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

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

de Melo, Luana Claudino
Contexto Genético e Prevalência da Resistência Do Tipo ESBL/pAmpC em Enterobactérias Isoladas De Cães e Gatos no Brasil e na França / Luana Claudino de Melo; orientador Nilton Erbert Lincopan Huenuman. -- São Paulo, 2018.
105 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Resistência antimicrobiana. 2. ESBL. 3. Enterobacteriaceae. 4. Animais de companhia. 5. Plasmídeos. I. Erbert Lincopan Huenuman, Nilton, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidata: Luana Claudino de Melo

Título da Tese: **Contexto Genético e Prevalência da Resistência Do Tipo ESBL/pAmpC em Enterobactérias Isoladas De Cães e Gatos no Brasil e na França.**

Orientador: Nilton Lincopan

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão publica realizada em 21/11/2018, considerou o(a) candidato(a):

(X) Aprovada ( ) Reprovada

Examinador(a): Assinatura:.....

Nome: .....

Instituição:.....

Examinador(a):

Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador(a):

Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador(a):

Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **698/14** referente ao projeto intitulado: "*Ambiente Genético de resistência ESBL e PMQR mediada por plasmídeos em bactérias Gram-Negativas multirresistentes isoladas de Animais de Companhia no Brasil e na França*" sob a responsabilidade de **Luana Claudino de Melo,** foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSH- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº466 de 2012.

São Paulo, 13 de novembro de 2014.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

EXPEDIÇÃO
DATA 25/11/2014
REL. Nº 3094

anses
alimentation, environnement, travail

Laboratoire de Lyon

Unité
antibiorésistance et virulence bactériennes

Dossier suivi par :
Marisa Haenni

Ligne directe :
04 78 69 65 60

Fax :
04 78 61 91 45

E- mail :
marisa.haenni@anses.fr

Lyon, June 26, 2018

To whom it may concern,

I, Marisa Haenni, co-supervisor of Luana Claudino de Melo, certify that the PhD Project titled: "Genetic Background of Plasmid-Mediated Resistance in Gram-Negative Bacteria Isolated from Companion Animals in Brazil and France" was developed and partly realized at the Lyon laboratory of the **Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail** (Anses) in France.

This work complies with the Ethic Comitee from the University of São Paulo (CEP-ICB nº698/14) and was performed under the responsibility of Luana Claudino de Melo (USP: 7218113). She didn't realize any experiment with animals. The PhD did not involve any live animals experiments, under the aegis of Brazilian law number 11.974 (October 8, 2008).

Dr Marisa Haenni
Vice-head of the AVB unit

Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail – Laboratoire de Lyon
31 avenue Tony Garnier – F69364 Lyon cedex 7 - Téléphone : + 33 (0)4 78 72 65 43 - Télécopie : + 33 (0)4 78 61 91 45 - www.anses.fr

Dedico esta tese àqueles que não falam, não raciocinam como os humanos, sequer nos compreendem. Porém, são portadores de um Amor tão imenso, simples e incondicional, que nós, seres humanos, ainda vamos demorar centenas de anos para aprender e alcançar tamanha evolução.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e ao Universo imenso e maravilhoso, aos meus Guias de luz e amor deste plano e de outros, pela imensa oportunidade de evolução e desenvolvimento que me auxiliaram a obter, e por sempre me permitirem acreditar que todos os sonhos fossem possíveis.

Ao programa Ciências Sem Fronteiras e seus desenvolvedores, que trouxeram a mim e a tantos outros alunos brasileiros de baixa renda a oportunidade de realizar o estágio no exterior, proporcionando imenso conhecimento e crescimento pessoal/profissional.

Ao professor Nilton Lincopan, pela orientação, incentivo, paciência, amizade e apoio de tantos anos, e principalmente pela construção de quem sou profissionalmente.

Je remercie énormément aux Drs. Jean-Yves Madec et Dra. Marisa Haenni, pour toute la soutenance, aide, support, amitié et principalement, la patience.

Je remercie énormément à toutes mes amies du labo et hors du labo, en France, pour être à mon cotê quand j'ai besoin. La distance ne fais jamais oublier les vrais amis, et je vous raméne au cœur par toujours!

Às minhas amigas do laboratório do Brasil, pessoas maravilhosas e talentosíssimas que serão mais do que colegas de profissão, grandes parceiras para toda a vida!

Agradeço especialmente à Quézia Moura da Silva, por toda a amizade e o apoio, além da ajuda com artigos, com a tese e com a vida durante todos esses anos!

Agradeço muito ao meu querido Marco Souza pelo apoio e incentivo nesta etapa final. Agradeço também aos irmãos Furlan (Mateus, Rafael e Renata) pelo apoio e pela difícil missão de paginar a tese.

Agradeço especialmente à Gisele, secretária do Departamento de Microbiologia do ICB, que me auxiliou em tantas coisas pessoais e profissionais, me deu suporte e atenção mesmo de longe e principalmente torceu por mim quando eu me sentia tão perdida.

Aos meus grandes amigos, pela torcida sincera e paciência entre minhas ausências e desesperos, por acreditarem em mim e me ajudarem a enxergar todo o potencial que eu pude desenvolver durante todos esses anos.

Agradeço muito aos meus pais Ruy e Ana, que sempre me apoiaram imensamente nas dificuldades e comemoraram de coração minhas conquistas, que deram muito de seus esforços e orações para que eu realizasse esse grande sonho. Tudo o que construo nessa vida, cada pequena vitória, é e sempre será por vocês.

Agradeço à minha querida irmã Mariana por todo o apoio e amor nessa imensa trajetória, pelas orientações, carinho, conselhos, aprendizado e simplesmente por existir. Sua existência nesse planeta é o que me motiva a continuar seguindo. Nós somos um.

Agradeço ao professor Dr. Antônio Pestana, o primeiro no mundo todo a acreditar no meu potencial, quando nem eu mesmo acreditava. Fui sua última aluna, então espero que de onde estiver, esteja orgulhoso da profissional que o senhor incentivou a formar.

Merci beaucoup!!
Gratidão!!

AGRADECIMENTO ÀS AGÊNCIAS DE FOMENTO

Agradeço ao Programa Ciências sem Fronteiras e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo projeto 202364/2014-3 aprovado. Agradeço também à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelos projetos financiados (números de processo 2013/04725-0 e 2016/08593-9), que proveram recursos necessários à execução deste trabalho.

"Já passamos por muita coisa nessa vida, mas nunca perdemos a capacidade de amar. "

Fonte: Mural de fotos de animais abandonados no Centro de Controle de Zoonoses – São Paulo

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 $bla_{\text{CTX-M-15}}$ e $bla_{\text{CTX-M-9}}$, 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 $bla_{\text{CMY-2}}$ 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 $bla_{\text{CTX-M-15}}$ 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 $bla_{\text{CTX-M-15}}$, além da presença de plasmídeo IncI1 carregando em sua maioria genes $bla_{\text{CTX-M-1}}$, $bla_{\text{CTX-M-9}}$ e $bla_{\text{CMY-2}}$. Em animais franceses saudáveis, além das associações $bla_{\text{CTX-M-15}}$/IncI1, $bla_{\text{CTX-M-1}}$/IncFIB, $bla_{\text{CTX-M-14}}$/IncF e da presença de $bla_{\text{CMY-2}}$ e $bla_{\text{TEM-52b}}$ (não tipáveis), foi identificada uma cepa de *E. coli* carregando um plasmídeo IncL (~60kb) contendo o gene $bla_{\text{OXA-48}}$, sendo esta a primeira descrição desse gene em animais na França. Além disso, os genes $bla_{\text{CTX-M-15}}$, $bla_{\text{CTX-M-2}}$ e $bla_{\text{CTX-M-9}}$ foram localizados no cromossomo em cepas brasileiras e francesas, como observado por S*outhern 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 $bla_{\text{CTX-M-15}}$ and $bla_{\text{CTX-M-9}}$, respectively, was confirmed among *E. coli* strains isolated from Brazilian pets, whereas predominance of IncI1 plasmids (~200 kb) belonging to the clonal complex (CC) CC12 and carrying $bla_{\text{CMY-2}}$ gene was observed among *E. coli* strains of low-virulence phylogrups A and B1. The presence of IncHI2-type (~ 600-kb) plasmids carrying $bla_{\text{CTX-M-15}}$ 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 $bla_{\text{CTX-M-15}}$ genes. In addition, presence of IncI1 plasmids carrying $bla_{\text{CTX-M-1}}$, $bla_{\text{CTX-M-9}}$ and $bla_{\text{CMY-2}}$ genes was identified. In healthy French animals, besides associations $bla_{\text{CTX-M-15}}$/IncI1, $bla_{\text{CTX-M-1}}$/IncFIB, $bla_{\text{CTX-M-14}}$/IncF, and the presence of $bla_{\text{CMY-2}}$ and $bla_{\text{TEM-52b}}$ (non-typable), it was observed an *E. coli* strain carrying an IncL plasmid (~ 60kbp) containing the $bla_{\text{OXA-48}}$ gene, representing the first description of this gene in a French dog. In addition, $bla_{\text{CTX-M-15}}$, $bla_{\text{CTX-M-2}}$ and $bla_{\text{CTX-M-9}}$ 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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura molecular das subfamílias dos antimicrobianos beta-lactâmicos e do ácido clavulânico (figura adaptada de Suarez, 2009) 23

Figura 2: Diagrama de similaridade de variantes CTX de acordo com a estrutura molecular do gene de origem 32

Figura 3: Esquema de replicons e amplificações do kit PBRT com os iniciadores de 30 replicons para caracterização dos grupos de incompatibilidade plasmidiais das cepas.....46

Figura 4: Resultados de testes fenotípicos de susceptibilidade antimicrobiana em três cepas de *Enterobacter cloacae*.....53

Figura 5: Relação clonal das cepas de *E. cloacae* produtoras de CTX-M-15 (Estudo I) isoladas de cães saudáveis, pela técnica de PFGE por Gel Compar II.....54

Figura 6: Relação clonal de 31 cepas de *E. coli* isoladas de animais saudáveis brasileiros (MELO et al., 2018), pela técnica de PFGE.....56

Figura 7: Foto de gel de eletroforese por campo pulsado (PFGE) de cepas de origem francesa.....64

Figura 8: Esquema de fotos de análise de PFGE + Southern Blot a partir da digestão de plugs por S1 para identificação do plasmídeo carreador do gene ESBL em cepas de origem francesa (Estudo III).....65

Figura 9: Relação clonal das 109 cepas de *E. coli* isoladas de animais saudáveis franceses (Estudos III), pela técnica de PFGE.....66

Figura 10: Relação clonal das 7 cepas de *E. coli* recuperadas de animais do Estudo IV, pela técnica de PFGE.....67

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Parâmetros comparativos dos perfis de resistência a partir dos resultados de testes de disco-difusão realizados nos isolados do Estudo I.....53

Gráfico 2: Parâmetros comparativos dos perfis de resistência a partir dos resultados de testes de disco-difusão realizados nos isolados do Estudo II.....53

Gráfico 3: Parâmetros comparativos dos perfis de resistência a partir dos resultados de testes de disco-difusão realizados nos isolados do Estudo II.....64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificações de algumas enzimas β-lactamases e relação de substrato-alvo de inibição de acordo com Ambler (1989) e Bush e Medeiros (1995 – 2009).....29-30

Tabela 2: Primers, sequências e referências utilizadas para os testes moleculares de identificação ESBL.....43

Tabela 3: Caracterização genotípica de isolados de cães saudáveis (Brasil) representantes de diferentes grupos clonais, pela técnica de sequenciamento de genoma completo:.....58

Tabela 4: Características fenotípicas e genotípicas de resistência de cepas Enterobacteriaceae coletadas de cães e gatos saudáveis no Brasil (2012).....59-60

Tabela 5: Características fenotípicas e genotípicas de resistência de cepas Enterobacteriaceae coletadas de cães e gatos com infecção no Brasil (2012).....61

Tabela 6: Características moleculares e filogenéticas, bem como a localização do gene *bla* de 37 cepas recuperadas de animais de companhia (cães e gatos) com infecção, atendidos em centros veterinários na França e recuperadas pela rede RESAPATH.....68-69

Tabela 7: Grupo de 14 Cepas virulentas tipo O:25 - ST131 produtoras de enzimas CTX-M, provenientes de cães e gatos da França.....70

Tabela 8: Estudo de casos e caracterização de cepas provenientes de coletas em cães e gatos saudáveis na École Veterinaire Maison Alfort (França), em 2015.....72

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Primers, sequências, tamanho, temperatura de anelamento e referências das análises de Multilocus Sequence Typing - MLST (WIRTH et al., 2006).....45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ESBL – Extended Spectrum Beta-Lactamase

MDR – multirresistente

PCR – Polymerase Chain Reaction

PBRT – PCR-Based Replicon Typing

PFGE – Pulsed-Field Gel Eletrophoresis

TE – Tampão Tris-HCl–EDTA

NGS – New Generation Sequencing

CIM – Concentração Inibitória Mínima

ITU – Infecção do Trato Urinário

KAN – Canamicina

TET – Tetraciclina

SUL – Sulfametoxazol

TMP – Trimetoprim

NAL – Ácido Nalidíxico

CLSI – Clinical & Laboratory Standards Institute

EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

CC – Complexo clonal

CFO – Cefoxitina

CIP – Ciprofloxacina

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

CPM – Cefepima

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

dNTP – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

IPM – Imipenem

MALDI-TOF – Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight

MLST – Multilocus Sequence Typing

NaOH – Hidróxido de Sódio

PBRT – PCR-Based Replicon Typing

pMLST – Plasmid Multilocus Sequence Typing

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

ST – Sequence Type

SUT – Sulfametoxazol/Trimetoprim

TBE – Tris-Borato-EDTA

TE – Tris-EDTA

TET – Tetraciclina

TIG – Tigeciclina

TOB – Tobramicina

ENR – Enrofloxacina

STR – Estreptomicina

GEN – Gentamicina

CTX – Cefotaxima

AMX – Amoxicilina

NI – Não Identificado

ND – Não Determinado

NA – Não Avaliado

PMQR – Plasmid-Mediated Quinolone Resistance

OMS – Organização Mundial da Saúde

ANSES – Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

LISTA DE SÍMBOLOS

β – Beta

°C – Graus Celsius

kb – Quilobase

kV – Kilovolt

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mM – Milimolar

mm – Milímetro

N – Normal

ng – Nanograma

nm – Nanômetro

pb – Pares de bases

µg – Micrograma

V – Volts

% – Porcentagem

~ – Aproximadamente

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....21
2 REVISÃO DE LITERATURA.....23
2.1 Os antibióticos ß-lactâmicos.....23
2.1.1 *Penicilinas*.....24
2.1.2 *Cefalosporinas*.....25
2.1.3 Carbapenêmicos.....26
2.1.4 *Monobactâmicos*.....27
2.2 Mecanismos de resistência aos antibióticos ß-lactâmicos 27
2.3 Enzimas ß-lactamases e ß-lactamases espectro-estendido (ESBL): classificação e desenvolvimento.....29
2.3.1 *Resistência Plasmidial.*.....32
2.4 Resistência antimicrobiana por ESBL do tipo CTX-M em animais de companhia.....35
3 OBJETIVOS.....38
3.1 Objetivo geral.....38
3.2 Objetivos específicos.....38
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....39
4.1 Grupos de estudo.....39
4.2 Isolados bacterianos.....40
4.2.1 *Brasil (Estudos I e II)*.....40
4.2.2 *França (Estudos III e IV).*.....40
4.3 Teste de susceptibilidade antimicrobiana.....41
4.4 Identificação de genes ß-lactamase e grupos filogenéticos.....42
4.5 PFGE (Pulsed-field Gel Eletrophoresis).....44
4.6 Genotipagem por tipagem de sequências de multilocus (MLST).....44
4.7 Caracterização plasmidial.....45
4.7.1 *Caracterização dos grupos de incompatibilidade plasmidial por PBRT*.....45
4.7.2 *Análise de tamanho plasmidial por S1-PFGE*.....46
4.8 Caracterização do plasmídeo carreador de gene ESBL.....47
4.8.1 *Southern Blot*.....47
4.8.1.1 Transferência elétrica para membrana de Nylon®.....47
4.8.1.*2* Preparação de Sonda para marcação molecular.....47

4.8.1.3 Pré-hibridização.....48
4.8.1.4 Revelação do Southern Blot.....48
4.9 Mobilização dos genes de resistência.....48
4.9.1 *Conjugação*.....48
4.9.2 *Transformação por eletroporação*.....49
4.10 Sequenciamento de genoma.completo.....49
4.10.1 *Preparação de bibliotecas tipo paired-end e sequenciamento*.....50
4.10.2 *Montagem e análise de sequências*.....50
4.11 Análise de Sequence Typing plasmidial por pMLST.....50
5 RESULTADOS.....52
5.1 Perfil da resistência mediada por plasmídeo em enterobactérias isoladas de animais de companhia no Brasil (Estudos I e II).....52
5.2 Perfil da resistência mediada por plasmídeo em enterobactérias isoladas de animais de companhia na França 62
5.2.1 *Estudo III: Isolados de animais de companhia do grupo RESAPATH*.....62
5.2.2 *Estudo IV: Isolados de animais de companhia saudáveis (École Veterinaire Maison Alfort)*.....70
6 DISCUSSÃO.....73
7 CONCLUSÕES.....84
8 REFERÊNCIAS.....85
9 ANEXOS.....102

1 INTRODUÇÃO

A crise atual da resistência aos antimicrobianos mediada por plasmídeos tornou-se uma grande preocupação não apenas na clínica humana, mas também para os animais e o meio ambiente (DOLEJSKA et al., 2012; BOONYASIRI et al., 2014). Algumas bactérias são naturalmente resistentes a certos tipos de antibióticos. No entanto, as bactérias geralmente podem adquirir genes de resistência de outras bactérias (principalmente por conjugação), ou tornam-se resistentes por uma mutação genética (VON WINTERSDORFF et al., 2016). Existem alguns fatores que contribuem para aumentar a pressão seletiva e a propagação dos genes de resistência antimicrobiana, como por exemplo o uso não controlado de antibióticos em medicina humana e veterinária, além do uso excessivo na produção animal (SILBERGELD; GRAHAM; PRICE, 2008; LALAK et al., 2016).

A epidemiologia da resistência antimicrobiana entre a interface homem-animal e o meio ambiente é altamente complexa e contribuiu para o surgimento de diferentes mecanismos de resistência antimicrobiana (SCHMIEDEL et al., 2014a), dificultando o seguimento das novas alternativas terapêuticas e talvez invalidando em breve as alternativas ainda em produção (PEREZ-JORGE et al., 2016; YILMAZ et al., 2016). Como exemplos importantes desses mecanismos de resistência estão as enzimas β-lactamases de espectro estendido (ESBL), prevalentes em membros da família Enterobacteriaceae e que, por consequência, merecem uma atenção especial na epidemiologia clínica. Essas enzimas são codificadas por genes plasmidiais, conferindo resistência aos antibióticos beta-lactâmicos como penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos (DAVIES; DAVIES, 2010a). O mecanismo de ação é caracterizado por inativação molecular do anel beta-lactâmico em suas estruturas. As variantes da enzima tipo CTX-M pertencem ao grupo mais dominante de ESBL descrito em todo o mundo (WOERTHER et al., 2013). Outro grupo de β-lactamases mediadas por plasmídeos que codificam resistência às cefalosporinas de terceira geração em Enterobacteriaceae é o de pAmpC, sendo a variante CMY-2 a mais usualmente relatada em *E. coli* e *Salmonella* spp. (SIDJABAT et al., 2014).

Os animais de companhia podem representar fontes potenciais de disseminação de bactérias resistentes a múltiplos fármacos. Estudos relacionados foram amplamente divulgados na Europa (HORDIJK et al., 2013; HAENNI et al., 2014; STERNEBERG-VAN DER MAATEN et al., 2015; YOUSFI et al., 2016), em sua maioria defendendo a hipóstese de

que o contato próximo de animais de companhia com seres humanos oferece condições favoráveis para a transmissão de bactérias por contato direto ou através do ambiente doméstico (como a contaminação de alimentos). Além disso, o uso extensivo de agentes antimicrobianos em animais pode criar uma oportunidade para a colonização por bactérias multirresistentes, permitindo a transferência horizontal desses genes em cepas pertencentes à microbiotas como a do intestino (PAIVA et al., 2012; TROTT, 2013; FERNANDES et al., 2016).

O contato próximo de animais de companhia como cães e gatos com humanos pode favorecer a transmissão bacteriana por contato direto (lambidas, abraços, feridas abertas ou mordidas) ou mesmo através do compartilhamento de ambiente (contaminação da moradia e compartilhamento de alimentos, etc.). A maioria dos estudos sobre resistência bacteriana em medicina veterinária no Brasil tem sido focada em alimentos, animais de produção e cavalos (AIZAWA et al., 2014a; LEIGUE et al., 2014; CASELLA et al., 2015; CONTE et al., 2017). Dados sobre animais de estimação ainda não foram amplamente elucidados.

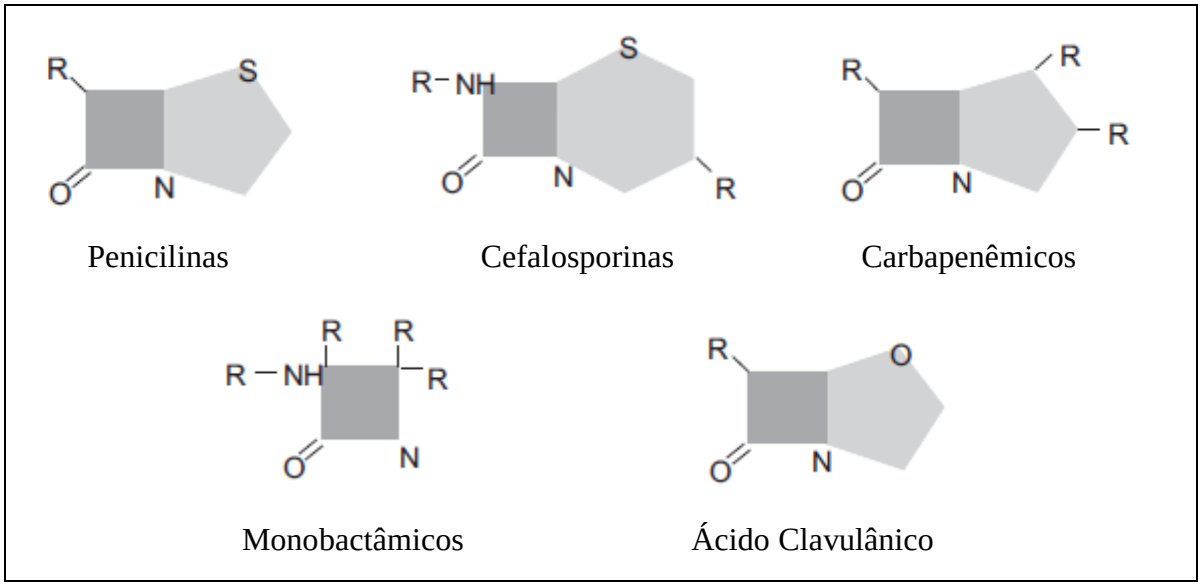
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Os antibióticos β-lactâmicos

Os β-lactâmicos são os antibióticos mais utilizados na luta contra as doenças infecciosas atuais, principalmente por sua eficácia, baixa toxicidade no organismo (BUSH; BRADFORD, 2016). Integram uma classe de antimicrobianos responsáveis pelo bloqueio da síntese bacteriana através da inibição da transpeptidação da parede celular. Estes ligam-se às PBPs, impossibilitando o transporte dos blocos de peptideoglicano para o preenchimento da parede celular e gerando orifícios na fase da replicação, ocasionando a morte do microrganismo (EALAND; MACHOWSKI; KANA, 2018).

Os mecanismos de ação e a variedade de exemplares dessa família ocorrem pelas pequenas diferenças nas estruturas do anel beta-lactâmico. Essas simples diferenciações nas estruturas dos anéis resultam na modificação das propriedades dos compostos, definindo as subfamílias e em consequência o perfil de resistência das enzimas β-lactamases (Figura 1) (SUÁREZ; GUDIOL, 2009). Dentre os membros dessa classe listam-se os antibióticos de 1ª, 2ª, 3ª e 4ª classe.

