



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

RAFAEL OSTI DE MELO

**FORMAÇÃO DE BIOFILME EM CATÉTER URINÁRIO POR  
*Proteus mirabilis* UROPATOGÊNICO**

---

Londrina  
2010

RAFAEL OSTI DE MELO

**FORMAÇÃO DE BIOFILME EM CATÉTER URINÁRIO POR**  
***Proteus mirabilis* UROPATOGÊNICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção de título de Mestre em Microbiologia

Orientador(a): Profa. Dra. Jacinta Sanchez Pelayo

Londrina  
2010

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

M528f      Melo, Rafael Osti de.  
Formação de biofilme em cateter urinário por *Proteus mirabilis*  
uropatogênico / Rafael Osti de Melo. – Londrina, 2010.  
60 f. : il.

Orientador: Jacinta Sanchez Pelayo.  
Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de  
Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia, 2010.  
Inclui bibliografia.

1. *Proteus* (Bactéria) – Teses. 2. Infecções urinárias – Teses. 3. Aparelho  
urinário – Cateteres – Teses. 4. Biofilme – Teses. 5. 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

RAFAEL OSTI DE MELO

**FORMAÇÃO DE BIOFILME EM CATÉTER URINÁRIO POR *Proteus mirabilis* UROPATOGÊNICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção de título de Mestre em Microbiologia

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Profª. Dra. Halha Ostrensky Saridakis  
UEL – Londrina - PR

---

Profª. Dra. Marilucia Santos Ludovico  
UEL – Londrina - PR

Londrina, 29 de Março de 2010.

Dedico este trabalho principalmente a meu pai João Batista “*in memoriam*”, cujo esforço incondicional e exemplo, criaram as bases morais e emocionais que regem minha vida pessoal e profissional, e à Katia, pela ajuda, afeto e paciência durante a execução deste.

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Jacinta Sanchez Pelayo pela orientação, ensinamentos, horas e horas de seu concorrido tempo, confiança, paciência e principalmente pela amizade.

À Profa. Dra. Halha Ostrensky Saridakis pelos inúmeros e valiosos conselhos que contribuíram e muito para a realização deste trabalho, e pela bondade e paciência, carinho e amizade que guardarei pra sempre.

À Profa. Dra. Marilucia Santos Ludovico pela ajuda na condução dos experimentos, apoio, dicas, orientação e amizade

À Profa. Dra. Eliana Carolina Vespero, pelas valiosas dicas que deram rumo ao trabalho desenvolvido

À Profa. Dra. Célia G. T. J. Andrade pela disponibilização do laboratório e ao técnico pela ajuda na realização da microscopia eletrônica.

Aos meus amigos de bancada Silvia, Claci, Michelle, Marcus e Fernando pela ajuda importantíssima na realização dos experimentos, pelo tempo que passamos no laboratório, risadas, muita dedicação ao trabalho e amizade.

Aos amigos Carlos Alfredo, Alessandra, Raquel, Claudia, Karen, Ariane que fizeram parte do laboratório de Bacteriologia, e sempre participaram da minha formação desde a graduação

Às meninas do interlaboratório que tanto me ajudaram Claci e Iara, pelos materiais, cafezinhos e cafés da manhã, e principalmente às boas conversas e amizade que nunca esquecerei.

Aos docentes do programa pelo conhecimento transmitido.

À Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo aporte financeiro.

A toda minha família, cujo sacrifício proporcionou a conclusão de mais esta etapa da minha vida.

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

**OBRIGADO**

*"O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis".*

**(Fernando Pessoa)**

MELO, Rafael Osti de. **Formação de Biofilme em Catéter Urinário por *Proteus Mirabilis* Uropatogênico**. 2010. 60 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

## RESUMO

*Proteus mirabilis* é a 3<sup>a</sup> causa mais comum (depois de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*) de infecção do trato urinário complicada (causando 12% das infecções) e a segunda causa mais comum (depois de *Providencia stuartii*) de bacteriúria relacionada a cateter em grupos de pacientes com cateter de demora (15% de infecção). Essas infecções são conhecidas por serem freqüentemente persistentes, de difícil tratamento e até fatais, dependendo da severidade da doença nos pacientes. As complicações da infecção em pacientes cateterizados incluem o desenvolvimento de urolitíase, obstrução do trato urinário e de cateteres, formação de cálculos na bexiga e rins, e bacteriúria. *P. mirabilis* pode colonizar o cateter e formar biofilme tanto em sua superfície quanto em seu lúmen, e a atividade de sua urease libera amônia a partir da uréia, elevando o pH da urina. Sob estas condições alcalinas, precipitam-se cristais de estruvita e apatita os quais podem aderir ao biofilme. Com o desenvolvimento desse, o fluxo urinário no cateter pode ser obstruído causando incontinência, devido ao vazamento da urina sobre o cateter ou retenção de urina na bexiga a qual resulta em distensão dolorosa. O refluxo da urina infectada para os rins podem culminar em episódios de pielonefrite, septicemia e choque séptico. A presença do biofilme constitui ainda uma forma de defesa do microrganismo frente ao tratamento com antibióticos cuja ação seria normalmente eficaz em combater as infecções urinárias causadas por espécies de *Proteus*. Os objetivos do presente estudo incluem verificar a formação de biofilme por *P. mirabilis* em superfície abiótica, quantificar a capacidade e tempo de formação, estrutura e características do biofilme em cateter urinário na presença e ausência de urina.

**Palavras-chave:** *Proteus mirabilis*. Cateter urinário. Biofilme. Urina.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Fatores de virulência de <i>P. mirabilis</i> associados a ITU.....	14
<b>Tabela 2</b> – Fímbrias de <i>Proteus</i> e sua importância na patogenicidade.....	15

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Organização genética do operon mrp.....	16
<b>Figura 2</b> – Ciclo de <i>swarming</i> de <i>Proteus</i> crescendo em meio sólido .....	21
<b>Figura 3</b> – <i>Swarming</i> de colônias de <i>P. mirabilis</i> em Agar.....	22
<b>Figura 4</b> – Formação in vitro de cristal por <i>P. mirabilis</i> em ágar urina .....	26
<b>Figura 5</b> – Material cristalino que bloqueou cateter .....	30

## ANEXO

<b>Figura 6</b> – MEV de <i>Proteus mirabilis</i> (TSB - 4 horas) .....	55
<b>Figura 7</b> – MEV de <i>Proteus mirabilis</i> (TSB - 12 horas) .....	56
<b>Figura 8</b> – MEV de <i>Proteus mirabilis</i> (TSB - 24 horas) .....	57
<b>Figura 9</b> – MEV de <i>Proteus mirabilis</i> (Urina - 4 horas) .....	58
<b>Figura 10</b> – MEV de <i>Proteus mirabilis</i> (Urina - 12 horas) .....	59
<b>Figura 11</b> – MEV de <i>Proteus mirabilis</i> (Urina - 24 horas) .....	60

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
1.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DE <i>PROTEUS MIRABILIS</i> E SEU PAPEL NAS INFECÇÕES URINÁRIAS .....	11
<b>2</b>	<b>FATORES DE VIRULÊNCIA DE <i>PROTEUS MIRABILIS</i> RELACIONADOS À INFECÇÃO URINÁRIA</b> .....	14
2.1	ESTRUTURAS DE SUPERFÍCIE .....	14
2.1.1	Fímbrias e Capacidade de Adesão .....	14
2.1.2	Flagelo e Motilidade .....	19
2.1.3	Cápsula .....	23
2.2	UREASE .....	23
2.3	FORMAÇÃO DE BIOFILME .....	27
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	32
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	42
4.1	OBJETIVO GERAL .....	42
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	42
	<b>ARTIGO CIENTÍFICO – FORMAÇÃO DE BIOFILME DE <i>PROTEUS MIRABILIS</i> UROPATOGÊNICO EM CATETER URINÁRIO</b> .....	43
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	52
	<b>ANEXOS</b> .....	54

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE *PROTEUS MIRABILIS* E SEU PAPEL NAS INFECÇÕES URINÁRIAS

*Proteus mirabilis* é um bacilo gram-negativo, anaeróbio facultativo, móvel com flagelos peritríquios. Esse microrganismo foi descrito primeiramente como bactéria putrificante por Hauser (1885) o qual considerou seu possível papel em eventos patológicos em organismos superiores, fato confirmado nas décadas subseqüentes (WENNER; RETTGER, 1919). Hoje, as espécies pertencentes ao gênero *Proteus* são tratadas como patógenos oportunistas capazes de causar infecções em seres humanos.

O gênero *Proteus* pertence à família *Enterobacteriaceae* (PENNER, 1984, 1992) e o traço mais característico que o distingue de outros membros desta família é o fenômeno “swarming”, uma diferenciação celular que facilita a movimentação e é importante no processo infeccioso desses microrganismos (WILLIAMS; SCHWARZHOF, 1978; MOBLEY; BELAS, 1995).

Os microrganismos pertencentes às espécies do gênero *Proteus* são amplamente distribuídos na natureza; podem ser encontrados em água poluída, solo e dejetos, onde desempenham papel importante na decomposição da matéria orgânica de origem animal (HAUSER, 1892). 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 desse gênero.

Atualmente, cinco espécies (*P. mirabilis*, *P. penneri*, *P. vulgaris*, *P. myxofaciens*, e *P. hauseri*) e três espécies genômicas não nomeadas (*Proteus* genoespécies 4, 5 e 6) foram descritas para o gênero (WILLIAMS et al., 1983; BRENNER et al., 1995; TRÜPER, 1999). A identificação e tipagem de isolados clínicos de *Proteus* podem ser feitas por análise computadorizada de padrões eletroforéticos de proteínas intracelulares (COSTAS, 1993), proteínas de membrana externa ou perfis enzimáticos (KAPPOS et al., 1992).

*Proteus* spp, sob condições favoráveis, é capaz de causar infecções nosocomiais, principalmente em pacientes geriátricos, psiquiátricos e paraplégicos bem como naqueles em unidades de terapia intensiva (UTI), os quais são, muitas vezes,

imunocomprometidos (MOBLEY, 1996; DE CHAMPS et al., 2000; O'HARA et al., 2000; NAGANO et al., 2003; KIM et al., 2004; LIMA, 2007). Essas infecções são associadas principalmente com as espécies *P. vulgaris*, *P. penneri*, e *P. mirabilis*, sendo esta última o patógeno mais comum o que pode ser explicado por sua maior frequência (25%) no intestino humano. Essa parte do corpo é o maior reservatório dessas bactérias nos humanos e isso pode resultar em autoinfecção ou transmissão da bactéria entre pacientes nos hospitais (CHOW et al., 1979).

As espécies de *Proteus* são importantes em infecções do trato urinário (ITU), as quais podem ser subdivididas em duas categorias: infecções hematogênicas (também conhecidas como infecções sistêmicas) e infecções ascendentes, nas quais a bactéria coloniza, passo a passo, o intróito, uretra, bexiga, ureter e no final, os rins (RUBIN et al., 1986). Esses microrganismos são mais associadas às infecções ascendentes, sendo *P. mirabilis* mais freqüente em pacientes usuários de cateter urinário (WARREN et al., 1982; WARREN et al., 1987) ou com anormalidades estruturais (SVANBORG et al., 1981), assim como após intervenção cirúrgica no trato urinário. Warren (1996) mostrou que *P. mirabilis* é a 3ª causa mais comum (depois de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*) de ITU complicada (12% de infecções) e a segunda causa mais comum (depois de *Providencia stuartii*) de bacteriúria relacionada a cateter em grupos de pacientes com cateter de demora (15% de infecção). As ITU causadas por *P. mirabilis* são conhecidas por serem freqüentemente persistentes, de difícil tratamento e até fatais, dependendo da severidade da doença nos pacientes. As complicações da infecção em pacientes cateterizados incluem o desenvolvimento de urolitíase, obstrução do trato urinário e de cateteres, formação de cálculos na bexiga e rins, e bacteriúria (WARREN, 1997; NIEL-WEISE; van den BROEK, 2005). Larsson et al. (1978) relataram que *P. mirabilis*, quando presente nos rins, pode causar danos severos aos tecidos devido à reações inflamatórias à infecção, caracterizados como pielonefrite aguda.

As infecções urinárias associadas a cateter (ITUAC) são as causas mais comuns de infecção nosocomial, respondendo por aproximadamente um milhão de casos anualmente (TAMBYAH; MAKI, 2000), ou seja, 80% de todas as ITU hospitalares e 40% de todas as infecções em hospitais e internações domiciliares (PLOWMAN et al., 2001; KALSI et al., 2003). Devido a esta alta incidência, o custo global da intervenção médica de ITU hospitalar é impressionante, com uma estimativa de 424 milhões a 451 milhões de dólares gastos anualmente (JARVIS, 1996). Além disso, a bacteremia associada a cateter custa, por episódio, cerca de 2.900 dólares (SAINT, 2000). O aumento do custo inclui terapia

antimicrobiana, aumento do tempo de internação, consultas médicas e morbidade (FOXMAN, 2002).

Indivíduos que requerem cateterização são predispostos ao desenvolvimento de ITUAC devido à própria presença do dispositivo e de organismos multi-resistentes patogênicos no ambiente hospitalar (JACOBSEN et al., 2008). Apesar da ameaça iminente de infecção por estas cepas, a maioria dos casos de bacteriúria associada ao cateter é assintomática. No entanto, quando um episódio de ITUAC torna-se sintomático, os sintomas podem variar de leves (febre, uretrite e cistite) a graves (pielonefrite aguda, formação de cálculos e bacteremia). Essas, quando não tratadas, podem levar a sepse e morte (NIELWEISE; van den BROEK, 2005). Estas infecções normalmente são recorrentes e resultam em morbidade, devido à presença de incrustações e obstrução do cateter por biofilme cristalino (STICKLER; ZIMAKOFF, 1994). Uma vez que a incidência de ITUAC sintomática é um importante problema de saúde, a investigação dirigida à compreensão da patogênese dessas infecções se justifica e deve levar a novos e melhores diagnóstico, prevenção e opções de tratamento (JACOBSEN et al., 2008).

*Proteus mirabilis* tem grande importância nas ITUAC principalmente devido aos seus fatores de virulência e à frequente formação de biofilme cristalino que acaba por complicar ainda mais a infecção, conferindo maior resistência a antibióticos, antissépticos e resposta imune do hospedeiro, sendo importante o reconhecimento dessa bactéria, pois os resultados obtidos em cultura podem não refletir uma bacteriúria verdadeira, podendo ocorrer falha no tratamento pela persistência dos microrganismos aderidos (STICKLER, 2001; STORTI et al., 2005; JACOBSEN et al., 2008).

## 2 FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Proteus mirabilis* RELACIONADOS À INFECÇÃO URINÁRIA

Os fatores de virulência e características de *P. mirabilis* importantes na infecção urinária estão especificados na Tabela 1. Breves descrições são apresentadas abaixo.

**Tabela 1** – Fatores de virulência de *P. mirabilis* associados a ITU

<b>Fator de virulência</b>	<b>Contribuição para a patogenicidade</b>
Fímbria	Aderência da bactéria ao tecido epitelial
Flagelo (fenômeno <i>swarming</i> )	Ascensão da bactéria do ureter aos rins
Urease	Elevação do pH durante o crescimento bacteriano resultando em formação de cálculos; citotoxicidade para células epiteliais do túbulo proximal humano
Cápsula (CPS)	Formação de biofilme e cálculos

**Fonte:** Rozalski; Sidorczyk; Kotelko (1997)

### 2.1 ESTRUTURAS DE SUPERFÍCIE

Nas interações entre patógenos bacterianos e células do hospedeiro, um papel significativo é desempenhado por estruturas de superfície da bactéria (ex., fímbrias, flagelo, cápsula, etc.). No caso de *P. mirabilis* está comprovado que as estruturas de sua superfície são muito importantes para sua virulência, particularmente auxiliando na adesão, colonização do trato urinário e formação de cálculos (ROZALSKI; SIDORCZYK; KOTELKO, 1997).

#### 2.1.1 Fímbrias e Capacidade de Adesão

A adesão à superfície do epitélio do hospedeiro é um dos fatores mais importantes de virulência bacteriana (NUNES, 2009), sendo destaque no início das ITU. *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* (ROCHA; PELAYO; ELIAS, 2007; OELSCHLAEGER; DOBRINDT; HACKER, 2002; ALAMURI et al., 2010) Silverblatt (1974) observou em uma infecção ascendente experimental que uma cepa de *P. mirabilis* intensamente fimbriada causou pielonefrite com maior eficácia do que aquela com poucas fimbrias. Por outro lado, as fimbrias diminuem a capacidade de *Proteus* infectar o parênquima renal por via hematogênica (ROCHA; PELAYO; ELIAS, 2007).

Estudos de ultra-estruturas (DUGUID; GILLIES, 1957; BRINTON, 1965; SILVERBLATT; OFEK, 1978) mostraram dois tipos de fimbrias em cepas de *P. mirabilis* – espessas (aproximadamente 7nm de diâmetro) e delgadas (4nm de diâmetro). O primeiro tipo, também conhecido como fimbria tipo IV, é manose-resistente e foi nomeada fimbria manose-resistente *Proteus*-like (MR/P). A segunda é a fimbria tipo III ou fimbria manose-resistente *Klebsiella*-like (MR/K) (OLD; ADEGBOLA, 1982; ADEGBOLA et al., 1983; CLEGG; GERLACH, 1987; GABIDULLIN; ISHKILDIN, 1989;). Silverblatt e Ofek (1978) demonstraram que a fimbria MR/P é mais importante para a aderência da bactéria ao epitélio do que as hemaglutininas MR/K. Essa capacidade de adesão não depende do tipo de célula hospedeira, podendo, a fimbria, se ligar tanto a células epiteliais bucais humanas como células renais de coelho.

