

LUANA CLAUDINO DE MELO

**Contexto genético e prevalência da resistência do tipo ESBL /
pAmpC em enterobactérias isoladas de cães e gatos no Brasil e na
França**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2019

Luana Claudino de Melo

**Contexto genético e prevalência da resistência do tipo ESBL /
pAmpC em enterobactérias isoladas de cães e gatos no Brasil e na
França**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Nilton Lincopan

Versão Corrigida

São Paulo

2019

RESUMO

MELO, L.C. **Contexto genético e prevalência da resistência do tipo ESBL/pAmpC em enterobactérias isoladas de cães e gatos no Brasil e na França.** 2018. 105f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Animais de companhia têm sido apontados como reservatórios de bactérias gram-negativas resistentes a antibióticos utilizados em medicina humana e veterinária. O objetivo deste estudo foi investigar a prevalência da resistência mediada por plasmídeos em bactérias Gram-negativas isoladas de animais de companhia no Brasil e na França, elucidando o papel potencial desses animais como portadores assintomáticos. Amostras de DNA extraídas de quatro coleções de bactérias Gram-negativas produtoras de ESBL foram analisadas por tipagem e sub-tipagem baseados em PCR, análise do polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), dimensionamento baseado em PFGE de nuclease S1 e hibridação *Southern blot*. Adicionalmente, isolados de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter cloacae* foram caracterizados por PFGE (*Pulsed-field Gel Electrophoresis*) e *Multilocus Sequence Typing*, agrupamento filogenético e tipagem de O25b. A presença de plasmídeos IncH12 (~600-kb) e IncFIB (~210-290-kp) carregando genes *bla*_{CTX-M-15} e *bla*_{CTX-M-9}, foi confirmada entre cepas de *E. coli* isoladas de animais brasileiros, enquanto uma predominância de plasmídeos IncI1 (~200 kb) pertencentes ao complexo clonal (CC) CC12 contendo o gene *bla*_{CMY-2} foi observado entre linhagens de *E. coli*, em filogrupos de baixa virulência A e B1. A presença de plasmídeos do tipo IncHI2 (~600kb) carregando o gene *bla*_{CTX-M-15} foi confirmada em cepas de *E. cloacae* ST927 isoladas de fezes e saliva de cães assintomáticos no Brasil. Entre os animais franceses com infecções, os isolados de *E. coli* pertencentes ao filogrupo A, B1 e B2 apresentaram tamanho de plasmídeo IncF de ~210-290 kb, carregando principalmente genes *bla*_{CTX-M-15}, além da presença de plasmídeo IncI1 carregando em sua maioria genes *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-9} e *bla*_{CMY-2}. Em animais franceses saudáveis, além das associações *bla*_{CTX-M-15}/IncI1, *bla*_{CTX-M-1}/IncFIB, *bla*_{CTX-M-14}/IncF e da presença de *bla*_{CMY-2} e *bla*_{TEM-52b} (não tipáveis), foi identificada uma cepa de *E. coli* carregando um plasmídeo IncL (~60kb) contendo o gene *bla*_{OXA-48}, sendo esta a primeira descrição desse gene em animais na França. Além disso, os genes *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-2} e *bla*_{CTX-M-9} foram localizados no cromossomo em cepas brasileiras e francesas, como observado por *Southern blot* e Sequenciamento de Nova Geração (NGS). Em resumo, em ambos os países, a prevalência de cepas positivas para a resistência tipo ESBL é grande. Os animais de companhia podem ter um papel importante na disseminação dos genes AmpC e ESBL mediados por plasmídeos.

Palavras-chave: bactéria comensal, *E. coli*, ESBL, CTX-M, multirresistentes, plasmídeos, cromossomo, animais de companhia.

ABSTRACT

MELO, L.C. **Genetic context and prevalence of ESBL / pAmpC resistance in enterobacteria isolated from dogs and cats in Brazil and France. 2018.** 105f. These (PhD in Microbiology) – Biomedical Sciences Institute, São Paulo University, São Paulo, 2018.

Companion animals can be reservoirs of Gram-negative bacteria resistant to antibiotics used in human and veterinary medicine. The aim of this study was to investigate the genetic context of plasmid-mediated resistance in Gram-negative bacteria isolated from companion animals in Brazil and France, elucidating the potential role of these animals as asymptomatic carriers. DNA samples, extracted from a collection of ESBL-producing Gram-negative bacteria, were analyzed by PCR-based typing and sub-typing schemes, restriction fragment length polymorphism analysis, S1 nuclease PFGE-based sizing and Southern blot hybridization. Additionally, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter cloacae* isolates were characterized by PFGE (Pulsed-field Gel Electrophoresis), *Multilocus Sequence Typing*, phylogenetic grouping and O25b typing. Presence of IncH12 (~600-kb) and IncFIB (~210-290-kp) plasmids carrying *bla*_{CTX-M-15} and *bla*_{CTX-M-9}, respectively, was confirmed among *E. coli* strains isolated from Brazilian pets, whereas predominance of IncII plasmids (~200 kb) belonging to the clonal complex (CC) CC12 and carrying *bla*_{CMY-2} gene was observed among *E. coli* strains of low-virulence phylogroups A and B1. The presence of IncHI2-type (~ 600-kb) plasmids carrying *bla*_{CTX-M-15} gene was confirmed in *E. cloacae* strains ST927 isolated from feces and saliva from asymptomatic dogs in Brazil. Among French diseased companion animals, *E. coli* isolates belonging to phylogroup A, B1 and B2 were found carrying IncF-type plasmid with size of ~210-290-kb, which harbored mainly *bla*_{CTX-M-15} genes. In addition, presence of IncII plasmids carrying *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-9} and *bla*_{CMY-2} genes was identified. In healthy French animals, besides associations *bla*_{CTX-M-15}/IncII, *bla*_{CTX-M-1}/IncFIB, *bla*_{CTX-M-14}/IncF, and the presence of *bla*_{CMY-2} and *bla*_{TEM-52b} (non-typable), it was observed an *E. coli* strain carrying an IncL plasmid (~ 60kbp) containing the *bla*_{OXA-48} gene, representing the first description of this gene in a French dog. In addition, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-2} and *bla*_{CTX-M-9} genes were located on the chromosome in Brazilian and French strains, as observed by *Southern Blot* and New Generation Sequencing (NGS) analysis. In summary, in both countries, the prevalence of positive strains for ESBL-type resistance in cats and dogs is high. Companion animals may play an important role in the dissemination of the plasmid mediated AmpC and ESBL genes.

Key words: Commensal bacteria, *E. coli*, ESBL, CTX-M, Multidrug-resistant, Plasmid