

ARTIGO ORIGINAL

Escherichia coli nas infeções urinárias da comunidade: comensal ou patogénica?



Ana Eusébio^a, Catarina Araújo^a, Madalena Andrade^a e Aida Duarte^{a,b,*}

^a Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

^b iMed.UL, Research Institute for Medicines and Pharmaceutical Sciences, Lisboa, Portugal

Recebido a 11 de março de 2015; aceite a 15 de fevereiro de 2016

Disponível na Internet a 20 de março de 2016

PALAVRAS-CHAVE

Escherichia coli;
Cistites;
Comensal;
Patogénica;
Virulência

Resumo

Objetivo: Estudar a patogenicidade de isolados de *Escherichia coli* (*E. coli*) nas infeções urinárias e sua relação com o hospedeiro, tendo em conta a associação de bacteriúria por *E. coli* a critérios definidos de patogenicidade ou a condições específicas inerentes ao hospedeiro, em mulheres com idades até 59 anos.

Materiais e métodos: Foram estudadas 228 estirpes de *E. coli*, isoladas de urinas de mulheres com idade ≤ 59 anos, provenientes de vários laboratórios portugueses de prestação de serviços à comunidade. A pesquisa dos genes de virulência *fimH*, *papC*, *ecpA*, *usp*, *hlyA* e *cnf1*, das ilhas de patogenicidade (PAI) I_{CTF073} e PAI II_{CTF073}, e a determinação do grupo filogenético foi efetuada pela técnica de PCR.

Resultados: Os genes mais frequentemente isolados foram o *ecpA*, seguido de *fimH*, e os grupos filogenéticos mais prevalentes o B2 e D patogénicos, tanto em cITU como em ncITU.

Tanto nos isolados comensais como os patogénicos apresentaram os genes *fimH*, *papC* e *ecpA* de aderência e colonização; contudo, os genes *usp*, *hlyA* e *cnf1*, associados a processos invasivos, assim como as PAI I_{CTF073} e PAI II_{CTF073} encontraram-se predominantemente nos isolados dos grupos patogénicos.

Conclusão: Os fatores de virulência estudados não ficaram restritos às estirpes patogénicas, tanto em ncITU como em cITU. Os fatores de risco do hospedeiro que propiciam o estabelecimento de cistites como a gravidez, recorrência e diabetes, estão associados à patogenicidade das bactérias.

© 2016 Associação Portuguesa de Urologia. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondência.

Correio eletrónico: aduarte@ff.ul.pt (A. Duarte).

KEYWORDS

Escherichia coli;
Cystitis;
Commensal;
Pathogenic;
Virulence

Escherichia coli* in community urinary tract infections: commensal or pathogenic?*Abstract**

Objective: To study *Escherichia coli* pathogenicity in urinary tract infections and their relationship with the host. Association of bacteriuria by *E. coli* with defined pathogenicity criteria or host specific conditions, in women aged up to 59 years.

Materials and methods: Overall 228 *Escherichia coli* strains were studied. These were isolated from urine of women with age ≤ 59 provided by various Portuguese laboratories in the community. The study of the virulence genes *fimH*, *papC*, *ecpA*, *usp*, *hlyA* and *cnf1*, pathogenicity islands (PAI) I_{CFT073} and PAI II_{CFT073}, and phylogenetic group determination was performed by PCR.

Results: The most frequently isolated genes were *ecpA*, followed by *fimH* and the most prevalent phylogenetic groups were pathogenics B2 and D, both in cITU and nclTU.

Both commensal and pathogenic isolates showed presence of *fimH*, *papC* and *ecpA* genes with functions in adhesion and colonization, while *usp*, *hlyA* and *cnf1* usually associated with invasive strains and PAI I_{CFT073} and PAI II_{CFT073} were found predominantly in pathogenic group strains.

Conclusion: Studied virulence factors were not restricted to pathogenic strains, both in nclTU and cITU. The host risk factors which propitiate cystitis such as pregnancy, recurrence and diabetes, are associated with bacterial pathogenicity.