**Tabela 2** – Fimbrias de *Proteus* e sua importância na patogenicidade

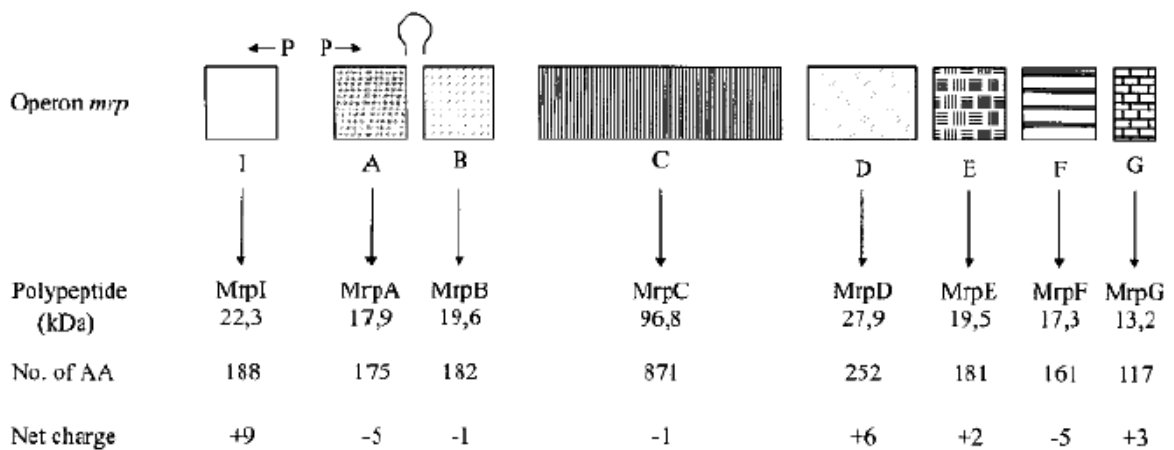
<b>Tipo de fimbria</b>	<b>Contribuição para a patogenicidade</b>
MR/P	Colonização da parte superior do trato urinário
MR/K	Associada a adesão das cepas aos cateteres
PMF	Colonização da bexiga e dos rins
NAF	Adesão às células uroepiteliais

### ***Fimbria MR/P***

A fimbria MR/P (21 kDa) foi isolada e purificada pela primeira vez por Sareneva, Holthöfer e Korhonen (1990) da cepa de *P. mirabilis* 3087. Ela possui, *in vitro*,

maior afinidade pelo epitélio uretral da parte inferior do trato urinário. Segundo os autores a adesão pode ser completamente inibida pelos fragmentos Fab dos anticorpos contra a fimbria purificada

Bahrani e Mobley (1993) a subunidade maior dessa fimbria, designada proteína MrpA, tem massa molecular de 18,5 kDa e é codificada pelo operon *mrpA*. Em outro estudo foi relatado que MrpA é similar à adesina de células uroepiteliais (WRAY et al., 1986)(elas possuem fragmentos idênticos de 10 aminoácidos), mas não à fimbria MR/P isolada por Sareneva, Holthöfer e Korhonen (1990).



**Figura 1** – Organização genética do operon *mrp* e características previstas dos polipeptídeos fimbriais da MR/P. AA, aminoácidos. P indica suposta seqüência do promotor. As setas indicam a direção de transcrição. A estrutura de loop acompanha *mrpA*. Os valores mostrados são para o polipeptídeo não processado. Adaptado de BAHRANI; MOBLEY (1994).

Bahrani e Mobley (1994) verificaram, por comparação com a seqüência de aminoácidos de proteínas que compõem fimbrias de outros microrganismos como, fimbria tipo “1” e “P” de *E. coli* e, a hemaglutinina manose-resistente de *Serratia marcescens*, que a fimbria MR/P possui similaridades significativas com essas, podendo ser classificada como chaperone/usher (NUCCIO; BAUMLER, 2007).

Outros genes envolvidos na expressão da fimbria MR/P tem sido identificados. O cluster do gene *mrp*, organizado de forma similar a outros operons fimbriais, possui oito polipeptídeos (Figura 1) (BAHRANI; MOBLEY, 1994).

A fimbria MR/P é altamente imunogênica. Ratos infectados com cepas de *P. mirabilis* MR/P positivas produziram anticorpos específicos cujo nível aumentou em animais infectados cronicamente (BAHRANI et al., 1994).

A fimbria MR/P atua na adesão de *P. mirabilis* às células HEP-2, o que sugere a importância dessa fimbria na colonização e infecção causada por esse microrganismo (ROCHA et al., 2007).

### ***Fímbrias MR/K***

As fímbrias MR/K são completamente diferentes das fímbrias MR/P quanto ao padrão de adesão tecidual. Elas ligam-se fortemente à cápsula de Bowman do glomérulo e à membrana basal tubular e não aderem às células do sedimento urinário (SARENEVA; HOLTHÖFER; KORHONEN, 1990). As MR/K são mais frequentes em *P. penneri* do que em *P. mirabilis* (YAKUBU, OLD, SENIOR, 1989).

As MR/K são fortemente associadas com a adesão das cepas a cateteres e persistência de bacteriúria relacionada a cateter. Isso foi detectado primeiramente em infecções por *P. stuartii* em pacientes idosos cateterizados (MOBLEY et al., 1988). Roberts, Fussell e Kaach (1990) observaram que dentre muitas espécies gram-negativas como, *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., *E. coli.*, *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp.; *P. mirabilis* foi a que mais aderiu aos cateteres. Foi observada alta afinidade da MR/K aos substratos poliméricos usado na produção do cateter, por exemplo, etileno, propileno, poliestireno e poliestireno sulfonado (HAWTHORN; REID, 1990). Foi relatada também aderência significativa de cepas de *P. mirabilis* a polimetilmetacrilato (PMMA) (material artificial usado em artroplastia) e PMMA contendo gentamicina (CHANG; MERRITT, 1991). Por outro lado, *P. mirabilis* não adere à proteína de Tamm-Horsfall, que contém glicoproteínas, ligando-as a fimbria tipo I. A proteína de Tamm-Horsfall é produzida nos rins e então liberada na urina junto com a bactéria ligada por fímbrias manose sensíveis (Fímbrias MS). A produção de MR/K na ausência de fímbrias MS é provavelmente comum a todas as espécies de *Proteus* e é responsável pela persistência dessas bactérias em infecções crônicas do trato urinário (YAKUBU, OLD, SENIOR, 1989).

### ***Fímbria Proteus mirabilis (PMF)***

Bahrani et al. (1993) relataram o isolamento e seqüenciamento do gene *pmfA* relacionado com a PMF como sendo uma seqüência de 552pb responsável pela codificação de um polipeptídeo de 184 aminoácidos.

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

Para avaliar a participação da PMF na virulência de *P. mirabilis*, um mutante *pmfA* que não expressa a proteína de 18,9 kDa foi construído e usado no modelo animal de ITU ascendente (MASSAD et al., 1994). A colonização das bexigas dos ratos por esse mutante foi 83 vezes inferior à das cepas selvagens. Isso mostra que a PMF pode reconhecer e aderir a um receptor específico na bexiga. Uma vez que os mutantes *pmfA* colonizam os rins, de maneira similar às cepas selvagens, outras fímbrias podem ser importantes para aderência ao epitélio renal. Todos esses dados sugerem o importante papel da PMF na colonização da bexiga, mas não dos rins.

Porém em estudos conduzidos por Zunino et al. (2003), utilizando cepa de *P. mirabilis*, P2, construída por conjugação da cepa de *Proteus* Pr2921 (selvagem) com a cepa de *E. coli* SM101pir descrita por Legnani-Fajardo et al. (1996) os dados obtidos confirmaram, ao contrário de trabalhos anteriores, que cepas de *P. mirabilis* uropatogênicas que produzem a PMF aderiram às células renais de ratos. Seus experimentos *in vitro* sugeriram que as PMF têm participação na aderência e colonização do trato urinário pelo menos durante os estágios iniciais da infecção.

### ***Adesina de célula uroepitelial/ Fímbria não aglutinante (NAF)***

Wray et al. (1986) isolaram e identificaram uma proteína, denominada adesina de célula uroepitelial (UCA), de um isolado uropatogênico de *P. mirabilis* HU 1069. A organização morfológica da UCA remete a estrutura em forma de bastão, típica de fímbrias que também são vistas em organismos intactos. Bijlsma et al. (1995) mostraram por microscopia eletrônica que a UCA sintetizada por cepas de *P. mirabilis* associadas a ITU de cães correspondem a uma fímbria delgada com diâmetro de 4 nm. A maior expressão desta adesina foi vista durante a capacidade máxima de aderência da bactéria às células epiteliais, o

que sugeriu que a proteína investigada agia como fimbria, responsável pela adesão bacteriana ao uroepitélio.

O maior fragmento dessa proteína, responsável pela adesão, tem massa molecular de 17,5 kDa. A seqüência de aminoácidos da porção N-terminal da UCA revelou homologia à fimbria K99 de *E. coli*. A razão para isso não é clara, já que essas ambas se ligam a tecidos diferentes: K99 ao epitélio intestinal de gado e eritrócitos de carneiro, e a UCA às células esfoliadas do trato urinário humano. No entanto, foi observada homologia menor entre a UCA e a fimbria tipo I de *E. coli*. Esses achados sugeriam que a UCA era uma adesina de epitélio intestinal (WRAY et al., 1986).

O seqüenciamento do gene *ucaA* realizado por Cook et al. (1995) demonstrou homologia na seqüência de aminoácidos entre a proteína UcaA e o terminal amino da hemaglutinina G de *E. coli* causadora de pielonefrite. Foi detectado ainda homologia significativa de aminoácidos entre a UcaA e proteínas pilinas de outros gêneros, incluindo *Haemophilus influenzae* (34%) e *Bordetella pertussis* (32%), ambas associadas a doenças respiratórias, e as hemaglutininas tipo Ic de *Klebsielliae* (31%) e *E. coli* (28%).

Segundo Bijlsma et al. (1995), o gene completo da *ucaA* é composto por 540pb e codifica um polipeptídeo de 180 aminoácidos, de massa molecular de 16 kDa. Esse gene foi encontrado em todos os isolados de *P. mirabilis* testados.

Foi demonstrado, *in vitro*, que a aderência de *P. mirabilis* às células da linhagem HEP-2 pode ser inibida pela pré-incubação da bactéria com anticorpos monoclonais contra a UCA. Isso sugere a importância desse tipo de fimbria em infecções causadas por esses microrganismos (TOLSON et al., 1997).

### 2.1.2 Flagelo e Motilidade

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; MOODY; MASON, 1980; MORTIE et al., 1982) foi demonstrada.

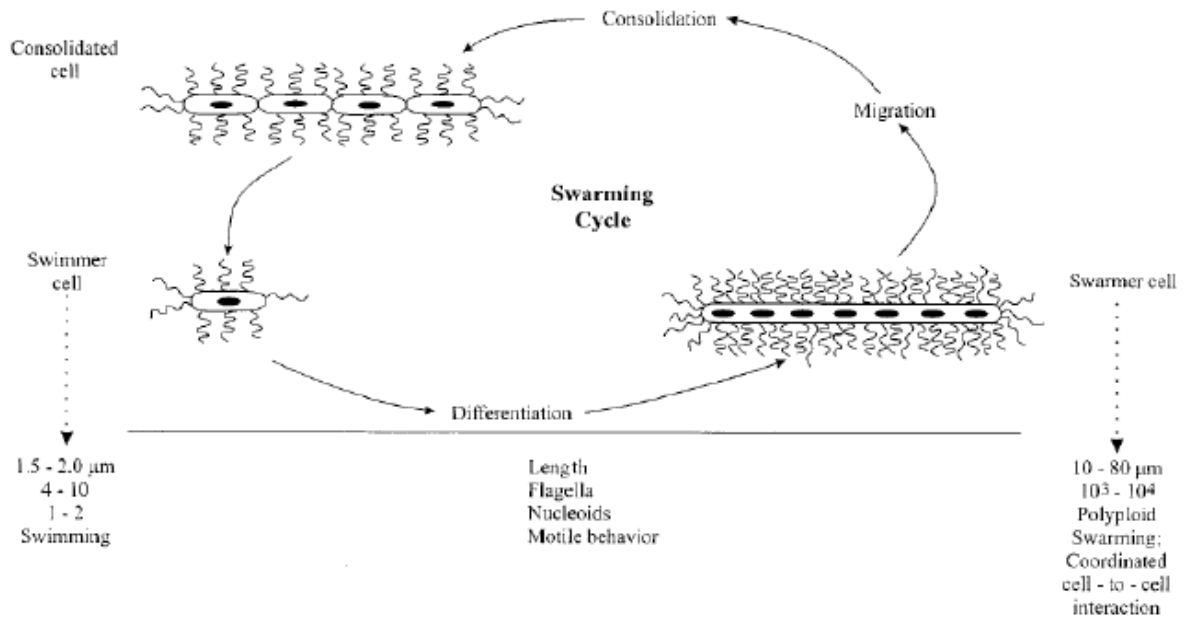
*Proteus* são bactérias que quando cultivadas *in vitro* em meio líquido, apresentam comportamento de células planctônicas (*swimming*) e com morfologia típica; são

bastonetes móveis, com flagelos peritríquios (6 a 10 por célula), com 1,0 a 2,0 µm de comprimento. Esses bastonetes, definidos como células *swimmer*, são similares em muitos aspectos de sua fisiologia a outros membros da família *Enterobacteriaceae*. Quando transferidos a meios sólidos, sofrem diferenciação em células *swarmer* e espalham-se na superfície do meio, formando um fino véu. Esse tipo de crescimento é denominado fenômeno *swarming* (ARMITAGE; SMITH; ROWBURY, 1979; BELAS, 1992; MOBLEY; BELAS, 1995) também apresentados por outros microrganismos gram-negativos como *Vibrio* sp. e *Serratia* sp. bem como os microrganismos gram-positivos *Bacillus* sp. e *Clostridium* sp. (HENRIKSEN, 1972; MCCARTER; SILVERMAN, 1989; ALBERTI; HARSHEY, 1990).

Esse fenômeno pode simplesmente ser descrito como a diferenciação de bastonetes curtos em células longas não septadas, multinucleadas que vão de 20 a 80µm de comprimento, acompanhada de aumento de 50 a 500 vezes o número de flagelos (Figura 2). Os flagelos recém sintetizados nas células *swarmer* são compostos pela mesma proteína (flagelina – 36,7 kDa) presente nos flagelos das células *swimmer* (BELAS; ERSKINE; FLAHERTY, 1991). A conversão morfológica de célula *swimmer* em *swarmer* coincide com algumas mudanças estruturais e bioquímicas, como diferenças no nível de algumas proteínas e expressão de algumas enzimas, por exemplo, triptofanase, fenilalanina desaminase, urease, bem como da hemolisina HpmA (ALLISON; LAI; HUGHES, 1992) e também o aumento do número de nucleóides proporcional ao crescimento da célula e predominância de cadeias laterais longas do lipopolissacarídeo (LPS) (ROZALSKI; SIDORCZYK; KOTELKO, 1997).

O fenômeno *swarming* possui três fases. Além da diferenciação mencionada acima, ocorrem migração da massa bacteriana e consolidação (BELAS, 1992). Uma célula individual, separada da população bacteriana, é incapaz de se mover na placa de Agar a menos que seja engolfada por outras células *swarmer*. Assim, o *swarming* pode ser considerado um processo de diferenciação multicelular coordenado induzido pela superfície em que se encontra o microrganismo. Esse fenômeno inicia-se quando um grupo de células *swarmer*, em meio sólido, migram rapidamente e coordenadamente a partir do início colônia e continuam até a diminuição do número de células *swarmer* ou por mudança de direção da migração (BELAS, 1992). Essa parada de movimento é acompanhada por diferenciação celular da célula *swarmer* em *swimmer*, fase chamada de consolidação. Todo o processo de diferenciação, migração e consolidação, é repetido várias vezes até que a superfície do agar seja coberta por anéis concêntricos formados pelas *swarmers* durante o movimento do centro da colônia para a periferia da placa (Figura 3). As células *swarmers* são formadas somente quando a bactéria cresce em meio sólido; quando removidas e transferidas para meio líquido,

diferenciam-se em células swimmer por formação de septo, divisão celular e redução de síntese flagelar, desde que não haja resistência mecânica como o fluxo de urina na uretra. (BELAS, 1992).