Figura 1: Estrutura molecular das subfamílias dos antimicrobianos β-lactâmicos e do ácido clavulânico (figura adaptada de Suarez, 2009)



Os antimicrobianos β-lactâmicos são amplamente utilizados tanto na medicina humana quanto veterinária para o tratamento de infecções no trato urinário, tratamento profilático pós-cirúrgico, abcessos intradérmicos, infecções generalizadas, entre outros. Graças à baixa toxicidade, conferida pela afinidade molecular de sua estrutura à estrutura do peptideoglicano (presente apenas nas células bacterianas), identifica-se nesses membros um amplo espectro de atividade, tanto em microrganismos gram-negativos quanto gram-positivos (MCCONEGHY; et al., 2013; MORATA et al., 2015).

2.1.1 Penicilinas

Essa subclasse de antibióticos é caracterizada por ser a mais antiga, descoberta por Fleming em 1928 pela inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* numa placa contaminada com *Penicilium notatum*. Desde então, diversas variedades naturais e sintéticas foram utilizadas na clínica médica geral, todas portando a clássica estrutura com o anel tiazolidínico acoplado ao anel betalactâmico, que a classifica como tal (MILLER, 2002).

A partir da variedade estrutural e da produção natural/sintética, cinco classes desse antimicrobiano já são bem conhecidas: as benzilpenicilinas naturais, as aminopenicilinas, as penicilinas resistentes às enzimas penicilinases, penicilinas de amplo espectro e as aminopenicilinas combinadas com inibidores de betalactamases (MILLER, 2002).

O mecanismo de ação das penicilinas é, como caracteriza a classe dos β-lactâmicos, a inibição da síntese da parede celular e o subsequente enfraquecimento da estrutura da parede até a sua completa lise, sendo esta subclasse a pioneira no desenvolvimento de estudos de mecanismo de ação e farmacocinética de antimicrobianos (SUÁREZ; GUDIOL, 2009).

Apesar do alto nível de resistência bacteriana a este antibiótico, seja pela aquisição de genes ou até mesmo pela resistência intrínseca entre alguns microrganismos (GREENWOOD, 2000; XU et al., 2018), o uso ainda é recorrente em alguns casos clínicos. Em um trabalho realizado em 2018, foi promovido um tratamento de dessensibilização de grávidas alérgicas à penicilina para o tratamento de sífilis gestacional em um hospital público no Sul do Brasil, onde apresentaram dados que asseguram a administração da penicilina para esse tratamento de baixo custo e grande eficácia (DALLÉ et al., 2018). As penicilinas ainda são prescritas no tratamento de muitas infecções simples, principalmente em neonatais, para evitar o uso de antimicrobianos mais específicos e complexos e assim evitar a evolução da resistência.

2.1.2 Cefalosporinas

As cefalosporinas são uma subclasse de antimicrobianos obtidos inicialmente de uma espécie de fungo (*Cephalosporinum acremonium*, atual *Acremonium chrysogenum*) (ELDAROV et al., 2015). Caracterizam-se principalmente pela sua estrutura, onde o ácido 7-minocefalosporânico (7-ACA) apresenta-se como núcleo central em todas as variações desse subgrupo. A mudança de espectro pode ser observada graças às possíveis alterações na cadeia lateral da estrutura química principal.

A partir das cadeias estruturais e seus espectros de ação, as cefalosporinas foram classificadas em primeira, segunda, terceira e quarta geração. A primeira geração inclui: cefalotina, cefazolina, cefalexina e cefadroxila, todas eficientes contra cocos gram-positivos, porém de baixa eficácia contra *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis* atualmente. O uso clínico desses fármacos ainda é amplamente explorado, principalmente em infecções por *Streptococcus* spp. e no tratamento de *S. aureus* sensíveis à oxacilina, além de ser amplamente indicado no tratamento profilático de muitos abcessos cirúrgicos. Um estudo publicado por H. Peltola e colaboradores em 2012 (PELTOLA et al., 2012) realiza um prospecto comparativo no uso de clindamicina e algumas cefalosporinas de primeira geração (cefalexina, cefalotina e cefadroxil) para o tratamento de infecção osteoarticular em crianças, identificando a eficácia dos dois tipos de antimicrobianos. Dessa forma, observa-se que o uso dessa geração de cefalosporinas, apesar da atual taxa de resistência, ainda pode ser amplamente empregado em muitos diagnósticos.

O grupo da segunda geração inclui a cefoxitina, a cefuroxima e o cefaclor e mantêm a eficácia contra gram-positivos do primeiro grupo, porém, apresentam-se mais eficazes contra enterobactérias da comunidade, além de *Neisseria gonorrheae* e *Neisseria meningitidis*. Um estudo na Grécia em 2016 (ANTACHOPOULOS et al., 2016) comparou a eficácia de cefuroxima, cefaclor e cefprozil versus cotrimoxazole para o tratamento profilático de infecção no trato urinário em crianças, o que resultou na comprovação da eficácia tanto das cefalosporinas de segunda geração como do cotrimoxazol, também caracterizando o primeiro grupo como alternativa para diversos quadros clínicos infecciosos.

As cefalosporinas de terceira geração abrangem um grupo identificado por possuir o expectro de ação mais eficaz contra bactérias Gram-negativas, se comparadas às cefalosporinas de gerações anteriores, graças à estrutura que confere maior estabilidade contra as enzimas ESBL (GARAU et al., 1997). Neste grupo se incluem ceftriaxona, cefotaxima e ceftazidima, sendo esta útima reconhecida pela sua alta eficácia contra infecções por

Pseudomonas aeruginosa, principalmente em associação com o inibidor avibactam (PITART et al., 2015). Já as cefalosporinas de quarta geração, apesar de possuirem grande semelhança com as cefalosporinas de terceira geração, são eficazes também contra Gram-positivos como *Staphylococcus aureus* e *P. aeruginosa*, possuindo atividade equivalente ou superior à cefotaxima e ceftazidima. São representadas por cefpiroma e cefepima, sendo esta última conhecida pela sua eficácia em tratamento de infecções causadas por cepas de *Enterobacter* spp. e *Pseudomonas* spp resistentes às cefalosporinas de terceira geração (GIAMARELLOU, 1999).

2.1.3 Carbapenêmicos

São identificados atualmente como imipenem, meropenem, carbapenem e doripenem e apresentam maior espectro de ação para tratamento de infecções tanto provenientes de gram-positivos como gram-negativos. Os membros dessa subclasse de β-lactâmicos diferenciam-se dos demais devido à sua estrutura composta por uma cadeia pentacíclica não-saturada e ligada a um átomo de carbono, formando o anel carbapenema exatamente ao lado do anel β-lactâmico. Essa identidade molecular é expressada na diferenciação de seu espectro de ação, pois graças à essa estrutura conseguem se ligar à molécula de PBP em vários sítios, causando a clássica ruptura da camada de peptideoglicano da parede celular bacteriana e consequentemente sua lise (efeito bactericida que classifica os β-lactâmicos).

Os carbapenêmicos foram identificados em 1979 e até hoje são empregados como alternativa terapêutica para infecções hospitalares graves de cepas bacterianas resistentes aos antimicrobianos clássicos. No entanto, recentemente foi observado aparecimento de resistência plasmidial (FERREIRA et al., 2018) e cromossomal (KRAHN et al., 2016) a esses fármacos, direcionando novos estudos e tratamentos alternativos. Considerados como uma das últimas alternativas terapêuticas para cepas multirresistentes (PAPP-WALLACE et al., 2011) e devido ao eminente risco de uma gradativa ineficácia frente à crescente resistência observada em alguns casos clínicos, os carbapenêmicos são hoje prescritos com muita cautela e aplicados principalmente em casos de graves infecções hospitalares na clínica humana. Apenas alguns países liberaram o uso dessa subclasse para a clínica veterinária, porém, o uso de carbapenêmicos na clínica humana é bem estabelecido, principalmente em infecções hospitalares ou em tratamentos onde outros tipos de antimicrobianos já foram utilizados e / ou não mais eficazes.

2.1.4 Monobactâmicos

Essa subclasse de antimicrobianos foi descoberta em 1981 a partir de espécies bacterianas ambientais e possui essa nomenclatura devido à diferenciação em sua estrutura. Diferente das demais classes de β-lactâmicos, os monobactâmicos possuem apenas um anel β-lactâmico ao invés de dois (BREWER; HELLINGER, 1991).

Apesar de sua baixa toxicidade e de ser bem aplicado para o tratamento de infecções pélvicas e respiratórias, não são indicados em infecções provenientes de espécies anaeróbias ou gram-positivas, pois não possui espectro de ação sobre esses indivíduos, considerados então inativos. O único monobactâmico utilizado na clínica atualmente é o aztreonam.

2.1.5 Inibidores de β-lactamases

Inibidores de β-lactamases são moléculas semi-sintéticas, com efeito de inibição sobre as enzimas supracitadas. Foram inicialmente desenvolvidos em 1951, porém, seu uso só foi liberado para a clínica em 1981, após muitos ensaios. A primeira molécula dessa subclasse foi denominada ácido clavulânico e foi diretamente associada com a amoxicilina devido ao largo uso deste antimicrobiano. Posteriormente, outros inibidores foram sintetizados, como o sulbactam e o tazobactam (ROLINSON GN, 1991).

O avibactam é um inibidor de boa eficácia comprovada, produzido em 2015 e rapidamente liberado para uso pela *Food and Drug Administration* (FDA). Já existem evidências que comprovam o avibactam como o maior inibidor de beta-lactamases quando associado à ceftazidima (STEWART et al., 2018).

2.2 Mecanismos de resistência aos antibióticos β-lactâmicos

Exatamente por ser considerada a classe de antimicrobianos mais amplamente utilizada em práticas clínicas humanas e veterinárias graças ao excelente perfil de estabilidade e amplo espectro antimicrobiano, o largo uso dos β-lactâmicos permitiu o surgumento de diversos mecanismos de resistência, principalmente entre membros da família Enterobacteriaceae, por seleção natural (UR RAHMAN et al., 2018). A capacidade de muitas espécies bacterianas desenvolverem resistência aos antibióticos não é um evento recente, porém, seu exponencial crescimento é considerado uma situação extremamente alarmante sobre a saúde pública entre diversos organismos e populações no mundo todo. Em 2015, a Organização Mundial de Saúde

(OMS) considerou a crise da resistência antimicrobiana como um problema atual, recomendando extrema atenção tanto no âmbito clínico (humanos e animais) como extra-hospitalar, ambiental e de produção (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

A origem da resistência aos antimicrobianos já foi imensamente estudada como um fenômeno totalmente natural, ligado à seleção natural dos organismos, sendo esta seleção elucidada por Charles Darwin em meados de 1844. Neste caminho inevitável para prosseguir na luta pela sobrevivência e evolução, onde microrganismos vão adquirindo resistência ou expressando a cada momento a capacidade de resistir a um ambiente inóspito, observa-se a resistência aos antimicrobianos existentes em muitas espécies bacterianas (ou até mesmo alguns ainda em fase de desenvolvimento). Este fenômeno pode ser denominado como um movimento crescente e que, de fato, vem sendo evidenciado na clínica humana desde a década de 1960 (NEU, 1992; THEURETZBACHER, 2009; SHOAI TEHRANI et al., 2014; BROLUND; SANDEGREN, 2016; PALLARES; CATAÑO, 2017).

Os aspectos de desenvolvimento da resistência, em geral, são definidos pela mutação de genes ou aquisição de elementos genéticos móveis por transferência horizontal (MARTINEZ, 2014a). A disseminação da resistência antimicrobiana tem sido diretamente relacionada também ao hospedeiro, ou seja, não apenas no aspecto molecular pela mobilidade genética e transferência horizontal, mas principalmente no aspecto epidemiológico entre humanos, animais e ambiente. Sabe-se que os primeiros usos efetivos de antibióticos na história foram atribuídos a algumas sulfonamidas (DAVIES; DAVIES, 2010a). A descoberta da penicilina, como já mencionado, ocorreu posteriormente por Fleming em 1928. Já o primeiro caso oficial de resistência foi identificado em 1940, sendo o primeiro relato de uma cepa resistente à penicilina (ABRAHAM, E.P AND CHAIN, 1988; DAVIES; DAVIES, 2010b).

Os mecanismos de resistência, na perspectiva genotípica / molecular, são observados em duas grandes formas: a partir da codificação de genes fixos no cromossomo, como uma resposta natural ao ambiente inóspito e a partir da aquisição de elementos genéticos móveis, como plasmídeos, além de mobilizações gênicas internas a partir de transposons, sequências de inserção e integrons. Na perspectiva fenotípica, os mecanismos mais observados são: impermeabilidade da membrana bacteriana, expulsão das moléculas do antibiótico por mecanismos de bomba de efluxo, modificação do sítio alvo e hidrólise enzimática do antibiótico (MARTINEZ, 2014b).

2.3 Enzimas β-lactamases e β-lactamases espectro-estendido (ESBL): classificação e desenvolvimento

Devido às diversas variações das enzimas β-lactamases identificadas, dois tipos de classificação foram aplicados para melhor compreensão. Essas classificações foram baseadas em sequências de aminoácidos e atividade enzimática (CANTÓN; GONZÁLEZ-ALBA; GALÁN, 2012). A primeira classificação disponível ocorreu em 1980 por Ambler (DUFFEY, 1953), onde organizou as enzimas a partir das estruturas moleculares, num esquema sequencial entre A e D, sendo A as penicilinases, B as metalo-β-lactamases, C as AmpC cromossomais e finalmente a D, para as oxacilinases. Posteriormente, novas classificações foram executadas e atualizadas de acordo com as estruturas funcionais das enzimas (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995). Por exemplo, as enzimas β-lactamases de espectro estendido foram reagrupadas num grupo denominado 2be e as enzimas com pouca afinidade aos inibidores de β-lactamases, desginadas ao grupo 2br. As enzimas que hidrolisam os antibióticos carbapenêmicos são agrupadas num grupo chamado 2f (Tabela 1).

Tabela 1: Classificações de algumas enzimas β-lactamases e relação de substrato-alvo de inibição de acordo com Ambler (1989) e Bush e Medeiros (1995 – 2009) - continua

Bush (2009)	**Ambler (1989)**	**Substrato-alvo**	**Inibido por**		**Enzimas β-lactamases**
			AC / TAZ	**EDTA**	
1	C	Cefalosporinas	Não	Não	*E. coli* AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	C	Cefalosporinas	Não	Não	GCI, CMY-37
2ª	A	Penicilinas	Sim	Não	PC1
2b	A	Penicilinas, primeiras cefalosporinas	Sim	Não	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Cefalosporinas de espectro estendido, monobactans	Sim	Não	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	A	Penicilinas	Não	Não	TEM-30, SHV-10
2ber	A	Cefalosporinas de espectro estendido, Monobactans	Não	Não	TEM-50
2c	A	Carbecilinin	Sim	Não	PCSE-1, CARB-3
2ce	A	Carbecilinin, cefepime	Sim	Não	RTG-4
2d	D	Cloxacilina	Variável	Não	OXA-1, OXA-10
2de	D	Cefalosporinas de espectro estendido	Variável	Não	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapenens	Variável	Não	OXA-23, OXA-48

AC: Ácido Clavulânico / TAZ: Tazobactam. (Adaptado de BUSH; JACOBY, 2010)

Tabela 1 (Continuação): Classificações de algumas enzimas β-lactamases e relação de substrato-alvo de inibição de acordo com Ambler (1989) e Bush e Medeiros (1995 – 2009)

Bush (2009)	**Ambler (1989)**	**Substrato-alvo**	**Inibido por**		**Enzimas β-lactamases**
			AC / TAZ	**EDTA**	
2e	A	Cefalosporinas de espectro estendido	Sim	Não	CepA
2f	A	Carbapenens	Variável	Não	KPC-2, IMI-1, SME-1
3ª	B1	Carbapenens	Não	Sim	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1

AC: Ácido Clavulânico / TAZ: Tazobactam. (Adaptado de BUSH; JACOBY, 2010)

Muitas variantes de β-lactamases são identificadas, como CMY, ACT, DHA, FOX, entre outras (Tabela 1). Sabe-se que a primeira enzima β-lactamase identificada foi a nomeada TEM-1, recuperada de um paciente na Grécia (MEDEIROS, 2000). Desde então sua disseminação se tornou irrefreável e hoje, muitos outros gêneros bacterianos possuem esse mesmo gene bla_{TEM} (BRADFORD, 2001). Já são identificadas mais de 221 variações deste gene expressando a resistência no mundo todo (KAREN BUSH, TIMOTHY PALZKILL, 1997; PLEISS, 2009).

Outra enzima identificada como precursora de resistência aos antibióticos β-lactâmicos foi a SHV. Essa enzima é classificada em diversos grupos de acordo com seu tipo funcional (como por exemplo: SHV-1 no grupo 2b, SHV-2 no grupo 2be e SHV-10 no grupo 2br) e é bem estabelecida em cepas de *Enterobacter cloacae*, aparecendo como resistência intrínseca, assim como em *K. pneumoniae*. No entanto, cepas de *E. coli* em sua maioria apresentam este gene em elementos móveis circulares (plasmídeos) (BRADFORD, 2001). Presente em mais de 193 variações atualmente (PLEISS, 2009), esta enzima foi identificada pela primeira vez em uma cepa de *E. coli* em 1972, codificada por um gene plasmidial, porém, sabe-se que sua região gênica antecessora é de origem cromossomal (LIAKOPOULOS; MEVIUS; CECCARELLI, 2016).

Um exemplo importantíssimo de mecanismo de resistência antimicrobiana é o surgimento das enzimas ESBL (Extended-spectrum β-lactamases). São enzimas catalizadoras das moléculas dos antibióticos dessa classe, que promovem, assim como as demais, a inativação dos mesmos até antes de adentrar no microrganismo pela inibição do anel β-lactâmico em suas estruturas. Diferenciam-se pelo largo espectro de atividade e são capazes de inativar a maior parte das cefalosporinas de terceira e quarta geração (UR RAHMAN et al., 2018). Essas enzimas são produzidas em sua maioria pela codificação de genes plasmidiais e são geralmente bloqueadas pelos inibidores de β-lactamases (HAMMERUM et al., 2014; KPODA et al., 2018;

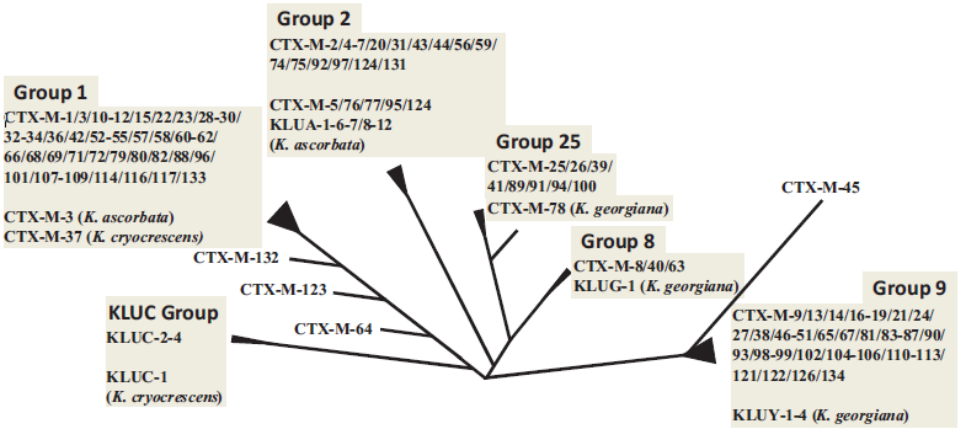
LIU et al., 2018; NIERO et al., 2018; UR RAHMAN et al., 2018). São predominantemente produzidas em membros da família Enterobacteriaceae e por esta razão, são alvo de maior atenção e estudo na clínica epidemiológica mundial.

Centenas de enzimas ESBL já foram identificadas até hoje de acordo com o seu espectro de ação e antibiótico-alvo, como variações das β-lactamases TEM e SHV. Outras enzimas são bem conhecidas, como CTX-M, , GES e OXA (PLEISS, 2009). Diversas variações desta enzima já foram retratadas no mundo todo, como por exemplo as enzimas SHV-12 na China, SHV-12, SHV-2a e SHV-31 no Brasil e SHV-38, SHV-108, SHV-99, SHV-110 no Irã (TOLLENTINO et al., 2011; JEANNOT; FOURNIER; CHOLLEY, 2013; LI et al., 2015; LIU et al., 2016; SHAHRAKI-ZAHEDANI et al., 2016). A dispersão de genes do tipo bla_{SHV} permitiu que esse grupo de enzimas fosse identificado em 2014 como o mais prevalente dentre as enzimas ESBL no mundo todo (LI et al., 2015).

Outras variações de ESBL foram observadas na clínica humana, em pássaros selvagens (ALCALÁ et al., 2015), animais de companhia (HUBER et al., 2013), animais de vida livre, de produção em fazendas (HAMMERUM et al., 2014; SENI et al., 2016) e no ambiente (CONTE et al., 2017). Selecionadas como o foco de estudo deste trabalho, as enzimas do grupo CTX-M são hoje as mais disseminadas e identificadas em mais de 170 variações (KAREN BUSH, TIMOTHY PALZKILL, 1997; PLEISS, 2009). O gene $bla_{\mathrm{CTX\text{-}M}}$ foi originalmente observado com localização cromossomal em cepas de *Kluyvera* spp., também pertencente à família das Enterobacteriaceae. No entanto, a transferência para plasmídeos e transposons permitiu que estes genes se dispersassem entre diversas outras espécies, inclusive as infecciosas e oportunistas, como *E. coli* (DIWAN et al., 2012; CLEMENTE et al., 2015; DEL CHIERICO et al., 2018), *K. pneumoniae* (CONCEIÇÃO et al., 2005), *Acinetobacter baumanni* (SHAKIL; KHAN, 2010), *Salmonella enterica* (ZHANG et al., 2016), entre outros.

Novas variações das enzimas CTX-M vêm sendo constantemente encontradas e classificadas de acordo com pequenas variações em suas estruturas moleculares. A partir desta classificação, atualmente são reconhecidos cinco grupos principais: grupo 1 ($bla_{\mathrm{CTX\text{-}M\text{-}1}}$ e variantes), grupo 2 ($bla_{\mathrm{CTX\text{-}M\text{-}2}}$ e variantes), grupo 8 ($bla_{\mathrm{CTX\text{-}M\text{-}8}}$ e variantes), grupo 9 ($bla_{\mathrm{CTX\text{-}M\text{-}9}}$ e variantes) e grupo 25 ($bla_{\mathrm{CTX\text{-}M\text{-}25}}$ e variantes), como demonstrado na figura 2 (D'ANDREA et al., 2013).

Figura 2: Diagrama de similaridade de variantes CTX-M de acordo com a estrutura molecular do gene de origem (D'ANDREA et al., 2013)



As primeiras enzimas CTX-M identificadas com essa nomenclatura foram as CTX-M-1 e CTX-M-2, porém, hoje se sabe que cronologicamente são originadas da enzima FEC-1 coletada de um cão de laboratório no Japão. Posteriormente, através da análise de sequências de DNA do gene de origem, essa enzima foi identificada como a variante CTX-M-3 (CANTÓN; GONZÁLEZ-ALBA; GALÁN, 2012).

A variação CTX tipo CTX-M-15 é hoje a mais prevalente no mundo todo, possuindo pequenas variações de percentual de prevalência de acordo com cada país. Na França, as variantes referentes aos grupo 1: CTX-M-15, CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-55, são as mais prevalentes na clínica humana e animal (ANASTAY et al., 2013; LUPO et al., 2018), acompanhadas das enzimas pertencentes ao grupo 9, como CTX-M-9, CTX-M-14, CTX-M-27 em animais (VALAT et al., 2012). No Brasil a prevalência de enzimas tipo CTX-M-15 é bem observada em diversos contextos (TOLLENTINO et al., 2011; SEKI et al., 2013; FURLAN; STEHLING, 2018; MOURA et al., 2018a), seguida da prevalência de CTX-M-2 (ROCHA; PINTO; BARBOSA, 2016) não só na clínica humana (DROPA et al., 2015), como principalmente veterinária (FERREIRA et al., 2014a; CASELLA et al., 2017).