© 2016 Associação Portuguesa de Urologia. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introdução

A *Escherichia coli* (*E. coli*) é o agente etiológico mais frequentemente isolado nas infeções do trato urinário (ITU), sendo também predominante na flora intestinal humana¹. Os fatores que predisõem à infeção urinária podem ser inerentes ao hospedeiro ou específicos do microrganismo. A cistite ou infeção urinária baixa pode caracterizar-se como complicada ou não complicada, consoante o hospedeiro apresente ou não fatores de risco, tais como internamento recente em hospital, patologias obstrutivas ou uso de cateter urinário²⁻⁶. A *E. coli* uropatogénica (UPEC) expressa fatores de virulência tais como adesinas, toxinas, sideróforos e proteínas de superfície responsáveis pela colonização, invasão e persistência no trato urinário¹. Entre as adesinas mais frequentemente associadas à UPEC estão as fimbrias do tipo 1 e as fimbrias do tipo P ou *Pyelonephritis associated pili* (Pap)^{7,8}. A adesina FimH, representativa das fimbrias do tipo 1, liga-se especificamente à uroplaquina Ia, uma glicoproteína expressa pelas células vesicais tida como importante na formação de biofilme^{9,10}. As Pap estão associadas a pielonefrite aguda não complicada¹¹, encontrando-se o recetor específico disseminado nas membranas celulares das células renais⁴, sendo essenciais para a colonização do trato urinário alto¹. Outras adesinas têm sido descritas em estirpes de *E. coli* enteropatogénicas e comensais, tal como a denominada de *E. coli common pilus* ou ECP, codificada pelo gene *ecpA*, responsável pela colonização, disseminação e infeção do trato gastrointestinal^{12,13}, como também pela formação de biofilmes em superfícies bióticas e abióticas.

Entre as proteínas excretadas pelas estirpes UPEC, a proteína *uropathogenic-specific protein* (USP), codificada pelo gene *usp*, foi descrita recentemente como prevalente

nas estirpes urinárias relativamente às estirpes fecais^{1,14-16}. Outra proteína importante, a citotoxina ou factor necrosante citotóxico CNF1 (*cytotoxic necrotizing factor 1*), tem a capacidade de induzir apoptose nas células epiteliais da bexiga, estimulando a sua exfoliação e consequente invasão do epitélio. Esta intervém também na inibição da atividade fagocítica e quimiotática dos neutrófilos¹⁷. Ainda relativamente às citotoxinas destaca-se a α -hemolisina, codificada pelo gene *hly*, que promove a formação de poros com a consequente lise celular, facilitando a obtenção de nutrientes e a captação de ferro iónico, necessários ao metabolismo bacteriano¹⁷.

Os genes que codificam estes fatores de virulência podem estar localizados no cromossoma ou em plasmídeos, e podem também estar associados a elementos genéticos móveis como as ilhas de patogenicidade (PAI). Estes elementos caracterizam-se por terem tamanho superior a 10 kilobases, o que lhes permite ter em associação genes codificadores de adesinas, toxinas, sideróforos, cápsulas e serem facilmente transferidos entre espécies bacterianas¹⁸⁻²⁰. Das 8 ilhas de patogenicidade já conhecidas em *E. coli* destacam-se a PAI I_{CFT073} e a PAI II_{CFT073}; a primeira possui um grupo de genes que codificam para a α -hemolisina e a Pap, enquanto a segunda transporta apenas genes codificadores da Pap¹⁸.

A fronteira entre comensalismo e patogenicidade tem suscitado aos investigadores o desenvolvimento de metodologias que permitam esclarecer se uma estirpe de *E. coli* considerada comensal pode ser patogénica e vice-versa, e quais as características que as diferenciam. Clermont et al.²¹ desenvolveram um algoritmo baseado na deteção de 3 genes conservados, o que permite agrupar as estirpes de *E. coli* em 4 grupos filogenéticos – A, B1, B2, D – sendo que as estirpes extraintestinais patogénicas pertencem

maioritariamente ao grupo B2 e em menor número ao grupo D, enquanto as comensais pertencem aos grupos A e B1^{21,22}.

Este trabalho surge como complemento de um projeto que visou o estudo da resistência aos antibióticos^{23,24}, tem como objetivo caracterizar os fatores de virulência em isolados *E. coli* de infecções urinárias e analisar a relação bactéria-hospedeiro. Com este estudo pretendemos verificar se a bacteriúria por *E. coli*, em mulheres com idades até 59 anos, está associada ou não a critérios definidos de patogenicidade da bactéria ou a fatores de risco inerentes ao hospedeiro.