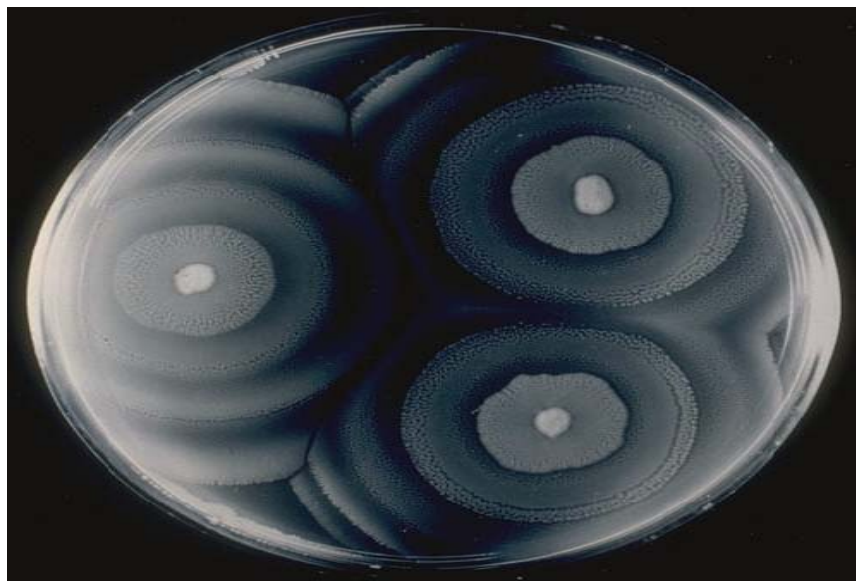
**Figura 2** – Ciclo de *swarming* de *Proteus* crescendo em meio sólido (ALLISON; LAI; HUGHES, 1992; MOBLEY; BELAS, 1995). A diferenciação em célula *swarmer* e sua movimentação são cíclicas. O bacilo vegetativo (célula *swimmer*), como observado em cultura líquida, diferencia-se no meio sólido em célula 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 diferenciação, são revertidas a células *swimmer*. (ROZALSKI; SIDORCZYK; KOTELKO, 1997)

Um material gelatinoso extracelular foi postulado por Stahl, Stewart e Williams (1983) como fator que facilita a translocação das células *swarmer*. Gygi et al. (1995b) mostraram que a translocação dessa população de células de *P. mirabilis* em meio sólido é facilitada pelo polissacarídeo da superfície celular, enriquecido em ácido galacturônico e *N*-acetilgalactosamina, provavelmente reduzindo a fricção na superfície. Esse polissacarídeo parece ser diferente da porção “O” do LPS por não conter os açúcares mencionados acima.

Allison, Lai e Hughes (1992) demonstraram que ao contrário das células vegetativas, as células *swarmer* de *P. mirabilis* mostram aumento substancial na atividade de urease intracelular, hemolisina extracelular (HpmA [hemolisina *Proteus mirabilis*]), e metaloproteases, ao contrário das células *swimmers*, portanto pode-se considerar esse tipo celular como as formas capazes de causar infecção (ALLISON et al., 1994).

Uma contribuição muito importante para o entendimento do fenômeno *swarming* foi a descoberta da molécula sinalizadora que inicia a diferenciação e a migração celular. Allison et al. (1993) consideram a glutamina como um quimioatrativo específico pra essas células. Após a suplementação com glutamina, formas filamentosas típicas sintetizando altos níveis de flagelina e hemolisina foram isoladas das periferias da colônia. Comparadas às células *swimmer*, os níveis de RNAm transcritos dos genes de hemolisina (*hpma*) e flagelina (*fliC*), foram visivelmente aumentados nas células *swarmer* durante a diferenciação dependente de glutamina (ALLISON et al., 1993)

A alta viscosidade e a possível presença de anticorpos antflagelares em meios de cultura como a Agar sangue, são outros tipos de sinais envolvidos na diferenciação celular de *P. mirabilis*. Ambos inibem a rotação normal do filamento flagelar, resultando em expressão anormal da diferenciação de células *swarmer* (GYGI et al., 1995a; BELAS, 1996). A função do flagelo, então, pode ser como sensor tátil das condições externas de crescimento que transfere diretamente os sinais de fora para dentro das células (ROZALSKI; SIDORCZYK; KOTELKO, 1997).



**Figura 3** – Swarming de colônias de *P. mirabilis* em agar.

### 2.1.3 Cápsula

Por um longo tempo, acreditava-se que cepas de *P. mirabilis* não produziam cápsulas típicas, característica de algumas bactérias gram-negativas, como, *Klebsiella* sp. ou cepas específicas de *E. coli*. Foi comprovado que a estrutura da cápsula, chamada de material gelatinoso ou glicocálice (polímeros altamente hidratados, presentes na superfície bacteriana), é um fator importante nas infecções causadas por cepas de *Proteus* devido à participação no desenvolvimento do cristal de estruvita e formação de cálculos (BEYNON et al., 1992; DUMANSKI et al., 1994). As cápsulas de *Proteus* tendem a ser ácidas, devido à presença de ácidos urônicos, piruvato ou grupos fosfato e permitem a esta estrutura ligar-se a cátions metálicos, tais como  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  (ROZALSKI; SIDORCZYK; KOTELKO, 1997) via interações eletrostáticas. Dumanski et al. (1994) compararam a formação de estruvita em urina, *in vitro*, na presença de CPS de estrutura conhecida e variação da carga. Verificaram que a cápsula de *P. mirabilis* ATCC 49965 alavanca a formação de cristais de estruvita e que esse efeito é correlacionado com a baixa afinidade dessa cápsula por  $\text{Mg}^{2+}$ . Os autores especularam que a fraca ligação de  $\text{Mg}^{2+}$  pela CPS facilita o desenvolvimento de cristais de estruvita, pois os íons magnésio sendo acumulados, podem ser prontamente liberados do LPS para a formação de cálculos (DUMANSKI et al., 1994).

## 2.2 UREASE

A uréia representa o principal produto nitrogenado excretado por humanos através da urina e na maioria dos animais. A urease (uréia amidohidrolase; EC 3.5.1.5[*Enzyme Commission number*]) catalisa a hidrólise desse composto para produção de amônia e dióxido de carbono, que resulta no aumento do pH da urina (MCLEAN et al., 1988; MOBLEY; HAUSINGER, 1989; CLAPHAM et al., 1990; MOBLEY; ISLAND; HAUSINGER, 1995). A urease é encontrada em mais de 200 espécies de bactérias gram-negativas e gram-positivas (GRIFFITH; MUSER; ITIN, 1976; MCLEAN et al., 1988; MOBLEY; BELAS, 1995; MOBLEY; ISLAND; HAUSINGER, 1995). Essa enzima tem sido implicada como fator contribuinte na patogenicidade de muitas bactérias, incluindo espécies de *Proteus*, *Providencia*, e *Morganella* (GUO; LIN, 1965; MAGANA-PLAZA; RUIZ-HERRERA, 1967;

MAGANA-PLAZA; MONTES; RUIZ-HERRERA, 1971; PENNER et al., 1976; SENIOR; BRADFORD; SIMPSON, 1980; ROSENSTEIN; HAMILTON-MILLER; BRUMFITT, 1981; JONES; MOBLEY, 1987). A produção da urease por essas bactérias é usada para distingui-las de outros membros da família *Enterobacteriaceae*. Essa atividade é constitutiva na maioria das cepas de *P. mirabilis* (MOBLEY; HAUSINGER, 1989) podendo ser induzível em algumas (MOBLEY; JONES; PENNER, 1987). É característica das ureases bacterianas sua associação com níquel (Ni<sup>0</sup>) e seu alto número de resíduos de cistina (ARONSON et al., 1979; MOBLEY; CHIPPENDALE, 1990; RANDO et al., 1990; SRIWANTHANA et al., 1994).

Métodos de microscopia eletrônica mostraram que a urease de *P. mirabilis* estava associada ao periplasma e à membrana externa (MACLEAN et al., 1986). Resultados opostos foram obtidos em estudos de fracionamento de células, os quais mostraram que a urease de *P. mirabilis* está, majoritariamente, presente na fração citoplasmática solúvel (JONES; MOBLEY, 1988). No entanto, é importante notar que a detecção foi feita pelo monitoramento do produto da hidrólise, isto é, amônia e não a urease propriamente dita. A urease de *P. mirabilis* na sua forma nativa é uma proteína de 212-280 kDa contendo as subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  (JONES; MOBLEY, 1987; BREITENBACH; HAUSINGER, 1988; MOBLEY; HAUSINGER, 1989). Ela permanece estável por 24 horas em pH 7 em temperatura de 10 a 0°C, já a 37°C a estabilidade é observada somente na faixa de pH 8 a 9 (BREITENBACH; HAUSINGER, 1988). Em pH 7,5 a urease foi estável por 10 minutos a 60°C e completamente inativada em temperaturas mais altas (MOBLEY; HAUSINGER, 1989). O valor do *K<sub>m</sub>* dessa enzima varia de 13 a 60 mM de uréia. (BREITENBACH; HAUSINGER, 1988; JONES; MOBLEY, 1987). A atividade da enzima pode ser inibida por várias substâncias, como análogos estruturais de uréia (hidroxiuréia, tiouréia, e metiluréia), ácidos hipúrico e acetohidroxâmico, fosforamidas e ácidos bórico e borônico (BREITENBACH; HAUSINGER, 1988; MOBLEY; HAUSINGER, 1989). Um aumento na atividade da urease foi observado em inserção pós-traducional de níquel (RANDO et al., 1990).

A urease de *Proteus* é homóloga à urease de *Klebsiella pneumoniae* (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 regulador positivo e *ureR* como indutor (NICHOLSON et al., 1993).

A formação de cálculos é o papel primário da urease durante as ITU causadas por *P. mirabilis*. A função secundária é o aumento de níveis tóxicos de amônia mediados pela hidrólise da uréia que resulta em dano aos tecidos, incluindo o epitélio renal (MUSHER et al., 1975). Foi demonstrado por (GRIFFITH; OSBORNE, 1987) que a amônia é tóxica à camada de glicosaminoglicana, protetora do uroepitélio presente na superfície da bexiga, para bloquear efetivamente a aderência da bactéria a este epitélio.

O papel da urease em infecções tem sido estudado por inúmeros autores (BRAUDE; SIEMIENSKI, 1960; MUSHER et al., 1975; MOBLEY et al., 1988) comprovando-se que essa enzima é fator de virulência importante em cepas de *P. mirabilis*. Mobley et al (1991) mostraram *in vitro* que a urease apresenta efeito citotóxico sobre células epiteliais do túbulo proximal renal humano (HPRTEC) no entanto, de menor importância quando comparado ao efeito causado pela hemolisina HpmA. Por outro lado, estudos de ITU ascendentes com modelos animais mostraram que cepas produtoras de urease persistiram nos rins e na bexiga, ao contrário das não produtoras, e que causaram maior número de lesões renais severas (JONES et al., 1990; JOHNSON et al., 1993).

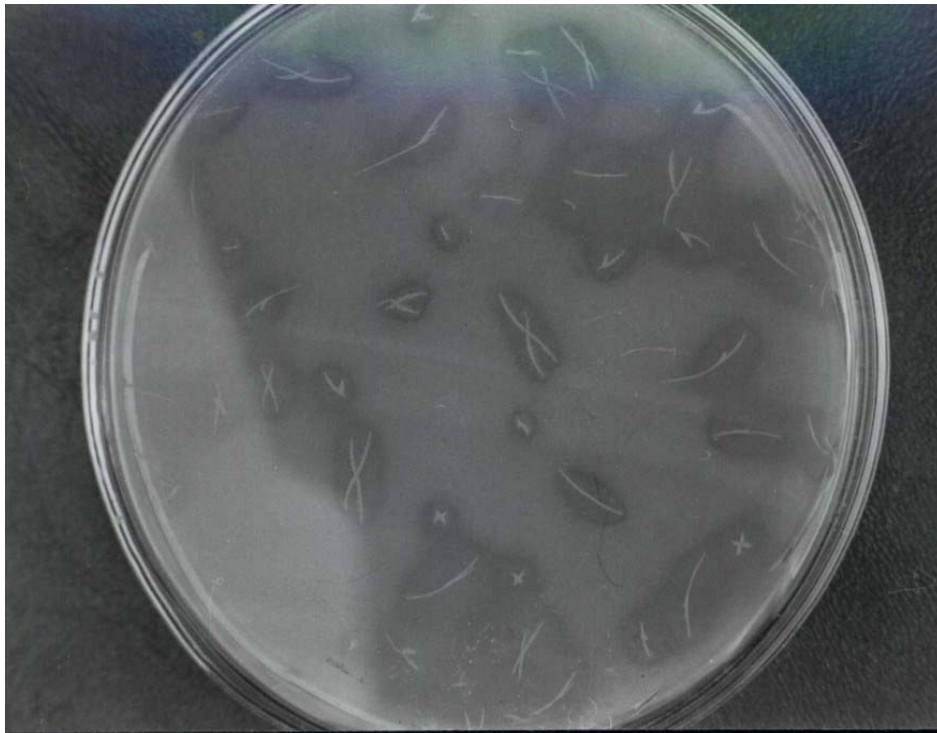
Muitos autores sugeriram que *P. mirabilis* produtor de urease desempenha função importante na formação de cálculos urinários decorrentes de infecção (MOBLEY; WARREN, 1987; RODMAN, 1998) e juntamente com *P. penneri* são os microrganismos mais comumente implicados na formação de cálculos nos rins e bexiga (ROSENSTEIN, 1986). A hidrólise da uréia pela urease libera  $\text{NH}_3$  que produz elevação do pH da urina, que por sua vez, resulta na precipitação dos componentes urinários como  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , os quais 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 formada por esse microrganismo também contribui no mecanismo de formação de cálculos. McLean et al. (1988) criaram, para esta bactéria, um conceito etiológico de formação de cálculos relacionado ao biofilme, o qual pode ser dividido nas seguintes etapas: (i) *P. mirabilis* ascende ao trato urinário, coloniza o uroepitélio e então forma micro-colônias que produzem 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 integram ao 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, ocorre formação de cristais de estruvita e carbonato de apatita e, finalmente, o cálculo maduro se assemelha a uma grande colônia de bactérias "fossilizada" (MACLEAN et al., 1985; NICKEL; EUTAG; COSTERTON, 1985; MCLEAN et al., 1988; CLAPHAM et al., 1990). 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*, confirmando o conceito de Maclean et al (1988)

*P. mirabilis* é a espécie mais freqüente quanto a formação de cálculos *in vivo* em comparação com outras bactérias produtoras de urease, uma vez que a urease produzida por esses microrganismos hidrolisa a uréia de 6-30 vezes mais rapidamente que a produzida por outros microrganismos (JOHNSON et al., 1993).

Silva et al. (2002) demonstraram *in vitro* que *P. mirabilis* foi capaz de formar cristais após 24-48h de incubação em agar urina, os quais apresentaram formato de X e posteriormente desenvolveram uma aparência dendrítica. (Figura 4).



**Figura 4** – Formação *in vitro* de cristal em forma de X ( ↔ ) e forma dendrítica ( → ) por *P. mirabilis* em Agar urina. Um *pool* de urina humana foi filtrado e adicionado à concentração final de 1% de Agar. As cepas de *P. mirabilis* foram semeadas sobre a superfície do Agar e incubadas a 37°C por 48h (SILVA et al., 2002)

### 2.3 FORMAÇÃO DE BIOFILME

O conceito de biofilme, segundo Costerton, Geesey e Cheng (1978) definiu que a maioria das bactérias cresce em um biofilme envolvido por uma matriz aderente às superfícies em todos os ecossistemas com nutrientes suficientes e que as bactérias sésseis (aderidas) diferem profundamente das planctônicas (flutuantes). No entanto, biofilmes têm sido descritos em muitos sistemas desde o século 17, quando Anthony Van Leewenhoek observou em seu rudimentar microscópio uma comunidade microbiana presente nas placas retiradas de seus dentes e que denominou de “animalículos”. Os dados sobre os quais essa teoria está baseada vêm da observação direta quantitativa de microrganismos por microscópio óptico mostrando que 99,9% ou mais das espécies bacterianas formam biofilme sobre várias superfícies diferentes (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; DONLAN; COSTERTON, 2002; DUNNE Jr., 2002).

O conceito de que as bactérias crescem preferencialmente em biofilmes envolvidos em uma matriz polimérica não foi imediatamente aceito nas áreas médica e odontológica. Contudo, novos métodos para exame direto de biofilme têm demonstrado que microrganismos responsáveis por infecções relacionadas a próteses ou dispositivos médico-hospitalares e outras infecções crônicas, realmente crescem em biofilmes dentro ou sobre esses sítios (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; DONLAN, 2002; STOODLEY et al., 2002).

A definição de biofilme tem evoluído nos últimos 30 anos. Marshall (1976) notou o desenvolvimento de “fibrilas extracelulares poliméricas muito finas” que ancoravam as bactérias às superfícies, já Costerton, Geesey e Cheng (1978) observaram que comunidades de bactérias aderidas estavam envolvidas em uma matriz de “glicocálice”, caracterizadas como polissacarídeos naturais e que essa matriz mediava a aderência. Mais tarde, Costerton et al. (1987) relataram que os biofilmes consistem de células simples e microcolônias, todas embebidas em uma matriz altamente hidratada e de exopolímeros predominantemente aniônicos.

Characklis e Marshall (1990) descreveram outros aspectos para definir os biofilmes, como as características da heterogeneidade espacial e temporal e o envolvimento de substâncias inorgânicas e abióticas presentes em uma matriz.

Costerton e Lappin-Scott (1995) relataram que a adesão das bactérias à superfície aumentava a expressão de genes que controlam a produção dos componentes

bacterianos necessários para a formação do biofilme, ou seja, que o processo era regulado pela indução e transcrição de genes específicos.

Em estudo posterior Donlan e Costerton (2002) definiram que o biofilme deriva de uma comunidade sésil de organismos, caracterizada por microrganismos que estão irreversivelmente aderidos a um substrato, a interface ou entre si, embebidos em matriz de substâncias poliméricas extracelulares produzidas por estes e que apresentam o fenótipo alterado com respeito à taxa de crescimento e transcrição de genes.

Mais recentemente, Klausen et al. (2006) e Clutterbuck et al. (2007), definiram que o biofilme é uma comunidade de bactérias aderidas a uma superfície biótica e/ou abiótica, envoltas por uma matriz polimérica produzida por elas mesmas, e essa associação promove vantagens de sobrevivência, como resistência a antimicrobianos, proteção contra anti-sépticos, desinfetantes, bacteriófagos e mecanismos de defesa do hospedeiro. A formação de biofilme é comum não somente em sistemas aquáticos como também no trato urinário, outros tecidos, superfícies abióticas (cateteres). Além de proteção para o microrganismo, o biofilme facilita a ligação de íons metálicos presentes no ambiente (ROZALSKI; SIDORCZYK; KOTELKO, 1997).

