



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MICHELE REGINA LOPES DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E FENOTÍPICA DE FATORES DE
VIRULÊNCIA DE *Proteus mirabilis* UROPATOGÊNICO ISOLADOS
NA REGIÃO DE LONDRINA-PR**

Londrina
2003

MICHELE REGINA LOPES DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E FENOTÍPICA DE FATORES DE
VIRULÊNCIA DE *PROTEUS MIRABILIS* UROPATOGÊNICO
ISOLADOS NA REGIÃO DE LONDRINA-PR**

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Jacinta Sanchez Pelayo

Londrina
2003

MICHELE REGINA LOPES DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E FENOTÍPICA DE FATORES DE
VIRULÊNCIA DE *PROTEUS MIRABILIS* UROPATOGÊNICO
ISOLADOS NA REGIÃO DE LONDRINA-PR**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Jacinta Sanchez Pelayo

Prof. Dr. João Bedendo

Prof^a. Dr^a. Shiduca Itow Jankevicius

Londrina, 28 de março de 2003.

DEDICATÓRIA

**Para minha mãe e
minha família.**

AGRADECIMENTOS

À **Providência Divina** por permitir e auxiliar no alcance de mais um degrau em direção aos planos e objetivos estabelecidos para esta Existência.

À **minha amiga, mãe, “anjo-da-guarda” e orientadora Prof^a. Dr^a. Jacinta Sanchez Pelayo**, pela orientação, ensinamentos, paciência e compreensão, mas, sobretudo pela amizade.

À **Prof^a. Dr^a. Halha Ostresky Saridakis**, pelo laboratório, pela paciência, pelas dicas, amizade e apoio.

À **Prof^a. Dr^a. Rosa Elisa Carvalho Linhares** pela amizade e contribuição nos testes com cultura de células.

À **Prof^a. Dr^a. Shiduca Itow Jankevicius** pelos ensinamentos e sugestões.

Ao Prof. Dr. Sérgio Suzart, pelas sugestões e ajuda na confecção dos primers *mrpA*.

Às **amigas e parceiras Eliane Blanco Nunes e Rita de Cássia Simões**, pelo incentivo, amizade, paciência, conversas, desabafos e apoio técnico.

Às **minhas colegas de turma Adriana, Audrey, Cláudia, Daniele, Elaine, Marsilene e Rita** pela colaboração imprescindível para conclusão deste curso. A vocês um obrigado muito especial e a minha gratidão

Aos docentes do Programa, dos Departamentos de Microbiologia e de Ciências Patológica pelo conhecimento transmitido direta ou indiretamente.

À Regina Quesada, Audrey de Souza Marques e Marsilene Pelisson por terem cedido as amostras bacterianas e pelas sugestões.

Aos colegas de laboratório Anderson, Ariane, Cíntia, Eliana, Eliane, Jhonatan, Kathelin e Sérgio pela colaboração e risadas.

Aos funcionários Ana, Claci, Iara, Márcio, Mari, Marta, Nilson, Pedrinho, Rosilda, “Val” e “Zui” pela boa vontade e ajuda.

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

Em especial, a minha mãe, colaboradora imprescindível deste trabalho, ser humano ímpar cujo desprendimento e sacrifício propiciaram a conclusão de mais esta etapa da minha vida.

PENSAMENTO

***“O rio alcança os seus objetivos
porque aprendeu a contornar
obstáculos”***

André Luís

SILVA, Michele Regina Lopes. **Caracterização genética e fenotípica de fatores de virulência de *Proteus mirabilis* uropatogênico isolados na região de Londrina-PR.** 2003. 56f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2003.

RESUMO

Proteus mirabilis é o agente causal de infecções urinárias principalmente em indivíduos com anormalidades no trato urinário e em pacientes cateterizados. O objetivo deste trabalho foi investigar a presença de fatores de virulência em *P. mirabilis* uropatogênicos isolados em Londrina. Trinta e cinco isolados de *P. mirabilis* foram caracterizados em relação à presença de adesinas fimbriais por meio de PCR, teste de hemaglutinação, teste de adesão a células HEp-2 (epitélio de laringe humana) e Vero (rim de macaco verde africano) e pelo teste de adesão a superfícies inertes. A produção de hemolisina foi observada e quantificada pela capacidade de lise de eritrócitos de carneiro. A produção de urease foi verificada por teste de hidrólise da uréia e pela capacidade de formação de cálculos *in vitro*. A susceptibilidade dos isolados a antimicrobianos foi determinada pelo método de difusão em disco. O gene *mrpA* foi detectado em 82,3% dos isolados e a combinação das hemaglutininas manose-resistente *Proteus*-like (MR/P) e manose-resistente *Klebsiella*-like (MR/K) foi observada em 68,6% dos isolados. O gene *fimH* da hemaglutinina manose-sensível (MS) não foi detectado entre os isolados. Os 35 isolados apresentaram padrão agregativo de adesão a células HEp-2, típico de *Escherichia coli* enteroagregativa, com predominância de adesão da bactéria à lamínula de vidro após seis horas de incubação. A maioria dos isolados foi capaz de descolar células Vero e aderir na superfície de lamínulas de vidro de maneira agregativa após seis horas de incubação. Adesão forte ao poliestireno foi observada em 42,8% dos isolados. A atividade hemolítica nas culturas celulares foi observada em 90% dos isolados. Hemolisina associada à célula foi detectada com títulos hemolíticos variando de 1:2 a 1:128. A produção de urease e a formação de cálculos *in vitro* foram constatadas em todos os isolados. Os 35 isolados foram sensíveis a amicacina, cefepime e gentamicina. A resistência aos demais antimicrobianos testados variou de 5,6% para imipenem a 83% para cefoxitina. Três isolados que apresentaram o gene *mrpA* não expressaram hemaglutinina MR/P, mas expressaram adesão agregativa nas culturas celulares. Estes dados sugerem que a colonização de *P. mirabilis* é multifatorial e que as adesinas fimbriais agem em conjunto para uma eficiente colonização do trato urinário. A ausência de atividade hemolítica em contraste com o descolamento das células Vero apresentada por alguns isolados, sugere que a hemolisina associada à célula não é o único fator responsável pelo efeito citotóxico. A capacidade de adesão dos isolados ao poliestireno pode resultar na obstrução de catéteres. Os resultados obtidos indicam que os isolados estudados de *P. mirabilis* uropatogênico apresentam grande potencial de infecção em pacientes suscetíveis, apesar de serem suscetíveis aos antimicrobianos comumente usados no tratamento de infecções do trato urinário.

Palavras-chave: Infecção Urinária. Urease. Adesinas Fimbriais. Hemolisinas. Antibióticos.

SILVA, Michele Regina Lopes. **Genetic and phenotypical characterization of uropathogenic *Proteus mirabilis* isolated in Londrina-PR.** 2003. 56f. Dissertation (Master in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2003.

ABSTRACT

Proteus mirabilis is a causative agent of urinary infections in individuals with abnormalities in the urinary tract and in catheterized patients. The objective of this work was to investigate the presence of virulence factors in uropathogenic *P. mirabilis* isolated in Londrina, Brazil. Thirty-five isolates *P. mirabilis* were characterized in relation to presence of fimbrial adhesins by PCR, hemagglutination assay, adherence assay in HEp-2 (human laryngeal epithelium) and Vero (kidney of african green monkey) cells and by adhesion to inert surface assay. The hemolysin production was observed and quantified by the capacity to lise sheep erythrocytes. The urease production was verified by urea hydrolysis test and for the ability to form calculi *in vitro*. The antimicrobial susceptibility of the isolates was determined by the disk diffusion method. The gene *mrpA* was detected in 82,3% of the isolates and the combination of the hemagglutinins mannose-resistant *Proteus*-like (MR/P) and mannose-resistant *Klebsiella*-like (MR/K) was observed in 68,6% of the isolates. The *fimH* gene of the hemagglutinin mannose-sensitive (MS) was not detected among the isolates. The 35 isolates displayed aggregative adhesion pattern to HEp-2 cells, typical of enteroaggregative *Escherichia coli*, with adhesion predominance of the bacteria to the coverslip after six hours of incubation. Most of the isolates were able to detach Vero cells and adhere to coverslip surface with aggregative adhesion pattern after six hours of incubation. Strong adhesion to the polystyrene was observed in 42,8% of the isolates. Hemolytic activity in total cell cultures was observed in 90% of isolates. Measurable cell-bound hemolysin was detected with hemolytics titles ranging from 1:2 to 1:128. The urease production and the *in vitro* calculi formation was verified in all isolates. The 35 isolates were sensitive to amikacin, cefepime and gentamycin. The resistance to other tested antimicrobial ranged from 5,6% for imipenem to 83% for ceftoxitin. Three isolates that presented the *mrpA* gene didn't express MR/P hemagglutinin, but they expressed aggregative adhesion to cell cultures. These data suggests that the *P. mirabilis* colonization is multifactorial and the fimbrial adhesins may work in concert for an efficient colonization of the urinary tract. The absence of hemolytic activity in contrast with the detach of Vero cells displayed by some isolates suggests that the cell-bound hemolysin is not the only responsible factor for the citotoxic effect. The isolates ability to adhere to polystyrene surface may result in catheter obstruction. The obtained results indicates that the studied isolates of uropathogenic *P. mirabilis* presents great infection potential to stabilish infection in susceptible patients, despite of this susceptibility to the most antimicrobial commomly used to treat urinary tract infections.

Keywords: Urinary Infection. Urease. Fimbrial Adhesins. Hemolysins. Antibiotics.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 <i>PROTEUS</i> SPP.....	10
1.2 SWARMING.....	11
1.3 UREASE.....	13
1.4 ADESINAS FIMBRIAIS.....	15
1.4.1 Manose-resistente <i>Proteus</i> -like (MR/P).....	15
1.4.2 Manose-resistente <i>Klebsiella</i> -like (MR/K).....	16
1.4.3 Fímbria Manose-sensível (MS).....	17
1.4.4 Fímbria não-aglutinante (NAF).....	18
1.4.5 Fímbria <i>Proteus mirabilis</i> (PMF).....	19
1.4.6 Fímbria <i>Proteus mirabilis</i> P-like (PMF).....	19
1.4.7 Fímbria temperatura-ambiente (ATF).....	20
1.5 CÁPSULA.....	20
1.6 HEMOLISINA.....	21
1.7 PROTEASES.....	22
1.8 SIDERÓFOROS.....	23
1.9 RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS.....	24
2 OBJETIVO	25
3 TRABALHO CIENTÍFICO: Virulence determinants of uropathogenic <i>Proteus mirabilis</i> isolated in Londrina, Brazil (este trabalho será enviado para a FEMS Microbiology Letters).....	26
4 TRABALHO CIENTÍFICO: In vitro stone formation by uropathogenic <i>Proteus mirabilis</i> in urine Agar (este trabalho foi enviado para: Brazilian Journal of Medical and Biological Research).....	41
5 CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

A infecção do trato urinário (ITU) é a infecção bacteriana mais freqüentemente documentada em humanos, tanto em hospitais quanto na comunidade. Caracteriza-se fundamentalmente pela multiplicação de bactérias em qualquer parte do trato urinário, seja nos rins, ureteres, bexiga ou uretra. Embora *Escherichia coli*, seja o microrganismo responsável pela maioria dos casos, infecções causadas por *Proteus* spp. são significantes devido a fatores de virulência como a produção de urease, responsável pela formação de cálculos e danos teciduais, e por este motivo tendem a ser mais severas e persistentes do que as causadas por *Escherichia coli*. Outras bactérias também podem causar infecção, tais como *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Providencia stuartii*, *Morganella morganii*, *Enterobacter* spp, *Citrobacter* spp., *Enterococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. (Coker et al., 2000; Mobley, 2000).