Materiais e métodos

Estirpes bacterianas: foram estudadas 228 estirpes de *E. coli*, isoladas de urinas de mulheres com idade inferior ou igual a 59 anos. As bactérias provinham de vários laboratórios portugueses de prestação de serviços à comunidade, tendo sido identificadas nos laboratórios de origem e, posteriormente, enviadas ao laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

Pesquisa de genes de virulência e identificação dos grupos filogenéticos: a pesquisa dos genes de virulência (*fimH*, *papC*, *ecpA*, *usp*, *hlyA* e *cnf1*), das ilhas de patogenicidade PAI I_{CF703} e PAI II_{CF703} e do grupo filogenético (*chuA*, *yjaA*, TSPE4.C2) foi efetuada no DNA genómico extraído pela técnica de *boiled*²⁵. Os produtos obtidos após amplificação pela técnica de PCR, com primers específicos para os genes em estudo^{12,21,26-29}, foram confirmados por sequenciação, e as sequências nucleotídicas e aminoácídicas foram analisadas por software disponível no National Centre for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Resultados

Caracterização da amostra clínica

O diagnóstico de cistite foi baseado nos sintomas clínicos como ardor à micção, poliúria e urgência urinária, e na análise cito-bacteriológica da urina. Este exame consiste na observação de leucocitúria, marcador de inflamação, associada à identificação de uma estirpe bacteriana em número superior a 10⁵ unidades formadas colónias UFC/ml. Dos 228 isolados de *E. coli*, 170 foram identificados de urinas de mulheres sem fatores de risco, consideradas cistites não complicadas (ncITU). Os restantes 50 isolados eram provenientes de urinas de mulheres, que se diferenciaram dos critérios de inclusão das ncITU porque apresentavam um ou mais fatores como recorrência da infeção (n=25), gravidez (n=37) e diabetes (n=2), ao que se englobaram nas cistites complicadas (cITU)⁶.

Genes de virulência

Na pesquisa dos genes de virulência observou-se um padrão de prevalência idêntico em todos os isolados, sendo que o gene mais frequente foi *ecpA*, seguido de *fimH*, tal como é observado na [figura 1](#). Nos 50 isolados de cITU, os genes *ecpA* e *fimH* foram identificados em 94,0% (n=47) e 72,0% (n=36), respetivamente. Da mesma forma, nos

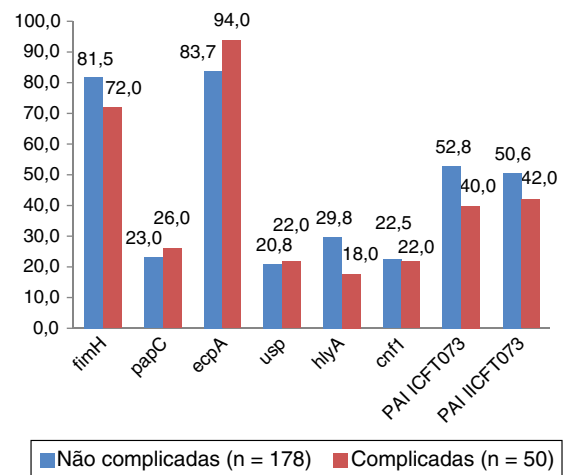


Figura 1 Percentagem de isolados de *Escherichia coli*, provenientes de cistites não complicadas e cistites complicadas, contendo os genes de virulência estudados *fimH*, *papC*, *ecpA*, *usp*, *hlyA*, *cnf1*, e as ilhas de patogenicidade PAI I_{CF703} e PAI II_{CF703}.

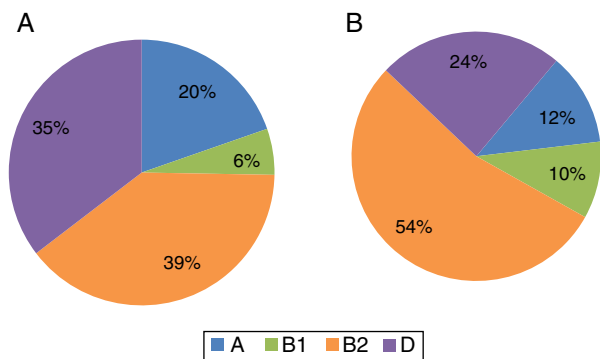


Figura 2 Distribuição dos isolados de *Escherichia coli*, provenientes de cistites não complicadas (A) e cistites complicadas (B), pelos grupos filogenéticos comensais (A e B1) e patogénicos (B2 e D).