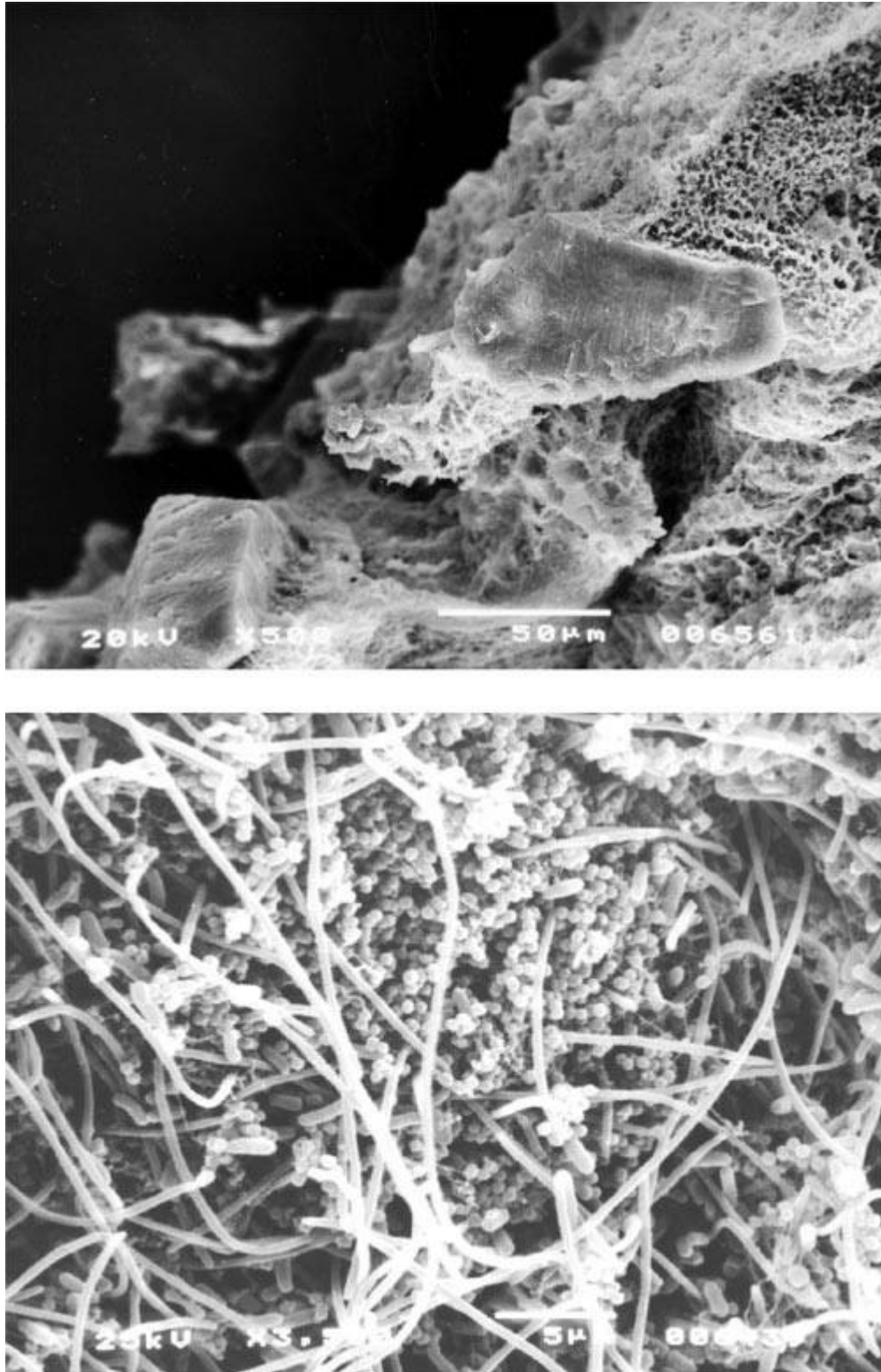
Análises de incrustações em cateteres uretrais demonstram, predominantemente, biofilmes contendo estruvita devido à ação da urease de *P. mirabilis* que cliva a uréia produzindo amônia e dióxido de carbono o qual, por sua vez, transforma-se em ácido carbônico. No entanto, a quantidade de amônia formada é maior do que a de ácido carbônico resultando em um decréscimo da concentração de H<sup>+</sup>, tornando a urina mais alcalina. Essa mudança do pH, como descrito anteriormente, contribui efetivamente para a solubilidade da estruvita e do fosfato de cálcio, porém a solubilidade do oxalato de cálcio não é afetada. A análise do tipo de incrustações formadas em diferentes valores de pH mostraram que, em pH mais ácido que 6,8 o composto predominante é o oxalato de cálcio, em pH mais alcalino que 6,8 o principal composto é a estruvita. A deposição de estruvita ocorre em frequência dez vezes maior em pH maior que 6,8 que a de oxalato em pH menor que 6,8 (MORRIS; STICKLER, 1998). O estudo das incrustações de bloqueadores de cateteres quase invariavelmente mostra a presença de *Proteus* sp., e quando a infecção por essa bactéria é erradicada, a tendência de bloqueio nos cateteres é abolida (JACOBSEN et al., 2008) comprovando assim, que a colonização por *Proteus* é de extrema importância no bloqueio de cateteres. Segundo Morris & Stickler (1998) o processo de incrustação segue alguns dos passos descritos na formação de cálculos e envolve 7 etapas descritas abaixo:

- 1 Adsorção de proteínas do hospedeiro no biomaterial. Isso é dependente, além da energia da superfície do biomaterial, de temperatura (febre) e da composição da urina;
- 2 Formação do filme primário, quando moléculas são depositadas no substrato protéico;
- 3 Aproximação e adesão bacteriana inicial. A partir desse ponto o processo é irreversível;
- 4 Colonização, crescimento e formação do biofilme bacteriano. A bactéria torna-se imobilizada na matriz polissacarídica e iniciam a produção de urease;
- 5 O pH urinário e do biofilme aumenta devido à produção dos íons amônio;
- 6 Os íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  são atraídos para a matriz. Este fato e a solubilidade diminuída do fosfato de cálcio e da estruvita resultam na próxima etapa;
- 7 Precipitação de cristais;

As bactérias contidas na camada de incrustação mostram características diferentes daquelas na urina. Enquanto as da urina, conhecidas como bactérias planctônicas, são móveis e metabolicamente ativas e relativamente sensíveis aos agentes antimicrobianos, dentro da camada de biofilme as bactérias são fenotipicamente distintas; são imóveis, metabolicamente menos ativas e a transferência de plasmídeos, incluindo os que conferem resistência aos antimicrobianos, é facilitada. Uma vez que o biofilme está estabelecido, a erradicação das espécies bacterianas de seu interior torna-se muito mais difícil (SHAW; CHOONG; FRY, 2005).

A formação de cálculos urinários durante ITU causada por *Proteus* sp. é característica deste tipo de infecção e é um processo crítico para o desenvolvimento do biofilme cristalino. Cálculos representam mais de 30% de todos os cálculos do trato urinário e representam cerca de 80% dos cálculos urinários classificados como coraliformes (HOCREITER; KNOLL; HESS, 2003).

Pedras no trato urinário superior são classificadas como cálculos coraliformes se à formação de pedra ocorrer na pelve renal e estender-se a pelo menos um dos cálices renais (MENG; STOLLER; MINOR, 2005).



**Figura 5** – Material cristalino que bloqueou cateter de um paciente após 4 dias. Os grandes cristais em forma de caixão (estruvita) (A), e os agregados microcristalinos são de fosfato de cálcio (apatita) (B). Adaptado de JACOBSEN et al. (2008).

A superfície luminal dos cateteres, particularmente os de látex, é extremamente irregular, principalmente nas bordas dos lumens (COX, 1990). Experimentos em modelos artificiais de bexigas sondadas nas quais os cateteres foram removidos em diferentes intervalos de tempo após infecção com *P. mirabilis*, para acompanhar os estágios iniciais da incrustação, demonstram a vulnerabilidade dos lumens à colonização (STICKLER, 2008).

Uma vez que o biofilme se desenvolve na superfície das células uroepiteliais ou cateteres, organismos dentro da estrutura típica em forma de cogumelo comunicam-se uns com os outros, utilizando sinais químicos que regulam uma grande variedade de funções celulares (STURGILL; RATHER, 2004). No entanto, o papel destas moléculas sinalizadoras no processo de formação do biofilme ou *swarming* durante as ITU ou CAUTIs não é claro. Como somente algumas proteínas envolvidas nesse processo em *P. mirabilis* foram identificadas, incluindo a urease, mais estudos precisam ser concluídos.

## REFERÊNCIAS

1. ADEGBOLA, R. A.; OLD, D. C.; SENIOR B. W. The adhesins and fimbriae of *Proteus mirabilis* strains associated with high and low affinity for urinary tract. **J. Med. Microbiol.** 16:427–431, 1983.
2. ALAMURI, P.; LÖWER, M.; HISS, J. A.; HIMPSL, S. D.; SCHNEIDER, G.; MOBLEY, H. L. Adhesion, invasion, and agglutination mediated by two trimeric autotransporters in the human uropathogen *Proteus mirabilis*. **Infect Immun.** 78(11):4882-94. 2010.
3. ALBERTI, L.; HARSHEY, R. M. Differentiation of *Serratia marcescens* 274 into swimmer and swarmer cells. **J. Bacteriol.** 172:4322–4328, 1990
4. ALLISON, C.; EMÖDY, L.; COLEMAN, N.; HUGHES, C. The role of swarm cell differentiation and multicellular migration in the uropathogenicity of *Proteus mirabilis*. **J. Infect. Dis.** 169:1155–1158, 1994.
5. ALLISON, C.; LAI, H. C.; GYGI, D.; HUGHES, C. Cell differentiation of *Proteus mirabilis* is initiated by glutamine, a specific chemoattractant for swarming cells. **Mol. Microbiol.** 8:53–60. 1993.
6. 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.** 6:1583–1591. 1992.
7. ARMITAGE, J. P.; SMITH, D. G.; ROWBURY, R. J. Alteration in the cell envelope composition of *Proteus mirabilis* during development of swarmer cells. **Biochim. Biophys. Acta.** 584:389–397. 1979.
8. ARONSON, M.; MEDALIA, O.; SCHORI, L.; MIRELMAN, D.; SHARON, N.; OFEK, I. Prevention of colonization of the urinary tract of mice with *Escherichia coli* by blocking of bacterial adherence with methyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside. **J. Infect. Dis.** 139:329–332. 1979.
9. BAHRANI, F. K.; COOK, S.; HULL, R. A.; MASSAD, G.; MOBLEY, H. L. T. *Proteus mirabilis* N-terminal amino acid sequence of a major fimbrial subunit and nucleotide sequences of the gene from two strains. **Infect Immun.** 61: 884-891. 1993.
10. BAHRANI, F. K.; MASSAD, G.; LOCKATELL, C. V.; JOHNSON, D. E.; RUSSEL, 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.** 62:3363–3371. 1994.
11. BAHRANI, F. K.; MOBLEY, H. L. T. *Proteus mirabilis* MR/P fimbriae: molecular cloning, expression, and nucleotide sequence of the major fimbrial subunit gene. **J. Bacteriol.** 175:457–464. 1993.
12. BAHRANI, F. K.; MOBLEY, H. L. T. *Proteus mirabilis* MR/P fimbrial operon: genetic organization, nucleotide sequence, and conditions for expression. **J. Bacteriol.** 176: 3412-3419. 1994.
13. BELAS, R. The swarming phenomenon of *Proteus mirabilis*. **ASM News** 58:15–22. 1992.

14. BELAS, R. ***Proteus mirabilis* swarmer cell differentiation and urinary tract infection**, p. 271–298. In H. L. T. Mobley and J. W. Warren (ed.), *Urinary tract infections. Molecular pathogenesis and clinical management*. ASM Press, Washington, D.C. 1996.
15. BELAS, R., ERSKINE, D.; FLAHERTY, D. *Proteus mirabilis* mutants defective in swarmer cell differentiation and multicellular behavior. **J. Bacteriol.** 173:6279–6288. 1991.
16. BEYNON, L. M.; DUMANSKI, D. J.; MCLEAN, R. J. C.; MACLEAN, L. L.; RICHARDS, J. C.; PERRY, M. B. Capsule structure of *Proteus mirabilis* (ATCC 49565). **J. Bacteriol.** 174:2172–2177. 1992.
17. BIJLSMA, I. G. W.; VAN DIJK, L.; KUSTERS, J. G.; GAASTRA, W. Nucleotide sequence of two fimbrial major subunit genes, *pmpA* and *ucaA* from canine-uropathogenic *Proteus mirabilis* strains. **Microbiology** 141:1349–1357. 1995.
18. BRAUDE, A. J.; SIEMIENSKI, J. Role of bacterial urease in experimental pyelonephritis. **J. Bacteriol.** 80:171–179. 1960.
19. BREITENBACH, J. M.; HAUSINGER, R. P. *Proteus mirabilis* urease partial purification and inhibition by boric acid and boronic acid. **Biochem. J.** 250:917–920. 1988.
20. BRENNER, D. J.; HICKMAN-BRENNER, F. W.; HOLMES, B.; HAWKEY, P. M.; PENNER, J. L.; GRIMONT, P. A. D.; O'HARA, C. M. Replacement of NCTC 4175, the current type strain of *Proteus vulgaris*, with ATCC 29905. Request for an opinion. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 45:870–871. 1995.
21. BRINTON, C. C. The structure, function, synthesis and genetic control of bacterial pili and a molecular model of DNA and RNA transport in gram-negative bacteria. **Trans. N. Y. Acad. Sci.** 27:1003–1054. 1965.
22. CHANG, C. C.; MERRITT, K. Effect of *Staphylococcus epidermidis* on adherence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis* to polymethyl metacrylate (PMMA) and gentamicin-containing PMMA. **J. Orthop. Res.** 9:284–288. 1991.
23. CHARACKLIS, W.G.; MARSHALL, K.C. **Biofilms: A basis for and interdisciplinary approach**, in: W.G. Characklis, K.C. Marshall (Eds.), *Biofilms*, Wiley-Interscience, New York, pp. 3-16. 1990
24. CHOW, A. W.; TAYLOR P. R.; YOSHIKAWA, T. T.; GUZE, L. B. A nosocomial outbreak of infection due to multiply resistant *Proteus mirabilis*: role of intestinal colonization as a major reservoir. **J. Infect. Dis.** 130:621–627. 1979.
25. CLAPHAM, L.; MCLEAN, R. J. C.; NICKEL, J. C.; DOWNEY, J.; COSTERTON, J. W. The influence of bacteria on struvite crystal habit and its importance in urinary stone formation. **J. Crystal Growth** 104:475–484. 1990.
26. CLEGG, S.; GERLACH, G. F. Enterobacterial fimbriae. **J. Bacteriol.** 169:934–938. 1987.
27. CLUTTERBUCK, A.L.; WOODS, E.J.; KNOTTENBELT, D.C.; CLEGG, P.D.; COCHRANE, C.A.; PERCIVAL, S.L. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. **Vet. Microbiol.** 121 (1-2): 1-17. 2007.

28. COOK, S. W.; MODY, N.; VALLE, J.; HULL, R. Molecular cloning of *Proteus mirabilis* uroepithelial cell adherence (*uca*) genes. **Infect. Immun.** 63:2082–2086. 1995.
29. COSTAS, M.; HOLMES, B.; FRITH, K. A.; RIDDLE C.; HAWKEY, P. M. 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.** 75:489–498. 1993.
30. COSTERTON, J.W.; CHENG, K.J.; GEESEY, G.G.; LADD, T.I.; NICKEL, J.C.; DASGUPTA, M.; MARRIE, T.J. Bacterial biofilms in nature and disease. **Ann. Rev. Microbiol.** 41:435-64. 1987.
31. COSTERTON, J.W.; GEESEY, G.G.; CHENG, K.J. How bacteria stick. **Sci. Am.** 238:86–95.1978.
32. COSTERTON, J. W.; LAPPIN-SCOTT, H. M. **Introduction to microbial biofilms**, p. 1-11. In H. M. Lappin-Scott and J. W. Costerton (ed.), *Microbial biofilms*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom. 1995.
33. COSTERTON, J. W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.R. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science** 284: 1318-1322. 1999.
34. COX, A.J. Comparison of catheter surface morphologies. **Br. J. Urol.** 65: 55-60. 1990.
35. DE CHAMPS, C.; BONNET, R.; SIROT, D.; CHANAL, C.; SIROT, J. Clinical relevance of *Proteus mirabilis* in hospital patients: a two-year survey. **J. Antimicrob. Chemother.** 45:537–539. 2000.
36. DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerg. Infect Dis.** 8(9):881-90. 2002.
37. DONLAN, R. M; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clin. Microbiol. Rev.** 15(2): 167–193. 2002
38. DUGUID, J. P.; GILLIES, P. R. Fimbrial and adhesive properties in dysentery bacilli. **J. Pathol. Bacteriol.** 74:397–411. 1957.
39. DUMANSKI, A. J.; HEDELIN, H.; EDIN-LILJEGREN, A.; BEAUCHEMIN, D.; MCLEAN, R. J. C. Unique ability of the *Proteus mirabilis* capsule to enhance mineral growth in infectious urinary calculi. **Infect. Immun.** 62:2998–3003. 1994.
40. DUNNE Jr, W. M. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? **Clin. Microbiol. Rev.** 15(2): 155–166. 2002
41. FOXMAN, B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. **Am. J. Med.** 113(Suppl. 1A):5S–13S. 2002.
42. GABIDULLIN, Z. G.; ISHKILDIN, I. B. Morphological properties and adhesiveness of bacteria of the genus *Proteus*. **J. Microbiol. Epidemiol. Immunol.** 6:83–86. 1989.
43. GRIFFITH, D. P.; MUSHER, D. M.; ITIN C. Urease: the primary cause of infection-induced urinary stones. **Invest. Urol.** 13:346–350. 1976.