A infecção urinária pode atingir pessoas de qualquer sexo e idade, sendo mais freqüente em mulheres. É a infecção nosocomial que mais acomete idosos, além de ser a forma mais comum de infecção em enfermarias, centros cirúrgicos e unidades de terapia intensiva (UTI), sendo os pacientes cateterizados os de maior risco. Os agentes causais geralmente são os mesmos de ITU não-nosocomial, porém com maior resistência a antimicrobianos (Lenz, 1994).

Proteus spp. está associado a ITU principalmente em indivíduos com alguma anormalidade do trato urinário ou relacionado com cateterismo vesical. Entre os fatores de virulência apresentados por *Proteus* spp., podemos citar como os mais importantes e estudados a adesão fimbrial (principalmente a fímbria manose resistente *Proteus*-like, MR/P), produção de urease e produção de hemolisinas (Mobley, 2000).

1.1 *PROTEUS* SPP.

Proteus spp. são bactérias Gram-negativas, anaeróbias facultativas, dimórficas, móveis, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. São encontradas em

solo, água e trato intestinal de vários mamíferos. O gênero *Proteus* foi descrito por Hauser em 1885 e recebeu esse nome por influência da mitologia grega, na qual Proteus é aquele capaz de assumir diferentes formas. É composto por cinco espécies: *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. penneri*, *P. myxofaciens* e *P. hauseri*. Dentre elas, apenas as três primeiras estão relacionadas com ITU (O'Hara et al., 2000).

1.2 SWARMING

Microrganismos como *Proteus* spp., *Vibrio* spp., *Bacillus* spp. e *Clostridium* spp., têm a capacidade de apresentar swarming que é um comportamento multicelular de migração induzido por percepção de mudanças ambientais físicas ou químicas, como aumento da viscosidade do meio ou acréscimo de peptídeos e aminoácidos, especialmente a glutamina (Belas, 1992; Allison et al., 1993).

O swarming caracteriza-se por uma diferenciação cíclica composta por três estágios iniciais: a diferenciação, migração e consolidação.

Na diferenciação as células vegetativas (swimmers) de 2 a 4 μm de comprimento aumentam seu tamanho para até 80 μm , apresentando-se como filamentos aseptados multinucleados e passando a ter cerca de 50 vezes mais flagelos na superfície celular (swarmers). Na célula swarmer o lipopolissacarídeo (LPS) de cadeia longa predomina em relação aos de cadeia curta, a membrana externa apresenta maior fluidez, não ocorre a expressão de fímbrias e há um aumento substancial na atividade da urease intracelular e hemolisinas (Sidorczik & Zynch, 1986; Belas et al., 1992).

Na migração, que dura de uma a duas horas, as bactérias movimentam-se rapidamente devido ao alinhamento de várias células alongadas, movimentação coordenada dos flagelos e produção de polissacarídeos capsulares para manter a conformação e auxiliar no deslizamento. Esta cooperação e a produção de polissacarídeos extracelulares são essenciais para a movimentação celular. (Belas, 1992; Gygi et al., 1995).

Na consolidação as bactérias completam a diferenciação e dividem-se em células vegetativas (swimmers) novamente. Ocorre a diminuição na

expressão de flagelo e de outros fatores de virulência e aumento da expressão de fímbrias (Allison et al., 1992).

Allison et al. (1992) observaram diferentes níveis de expressão de fatores de virulência usando mutantes construídos com inserção de transposons. Mutantes não-flagelados e imóveis foram incapazes de invadir células uroepiteliais e apresentaram baixa atividade de urease, hemolisina e protease em relação ao fenótipo da amostra selvagem. Já os mutantes móveis e incapazes de diferenciar em célula swarmer apresentaram queda na atividade hemolítica, ureolítica e de invasão, além de produzir três vezes menos protease que o fenótipo da amostra selvagem.

Na célula swarmer a superexpressão de flagelo é o aspecto mais importante. O flagelo funciona como um sensor tátil das condições externas, transmitindo-as para dentro da célula. Tanto na célula swimmer quanto na swarmer o flagelo é codificado pelos genes *flaA*, *flaB*, *flaC* e *flaD* (Gygi et al., 1995).

Belas & Flaherty (1994) descreveram a ocorrência de múltiplos genes codificando flagelina em *P. mirabilis* como os genes *flaA* e *flaB*. O gene *flaD* é o responsável pela assembléia das subunidades flagelares.

Belas (1994) reportou que apenas mutações no gene *flaA* prejudicam o swarming e a motilidade. Além disso, demonstrou também que ocorre variação na flagelina produzida por *P. mirabilis* ocorrendo à produção de um flagelo híbrido contendo a porção N-terminal de *flaA* e a porção N-terminal de *flaB* ou *flaC*, que é antigenicamente distinto do codificado pelo *flaA*. Esta variação antigênica aumenta potencialmente a capacidade de evasão do sistema imunológico do hospedeiro.

A expressão de flagelo está sob controle do operon *flhDC*, que codifica o ativador transcricional FlhD2C2, e também está envolvido na divisão celular (septação) e na integração de sinais, regulando também a expressão de outros fatores de virulência durante o swarming (Furness et al., 1997).

Dessa forma, o swarming é uma resposta adaptativa ao ambiente do hospedeiro para facilitar a colonização do trato urinário e pode estar envolvido na formação de biofilmes em catéteres (Allison et al., 1994; Stickler et al., 1998).

1.3 UREASE

Aproximadamente 46% dos bacilos Gram-negativos produzem urease, mas embora a produção de urease seja um fenótipo comum entre as bactérias causadoras de ITU, espécies como *P. mirabilis* são mais frequentemente associadas com formação de cálculos e pielonefrite (Griffith et al. 1976; Jones & Mobley, 1987).

Urease expressa por *Proteus* é uma enzima de 212-280 KDa localizada no citoplasma bacteriano e tem sua síntese induzida pela uréia. É codificada pelo operon *ure* composto por oito genes: *ureA* (α), *ureB* (β) e *ureC* (γ) responsáveis pela codificação das proteínas estruturais, *ureEFG* responsáveis pela incorporação do cofator níquel à enzima, *ureD* uma chaperonina responsável pela proteína reguladora positiva e importante no direcionamento das subunidades para tornar a enzima ativa, e *ureR* que é transcrito na direção oposta ao restante do operon e codifica a proteína indutora da família AraC de reguladores transcricionais (Nicholson et al., 1993; Thomas & Collins, 1999).

A urease é responsável pela hidrólise da uréia em gás carbônico (CO₂) e amônia (NH₃) com conseqüente alcalinização da urina. A urina alcalina propicia a formação de cálculos renais, principalmente estruvita (MgNH₄PO₄.6H₂O) e carbonato de apatita [Ca₁₀(PO₄)₆CO₃] e conseqüentes processos obstrutivos que seguramente determinarão incremento na multiplicação bacteriana. A amônia liberada é responsável pelo dano tecidual, que facilita a persistência do patógeno (Rodman, 1998).

Mutantes negativos em diferentes genes do operon da urease foram testados no modelo murino de ITU ascendente e tiveram sua capacidade de colonizar e persistir na bexiga e rins severamente atenuada. Quando inoculado em altas concentrações, foram capazes de colonizar a bexiga de camundongos cateterizados, mas incapazes de ascender até os rins e causar urolitíase (Jones et al., 1990; Johnson et al., 1993).

A formação do cálculo inicia-se com a formação dos primeiros cristais de estruvita, cuja primeira conformação é em forma de X, seguida por uma forma dendrítica e assim que a supersaturação e o grau de crescimento tornam-se

menos pronunciados, adquire formas tabulares, trapezoidais e finalmente octaédricas (Rodman, 1998; Mobley, 2000).

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

Braude & Sieminski (1960) verificaram que o aumento do pH, associado à hidrólise da uréia, é tóxico para células Vero (células de rim de macaco verde africano) *in vitro*.

A incrustação de catéteres de demora tem sido amplamente relatada por vários autores, podendo inclusive chegar à obstrução. De acordo com a literatura, *P. mirabilis* é o microrganismo predominante na urina de pacientes com obstrução de catéteres (Morris & Stickler, 1998; Coker et al., 2000)

A incrustação do cateter inicia-se com a infecção do trato urinário por bactérias produtoras de urease e posterior adesão à superfície do cateter. Segue-se o desenvolvimento de biofilme através da secreção de exopolissacarídeos bacterianos. A atividade da urease eleva o pH do micro-ambiente e da urina, levando à precipitação de íons magnésio e cálcio. A este biofilme pode aderir cálculos previamente formados no trato urinário, o que ajuda a bloquear o cateter. Desta forma, a bactéria torna-se menos susceptível a antimicrobianos e aos mecanismos de defesa do hospedeiro (Mobley & Warren, 1987; Stickler et al., 1993; Dumanski et al., 1994).

Stickler et al. (1993) verificaram que dos 73 catéteres de demora pesquisados, 18 apresentavam *P. mirabilis*. Destes, 10 apresentavam cultura pura e uma estrutura cristalina ausente nos catéteres destituídos de *P. mirabilis*.

Morris et al. (1997) demonstraram que de 18 tipos de catéteres de diferentes materiais estudados, nenhum foi capaz de resistir à incrustação causada por *P. mirabilis*.