2.3.1 Resistência Plasmidial

O genoma bacteriano é identificado principalmente pela presença de um cromossomo circular, responsável por portar genes essenciais para a manutenção da célula, denominados genes *housekeeping*. No entanto, o cromossomo bacteriano na maioria das vezes é acompanhado de elementos genéticos individuais móveis, os plasmídeos. Esses DNAs de morfologia circular são responsáveis por conferir à bactéria capacidade de adaptação e competição no meio ambiente em que vive, geralmente pela produção de toxinas ou enzimas

que conferem resistência a um fator fisiológico presente neste meio (CARATTOLI et al., 2005). A mobilidade desses elementos plasmidiais os caracteriza como um dos principais vetores de disseminação de genes entre as bactérias. Sua principal forma de disseminação ocorre através da conjugação, porém, transformação e transdução também realizam um papel importante. Os processos citados são descritos como:

- Conjugação: processo de transferência de plasmídeos entre bactérias (doadora e receptora) onde ocorre a ligação das células bacterianas pela produção de um pílus sexual / conjugativo, proveniente da doadora. A formação deste pilus pode ser codificada pela própria bactéria doadora ou pelo plasmídeo conjugativo – portador de todos os genes necessários para a transferência gênica, denominados genes *tra* (MARQUES, 2012).
- Transformação: processo em que a bactéria possui a capacidade de captar DNA livre no ambiente externo a partir da codificação de receptores e enzimas de membrana, quando identificada a transformação natural por bactérias competentes, ou quando induzidas por processos químicos ou eletroporação, em procedimentos de engenharia genética laboratorial em biotecnologia (JOHNSTON et al., 2014).
- Transdução: processo de transferência gênica entre bactérias ocasionada pela presença de vírus transmissores denominados bacteriófagos. Estes são presentes em diversos ecossistemas e ao infectarem a bactéria, integram-se ao seu cromossomo, utilizando da maquinaria celular de replicação (da bactéria hospedeira) para se replicarem. A transferência de material genético de uma bactéria para outra ocorre nesta replicação, geralmente quando o ciclo do bacteriófago é caracterizado como lítico e a degradação do DNA bacteriano é observada. Neste processo de replicação / degradação celular, pequenas regiões gênicas bacterianas são integradas nos novos bacteriófagos, e quando estes são liberados no ambiente, carregam os genes da antiga bactéria hospedeira para a próxima, num ciclo de replicação e disseminação desses genes adquiridos (MARQUES, 2012; PENADÉS et al., 2015).

Adicionalmente aos processos de transferência plasmidial entre cepas, processos de mobilidade gênica dentro das próprias células bacterianas (e características plasmidiais) permitem aos plasmídeos alterarem suas características moleculares, adquirindo genes livres ou realizando pequenas alterações em suas sequências graças a elementos móveis como transposons - sequências gênicas que transitam dentro de um próprio elemento genético (plasmídeos ou cromossomos). Os transposons são elementos transponíveis que podem saltar de um gene para outro dentro de um genoma (COE; KASS, 2005). Já as sequências de inserção são sequências gênicas móveis que carregam genes que codificam enzimas (JAIN;

RIVERA; LAKE, 1999), enquanto os integrons, por sua vez, são sistemas gênicos naturais capazes de capturarem e integrarem cassetes gênicos, transformando-os em genes funcionais (ROWE-MAGNUS; MAZEL, 2002). Nesta condição, a cepa bacteriana que consegue sobreviver à uma condição de pressão seletiva no meio (pela portabilidade de um ou mais plasmídeos com genes de resistência) pode realizar a transferência desses plasmídeos, ou no meio externo ou transferindo-os a outras bactérias, por conjugação. Essa capacidade de transferência de elementos genéticos móveis, como plasmídeos, entre microrganismos da mesma espécie ou até mesmo de gêneros diferentes, é o que se apresenta como papel crucial para a evolução e adaptação das espécies bacterianas (LI et al., 2016).

Uma grande variedade de plasmídeos está presente no ambiente microbiano. Dessa forma, podem ser classificados em diferentes grupos, chamados grupos de incompatibilidade plasmidial. Há algumas décadas atrás foi observado um comportamento de incompatibilidade entre diferentes elementos plasmidiais dentro de uma mesma célula bacteriana, ou seja, plasmídeos se tornam incompatíveis quando compartilham sistemas similares de replicação e partição dentro da mesma bactéria. Num exemplo prático, pode-se definir da seguinte forma: se a introdução de um segundo plasmídeo no microrganismo desestabiliza a presença do primeiro, os dois são considerados incompatíveis (NOVICK; HOPPENSTEADT, 1978). Junto a esse fenômeno, desde os anos 70 esses tipos de plasmídeos foram identificados como grupos de incompatibilidade plasmidial (Inc). Essa classificação é sempre baseada na sequência de nucleotídeos na origem do sítio de replicação; dessa forma, diversos grupos de incompatibilidade foram selecionados, como IncI1, IncI2, complexo IncF (InFII, IncFIA, IncFIB), IncQ, IncP, entre outros (SHINTANI; SANCHEZ; KIMBARA, 2015).

A mobilização de genes através de plasmídeos ou outros elementos genéticos móveis é considerada como o maior risco de disseminação da resistência antimicrobiana no mundo e vem sendo amplamente reportada em diversos países, inclusive no Brasil (CARVALHO et al., 2016; PETROSILLO et al., 2016; ANDRADE et al., 2018; BRAGA et al., 2018; FURLAN; STEHLING, 2018; MOURA et al., 2018b). A resistência às cefalosporinas de 3ª geração, por exemplo, se dá principalmente pela produção de ESBL e pAmpC localizados em plasmídeos e integrons, facilitando assim a transmissão entre diferentes amostras (CLEMENTE et al., 2015).

Num aspecto molecular, a disseminação dos genes produtores das enzimas CTX-M pode ser atribuída, principalmente, à mobilização através de sequências de inserção e plasmídeos. A sequência de inserção ISEcp1 já foi identificada como sequência iniciadora e responsável pela mobilização das regiões gênicas *bla*, tanto entre cromossomo quanto em plasmídeo. Essas

sequências de inserção já foram observadas flanqueando os genes codificadores de diversas variantes CTX-M (BONNET, 2004).

Quanto à mobilidade gênica por plasmídeos, a relação de determinados grupos de incompatibilidade plasmidial com os genes de resistência codificadores de ESBLs já é bem esclarecida. Observa-se, por exemplo, a prevalência de IncI1 portando o gene $bla_{\text{CTX-M-1}}$ em humanos e animais de produção como galinhas, da mesma forma que a associação IncFIA, IncFII e IncFIB com o gene $bla_{\text{CTX-M-15}}$, contribuindo para a disseminação desses genes produtores de ezimas β-lactamases nos respectivos nichos (CARATTOLI, 2009; FALGENHAUER et al., 2014).

Outras variantes CTX-M oriundas de genes presentes em grupos de incompatibilidade plasmidial são observadas. Plasmídeos pertencentes à família IncL/M, por exemplo, foram identificados como responsáveis pela disseminação do gene $bla_{\text{CTX-M-3}}$ na Polônia. Essa mesma associação IncL/M - $bla_{\text{CTX-M-3}}$ também foi encontrada em outros países da Europa Oriental, na França, Bélgica e Coréia (CARATTOLI, 2009). Em um trabalho publicado recentemente, o surgimento de cepas virulentas e produtoras de ESBL/pAmpC em alimentos, animais de produção alimentícia e humanos foi observado por um período de 6 anos no Brasil. Estre trabalho resultou na identificação e mapeamento dos plasmídeos tipo IncI1/ST113 e IncI1/ST12, carreadores de genes de resistência associados à virulência no Brasil (MOURA et al., 2018b). Na literatura observa-se uma prevalência de CTX-M-14 presente em plasmídeos do complexo IncF (WANG et al., 2012), da mesma forma que o gene produtor da enzima CTX-M-15 (GONULLU et al., 2008). Já o gene $bla_{\text{CMY-2}}$ pode ser encontrado em sua maioria em plasmídeos tipo IncI1 (DA SILVA et al., 2017).

2.4 Resistência antimicrobiana a partir de ESBL em animais de companhia

A disseminação de cepas resistentes é comumente associada à quantidade de fontes às quais elas podem se associar, seja no ambiente ou na microbiota ou em infecções de humanos e animais. A caracterização dos diversos tipos de resistência em animais, principalmente em animais de companhia, já foi observada. Entretanto, o papel dos animais como reservatórios de cepas resistentes produtoras de enzimas do tipo ESBL começou a ser estudado há pouco tempo, e desde então, muitas espécies foram identificadas como produtoras de enzima ESBL tipo CTX, como por exemplo a presença simultânea de genes ESBL a partir dos genes $bla_{\text{CTX-M-15}}$, $bla_{\text{SHV-12}}$, $bla_{\text{PER-1}}$ e $bla_{\text{FOX-2}}$ em bivalves na Croácia (MARAVIĆ et al., 2015). Um estudo publicado em 2010 (LITERAK et al., 2010) identificou cepas de *E. coli* produtoras das enzimas

CTX-M-1, TEM-1 e TEM-52b em amostras de fezes coletadas em swab, provenientes de pequenos mamíferos terrestres, ruminantes e raposas selvagens, ursos marrons e javalis, todos pertencentes a regiões da República Tcheca e Eslováquia. Em outro estudo realizado na Tanzânia, observou-se a presença de *E. coli*, *Klebsiella* spp. e *Proteus* spp. multirresistentes, produtoras da enzima CTX-M-15 e portadoras de genes de resistência às fluoroquinolonas [*aac(6')-Ib-cr* e *qnrS*], em diversas espécies de animais como cães saudáveis, ovelhas, cabras, galinhas, porcos e gado (SENI et al., 2016).

O primeiro relato de uma cepa produtora de enzima ESBL em animais de companhia ocorreu em 1988 no Japão, onde um cão acondicionado em um laboratório se apresentou como portador de uma cepa produtora da enzima FEC-1 (MATSUMOTO et al., 1988). Alguns estudos com animais de companhia foram realizados em determinadas partes do mundo recentemente. Na França, por exemplo, o primeiro estudo sobre cepas de *E. coli* produtoras de enzimas ESBL foi realizado em 2013 por Safia Dahmen, que pôde observar, a partir de amostras de infecções clínicas em cães e gatos, um percentual de 3,7% de cepas produtoras de ESBL, das quais 74% pertenciam ao grupo CTX-M, com predominância do gene $bla_{\text{CTX-M-15}}$ (DAHMEN et al., 2013). O primeiro relato de cepas de *E. coli* produtoras de enzimas ESBL na Polônia ocorreu em 2015 a partir de amostras clínicas de cães admitidos em um centro veterinário, devido a infecções intestinais (RZEWUSKA et al., 2015b), onde se observou o percentual de 3,4% de cepas ESBL positivas, portadoras dos genes $bla_{\text{SHV-12}}$, $bla_{\text{CTX-M-15}}$ e $bla_{\text{TEM-116}}$.

A clínica veterinária de pequenos animais tem apresentado recentemente alta prevalência de cepas resistentes aos antimicrobianos. Uma pesquisa publicada em 2017 em Portugal realizou um estudo retrospectivo de 16 anos sobre a presença de perfil de resistência fenotípico e genotípico entre cepas de animais de companhia portadores de infecções no trato urinário (ITU). O trabalho elucidou que esse tipo de perfil representa um grande obstáculo para o sucesso das terapias antimicrobianas nesses animais, contribuindo para a disseminação da resistência (MARQUES et al., 2017).

Seguindo uma exponencial atenção para a resistência tipo ESBL/CTX, relatos de cepas resistentes em animais de companhia ou selvagens, na França (HAENNI et al., 2016; CASELLA et al., 2017; MADEC et al., 2017a; LUPO et al., 2018) e na Europa (CLOECKAERT et al., 2007; BOOTHE et al., 2012; HUBER et al., 2013; RZEWUSKA et al., 2015a; MARQUES et al., 2017; ZOGG et al., 2018), foram publicados recentemente. Na França e em outros países europeu,s um número considerável de estudos em cães, gatos e aves confirmaram a presença de ESBLs e pAmpC a partir dos genes e plasmídeos $bla_{\text{CTX-M-15}}$ / IncR,

bla$_{CTX-M-1}$ / IncN, *bla*$_{SHV-2a}$ / IncR e *bla*$_{CMY-2}$ / IncI1 e (DONATI et al., 2014) identificando grande variedade de enzimas, porém, apresentando a prevalência das enzimas CTX-M-15 e CTX-M-1 (JAMBOROVA et al., 2015; MADEC et al., 2017b). Os primeiros relatos de ESBL em animais na França foram publicados em 2003, principalmente em cepas de *E. coli*, mas estudos de vigilância recentes apoiam a teoria do surgimento em meados da década de 1990 (MADEC et al., 2016). Outro estudo recente, realizado em Paris (SCHLÜTER et al., 2014), relatou a presença de cepas que abrigam plasmídeos carregando genes *bla*$_{CTX-M-15}$, além da grande variedade de genes que codificam a resistência a outros antibióticos como aminoglicosídeos, tetraciclina e fluoroquinolonas. Ainda na França, Pierre Bogaerts caracterizou o perfil de mecanismos de resistência aos β- lactâmicos em cães e gatos doentes entre 2008 e 2010, onde observou uma maior prevalência de genes produtores das enzimas CTX-M-1, CTX-M-14, CTX-M-15 e CTX-M-32 (BOGAERTS et al., 2015).

No Brasil, apesar de existirem poucos trabalhos publicados a respeito de animais de companhia portadores de resistência a antibióticos, muitos outros trabalhos contribuíram para compreender a evolução dessa resistência nesses animais, a partir de estudos em animais de produção (CASELLA et al., 2015), papagaios e búfalos (AIZAWA et al., 2014b) e cavalos (LEIGUE et al., 2014). Um recente trabalho realizado no Brasil, em 2016, investigou a presença de cepas clonalmente relacionadas em cães e seus proprietários, encontrando genes do tipo *bla*$_{TEM}$, grupo *bla*$_{CTX-M}$ e *bla*$_{SHV}$. A partir das análises de PFGE-Xba1 foram observados 4 grupos clonais idênticos entre os cães e os proprietários, confirmando a ocorrência de transmissão no contexto humano-animal de companhia na América Latina (CARVALHO et al., 2016).

Os estudos apresentam importantes informações sobre a avaliação da transmissão cruzada humano-animal e, considerando a mobilidade genética dos plasmídeos e suas relações entre humanos e outras espécies, esses trabalhos puderam informar um caminho de compreensão sobre a disseminação de ESBLs no Brasil, não só no aspecto da circulação de cepas entre a clínica humana e veterinária, mas também em animais e no ambiente, como já foi identificado em outros países (DAMBORG et al., 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a prevalência e o contexto genético da resistência às cefaloporinas de amplo espectro em bactérias gram-negativas isoladas de animais de companhia (cães e gatos) sadios ou infectados, no Brasil e na França, elucidando o papel desses animais como potenciais portadores sintomáticos e assintomáticos.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar o perfil fenotípico de resistência aos antibacterianos em bactérias gram-negativas isoladas de animais de companhia no Brasil e na França;

- Identificar genótipos de β-lactamases de amplo espectro nas bactérias isoladas dos grupos de estudo;

- Investigar o contexto genético de resistência às cefaloporinas de amplo espectro em bactérias gram-negativas isoladas de animais de companhia no Brasil e na França;

- Identificar linhagens clonais de bactérias gram-negativas produtoras de ESBL nos animais de companhia sadios ou infectados, no Brasil e na França.

- Correlacionar a presença de linhagens clonais produtoras de ESBL em bactérias gram-negativas identificadas nos grupos de estudos de ambos os países;

- Definir o papel dos animais de companhia na disseminação de bactérias produtoras de ESBL no Brasil e na França.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Grupos de estudo

Para o desenvolvimento do projeto, quatro coleções de cepas bacterianas, chamadas Estudos I, II, III e IV (sendo duas provenientes do Brasil e duas da França, respectivamente) foram reunidas. Os Estudos foram selecionados seguindo os seguintes critérios de similaridade: tipos de animais de companhia (cães e gatos), origem das coleções bacterianas de acordo com os países selecionados e família das espécies bacterianas de interesse (Enterobacteriaceae).

O primeiro grupo (Estudo I) é uma coleção de cepas isoladas em 2012, oriundas de 226 amostras coletadas em swab retal e bucal de 29 gatos e 84 cães saudáveis, provenientes de dois centros de abrigo de animais, sendo um o Centro de Controle de Zoonoses (-23.511555S, -46.627258º) e outro um abrigo particular (coordenadas: -23.548564S, -46.762228º) em São Paulo, Brasil, em 2012. Os animais eram, em sua maioria, de raça indefinida e de diversos tamanhos, origens e de dois gêneros (macho e fêmea). Todos foram resgatados em condições precárias nas ruas de São Paulo ou entregues anonimamente nos centros de acolhimento para cuidado e doação. Apesar das condições iniciais, os animais submetidos à coleta não tinham sinais de infecções ou quaisquer enfermidades, conforme analisado nos prontuários do centro e por entrevista ao dono do abrigo particular, e por este motivo foram considerados animais brasileiros saudáveis. Os isolados haviam sido previamente identificados e caracterizados como cepas portadoras de genes de resistência tipo ESBL e PMQR em um trabalho anterior (MELO, 2014).

O segundo grupo (Estudo II) é uma coleção de 74 isolados (pertencentes à família Enterobacteriaceae) recuperados de 62 cães e 12 gatos admitidos no Hospital Veterinário da Universidade de São Paulo (coordenadas: -23.568849, -46.740094) por swab retal ou do aparelho reprodutor, entre 2010-2011. Apesar de também possuírem em sua maioria raça indefinida e indistinção de gênero e idade, todos os animais submetidos à coleta moravam em lares e possuíam proprietários, presentes na hora da coleta. Todo o grupo de animais do estudo II foi diagnosticado com infecção no trato urinário, considerado então como o grupo brasileiro de animais doentes. Os isolados também haviam sido previamente caracterizados como portadores de genes de resistência tipo ESBL (BARBATO, 2012).

O terceiro grupo (Estudo III) foi caracterizado a partir de 109 isolados clínicos de *E. coli*, coletados de cães e gatos admitidos em diversos centros veterinários da França,

selecionados e reunidos nesta coleção através da rede RESAPATH, uma rede de vigilância epidemiológica de resistência antimicrobiana em patógenos de animais. Foram coletadas amostras a partir de swab e / ou coleta de secreção das regiões infectadas em 33 gatos e 76 cães em tratamento por diversas infecções como infecção do trato urinário (ITU), abcessos intradérmicos, infecções intestinais, otite e algumas doenças não identificadas. Dessa forma, o grupo III foi identificado como o grupo de animais franceses doentes. Os isolados haviam sido identificados por MALDI-TOF, caracterizados com algum fenótipo de resistência antimicrobiana e armazenados a -20 °C no banco de cepas do laboratório ANSES.

No quarto grupo (Estudo IV) apresentam-se 7 isolados de *E. coli*, provenientes de 227 swabs retais de gatos e 166 de cães submetidos a consultas de rotina habituais para aplicação de vacina. As amostras foram coletadas entre janeiro e julho de 2015 na Escola Veterinária de Maison-Alfort, França (coordenadas: 48.814243, 2.421179). Os respectivos donos foram submetidos a uma entrevista sobre sua própria saúde e a saúde de seu animal de estimação, além da ocorrência de viagem nos últimos 12 meses antecessores à coleta. Os isolados haviam sido previamente caracterizados como portadores de genes ESBL, identificados por MALDI-TOF e armazenados a -20 °C no banco de cepas do laboratório ANSES.

4.2 Isolados bacterianos

4.2.1 Brasil (Estudos I e II)

O armazenamento das amostras em ágar AMIES® (Citotest Labware, Jiangsu - 2012) auxiliou na conservação para posterior processamento. A partir destas amostras, uma triagem isolou 53 membros da família Enterobacteriaceae em ágar seletivo MacConkey com ceftriaxona (2 µg/mL). Em seguida, todos foram identificados através de kits de indentificação API® (Biomérieux, EUA – 2012) e Bactray® (LaborClin, 2012). A identificação das espécies foi confirmada por MALDI-TOF® (Bruker Daltonik, Bremen, 2002) e o perfil geral de resistência às cefalosporinas e fluoroquinolonas desse grupo já foi relatado (MELO, 2014).

4.2.2 França (Estudos III e IV)

Todos os isolados foram anteriormente identificados pelas galerias API20E® e MALDI-TOF, além de serem armazenados a - 80 ° C. Para o presente trabalho, as cepas foram descongeladas e reativadas para as demais análises.

4.3 Teste de susceptibilidade antimicrobiana

Todos os isolados foram submetidos aos testes de sensibilidade antimicrobiana e triagem de produção de ESBL de acordo com as recomendações da Sociedade Francesa de Microbiologia (www.sfm-microbiologie.org) e EUCAST (Comitê Europeu de Testes de Susceptibilidade aos Antimicrobianos) (http://www.eucast.org/).

O método descrito por Bauer e colaboradores (1966) tem como objetivo identificar a atividade de inibição de antibióticos de diversas classes a partir da submissão de uma cepa ao contato de discos de antibióticos com concentração equivalente, que ao serem dispostos em placa de petri com meio Muller Hinton distribuem o antibiótico de maneira gradual, de forma que o halo de inibição da cepa represente o nível de sensibilidade/resistência de acordo com os padrões EUCAST.

Foram testados os seguintes discos de antibióticos de interesse humano e/ou veterinário: Amoxicilina, Amoxicilina + Ácido Clavulânico, Cefalotina, Cefuroxima, Cefotaxima, Ceftiofur, Piperacilina, Ticarcilina, Piperacilina + Tazobactam, Ticarcilina + Ácido Clavulânico, Ertapenem, Ceftazidima, Cefoxitina, Cefepima, Aztreonam, Cefquinoma, Estreptomicina, Canamicina, Amicacina, Apramicina, Gentamicina, Tobramicina, Netilmicina, Cloranfenicol, Florfenicol, Tetraciclina, Sulfonamida, Trimetoprim, Ácido Nalidíxico, Enrofloxacina e Ofloxacina. Os exemplares bacterianos foram retirados do estoque a -80 C, estriados em placa de ágar Colúmbia + 5% sangue (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) e incubados em estufa a 37°C por 24 horas. Em seguida, foi preparada uma suspensão bacteriana com solução salina (0,9% NaCl), de acordo com a escala padrão 0,5 de McFarland (por densitômetro). Após a diluição a 0,5, uma nova diluição 1/10 foi realizada.

Com o auxílio de swab estéril essa suspensão foi distribuída de maneira uniforme em placas com ágar Muller Hinton (BioRad, Marne-la-Coquette, France), para distribuição dos discos de antimicrobianos e armazenamento em estufa a 37°C por 16 horas. Os discos de antimicrobianos da família das cefalosporinas foram dispostos agrupados (respeitando o limite de 3 cm de distância entre cada um) e a cepa ATCC 25922 foi usada como controle de qualidade do teste. A leitura foi realizada por avaliação em equipamento SirSCAN Micro® (i2a Diagnostics) a partir dos padrões recomendados pelo EUCAST e CLSI, associados.

Os antibiogramas em que as cefalosporinas apresentavam halo de inibição curto, mas sem a zona fantasma característica do perfil ESBL, foram refeitos com adição de 200 mg/L de Cloxacilina (inibidor de AmpC cromossomal) na placa com meio Muller Hinton para identificar uma possível inibição do espectro de ação dos antibióticos pela presença de uma

enzima AmpC cromossomal, em coexistência com a produção de enzima ESBL de origem plasmidial.

4.4 Identificação de genes β-lactamase e grupos filogenéticos

Os testes para caracterização genotípica, como identificação e classificação de genes que conferiram a resistência às cefalosporinas e outros tipos de classificação foram realizados através da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) descrita inicialmente por Kinzler e Vogelstein em 1999 (VOGELSTEIN; KINZLER, 1999). Esta técnica tem como objetivo a amplificação de genes a partir da desnaturação da amostra de DNA original por aumento de temperatura e posterior síntese exponencial mediada pela DNA polimerase em termociclador. As etapas da amplificação consistem em: desnaturação, anelamento, extensão, emparalhemento e conservação.