44. GRIFFITH, D. P.; OSBORNE, C. A. Infection (urease) stones. **Miner. Electrolyte Metab.** 13:278–285. 1987.
45. GUENTZEL, M. N.; BERRY, L. J. Motility as a virulence factor for *Vibrio cholerae*. **Infect. Immun.** 11:890–897. 1975.
46. GUO, M. M. S.; LIN, P. V. Serological specificities of ureases of *Proteus* species. **J. Gen. Microbiol.** 38:417–422. 1965.
47. GYGI, D.; BAILEY, M. J.; ALLISON, C.; HUGHES, C. Requirement for FlhA in flagella assembly and swarm-cell differentiation by *Proteus mirabilis*. **Mol. Microbiol.** 15:761–769. 1995a.
48. GYGI, D.; RAHMAN, M. M.; LAI, H.C.; CARLSON, R.; GUARD-PETTER, J.; HUGHES, C. A cell-surface polysaccharide that facilitates rapid population migration by differentiated swarm cell of *Proteus mirabilis*. **Mol. Microbiol.** 17:1167–1175. 1995b.
49. HAUSER, G. Über Fäulnisbakterien und deren Beziehung zur Septicämia, p. 107. Vogel, Leipzig, Germany. 1885. [Abstract]
50. HAUSER, G. Ueber das Vorkommen von *Proteus vulgaris* bei einer jauchig-phlegmonösen eiterung nebst einigen bemerkungen zur biologie des *Proteus*. **Münch Med Wochenschr.** 39:103–105. 1892. [Abstract]
51. HAWTHORN, L.; REID, G. The effect of protein and urine on uropathogen adhesion to polymer substrata. **J. Biomed. Mater. Res.** 24: 1325–1332. 1990.
52. HENRIKSEN, J. Bacterial surface translocation: a survey and a classification. **Bacteriol. Rev.** 36:478–503. 1972.
53. HOCHREITER, W.; KNOLL, T.; HESS, B. Pathophysiology, diagnosis and Conservative therapy of non-calcium kidney calculi. **Ther. Umsch.** 60:89–97. (In German). 2003.
54. JACOBSEN, S. M.; STICKLER, D. J.; MOBLEY, H. L. T.; SHIRTLIFF, M. E. Complicated catheter associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. **Clin Microbiol. Rev.** 21:26-59. 2008.
55. JARVIS, W. R. Selected aspects of the socioeconomic impact of nosocomial infections: morbidity, mortality, cost, and prevention. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.** 17:552–557. 1996.
56. JOHNSON, D. E.; RUSSELL, R. G.; LOCKATELL, C. V.; ZULTY, J. C.; WARREN, J. W.; MOBLEY, H. L. T. 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.
57. JONES, B. D.; LOCKATELL, C. V.; JOHNSON, D. E.; WARREN, J. W.; MOBLEY, H. L. T. Construction of urease-negative mutant of *Proteus mirabilis*: analysis of virulence in a mouse model of ascending urinary tract infection. **Infect. Immun.** 58:1120–1123. 1990.

58. 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.** 55:2198–2203. 1987.
59. JONES, B. D.; MOBLEY, H. L. T. *Proteus mirabilis* urease: genetic organization, regulation, and expression of structural genes. **J. Bacteriol.** 170:3342–3349. 1988.
60. KALSI, J.; ARYA, M.; WILSON, P.; MUNDY, A. Hospital-acquired urinary tract infection. **Int. J. Clin. Pract.** 57:388-91. 2003.
61. KAPPOS, T.; JOHN, M. A.; HUSSAIN, Z.; VALVANO, M. A. Outer membrane protein profiles and multilocus enzyme electrophoresis analysis for differentiation of clinical isolates of *Proteus mirabilis* and *Proteus vulgaris*. **J. Clin. Microbiol.** 30:2632–2637. 1992.
62. KIM, J. Y.; PARK, Y. J.; KIM, S. I.; KANG, M. W.; LEE, S. O.; LEE, K. Y. Nosocomial outbreak by *Proteus mirabilis* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase VEB-1 in a Korean university hospital. **J. Antimicrob. Chemother.** 54:1144-1147. 2004.
63. KLAUSEN, M.; GJERMANSSEN, M.; KREFT, J.-U; TOLKER-NIELSEN, T. Dynamics of development and dispersal in sessile microbial communities: examples from *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* model biofilms. **FEMS Microbiol. Lett.**, 261, 1–11. 2006
64. LARSSON, P.; FASTH, A.; JODAL, U.; SOHL, A. A.; SVANBORG, E. C. Urinary tract infections caused by *Proteus mirabilis* in children. The antibody response to O and H antigens and Tamm Horsfall protein and bacterial adherence to uroepithelium. **Acta. Paediatr. Scand.** 67:591–596. 1978.
65. LEGNANI-FAJARDO, C.; ZUNINO, P.; PICCINI, C.; ALLEN, A; MASKELL, D. Defined mutants of *Proteus mirabilis* lacking flagella cause ascending urinary tract infection in mice. **Microb Pathog** 21:395–405. 1996.
66. LIMA, A.; ZUNINO, P.; D'ALESSANDRO, B.; PICCINI, C. 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.** 56:1600-1607. 2007.
67. MAGANA-PLAZA, I.; MONTES, C.; RUIZ-HERRERA, J. Purification and biochemical characteristics of urease from *Proteus rettgeri*. **Biochim. Biophys. Acta.** 242:230–237. 1971.
68. MAGANA-PLAZA, I.; RUIZ-HERRERA, J. Mechanisms of regulation of urease biosynthesis in *Proteus rettgeri*. **J. Bacteriol.** 93:1294–1301. 1967.
69. MASSAD, G.; LOCKATELL, C. V.; JOHNSON, 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 tract infection. **Infect. Immun.** 62:536–542. 1994.
70. McCARTER, L.; SILVERMAN, M. Iron regulation of swarmer cell differentiation of *Vibrio parahaemolyticus*. **J. Bacteriol.** 171:731–736. 1989.
71. McLEAN, R. J. C.; CHENG, K.-J.; GOULD, W. D.; COSTERTON, J. W. Histochemical and biochemical urease localization in the periplasm and outer membrane of two *Proteus mirabilis* strains. **Can. J. Microbiol.** 32:772–778. 1986.

72. McLEAN, R. J. C.; NICKEL, J. C.; CHENG, K.-J.; COSTERTON, J. W. The ecology and pathogenicity of urease-producing bacteria in the urinary tract. **Crit. Rev. Microbiol.** 16:37–79. 1988.
73. McLEAN, R. J. C.; NICKEL, J. C.; NOAKES, V. C.; COSTERTON, J. W. An in vitro ultrastructural study of infectious kidney stone genesis. **Infect. Immun.** 49:805–811. 1985.
74. McMANUS, A. T.; MOODY, E. E.; MASON, A. D. Bacterial motility: a component in experimental *Pseudomonas aeruginosa* burn wound sepsis. **Burns** 6:235–239. 1980.
75. MENG, M.; STOLLER, M. L.; MINOR, T. Struvita and staghorn calculi. eMedicine. <http://www.emedicine.com/med/topic2834.htm>. 2005.
76. MOBLEY, H. L. T. **Virulence of *Proteus mirabilis***. In *Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management*, pp. 245–269. Edited by H. L. Mobley & J. W. Warren. Washington, DC: American Society for Microbiology. 1996.
77. MOBLEY, H. L. T.; BELAS, R. Swarming and pathogenicity of *Proteus mirabilis* in the urinary tract. **Trends Microbiol.** 3:280–284. 1995.
78. MOBLEY, H. L. T.; CHIPPENDALE, G. R. Hemagglutinin, urease and hemolysin production by *Proteus mirabilis* from clinical sources. **J. Infect. Dis.** 161:525–530. 1990.
79. MOBLEY, H. L. T.; CHIPPENDALE, G. R.; SWIHART, K.; WELCH, R. Cytotoxicity of the HpmA hemolysin and urease of *Proteus mirabilis* and *Proteus vulgaris* against cultured human renal proximal tubular cells. **Infect. Immun.** 59:2036–2042. 1991.
80. MOBLEY, H. L. T.; CHIPPENDALE, G. R.; TENNEY, J. H.; MAYER, A. R.; CRISP, L. J.; PENNER, J. L.; WARREN, J. W. MR/K hemagglutination of *Providencia stuartii* correlates with adherence to catheters and with persistence in catheter-associated bacteriuria. **J. Infect. Dis.** 157:264–271. 1988.
81. MOBLEY, H. L. T.; HAUSINGER, R. P. Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. **Microbiol. Rev.** 53:85–108. 1989.
82. MOBLEY, H. L. T.; ISLAND, M. D.; HAUSINGER, R. P. Molecular biology of microbial ureases. **Microbiol. Rev.** 59:451–480. 1995.
83. MOBLEY, H. L. T.; JONES, B. D.; PENNER, J. L. Urease activity of *Proteus penneri*. **J. Clin. Microbiol.** 25:2302–2305. 1987.
84. MOBLEY, H. L. T.; WARREN, J. W. Urease-positive bacteriuria and obstruction of long-term urinary catheters. **J. Clin. Microbiol.** 25:2216–2217. 1987.
85. MORRIS, N. S.; STICKLER, D. J. Encrustation of indwelling urethral catheters by *Proteus mirabilis* biofilms growing in human urine. **J. Hosp. Infect.** 39(3):227–234. 1998.
86. MORTIE, T. C.; DOYLE-HUNTZINGER, D.; CRAVEN, R. C.; HOLDER, I. A. Loss of virulence associated with absence of flagellum in an isogenic mutant of *Pseudomonas aeruginosa* in the burned-mouse model. **Infect. Immun.** 38:1296–1298. 1982.

87. MUSER, D. M.; GRIFFITH, D. P.; YAWN, D.; ROSSEN, R. D. Role of urease in pyelonephritis resulting from urinary tract infection with *Proteus*. **J. Infect. Dis.** 131:177–181. 1975.
88. NAGANO, N.; SHIBATA, N.; SAITOU, Y.; NAGANO, Y.; ARAKAWA, Y. Nosocomial outbreak of infections by *Proteus mirabilis* that produces extended-spectrum CTX-M-2 type  $\beta$ -lactamase. **J. Clin. Microbiol.** 41:5530-5536. 2003.
89. NICHOLSON, E. B.; CONCAUGH, E. A.; FOXALL, P. A.; ISLAND, M. D.; MOBLEY, H. L. T. *Proteus mirabilis* urease transcriptional regulation by UreR. **J. Bacteriol.** 175:465–473. 1993.
90. NICKEL, J. C.; EUTAG, J.; COSTERTON, J. W. Ultrastructural microbial ecology of infection induced urinary stones. **J. Urol.** 133:622–627. 1985.
91. NIEL-WEISE, B. S.; VAN DEN BROEK, P. J. Urinary catheter policies for long-term bladder drainage. **Cochrane Database Syst. Rev.** 2005:CD004201. 2005.
92. NUCCIO, S. P.; BAUMLER, A. J. Evolution of the chaperone/usher assembly pathway: fimbrial classification goes Greek. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 71:551-575. 2007.
93. NUNES, F. A. P. **Determinantes genéticos de virulência bacteriana e sua relação com as infecções urinárias como causa primária de bacteremia.** Lisboa: Universidade de Lisboa, 2009. 38 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular Humana, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2009.
94. O'HARA, C. M.; BRENNER, F. W.; MILLER, J. M. Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. **Clin. Microbiol. Rev.** 13:534–546. 2000.
95. OELSCHLAEGER, T.A.; DOBRINDT, U.; HACKER, J. Virulence factors of uropathogens. **Curr. Opin. Urol.**12:33. 2002.
96. OLD, D. C.; ADEGBOLA, R. Hemagglutinins and fimbriae of *Morganella*, *Proteus* and *Providencia*. **J. Med. Microbiol.** 15:551–564. 1982.
97. PENNER, J. L. **Genus XI. *Proteus***, p. 491–494. In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md. 1984.
98. PENNER, J. L. **The genera *Proteus*, *Providencia* and *Morganella***, p. 2849–2853. In A. Balows, H. G. Trüper, W. Harder, and K. H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*, vol. III. Springer-Verlag KG, Berlin, Germany. 1992.
99. PENNER, J. L.; HINTON, N. A.; WHITELEY, G. R.; HENNESSY, J. N. Variation in urease activity of endemic hospital strains of *Proteus rettgeri* and *Providencia stuartii*. **J. Infect. Dis.** 134:370–376. 1976.
100. PLOWMAN, R.; GRAVES, N.; ESQUIVEL, J.; ROBERTS, J. A. An economic model to assess the cost and benefits of the routine use of silver alloy coated urinary catheters to reduce the risk of urinary tract infections in catheterized patients. **J. Hosp. Infect.** 48:33-42. 2001.

101. RANDO, D.; STEGLITZ, U.; MÖRSDORF, G.; KALTWASSER, H. Nickel availability and urease expression in *Proteus mirabilis*. **Arch. Microbiol.** 154:428–432. 1990.
102. ROBERTS, J. A.; FUSSELL, E. N.; KAACH, M. B. Bacterial adherence to urethral catheters. **J. Urol.** 144:264–269. 1990.
103. ROCHA, S. P. D.; ELIAS, W. P.; CIANCIARULLO, A. M.; MENEZES, M. A.; NARA, J. M.; PIAZZA, R. M. F.; SILVA, M. R. L.; MOREIRA, C. G.; PELAYO, J. S. Aggregative adherence of uropathogenic *Proteus mirabilis* to cultured epithelial cells. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** 51:319-326. 2007
104. ROCHA, S. P. D.; PELAYO, J. S.; ELIAS, W. P. Fimbriae of uropathogenic *Proteus mirabilis*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** 51:1-7. 2007
105. RODMAN, J. S. Struvite stones. **Nephron.** 81:50-59. 1998.
106. ROSENSTEIN, I. J. M. Urinary calculi: microbiological and crystallographic studies. **Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.** 22:245–277. 1986.
107. ROSENSTEIN, I. J.; HAMILTON-MILLER, J. M.; BRUMFITT, W. Role of urease in the formation of infection stones: comparison of ureases from different sources. **Infect. Immun.** 32:32–37. 1981.
108. ROZALSKI, A.; SIDORCZYK, Z.; KOTELKO, K. Potencial virulence factors of *Proteus* bacilli. **Microb. Mol. Biol. Rev.**, **61(1)**:65-89. 1997.
109. RUBIN, R. H.; TOLKOFF-RUBIN, N. E.; COTRAN, R. S. **Urinary tract infection, pyelonephritis and reflux nephropathy**, p. 1085–1143. In B. M. Brenner and F. C. Rector (ed.), *The kidney*. The W. B. Saunders Co., Philadelphia, Pa. 1986.
110. SAINT, S. Clinical and economic consequences of nosocomial catheter related bacteriuria. **Am. J. Infect. Control.** 28:68–75. 2000.
111. SARENEVA, T.; HOLTHÖFER, H.; KORHONEN, T. K. Tissue-binding affinity of *Proteus mirabilis* fimbriae in the human urinary tract. **Infect. Immun.** 58:3330–3336. 1990.
112. SENIOR, B. W.; BRADFORD, N. C.; SIMPSON, D. S. The ureases of *Proteus* strains in relation to virulence for the urinary tract. **J. Med. Microbiol.** 13:507–512. 1980.
113. SHAW, G. L.; CHOONG, S. K.; FRY, C. Encrustation of biomaterials in the urinary tract. **Urol. Res.** 33(1):17-22. 2005.
114. SILVA, M.R.L.; ROCHA, S. P. D.; QUESADA, R.; PELAYO, J. S. In vitro stone formation by uropathogenic *Proteus mirabilis* in urine agar. **Biosaúde.** v. 4. 2002.
115. SILVERBLATT, F. J. Host-parasite interaction in the rat renal pelvis: a possible role of pili in the pathogenesis of pyelonephritis. **J. Exp. Med.** 140:1696–1711. 1974.
116. SILVERBLATT, F. J.; OFEK, I. **Effects of pili on susceptibility of *Proteus mirabilis* to phagocytosis and on adherence to bladder cells**, p. 49–59. In E. H. Kass and W. Brumfitt (ed.), *Infections of the urinary tract*. University of Chicago Press, Chicago, Ill. 1978.