Entre as tentativas utilizadas no controle da obstrução de catéteres, pode-se citar: impregnação do cateter com antimicrobianos durante a colocação e a troca, acidificação da dieta do paciente, escolha de cateter constituído de material

menos passível de adesão bacteriana, ingestão de inibidores de urease (ácido acetoidroxâmico). Atualmente tem sido proposto a impregnação de catéteres com substâncias análogas a moléculas de N-acil-L-homoserinas lactonas (AHL), responsáveis pela indução de biofilme, que inibiriam a ligação das moléculas de sinalização nativas a seus receptores apropriados, inibindo assim o “quorum sensing” (Roberts et al., 1990; Stickler et al., 1993; Bibby & Hukins, 1993)

1.4 ADESINAS FIMBRIAIS

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

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

Entre as fímbrias relacionadas com *Proteus* spp., a manose-resistente *Proteus*-like (tipo IV) é a melhor estudada. Caracteriza-se como uma fímbria de 7 a 8 nm de diâmetro observada pela primeira vez em bactérias capazes de aglutinar eritrócitos de uma maneira manose-resistente (Old & Adegbola, 1982).

O operon *mrp*, responsável pela codificação da fímbria MR/P é composto de duas regiões: *mrpABCDEFGHJ* e *mrpI*. O *mrpABCDEFGHJ* codifica 8 proteínas estruturais (MrpA,B,C,D,E,F,G,H) e uma proteína ligadora de DNA (MrpJ). O *mrpI* codifica a proteína regulatória MrpI, envolvida na regulação transcricional (ON/OFF) do operon (Bahrani & Mobley, 1994).

Li et al. (1997) sugeriram que o polipeptídeo MrpG não é a adesina, mas é fundamental para o início da assembléia das subunidades da fímbria MR/P. O mutante *mrpG* perdeu a capacidade de aglutinar eritrócitos de maneira manose-resistente, não apresentou a proteína MrpA e tornou-se significativamente menos virulento no modelo animal de infecção transuretral.

A fímbria MR/P é altamente imunogênica e sua expressão diminui a habilidade do *P. mirabilis* em infectar o parênquima renal pela via hematogênica porque torna a bactéria mais susceptível à fagocitose.

A urina humana apresenta moléculas, geralmente glicoproteínas, de baixo peso molecular capazes de inibir a ligação da fímbria MR/P aos receptores do hospedeiro. Sareneva et al. (1990) propuseram que a baixa ligação ao uroepitélio intacto talvez possa explicar a relativa baixa patogenicidade do *P. mirabilis* em hospedeiros saudáveis.

Li et al. (1999) propuseram que a MrpH estaria localizada na extremidade da fímbria e seria a adesina funcional. Ainda, verificaram que ela é essencial para a assembléia da fímbria e substituições na extremidade N-terminal levaram a perda na capacidade de hemaglutinação.

Zunino et al. (2001) reportaram que o gene *mrpA* pode estar presente em múltiplas cópias no cromossomo e tem papel importante na hemaglutinação. O mutante *mrpA* foi incapaz de sintetizar a fímbria e apresentou-se menos aderente em células uroepiteliais.

Pesquisas para a obtenção de uma vacina contra infecção urinária em indivíduos susceptíveis têm sido desenvolvidas tendo a fímbria MR/P como alvo. Testes no modelo animal demonstraram que apesar da produção de IgM e IgG pelos camundongos infectados, não houve proteção (queda na mortalidade) dos animais quando submetidos a uma segunda infecção. Imunizações usando diversas subunidades da fímbria em várias vias de inoculação apresentaram resultados mais animadores, principalmente usando a proteína MrpH inoculada via intranasal (Johnson et al., 1999; Li et al., 1999).

1.4.2 Manose-resistente *Klebsiella*-like (MR/K)

Apesar do nome, a hemaglutinina manose-resistente *Klebsiella*-like (tipo 3) é expressa por bactérias pertencentes a vários gêneros da família *Enterobacteriaceae* e estudos sorológicos demonstraram que existe uma considerável diversidade antigênica entre elas (Old & Adegbola, 1985; Clegg & Gerlach, 1987).

Silverblat (1974) observou que bactérias expressando uma fímbria fina, de aproximadamente 7 nm de diâmetro, eram mais virulentas no modelo murino de ITU (pielonefrite).

Mais tarde, Old & Adegbola (1982) reportaram que estes filamentos finos eram responsáveis pela hemaglutinação de eritrócitos tratados com ácido tânico, modelo este, observado pela hemaglutinina MR/K. A espermidina secretada na urina inibe a ligação da adesina aos eritrócitos tratados com ácido tânico e uma vez que ela é exposta na superfície de eritrócitos tratados, sugere-se que a hemaglutinação dada por MR/K é mediada pela espermidina (Gerlach et al., 1989).

O operon responsável pela codificação da hemaglutinina MR/K é composto por seis genes *mrkABCDEF*, sendo MrkA a maior subunidade estrutural (20,5 KDa), MrkB (25 KDa) e MrkC (91 KDa) responsáveis pela assembléia das subunidades estruturais, MrkD (34 KDa) a adesina funcional, MrkE (30 KDa) possivelmente responsável pela regulação do operon, e MrkF (14,5 KDa) envolvida no ancoramento da hemaglutinina na superfície da célula (Allen et al., 1991).

A expressão da hemaglutinina MR/K por isolados associados a catéteres permite pensar que esta adesina pode estar relacionada com a habilidade de aderir *in vitro* a superfícies de catéteres (Mobley & Chippendale, 1990).

1.4.3 Fímbria Manose-Sensível (MS)

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

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

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

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

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

1.4.4 Fímbria não-aglutinante (NAF)

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

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

Recentemente o nome fímbria não-aglutinante foi proposto para substituir adesina de célula uroepitelial para distingui-la das outras adesinas fímbriais expressas por *P. mirabilis* (Tolson et al., 1997).

Latta et al. (1998) testando a expressão de NAF em diferentes condições, verificaram que a sua melhor expressão dá-se na presença de Agar Lúria 2% de agar, adicionado de 0,5% de glicose, incubados a 22 °C por 48 horas.

Também verificou que os isolados testados crescidos sob diferentes condições foram aptos a aderir e invadir células EJ/28 (tumor de trato urinário).

Latta et al. (1999) encontraram que células swarmer não expressam (ou expressam muito pouco) a fímbria MR/P e a NAF, e sugeriram que a expressão de ambas é controlada por um elemento regulador comum.

1.4.5 Fímbria *Proteus mirabilis* (PMF)

Bahrani et al. (1993) reportaram o isolamento e sequenciamento do gene *pmfA* relacionado com a Fímbria *Proteus mirabilis* (PMF) como sendo uma seqüência de 552 pb responsável pela codificação de um polipeptídeo de 184 aminoácidos. Este apresentou homologia com outras subunidades fimbriais de outros gêneros.

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

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

1.4.6 Fímbria *Proteus mirabilis* P-like (PMP)

A Fímbria *Proteus mirabilis* P-like (PMP) foi reportada por Bijlsma et al. (1995) pesquisando *P. mirabilis* isolados de cães. O gene *pmpA* foi identificado como um fragmento de DNA de 549 pb codificando um polipeptídeo de 183

aminoácidos. A proteína PmpA apresentou grande similaridade com a subunidade maior da fímbria P (pap) de *E. coli* pielonefritogênica.

1.4.7 Fímbria temperatura-ambiente (ATF)

Massad et al. (1994) purificaram e caracterizaram a fímbria ATF e verificaram que a sua subunidade maior (24 kDa) não apresentou similaridade com nenhuma outra fímbria ou proteína. Através da microscopia eletrônica verificou-se que era formada por uma estrutura tubular na superfície da bactéria reconhecida por anti-soro específico, mas não relacionada com hemaglutinação. As condições de crescimento influenciam sua expressão. Verificou-se que a sua melhor expressão dá-se em Caldo Lúria a 23 °C por 48 horas, sem aeração. A seqüência parcial de 2 polipeptídeos foi determinada por Mobley (1996): AtfA com 19 kDa sendo uma subunidade estrutural e AtfB sendo uma chaperonina-like. Esta fímbria foi relacionada com o crescimento de *Proteus* spp. no ambiente.

1.5 CÁPSULA

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

1.6 HEMOLISINA

As hemolisinas são toxinas formadoras de poros que se inserem em alvos na membrana de células eucariontes, causando efluxo de sódio. Estão associadas com a citotoxicidade em células Vero. Não são consideradas essenciais na fase inicial de infecção, mas são importantes na disseminação do patógeno até o trato urinário superior (Mobley & Chippendale, 1990; Coker et al., 2000). São visualizadas fenotipicamente em *P. mirabilis* através da lise de eritrócitos de carneiro (Senior & Hughes, 1987).

Mobley & Chippendale (1990) verificaram que não houve diferença na produção de hemolisina comparando isolados fecais com isolados de pacientes com pielonefrite ou bacteriúria associada a cateter, sugerindo que a produção de hemolisina não é um marcador seguro de virulência.

Koronakis et al. (1987) e Welch (1987) reportaram três tipos de atividade hemolítica: intracelular, associada à célula (*P. mirabilis*, *P. vulgaris* e *Morganella morganii*) e extracelular. A última não foi detectada em nenhuma amostra de *P. mirabilis*, apenas em *P. vulgaris* e *M. morganii*.

A beta-hemolisina cálcio independente é codificada por dois genes em *Proteus* spp.: *hpmA* (166 KDa) e *hpmB* (63 KDa). O *hpmA* é ativado quando seu peptídeo N-terminal é clivado, sendo este passo essencial para o transporte da hemolisina para a superfície da bactéria. Estes apresentam homologia com *shIA* e *shIB* de *Serratia marcescens*. Assim, HpmA e ShIA formam uma nova família de hemolisinas entre os patógenos Gram-negativos oportunistas (Uphoff & Welch, 1990; Lukomski et al., 1991).

Kaca & Rózalski (1991) verificaram que a atividade hemolítica da HpmA em *P. mirabilis*, quando associada à célula, é maior entre a fase log tardia e estacionária. Observaram também que esta hemolisina não é dependente do tipo de meio de cultura ou da quantidade de oxigênio, sendo inibida em presença de N-etilmaleimida e tripsina.

Mobley et al. (1991) testaram mutantes defectivos nos genes *ureC* da urease e *hpmA* da hemolisina em cultura de células HRPTEC (célula renal humana do epitélio tubular proximal) e reportaram que a HpmA é a principal

responsável pela citotoxicidade, verificada através da mensuração da lactato desidrogenase liberada.

HpmA, responsável por dano tecidual, esta localizada no periplasma e é ativada e transportada pela HpmB que esta localizada hipoteticamente na membrana externa. Mutantes *hpmA* com deleção de 140 KDa na extremidade amino-terminal apresentaram dose letal seis vezes maior que a cepa selvagem e para que haja secreção são necessários os 335 aminoácidos do *hpmA* (Swihart & Welch, 1990).