Para testes genotípicos, o DNA de cada isolado foi extraído utilizando o kit de PCR NucleoSpin® e analisado por PCR através de kit Quiagen® com primers específicos (YAMANE et al., 2007) para a identificação de genes $bla_{\text{CTX-M-1}}$, $bla_{\text{CTX-M-2}}$, $bla_{\text{CTX-M -9}}$, $bla_{\text{CTX-M-8}}$, bla_{KPC}, bla_{SHV}, $bla_{\text{CMY-2,}}$ bla_{VIM} e bla_{IMP} (Tabela 2), nas seguintes condições: 12,5 µL de mix tampão Quiagen®; 10,1 µL de água miliQ estéril; 0,4 µL de primers foward e reverse específicos para cada gene de interesse e 2 µL de DNA. O protocolo para a reação foi: 15 minutos a 95° C, 30 segundos a 94° C, temperatura de anelamento conforme gene e protocolo do centro de pesquisa e repetição do ciclo por 30 vezes, para posterior 1 minuto de extensão a 72° C, 7 minutos de extensão final a 72° C e conservação da reação a 4° C no termociclador. Para todos os genes $bla_{\text{CTX-M-group}}$, foi realizada uma PCR adicional usando os iniciadores da sequência de inserção ISEcp1 (5'- CAGCTTTTATGACTCG-3 ') e P2D (5'- CAGCGCTTTTGCCGTCTAAG-3'), e em seguida foram sequenciados (Genewiz, Enland) para determinar o contexto genético dos genes $bla_{\text{CTX-M}}$.

Todas as análises foram realizadas em termociclador e sua leitura se deu por eletroforese em capilares automatizada Quiaxcel (Quiagen, USA). O aparelho citado realiza uma análise de concentração por quantificação básica de material genético amplificado a partir da sensibilidade de capilares. O software QIAxcel ScreenGel realizou a análise dos dados por picos de concentração, transformando os resultados em gráficos, onde os picos maiores eram considerados PCR positiva.

O último grupo de estudo deste trabalho (Estudo IV) tinha como objetivo caracterizar isolados previamente identificados como portadores de algum tipo de gene de resistência

ESBL e realizar um estudo de casos. Testes anteriores na Escola de Veterinária de Maison-Alfort já haviam caracterizado um perfil fenotípico de resistência a partir de antibiograma e MIC, pré-selecionando o grupo de cepas para o estudo molecular. Após a extração de DNA por kit, testes genotípicos por PCR foram realizados com amplificadores dos genes de interesse do trabalho ($bla_{CTX-M-1}$, $bla_{CTX-M-2}$, $bla_{CTX-M-9}$ e bla_{OXA-48}), além da análise de sequenciamento para MLST de *E. coli*.

Para isolados de *E. coli*, foi analisado o grupo filogenético por PCR utilizando iniciadores específicos (Tabela 2) e análise por chaves de identificação. Após a confirmação do grupo de virulência B2, todas as cepas positivas foram submetidas à análise de PCR para identificação do sorotipo O25:ST131.

Tabela 2: Primers, sequências e referências utilizadas para os testes moleculares de identificação de genes filogenéticos e codificadores de ESBL

GENE CORRESPONDENTE	PRIMER	SEQUÊNCIA DOS INICIADORES	REFERÊNCIAS
*bla*CTX-1 grupo	Gp1_for	TTA GGA ART GTG CCG CTG YA	(DALLENNE et al., 2010)
*bla*CTX-1/2 grupo	Gp1-2_rev	CGA TAT CGT TGG TGG TRC CAT	
*bla*CTX-2 grupo	Gp2_for	CGT TAA CGG CAC GAT GAC	
*bla*CTX-9 grupo	Gp9_for	TCA AGC CTG CCG ATC TGG T	(DALLENNE et al., 2010)
	Gp9_rev	TGA TTC TCG CCG CTG AAG	
*bla*SHV	SHV_1	AGC CGC TTG AGC AAA TTA AA	(DALLENNE et al., 2010)
	SHV_2	GGG GTA TCC CGC AGA TAA AT	(DALLENNE et al., 2010)
Sequência de inserção	ISEcp1	AAA ATG ATT GAA AGG TGG T	(ANSES, 2011[1])
	P2D	CAG CGC TTT TGC CGT CAA G	
*bla*CMY-2	CF1	ATG ATG AAA AAA TCG ATA TG	(LITERAK et al., 2010)
	CF2	TTA TTG CAG TTT TTC AAG AAT G	
Grupos filogenéticos	gadA-for	GAT GAA ATG GCG TTG GCG CAA G	(CLERMONT et al., 2013)
	gadA-rev	GGC GGA AGT CCC AGA CGA TAT CC	
	chuA-for	ATG ATC ATC GCG GCG TGC TG	
	chuA-rev	AAA CGC GCT CGC GCC TAA T	
	yjaA-for	TGT TCG CGA TCT TGA AAG CAA ACG T	
	yjaA-for	ACC TGT GAC AAA CCG CCC TCA	
	TSPE4.C2-for	GCG GGT GAG ACA GAA ACG CG	
	TSPE4.C2-rev	TTG TCG TGA GTT GCG AAC CCG	
Sonda CTX-M	MA_1	SCS ATG TGC AGY ACC AGT AA	(CONCEIÇÃO et al., 2005)
	MA_2	CCG CRA TAT GRT TGG TGG TG	

[1] = primers desenhados no laboratório ANSES, Lyon (2011)

4.5 PFGE (Pulsed-field Gel Eletrophoresis)

Para análise do perfil clonal bacteriano e do tamanho plasmidial, as cepas foram repicadas em ágar Columbia + 5% sangue e cultivadas em estufa a 37 ºC por 24 horas, para a preparação de *plugs*. Colônias puras da cepa foram diluídas em salina (0,9%) para o acerto da turbidez da solução equivalente à escala 4,5 de McFarland e centrifugadas para concentração de *pellet* e descarte do sobrenadante. Solução de TEE (100µL) e agarose Clean Cut 2% a 56ºC foi acrescentada e os plugs foram preparados em formato de gota (num volume de 23 µL) e resfriados a 4ºC por 15 minutos. Posteriormente foram ressuspensos para lise em uma solução de proteinase K (Roche, Alemanha), TEE 1X e 1% N-Lauryl Sarcosine (Sigma, EUA), a 55 ºC *overnight*, sem agitação. Em seguida, os *plugs* foram tratados com Triton X-114 a 0,1% por 2 horas e lavados 4 vezes por 1 hora cada com tampão TE, para finalmente serem armazenados no mesmo tampão 1x sob refrigeração a 4ºC.

Na etapa subsequente, os *plugs* preparados foram submetidos à digestão, em 37 ºC, *overnight*, pela enzima Xba1 (Promega, EUA), em 40 U, que realiza a clivagem em sítios de restrição ao longo de todo o DNA cromossomal, gerando um padrão específico de bandas para cada clone. As corridas de PFGE foram realizadas em máquina de migração por carga elétrica, com voltagem de 6 V/cm, com intervalos de pulso de 10 segundos a 60 segundos, em um ângulo de 120°, em um ciclo, durante 24 horas. Os géis resultantes das corridas foram corados e fotografados como previamente descrito no tópico anterior. A construção do dendrograma foi realizada utilizando o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) e coeficiente Dice, com tolerância e otimização estabelecidas em 0% e 1%, respectivamente (BioNumerics, Ghent Belgium). Linhagens com similaridade do perfil em ≥ 90% foram consideradas clonais e separadas em grupos.

4.6 Genotipagem de sequências de multilocus (MLST)

A tipagem de MLST foi realizada com todos os isolados pertencentes às espécies de *E. cloacae*, *K. pneumoniae* e *E. coli* que não possuiam relação clonal de acordo com a PFGE. As PCRs foram realizadas de acordo com os esquemas de MLST já estabelecidos (Quadro 1) (WIRTH et al., 2006; MIYOSHI-AKIYAMA et al., 2013). Após amplificação dos genes *housekeeping* (genes essenciais, responsáveis pelo metabolismo da célula bacteriana), os produtos da PCR foram enviados para sequenciamento de primeira geração (Sanger),

analisados e identificados conforme protocolo padronizado em site específico (http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/allele_st_search).

Quadro 1: Primers, sequências, tamanho, temperatura de anelamento e referências das análises de *Multilocus Sequence Typing* - MLST (WIRTH et al., 2006)

Gene MLST	Primer	Sequência dos iniciadores	Tamanho da amplificação	Tºc Anelamento
E. coli	*adk-f*	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG	583 bp	54° C
	adk-r	CCGTCAACTTTCGCGTATTT		
	fumC-f	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC	806 bp	54° C
	fumC-r	GTACGCAGCGAAAAAGATTC		
	gyrB-f	TCGGCGACACGGATGACGGC	911 bp	60° C
	gyrB-r	ATCAGGCCTTCACGCGCATC		
	icd-f	ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA	878 bp	54° C
	icd-r	GGACGCAGCAGGATCTGTT		
	mdh-f	ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGCGCTGCTGGCGG	932 bp	60° C
	mdh-r	TTAACGAACTCCTGCCCCAGAGCGATATCTTTCTT		
	purA-f	CGCGCTGATGAAAGAGATGA	816 bp	54° C
	purA-r	CATACGGTAAGCCACGCAGA		
	recA-f	CGCATTCGCTTTACCCTGACC	780 bp	58° C
	recA-r	TCGTCGAAATCTACGGACCGGA		

4.7 Caracterização plasmidial

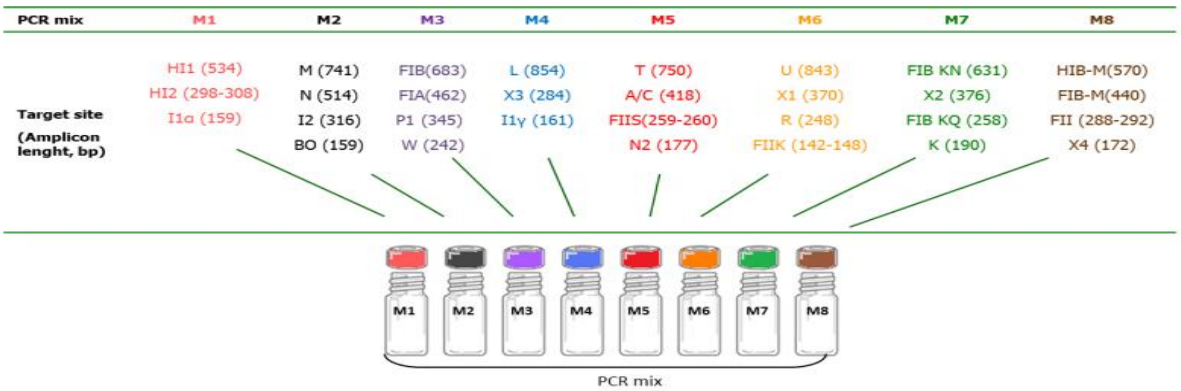
4.7.1 Caracterização dos grupos de incompatibilidade plasmidial por PBRT

Os plasmídeos foram caracterizados utilizando técnica baseada em replicons PBRT do kit DIATHEVA®, seguindo as recomendações publicadas (CARATTOLI et al., 2006). O teste é resumido em uma análise de amplificação das sequências e identificação de grupos de incompatibilidade de plasmídeos, descritos assim por sua estabilidade durante a conjugação bacteriana (CARATTOLI, 2009). São oito testes de PCR multiplex, totalizando 25 replicons a serem identificados: HI1, HI2, I1, I2, X1, L/M, N, FIA, FIB, FIC, FII, FIIS, FIIK, W, Y, P, A/C, T, K, U, R, B/O, HIB-M e FIB-M (Figura 3). As temperaturas para o ciclo de amplificação seguiram as recomendações do fabricante: desnaturação a 95 °C por 15 minutos com de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 minuto, anelamento a 60 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto, 5 minutos de extensão a 72 °C e por fim, conservação em 4 ºC.

As análises ocorreram a partir do resultado da PCR em leitura por capilaridade. Os genes positivos foram classificados conforme grupo de incompatibilidade plasmidial de acordo com a tabela classificatória do fornecedor:

Figura 3: Esquema de replicons e amplificações do kit PBRT (DIATHEVA, Itália) com os iniciadores de 30 replicons para caracterização dos grupos de incompatibilidade plasmidiais das cepas

3



4.7.2 Análise de tamanho plasmidial S1-PFGE

A preparação dos *plugs* seguiu os mesmos passos descritos no tópico anterior (PFGE)**.** Em seguida os *plugs* foram submetidos à digestão pela enzima S1, em estufa a 37 ºC (tempo: 45 minutos), de forma que apenas os plasmídeos foram conservados nos plugs bacterianos. Já em relação à análise da presença do gene ESBL no cromossomo, a digestão dos *plugs* foi realizada pela enzima I-Ceu1 (*overnight*) para conservação de DNA cromossomal. As corridas de PFGE foram realizadas em máquina de migração por carga elétrica. Para a enzima S1 nuclease, a corrida foi realizada com voltagem de 6 V/cm, com intervalos de pulso de 1 segundo a 30 segundos, em um ângulo de 120°, em um ciclo, durante 20 horas. Para a enzima I-Ceu1, a corrida foi realizada com voltagem de 6 V/cm, com intervalos de pulso de 20 segundos a 2 minutos, em um ângulo de 60°, em dois ciclos, durante 12 horas. O gel foi corado com Brometo de Etídio a 1% e posteriormente submetido à agitação e lavagem em água por 30 minutos. Posteriormente, foi registrado em foto pelo equipamento Gel DocTM XR+ e software Image LabTM (ambos da BioRad) e a altura das bandas positivas resultantes foi analisada a partir do marcador de 50 kb utilizado (Lambda Ladder Chef DNA Size Standard – BioRad).

4.8 Caracterização do plasmídeo carreador de gene ESBL

4.8.1 Southern Blot

4.8.1.1 Transferência elétrica para membrana de Nylon®

Os géis dos testes de PFGE pelas enzimas S1 e Xba1 foram fotografados e utilizados para transferência do DNA à membrana de Nylon®. A metodologia foi realizada incialmente por vácuo, em máquina de sucção através do tratamento manual com tampões de depurinação, desnaturação e neutralização, por um período médio de 3 horas. Devido à instabilidade e ineficácia do método, a etapa de transferência foi alterada para o método elétrico a partir de equipamento *Power Blotter System - Invitrogen* (Thermo Fischer Scientific, Villebon-sur-Yvette, France) e realizada por 1 hora, de acordo com o protocolo do fabricante. Ao fim da transferência, as membranas foram identificadas e submetidas à secagem em temperatura ambiente.

4.8.1.2 Preparação de Sonda para marcação molecular

Plasmídeos portadores dos genes ESBL foram detectados a partir de PFGE com digestão da enzima S1, transferência do perfil em membrana de nylon, seguido de Southern Blot utilizando sondas específicas. As sondas consistem em marcadores moleculares de sequência genética específica e complementar ao gene de interesse a ser identificado no genoma bacteriano. Foram preparadas a partir do kit PCR DIG Probe Synthesis (Roche, Alemanha), segundo recomendações do fabricante, onde um mix contendo tampão 10X (5 µL), sonda de marcação (5 µL), concentrado de primers de interesse em 10 µM (5,0 µL), enzima de restrição (0,75 µL), água ultra-pura (30,25 µL) e DNA positivo para o gene purificado (4 µL), foi preparado e amplificado em técnica de PCR a partir do protocolo de amplificação original de cada gene. Após a confirmação da amplificação da sonda por leitura em eletroforese por capilares (Quiagen, USA), alíquotas de 10 µL foram preparadas e congeladas a -20ºC. Amplificações dos genes de interesse foram utilizadas para preparação das sondas e identificação da localização plasmidial dos genes pertencentes ao grupo $bla_{\text{CTX-M}}$. Adicionalmente, outras sondas foram preparadas a partir dos produtos de amplificação dos genes e da região 16S para a verificação da localização cromossomal do gene de resistência.

4.8.1.3 Pré-hibridização

A preparação da membrana preenchida de DNA transferido ocorreu pela pré-hibridização, realizada com o kit *DIG DNA Labeling and Detection* (Roche, Alemanha). Para a etapa de pré-hibridização, as membranas foram inseridas em tubo de vidro e imergidas em uma solução contendo 5x SSC, N-Laurilsarcosina a 0,1 %, SDS a 10%, solução de bloqueio (tampão incluso no kit com ácido maleico e solução de lavagem) a 1% e água destilada. Este material foi submetido a rotação por 4 horas a 42ºC. Após esta preparação, a sonda (8 µL) foi desnaturada a 100ºC, por 4 minutos, e diretamente inserida nos tubos com membrana + solução de pré-hibridização. A hibridização do produto foi então realizada por 16 horas em rotação a 42ºC, ou por temperatura ideal, conforme cada gene de interesse.

4.8.1.4 Revelação do Southern Blot

Após a hibridização *overnight* em 42 °C, todas as membranas foram lavadas com solução de 20x SSC e 0,1% SDS por duas vezes em temperatura ambiente a 5 minutos cada, e posteriormente a 68 ºC por 15 minutos numa solução em menor concentração (0,5x SSC + 0,1% SDS). Em seguida foram tratadas com ácido maleico e solução de bloqueio durante 45 minutos, submetidas a imersão em solução contendo imunoglobulina purificada Anti-Dioxigenina-AP Fab Fragments® por 30 minutos, lavadas com tampão três vezes por 1h30min sob agitação, e finalmente coradas com NBT/BCIP. A revelação dos resultados ocorreu após armazenamento das membranas em local escuro e sem agitação por duas horas, ou em alguns casos, durante uma noite. Todas as bandas tingidas nessas membranas comprovaram a fixação da sonda no gene/plasmídeo de interesse, presente na amostra bacteriana. De acordo com o peso molecular utilizado como marcador, a localização do plasmídeo foi confirmada pela comparação entre as alturas das bandas (gene-plasmídeo) em ambos os experimentos.

4.9 Mobilização dos genes de resistência

4.9.1 Conjugação

Alguns ensaios de conjugação foram realizados com a cepa receptora *E. coli* J53 resistente à rifampicina. Os dois grupos (doadoras e receptoras) foram incubados num volume de 5 ml cada, em caldo BHI por 12 horas a 37°C, sendo aliquotados em tubos com novos

volumes de 10 ml de BHI por dois dias. Em seguida, 10 µL de cada tubo (doadora e receptora) foram inoculados em um mesmo tubo de BHI, permanecendo em temperatura de 37°C sem agitação por 16 horas. Placas de ágar BHI com rifampicina e os antibióticos de interesse para as cepas resistentes doadoras foram utilizadas para realizar a inoculação dessa suspensão de forma estriada, e posteriormente foram mantidas em estufa, também a 37°C. As colônias crescidas nas placas foram selecionadas e submetidas à antibiograma e PCR para confirmação da transferência dos genes de resistência.

4.9.2 Transformação por eletroporação

O DNA plasmidial das cepas foi extraído e purificado por kit Nucleo Bond PC20 conforme especificações do fabricante (Machereney-Nagel, Alemanha). Após confirmação da presença do gene de interesse por amplificação em PCR, um volume de 10 µL do produto purificado foi adicionado em eppendorf com 100 µL de células competentes *E. coli* TOP10. As soluções foram então transferidas para cubetas de eletroporação de 2 mm e submetidas a um choque elétrico de 2,5 kV (Eppendorf® Electroporator 2510). Ao fim do procedimento, as soluções células/DNA foram transferidas para meio S.O.C. (Invitrogen, EUA) e permaneceram sob leve agitação a 37 ºC, por uma hora. Placas de BHI + cefotaxima foram preparadas e as soluções finais no meio S.O.C. foram semeadas nessas placas, mantidas em estufa a 37 °C, por 18 a 24 horas. A extração de DNA e a PCR foram realizadas a partir das colônias crescidas nessas placas para verificar o sucesso da transformação.

4.10 Sequenciamento de genoma completo

O sequenciamento do genoma completo foi realizado para algumas cepas de interesse do trabalho. Inicialmente, a extração do DNA genômico foi realizada por kit PureLink™ Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo (Life Technologies, Carlsbad, CA), seguindo as recomendações do fabricante. A análise de pureza, integridade e quantificação do DNA genômico foi realizada por espectrofotometria através do aparelho DeNovix DS-11 (DeNovix Inc., Wilmington, USA) e por fluorometria pelo equipamento Qubit® 2.0 fluorometer (Life Technologies, Carlsbad, CA), conforme protocolo do fabricante, utilizando o kit Qubit® dsDNA HS Assay (Life Technologies, Carlsbad, CA).

4.10.1 Preparação de bibliotecas tipo paired-end e sequenciamento

As bibliotecas do tipo paired-end foram preparadas com o kit Nextera XT DNA Library Preparation (Illumina Inc., Cambridge, UK) conforme recomendações do fabricante (Nextera® XT DNA Library Prep Reference Guide; Document 15031942 v01). A preparação de biblioteca genômica é uma técnica de clivagem de regiões específicas de todo o DNA bacteriano (ou de interesse) conforme enzimas de restrição correspondentes à clivagem de cada região, para posterior ligação de adaptadores como marcadores para os fragmentos resultantes. Essas partes foram então quantificadas, avaliadas em sua qualidade a partir do sistema Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), e enviadas para sequenciamento no Laboratório de Investigação e Análise de Genomas (Genome Investigation and Analysis Laboratory - GENIAL), do Centro de Facilidades para a Pesquisa (CEFAP) da USP. As plataformas utilizadas para o sequenciamento foram Illumina MiSeq (300 pb) e Illumina NextSeq (75 pb).

4.10.2 Montagem e análise de sequências

Todas as sequências geradas pelas plataformas Illumina foram recuperadas e separadas para montagem do genoma a partir de programas de montagem SPAdes versão 3.7.0 e Velvet versão 1.2.10 (para as sequências produzidas nas plataformas Illumina MiSeq e Illumina NextSeq, respectivamente), para posterior anotação automática pela ferramenta NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) versão 3.2. Os contigs montados foram analisados nas seguintes plataformas online: MLST 1.8 (para classificação de sequence typing-ST), ResFinder 2.1 (para análise de perfil genético de resistência aos antibacterianos), PlasmidFinder 1.3 (para caracterização de grupos de incompatibilidade plasmidial), SerotypeFinder 1.1 (para análise de sorotipo) e VirulenceFinder 1.5 (para caracterização de perfil de virulência, quando presente), todos a partir do site http://www.genomicepidemiology.org/. A ferramenta pMLST 1.4 foi utilizada para as cepas classificadas nos grupos de incompatibilidade F e I1, de forma a obter o ST plasmidial. (CARATTOLI et al., 2006; VILLA et al., 2010).

4.11 Análise de *Sequence Typing* plasmidial por pMLST

O ST plasmidial foi identificado conforme especificado no item 4.6. Sequências iniciadoras específicas para os plasmídeos encontrados IncI1, IncFIB, IncHI2 foram amplificadas segundo o protocolo disponível no site pMLST (https://pubmlst.org/). Foi realizada a análise para os grupos IncI1, IncHI2 e IncFIB.

A amplificação dos seguintes genes foi realizada para a análise de IncI1: *repI* (replicase), *ardA* (codificador da enzima de restrição do tipo I), *trbA* (envolvido na manutenção e transferência de plasmídeos), *sogS* (DNA primase), *pilL* (biogênese do pilus tipo IV). As sequências dos primers foram obtidas de ensaios realizados previamente (GARCÍA-FERNÁNDEZ et al., 2008). Para o IncFIB, apenas o gene repB codificador da proteína de replicação FIB foi amplificado, seguindo protocolo já publicado (VILLA et al., 2010). Para IncHI2, *smr0018* e *smr00199* foram amplificados, ambos codificadores de proteínas específicas do plasmídeo.

As análises de PCR foram realizadas em 1 ciclo a 94 °C por 5 minutos, em seguida foram realizados 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundo, anelamento de 60 °C / 54 °C / 56 °C (IncI1, IncFIB e IncHI2, respectivamente) por 30 segundos e elongamento a 72 °C por 1 minuto, finalizando com a extensão das fitas em um cilco de 72 °C por 5 minutos.

Os produtos da PCR foram enviados para sequenciamento de primeira geração (Sanger), analisados e identificados conforme protocolo padronizado em site padronizado (https://pubmlst.org/).