117. SRIWANTHANA, B.; ISLAND, M. D.; MANEVAL, D.; MOBLEY, H. L. T. Single-step purification of *Proteus mirabilis* urease accessory protein UreE, a protein with a naturally occurring histidine tail, by nickel chelate affinity chromatography. **J. Bacteriol.** 176:6836–6841. 1994.
118. STAHL, S. J.; STEWART, K. R.; WILLIAMS, F. D. Extracellular slime associated with *Proteus mirabilis* during swarming. **J. Bacteriol.** 154:930–937. 1983.
119. STICKLER, D. J. Susceptibility of antibiotic-resistant gram-negative bacteria to biocides: a perspective from the study of catheter biofilms. **J. Appl. Microbiol.** 92:163S-70S. 2001.
120. STICKLER, D. J. Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters. **Nat Clin Pract Urol.** 5(11):598–608. 2008.
121. STICKLER, D. J.; ZIMAKOFF, J. Complications of urinary tract infections associated with devices used for long-term bladder management. **J. Hosp. Infect.** 28:177–194. 1994.
122. STOODLEY, P.; CARGO, R.; RUPP, C. J.; WILSON, S.; KLAPPER, I. Biofilm material properties as related to shear induced deformation and detachment phenomena. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 29(6): 361-367. 2002.
123. STORTI, A.; PIZZOLITO, A. C.; PIZZOLITO, E. L. Detection of mixed microbial films on central venous catheters removed from intensive care unit patients. **Braz. J. Microbiol.** 36:275-80. 2005.
124. STURGILL, G.; RATHER, P. Evidence that putrescine acts as an extracellular signal required for swarming in *Proteus mirabilis*. **Mol. Microbiol.** 51: 437–446. 2004
125. SVANBORG, E. C.; HAGBERG, L.; HANSON, L. A.; KORHONEN, T.; LEFFLER, H.; OLLING, S. Adhesion of *Escherichia coli* in urinary tract infection. **Ciba Found. Symp.** 80:161–187. 1981.
126. TAMBYAH, P. A.; MAKI, D. G. Catheter-associated urinary tract infection is rarely symptomatic: a prospective study of 1,497 catheterized patients. **Arch. Intern. Med.** 160:678–682. 2000.
127. 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.** 43:709-717. 1997.
128. TRÜPER, H. G. Replacement of strain NCTC 4175, since 1963 the neotype strain of *Proteus vulgaris*, with strain ATCC 29905—opinion 70. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 49:1949. 1999.
129. WARREN, J. W. **Clinical presentations and epidemiology of urinary tract infections**, p. 3–27. In H. L. T. Mobley and J. W. Warren (ed.), *Urinary tract infections. Molecular pathogenesis and clinical management*. ASM Press, Washington, D.C. 1996.
130. WARREN, J. W. Catheter-associated urinary tract infections. **Infect. Dis. Clin. N. Am.** 11:609–622. 1997.

131. WARREN, J. W.; DAMRON, D.; TENNEY, J. H.; HOOPES, I. M.; DEFORGE, B.; MUNCIE Jr., H. L. Fever, bacteremia and death as complications of bacteriuria in women with long-term urethral catheters. **J. Infect. Dis.** 155:1151–1158. 1987.
132. WARREN, J. W.; TENNEY, J. H.; HOOPES, J. M.; MUNCIE, H. J.; ANTHONY, W. C. A prospective microbiologic study of bacteriuria in patients with chronic indwelling urethral catheters. **J. Infect. Dis.** 146:719–723. 1982.
133. WENNER, J. J.; RETTGER, L. F. A systematic study of the *Proteus* group of bacteria. **J. Bacteriol.** 4:331–353. 1919.
134. WILLIAMS, E. W.; HAWKEY, P. M.; PENNER, J. L.; SENIOR, B. W.; BARTON, L. J. Serious nosocomial infection caused by *Morganella morganii* and *Proteus mirabilis* in a cardiac surgery unit. **J Clin Microbiol.** 18:5–9. 1983.
135. WILLIAMS, F. D.; SCHWARZHOF, R. H. Nature of the swarming phenomenon in *Proteus*. **Annu. Rev. Microbiol.** 32:101–122. 1978.
136. WRAY, S. K.; HULL, S. I.; COOK, R. G.; BARRISH, J.; HULL, R. A. Identification and characterization of a uroepithelial cell adhesion from a uropathogenic isolate of *Proteus mirabilis*. **Infect. Immun.** 54:43–49. 1986.
137. YAKUBU, D. E.; OLD, D. C.; SENIOR, B. W. The haemagglutinins and fimbriae of *Proteus penneri*. **J. Med. Microbiol.** 30:279–284. 1989.
138. ZUNINO, P.; SOSA, V.; ALLEN, A. G.; PRESTON, A.; SCHLAPP, G.; MASKELL, D. J. *Proteus mirabilis* fimbriae (PMF) are important for both bladder and kidney colonization in mice. **Microbiology** 149:3231–3237. 2003.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

- Verificar a capacidade de formação e comparar a estrutura do biofilme em cateteres urinários por *P. mirabilis*, em presença de urina humana e em meio de cultura laboratorial.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar a formação de biofilme dos isolados em microplacas de poliestireno;
- Analisar a formação e estrutura do biofilme na superfície e no lúmen de cateter urinário por microscopia eletrônica de varredura.

**ARTIGO CIENTÍFICO – FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *PROTEUS MIRABILIS*  
UROPATOGÊNICO EM CATETER URINÁRIO**

**Rafael Osti de Melo, Halha Ostrensky Saridakis, Marilucia Santos Ludovico, Silvia  
Emanuele Cestari, Marcus Vinicius Stuqui Mastine, Jacinta Sanchez Pelayo\***

\* Autor para correspondência e-mail: [jspelayo@gmail.com](mailto:jspelayo@gmail.com)

## FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *PROTEUS MIRABILIS* UROPATOGÊNICO EM CATETER URINÁRIO

Rafael Osti de Melo, Halha Ostrensky Saridakis, Marilucia Santos Ludovico, Silvia Emanuele Cestari, Marcus Vinicius Stuqui Mastine, Jacinta Sanchez Pelayo<sup>1\*</sup>

### Resumo

Pacientes submetidos a cateterismo de demora freqüentemente apresentam episódios complicados de infecção por espécies de *Proteus*, principalmente *Proteus mirabilis*. A espécie coloniza tanto o meato uretral como cateteres e forma biofilme na superfície e interior deste. A quebra da uréia pelo *P. mirabilis* resulta em amônia, ocorrendo assim a elevação do pH da urina e sob estas condições alcalinas, precipitam-se cristais de estruvita e apatita, os quais podem ficar agregados ao biofilme. Com o desenvolvimento do biofilme o fluxo de urina é obstruído, podendo causar incontinência urinária ou retenção de urina na bexiga. O objetivo deste estudo foi verificar as características de biofilme produzido por *P. mirabilis* em cateter mantido em urina humana e em meio de cultivo de bactérias. A estrutura do biofilme da cepa *P. mirabilis* HU49 (fortemente aderente no teste em microplaca de poliestireno) e da cepa HU117 (não aderente) foram comparadas por microscopia eletrônica de varredura. Biofilmes formados no cateter na presença de urina humana apresentam estrutura cristalina em 24 horas diferentemente do observado naqueles cultivos em Caldo Triptona de Soja. Este estudo demonstrou que duas estruturas marcadamente diferentes de biofilme são formadas, dependendo do meio de cultivo utilizado.

**Palavras-chave:** *Proteus mirabilis*. Cateter urinário. Biofilme. Urina.

### Abstract

The care of many patients undergoing long-term bladder catheterization is frequently complicated by infection with *Proteus mirabilis*. These organisms colonize the catheter, forming surface biofilm communities, and their urease activity generates alkaline conditions under which crystals of magnesium ammonium phosphate and calcium phosphate are formed and become trapped in the biofilm. As the biofilm develops it obstructs the flow of urine through the catheter, causing either incontinence due to leakage of urine around the catheter or retention of urine in the bladder. The aim of this study was to determine the characteristics *P. mirabilis* biofilm in urinary catheter in human urine and standard laboratory media. The structure of *P. mirabilis* HU49 (strongly adherent) and HU117 (nonadherent) biofilms were compared by scanning electron microscopy. Human urine biofilms were observed to form a crystalline structure at 24 h differently to the observed in biofilms produced in TSB. This study has demonstrated that two markedly different biofilm structures are formed, depending on the growth media utilized.

**Keywords** *Proteus mirabilis*. Urinary catheter. Biofilm. Urine.

---

<sup>1</sup> Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Microbiologia, Campus Universitário, Cx. Postal 6001, 86051-990 Londrina, PR, Brasil.

## Introdução

*Proteus mirabilis* é um microrganismo frequentemente isolado de infecções no trato urinário e possui uma notável capacidade de diferenciação celular. Esse processo envolve a diferenciação de células *swimmer* (2µm) em células *swarmer* (10-30µm) (Rather, 2005). Após a diferenciação esta bactéria movimenta-se mais facilmente, sobre diferentes superfícies (Jones et al., 2004). Esses conjuntos multicelulares produzem polissacarídeos que liberados, agem como lubrificante e auxiliam nesse movimento. Além disso, esse produto extracelular produzido durante o *swarming* pode conter putrescina (Sturgill & Rather, 2004), a qual foi descrita como composto que auxilia na sinalização celular. Segundo Rather (2005) as células *swarmer* eventualmente se diferenciam em célula *swimmer* na etapa de consolidação. A célula *swarmer* é também associada à expressão de genes que controlam a produção de urease. Essa enzima catalisa a hidrólise da uréia formando amônia e dióxido de carbono. Essa reação enzimática alcaliniza a urina e nessas condições, vários cristais, incluindo fosfato de magnésio, são produzidos. Esses cristais são depositados diretamente na superfície do cateter ou nos biofilmes microbianos.

Os biofilmes são definidos na literatura como ‘\_microrganismos ligados a uma superfície e cobertos por exopolissacarídeo de origem microbiana’ (Charackerlis & Marshall, 1990). A formação de biofilme é um processo de desenvolvimento, o qual envolve inicialmente a adesão das células bacterianas à superfície mediada por várias proteínas da superfície celular. Uma vez aderida à superfície, a bactéria submete-se a mudanças que envolvem ativação e regulação de genes que controlam produção do exopolissacarídeo. A estrutura desses biofilmes microbianos pode variar em resposta a condições ambientais, como limitação de nutrientes e pressão (Stoodley et al., 2002). Os biofilmes são observados em muitas infecções clínicas incluindo fibrose cística, endocardite e infecções decorrentes do uso de cateter urinário.

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

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é um método muito útil para observar os biofilmes cristalinos de *Proteus mirabilis* nos cateteres urinários (Stickler et al.,

1998). A hipótese deste estudo era que a estrutura do biofilme de *Proteus mirabilis* cultivado com urina humana difere quando comparado com o cultivo em meio de cultura rico, como o caldo de triptona de soja (TSB), bem como quanto ao tipo de cepa utilizada. O objetivo foi verificar as características do biofilme de *P. mirabilis* em cateter urinário em dois diferentes meios de crescimento.

## **Materiais e métodos**

### **Cepas bacterianas e cultivo**

As 226 cepas de *Proteus mirabilis* utilizadas nesse estudo, sendo 39 isoladas da urina de pacientes com infecção do trato urinário de origem comunitária, atendidos no Hospital Universitário de Londrina, entre Abril de 2001 e Maio de 2002, 32 isoladas da urina de crianças com bexiga neurogênica, atendidas no Ambulatório de Bexiga Neurogênica da Universidade Estadual de Londrina entre 2006 e 2007, 112 isoladas da urina de pacientes com infecção do trato urinário de origem comunitária e hospitalar, atendidos no Hospital universitário de Londrina, entre Janeiro de 2009 e Outubro de 2009, 42 isoladas da (UNICAMP) e a cepa padrão *P. mirabilis* HI4320 (Mobley & Warren, 1987) foram identificadas bioquimicamente através dos meios EPM (Toledo et al., 1982a), MILi (Toledo et al., 1982b) e Citrato de Simmons (Merck, Darmstadt, Germany). Para o ensaio de formação de biofilme em microplacas de poliestireno as cepas foram cultivadas em caldo infuso de cérebro e coração (BHIB) (Acumedia, Lansing, MI, USA) preparado em tampão salina-fosfato (PBS), pH 7.2, ao invés de água, e a turbidez monitorada a DO<sub>550</sub>. Nos ensaios *in vitro* de formação de biofilme em cateter, as cepas foram cultivadas em “pool” de urina humana, esterilizada por filtração e em caldo triptona de soja (TSB) (Acumedia, Lansing, MI, USA).

### **Quantificação de formação de biofilme**

As bactérias estudadas quanto à de formação do biofilme utilizando método descrito por Stepanović et al. (2000), com as modificações deste trabalho. As culturas foram diluídas 1:200 em BHIB (Acumedia, Lansing, MI, USA) e 200µL dessa suspensão foram transferidos em triplicata para placas de poliestireno, de fundo chato, de 96 poços, incluindo o controle negativo (BHIB - Acumedia, Lansing, MI, USA), e então incubadas a 37°C por 24

horas. O conteúdo de cada poço foi aspirado e cada um lavado três vezes com 250µL de solução fisiológica a 0,9%.

As bactérias aderidas foram fixadas com 200µL de metanol PA por 15 minutos e depois de secas, foram coradas com 200µL de solução de cristal violeta de Hucker 2% por 5 minutos. O excesso de corante foi lavado em água corrente e após secagem foi medida a densidade óptica em leitor de ELISA (Micro-ELISA Autoreader) (Multiskan EX, Labsystems, Uniscience) a 550nm.

O valor da absorbância de cada amostra ( $DO_a$ ) foi obtido da média aritmética dos três valores de cada amostra. Esse valor foi comparado com a absorbância do BHIB (DO). Para determinar o grau de aderência dos isolados foi utilizada a seguinte classificação:

Não aderente	$(DO_a \leq DO)$
Fracamente aderente	$(DO < DO_a \leq 2 \times DO)$
Moderadamente aderente	$(2 \times DO < DO_a \leq 4 \times DO)$
Fortemente aderente	$(4 \times DO < DO_a)$

### **Microscopia eletrônica de varredura**

Foi utilizada uma cepa de *P. mirabilis* que aderiu fortemente (Pm 49HU) e uma, não aderente (Pm 117HU) no ensaio da microplaca de poliestireno, para a realização da MEV e verificação de sua capacidade de formar biofilme na superfície do cateter vesical. As cepas foram cultivadas em 3 mL de urina humana filtrada e em TSB (Acumedia, Lansing, MI, USA) por 4, 12 e 24 horas a 37°C, sob intensa agitação. Uma secção de um centímetro de cateter vesical de 2,7 mm de diâmetro foi colocada em cada tubo e retirada nos respectivos tempos descritos acima.

Nos diferentes tempos de crescimento, os cateteres foram lavados 3 vezes com PBS 0,01M (pH 7,2) e realizou-se a fixação do material com 1,5mL de glutaraldeído 3,0% e tampão cacodilato de sódio 0,1M por 16 horas a 4°C. Passado esse tempo, realizou-se 3 banhos de 10 minutos cada com 1,5mL de tampão cacodilato de sódio 0,1M.

Logo após, os cateteres receberam tratamento com 1,5mL de Tetróxido de Ósmio ( $OsO_4$ ) por 1 hora, no escuro. Retirou-se então o tetróxido de ósmio e repetiram-se os

3 banhos de 10 minutos cada com tampão cacodilato de sódio 0,1M e posteriormente foram desidratados em gradiente crescente de concentração de Etanol (70% - 100%). Após a desidratação completa, as amostras foram colocadas no secador de ponto crítico (Bal-Tec CPD 030 Critical Point Dryer), para retirada completa do etanol das amostras e sua substituição por CO<sub>2</sub>. Os cateteres foram montados imediatamente em Stabs e após secarem, cobertos com uma camada de ouro em pulverizador catódico (Bal-Tec SCD 050 Sputter Coater) por 200 segundos para facilitar a observação em microscópio eletrônico de varredura (Phillips, FEI Quanta 200).

### **Quantificação de formação de biofilme**

A aderência é o primeiro passo na formação de biofilme. *P. mirabilis* demonstrou grande capacidade em aderir a material abiótico, o qual é o principal problema no tratamento de pacientes que requerem uso de cateter. A aderência a substratos abióticos é influenciada por vários fatores ambientais e outros produzidos pelos microrganismos. Forças de atração e repulsão como interações eletrostáticas, forças de van der Waals, interações dipolo e interações hidrofóbicas são importantes para a adesão inicial de microrganismos a essas superfícies abióticas (McEldowney & Fletcher, 1986). De acordo com Mobley et al. (1988) fatores de *P. mirabilis*, como a fimbria MR/K podem influenciar na adesão da bactéria a cateteres. Hawthorn & Reid (1990) observaram alta afinidade de cepas de *P. mirabilis* ao substratos poliméricos usados na produção do cateter, por exemplo, etileno, propileno, poliestireno e poliestireno sulfonado. Foi relatada também a aderência significativa de cepas de *P. mirabilis* a polimetilmetacrilato (PMMA) (material artificial usado em artroplastia) e PMMA contendo gentamicina (Chang & Merretti, 1991). A aderência dos microrganismos torna-se muito firme quando a matriz do biofilme é produzida, protegendo a comunidade de células e produzindo um microambiente favorável às interações entre as bactérias.

Das 226 cepas testadas, somente duas (aprox. 1%) não aderiram ao poliestireno. Dentre as 224 (99%) cepas que aderiram ao poliestireno, 77 (33%) foram fracamente aderentes, 126 (56%) moderadamente aderentes e 21 (11%) fortemente aderentes (Figura 6).

## Microscopia eletrônica de varredura

A MEV revelou que após 4 horas de crescimento em meio TSB, as cepas Pm49HU e Pm117HU já estavam aderidas a superfície do cateter, em pequena quantidade e sem produção de matriz. Com 12 horas de crescimento em TSB o número de bactérias aderidas era muito maior, a cepa Pm49HU apresentou um biofilme mais estruturado com bactérias ligadas como rede, ao contrário da cepa Pm117HU. Em 24 horas de crescimento em TSB as bactérias se apresentaram embebidas nas matrizes extracelulares que já estão bem formadas, porém melhor caracterizadas na cepa Pm49HU. É possível notar a presença de algumas células *swarmer*.