A alfa-hemolisina cálcio-dependente (HlyA) é encontrada no sobrenadante de alguns isolados de *Proteus* spp., principalmente em *P. vulgaris*. A HlyA de *Proteus* spp. está relacionada com HlyA de *E. coli* e a produção de hemolisinas HpmA é mais comum em *Proteus* spp. do que a HlyA (Senior & Hughes, 1987; Swihart & Welch, 1990).

Peerbooms et al (1983) verificaram que *P. mirabilis* que sintetizam hemolisina associada à célula apresentam uma dose letal 50% menor do que os não-hemolíticos quando injetados transuretralmente em camundongos. Posteriormente demonstraram que a atividade hemolítica em *P. mirabilis* está relacionada com a invasão celular. Estudando 32 amostras, verificaram que a internalização em células Vero aumentou proporcionalmente ao título hemolítico da amostra bacteriana (Peerbooms et al., 1984).

A hemolisina HpmA é citotóxica para uma variedade de células. Mobley et al. (1991), estudando amostras de *P. mirabilis* produtoras de hemolisina, verificaram que todas foram citotóxica em células de cultura HRPTEC.

1.7 PROTEASES

Foram descritas quatro enzimas proteolíticas em *Proteus*: IgA protease, uma proteinase, ZapA e uma protease da família U32 de peptidase, todas elas pertencentes à família Serralisina de metaloproteases dependente de zinco (Kornfeld & Plaut, 1981).

A IgA protease cliva a imunoglobulina em vários fragmentos. A proteinase (metaloenzima proteolítica extracelular 50 KDa) é capaz de clivar IgA,

IgG, caseína soroalbumina bovina, gelatina e outros componentes secretores. Esta foi observada em bactérias isoladas de pacientes com ITU crônica. ZapA (55 kDa) digere Igs do soro (IgA1, IgA2 e IgG) de humanos e camundongos e tem sua ação estimulada por cátions divalentes Ca^{2+} e Mg^{2+} . Além disso, apresenta similaridade com as enzimas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marscens* e *Erwinia chrysanthemi*. A protease da família U32 de peptidases ao ser submetida a uma mutação insercional em *P. mirabilis* resultou em diminuição na produção extracelular de protease e redução de 100 vezes na colonização em camundongos (Loomes et al., 1990).

1.8 SIDERÓFOROS

Os sideróforos clássicos não estão presentes em *Proteus* spp. Drechsel et al. (1993) verificaram que a mais significativa atividade de sideróforo é apresentada por α -cetoácidos resultantes da desaminação do triptofano e fenilalanina (ácido indolpirúvico e ácido fenilpirúvico, respectivamente) e de outros α -cetoácidos como α -cetoisocapróico ou α -cetoisovalérico. Apesar dos α -cetoácidos não formarem complexos estáveis com o ferro, à conformação é suficiente para quelar ferro na ausência de sideróforos clássicos.

1.9 RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

Proteus spp. apresentam resistência intrínseca a nitrofurantoína, tetraciclina e polimixina, e são susceptíveis a ampicilina, amoxicilina, piperacilina, cefalosporinas (cefoxitina, cefuroxima, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, ceftizoxime, cefepime), aminoglicosídeos (amicacina, gentamicina, tobramicina), imipenem, ciprofloxacina e sulfa-trimetoprim (Coker et al., 2000).

Casos de *P. mirabilis* envolvidos em surtos hospitalares não são freqüentemente relatados. Chow et al. (1979) relataram um surto onde *P. mirabilis*

apresentou resistência a ampicilina, cefalosporina, tetraciclina, cloranfenicol, carbenicilina, colistina, sulfa-trimetoprim, estreptomicina, aminoglicosídeos e Dance et al. (1987) reportaram *P. mirabilis* resistente a gentamicina e clorexidina como causa de ITU em 90 pacientes relacionados com sondagem.

Nem sempre as resistências observadas *in vivo* correspondem com as relatadas *in vitro*, uma vez que as bactérias em questão apresentam mecanismos de evasão dos antimicrobianos, como por exemplo, incrustação nos cálculos, o que pode mascarar a verdadeira susceptibilidade (Rózalski et al., 1997).

2 OBJETIVO

A frequência de microrganismos isolados de ITU vem-se modificando com o passar dos anos. O principal fator que influencia essa mudança é o uso indiscriminado de drogas antimicrobianas. *Escherichia coli* considerado um dos principais uropatógenos vem sendo atualmente responsável por menos de 50% dos casos de ITU nosocomial, relacionados a cateter, e patógenos como *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp e *Proteus* spp, vêm tornando-se cada vez mais freqüentes.

P. mirabilis está associado a ITU principalmente em indivíduos com alguma anormalidade do trato urinário ou relacionado com cateterismo vesical. Devido à presença de fatores de virulência como produção de urease, responsável pela formação de cálculos e danos teciduais, tendem a causar ITU mais severas e persistentes do que as causadas por *E. coli*.

Sendo assim, vimos a necessidade de um estudo com o objetivo de caracterizar melhor genotipicamente e fenotipicamente os principais fatores de virulência associados a cepas de *P. mirabilis* uropatogênicas, isoladas na região de Londrina.

3 TRABALHO CIENTÍFICO

Virulence determinants of uropathogenic *Proteus mirabilis* isolated in Londrina, Brazil

Michele R. L. Silva, Jacinta S. Pelayo*

Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, 86051-970
Londrina, PR, Brazil

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

Keywords: *Proteus mirabilis*; Uropathogenic; Virulence determinants

Submetido ao periódico **FEMS Microbiology Letters**

Abstract

We investigated 35 uropathogenic *Proteus mirabilis* isolates from urinary tract infections for the presence of the *mrpA* gene, and for the expression of adherence factors and hemolysin production. The *mrpA* gene was detected in 82.3% of the isolates, and combination of mannose-resistant *Proteus*-like (MR/P) and mannose-resistant *Klebsiella*-like (MR/K) hemagglutinins was observed in 68.6% of the isolates. The 35 strains displayed aggregative adhesion to HEp-2 cells after 6h of incubation. Most of the strains were able to detach Vero cells and to adhere to coverslip surfaces, showing an aggregative adherence pattern after 6h of incubation. Hemolytic activity in total cell cultures was observed in 90% of strains. The association of the virulence factors searched for in this work as hemolysin and hemagglutinins MR/P and MR/K, with the cytotoxic activity against Vero cells, their adhesion model in HEp-2 cells and capacity to adhere in inert surfaces (plastic), could be assessed by evaluation of specific mutations for each factor.

1. Introduction

Proteus mirabilis is a common cause of urinary tract infection (UTI) in patients with short and long-term indwelling urinary catheters, and in individuals with structural or functional abnormalities of the urinary tract. These infections may cause cystitis and serious complications such as pyelonephritis, bacteremia and stone formation, which can produce severe damage in kidney tissue and may block catheters [1,2].

P. mirabilis expresses several putative virulence factors, such as urease, flagella (swarming phenomenon), fimbriae, resistance to normal serum, outer-membrane proteins, IgG and IgA proteases and invasiveness in tissues [2]. A variety of fimbriae and hemagglutinins were detected in *P. mirabilis*: mannose resistant *Proteus*-like (MR/P), mannose resistant *Klebsiella*-like (MR/K), nonagglutinating fimbriae (NAF), *Proteus mirabilis* fimbriae (PMF), ambient-temperature fimbriae (ATF), *Proteus mirabilis* P-like fimbriae (PMP) and mannose-sensitive fimbriae (MS), but the mechanisms by which it adheres to cells is unclear [2,3,4].

Among the adherence structures, MR/P is the most important and the best understood, and it has been associated with pyelonephritis [4,5]. MR/K has been strongly associated with adhesion to catheters and with persistence of catheter-associated bacteriuria.[2,6]. Studies suggesting fimbriae-mediated adhesion to tissue culture cells in vitro were reported by some authors, but none of them has described a pattern of adherence characteristic of *P. mirabilis* [7,8].

There is also evidence that hemolysins lead to increased virulence in *P. mirabilis* infection. Production of this protein has been correlated with cytotoxicity for Vero (African green monkey kidney) cells [9].

In this study we investigated the presence of several putative virulence factors in *P. mirabilis* isolates from community-acquired UTI in Londrina, Brazil.

2. Material and methods

2.1. Bacterial isolates

Thirty-five *Proteus mirabilis* isolated from urine of patients (1-71 years old; median age, 25) with community-acquired urinary tract infection were examined in this study. The population analyzed (21 men and 14 women) was selected from patients attending the emergency room of public hospitals and a clinical laboratory in the city of Londrina, Brazil. Strains were isolated between April 2001 and May 2002. The bacterial isolates were first identified by MicroScan (Behring-DADE, California, CT) in Neg Combo 20 plates and then confirmed by biochemical tests in our laboratory [10,11] and stocked at -70°C in tryptic soy broth (TSB) (Biobras-Brasil), with 20% glycerol.

2.2. Polymerase chain reaction (PCR)

The 35 *P. mirabilis* isolates were screened for the presence of the genetic sequences *mrpA* (major subunit of fimbriae MR/P) and *fimH* (adhesin subunit of type I fimbriae). Table 1 shows the primers sequences, sizes of amplified DNA fragments, and annealing temperature for the sequences studied. The *mrpA* primer was designed to amplify a 625-bp DNA fragment, corresponding to the 5'-region from nucleotide 21 to 690 of the published sequence of *mrpA* (Gen Bank accession number Z18753). Amplification reactions consisted of 25 cycles and were performed as follows. Bacterial growth from cultures on tryptic soy agar (Biobras-Brazil) were suspended in 300 µl of Milli-Q water and boiled for 10 min in order to release and denature the bacterial DNA. The amplification of the bacterial DNA was carried out in 25 µl volumes containing 10 µl of bacterial lysate, 200 µM dNTPs (Gibco-BRL), 1.5 mM MgCl₂ (Gibco-BRL), 20 pmol of each primer (Gibco-BRL) and 1.5 U *Taq* DNA polymerase (Gibco-BRL). After amplification, the products were eletrophoresed in 1% agarose gel (Difco, Detroit, MI, USA), stained with ethidium bromide (Gibco-BRL) and visualised in a digital image capture system (Imagemaster, Pharmacia). The sizes of the bands were determined by comparing them with a 100 pb DNA Ladder (Gibco-BRL). *P. mirabilis* HI4320 [12] was used as positive control for *mrpA* and *Escherichia coli* V-27 for *fimH* [13].