5 RESULTADOS

5.1 Perfil da resistência mediada por plasmídeo em enterobactérias isoladas de animais de companhia no Brasil (Estudos I e II)

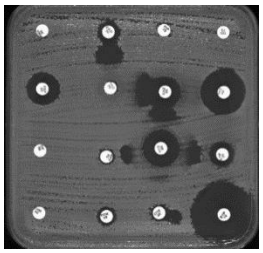
Entre o grupo de animais saudáveis do Brasil (Estudo I), um total de 2 gatos (6,9%; *n* = 2/29) e 26 cães (31,0%; *n* = 26/84) portavam uma Enterobacteriaceae com perfil de resistência às cefalosporinas (ESC-R). Entre as duas Enterobacteriaceae ESC-R coletadas de gatos, uma foi isolada de swab retal (fezes) e a segunda de swab oral (saliva). Entre os 26 cães, 19 portavam Enterobacteriaceae ESC-R nas fezes, 6 na saliva e um animal apresentava bactérias resistentes em amostras coletadas de swab oral e retal. Destes 28 animais, um total de 36 isolados de Enterobacteriaceae ESC-R foram recuperados, os quais foram identificados como 31 isolados de *E. coli* (2 de gatos e 29 de cães) e 5 isolados de *E. cloacae* (todos de cães).

Nas análises fenotípicas, os 36 isolados do estudo I apresentaram fenótipo positivo para ESBL (figuras 4a, 4b e 4c) a partir da zona de inibição entre as cefalosporinas e o inibidor. Os resultados dos testes de disco-difusão para o perfil de multirresistência evidenciaram que todos os isolados dos Estudos I e II apresentaram resistência total à amoxicilina, cefalotina, cefuroxima e ticarcilina, em contraste com a total sensibilidade à apramicina, netilmicina e florfenicol, conforme registrado nos gráficos 1 e 2. A alta resistência às cefalosporinas de todas as gerações era esperada e contribuiu para selecionar os isolados para os testes genotípicos seguintes. Resistências adicionais foram observadas em abundância, como às fluoroquinolonas enrofloxacina e ofloxacina (38,9% e 50,0% respectivamente, *n* = 22/44), aminoglicosídeos (estreptomicina - 88,6%, n = 39/44; gentamicina - 65,9%, n = 29/44) e fenicóis como o cloranfenicol (38,6%, n = 17/44, porém não houve perfil de resistência ao florfenicol).

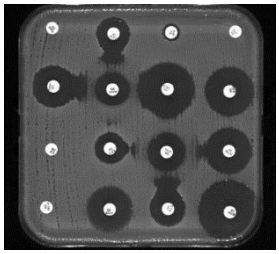
Os parâmetros comparativos entre os perfis de resistência e sensibilidade para cada antibiótico utilizado nos testes fenotípicos dos Estudos I e II constam nos gráficos 1 e 2, respectivamente. Entre o grupo de animais doentes (Estudo II), um gato (8,3 %; *n* = 1/12) e 7 cães (11,3%; *n* = 7/62) apresentaram Enterobacteriaceae resistente às cefalosporinas. Consequentemente, combinando as duas coleções bacterianas de gatos e cães sadios e doentes, um total de 44 Enterobacteriaceae ESBL positivas foi submetido à análise molecular, incluindo 37 *E. coli*, 5 *E. cloacae* e 2 *K. pneumoniae*.

Figura 4: Resultados de testes fenotípicos de susceptibilidade antimicrobiana

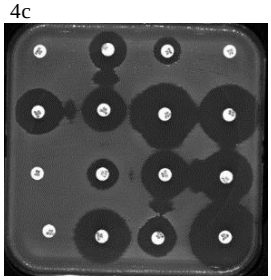
4a



4b



4c



Resultados de testes fenotípicos de susceptibilidade antimicrobiana em três cepas de *E. cloacae* provenientes de um animal saudável (**4A** – 44947) e duas cepas de *E. coli*, provenientes de um cão saudável (**4B** – 44924) e de um cão com infecção no trato urinário (**4C** – 44956), respectivamente.

Gráfico 1: Percentual de resistência antimicrobiana entre os isolados do Estudo I (Brasil – animais saudáveis) em relação aos diferentes antimicrobianos testados, de acordo com o método de disco-difusão

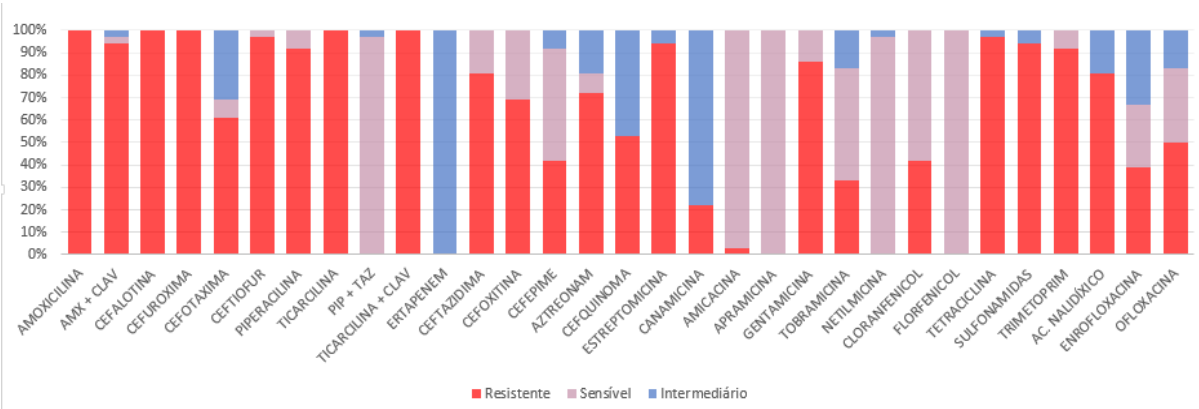
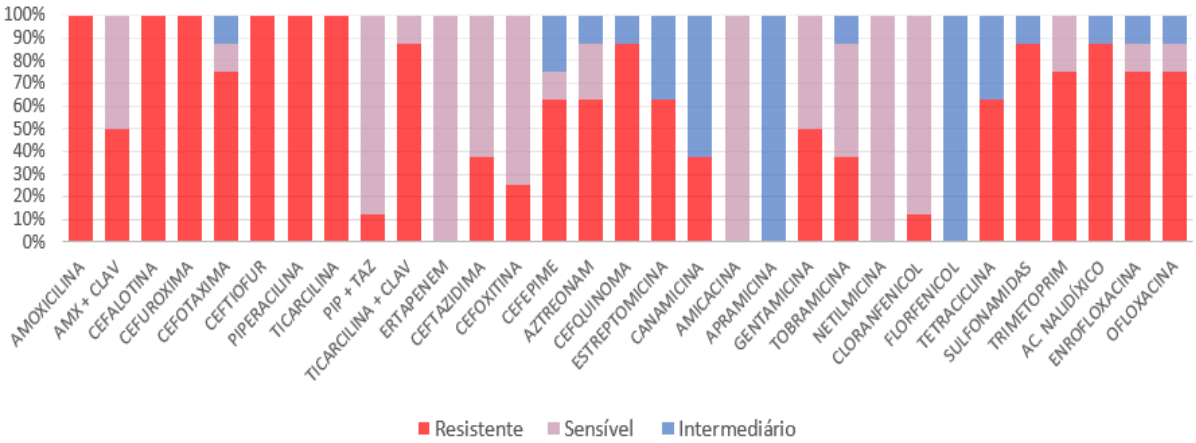


Gráfico 2: Percentual de resistência antimicrobiana entre os isolados do Estudo II (Brasil – animais doentes) em relação aos diferentes antimicrobianos testados, de acordo com o método de disco-difusão



Em relação aos dois grupos de estudo (I e II), as análises moleculares por PCR revelaram que 12 cepas (5 *E. cloacae*, 1 *K. pneumoniae* e 6 *E. coli*) foram positivas para o grupo $bla_{\text{CTX-M-1}}$, onde sequenciamento adicional da região da sequência de inserção do gene (*ISEcp1*) confirmou que 12 cepas levavam o gene $bla_{\text{CTX-M-15}}$ (Tabela 5). Por outro lado, a presença de genes $bla_{\text{CTX-M-2}}$ e $bla_{\text{CTX-M-9}}$ foi confirmada em 6 e 2 isolados de *E. coli*, respectivamente, enquanto 5 cepas de *E. coli* e 1 cepa de *K. pneumoniae* levavam o gene $bla_{\text{CTX-M-8}}$. Dos 22 isolados que exibiram um fenótipo ESBL após o teste de disco-difusão (e adição de cloxacilina no meio Muller Hinton), 18 foram positivos para o gene $bla_{\text{CMY-2}}$ nos resultados de PCR. Os 4 outros isolados também foram positivos para $bla_{\text{CMY-2}}$, porém, apresentaram presença simultânea com outros genes ESBL, como o isolado 44952, proveniente de um animal doente e positivo para $bla_{\text{CMY-2}}$ e $bla_{\text{CTX-M-15}}$. Os isolados provenientes de animais saudáveis portadores de $bla_{\text{CMY-2}}$ + $bla_{\text{CTX-group}}$ foram: 44922 com $bla_{\text{CTX-M-2}}$ e 44925 – 44948, com $bla_{\text{CTX-M-8}}$. Como observado, a presença simultânea de ESBL/pAmpC não foi predominantemente associada aos grupos de animais saudáveis ou doentes, porém três pertenciam ao Estudo I (animais saudáveis).

A análise dos filogrupos de *E. coli* provenientes de animais saudáveis classificou as cepas nos grupos de baixa virulência, A (n = 13) e B1 (n = 7), e nos grupos de alta virulência, C (n = 5), D (n = 6), E (n = 1) e F (n = 4). Já as seis cepas de *E. coli* de animais doentes pertenciam aos filogrupos A (n = 2), B1 (n = 2), D (n = 1) e B2 (n = 1), sendo esta última não-pertencente ao clone de maior virulência B2-ST131.

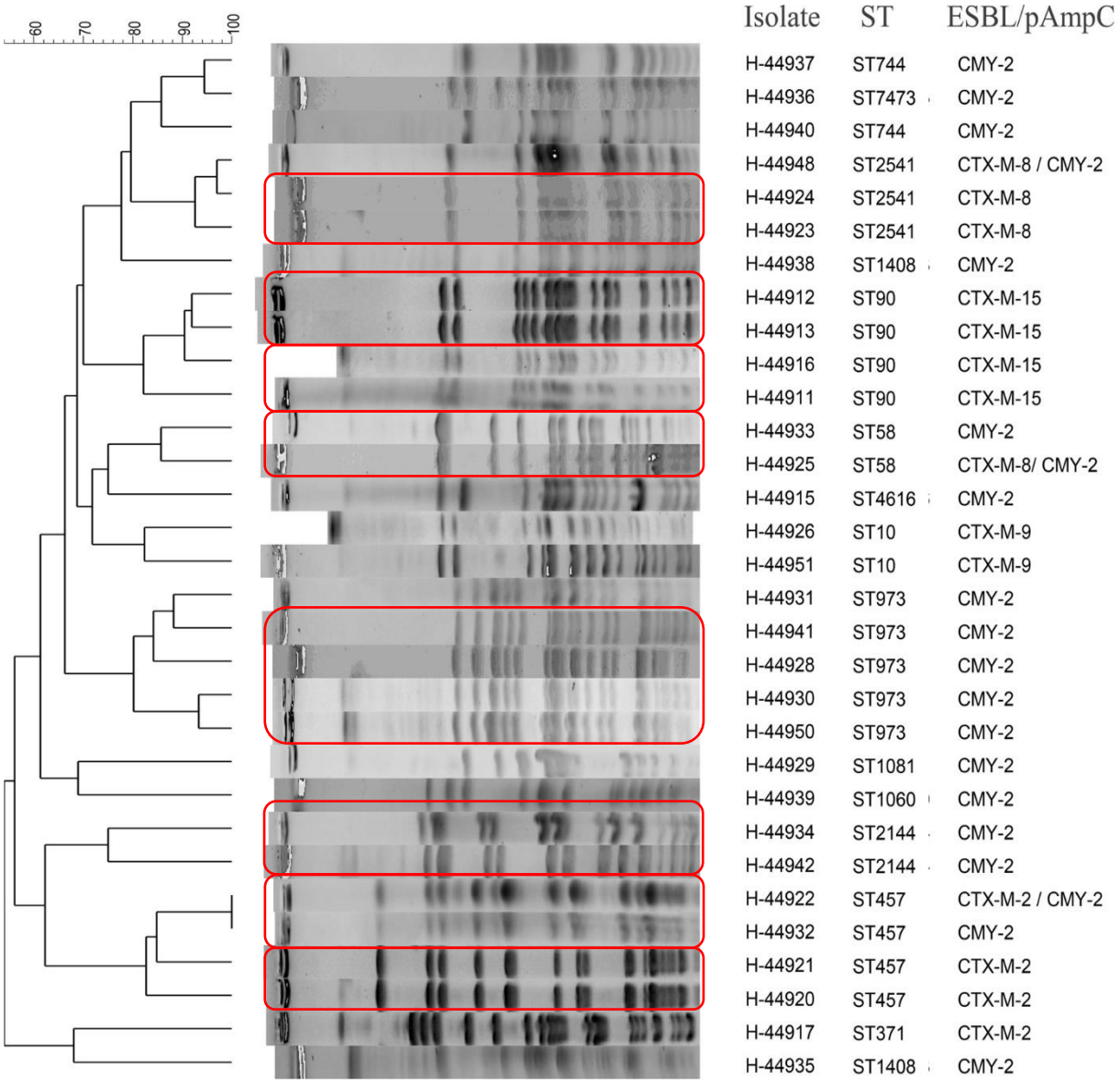
Os resultados de PFGE-Xba1 são apresentados em dendrograma (Figuras 5 e 6). Para os isolados de *E. coli* foi confirmada uma diversidade clonal, com a identificação de 8 clones distintos. Cuiosamente, dois grupos, sendo um referente à duas cepas recuperadas de animais de centros diferentes (*E. coli* - CCZ e abrigo) e outro referente à duas cepas do mesmo animal (*E. cloacae* 44945 – 44946), exibiram alguns perfis de PFGE idênticos. Por outro lado, o grupo de cepas de *E. cloacae* produtoras da enzima CTX-M-15, isoladas de diferentes animais, foi clonalmente relacionado (Figura 7). É importante ressaltar que as cepas 44945 e 44946, apesar de serem consideradas do mesmo perfil, são originadas de diferentes amostras (fezes e saliva, respectivamente) coletados no mesmo animal (cadela).

Figura 5: Relação clonal das cepas de *E. cloacae* produtoras de CTX-M-15 (Estudo I) isoladas de cães saudáveis, pela técnica de PFGE por Gel Compar II, com tolerância e otimização de 0 % e 1 %, respectivamente

Os resultados da análise de PFGE combinaram perfeitamente com os STs identificados pela técnica de MLST (Tabela 4), com exceção apenas do ST1408, evidenciado em duas cepas (44938 e 44935) sem nenhuma relação clonal, de acordo com o PFGE. Os métodos de tipagem mostraram que mais da metade dos isolados pertencia a quatro STs: ST973 (*n* = 5), ST457 (*n* = 4), ST90 (*n* = 4) e ST2541 (*n* = 3). Já para o grupo de *E. coli*, o ST90 foi prevalente entre as produtoras de CTX-M-15, enquanto o ST457 foi prevalente entre produtoras de CTX-M-2. Em relação às produtoras de CMY-2 plasmidial, diversos STs foram identificados, como STs 457, 973, 744, 2144 1098, 4616, 1060 e 7473. Em cães saudáveis, as duas cepas de *E. coli* produtoras de CTX-M-9 pertenciam ao ST10.

Entre os animais doentes, os seis exemplares de *E. coli* e dois de *K. pneumoniae* apresentaram perfis individuais de PFGE e MLST. As cepas de *K. pneumoniae* obtiveram ST101 (44958) e ST130 (44959), enquanto todas cepas de *E. cloacae* produtoras de CTX-M-15 eram relacionadas clonalmente e pertenciam ao ST927. Este clone foi recuperado de 4 cães, sendo duas destas cepas provenientes de amostras de origem retal e oral do mesmo cão (Animal 26).

Figura 6 : Relação clonal de 31 cepas de *E. coli* isoladas de animais saudáveis brasileiros (MELO et al., 2018), pela técnica de PFGE



Os perfis foram equiparados e o dendograma foi gerado a partir do programa Bionumerics (Ghent, Belgium) e correlação Dice, com tolerância e optimização de 0,5% e 1%, respectivamente.

Os resultados das análises dos grupos de incompatibilidade plasmidial pela técnica de Southern blot também são apresentados na Tabela 4. A presença do gene $bla_{\text{CMY-2}}$ estava relacionada, em sua maioria, à presença de plasmídeos com tamanho de 150 a 250 kb, pertencentes ao grupo de incompatibilidade do tipo IncI1, com exceção apenas das cepas 44933 e 44932, onde o gene estava associado ao grupo IncF. Em um isolado de *E. coli* o gene $bla_{\text{CTX-M-15}}$ estava relacionado ao tipo IncFIB, enquanto em todos os exemplares de *E. cloacae* a presença do gene $bla_{\text{CTX-M-15}}$ estava relacionada a plasmídeos do tipo IncHI2. Nas cepas de

E. coli 44911, 44912, 44913, 44916, 44920 e 44953 não foi possível identificar a localização plasmidial dos genes codificadores de ESBL ou pAmpC, pela análise com a enzima de digestão S1 nuclease. Entretanto, pela análise com a enzima I-Ceu1, foi possível observar a presença genes $bla_{\text{CTX-M-15}}$ e $bla_{\text{CTX-M-2}}$ no cromossomo, confirmados por sequenciamento NGS (Tabela 3).

A análise de pMLST, revelou prevalência do ST12 entre os plasmídeos IncI1 carreando o gene $bla_{\text{CMY-2}}$ em isolados de *E. coli*. Esse mesmo pMLST também foi detectado em plasmídeos carreadores do gene $bla_{\text{CTX-M-8}}$. Em quatro cepas (44923, 44924, 44925 e 44959) o gene $bla_{\text{CTX-M-8}}$ foi carreado pelo IncI1/ST113. Este plasmídeo foi identificado em diferentes contextos, incluindo dois isolados de *E. coli* diferentes (ST2541 e ST58) provenientes de um mesmo cão (animal 14, Tabela 4), mas também de outro exemplar de *E. coli*, ST2541, de outro cão saudável do mesmo abrigo (animal 12, Tabela 4) e, finalmente, de um exemplar de *K. pneumoniae* isolado de um cão doente no Hospital Veterinário (animal 8, Tabela 5). Todos os genes $bla_{\text{CTX-M-9}}$ foram localizados em plasmídeos IncFII. Todos os plasmídeos do grupo IncF diferiram em apenas um nucleotídeo, resultando nos dois subtipos F31:A-:B6 e F36:A-:B6.

Os genes $bla_{\text{CTX-M-2}}$ e $bla_{\text{CTX-M-15}}$ foram encontrados em plasmídeos (n = 11) e no cromossomo (n = 6). Como observado na tabela 5, quando localizado no plasmídeo, o gene $bla_{\text{CTX-M-2}}$ estava em plasmídeos não tipáveis (44922 e 44921, Tabela 4; 44954, Tabela 5), ou num plasmídeo IncHI2/ST2 (44917 [ST371], Tabela 4). A mesma situação foi encontrada para o $bla_{\text{CTX-M-15}}$, que foi encontrado no cromossomo ou nos plasmídeos do tipo IncHI1, IncHI2 ou IncF (Tabela 4 e 5). Observa-se que $bla_{\text{CTX-M-15}}$ estava localizado no mesmo plasmídeo IncHI2 em todos os isolados do mesmo clone de *E. cloacae*. Os tamanhos dos plasmídeos carreadores do gene pAmpC $bla_{\text{CMY-2}}$ variaram entre 150 e 250 kb e quase todos (exceto três: 44932, 44933 e 44939) pertenciam ao tipo IncI1. Entre estes plasmídeos $bla_{\text{CMY-2}}$/IncI1, o subtipo IncI1/ST12 foi predominante e amplamente distribuído entre isolados de *E. coli* não relacionados, recuperados de diferentes animais. Outros subtipos de plasmídeos detectados foram $bla_{\text{CMY-2}}$/IncI1 ST1 e ST2.

Os ensaios de transformação bacteriana foram realizados com cepas nas quais o teste de PFGE-S1 e PFGE-ICeu1 não conseguiram identificar a localização do gene de resistência. Nenhuma das cepas apresentou sucesso no ensaio, o que reforçou a hipótese de localização cromossomal. Os ensaios de conjugação também se apresentaram inconclusivos.

O sequenciamento de nova geração realizado com as cepas 44921, 44924 e 44912, confirmou a presença dos genes ESBL. Os resultados de sorotipo, virulência e genes de resistência, bem como o perfil plasmidial, pode ser observado na tabela 3. Duas cepas

provenientes do mesmo centro de acolhimento (CCZ), porém, de animais e dias de coleta diferentes foram identificados com o sorotipo O8:H9 (44912 e 44924), enquanto na cepa 44921 foi identificado o sorotipo O45:H19. As análises de ST identificaram ST90, ST371 e ST2541, respectivamente. Através da ferramenta PlasmidFinder 1.3, foi identificada uma grande variedade de grupos Inc: cepa positiva para *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ / FIB, FIA, cepa positiva para *bla*$_{\text{CTX-M-2}}$ / FIC(FII), X1, FIB e cepa *bla*$_{\text{CTX-M-8}}$ / I1, HI1, FII, HI1A, FIA. Em relação à virulência de *E. coli*, foram encontrados os seguintes genes: *iss, gad, iss, ireA, eilA, iroN, cma, tsh, ipfA.*

Tabela 3 - Caracterização genotípica de isolados de cães saudáveis (Brasil) representantes de diferentes grupos clonais, pela técnica de sequenciamento de genoma completo

Cepa	Sorotipo	ST	Genes de Resistência	Inc	Virulência	Acesso GenBank
44912	O8:H9	ST90	*bla*$_{\text{CTX-M-15}}$, *tet(B)*	FIB, FIA	*iss, gad,*	NBSE00000000
44921	O45:H19	ST371	*bla*$_{\text{CTX-M-2}}$	FIC(FII), X1, FIB	*iss, ireA, eilA, iroN, cma, tsh*	NBSE00000000
44924	O8:H9	ST2541	*bla*$_{\text{TEM-1A}}$, *bla*$_{\text{CTX-M-8}}$, *aadA1, strA, strB, sul2, tet(B)*	I1, HI1, FII, HI1A, FIA	*ipfA*	PHSR00000000

Tabela 4: Características fenotípicas e genotípicas de resistência de cepas Enterobacteriaceae coletadas de cães e gatos saudáveis no Brasil (2012) – continua

Animal	Número de cepa	Origem	Espécie / Gênero	Data da Coleta	Espécie bacteriana	Filogrupo	ST[a]	Enzima ESBL	bla_{ESBL} localização	Subtipo plasmidial	Perfil de resistência associada[b]
1	44911	Saliva	Gato / Fêmea	*jun/12*	*E. coli*	C	90	CTX-M-15	Cromossomal	-	STR, GEN, TET, SUL, TMP, NAL, ENR
2	44912	Saliva	Cão / Macho	*jul/12*	*E. coli*	C	90	CTX-M-15	Cromossomal	-	STR, GEN, TET, SUL, TMP, NAL, ENR
3	44913	Saliva	Cão / Macho	*jul/12*	*E. coli*	C	90	CTX-M-15	Cromossomal	-	STR, GEN, FFC, TET, SUL, TMP, NAL, ENR
4	44916	Fezes	Cão / Fêmea	*nov/12*	*E. coli*	C	90	CTX-M-15	Cromossomal	-	STR, GEN, TET, SUL, TMP, NAL, ENR
5	44917	Fezes	Cão / Macho	*jul/12*	*E. coli*	E	371	CTX-M-2	IncHI2	ST2 (183-, 92-, hipA+)	STR, GEN, FFC, TET, SUL, TMP, NAL, ENR
5	44921	Fezes	Cão / Fêmea	*jul/12*	*E. coli*	F	457	CTX-M-2	NT[c]	-	STR, GEN, CHL, TET, SUL, TMP, NAL
6	44920	Fezes	Gato / Macho	*jun/12*	*E. coli*	F	457	CTX-M-2	Cromossomal	-	STR, GEN, CHL, TET, SUL, TMP, NAL
7	44922	Fezes	Cão / Macho	*jul/12*	*E. coli*	F	457	CTX-M-2 / CMY-2	NT /Inc I1	NT IncI1 plasmid	STR, GEN, CHL, FFC, TET, SUL, TMP
8	44932	Saliva	Cão / Fêmea	*jul/12*	*E. coli*	F	457	CMY-2	IncF	NT F formula	STR, GEN, CHL, TET, SUL, TMP, NAL, ENR
9	44929	Saliva	Cão / Fêmea	*jul/12*	*E. coli*	B1	1081	CMY-2	IncI1	ST2	GEN
9	44930	Saliva	Cão / Fêmea	*jul/12*	*E. coli*	D	973	CMY-2	IncI1	ST12	STR, GEN, CHL, TET, SUL, TMP
10	44950	Fezes	Cão / Fêmea	*jul/12*	*E. coli*	D	973	CMY-2	IncI1	ST12	STR, CHL, TET, SUL, TMP, NAL, ENR
11	44928	Fezes	Cão / Fêmea	*jul/12*	*E. coli*	D	973	CMY-2	IncI1	ST12	STR, CHL, TET, SUL, TMP
12	44931	Fezes	Cão / Macho	jul/12	*E. coli*	D	973	CMY-2	IncI1	ST12	STR, CHL, TET, SUL, TMP, NAL, ENR
13	44941	Fezes	Cão / Fêmea	nov/12	*E. coli*	D	973	CMY-2	IncI1	ST12	STR, GEN, TET, SUL, TMP, NAL, ENR
14	44925	Fezes	Cão / Fêmea	nov/12	*E. coli*	B1	58	CTX-M-8 / CMY-2	IncI1 / NT	ST113 / -	STR, TET, SUL, TMP, NAL, ENR
14	44924	Fezes	Cão / Fêmea	nov/12	*E. coli*	A	2541	CTX-M-8	IncI1	ST113	STR, TET, SUL
15	44923	Fezes	Cão / Macho	*nov/12*	*E. coli*	A	2541	CTX-M-8	IncI1	ST113	STR, TET, SUL

[a]: *Sequence type*. [b]: STR, estreptomicina; KAN, canamicina; GEN, gentamicina; CHL, cloranfenicol; FFC, florfenicol; TET, tetraciclina; SUL, sulfonamidas; TMP, trimetoprim; NAL, ácido nalidíxico; ENR, enrofloxacina.[C]: NT, não tipável. [d]: co-localização.