170 isolados de ncITU, os genes *ecpA* e *fimH* foram encontrados em 83,7% (n = 149) e 81,5% (n = 145). Para os restantes genes de virulência estudados (*papC*, *usp*, *hlyA* e *cnf1*), foram encontrados valores dentro da mesma ordem entre 18-30%.

Relação dos fatores de virulência e os grupos filogenéticos

Os 228 isolados de *E. coli* distribuíram-se entre os 4 grupos filogenéticos, A, B1, B2, D, de acordo com a [figura 2](#). As bactérias comensais dos grupos A e B1 foram identificadas em 45 dos 178 isolados associados às ncITU ([fig. 2A](#)) e que se distribuíram pelo grupo A (20%; n=35) e pelo grupo B1 (6%; n=10), enquanto a maioria dos isolados de ncITU (n=133) pertencem aos grupos patogénicos B2 e D em quantidade percentual semelhante de 39% (n=70) e 35% (n=63), respetivamente. De acordo com a [figura 2B](#), dos 50 isolados provenientes de cITU, verificou-se que 39 isolados estavam nos grupos patogénicos B2 (54%; n=27) e D (24%; n=12). Os

Tabela 1 Distribuição dos isolados de *Escherichia coli* pelos grupos filogenéticos patogénicos (B2, D) e comensais (A, B1), de acordo com os fatores de virulência *fimH*, *papC*, *espA*, *usp*, *hlyA*, *cnf1* e as ilhas de patogenicidade PAI I_{CFT073} e PAI II_{CFT073}

	B2		D		A		B1	
	ncITU (n = 70)	cITU (n = 27)	ncITU (n = 63)	cITU (n = 12)	ncITU (n = 35)	cITU (n = 6)	ncITU (n = 10)	cITU (n = 5)
FimH	62	19	49	9	26	5	8	3
PapC	18	8	14	3	7	1	2	1
EcpA	60	27	50	12	29	3	10	5
Usp	16	9	12	2	6	-	-	-
HlyA	37	6	9	3	7	-	-	-
Cnf-1	24	9	9	2	6	1	10%	-
PAI I _{CFT073}	59	15	26	5	8	1	10,0%	-
PAI II _{CFT073}	55	16	21	5	12	2	20,0%	-

ncITU: infecção do trato urinário não complicada; cITU: infecção do trato urinário complicada.

restantes 11 isolados (12%; n = 6) e (10%; n = 5) distribuíram-se entre os grupos comensais A e B1, respetivamente.

Em 8 isolados, foram identificados todos os genes de virulência em estudo; distribuíram-se pelos grupos filogenéticos patogénicos B2 (n = 3) e D (n = 5). Apenas num isolado do grupo filogenético D não foram detetados quaisquer fatores de virulência em estudo.

Ao comparar os resultados expressos na [tabela 1](#), dos isolados provenientes de cITU e ncITU, verifica-se que, tanto os isolados comensais (A e B1), como os patogénicos (B2 e D), apresentaram todos os genes que estão implicados na aderência às células e colonização do hospedeiro (*fimH*, *papC*, *ecpA*). Inclusivamente, no grupo de isolados comensais e provenientes de cITU só foram detetados os genes de colonização. Quanto aos genes que codificam proteínas de proteínas responsáveis por processos invasivos, os isolados dos grupos B2 e D apresentam valores significativamente mais elevados, quando comparados com os grupos A e B1.

Relação das ilhas de patogenicidade com os grupos filogenéticos

Nos 228 isolados, as 2 ilhas de patogenicidade (PAI I_{CFT073} e PAI II_{CFT073}) foram predominantes entre as 8 PAI pesquisadas, tanto nos isolados de ncITU como de cITU. Embora com valores semelhantes, a PAI I_{CFT073} foi a prevalente 51,9 e 49,3%, seguida da PAI II_{CFT073} com 49,7 e 46,3% para os isolados de ncITU e de cITU, respetivamente. De acordo com a [tabela 1](#), estas PAI também foram encontradas em maior percentagem nas estirpes B2 e D, tanto nos isolados de ncITU como de cITU. Contrariamente ao que se poderia pensar, não se detetaram isolados com as 2 PAI nos grupos comensais A e B1, oriundos de cistites complicadas, tendo em conta o facto de provirem de 10 grávidas, 3 delas com recorrência, e de uma mulher com diabetes.