2.3. Hemagglutination assay

Bacteria were passaged statistically three times for 48 h in 3 ml of nutrient broth (Biobras-Brazil) at 37 °C, then harvested by centrifugation (8,000 g, 10 min). Cell pellets were suspended in 0.3 ml of phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2, and 0.05 ml of suspension was mixed with 0.1 ml of erythrocyte suspension (3%) on glass surface, at 23 °C. Hemagglutination was defined as visible clumping of erythrocytes as follows: Mannose-sensitive (MS) hemagglutination was demonstrated by agglutination of guinea pig erythrocytes in the absence but not in the presence of 50 mM mannose. MR/K hemagglutination was shown by agglutination of tannic acid-treated erythrocytes but not untreated human (O group) erythrocyte; this reaction was not inhibited by 50 mM mannose. MR/P hemagglutination was demonstrated by agglutination of untreated and tannic acid-treated chicken erythrocytes, in the presence of 50 mM mannose [6].

2.4. HEp-2 and Vero cells adherence assay

All *P. mirabilis* isolates were tested for adherence to HEp-2 (Human laryngeal epithelial) and Vero cells with 3h and 6 h of incubation , as described by Cravioto et al. [14].

2.5. Hemolysin Assay

The method used was the described by Mobley & Chippendale [6]. Bacteria were grown at 37°C with aeration in brain-heart infusion broth (BHIB) (Difco, Detroit, MI, USA) prepared in PBS, pH 7.2, instead of water and turbidity was monitored at OD₅₅₀ . Samples were taken at different times points and 0.1 ml of two-fold dilutions of bacterial suspension in PBS, pH 7.2, were mixed with 0.05 ml of a 3% suspension of sheep erythrocytes and incubated at 37 °C for 1 h. The hemolytic titres was defined as the highest dilution in which no visible erythrocyte pellet was observed. To verify whether hemolysin was cell-bound and/or secreted, aliquots of samples were taken at different times, filtered through millipore filter membranes (0.22 µm), and then assayed for hemolytic activity.

2.6. Adhesion to inert surface

The method used was the described by Stepanovic et al. [15]. Bacteria isolates were cultivated overnight at 37 °C in Luria-Bertani (LB) broth . The cultures were diluted 1:200 in LB, and 200 µl of this suspension were inoculated in quadruplicate in sterile 96-well polystyrene plates (NUNC, Naperville, IL), and incubate for 24 h at 37°C. Negative control wells contained broth only. Then, the content of each well was aspirated, and was washed three times with 250 µl of sterile PBS, pH 7.2. The attached bacteria were fixed with 200 µl of 99% methanol (Merck) per well, and after 15 min plates were emptied and left to dry. The plates were stained for 5 min with 0.2 ml of 2% Hucker crystal violet used for Gram staining per well. Excess stain was rinsed off by placing the plate under running tap water. The plates were air-dried, and the OD of each well was measured at 550 nm with a Micro-ELISA Autoreader (MultiScan EX, LabSystem, Uniscience). The cut-off OD (OD_c) was defined as three standard deviations above the mean OD of the negative control. Strains were classified as follows:

$OD \leq OD_c$ (non-adherent)

$OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$ (weakly adherent)

$2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$ (moderately adherent)

$4 \times OD_c < OD$ (strongly adherent)

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

Gene	Primer sequence (5'-3')	Amplified Fragments (bp)	Annealing Temperature (°C)	Reference
<i>mrpA</i>	GAGCCATTCAATTAGGAATAATCC A AGCTCTGTACTTCCTTGTACAGA	625	58	This study
<i>fimH</i>	TGCAGAACGGATAAGCCG GG GCAGTCACCTGCCCTCCGTGA	508	63	[13]

3. Results and discussion

Several potential virulence factors have been suggested for uropathogenic *P. mirabilis* [2]. In this work, we have analysed adherence factors and hemolysin as virulence determinants.

Adherence plays an important role in the pathogenesis of UTI. Fimbriae-mediated adherence to uroepithelial cells and kidney epithelium may be essential for virulence of *P. mirabilis* [2]. This bacteria may express several types of fimbriae simultaneously, and their expression has been correlated with hemagglutination profiles [6].

We detected the *mrpA* gene in 29 isolates (82.3%); the remaining six (17.7%) strains tested did not present the *mrpA* gene and expressed MR/P hemagglutination. Bahrani et al. [16], constructed an *mrpA* mutant by allelic-exchange and verified that this mutant failed to express MR/P fimbriae and lost the ability to hemagglutinate erythrocytes. These phenotypes were restored when the clone *mrpA* gene was supplied in trans. However, a recent study has shown that a new gene *mrpH* located downstream of *mrpG* in the *mrp* gene cluster encodes the functional MR/P hemagglutinin [17]. It is possible that the region of *mrpA* gene searched for in this work is a variable region, and it would be interesting to verify whether the samples studied harbor the *mrpH* gene.

On the other hand, three strains that presented the *mrpA* gene did not express hemagglutination MR/P. Maybe some strains possess the gene sequences necessary for fimbriae expression but did not express some other proteins or adhesive structures.

The combination of MR/P and MR/K hemagglutinins was observed in 68.6% of the isolates, and 22.8% of the strains presented only MR/P hemagglutination. Mobley and Chippendale [6], observed that pyelonephritis isolates were more likely to express MR/P hemagglutinin in the absence of MR/K hemagglutinin than were catheter-associated or faeces isolates. The expression of MR/K hemagglutinin by catheter-associated isolates could be correlated with their ability to adhere in vitro to catheter surfaces. The *fimH* gene and expressed mannose-sensitive hemagglutination of guinea pig erythrocytes were not detected in any of the 35 isolates. Rarely the mannose-binding type 1 fimbriae are expressed by

uropathogenic strains of *P. mirabilis* [18]. Only three strains failed to hemagglutinate with any species of erythrocytes tested. These data suggest that colonization is multifactorial and that a number of fimbriae may work in concert efficiently to colonize the bladder and kidneys.

All 35 strains presented few bacteria forming aggregates on both coverslip and HEp-2 cells surfaces after 3h of incubation (Fig. 1A), but after 6 h of incubation all strains showed an aggregative adherence pattern typical of enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) described by Nataro et al. [19], with predominance of bacteria adherence to coverslip (Fig. 1B).

According to the results of the test of adhesion to inert surface, 42.8% of the strains presented strong adherence, 28.6% moderate adherence and 28.6% weak adherence in polystyrene plates.

The ability of these strains to adhere to plastic may be important for the establishment of urinary tract infections in catheterised patients. Of all nosocomial infections, 40% occur in the UTI and more than 60% of these are related to an indwelling urethral catheter [20].

In Vero cells, all of the 35 isolates presented adherence to both coverslips and cell surfaces, after 3 h of incubation (Fig. 2A). The standard of adhesion was not defined, probably because the Vero cells already presented a cytotoxic effect. After 6 h of incubation the majority of the strains were able to detach Vero cells and to adhere to the coverslip surface, showing an aggregative adherence pattern (Fig. 2B).

The hemolysin production was observed during late exponential phase of growth in BHIB. Only two isolates showed no detectable expression of hemolysin. The isolates produced measurable hemolytic activity with titers ranging from 1:2 to 1:128 (median, 1:20). None of the 35 *P. mirabilis* isolates expressed cell-free hemolytic activity.

Swihart and Welch [9] showed that HpmA is the hemolysin most commonly found among *P. mirabilis* isolates. Hemolytic activity was present in total cell cultures and cell-free supernatants and exhibited cytotoxic activity to Vero cells.

Associating the test of adhesion in Vero cells with hemolysin production, we observed that two isolates that did not present hemolysin caused cytotoxic effect in the Vero cells after 3 h and 6 h of incubation, which suggests that hemolysin is not the only factor responsible for the cytotoxic effect caused in Vero cells, and that possibly other factors might be important for cytotoxicity [21].

The association of the virulence factors searched in this work as hemolysin and hemagglutinins MR/P and MR/K, with the cytotoxic activity against Vero cells, their adhesion model in HEp-2 cells and capacity to adhere in inert surfaces (plastic), could be assessed by evaluation of specific mutations for each factor.

Acknowledgements

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

4. References

- [1] Coker, C., Poore, C.A., Li, X. and Mobley, H.L.T. (2000) Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. *Microb. Infect.* 2, 1497-1505.
- [2] Rózalski, A., Sidorczyk, Z. and Kotelko, K. (1997) Potential virulence factors of *Proteus* bacilli. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 65-89.
- [3] Gerlach, G.F., Allen, B.L. and Clegg, S. (1988) Molecular characterization of the type 3 (MR/K) fimbriae of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 170, 3547-3553.
- [4] Bahrani, F.K. and Mobley, H.L.T. (1994) *Proteus mirabilis* MR/P fimbrial operon: genetic organization, nucleotide sequence, and conditions for expression. *J. Bacteriol.* 176, 3412-3419.
- [5] Old, D. and Adegbola, R. (1982) Hemagglutinins and fimbriae of *Morganella*, *Proteus* and *Providencia*. *J. Med. Microbiol.*, 15, 551-564. 1982.
- [6] Mobley, H.T.L. and Chippendale, G.R. (1990) Hemagglutinin, urease, and hemolysin production by *Proteus mirabilis* from clinical sources. *J. Infect. Dis.* 161, 525-530.
- [7] Sareneva, T., Holthöfer, H. and Korhonen, T.K. (1990) Tissue-binding affinity of *Proteus mirabilis* fimbriae in the human urinary tract. *Infect. Immun.* 58, 3330-3336.
- [8] Cook, S.W., Mody, N., Valle, J. and Hull, R. (1995) Molecular cloning of *Proteus mirabilis* uroepithelial cell adherence (*uca*) genes. *Infect. Immun.*, 63, 2082-2086.
- [9] Swihart, K.G. and Welch, R.A. (1990) Cytotoxic activity of the *Proteus* hemolysin HpmA. *Infect. Immun.* 58, 1861-1869.
- [10] Toledo, M.R.F., Fontes, C.F. and Trabulsi, L.R. (1982a) EPM: modificação do meio de Rugai e Araújo para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H₂S, urease e triptofano-desaminase. *Rev. Microbiol.* 13, 309-315.