Tabela 4 (Continuação): Características fenotípicas e genotípicas de resistência de cepas Enterobacteriaceae coletadas de cães e gatos saudáveis no Brasil (2012)

Animal	Número de cepa	Origem	Espécie / Gênero	Data da Coleta	Espécie bacteriana	Filogrupo	ST[a]	Enzima ESBL	blaESBL localização	Subtipo plasmidial	Perfil de resistência associada[b]
16	44948	Fezes	Cão / Macho	*nov/12*	*E. coli*	A	2541	CTX-M-8 / CMY-2	IncI1[d]	ST12	STR, KAN, GEN, TET, SUL, TMP, NAL, ENR
16	44915	Fezes	Cão / Macho	*nov/12*	*E. coli*	C	4616	CMY-2	IncI1	ST12	STR, KAN, GEN, TET, SUL, TMP, NAL, ENR
17	44936	Fezes	Cão / Macho	*nov/12*	*E. coli*	A	7473	CMY-2	IncI1	ST12	STR, GEN, TET, SUL, TMP
17	44937	Fezes	Cão / Macho	*nov/12*	*E. coli*	A	744	CMY-2	IncI1	ST12	STR, GEN, TET, SUL, TMP
18	44940	Fezes	Cão / Fêmea	*nov/12*	*E. coli*	A	744	CMY-2	IncI1	ST12	STR, KAN, CHL, TET, SUL, TMP, NAL, ENR
19	44934	Fezes	Cão / Macho	*nov/12*	*E. coli*	B1	2144	CMY-2	IncI1	ST12	STR, GEN, TET, SUL, TMP, NAL
20	44942	Fezes	Cão / Fêmea	*nov/12*	*E. coli*	B1	2144	CMY-2	IncI1	ST12	STR, GEN, TET, SUL, TMP
21	44938	Fezes	Cão / Fêmea	*nov/12*	*E. coli*	A	1408	CMY-2	IncI1	ST12	STR, GEN, TET, SUL, TMP
22	44935	Fezes	Cão / Macho	*nov/12*	*E. coli*	A	1408	CMY-2	IncI1	ST1	STR, GEN, TET, SUL, TMP
23	44933	Fezes	Cão / Fêmea	*nov/12*	*E. coli*	B1	58	CMY-2	IncF	F-:A-:B1	TET, TMP, NAL, ENR
24	44926	Saliva	Cão / Fêmea	*jul/12*	*E. coli*	A	10	CTX-M-9	IncFII	F31:A-:B6	STR, GEN, TET, SUL, TMP, NAL, ENR
25	44951	Fezes	Cão / Macho	*nov/12*	*E. coli*	A	10	CTX-M-9	IncFII	F36:A-:B6	STR, TET, SUL, TMP, NAL, ENR
26	44939	Fezes	Cão / Fêmea	*nov/12*	*E. coli*	A	1060	CMY-2	NT	-	STR, TET, SUL, TMP
23	44943	Fezes	Cão / Fêmea	*nov/12*	*E. cloacae*	-	927	CTX-M-15	IncHI2	ST2 (183+, 92+, hipA+)	STR, KAN, GEN, CHL, TET, SUL, TMP, NAL
27	44944	Saliva	Cão / Macho	*nov/12*	*E. cloacae*	-	927	CTX-M-15	IncHI2	ST2 (183+, 92+, hipA+)	STR, KAN, GEN, CHL, TET, SUL, TMP, NAL
26	44945	Fezes	Cão / Fêmea	*nov/12*	*E. cloacae*	-	927	CTX-M-15	IncHI2	ST2 (183+, 92+, hipA+)	STR, KAN, GEN, CHL, TET, SUL, TMP, NAL
26	44946	Saliva	Cão / Fêmea	*nov/12*	*E. cloacae*	-	927	CTX-M-15	IncHI2	ST2 (183+, 92+, hipA+)	STR, KAN, GEN, CHL, TET, SUL, TMP, NAL
28	44947	Fezes	Cão / Fêmea	*nov/12*	*E. cloacae*	-	927	CTX-M-15	IncHI2	ST2 (183+, 92+, hipA+)	STR, KAN, GEN, CHL, TET, SUL, TMP, NAL

[a]: *Sequence type*. [b]: STR, estreptomicina; KAN, canamicina; GEN, gentamicina; CHL, cloranfenicol; FFC, florfenicol; TET, tetraciclina; SUL, sulfonamidas; TMP, trimetoprim; NAL, ácido nalidíxico; ENR, enrofloxacina.[C]: NT, não tipável. [d]: co-localização.

Tabela 5: Características fenotípicas e genotípicas de resistência de cepas Enterobacteriaceae coletadas de cães e gatos com infecção no Brasil (2012)

Animal	Número de cepa	Origem	Espécie / Gênero	Origem da Coleta	Espécie bacteriana	ST[a]	Filogrupo	Enzima ESBL	blaESBL localização	Subtipo plasmidial	Perfil de resistência associada[b]
1	44952	13ci	Cão / Fêmea	UTI	*E. coli*	3267	A	CTX-M-15 / CMY-2	FIB / NT	NT/ -	KAN, TET, SUL, TMP, NAL, ENR
2	44955	27ci	Cão / Fêmea	UTI	*E. coli*	372	B1	CTX-M-8	NT	-	STR TET, SUL, TMP, NAL, ENR
3	44957	50ci	Cão / Fêmea	UTI	*E. coli*	744	A	CMY-2	I1	NT	STR, KAN, CHL, TET, SUL, TMP, NAL, ENR
4	44956	67ci	Cão / Macho	UTI	*E. coli*	3395	B2	CTX-M-9	FII	F1:A-:B-	GEN, NAL, ENR
5	44953	78ci	Cão / ND	UTI	*E. coli*	457	D	CTX-M-2	Cromossomal	-	STR, GEN, TET, SUL, TMP, NAL
6	44954	103ci	Cão / ND	UTI	*E. coli*	155	B1	CTX-M-2	NT	-	STR, GEN, SUL, TMP, NAL, ENR
7	44958	KJF	Cão / ND	UTI	*K. pneumoniae*	101	n/a	CTX-M-15	HI1	-	STR, GEN, TET, SUL, TMP, NAL, ENR
8	44959	74ci	Cão / ND	UTI	*K. pneumoniae*	130	n/a	CTX-M-8	I1	ST113	SUL

[a]: *Sequence type*. [b]: STR, estreptomicina; KAN, canamicina; GEN, gentamicina; CHL, cloranfenicol; FFC, florfenicol; TET, tetraciclina; SUL, sulfonamidas; TMP, trimetoprim; NAL, ácido nalidíxico; ENR, enrofloxacina.[C]: NT, não tipável UTI: infecção no trato urinário.

5.2 Perfil da resistência mediada por plasmídeo em enterobactérias isoladas de animais de companhia na França

5.2.1 Estudo III: Isolados de animais de companhia do grupo RESAPATH

As análises fenotípicas do perfil de resistência a partir do teste de disco-difusão resultaram na identificação de perfis típicos de cepas produtoras de ESBL (Gráfico 3). Para os isolados do estudo III, o nível de resistência intermediária aos antibióticos foi considerado critério para a inclusão dos isolados nos testes genotípicos subsequentes. Todos os isolados apresentaram 100% de resistência à amoxicilina, porém, apenas 28,1% apresentaram resistência quando o antibiótico estava associado ao inibidor ácido clavulânico. O mesmo observou-se em relação à piperacilina, onde 98,2% dos isolados apresentaram resistência quando os discos continham apenas o antibiótico, enquanto 0,9% apresentaram resistência ao testá-lo com adição do inibidor tazobactam. Cefalotina, ticarcilina e ceftiofur apresentaram resultados semelhantes (99,1%, 99,1% e 87,7% de resistência, respectivamente).

Em relação às outras classes de antimicrobianos testadas, os isolados apresentaram um percentual de resistência relativamente alto às quinolonas/fluoroquinolonas, onde 77,2% foi resistente ao ácido nalidíxico, 67,5% à enrofloxacina e 72,8% à ofloxacina. Dentre os aminoglicosídeos testados, 43,9 % apresentou perfil de resistência para estreptomicina, 39,5% para canamicina e 4,4% para amicacina. A tetraciclina foi o antimicrobiano que mais obteve destaque, apresentando 60,5% de resistência entre os isolados.

As análises moleculares iniciais realizadas entre os 109 isolados franceses de *E. coli*, a partir de amplificação por PCR e sequenciamento de primeira geração das sequências de inserção ISEcP – P2D, identificaram a presença dos seguintes genes: $bla_{\text{CTX-M-15}}$ (33,0%; n = 36), $bla_{\text{CTX-M-1}}$ (21,1%; n = 23), $bla_{\text{CTX-M-9}}$ (10,1%; n = 11), $bla_{\text{CTX-M-14}}$ (6,4%; n = 7); $bla_{\text{CTX-M-27}}$ (5,5%; n = 6), $bla_{\text{CTX-M-55}}$ e $bla_{\text{CTX-M-3}}$ (2,8%; n = 3, cada) e $bla_{\text{CTX-M-32}}$ (0,9%; n = 1), codificadores de ESBL, e $bla_{\text{CMY-2}}$ (19,3%; n = 20), codificador de pAmpC.

A análise de PFGE a partir de digestão com a enzima Xba1 (Figura 7a) apresentou perfis clonais bastante heterogêneos (figura 9). Dessa forma, pôde-se observar um total de 4 grupos clonais distintos, apresentando associação com os perfis genéticos de resistência. Apenas um grupo apresentou clonalidade entre uma cepa proveniente de cão e uma proveniente de gato.

A análise do perfil de virulência realizada pela técnica de Clermont (2013) identificou 22,0% (*n* = 24) dos isolados como pertencentes ao filogrupo A, enquanto 15,6% (*n* = 17) pertenceram ao grupo B1, os dois grupos de menor virulência. Os filogrupos de alta virulência B2 e D foram identificados num percentual de 33,9% (*n* = 37) e 24,8% (*n* = 27), respectivamente. Um total de 14 cepas pertencentes ao filogrupo B2 de alta virulência foram positivas para o sorotipo O:25-ST131, o clone pandêmico de alto risco disseminado em todo o mundo, isoladas de animais de companhia infectados (Tabela 7).

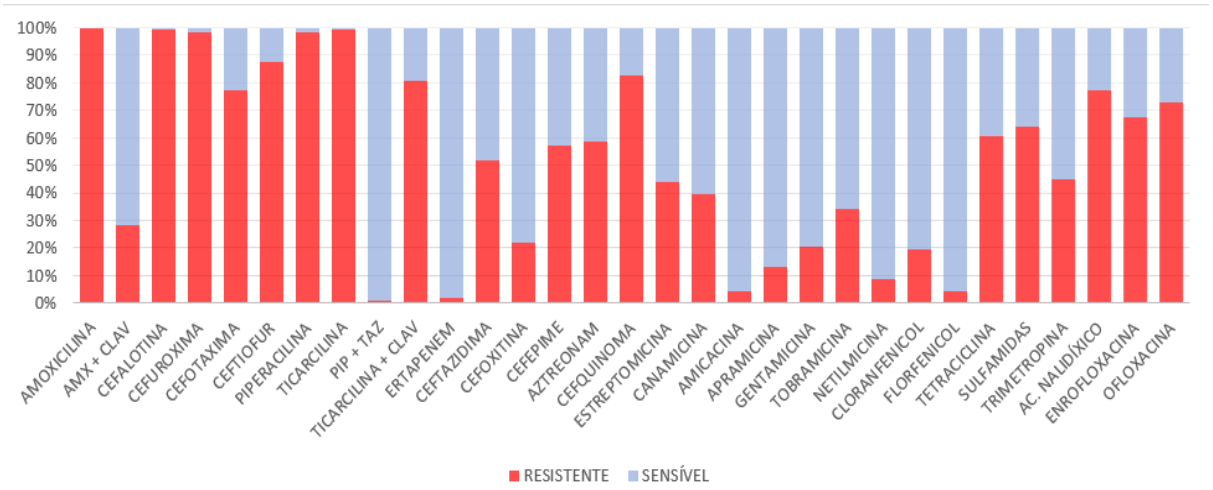
A técnica de Southern Blot revelou a presença de plasmídeos de diferentes tamanhos, carreando os genes $bla_{\text{CTX-M-15}}$ (de ~100 kb a ~190 kb), $bla_{\text{CTX-M-1}}$ (de ~100 kb a ~145 kb), $bla_{\text{CTX-M-3}}$ e $bla_{\text{CTX-M-55}}$ (~100 kb), $bla_{\text{CTX-M-9}}$, $bla_{\text{CTX-M-14}}$ e $bla_{\text{CTX-M-27}}$ (de ~70 kb a ~175 kb), e $bla_{\text{CMY-2}}$ (de ~95 kb a ~125 kb). Apesar de vários testes com diferentes temperaturas de pré-hibridização serem realizados para a fixação da sonda nas membranas, a localização dos genes codificadores de ESBL não pôde ser observada em 33 cepas.

As análises por S1 nuclease (figura 7b) e *Southern blot* (Figura 8), realizadas para a caracterização de grupos de incompatibilidade de plasmídeos, identificaram a presença de genes $bla_{\text{CTX-M-15}}$, $bla_{\text{CTX-M-1}}$ e as variantes dos genes $bla_{\text{CTX-M-9,}}$ relacionadas em sua grande parte aos grupos de incompatibilidade plasmidiais do tipo IncF e IncI1 (Tabela 6). Um percentual de 24,8% (*n* = 27) foram identificados como portadores do plasmídeo IncI1, em sua maioria carreadores do gene $bla_{\text{CTX-M-1}}$. Já 28,4% das cepas apresentaram o complexo plasmidial tipo IncF (*n* = 31), em um percentual equilibrado de portabilidade entre os grupos $bla_{\text{CTX-M-1}}$ e $bla_{\text{CTX-M-9}}$, conforme especificado na tabela 6. Os plasmídeos Inc1 foram observados em altura média de ~100kb, enquanto os plasmídeos do complexo IncF foram identificados com altura média de ~105kb a ~190kb. Conforme ainda observado na Tabela 6, as alturas dos plasmídeos foram compatíveis com as dos genes codificadores de ESBL, caracterizando os mesmos como os carreadores desse tipo de resistência.

Determinadas cepas que apresentaram resultado negativo no teste de PFGE-S1 foram submetidas ao teste de PFGE-Ceu1 para verificar a possível localização cromossomal desses genes. Após o tratamento das membranas de Nylon® com as sondas preparadas a partir dos produtos de amplificação dos genes codificadores de ESBL + região 16S cromossomal, a revelação por Southern Blot identificou ao menos 7 cepas positivas para este tipo de padrão genético de resistência (genes de localização cromossomal): 32910, 36003, 36555, 37984 (portadoras de $bla_{\text{CTX-M-15}}$), 27604, 35794 e 36553 (portadoras de $bla_{\text{CTX-M-9}}$). Outras 4 cepas (37892, 27257, 34355 e 36229) apresentaram positividade no Southern Blot com sonda CTX-

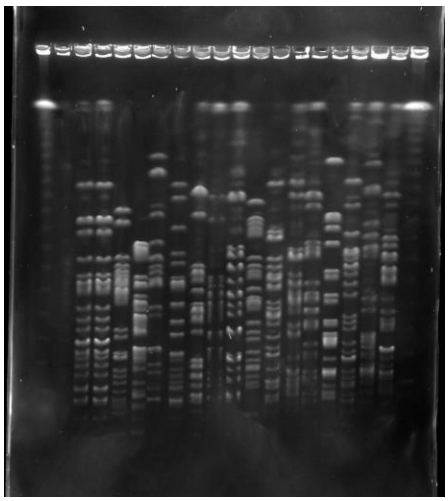
M, porém, obtiveram resultados inconclusivos com sonda 16S e foram classificadas com localização molecular ESBL não identificada. Os resultados dos testes de transformação para as cepas acima identificadas foram negativos. As análises de pMLST de exemplares produtores de cada tipo diferente de enzima ESBL mediada por plasmídeo IncI1 apresentou o mesmo ST3, complexo clonal CC3.

Gráfico 3: Percentual de resistência antimicrobiana entre os isolados do Estudo III (França – animais doentes) em relação aos diferentes antimicrobianos testados, de acordo com o método de disco-difusão



Figuras 7: Foto de gel de eletroforese por campo pulsado (PFGE) a partir da enzima Xba1 e foto de gel PFGE a partir da digestão da enzima S1:

7a



7b

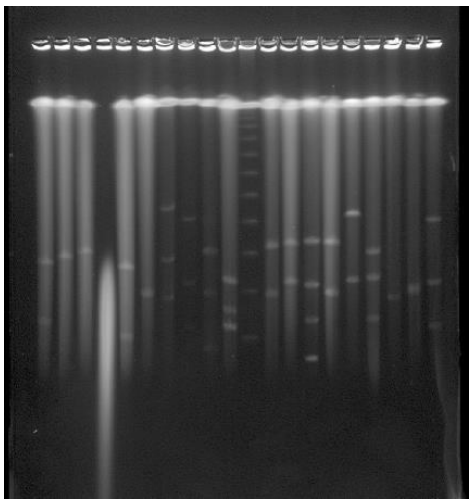
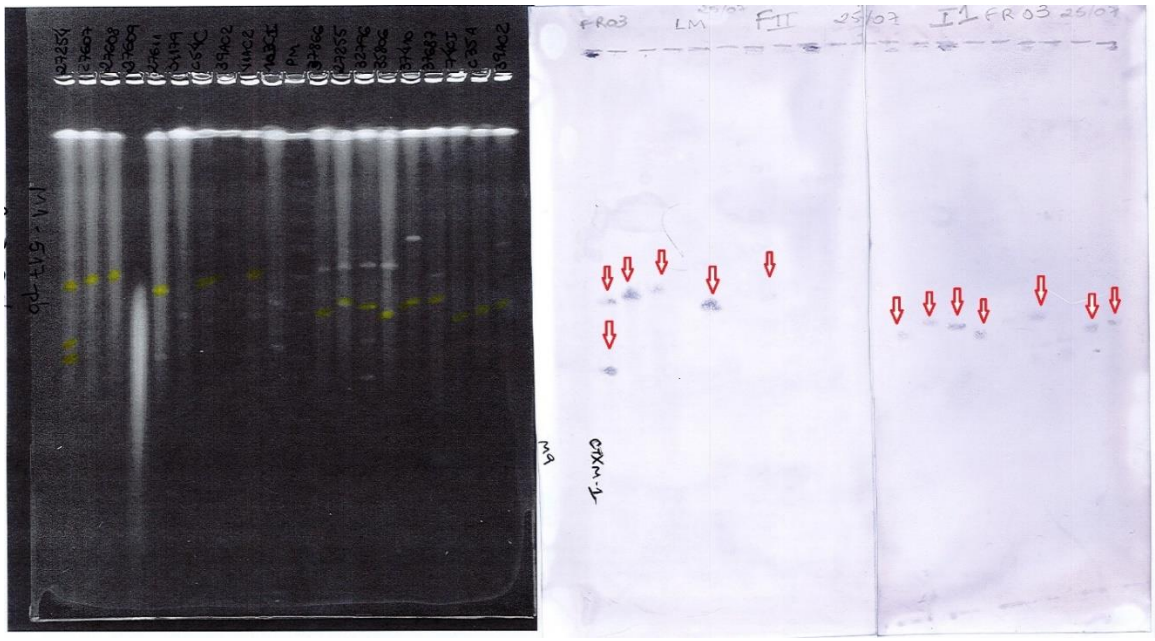


Figura 7a: Foi realizada a digestão da enzima Xba1, que corta porções do genoma bacteriano em genes *housekeeping* e permite observar o perfil clonal de cada organismo. **Figura 7b:** A transferência do material contido no gel foi realizada e submetida a tratamento com sondas específicas para observar a tipagem plasmidial e a localização dos genes de interesse do trabalho.

Figura 8: Esquema de fotos de análise de PFGE + Southern Blot a partir da digestão de plugs por S1 para identificação do plasmídeo carreador do gene ESBL em cepas de origem francesa (Estudo III).

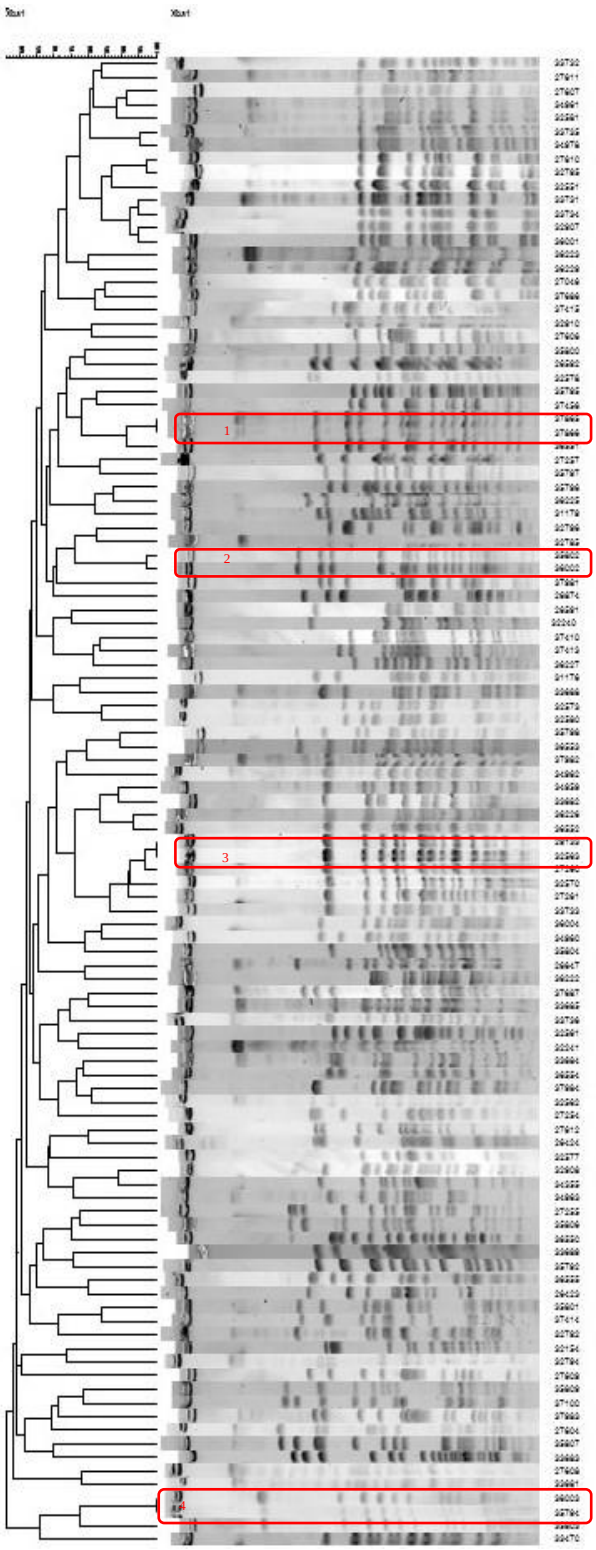
8



Observa-se na foto PFGE revelada (negativo) o perfil plasmidial de cada cepa, identificadas no topo do esquema de figuras. As bandas brancas representam os plasmídeos encontrados em cada cepa, em corrida vertical. A foto da revelação por Southern blot com cepas positivas para o gene $bla_{\text{CTX-M-1}}$ revelam as bandas representativas do plasmídeo tipo IncFII (evidenciado pelas flechas vermelhas). A partir de revelações anteriores por sonda CTX-M-1, a comparação equidade da altura dos genes indicam a portabilidade ESBL por este complexo plasmidial.