No cultivo em “pool” de urina humana a cepa Pm49HU iniciou em 4 horas o processo de formação da matriz e formou aglomerados menos organizados do que os encontrados no cultivo em TSB. É possível ver células alongadas por entre os aglomerados celulares. Resultado semelhante foi descrito por Jones et al. (2007), que por imagens 3-D verificaram que em biofilmes cultivados em urina artificial as células *swarmer* estão ligadas ao biofilme e não sobre a superfície. Em 12 horas de crescimento a matriz extracelular já está bem definida e em ambas as cepas, sendo possível verificar a presença de agregados cristalinos, iniciando a incrustação, como descrito por Stickler et al. (2006), os quais desenvolveram um sensor para detectar a formação de biofilme cristalino a fim de evitar o bloqueio do cateter. Este sensor é resultante da mudança de pH que ocorre quando o biofilme de *P. mirabilis* é formado e a presença desses agregados confirma que o pH urinário já está mais alcalino. É possível observar grandes cristais de estruvita, em forma de caixão como o visto por Stickler et al. (1993). Em 24 horas de cultivo o biofilme já está bem desenvolvido e com deposição de cristais sobre toda a superfície, luminal e externa do cateter. Na cepa Pm49HU é possível ver bactérias aderidas a um provável cristal de estruvita e não há diferença, no que diz respeito às ligações célula-a-célula e célula-a-substrato entre as duas cepas nesse tempo. Stickler et al. (2003) observaram as etapas de formação de biofilme de *P. mirabilis* sobre cateter de Foley e verificaram, assim como no presente trabalho, que, a partir de 4 horas, bactérias começam a aderir à superfície e formar microcolônias, em torno de 8 a 12 horas agregados microcristalinos são depositados no biofilme, e com 20-24 horas o biofilme já se estende pelo cateter. Resultado semelhante foi observado por Stickler e Morgan (2006), que mostram a grande deposição de cristais no biofilme, após 24 horas de cultivo.

A diferença na estrutura do biofilme quando cultivado em urina e em meio de cultura foi observado por Jones et al. (2007), os quais observaram, embora usando urina

artificial e meio de cultura caldo Luria-Bertani (LB), que o biofilme formou-se rapidamente nos dois meios e que no meio LB ele começou de forma mais organizada e manteve-se assim durante as horas seguintes. Segundo os mesmos autores a estrutura do biofilme cultivado em urina é diferente, pois a deposição de cristais dificulta a formação da estrutura de cogumelo e também a formação de canais de nutrientes, resultando uma camada de aspecto irregular.

A presença de poucas células *swarmer* sugere a possibilidade de que essas formas de diferenciação não são necessárias para o desenvolvimento do biofilme e sim na procura de novos sítios com maior número de nutrientes. Isto está de acordo com trabalhos realizados por Jansen et al. (2003) e Jones et al. (2005), os quais mostraram, respectivamente, que as formas *swarmer* de *P. mirabilis* não estavam presentes nas infecções ascendentes do trato urinário e que as células *swarmer* não eram necessárias para a adesão na superfície.

A diferença na estrutura do biofilme entre as cepas Pm49HU e Pm117HU foi sutil, tanto no cultivo com TSB quanto na urina humana, pelo menos nas etapas iniciais, porém o cultivo em urina apresentou maior deposição de cristais no biofilme formado pela cepa Pm49HU, talvez por esta ser supostamente mais aderente que a cepa Pm117HU levando-se em conta os resultados obtidos por Dumanski et al. (1994) e Rozalski et al. (1997), que observaram a importância da adesão na produção de cálculos e adesão de minerais.

Um dado interessante foi que apesar da cepa Pm117HU apresentar-se como não aderente à microplaca de poliestireno, no teste desenvolvido por Stepanović et al. (2000), apresentou resultado diferente quando testada em cateter urinário, o qual contém poliestireno em sua composição. Essa bactéria aderiu à superfície abiótica do cateter, apresentando, em 24 horas de incubação, estrutura semelhante à cepa Pm49HU, que no teste da microplaca mostrou-se como fortemente aderente.

Em conclusão foi possível verificar que *P. mirabilis* produz tipos diferentes de biofilme, dependendo do meio em que são cultivados e que a capacidade de adesão a superfícies abióticas tem relativa importância, pelo menos nos estágios iniciais da colonização. Devido à grande importância e riscos que essas incrustações causam como os danos ao epitélio do trato urinário, bloqueio do cateter e impacto na eficácia de antimicrobianos, se faz necessário promover alternativas para sanar esse problema. Estudos usando substâncias que modulam a estrutura do biofilme de *P. mirabilis* já foram iniciados, porém a utilização prática desse fenômeno ainda não foi alcançada, pois o biofilme inicia-se muito rápido e normalmente nos primeiros dias o paciente ainda não apresenta sintoma algum. A utilização de cateteres cobertos com antibióticos se tornou uma boa alternativa, pelo menos enquanto as cepas estejam sensíveis. Alternativas como utilizar extratos vegetais e substâncias

biológicas que modificariam esse biofilme também são interessantes, porém mais estudos devem ser realizados.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao CNPq pelo suporte financeiro, a Profa. Dra. Célia G. T. J. Andrade e ao Tec. Oswaldo pela ajuda na realização da microscopia eletrônica de varredura.

## REFERÊNCIAS

- Chang, CC & Merritt K (1991) Effect of *Staphylococcus epidermidis* on adherence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis* to polymethyl metacrylate (PMMA) and gentamicin-containing PMMA. *J Orthop Res* **9**:284–288.
- Charackerlis WG & Marshall KC (1990) Biofilms: a basis for an interdisciplinary approach. Biofilms (Charackerlis WG & Marshall KC, eds), pp. 3–15. Wiley Inc., New York.
- Dumanski AJ, Hedelin H, Edin-Liljegren A, Beauchemin D & McLean RJC (1994) Unique ability of the *Proteus mirabilis* capsule to enhance mineral growth in infectious urinary calculi. *Infect Immun* **62**:2998–3003.
- Hawthorn L & Reid G (1990) The effect of protein and urine on uropathogen adhesion to polymer substrata. *J Biomed Mater Res* **24**: 1325–1332.
- Jansen AM, Lockett CV, Johnson DE & Mobley HL (2003) Visualization of *Proteus mirabilis* morphotypes in the urinary tract: the elongated swarmer cell is rarely observed in ascending urinary tract infection. *Infect Immun* **71**: 3607–3613.
- Jones BV, Young R, Mahenthalingam E & Stickler DJ (2004) Ultrastructure of *Proteus mirabilis* swarmer cell rafts and role of swarming in catheter-associated urinary tract infection. *Infect Immun* **72**: 3941–3950.
- Jones BV, Mahenthalingam E, Sabbuba NA & Stickler DJ (2005) Role of swarming in the formation of crystalline *Proteus mirabilis* biofilms on urinary catheters. *J Med Microbiol* **54**: 807–813.
- Jones SM, Yerly J, Hu Y, Ceri H & Martinuzzi R (2007) Structure of *Proteus mirabilis* biofilms grown in artificial urine and standard laboratory media. *FEMS Microbiol Lett* **268**:16-21.
- McEldowney S, Fletcher M (1986) Variability of the influence of Physicochemical Factors Affecting Bacterial Adhesion to Polystyrene Substrata. *App Env Microbiol* **52**(3): 460-465
- Mobley HLT, Warren JW (1987) Urease-positive bacteriuria and obstruction of long-term urinary catheters. *J Clin Microbiol* **25**:2216–2217.
- Mobley HLT, Chippendale GR, Tenney JH, Mayer AR, Crisp LJ, Penner JL & Warren JW (1988) MR/K hemagglutination of *Providencia stuartii* correlates with adherence to catheters and with persistence in catheter-associated bacteriuria. *J Infect Dis* **157**:264–271.
- Rather PN (2005) Swarmer cell differentiation in *Proteus mirabilis*. *Environ Microbiol* **7**: 1065–1073.
- Rozalski A, Sidorczyk Z, Kotelko K (1997) Potential virulence factors of *Proteus* bacilli. *Microb Mol Biol Rev* **61**: (1)65-89
- Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Svabić-Vlahović M (2000) A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microb Methods* **40**: 175-179

Stickler D, Young R, Jones G, Sabbuba N, Morris N (2003) Why are Foley catheters so vulnerable to encrustation and blockage by crystalline bacterial biofilm? *Urol Res* **31**:306–311.

Stickler DJ & Zimakoff J (1994) Complications of urinary tract infections associated with devices used for long-term bladder management. *J Hosp Infect* **28**: 177–194.

Stickler DJ, King JB, Winters C & Morris SL (1993) Blockage of urethral catheters by bacterial biofilms. *J Infect* **27**:133–135.

Stickler DJ, Morris N, Moreno MC & Sabbuba N (1998) Studies on the formation of crystalline bacterial biofilms on urethral catheters. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **17**: 649–652.

Stickler DJ, Jones SM, Adusei GO & Waters MG (2006) A sensor to detect the early stages in the development of crystalline *Proteus mirabilis* biofilm on indwelling bladder catheters. *J Clin Microbiol* **44**:1540-1542.

Stickler, DJ & Morgan SD (2006) Modulation of crystalline *Proteus mirabilis* biofilm development on urinary catheters. *J Med Microbiol* **55**:489–494.

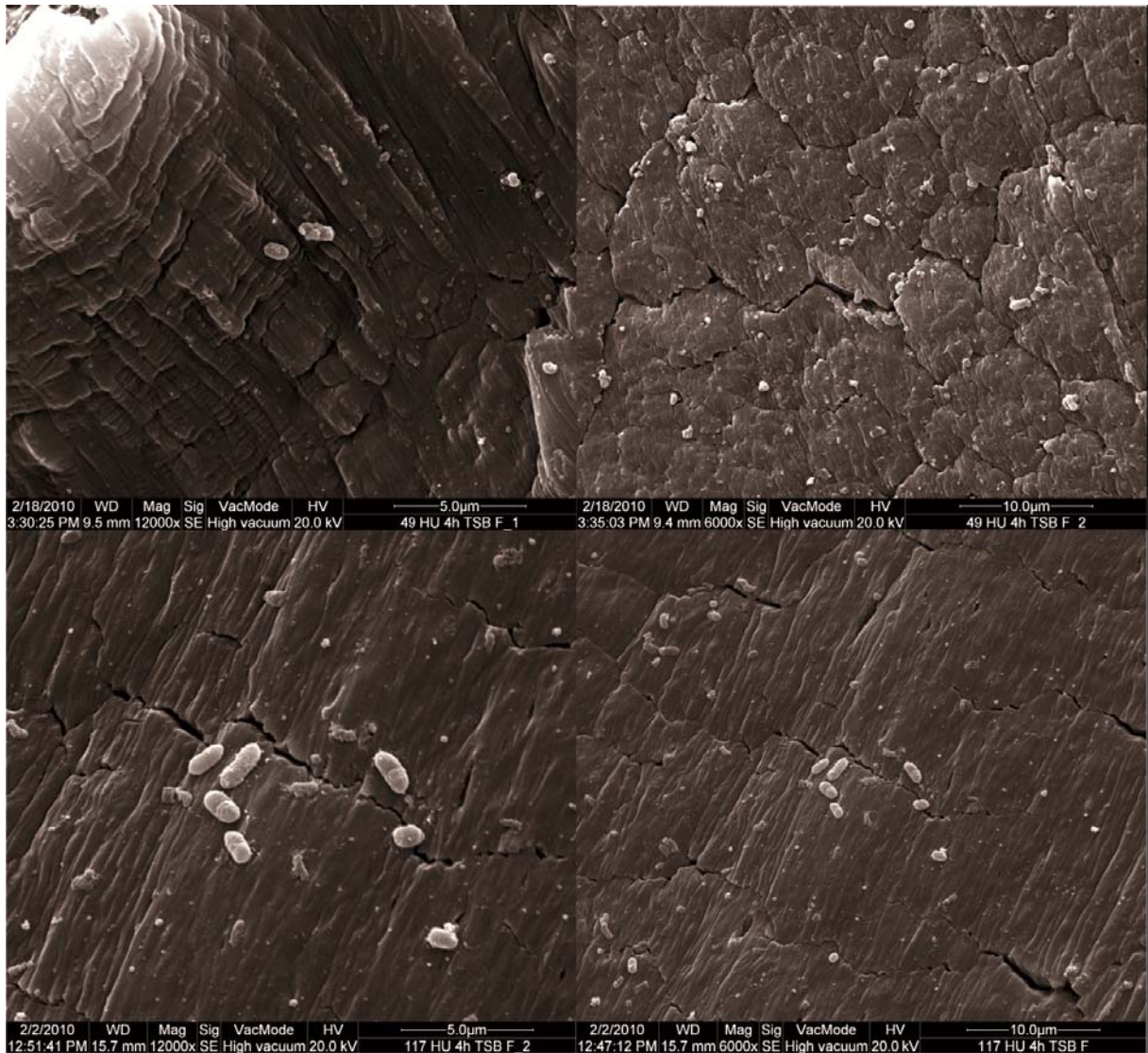
Stoodley P, Cargo R, Rupp CJ, Wilson S & Klapper I (2002) Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *J Ind Microbiol Biotechnol* **29**: 361–367.

Sturgill G & Rather P (2004) Evidence that putrescine acts as an extracellular signal required for swarming in *Proteus mirabilis*. *Mol Microbiol* **51**: 437–446.

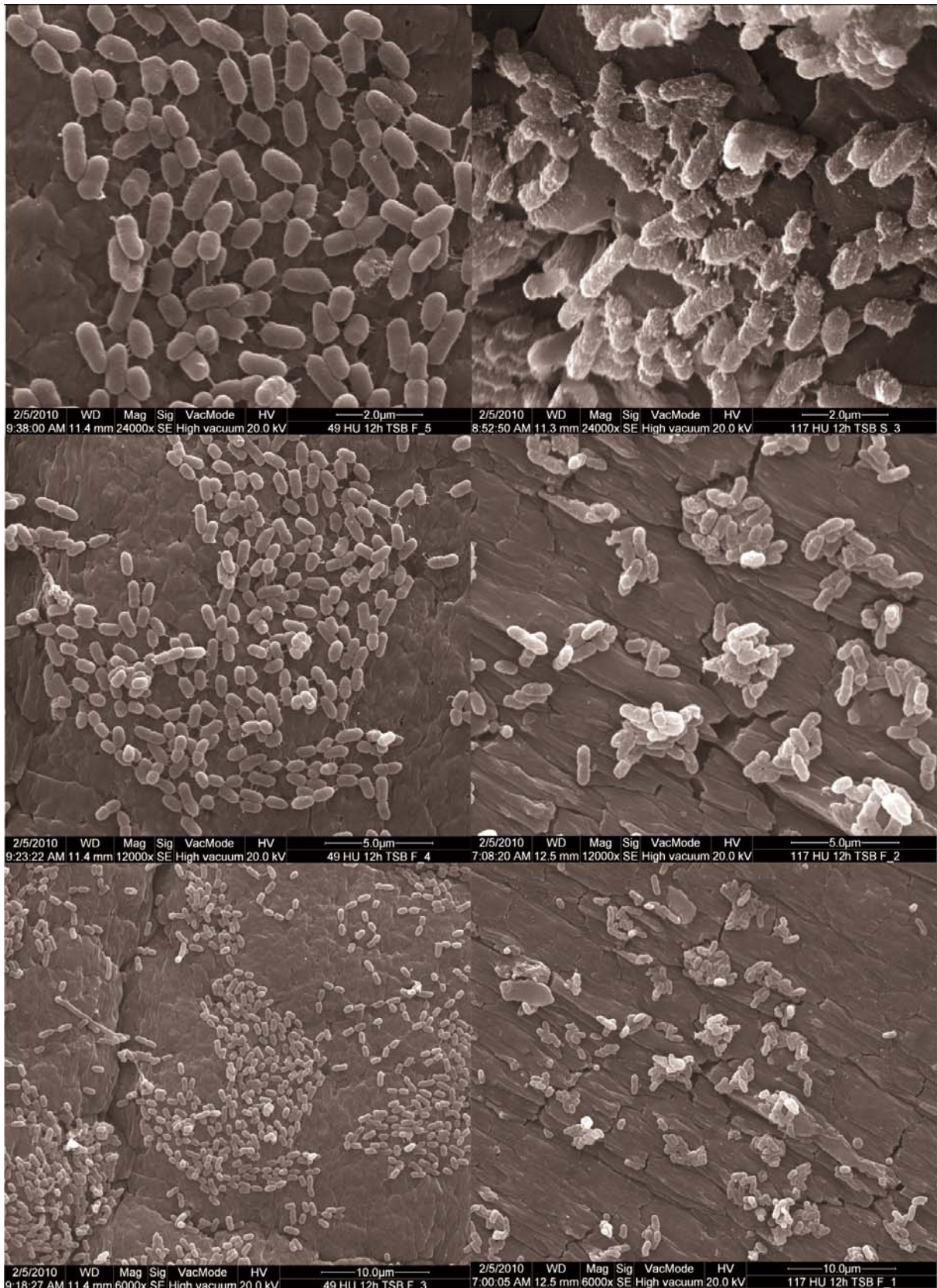
Toledo MRF, Fontes CF, Trabulsi LR (1982a) EPM: modificação do meio de Rugai e Araújo para realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H<sub>2</sub>S, urease e triptofano-desaminase. *N Rev Microbiol* **13**:309-315.