- [11] Toledo, M.R.F., Fontes, C.F. and Trabulsi, L.R. (1982b) MILi: um meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina-descarboxilase. *Rev. Microbiol.* 13, 230-235.
- [12] Mobley, H.L.T. and Warren, J.W. (1987) Urease-positive bacteriuria and obstruction of long-term urinary catheters. *J. Clin. Microbiol.* 25, 2216-2217.
- [13] Johnson, J.R. and Stell, A.L. (2000) Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J. Infect Dis* 181, 261-272.
- [14] Cravioto, A., Gross, R.J., Scotland, S.M. and Rowe, B. (1979) An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr. Microbiol.* 3, 95-99.
- [15] Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B. and Vlahović, M.S. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods.*40, 175-179.
- [16] Bahrani, F.K., Massad, G., Lockatell, C.V., Johnson, D.E., Russell, R.G., Warren, J.W. and Mobley, H.L.T. (1994) Construction of an MR/P fimbrial mutant of *Proteus mirabilis*: role in virulence in a mouse model of ascending urinary tract infection. *Infect. Immun.* 62, 3363-3371.
- [17] Li, X., Johnson, D.E. and Mobley, H.L.T. (1999) Requirement of MrpH for manose-resistant *Proteus*-like fimbriae-mediated hemagglutination by *Proteus mirabilis*. *Infect. Immun.* 67, 2822-2833.
- [18] Adegbola, R.A., Old, D.C. and Senior, B.W. (1983). The adhesins and fimbriae of *Proteus mirabilis* strains associated with high and low affinity the urinary tract. *J. Med. Microbiol.* 16, 427-431
- [19] Nataro, J. P., Kaper, J. B., Robins-Browne, R., Prado, V., Vial, P. and Levine, M. M. (1987) Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 6, 829-831.
- [20] Roberts, J.A., Fussel, E.N. and Kaack, M.B. (1990) Bacterial adherence to urethral catheters. *J. Urol.* 144, 264-269.

- [21] Mobley, H.L.T., Chippendale, G.N., Swihart, K.G., and Welch, R.A. (1991) Citotoxicity of the HpmA hemolysin and urease of *Proteus mirabilis* and *Proteus vulgaris* against cultured human renal proximal tubular epithelial cells. *Infect. Immun.* 59, 2036-2042.

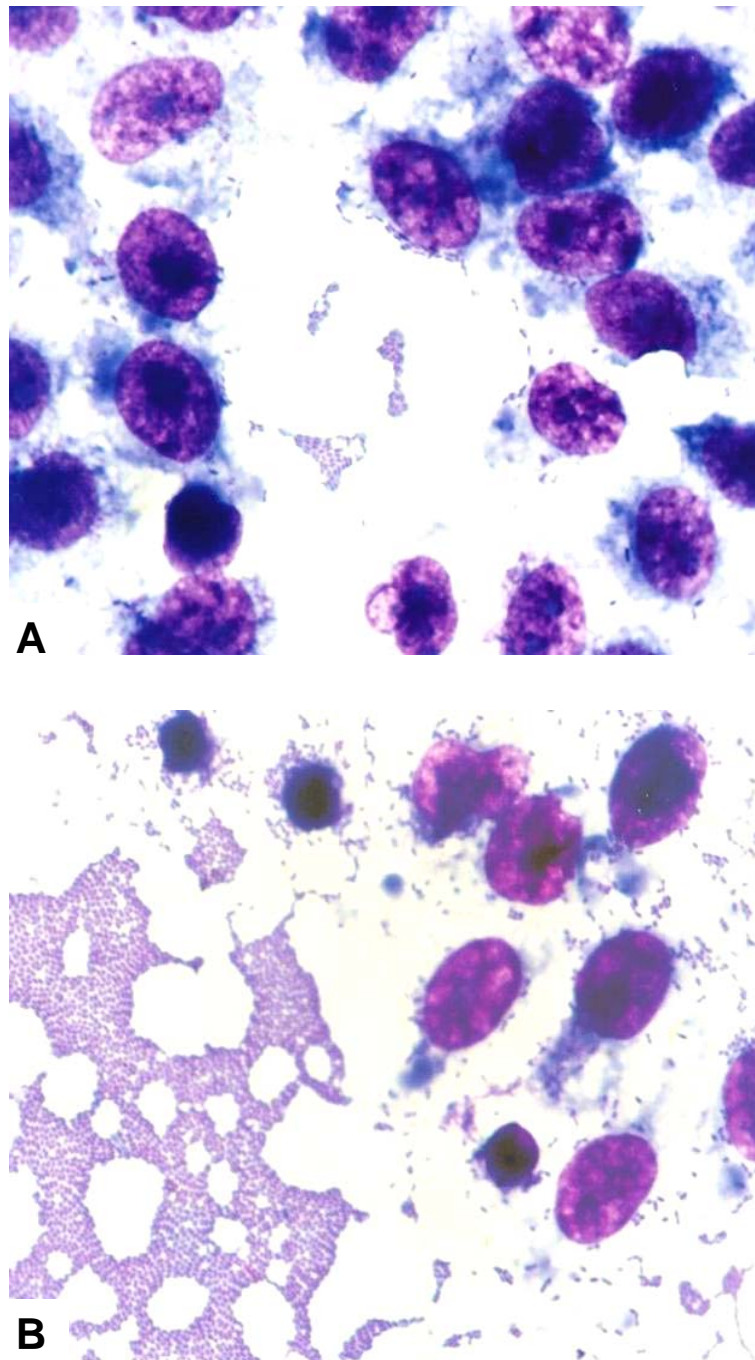


Fig.1. Uropathogenic *P. mirabilis* showing a aggregative adherence pattern to HEp-2 cells after 3 h of incubation (A) and 6 h of incubation (B) (microscope magnification X3570).

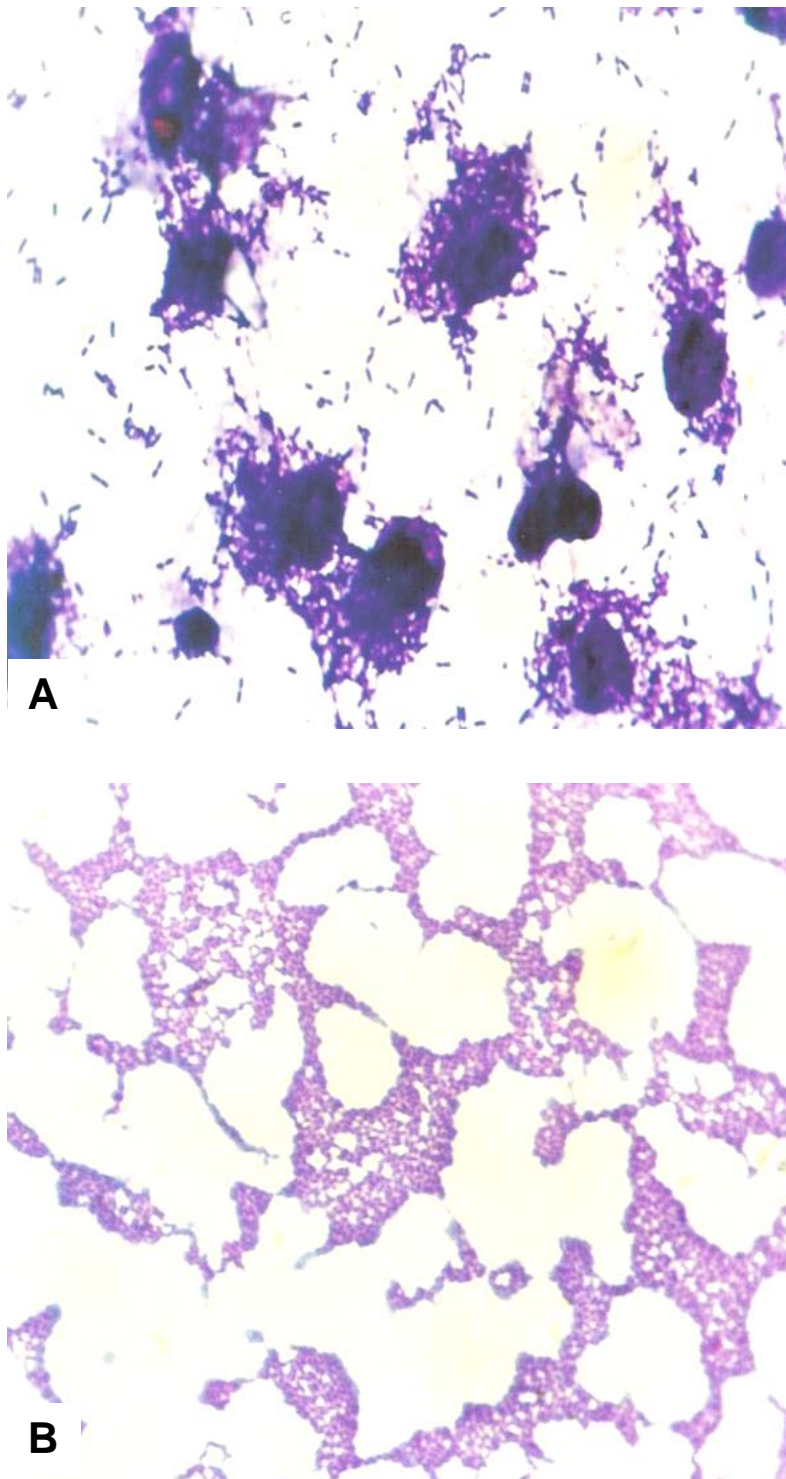


Fig.2. In Vero cells after 3 h of incubation, the strains showing a non-defined adherence pattern, and the cells a cytotoxic effect (A). After 6 h of incubation the strains were able to detach Vero cells and to adhere to the coverslip surface, showing an aggregative adherence pattern (B) (microscope magnification X3570).

4 TRABALHO CIENTÍFICO

In vitro stone formation by uropathogenic *Proteus mirabilis* in urine agar

M. R. L. Silva¹; S. P. D. Rocha¹; R. Quesada²; J. S. Pelayo^{1*}

¹Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil

²Departamento de Patologia, Legislação e Deontologia, Centro de Ciências da Saúde, Hospital Regional do Norte do Paraná/UEL, Londrina, PR, Brasil

***Correspondence:** Universidade Estadual de Londrina, CCB, Caixa Postal: 6001. CEP 86051-990, Londrina, PR, Brasil. Fax: (+5543) 3371-4207. E-mail: jspelayo@sercomtel.com.br

Running title: Stone formation by uropathogenic *Proteus mirabilis*

Keywords: *Proteus mirabilis*, uropathogenic, stone, antibiotics

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**, Londrina, PR, v.4, n.2, p. 75-80, jul. / dez .2002.

Abstract

Proteus mirabilis is a causative agent of cystitis and pyelonephritis in individuals which present structural abnormalities in the urinary tract. It produces an urease that plays an important role in the formation of urinary stones. Thirty-five urease-producing strains of *P. mirabilis* isolated from patients with urinary tract infection (UTI) showed ability to form stones *in vitro* after incubation in urine agar for 24-48 h. Although *P. mirabilis* is susceptible to several antibiotics commonly used to treat UTI, its eradication can be complicated by stone formation, because those stones can protect bacteria against antibiotics, antibodies and urease inhibitors, and can cause obstruction of long-term urethral catheters.