Figura 9: Relação clonal das 109 cepas de *E. coli* isoladas de animais franceses com infecção (Estudos III), pela técnica de PFGE.

9



Grupos clonais

Grupo 1:	32563	gato	$bla_{CTX-M15}$
	29133	gato	
Grupo 2:	37865	gato	bla_{CMY}
	37866	gato	
Grupo 3:	36003	cão	$bla_{CTX-M-15}$
	35794	cão	$bla_{CTX-M-9}$
Grupo 4:	35802	gato	$bla_{CTX-M-15}$
	36002	cão	$bla_{CTX-M-1}$

Um total de 4 pequenos grupos clonais foram identificados e quase todos originavam da mesma espécie de animal. Os perfis foram equiparados e o dendograma foi gerado a partir do programa Bionumerics (Ghent, Belgium) e correlação Dice, com tolerância e optimização de 0,5% e 1%, respectivamente.

Figura 10: Relação clonal das 7 cepas de *E. coli* recuperadas de animais do Estudo IV, pela técnica de PFGE

Os perfis foram equiparados e o dendograma foi gerado a partir do programa Bionumerics (Ghent, Belgium) e correlação Dice, com tolerância e optimização de 0,5% e 1%, respectivamente. Nenhuma cepa do estudo apresentou relação clonal.

Tabela 6: Características moleculares e filogenéticas, bem como a localização do gene *bla* de 37 cepas recuperadas de animais de companhia (cães e gatos) com infecção, atendidos em centros veterinários na França e recuperadas pela rede RESAPATH (continua)

Gene bla_{CTX-M} identificado	Número da cepa	Ano de coleta	Animal	Doença	Grupo Filogenético	Grupos de Incompatibilidade plasmidial	Tamanho do gene ESBL	Tamanho dos plasmídeos	Mapeamento do perfil de resistência ESBL
*bla*CTX-M-15	26591	2011	gato	ITU	A	IncF	MA1/MA2: ~160	F:~ 160	*bla*CTX-M-15 / IncF
	27260	2011	cão	NI	A	IncF	MA1/MA2: ~125	F: ~ 125	*bla*CTX-M-15 / IncF
	27261	2011	gato	NI	A	IncF	MA1/MA2: ~145	F: ~ 145	*bla*CTX-M-15 / IncF
	27612	2011	cão	NI	B1	IncI1	MA1/MA2: ~95	I1 ~ 95	*bla*CTX-M-15 / IncI1
	29133	2011	gato	ITU	A	IncF	MA1/MA2: ~145	F: ~ 145	*bla*CTX-M-15 / IncF
	32563	2012	gato	ITU	A	IncF	MA1/MA2: ~145	F: ~ 145	*bla*CTX-M-15 / IncF
	32570	2012	gato	NI	A	IncF	MA1/MA2: ~145	F: ~ 145	*bla*CTX-M-15 / IncF
	32577	2012	cão	abcesso	B1	IncI1 -IncF	MA1/MA2: ~265	F: ~265	*bla*CTX-M-15 / IncF
	33733	2013	gato	ITU	A	IncF	MA1/MA2: ~145	F: ~ 145	*bla*CTX-M-15 / IncF
	33736	2013	cão	abcesso	A	IncFIB -IncFIA - IncFII	MA1/MA2: ~145	F: ~145	*bla*CTX-M-15 / IncF
	34959	2013	cão	ITU	A	IncF	MA1/MA2: ~105	NT	NT
	36004	2014	cão	NI	B1	IncF	MA1/MA2: ~145	F: ~ 145	*bla*CTX-M-15 / IncF
	36552	2014	cão	ITU	A	IncF	MA1/MA2: ~105	F:~ 105	*bla*CTX-M-15 / IncF
	37983	2013	cão	ITU	A	IncF	MA1/MA2: ~90	F: ~ 90	*bla*CTX-M-15 / IncF
*bla*CTX-M-1	26424	2011	cão	pulmão	B1	IncI1 - IncF	M1: ~125	FII: ~125	*bla*CTX-M-1 / IncF
	27255	2011	cão	swab nasal	D	IncI1 - IncF	M1: ~ 125	F:~ 180 / I1: ~125	*bla*CTX-M-1 / IncI1
	32154	2012	gato	fezes	B1	IncI1	M1: ~125	I1 ~ 125	*bla*CTX-M-1 / IncI1
	32796	2012	cão	NI	D	IncI1 - IncF	M1: ~125	F:~ 180 / I1: ~105	*bla*CTX-M-1 / IncI1

NI: não identificado, Np: não informado, **UTI:** infecção no trato urinário

Tabela 6 - Continuação: Características moleculares e filogenéticas, bem como a localização do gene *bla* de 37 cepas recuperadas de animais de companhia (cães e gatos) com infecção, atendidos em centros veterinários na França e recuperadas pela rede RESAPATH

Gene *bla*$_{CTX-M}$ identificado	Número da cepa	Ano de coleta	Animal	Doença	Grupo Filogenético	Grupos de Incompatibilidade plasmidial	Tamanho do gene ESBL	Tamanho dos plasmídeos	Mapeamento do perfil de resistência ESBL
*bla*CTX-M-1	32908	2012	cão	ITU	D	I1	M1: ~ 135	I1 ~ 125	*bla*CTX-M-1 / IncI1
	35800	2013	cão	NI	D	IncI1 –IncFII - IncFIB - IncFIA	M1: ~ 135	F ~200 - I1 ~ 135	*bla*CTX-M-1 / IncI1
	35806	2013	gato	NI	D	IncI1 – F	M1: ~ 125	F:~ 150 / I1: ~100	*bla*CTX-M-1 / IncI1
	36550	2014	cão	swab vaginal	B1	IncI1 – F	M1: ~ 100	I1 ~ 100	*bla*CTX-M-1 / IncI1
*bla*CTX-M-3	32792	2012	cão	Urina	D	IncF	MA1/MA2: ~100	F ~ 75	*bla*CTX-M-3 / IncF
*bla*CTX-M-55	26592	2011	cão	NI	A	IncI1 – IncFIB -IncFII	MA1/MA2: ~150	F: 150 I1: 150	*bla*CTX-M-55 / IncI1
	35801	2013	cão	Respiratório	D	IncI1 - IncF	MA1/MA2: ~100	F: 150 I1: 100	*bla*CTX-M-55 / IncI1
*bla*CTX-M-14	32562	2012	cão	NI	A	IncF	M9: ~ 150	FII - 75 / 125	*bla*CTX-M-14 / IncF
	34960	2013	cão	secreção (pus)	D	IncF	M9: ~ 175	F: 175	*bla*CTX-M-14 / IncF
*bla*CTX-M-9	32578	2012	gato	ITU	B1	IncFIB, FIA	M9: ~ 145	IncFIB/FIA	*bla*CTX-M-9 / IncFIB/FIA
	34961	2013	cão	Otite	D	IncF	MA1/MA2: ~ 120	F: ~175	*bla*CTX-M-9 / IncF
	35797	2013	cão	Pele	D	IncF	M9: ~ 175	F: 175 / I1 ~ 100	*bla*CTX-M-9 / IncF
	35798	2013	cão	Bucal	D	IncFII	M9: ~75	F: 75	*bla*CTX-M-9 / IncF
*bla*CMY-2	33683	2012	cão	ITU	D	IncI1	CMY: ~ 100	NT	NT
	35809	2013	cão	Digestivo	D	IncI1 - IncF	CMY: ~ 100	I1: ~ 100	*bla*CMY-2 / IncI1
	37100	2014	cão	NI	D	IncI1 - IncF	CMY: ~ 100	I1: ~ 100	*bla*CMY-2 / IncI1
	37413	2014	cão	Fígado	A	IncI1 - IncF	CMY: ~ 100	I1: ~ 100	*bla*CMY-2 / IncI1
	37865	2014	gato	ITU	B1	IncI1 - IncF	CMY: ~ 100	NT	NT
	37866	2014	gato	ITU	B1	IncI1 - IncF	CMY: ~ 100	I1: ~ 100	*bla*CMY-2 / IncI1

NI: não identificado, Np: não informado, **UTI:** infecção no trato urinário

Tabela 7: Grupo de 14 Cepas virulentas tipo O:25 - ST131 produtoras de enzimas CTX-M, provenientes de cães e gatos da França

Número da cepa	Ano de coleta	Origem	Animal	Doença	enzima CTX-M	Grupo Filogenético	Grupos de Incompatibilidade plasmidial	Perfil clonal	Grupo Incportaor de ESBL
27046	2011	urina	cão	ITU	CTX-M-15	B2	F	NCR	IncFII/FIB
27610	2011	pele	cão	pele	CTX-M-15	B2	F	1	IncF
32795	2012	urina	cão	ITU	CTX-M-15	B2	F	1	IncF
32551	2012	urina	cão	ITU	CTX-M-15	B2	F	NCR	FII/FIB
32907	2012	urina	cão	ITU	CTX-M-15	B2	ND	NCR	ND
33732	2013	urina	gato	ITU	CTX-M-15	B2	ND	NCR	ND
33734	2013	urina	cão	ITU	CTX-M-15	B2	ND	NCR	ND
33735	2013	ouvido	cão	otite	CTX-M-15	B2	F	NCR	ND
32561	2012	retal	cão	infecção intestinal	CTX-M-1	B2	I1, FIB, FII	NCR	Inc I1
37686	2014	urina	cão	ITU	CTX-M-1	B2	F	NCR	ND
27607	2011	ND	cão	NI	CTX-M-14	B2	F	NCR	IncF
27608	2011	Urina	gato	ITU	CTX-M-14	B2	F	NCR	IncF
27611	2011	Ouvido	cão	otite	CTX-M-14	B2	F	NCR	IncF
33681	2012	Urina	cão	ITU	CTX-M-27	B2	F	NCR	IncF

ND: Não determinado.

5.2.2 Estudo IV: Isolados de animais de companhia saudáveis (École Veterinaire Maison Alfort)

Dos 227 swabs retais coletados de cães e 166 coletados de gatos sem infecções, 7 cepas de *E. coli* foram recuperadas (*n* = 2%). Os resultados evidenciaram três cepas pertencentes aos ST973, ST141 e ST68, todos provenientes de gatos, portando os genes $bla_{\text{CTX-M-1}}$, $bla_{\text{CTX-M-15}}$ e $bla_{\text{CTX-M-14}}$ pelos grupos de incompatibilidade plasmidial tipos IncFIB, IncI1 e IncFII, respectivamente (Tabela 8). A cepa positiva para o gene $bla_{\text{CTX-M-1}}$ (40236) era oriunda de uma gata de aproximadamente 13 meses saudável, porém, anteriormente acometida por uma infecção respiratória, tratada por antimicrobiano (desconhecido). Sua proprietária não possuía histórico de viagens nos últimos 12 meses antecessores à coleta. Já a cepa positiva para $bla_{\text{CTX-M-15}}$ (41285) era oriunda de um cão macho da raça Staffordshire bull terrier, de aproximadamente 4 anos, que não possuía histórico de infecções nem internações nos últimos 12 meses. Seu proprietário não havia tido nenhuma doença infecciosa e, consequentemente,

não havia sido submetido a nenhum tratamento com antimicrobiano no mesmo período. Também não havia histórico de viagens para o exterior.

A cepa portadora do gene *bla*$_{\text{CTX-M-14}}$ (40232) foi recuperada de uma gata sem raça definida, de aproximadamente 8 meses, saudável e sem nenhum histórico de doenças infecciosas ou internações durante sua vida. Seu proprietário também não possuía histórico de internações ou viagens nos 12 meses antecessores à coleta.

Duas outras cepas de origem canina foram identificadas como portadoras dos genes *bla*$_{\text{CMY-2}}$ (39594 - ST55 e 41286 - ST963). A cepa 39594 foi recuperada de uma cadela da raça Bull Terrier adulta (aproximadamente 5 anos) que não possuía histórico de internação, porém, possuía histórico de otite e infecções respiratórias tratados sem uso de antimicrobianos. A segunda cepa (41286) era proveniente de uma cadela Staffordshire Bull Terrier de aproximadamente 8 anos, saudável, sem histórico de infecções ou internações nos últimos 12 meses antecessores à coleta.

Surpreendentemente, uma cepa positiva para o gene*bla*$_{\text{OXA-48}}$ (ST372) foi identificada. Este gene apresentou-se como pertencente a um plasmídeo do tipo IncL, com um tamanho de ~ 60 kb, porém, previamente caracterizado e identificado em outro estudo, a partir da localização do transposon Tn1999.2 e PCR mapping. Esta cepa (denominada 39597) foi recuperada de um cão da raça pastor alemão com histórico de hospitalização de 3 - 8 dias durante os 12 meses anteriores à coleta, devido à uma infecção abdominal. Na ocasião, o animal havia sido tratado com amoxicilina + ácido clavulânico. Seu dono havia sido hospitalizado na França por um curto período de tempo, porém, não havia nenhum histórico de viagem para fora da Europa.

A última cepa produtora de ESBL do estudo (39590) apresentou dificuldade em ser caracterizada pelas técnicas de PCR, PFGE e Southern Blot devido à grande diversidade de genes ESBL, os quais, hipoteticamente, a mesma poderia portar. Testes foram realizados com os genes *bla*$_{\text{VIM}}$, *bla*$_{\text{IMP}}$, *bla*$_{\text{CMY}}$, *bla*$_{\text{SHV}}$, *bla*$_{\text{TEM}}$, até finalmente ser submetida ao NGS e, a partir da montagem dos contigs e análise dos dados gerados, ser identificada como portadora do gene *bla*$_{\text{TEM-52b}}$. A cepa em questão foi recuperada de uma gata saudável, de aproximadamente 7 meses, sem histórico de infecções ou internações desde sua aquisição pela proprietária, que também não apresentava histórico de internação e nem possuía outros animais em sua residência.

Tabela 8: Estudo de casos e caracterização de cepas provenientes de coletas em cães e gatos saudáveis na École Veterinaire Maison Alfort (França), em 2015

Cepa	Animal	Infecção nos últimos 12 meses	Internação	Tratamento	ST	Fenótipo	*bla* gene encontrado	Plasmídeo carreador do gene *bla*	Plasmídeo (kbp)	Resistências Associadas
39590	Gato	não	Não	não	219	ESBL	$bla_{TEM-52b}$	ND	ND[3]	AMN, FQN, FEN, SULFAS, e TRP
39594	Cão	não	Não	não	55	pAmpC	bla_{CMY-2}	NT[2]	ND[3]	NAL
40232	Gato	não	Não	não	68	ESBL	$bla_{CTX-M-14}$	IncF	150	nenhuma
40236	Gato	Sim, infecção respiratória	Sim, 3-8 dias	Sim (TD[4])	973	ESBL	$bla_{CTX-M-1}$	IncFIB	210	STR, TRP
41285	Cão	não	Não	não	141	ESBL	$bla_{CTX-M-15}$	IncI1	200	GEN
41286	Cão	não	Não	não	963	pAmpC	bla_{CMY-2}	NT[2]	ND[3]	nenhuma
39597	Cão	Sim, infecção intestinal	Sim, >3 dias	AMX + CLAV	372	Erta R	bla_{OXA-48}	IncL	60	nenhum

[1]Erta NonS: não suscetível ao ertapenem. [2]NT: não tipável .[3]ND: não determinado. TD[4]: Tratamendo desconhecido. GEN: Gentamicina. TRP: Trimetropim. NAL: Ácido Nalidíxico. AMN: aminoglicosídeos. FQN: fluoroquinolonas. FEN: fenicóis. SULFAS: sulfametazol.

6 DISCUSSÃO

O desenvolvimento dos quatro estudos apresentados resultou numa caracterização dos mapas de prevalência de cepas produtoras de ESBL em animais de companhia (cães e gatos), tanto no Brasil quanto na França. Nos estudos brasileiros com animais saudáveis (Estudo I) e doentes (Estudo 2) foi realizada uma investigação sobre a prevalência e o contexto genético de disseminação dos genes codificadores de ESBL/pAmpC presentes em cães e gatos em situação de rua (Estudo I) e abrigados em casas particulares (Estudo II) em São Paulo. A maior parte dos estudos realizados em animais no Brasil até agora se concentraram no aspecto alimentar, como em frangos e carne de frango (CASELLA et al., 2015). Nenhum estudo em larga escala com foco em epidemiologia molecular dos genes codificadores de ESBL/pAmpC em animais de companhia fora realizado até então. O presente trabalho referente aos dois estudos brasileiros incluiu 187 animais de estimação (cães e gatos) saudáveis e portando algum tipo de doença infecciosa. Destaca-se aqui que a prevalência de Enterobacteriaceae produtoras de ESBL/pAmpC foi maior em cães saudáveis (31,0%; n = 26/84). Uma prevalência mais limitada pôde ser observada em gatos sadios (6,9%; n = 2/29), bem como em animais com infecções do trato urinário (8,3% em gatos e 11,3% em cães). Em alguns estudos na Europa e nos Estados Unidos, as proporções de ESBL/pAmpC variaram de acordo com o país e a amostragem, mas permaneceram abaixo de 5% em gatos e cães (SHAHEEN et al., 2011; DIERIKX et al., 2012; HUBER et al., 2013; BOGAERTS et al., 2015; MAEYAMA et al., 2018).

As avaliações em diferentes contextos evidenciam uma inviabilidade de comparação, devido aos múltiplos vieses de amostragem e isolamento em cada tipo de pesquisa. Neste trabalho, swabs orais e retais foram coletados de cães e gatos, enquanto a maioria dos estudos relatam apenas swabs retais (GANDOLFI-DECRISTOPHORIS et al., 2013; BELAS et al., 2014; YOUSFI et al., 2018). Ainda não é conhecido nenhum outro trabalho no qual swabs orais foram coletados para avaliar a presença de cepas multirresistentes nas vias orais de animais. Dessa forma foi possível obter uma proporção maior de resistência em comparação com quaisquer outros estudos. Sabe-se que a via oral em geral não é a principal fonte ou reservatório de cepas produtoras de ESBL, porém acredita-se que swabs orais podem ser recomendados para ter uma amostragem mais abrangente.

O resultado de 10 cepas resistentes em amostras de saliva de 9 cachorros e 1 gato pode representar um fator de risco para a transmissão para humanos, considerando também a

transmissão humano-animal. As cepas do Brasil mostraram nos testes fenotípicos de difusão de disco a resistência também a antimicrobianos que não são administrados na medicina veterinária, apenas na clínica humana. Estes dados, associados à prescrição deliberada de antimicrobianos na medicina humana e veterinária, além da disposição irregular destes componentes no ambiente (FONTES et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2017) podem ser considerados como uma perspectiva muito alarmante da propagação de cepas bacterianas multirresistentes.

Neste primeiro estudo (I) referente a animais saudáveis de centros de recuperação de animais de rua (particular e público), o objetivo inicial foi identificar o aspecto de disseminação da resistência num prospecto amplo para que, possivelmente, um perfil de disseminação ambiental pudesse ser elucidado, uma vez que a maioria desses animais, dos quais foram recuperadas as cepas produtoras de ESBL, eram provenientes de situação de rua. O Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) recuperou os animais das ruas por razões sanitárias, num controle de possíveis zoonoses ou risco à sociedade (quando o animal sofria algum acidente ou representava risco aos cidadãos, mordendo ou atacando de alguma forma). Em determinados casos, os animais eram abandonados na porta do CCZ para serem recuperados. No abrigo particular, os animais também eram abandonados ou entregues em mãos aos proprietários da casa, que os acolhiam com comidas ou medicamentos, quando necessário. Dessa forma, como informações a respeito dos ambientes aos quais esses animais se alimentavam, dormiam ou depositavam seus dejetos anteriormente ao acolhimento eram desconhecidas, pouco se pode afirmar a respeito da origem das cepas resistentes das quais eles eram portadores assintomáticos.

No entanto, apesar da origem ser identificada como incerta, a circulação da resistência no mesmo ambiente é bem elucidada a partir de um mesmo clone ESBL/CTX-M-15 em 4 animais diferentes do mesmo centro (CCZ). O teste clonal realizado pela técnica de PFGE com enzima Xba1 mostrou 100% de clonalidade entre as 5 cepas de *E. cloacae* identificadas, originadas de swab oral e retal (fezes e saliva) de cães abrigados em diferentes baias do Centro de Controle de Zoonoses em São Paulo. Pôde-se observar que há uma circulação da mesma cepa resistente no ambiente, uma vez que os animais não compartilhavam o mesmo local onde eram alocados. Este tipo de propagação foi confirmado não apenas entre animais, mas também em amostras de fezes e saliva originadas do mesmo animal, exemplificando duas transmissões de veículos diferentes (fezes - saliva). Assim como no presente trabalho, a presença de plasmídeo do grupo de incompatibilidade IncHI2, ST1, em *E. cloacae* já foi identificada em cepas de origem clínica na Espanha (COELHO et al., 2012). Na medicina veterinária cepas

carregando tais plasmídeos já foram relatadas entre animais de companhia com doenças infecciosas e pode-se observar o crescimento da disseminação nos dias atuais (WEESE, 2008). Os presentes resultados devem ser considerados como uma possível evidência de disseminação clonal dessa cepa específica de *E. cloacae* portadora do gene $bla_{\text{CTX-M-15}}$, presente no plasmídeo de grupo de incompatibilidade tipo HI2/ST1 entre cães do Centro de Controle de Zoonoses em São Paulo.

Ainda em relação às análises de perfil de clonalidade, a proximidade clonal entre cepas com mesmo perfil de resistência de animais alocados próximos e/ou em mesmas baias foi observada e era esperada. No entanto, alguns padrões interessantes foram identificados, como, por exemplo, entre as cepas 44941 e 44928 (CMY-2), que possuíam perfis idênticos, porém foram coletadas em épocas diferentes (julho e novembro, respectivamente). As cepas 44926 e 44951 (CTX-M-9), também coletadas de cães em épocas diferentes, apresentaram o mesmo perfil. Já as cepas 44920 e 44921 foram identificadas como clonalmente relacionadas e, curiosamente, foram coletadas em diferentes dias (2012), locais (centro de acolhimento particular e CCZ) e de diferentes animais (swab retal de gato e cão, respectivamente). Mesmo considerando a rotina de limpeza diária e regular dos centros de acolhimento e os cuidados prestados por todos os trabalhadores, associados aos hábitos naturais de higiene e sociedade dos cães e seus diversos contextos, a transmissão cruzada e a circulação livre de genes de resistência entre diferentes tipos de espécies bacterianas no ambiente que esses animais são condicionados foi observada como um padrão importante de disseminação.

Neste mesmo estudo (I), referente às cepas provenientes de animais de companhia saudáveis no Brasil, identificou-se um perfil de cepas $bla_{\text{CMY-2}}$/IncI1. Este padrão molecular de resistência já foi observado em cepas de *E. coli* produtoras da enzima CMY-2, cujo gene é portado por um plasmídeo tipo Inc1/ST2 em animais de companhia na Itália. (GARCIA-FERNANDEZ et al., 2008).

A presença de numerosas cepas multirresistentes em animais de estimação é motivo de preocupação e, mais particularmente, na população animal saudável resgatada das ruas que, sem dúvida, tinha acesso muito limitado, se algum, aos tratamentos antimicrobianos. Isso indica uma disseminação significativa e silenciosa dos determinantes de ESBL/pAmpC na população geral de cães e gatos abandonados nas ruas de São Paulo, Brasil. Esses animais que viviam nas ruas devem ser considerados um importante vetor de disseminação de bactérias multirresistentes.