Discussão

Um dos fatores principais para a ocorrência de infeções do tracto urinário é a presença de adesinas fimbriais, permitindo a aderência da bactéria ao uroepitélio. A prevalência de fimbrias do tipo 1, comparativamente às do tipo P, é um indicador de virulência importante e relevante na patogenicidade das estirpes de *E. coli*. Esta fimbria desempenha um papel importante na indução da inflamação, em particular nas cistites, uma vez que a adesina FimH se liga especificamente à uroplaquina, abundante no epitélio vesical. No entanto, a associação com as Pap alerta para a necessidade de um maior acompanhamento clínico, de modo a evitar infeções no aparelho urinário alto, mais concretamente, pielonefrites.

O facto de se ter verificado a presença do pilus ECP na maioria dos isolados, adesina que está implicada na colonização do intestino e que contribui para a permanência das bactérias no hospedeiro, confirma a autocontaminação por via ascendente como a principal causa de ITU. A adesina EcpA é um fator crítico para a aderência e virulência de estirpes de *E. coli* entero-hemorrágicas (EHEC), porque ao mimetizar o comportamento das estirpes comensais confere a vantagem na colonização e evasão ao sistema imunitário do hospedeiro³⁰. No nosso estudo a prevalência do

gene *ecpA*, tanto em grupos patogénicos como comensais, permite-nos concordar com Rendon et al.³⁰, ao afirmar que este gene acompanha a evolução de *E. coli* intestinais e extraintestinais, possibilitando a colonização generalizada destas bactérias. Efetivamente, o gene *ecpA* foi encontrado nos isolados dos 4 grupos filogenéticos, com maior relevância nos isolados dos grupos patogénicos B2 e D, enquanto em estirpes hospitalares multirresistentes este gene foi encontrado maioritariamente em isolados do grupo A³¹.

Relativamente à associação do grupo filogenético e fatores de virulência, observou-se um predomínio destes nos grupos patogénicos B2, seguido do grupo D, tanto em cistites complicadas como não complicadas, comparativamente aos grupos comensais A e B1. Esta diferença é evidenciada pela baixa percentagem dos genes *usp*, *hly* e *cnf1* encontrados nestes grupos, o que poderá justificar uma menor capacidade invasiva e uma menor causalidade para a infeção por parte das estirpes comensais. A proteína USP tem sido encontrada mais frequentemente em estirpes uropatogénicas do que em comensais, e está associada às bacteriemias com origem nas infeções urinárias¹². No nosso estudo, o gene *usp* foi detetado nos isolados de cistites complicadas nas estirpes patogénicas, o que não aconteceu nas estirpes comensais onde foi encontrado apenas nos isolados de cistites não complicadas. Se a prevalência de uma proteína como a USP, com capacidade de invadir o epitélio vesical, num grupo de isolados patogénicos é relevante, a presença desta proteína USP nos isolados comensais, em particular nos provenientes de nCIU, poderá ser um alerta pela patogenicidade que confere à bactéria, independentemente dos fatores de risco inerentes ao hospedeiro. No entanto, os isolados de CIU apresentaram percentagens elevadas de fatores de virulência, um pouco superiores aos isolados de nCIU, o que permite estabelecer um grau de patogenicidade semelhante entre os grupos, reforçando a hipótese de que a virulência inerente à bactéria poderá ser tão ou mais importante que os fatores de risco do hospedeiro. Efetivamente a presença de fatores de aderência, de invasão e de toxicidade em estirpes comensais, características inerentes à estirpe bacteriana, tem um papel determinante e justifica a dificuldade de erradicação da bactéria e da recorrência de infeção.