Proteus mirabilis is a common cause of urinary tract infection (UTI) in patients with abnormalities of the urinary tract or subjected to chronic procedures, such as long-term urinary catheters (1,2). Among its several virulence factors, production of urease has been recognized as a major and essential factor (3). This enzyme has also been implicated as a factor that contributes to the pathogenicity of many other bacteria including *Klebsiella* spp., *Providencia* spp. and *Morganella* spp. (4).

Several authors have suggested that urease-positive *P. mirabilis* plays an important role in the formation of infection-induced urinary stones (1,5). *P. mirabilis* urease is an urea-unducible urease nickelmetalloenzyme of 250-KDa, found in the cytoplasm. It is encoded by the *ure* cluster, which contains eight genes, *ureABC* for structural subunits, *ureEFG* for incorporation of nickel, *ureD* as a positive regulator and *ureR* as inductor (6). Urease hydrolyses urea to ammonia and carbon dioxide, increasing the pH of urine, and causing precipitation of soluble ions which form stones usually composed of struvite ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) and carbonate-apatite ($\text{CA}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{CO}_3$) (5,7). The presence of stones in the urinary tract possibility protects uropathogens from antibiotics, antibodies, and urease inhibitors (3).

If the hypothesis is true that stone formation protects *P. mirabilis* from antibiotics *in vivo*, then strains isolated from UTI and capable to form stones should include bacteria susceptible to antibiotics. Therefore, in this study we tested whether *P. mirabilis* isolated from patients with UTI were susceptible to antibiotics, and able to forms stones *in vitro*.

Thirty-five urease-producing strains of *P. mirabilis* were isolated from patients with UTI ($\geq 10^5$ CFU/ml) at a public hospital and a clinical laboratory in the city of Londrina (Brazil) and sent to our laboratory. *Escherichia coli* was used as negative

control. All strains were stored at -70°C in tryptic soy broth (TSB) (Biobras) with 15% glycerol.

Human urine of healthy volunteers was collected aseptically into sterile containers. A pool of urine from at least three volunteers was used in each experiment. Urine samples were centrifuged at 5000 g for 10 min at 4°C and were filtered through a $0.22\ \mu\text{m}$ Millipore filter. Agar was prepared separately, autoclaved and added to the sterile urine to a final concentration of 1% of agar. The strains were grown in TSB at 37°C for 18h and $100\ \mu\text{l}$ were spread over the surface of urine agar using a sterile glass spreader and the plates were then incubated at 37°C for 48h.

The antimicrobial susceptibility was determined by the disk diffusion method on Müller-Hinton agar (Biobras), as described by Bauer et al. (8). The following antibiotics were tested: amikacin, ampicillin, cephalothin, cefepime, cefotaxime, ceftoxitin, ciprofloxacin, gentamicin, imipenem and nalidixic acid (Laborclin).

The 35 strains of *P. mirabilis* tested in this study formed stones *in vitro* after 24-48 h of incubation; those stones presented an X-shaped form that posteriorly developed a dendritic appearance (Fig. 1). This particular shape of the stones is considered characteristic of crystals of struvite formation (7). *P. mirabilis* is more often associated with stone formation *in vivo* than other urease-positive bacteria because the urease that it produces hydrolyzes urea 6-30 times faster than ureases produced by other microorganisms (9). Thus, the ability of the tested strains to form stones in urine agar is in agreement with their UTI source and their presumed ability to form stones *in vivo*.

P. mirabilis infection can cause more severe histological damage than *E. coli* and *K. pneumoniae* (9), possibly because it remains viable within the stones during therapy with antibiotics, thereby causing chronic infections, and also because stone

formation hampers the free flow of urine, which is one of the body's natural cleaning mechanisms. Moreover, the importance of urease as virulence factor is corroborated by the observation that an urease-negative mutant was severely attenuated in its ability to colonize and persist in bladder and kidneys in the murine model of ascending UTI (9); urease also seems to contribute to cytotoxicity for cultured human renal proximal tubular epithelial cells (HRPTEC) (5,10).

P. mirabilis is susceptible to most antibiotics commonly used to treat UTI, although it has intrinsic resistance to the nitrofurantoin and tetracycline (2). The strains tested in this study presented varied resistance: 83% were resistant to cefoxitin, 50% to cephalothin, 25% to ampicillin, 19.4% to nalidixic acid, 8.3% to cefotaxime, 8.3% to ciprofloxacin, and 5.6% to imipenem. All strains were sensitive to amikacin, cefepime and gentamicin. Similar results were found by Thomson et al. (11) in USA and María et al. (12) in Spain.

Since all strains tested in this study were isolated from UTI and formed stones *in vitro*, and thus presumable can form stones *in vivo*, and since all were sensitive or poorly resistant to several antibiotics, these results corroborate the hypothesis that stone formation *in vivo* can protect *P. mirabilis* against antibiotics. Then, these stones can cause *P. mirabilis* infections, to be chronic, as organisms can remain viable within the stones during therapy.

References

1. Mobley HLT & Warren JW (1987). Urease-positive bacteriuria and obstruction of long-term urinary catheters. *Journal of Clinical Microbiology*, 25: 2216-2217.
2. Coker C, Poore CA, Li X & Mobley HLT (2000). Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. *Microbes and Infection*, 2:1497-1505.
3. Rózalski A, Sidorczyk Z & Kotelko K (1997). Potential virulence factors of *Proteus* bacilli. *Microbiology and Molecular Biology Review*,s 61: 65-89.
4. O' Hara CM, Brenner FW & Miller JM (2000). Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. *Clinical Microbiology Reviews*, 13: 534-546.
5. Rodman JS (1998). Struvite stones. *Nephron*, 81: 50-59.
6. Nicholson EB., Concaugh EA, Foxall PA, Island MD & Mobley HLT (1993) *Proteus mirabilis* urease: transcriptional regulation by UreR. *Journal of Bacteriology*, 175: 465-473.
7. Li X, Zhao H, Lockett CV, Drachenberg CB, .Johnson DE & Mobley HLT (2002). Visualization of *Proteus mirabilis* within the matrix of urease-induced bladder stone during experimental urinary tract infection. *Infection and Immunity*, 70: 389-394.
8. Bauer AW, Kirby WNN, Sherris GY & Turk M (1966). Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *American Journal Clinical Pathology*, 45: 493-496.
9. Johnson DE, Russell RG, Lockett CV, Zulty JC, Warren JW & Mobley HLT (1993). Contribution of *Proteus mirabilis* urease to persistence, urolithiasis and acute pyelonephritis in a mouse model of ascending urinary tract infection. *Infection and Immunity*, 61: 2748-2754.
10. Burne RA & Chen YYM (2000). Bacterial ureases in infectious diseases. *Microbes and Infection*, 2: 533-542.

11. Thomson KS, Sanders WE & Sanders CC (1994). USA resistance patterns among UTI pathogens. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 33: 9-15.
12. María I, González RC, Gámez JCV & Cenjor JF (1998). Etiología e resistencia bacteriana de las infecciones urinarias extrahospitalares. *Semergen*, 25: 11-14.



Figure 1 - In vitro stone formation in X-shaped form (\rightleftharpoons) and that posteriorly developed a dendritic appearance (\rightleftharpoons) by *P. mirabilis* on urine agar. A pool of urine human were filtered and added to a final concentration of 1% agar. *P. mirabilis* strains were spread over the surface of urine agar and incubated at 37°C for 24-48 h. Urease hydrolyses urea, a cytoplasmatic enzyme of *P. mirabilis*, increasing the pH of urine, and causing precipitation of soluble ions which form the visible stones.

5 CONCLUSÕES

1. Os 35 isolados de *P. mirabilis* uropatogênico mostraram-se capazes de formar cálculos *in vitro*, após incubação em agar urina a 37 °C por 48 horas e foram sensíveis para a maioria dos antibióticos estudados.
2. O gene *mrpA* foi encontrado em 82,3% dos isolados, sendo que três destes não apresentaram expressão da hemaglutinina MR/P e 17,7% que não apresentaram o gene *mrpA*, expressaram a hemaglutinina MR/P.
3. A combinação das hemaglutininas MR/P e MR/K foi observada em 68,6% dos isolados e 22,8% apresentaram somente a hemaglutinina MR/P. Três isolados não apresentaram nenhuma das hemaglutininas pesquisadas. Nenhum dos isolados apresentaram o gene *fimH* ou expressão da hemaglutinina manose sensível (tipo 1).
4. Todos os isolados apresentaram um padrão de adesão agregativo em células HEp-2 após 6 horas de incubação, com predominância de bactérias aderidas na lamínula.
5. No teste de adesão em superfície inerte (poliestireno), 42,6% dos isolados apresentaram forte aderência ao plástico, 28,6% aderência moderada e 26,8% aderência fraca.
6. Atividade hemolítica foi observada em 90% dos isolados.
7. Em células Vero, a maioria das amostras causaram efeito citopático na célula, sendo que em muitas delas se observou 100% de descolamento das células e bactérias aderidas de forma agregativa na lamínula.
8. A associação dos fatores de virulência pesquisados nesse trabalho como hemaglutininas MR/P e MR/K e produção de hemolisina, com a atividade citotóxica observada nas células Vero, o modelo de adesão observado nas células HEp-2 e a capacidade de aderir em superfície inerte (poliestireno), poderiam ser pesquisados utilizando mutantes para cada um dos fatores estudados.

REFERÊNCIAS

- Abraham, S.H.; Goguen, J.D.; Sun, D.; Klemm, P.; Beachey, E.H. Identification of two ancillary subunits of *Escherichia coli* type 1 fimbriae by using antibodies against synthetic oligopeptides of *fim* gene products. **J. Bacteriol.**, **169**: 5530-5536. 1987.
- Allen, B.L.; Gerlach, G.F.; Clegg, S. Nucleotide sequence and functions of *mrk* determinants necessary for expression of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, **173**: 916-920. 1991.
- Allison, C.; Emody, 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.
- Allison, C.; Lai, A.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.
- 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.
- 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.
- Bahrani, F.K.; Cook, S.; Hull, R.A.; Massad, G.; Mobley, H.L.T. *Proteus mirabilis* fimbrial N-terminal amino acid sequence of a major fimbrial subunit and nucleotide sequences of the gene from two strains. **Infect. Immun.**, **61**: 884-891. 1993.
- Belas, R. Expression of multiple flagellin-encoding genes of *Proteus mirabilis*. **J. Bacteriol.**, **176**: 7169-7181. 1994.
- Belas, R. The swarming phenomena of *Proteus mirabilis*. **ASM News**, **58**: 15-22. 1992.
- Belas, R.; Flaherty, D. Sequence and genetic analysis of of multiple flagellin-encoding genes of *Proteus mirabilis*. **Gene**, **148**: 33-41. 1994.

