ANA CAROLINA EWBANK

**Identification and characterization of antimicrobial resistant genes in the
microbiome of seabirds of the Brazilian coast**

SÃO PAULO

2021

ANA CAROLINA EWBANK

Identification and characterization of antimicrobial resistant genes in the microbiome of wild seabirds of the Brazilian coast

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. José Luiz Catão-Dias

Co-orientador:

Dr. Fernando Esperón Fajardo

São Paulo

2021

RESUMO

EWBANK, A. C. **Identificação e caracterização de genes de resistências a antimicrobianos no microbioma de aves marinhas da costa brasileira.** 171 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

A resistência a antimicrobianos é quintessencial em Saúde Única. Resistência microbiana resulta da plasticidade das bactérias e interações entre microorganismos, hospedeiros e ambiente, influenciada pela pressão antropogênica. O consequente remodelamento dos microbiomas existentes, associado à sua capacidade de disseminação, conferem aos genes de resistências a antimicrobianos (GRAs) o papel de poluentes ambientais que, assim como bactérias resistentes a antimicrobianos (BRA), são indicadores ambientais de antropização. Aves marinhas são excelentes sentinelas da saúde do ecossistema marinho. Neste estudo foram utilizadas técnicas genotípicas (ex.: PCR a tempo real [rtPCR] gelificado e sequenciamento completo [WGS]) e fenotípicas (cultura bacteriana e antibiograma) para avaliar a presença e diversidade dos GRAs e BRA de prioridade em saúde pública (*Escherichia coli* produtora de beta-lactamase de espectro estendido [ESBL-EC] e AmpC [AmpC-EC]) no microbioma de aves marinhas de vida livre de ambientes costeiros e insulares prístinos do Brasil. GRAs mediados por plasmídeos foram detectados e quantificados por rtPCR em enemas de (1) 25 aves marinhas (gaivotão [*Larus dominicanus*, n = 14] e pinguim-de-Magalhães [*Spheniscus magellanicus*, n = 11]) à admissão a centro de reabilitação no sul do Brasil, e (2) 308 indivíduos: 104 do Arquipélago de Fernando de Noronha (FNA), Pernambuco (atobá-mascarado [*Sula dactylatra*, n = 48], atobá-marrom [*Sula leucogaster*, n = 31] e fragata-comum [*Fregata magnificens*, n = 25]), e 204 do Atol das Rocas (ROA), Rio Grande do Norte (atobá-mascarado [n = 33], atobá-marrom [n = 33], fragata-comum [n = 35], atobá-de-pé-vermelho [*Sula sula*, n = 33], trinta-réis-das-rocas [*Onychoprion fuscatus*, n = 36], e viuvinha-marrom [*Anous stolidus*, n = 34]) para comparação entre um ambiente intensamente antropizado (FNA) versus um bioma prístino (ROA), no nordeste brasileiro. Ademais, foram utilizadas técnicas fenotípicas e de WGS para pesquisar ESBL-/AmpC-EC (i) nos mesmos 204 indivíduos de ROA, e (2) em 20 fragatas-comuns de um local inabitado (Arquipélago de Alcatrazes) inserido na antropizada costa sudeste brasileira. Nossos objetivos foram utilizar aves marinhas como bioindicadores de antropização para acessar a ocorrência e disseminação de GRAs e ESBL-/AmpC-EC na costa brasileira, sua epidemiologia e persistência frente à Saúde Única. Nossos resultados

mostraram ampla ocorrência e diversidade nos diferentes cenários, especialmente no antropizado (FNA), que apresentou resultados consistentes com pressão antropogênica: maior significância estatística na prevalência de GRAs conferindo resistência a sulfonamidas e quinolonas em comparação a ROA, e maior prevalência de *suII*. Acreditamos que essa seja a primeira detecção de *mecA* em aves marinhas nas Américas, e a primeira de *mcr-1* em aves marinhas de vida livre no Brasil e migratórias não-sinantrópicas no mundo. Quanto a biomas insulares, esse é o primeiro relato: (1) do clone pandêmico e de importância em saúde pública ST131 carregando *bla*_{CTX-M-8}, e (2) de ST648 carregando *bla*_{CTX-M-2} e *bla*_{CMY-2}, ST117 carregando *bla*_{SHV-12} e do novo ST11350 (complexo clonal ST349) carregando *bla*_{CTX-M-55}. Mostramos aqui o papel-chave das características biológicas e ecológicas espécie-específicas (ex.: migração, forrageamento) e a relevância da antropização no estudo de resistências a antimicrobianos. Finalmente, enfatizamos o papel das aves marinhas como sentinelas de antropização e seu envolvimento na cadeia de resistências antimicrobianas em Saúde Única.