A prevalência das ilhas de patogenicidade PAI I_{CF7073} e PAI II_{CF7073} foi superior nos isolados patogénicos comparativamente aos comensais, sendo que neste grupo não foram detetadas nos isolados de CIU. Estas ilhas de patogenicidade possuem um grupo de genes que codificam para a Pap e α -hemolisina, o que poderá indiciar a maior facilidade das estirpes atingirem o aparelho urinário superior e permanecerem no parênquima renal (Pap); capacidade de lisar as hemácias (α -hemolisina), assim como células endoteliais e do epitélio renal, permitindo maior facilidade de entrada na corrente sanguínea, originando bacteriemias. No nosso estudo, não se verificou uma analogia entre o número de isolados positivos para o gene *hlyA* e a PAI I_{CF7073}, dado que para a deteção da PAI a zona a amplificar por PCR não é a correspondente à do gene *hlyA* e o facto de poderem ocorrer deleções, mutações e rearranjos genómicos nas PAI poderá justificar a inexistência de concordância entre estes valores. No entanto, e de acordo com Schmidt et al.²⁰, a inserção de uma PAI no cromossoma bacteriano pode converter uma bactéria não patogénica em patogénica

e permitir mais facilmente a aquisição de genes de virulência.

As bactérias que transportam ilhas de patogenicidade têm maior capacidade invasiva, o que associado a fatores de aderência conduz a uma maior capacidade de lesão do epitélio, persistência, proteção do alcance do antibiótico e sistema imunitário, assim como maior capacidade de ascensão no trato urinário.

Conclusão

Neste estudo verificou-se que tanto os isolados de ITU complicadas, como os de ITU não complicadas apresentaram um grau de patogenicidade semelhante, reforçando a hipótese de que os fatores de risco inerentes à bactéria poderão ser tão ou mais importantes que os do hospedeiro. As condições específicas do hospedeiro, tais como a gravidez, recorrência e diabetes, podem não ser determinantes para o estabelecimento da ITU, dado que os isolados nestas situações apresentaram um número elevado de fatores de virulência.

Responsabilidades éticas

Proteção de pessoas e animais. Os autores declaram que para esta investigação não se realizaram experiências em seres humanos e/ou animais.

Confidencialidade dos dados. Os autores declaram que não aparecem dados de pacientes neste artigo.

Direito à privacidade e consentimento escrito. Os autores declaram que não aparecem dados de pacientes neste artigo.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Bibliografia

1. Tiba MR, Yano T, Leite Dda S. Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2008;50(5):255–60.
2. Schmiemann G, Kniehl E, Gebhardt K, Matejczyk MM, Hummers-Pradier E. The diagnosis of urinary tract infection: A systematic review. *Dtsch Arztebl Int*. 2010;107(21):361–7.
3. Katsarolis I, Poulakou G, Athanasia S, Kourea-Kremastinou J, Lambri N, Karaiskos E., et al. Acute uncomplicated cystitis: From surveillance data to a rationale for empirical treatment. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;35(1):62–7.
4. Hooton TM. Pathogenesis of urinary tract infections: An update. *J Antimicrob Chemother*. 2000;46 Suppl 1:1–7, discussion 63–5.
5. Chung A, Arianayagam M, Rashid P. Bacterial cystitis in women. *Aust Fam Physician*. 2010;39(5):295–8.
6. Grabe M, Bjerklund-Johansen TE, Botto H, Çek M, Naber KG, Pickard RS, et al. Guidelines on urological infections. European Association of Urology. 2013. Disponível em: http://uroweb.org/wp-content/uploads/18.Urological-infections_LR.pdf
7. Holden NJ, Totsika M, Mahler E, Roe AJ, Catherwood K, Lindner K, et al. Demonstration of regulatory cross-talk between P fimbriae and type 1 fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology*. 2006;152 Pt 4:1143–53.