Toledo MRF, Fontes CF, Trabulsi LR (1982b) MILi: um meio para realização dos testes de motilidade, indol e lisina-descarboxilase. *N Rev Microbiol* **13**:230-235.

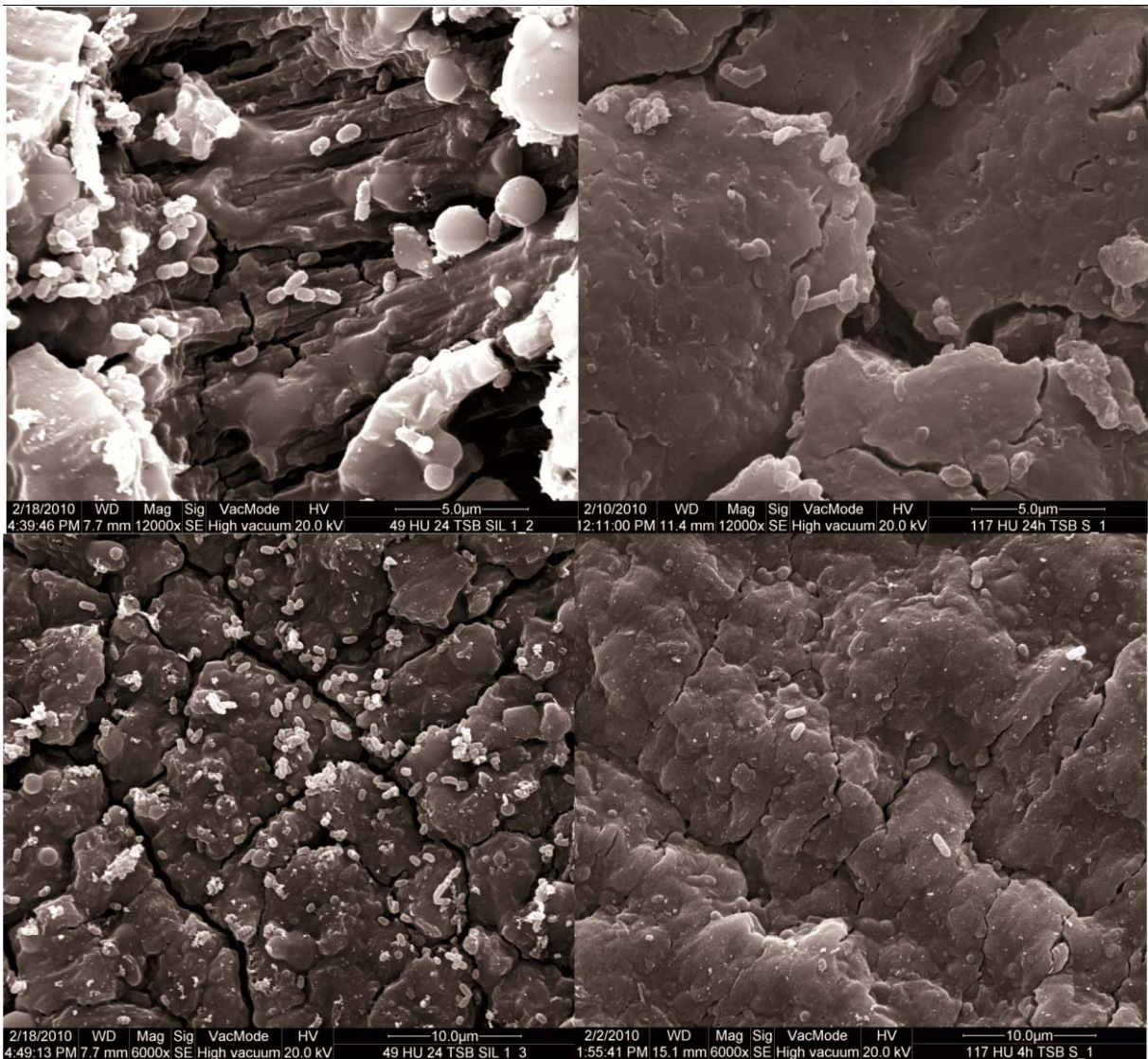
## **ANEXOS**



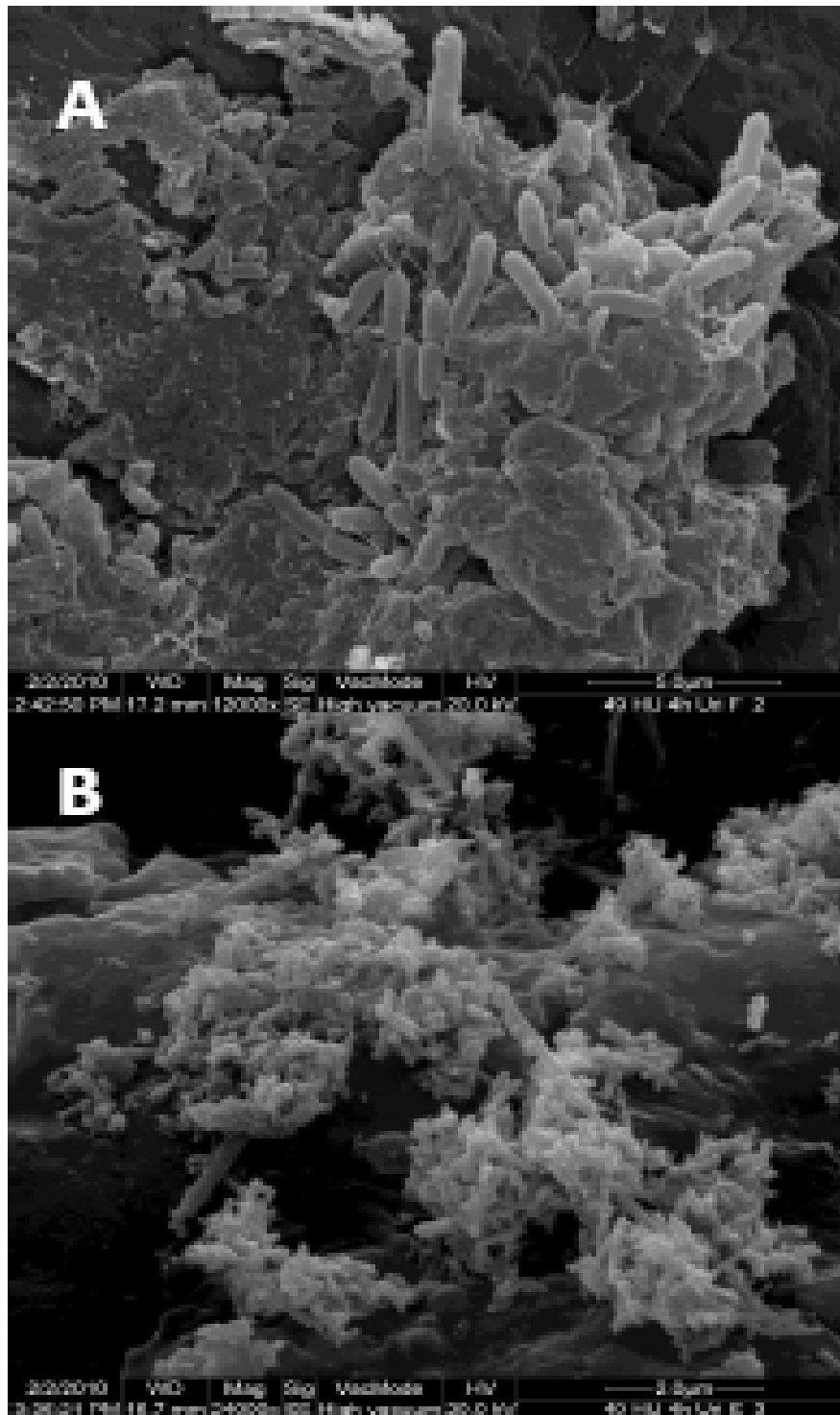
**Figura 6** – MEV de *Proteus mirabilis* na superfície de cateter urinário, incubado em TSB por 4 horas. A e B: Pm49HU, em 12000x e 6000x de aumento, respectivamente. C e D: Pm117HU, em 12000x e 6000x de aumento, respectivamente. Nota-se baixo número de bactérias aderidas e em C podemos ver um processo de divisão celular.



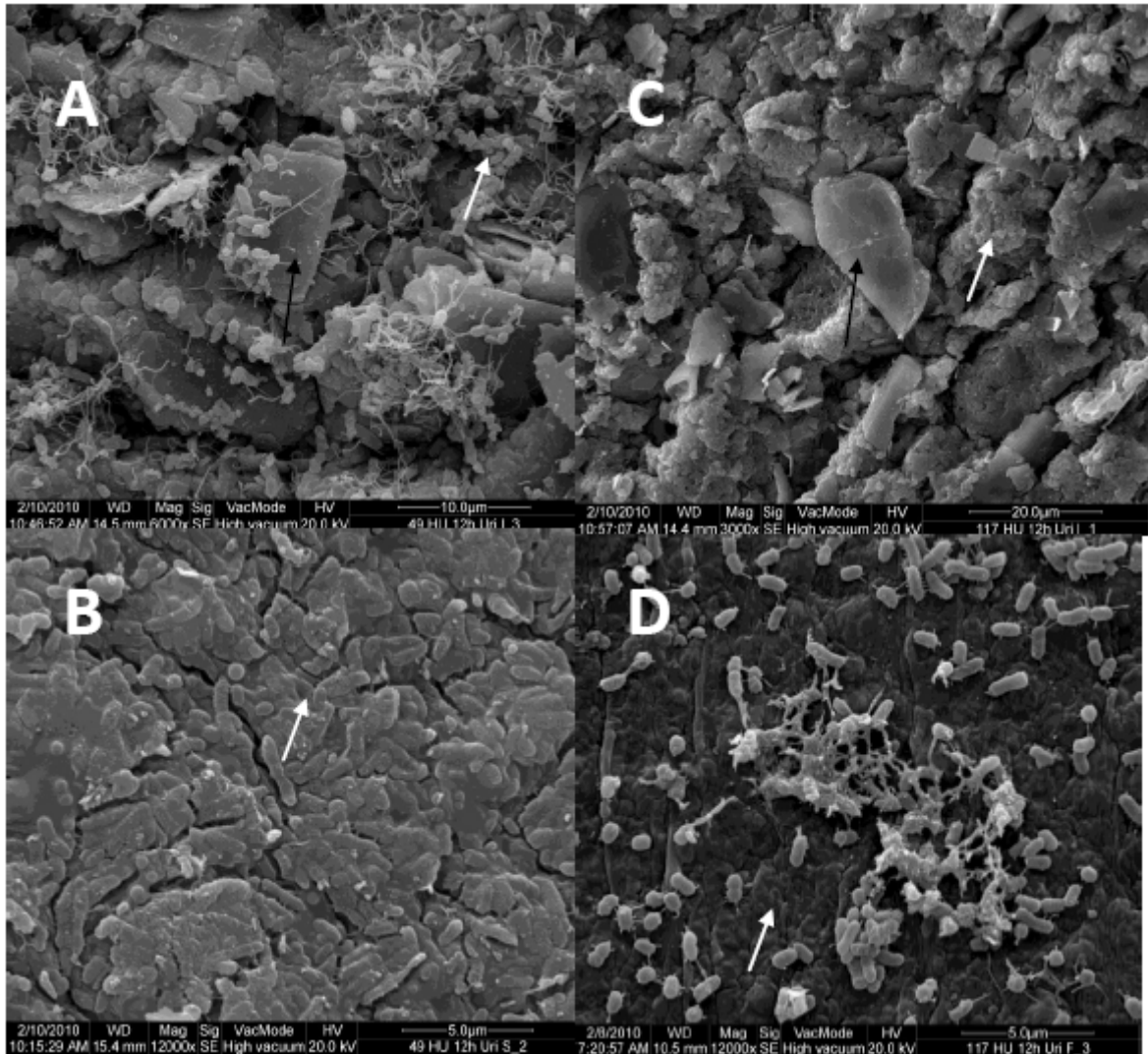
**Figura 7** – MEV de *Proteus mirabilis* na superfície de cateter urinário, incubado em TSB por 12 horas. A, B e C: Pm49HU, em 24000x, 12000x e 6000x de aumento, respectivamente. D, E e F: Pm117HU, em 24000x, 12000x e 6000x de aumento, respectivamente. Nesse tempo observa-se a estrutura mais organizada de ligação na cepa Pm49HU e maior número de ligações entre as células.



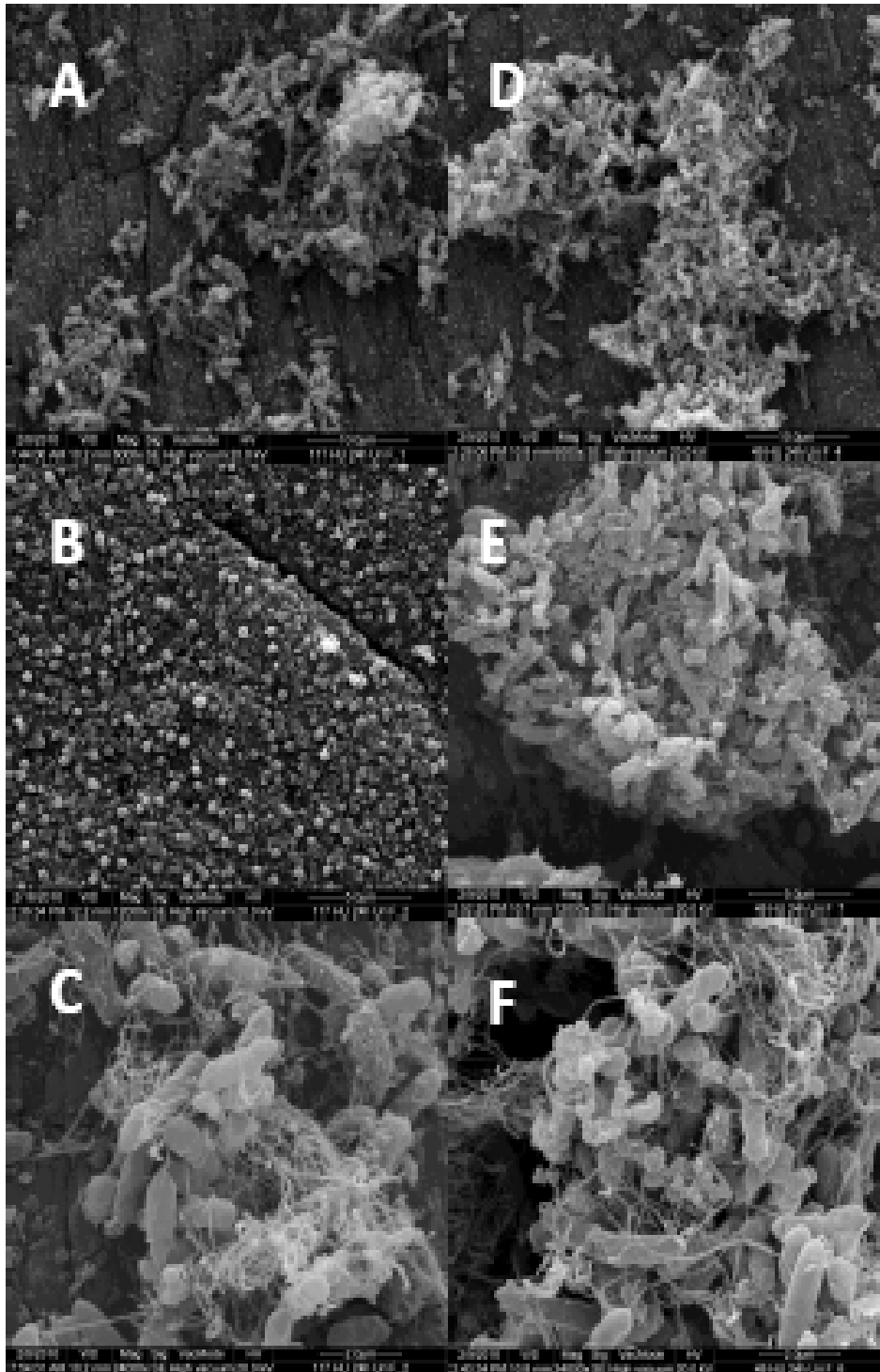
**Figura 8** – MEV de *Proteus mirabilis* na superfície de cateter urinário, incubado em TSB por 24 horas. A e C: Pm49HU, em 12000x e 6000x de aumento, respectivamente. B e D: Pm117HU, em 12000x e 6000x de aumento, respectivamente. Nesse tempo observa-se as células embebidas na matriz do biofilme.



**Figura 9** – MEV de *Proteus mirabilis* na superfície de cateter urinário, incubado em urina humana por 4 horas. A e B: Pm49HU, em 12000x e 24000x de aumento, respectivamente. Em B nota-se a presença de células alongadas agregadas ao grupo de células



**Figura 10** – MEV de *Proteus mirabilis* na superfície de cateter urinário, incubado em urina humana por 12 horas. A e B: Pm49HU, em 6000x e 12000x de aumento, respectivamente. C e D: Pm117HU, em 3000x e 12000x de aumento, respectivamente. Em A e C nota-se a presença de cristais em forma de caixão e agregados microcristalinos. Em B e D a matriz cobre quase totalmente as células bacterianas.



**Figura 11** – MEV de *Proteus mirabilis* na superfície de cateter urinário, incubado em urina humana por 24 horas. A, B e C: Pm117HU, em 6000x, 12000x e 24000x de aumento, respectivamente. D, E e F: Pm49HU, em 6000x, 12000x e 24000x de aumento, respectivamente. Ambas as cepas desenvolveram biofilme semelhantes em 24 horas