- Bibby, J.M.; Hukins, D.W.L. Acidification of urine is not a feasible method for preventing of encrustation indwelling urinary catheters. **Scan. J. Urol. Nephrol.**, **27**: 63-65. 1993.
- Bijlsma, I.G.W.; van Dijk, L.; Kusters, J.G.; Gaastra, W. Nucleotide sequences of two fimbrial major subunit genes, *pmpA* and *ucaA* from canine-uropathogenic *Proteus mirabilis* strains. **Microbiology**, **141**: 1349-1357. 1995.
- Braude, A.J.; Siemienski, J. Role of bacterial urease in experimental pyelonephritis. **J. Bacteriol.**, **80**: 171-179. 1960
- Clegg, S.; Gerlach, G.F. Enterobacterial fimbriae. **J. Bacteriol.**, **169**: 934-938. 1987.
- Coker, C.; Poore, C.A.; Li, X.; Mobley, H.L.T. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. **Microb. Infect.**, **2**: 1497-1505. 2000.
- Chow, A.W.; Taylor, P.R.; Yoshikawa, T.T.; Guze, L.B. A nosocomial outbreak of infections due to multiply resistant *Proteus mirabilis*: role of intestinal colonization as a major reservoir. **J. Infect. Dis.**, **139**: 621-627. 1979.
- Daifuku, R.; Stamm, W. E. Bacterial adherence to bladder uroepithelial cells in catheter-associated urinary tract infection. **N. Engl. J. Med.**, **314**: 1208-1213. 1986.
- Dance, D.A.B.; Pearson, A.D.; Seal, D.V.; Lowes, J.A. A hospital outbreak caused by a chlorhexidine and antibiotic-resistant *Proteus mirabilis*. **J. Hosp. Infect.**, **10**: 10-16. 1987.
- Dorman, C.J.; Higgins, C. Fimbrial phase variation in *Escherichia coli*: dependence on integration host factor and homologies with other site-specific recombinases. **J. Bacteriol.**, **169**: 3840-3843. 1987.
- Drechsel, H.; Thieken, A.; Reissbrodt, R.; Jung, G.; Winkelmann, G. Alphaketoacids are novel siderophores in the genera *Proteus*, *Providencia* and *Morganella* and are produced by amino acid deaminases. **J. Bacteriol.**, **175**: 2727-2733. 1993.
- 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.

Furness, R.B.; Fraser, G.M.; Hay, N.A. Hughes, C. Negative feedback from a *Proteus mirabilis* Class II flagellum export defect to the *flhDC* master operon controlling cell division and flagellum assembly. **J. Bacteriol.**, **179**: 5585-5588. 1997.

Gerlach, G.F.; Allen, B.L.; Clegg, S. Type 3 fimbriae among enterobacteria and the ability of spermidine to inhibit MR/K hemagglutination. **Infect. Immun.**, **57**: 219-224. 1989.

Griffith, D.P.; Musher, D.M.; Itin, C. Urease: the primary cause of infection-induced urinary stones. **Invest. Urol.** **13**: 346-350. 1976.

Gygi, D.; Bailey, M.J.; Allison, C.; Hughes, C. Requirement of FlhA in flagella assembly and swarm cell differentiation by *Proteus mirabilis*. **Mol. Microbiol.**, **15**: 761-769. 1995.

Johnson, D.E.; Bahrani, F.K.; Lockatell, C.V.; Drachenberg, C.B., Belas, R., Warren, J.W., Mobley, H.L.T. Serum immunoglobulin response and protection from homologous challenge by *Proteus mirabilis* in mouse model of ascending urinary tract infection. **Infect. Immun.**, **67**: 6683- 6687. 1999.

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 persistence, urolithiasis and acute pyelonephritis in a mouse model of ascending urinary tract infection. **Infect. Immun.**, **61**: 2748-2754. 1993.

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

Jones, B.D.; Lockatell, C.V.; Johnson, D.E.; Warren, J.W.; Mobley, H.L.T. Construction of a urease-negative mutant of *Proteus mirabilis*: analysis of virulence in a mouse model of ascending urinary tract infection. **Infect. Immun.**, **58**: 1120-1123. 1990.

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.

Kaca, W.; Rózalski, A. Characterization of cell-bound and cell-free hemolytic activity of *Proteus* strains. **Eur. J. Epidemiol.**, **7**: 159-165. 1991.

Kornfeld, S.J.; Plaut, A.G. Secretory immunity and the bacterial IgA proteases. **Rev. Infect. Dis.**, **3**: 521-534. 1981.

Koronakis, V.; Cross, M.; Senior, B.; Koronakis, E.; Hughes, C. The secreted hemolysins of *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* and *Morganella morganii* are genetically related to each other and to the alpha-hemolysin of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, **169**: 1509-1515. 1987.

Latta, R.K.; Schur, M.J.; Tolson, D.L.; Altman, E. The effect of growth conditions on in vitro adherence, invasion, and NAF expression by *Proteus mirabilis* 7570. **Can. J. Microbiol.** **44**: 896-904. 1998.

Latta, R.K.; Grondin, A.; Jarrell, H.C.; Nicholls, G.R.; Berubé, L.R. Differential expression of nonagglutinating fimbriae and MR/R fimbriae pili in swarming colonies of *Proteus mirabilis*. **J. Bacteriol.**, **181**: 3220-3225. 1999.

Lenz, L.L. **Infecção urinária**. São Paulo: BYR. 1994.

Li, X.; Zhao, H.; Geymonat, L.; Bahrani, F.; Johnson, D.E.; Mobley, H.L.T. *Proteus mirabilis* mannose-resistant, *Proteus*-like fimbriae: MrpG is located at the fimbrial tip and is required for fimbrial assembly. **Infect. Immun.** **65**: 1327-1334. 1997.

Li, X.; Johnson, D.E.; Mobley, H.L.T. Requirement of MrpH for mannose-resistant *Proteus*-like fimbriae mediated hemagglutination by *Proteus mirabilis*. **Infect. Immun.**, **67**: 2822-2833. 1999.

Loomes, L.M.; Senior, B.W.; Keer, M.A. A proteolytic enzyme secreted by *Proteus mirabilis* degrades immunoglobulins of the immunoglobulins A1 (IgA1), IgA2, and IgG isotypes. **Infect. Immun.**, **58**: 1979-1985. 1990.

Lukomski, S.; Serwecinska, L.; Rózalski, A.; Dziadek, J.; Staczek, P.; Jaworski, A. Cell-free and cell bound haemolytic activities of *Proteus penneri* determined by different Hly determinants. **Can. J. Microbiol.**, **37**: 419-424. 1991.

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

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

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

Mobley, H.L.T.; Chippendale, G.N.; Swihart, K.G.; Welch, R.A. Cytotoxicity of the HpmA hemolysin and urease of *Proteus mirabilis* and *Proteus vulgaris* against cultured human renal proximal tubular epithelial cells. **Infect. Immun.** **59**: 2036-2042. 1991.

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

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

Morris, N.S.; Stickler, D.J. The effect of urease inhibitors on the encrustation of urethral catheters. **Urol. Res.**, **26**: 275-279. 1998.

Morris, N.S.; Stickler, D.J.; Winters, C. Which indwelling urethral catheters resist encrustation by *Proteus mirabilis* biofilms? **Br. J. Urol.**, **80**: 58-63. 1997.

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.

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.

Old, D.; Adegbola, R. Hemagglutinins and fimbriae of *Morganella*, *Proteus* and *Providencia*. **J. Med. Microbiol.**, **15**: 551-564. 1982.

Old, D.; Adegbola, R. Antigenic relationships among type-3 fimbriae of *Enterobacteriaceae* revealed by immunoelectronmicroscopy. **J. Med. Microbiol.**, **20**: 113-121, 1985.

Peerbooms, P.G.H.; Verweij, A.M.J.J.; MacLaren, D.M. Vero cell invasiveness of *Proteus mirabilis*. **Infect. Immun.**, **43**: 1068-1071. 1984

Peerbooms, P.G.M.; Verweij, A.M.J.J.; MacLaren, D.M. Investigation of the haemolytic activity of *Proteus mirabilis* strains. **Anton. Van Lee.**, **49**: 1-11. 1983.

Roberts, J.A.; Fussel, E.N.; Kaack, M.B. Bacterial adherence to urethral catheters. **J. Urol.** **144**: 264-269. 1990.

Rodman, J.S. Struvite stones. **Nephron**, **81** : 50-59. 1998.

Rózalski, A.; Sidorczyk, Z.; Kotelko, K. Potential virulence factors of *Proteus* bacilli. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, **61**: 65-89. 1997.

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.

Senior, B.W.; Hughes, C. Production and properties of haemolysins from clinical isolates of Proteaeae. **J. Med. Microbiol.**, **24**: 17-25. 1987.

Sidorczik, Z.; Zynch, K. Lipopolyssaccharides of flagellated and nonflagellated *Proteus vulgaris* strains. **Arch. Immunol. Ther. Exp.**, **34**: 461-469. 1986.

Silverblat, 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.

Stickler, D ; Ganderton, L. ; King, J. ; Nettleton, J. ; Winters, C. *Proteus mirabilis* biofilms and the encrustation of urethral catheters. **Urol. Res.**, **21**: 407-411. 1993

Swihart, K.G.; Welch, R.A. The HpmA hemolysin is more common than HlyA among *Proteus* isolates. **Infect. Immun.**, **58**: 1853-1860. 1990.

Thomas, V.J.; Collins, C.M. Identification of UreR binding sites in the *Enterobacteriaceae* plasmid encoded and *Proteus mirabilis* urease gene operons. **Mol. Microbiol.**, **31**: 1417-1428. 1999.

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.

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

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

Wray, S.K.; Hull, S.I.; Cook, R.G.; Barrish, J.; Hull, R.A. Identification and characterization of urothelial cell adhesin from an uropathogenic isolate of *Proteus mirabilis*. **Infect. Immun.** **54**: 43-49. 1986.

Zunino, P.; Geymonat, L.; Allen, A.G.; Preston, A.; Sosa, V.; Maskell, D.J. New aspects of the role of MR/P fimbriae in *Proteus mirabilis* urinary tract infection. **FEMS Immunol. Med. Mic.**, **31**: 113-120. 2001.