8. Mulvey MA. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol*. 2002;4(5):257–71.
9. Wellens A, Garofalo C, Nguyen H, van Gerven N, Slättegård R, Hernalsteens JP, et al. Intervening with urinary tract infections using anti-adhesives based on the crystal structure of the FimH-oligomannose-3 complex. *PLoS One*. 2008;3(4):e2040.
10. Anderson GG, Dodson KW, Hooton TM, Hultgren SJ. Intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Trends Microbiol*. 2004;12(9):424–30.
11. Snyder JA, Haugen BJ, Lockatell CV, Maroncle N, Hagan EC, Johnson DE, et al. Coordinate expression of fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2005;73(11):7588–96.
12. Blackburn D, Husband A, Saldaña Z, Nada RA, Klena J, Qadri F, et al. Distribution of the *Escherichia coli* common pilus among diverse strains of human enterotoxigenic *E. coli*. *J Clin Microbiol*. 2009;47(6):1781–4.
13. Garnett JA, Martínez-Santos VI, Saldaña Z, Pape T, Hawthorne W, Chan J, et al. Structural insights into the biogenesis and biofilm formation by the *Escherichia coli* common pilus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(10):3950–5.
14. Nakano M, Yamamoto S, Terai A, Ogawa O, Makino SI, Hayashi H, et al. Structural and sequence diversity of the pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* which encodes the USP protein. *FEMS Microbiol Lett*. 2001;205(1):71–6.
15. Rijavec M, Müller-Premru M, Zakotnik B, Zgur-Bertok D. Virulence factors and biofilm production among *Escherichia coli* strains causing bacteraemia of urinary tract origin. *J Med Microbiol*. 2008;57 Pt 11:1329–34.
16. Yamamoto S, Nakano M, Terai A, Yuri K, Nakata K, Nair GB, et al. The presence of the virulence island containing the *usp* gene in uropathogenic *Escherichia coli* is associated with urinary tract infection in an experimental mouse model. *J Urol*. 2001;165(4):1347–51.
17. Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol*. 2008;85(1):11–9.
18. Oelschlaeger TA, Dobrindt U, Hacker J. Pathogenicity islands of uropathogenic *E. coli* and the evolution of virulence. *Int J Antimicrob Agents*. 2002;19(6):517–21.
19. Emody L, Kerenyi M, Nagy G. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents*. 2003;22 Suppl 2:29–33.
20. Schmidt H, Hensel M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17(1):14–56.
21. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66(10):4555–8.
22. Johnson JR, O'Bryan TT, Kuskowski M, Maslow JN. Ongoing horizontal and vertical transmission of virulence genes and *papA* alleles among *Escherichia coli* blood isolates from patients with diverse-source bacteremia. *Infect Immun*. 2001;69(9):5363–74.
23. Narciso A, Fonseca F, Cerqueira S, Duarte A. Susceptibilidade aos antibióticos de bactérias responsáveis por cistites não complicadas: estudo comparativo dos isolados de 2008 e 2010. *Acta Urol Port*. 2010;28(1):16–21.
24. Narciso A, Eusébio A, Fonseca F, Duarte A. Infecções urinárias na comunidade: estudo multicêntrico. *RPDI*. 2012;8(1):7–12.
25. Brizio A, Vasco S, Gonçalves AR, Lito LM, Cristino JM, Salgado MJ, et al. Survey of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolates from a Portuguese hospital and characterisation of a novel class 1 integron (In60A) carrying the *bla*CTX-M-9 gene. *Int J Antimicrob Agents*. 2006;28(4):320–4.
26. Usein CR, Damian M, Tatu-Chitoiu D, Capusa C, Fagaras R, Tudorache D, et al. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from Romanian adult urinary tract infection cases. *J Cell Mol Med*. 2001;5(3):303–10.
27. Kao JS, Stucker DM, Warren JW, Mobley HL. Pathogenicity island sequences of pyelonephritogenic *Escherichia coli* CFT073 are associated with virulent uropathogenic strains. *Infect Immun*. 1997;65(7):2812–20.
28. Rasko DA, Phillips JA, Li X, Mobley HL. Identification of DNA sequences from a second pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* CFT073: Probes specific for uropathogenic populations. *J Infect Dis*. 2001;184(8):1041–9.
29. Kurazono H, Yamamoto S, Nakano M, Nair GB, Terai A, Chai-cumpa W, et al. Characterization of a putative virulence island in the chromosome of uropathogenic *Escherichia coli* possessing a gene encoding a uropathogenic-specific protein. *Microb Pathog*. 2000;28(3):183–9.
30. Rendon MA, Saldaña Z, Erdem AL, Monteiro-Neto V, Vázquez A, Kaper JB, et al. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(25):10637–42.
31. Narciso A, Lito L, Cristino JM, Duarte A. *Escherichia coli* uropatogénica: resistência aos antibióticos versus factores de virulência. *Acta Urol Port*. 2010;27(2):11–20.