Palavras-chave: Antropização. Antibiótico. *Escherichia coli* resistente a cefalosporinas de espectro estendido. Aves marinhas migratórias. Animais Selvagens.

ABSTRACT

EWBANK, A. C. **Identification and characterization of antimicrobial resistant genes in the microbiome of seabirds of the Brazilian coast.** 171 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Antimicrobial resistance is a quintessential One Health issue. Microbial resistance results from bacteria genetic plasticity and interactions among microbials, hosts and the environment, enhanced by anthropogenic pressure. The consequent remodeling of the existing microbiomes, associated with their dissemination capacity, confer antimicrobial resistance genes (ARGs) the role of environmental pollutants and, alongside antimicrobial resistant bacteria (ARB), indicators of environmental anthropization. Seabirds are excellent sentinels of the marine ecosystem health. We used genotypic (i.e., gelled real-time PCR [rtPCR] and whole genome sequencing [WGS]) and phenotypic techniques (bacterial culture and antimicrobial sensitivity tests) to evaluate the presence and diversity of ARGs and ARB of critical priority (extended-spectrum beta-lactamase [ESBL]-producing *Escherichia coli* [ESBL-EC] and AmpC-producing *E.coli* [AmpC-EC]) in the microbiome of wild seabirds inhabiting coastal and insular environments in Brazil. Gelled rtPCR reactions detected and quantified selected plasmid-mediated ARGs in enemas of (1) 25 seabirds (kelp gull [*Larus dominicanus*, n = 14] and Magellanic penguin [*Spheniscus magellanicus*, n = 11]) upon admission to a rehabilitation center in southern Brazil, and (2) 308 individuals: 104 from the Fernando de Noronha Archipelago (FNA), Pernambuco (masked boobies [*Sula dactylatra*, n = 48], brown boobies [*Sula leucogaster*, n = 31] and magnificent frigatebirds [*Fregata magnificens*, n = 25]), and 204 from Rocas Atoll (ROA), Rio Grande do Norte (masked boobies [n = 33], brown boobies [n = 33], magnificent frigatebirds [n = 35], red-footed boobies [*Sula sula*, n = 33], sooty terns [*Onychoprion fuscatus*, n = 36], and brown noddies [*Anous stolidus*, n = 34]) to compare the highly anthropized (FNA) versus the pristine biome (ROA), northeastern Brazil. Additionally, we used phenotypic techniques and WGS to survey ESBL-/AmpC-EC in cloacal swabs of (1) the same 204 ROA individuals, and (2) 20 magnificent frigatebirds from an uninhabited site (Alcatrazes Archipelago, São Paulo) Brazil), inserted in the anthropized southeastern Brazilian coast. Our goals were to use seabirds as environmental bioindicators of anthropization to assess the occurrence and dissemination of ARGs and ESBL-/AmpC-EC in the Brazilian coast, and their epidemiology and persistence through a One Health approach. Our findings showed their wide occurrence and diversity throughout the evaluated scenarios, especially in the anthropized (FNA), which presented results consistent with anthropogenic pressure: statistically significant higher prevalence of

sulfonamide- and quinolone-encoding ARGs in comparison with ROA, and higher *suII* gene prevalence. To our knowledge, this is the first detection of *mecA* in seabirds in the Americas, and of *mcr-1* gene in wild free-ranging seabirds in Brazil and in free-ranging migratory non-synanthropic seabirds worldwide. Regarding insular biomes, this is the first detection of (1) the pandemic and public health relevant ST131-O25b harboring *bla*_{CTX-M-8} (3 isolates) in the southern hemisphere, and (2) ST117 harboring *bla*_{SHV-12}, and of a novel ST11350 (ST349 clonal complex) harboring *bla*_{CTX-M-55} worldwide. We showed the key role of species-specific biological and ecological characteristics (e.g., migration, foraging strategies) and the relevance of anthropization in the study of antimicrobial resistance. Finally, we highlight the role of seabirds as anthropization sentinels and their involvement in the One Health chain of antimicrobial resistance.

Keywords: Anthropization. Antibiotic. Extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli*. Migratory seabird. Wildlife.