Essa alta prevalência de produtores de ESBL/pAmpC observada em cães de rua, em grande escala, e em menor escala em gatos, provavelmente resulta da inclusão em um ambiente

específico como o Centro Público de Controle de Zoonoses (para cães) e abrigo privado (para gatos), em São Paulo, no estudo em questão. Apesar de poucos isolados ESBL/pAmpC serem filogeneticamente relacionados, a disseminação de alguns clones específicos entre diferentes animais foi observada. Pode-se citar, por exemplo, não só os cinco isolados de *E. cloacae* recuperados de cães abrigados neste centro, mas também os isolados de *E. coli* do ST90, ST973 ou ST457 que compartilham um perfil PFGE idêntico. Mesmo que esses cães não compartilhassem a mesma gaiola, isso provavelmente demonstra a circulação da mesma cepa resistente entre animais dentro do centro, uma vez que os cães não foram atribuídos a uma gaiola específica. Isso também indica que os procedimentos diários de limpeza observados no abrigo não foram suficientes para mitigar o risco de transmissão de cepas produtoras de ESBL/pAmpC entre animais.

O provável fator de transmissão para humanos por contato próximo pode ser sugerido nao só dentro do centro de acolhimento e controle de zoonoses, mas também posteriormente no caso de adoção (o CCZ promove feiras de adoção regularmente). Os resultados apresentados também destacam uma diversidade de origens desses genes codificadores de ESBL/pAmpC, sugerindo múltiplas origens de contaminação. Como já mencionado anteriormente, animais ESBL/pAmpC positivos neste estudo já haviam vivido na rua ou talvez em domicílios, lugares dos quais foram reuperados. Dessa forma, é natural refletir sobre a possível contaminação desses animais por alimentos, incluindo alimentos crus (BAEDE et al., 2015), através de outros animais ou do próprio ser humano. Entre os clones mais predominantes, apesar de todos terem sido previamente relatados em animais, apenas o ST2541 também foi descrito em cães errantes (TAMANG et al., 2013). A prevalência significativa de $bla_{\text{CTX-M-2}}$ e $bla_{\text{CTX-M-8}}$ descrita em animais de estimação nesta pesquisa é claramente uma reminiscência da epidemiologia de enzimas do tipo CTX-M na América Latina, em humanos e no ambiente (BARTOLONI et al., 2013; DROPA et al., 2016). No entanto, uma das descobertas mais notáveis é a predominância de algumas combinações de genes ESBL/pAmpC e plasmídeos, como o plasmídeo do tipo IncI1/ST12, carreando o gene $bla_{\text{CMY-2}}$, encontrado em diferentes cepas de *E. coli* provenientes de diferentes cães do mesmo abrigo. Similarmente, o plasmídeo do tipo IncI1/ST113, carreando o gene $bla_{\text{CTX-M-8}}$, foi identificado em diferentes cepas de *E. coli* de diferentes cães e também em outra espécie bacteriana (*K. pneumoniae*) coletada em um hospital veterinário distante e não relacionado. É interessante destacar que o plasmídeo do tipo IncI1/ST113, carreando o gene $bla_{\text{CTX-M-8}}$, foi identificado em diferentes espécies de Enterobacteriaceae na Alemanha, incluindo *Salmonella enterica*, *E. coli* e *Enterobacter aerogenes*, sugerindo tanto uma capacidade particular de transferência entre Enterobacteriaceae quanto uma possível origem na

América Latina (ELLER et al., 2014). No Brasil, os plasmídeos do tipo IncI1/ST113 foram associados à transferência do gene *bla*$_{CTX-M-8}$ em linhagens de *Salmonella* spp. e *E. coli*, ambas isoladas de carne e aves (FERREIRA et al., 2014b; MOURA et al., 2018c). Igualmente, os plasmídeos do tipo IncI1/ST12 vêm sendo reportados e associados à disseminação de genes *bla*$_{CMY-2}$ entre membros da família Enterobacteriaceae de diferentes fontes e contextos clínicos (HANSEN et al., 2016; LIAKOPOULOS; MEVIUS; CECCARELLI, 2016; CASTELLANOS et al., 2017). Os plasmídeos dos tipos IncI1/ST113 e IncI1/ST12 são então indicados como os prováveis principais vetores de disseminação dos genes do tipo *bla*$_{CTX-M}$ e *bla*$_{CMY}$ entre as enterobactérias na cadeia de produção de alimentos e também nos animais de companhia. Todos esses dados destacam um alarmante papel dos plasmídeos na disseminação dos genes ESBL/pAmpC, e a prevalência de certas combinações de genes ESBL/pAmpC/plasmídeo, dependendo da epidemiologia de cada região estudada. De fato, outras combinações gene/plasmídeo ESBL/pAmpC são prevalentes em animais em outros continentes, como a combinação *bla*$_{CTX-M-1}$/IncI1/ST3 na Europa e países vizinhos (GRAMI et al., 2013; MADEC et al., 2015).

Os genes *bla*$_{CTX-M-15}$ e *bla*$_{CTX-M-2}$ também foram encontrados com localização cromossomal, menos comum que a localização plasmidial. Uma localização cromossômica foi, no entanto, relatada em isolados clínicos humanos da Alemanha, Holanda e Reino Unido (RODRÍGUEZ et al., 2014), bem como em aves selvagens da Mongólia (GUENTHER et al., 2017) e em isolados de *Proteus mirabilis* provenientes de humanos no Japão (HARADA et al., 2012), em alguns casos apresentou-se em associação com o clone ST38. A integração cromossomal do gene *bla*$_{CTX-M-2}$ também foi detectada em frangos de corte saudáveis no estado de São Paulo, mesma região de origem das cepas do estudo I (FERREIRA et al., 2014b).

Os estudos III e IV da França foram concentrados em duas coleções: a primeira era um grupo de isolados coletados de animais infectados, atendidos em clínicas veterinárias e hospitais, e a segunda de animais saudáveis que passaram por atendimento de rotina (check up, vacinas, etc) no cento veterinário da Escola de Veterinária de Maisons-Alfort, próximo de Paris. Os dois estudos tiveram como objetivo contribuir com o mapa epidemiológico sobre a resistência do tipo ESBL entre animais de companhia (cães e gatos) com a análise final do perfil clonal e o mapa genético do ambiente. As comparações dos perfis clonais entre cepas dos dois países até o momento foram positivas, pois mesmo que não tenham apresentado relação próxima observável, foram importantes para verificar a disseminação desta resistência ESBL em clones bacterianos. Na Europa, a presença de cepas produtoras de ESBL em cães e gatos saudáveis tem sido relatada em larga escala e tornou-se um considerável fator

epidemiológico, especialmente da medicina veterinária e na administração de alguns antimicrobianos também aplicados em medicina humana, como no caso de cefalosporina (SHIBATA et al., 2006).

Ainda em relação às cepas de origem francesa, observou-se uma prevalência do grupo genético *bla*$_{\text{CTX-M-1}}$, com as variantes *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$, *bla*$_{\text{CTX-M-3}}$, *bla*$_{\text{CTX-M-55}}$ e *bla*$_{\text{CTX-M-32,}}$ no entanto, as três ultimas não foram observadas nas cepas brasileiras. Por outro lado, a variante *bla*$_{\text{CTX-M-2}}$ foi observada em 10 cepas originadas do Brasil, enquanto esteve ausente no grupo de cepas francesas. As variantes *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ e *bla*$_{\text{CTX-M-9}}$ foram observadas em ambos os grupos, o que mostra que apesar de algumas características diferentes no perfil de resistência, elas são semelhantes em termos de presença e seguem o perfil epidemiológico já registrado em cada região.

O perfil das cepas portadoras de *bla*$_{\text{CTX-M-1}}$ carreado pelo plasmídeo Inc1/ST3-CC3 é um padrão comumente observado em vários reservatórios na França e foi apresentado recentemente em animais de companhia na Tunísia, bem como o perfil de cepa *bla*$_{\text{CMY-2}}$/IncI1/ST12 observado no grupo de cepas brasileiras (BEN SALLEM et al., 2014; SIDJABAT et al., 2014). Na ocasião, o estudo citado observou a prevalência deste perfil bacteriano de resistência em *E. coli* proveniente de humanos, animas de companhia e de produção alimentar. Estes resultados podem elucidar uma possível circulação das cepas portando *bla*$_{\text{CTX-M-1}}$/Inc1/ST3-CC3 e *bla*$_{\text{CMY-2}}$/IncI1/ST12 de maneira intercontinental – França-Tunísia e Brasil-Tunísia, respectivamente.

Apesar da quantidade prevalente de cepas ESBL/IncI1, plasmídeos pertencentes ao grupo IncF (IncFII, IncFIA, IncFIB) puderam ser identificados como os principais carreadores dos genes *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$, *bla*$_{\text{CTX-M-14}}$ e *bla*$_{\text{CTX-M-9}}$. Esse complexo plasmidial carregando os genes codificadores de enzimas do tipo CTX-M já foi relatado em animais de companhia na França em 2013, onde isolados de *E. coli* produtores de enzimas ESBL foram identificados em 3,7% do total de cepas avaliadas. Desse valor, 14% portavam o gene *bla*$_{\text{CTX-M}}$ em plasmídeos IncFII e, numa caracterização aprofundada, foi identificado o gene *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ predominantemente localizado em plasmídeos F31:A4:B1, F36:A4:B1 ou F36:A1:B20 (DAHMEN et al., 2013). Esses perfis plasmidiais já foram amplamente reportados, concluindo a rápida disseminação desse perfil entre humanos e animais.

A análise de distribuição filogenética a partir da classificação montada e atualizada por Clermont (CLERMONT et al., 2013) foi importante para identificar um perfil de virulência associado à codificação de enzimas responsáveis pela degradação de β-lactâmicos. Um total

de 33,9% de cepas positivas para o grupo B2 de maior virulência foi associado de forma bem equilibrada entre cepas positivas para todas as variantes de *bla*$_{CTX}$ encontradas no Estudo III (animais saudáveis – França), tal qual o grupo D, segundo de maior virulência no perfil de classificação de Clermont, que teve um percentual de 24,8% de prevalência em diversas variantes de produtoras de ESBL. O grupo filogenético A destacou-se como o mais prevalente entre cepas produtoras da enzima CTX-M-15 num percentual de 22%. Os isolados do grupo B2 foram submetidos ao sequenciamento WGS e identificados como pertencentes ao sorotipo O:25-ST131, maior grupo endêmico de virulência do mundo. Este tipo de virulência já foi elucidada num trabalho realizado em 2012 na França (Paris) (BRISSE et al., 2012) onde cepas produtoras da enzima CTX-M-15 foram fortemente associadas com o grupo B2. Apesar de representar um grupo heterogêneo, as cepas mais prevalentes no grupo B2 O:25-ST131 do Estudo II também são as portadoras dos genes *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}15}$. Essa comparação de dois resultados de trabalhos provenientes da França evidenciam uma alarmante circulação de cepas virulentas apresentando um padrão comum de resistência às cefalosporinas.

Apesar de análises de *Sequence Typing* não terem sido realizadas no Estudo III referente aos animais franceses doentes, a análise de perfil clonal realizada por RFLP e digestão da enzima Xba1 apresentaram uma grande diversidade de indivíduos com perfis heterogêneos, tanto no Estudo III quanto no IV. Dessa forma, é adequado argumentar que os genes codificadores de ESBL estão presentes e amplamente disseminados entre cepas de *E. coli* de animais de companhia na França, caracterizando a habilidade de transferência e disseminação entre espécies e indivíduos pertencentes à família das Entetobacteriaceae.

O Estudo IV teve como objetivo elucidar o perfil molecular de resistência relacionado a estudos de casos onde os animais e os proprietários foram investigados em relação ao perfil de disseminação sob aspectos de região de alcance (por possíveis viagens) ou hospitalar (por possíveis internações - humano e animal). Um estudo realizado na Alemanha (MEYER et al., 2012) teve como objetivo observar a prevalência de cepas produtoras de ESBL prevalentes em um grupo de pessoas avaliadas em relação a locais de viagens realizadas e convivência com animais de companhia. Na ocasião, a pesquisa evidenciou 75% de prevalência de ESBL em pessoas que possuíam estes animais e apesar dos resultados positivos entre pessoas que viajaram para a Grécia e a África, os dados não apresentaram associação da disseminação de cepas resistentes por migração/imigração, tal qual o Estudo IV, uma vez que, neste, os animais portadores de ESBL pertenciam a donos sem hábitos de viajar constantemente (ou nos últimos 12 meses) para fora da Europa. A pesquisa de Meyer foi o primeiro estudo a defender que o

contato com animais de companhia pode aumentar exponencialmente a probabilidade do ser humano ser colonizado com cepas de *E. coli* produtoras de ESBL.

Em relação aos *Sequence typing*, o ST55 foi reportado apenas em animais selvagens nos Estados Unidos. Já o ST68 foi identificado apenas em humanos na França, mas em outros países como Estados Unidos, Alemanha, Reino Unido e Nepal ele foi observado em animais de companhia, animais selvagens, animais criados para consumo (pecuária) e na clínica humana. O ST973, identificado em *E. coli*, foi também encontrado em animais de companhia na Dinamarca e nos EUA, no entanto a disseminação apresentou-se mais abrangente, pois foi também encontrado entre humanos, outros tipos de animais que não de companhia e no ambiente, na Turquia e Austrália (dados obtidos de http://enterobase.warwick.ac.uk). Por fim, a cepa de *E. coli* pertencente ao ST141 (41285), carregando o gene $bla_{\text{CTX-M-15}}$ em um plasmídeo do tipo IncI1, identificada em um cão do Estudo IV, apresentou um perfil comumente observado em animais de companhia, pois o ST já foi observado e relatado em animais de companhia na Europa (dados obtidos de http://enterobase.warwick.ac.uk).

A princípio, a análise de resistência aos carbapenêmicos não era o objetivo dos estudos (Brasil e França) e a portabilidade de gene produtor desse tipo de resistência não era esperado. No entanto, análises anteriores do perfil fenotípico realizadas na Escola de Veterinária de Maisons-Alfort indicavam a possibilidade da presença desse tipo de gene no Estudo IV. Por este motivo foram realizados testes genotípicos e rapidamente a cepa portadora do gene $bla_{\text{OXA-48}}$ foi identificada. Este foi o primeiro relato de uma enterobactéria produtora de enzima carbapenemase (CPE) em um animal na França. Esta descoberta acrescenta dados importantes ao número muito limitado de estudos que relatam CPE em animais no mundo todo. Em particular, as Enterobacteriaceae produtoras de OXA-48 em animais só foram relatadas até agora em quatro países: em aves no Líbano e em cães na Argélia, na Alemanha e nos EUA (STOLLE et al., 2013; SCHMIEDEL et al., 2014b; AL BAYSSARI et al., 2015; LIU; THUNGRAT; BOOTHE, 2016; YOUSFI et al., 2018). A maioria destes relatos são sobre animais de estimação como portadores assintomáticos, o que pode indicar transferência de humano para animal através de contato próximo. Na França, a enzima OXA-48 é endêmica apenas em humanos até o momento (ROBERT et al., 2014). Em relação ao mapa epidemiológico, o Estudo IV confirma uma baixa prevalência de cepas produtoras de ESBL em cães e gatos (< 2%), considerando todos 227 cães e 116 gatos submetidos à coleta da Escola Veterinária. Por outro lado, a variedade de enzimas e STs neste estudo foi proporcionalmente mais elevada em relação aos outros Estudos, e a presença de $bla_{\text{OXA-48}}$

entre as cepas é alarmante, uma vez que a proporção de *E. coli* produtora de carbapenemases na França é bem baixa - 0,01% em 2012 (MELO et al., 2016).

Ainda com os amplos resultados obtidos nos dois países, fica complicado comparar os dois perfis sem considerar os fatores epidemiológicos divergentes entre os dois grupos. Os animais submetidos à coleta na França, apesar de estarem em sua maioria acometidos por algum tipo de infecção, são provenientes de donos e casas particulares, onde geralmente ocorre mais cuidado com o ambiente e alimentação do que os animais saudáveis submetidos à coleta no Brasil. Apesar da considerável diversidade de genes de resistência encontrados nesses últimos, não foi observada, por exemplo, a presença do gene $bla_{\text{OXA-48}}$ como no cão da raça pastor alemão na França. Esses dados deveriam ser mais investigados, uma vez que os genes da carbapenemase também estão associados a um alto potencial de disseminação e sua prevalência em fontes não-humanas pode ser potencialmente subestimada, mesmo em países ou continentes onde a resistência a carbapenemases não é altamente prevalente em seres humanos (VAN DUIN et al., 2013).

Os ensaios de transformação bacteriana inconclusivos podem ser atribuídos a problemas técnicos relacionados ao eletroporador e, por inconsistência de resultados, foram descontinuados. Porém, a impossibilidade de transformação das cepas inconclusivas nos resultados de PFGE-S1/Southern blot foram cruciais para o direcionamento do estudo à hipótese de localização cromossomal, que resultou na confirmação desse perfil em três dos quatro estudos analisados (I e II - Brasil e III – França). A hipótese de integração do gene de resistência originalmente plasmidial no cromossomo já foi mencionada (MARQUES, 2012). Segundo descrito, a recombinação homóloga pode ocorrer em algumas simples regiões com similaridade de sequências, permitindo uma possível integração do plasmídeo em regiões específicas do cromossomo. Os transposons plasmidiais independem da presença de sequências homólogas, utilizando o processo normal de transposição para a integração do plasmídeo ou fragmentos do mesmo. Outra hipótese de integração cromossomal foi descrita a partir de estudos de genoma completo de cepas de *K. pneumoniae* portando os genes bla_{KPC} e $bla_{\text{CTX-M}}$ integrados no cromossomo, concomitantemente (HUANG et al. em 2017). Nesta pesquisa, análises comparativas de genoma identificaram várias cópias do mesmo gene codificador de ESBL ligado às sequências de inserção ISEcp1 e do gene codificador do sistema CRISPR-cas (sistema de resposta imunológica em procariotos que confere resistência a qualquer gene/elemento gênico não reconhecido e potencialmente perigoso para a célula). A hipótese é de que a presença deste mecanismo pode sugerir a indução de degradação dos plasmídeos na bactéria, de forma que porções dos genes plasmidiais ou genes inteiros +

sequências de inserção específicas, associadas à uma possível pressão seletiva do meio (com a presença de antimicrobianos) possam induzir uma integração desses elementos genéticos no cromossomo, perpetuando-se na espécie pela replicação celular como um instinto natural de evolução e adaptação. Como já mencionado, as cepas portadoras de genes codificadores de ESBL que expressam enzimas do tipo CTX-M estão se tornando cada vez mais comuns nos ambientes, em humanos, nos animais e nos alimentos. Uma hipótese epidemiológica a ser levantada que coincide com as hipóteses publicadas seria a inserção desses genes no cromossomo por evolução natural a partir da grande diversidade de genes do tipo $bla_{\text{CTX-M}}$ associada com a presença dos antimicrobianos no meio ambiente de um modo geral. A presença dos antimicrobianos podem exercer uma pressão seletiva contínua nesses meios, e como um processo de evolução natural as cepas integram a resistência em seu cromossomo como padrão de sobrevivência necessário.

Os resultados totais da pesquisa desenvolvida com todos os quatro estudos mostram uma alta taxa de cepas resistentes a antibióticos β-lactâmicos em cães e gatos de diferentes origens, elucidando um mapa epidemiológico alarmante de resistência bacteriana do tipo ESBL-CTX, tanto na França quanto no Brasil. A prevalência maior de cepas produtoras de ESBL em cães e menor em gatos de cada estudo, apesar de ser observada claramente, não é conclusiva devido à equivalência de cada grupo de espécies animais apresentar-se desigual em todos os estudos observados. Fatores como facilidade de manuseio dos animais para as coletas, número de animais disponíveis para as amostragens em cada centro de acolhimento e data programada e autorização dos próprios centros impediram que os números fossem equiparados. No entanto, a diversidade e a desigualdade de amostras não prejudicaram a leitura final do trabalho, que elucida de maneira geral o mapa de prevalência de cepas ESBL em animais de rua e consequentemente no ambiente.

Muitos relatos de resistência ESBL em animais e no ambiente já foram realizados, mas a relação desse tipo de resistência entre animais de companhia precisa ser melhor explorado. As origens de contaminação oscilam entre diversos nichos como contato humano, ambiente, e até alimentação regrada e cuidadosa. Num estudo realizado em 2014 (SEIFFERT et al., 2014) foi surpreendentemente observada uma alta prevalência de $bla_{\text{CTX-M-15}}$ (53,3%), $bla_{\text{CMY-4}}$ (20%) e $bla_{\text{VEB-4-like}}$ (6,7%), inclusive a presença de $bla_{\text{OXA-48}}$ (13,3%) como elememtos genéticos livres (fragmentos de DNA – sem presença de isolados bacterianos vivos) em 30 pacotes de ração úmida para cães e gatos na Suíça. Esses dados absurdamente alarmantes direcionam a perspectiva da origem de contaminação animal também de forma molecular,

pois estes fragmentos de DNA podem ser integrados pelas bactérias comensais existentes no intestino destes animais e se tornarem parte do genoma bacteriano de maneira transitória (plasmidial) ou permanente (cromossomal), dando origem assim ao ciclo de disseminação animal-humano-ambiente. Em contrapartida, Madec e colaboradores realizaram um estudo onde observaram relações comuns de genes, plasmídeos ou clones bacterianos entre isolados de humanos e animais. Em conclusão, identificaram que todos os estudos reunidos e publicados até o momento (sobre transmissão entre espécies), investigaram populações de animais e humanos que não estavam necessariamente em contato direto, e as que estiveram, não resultaram em resultados conclusivos para identificar a transmissão cruzada entre as espécies. Ou seja, até agora informações limitadas sustentam as teorias sobre as vias de transmissão de cepas/genes de resistência aos diversos antimicrobianos existentes na clínica humana e veterinária (MADEC et al., 2017a).

As considerações sobre as alternativas de tratamento em pequenos animais (cães e gatos) frente ao crescimento da resistência microbiana permanecem inconclusivas. O uso de carbapenêmicos em animais de companhia ainda é restrito em alguns países, mas seu uso começou a ser exponencialmente aplicado e consequentemente, cepas produtoras de enzimas resistentes a eles começaram a surgir nessa população, como observado no estudo IV. Ainda assim, apesar da grande resistência aos β-lactâmicos ser evidenciada, estes ainda são os mais adequados e utilizados para o tratamento de infecções em cães e gatos (SHIMIZU et al., 2017). O uso dos antimicrobianos, de um modo geral, deve seguir um acompanhamento mais rígido na medicina veterinária, para que seja aplicado com muita cautela e evitar que o aumento exponencial de cepas resistentes não alcance níveis ainda mais insustentáveis do que já observado atualmente, como, por exemplo, o recente surgimento da resistência à colistina, conhecida até então como última alternativa a infecções ocasionadas por cepas multirresistentes (FERNANDES et al., 2016).

Por fim, acredita-se que realizar o mapa de prevalência em animais de companhia é um trabalho imprescindível para incentivar maiores estudos e orientações na clínica tanto veterinária quanto humana, principalmente entre os programas de controle epidemiológico existentes no mundo inteiro.

7 CONCLUSÕES

- Existe uma alta prevalência de perfil fenotípico de resistência ESBL e MDR entre animais de companhia na cidade de São Paulo;

- Cães e gatos são considerados veículos de transmissão para cepas produtoras de ESBL tanto no Brasil quanto na França;

- O Estudo I observou a circulação de grande diversidade de cepas produtoras de variantes enzimáticas do tipo CTX-M de localização plasmidial e cromossômica provenientes de amostras de swab oral e retal de cães e gatos acolhidos no Centro de Controle de Zoonoses de São Paulo e em abrigos particulares;

- A prevalência de resistência plasmidial foi maior que a cromossômica nos estudos I, II, e III dos dois países;

- O estudo IV confirmou uma baixa prevalência de ESBL entre cães saudáveis na França (< 2%); no entanto, foi identificada pela primeira vez uma cepa de *E. coli* produtora de $bla_{\text{OXA-48}}$ em animais de companhia na França;

- Houve maior prevalência de plasmídeos do tipo Inc1 portadores do gene pAmpC $bla_{\text{CMY-2}}$ nos dois países de estudo, enquanto o grupo IncF apresentou maior diversidade de portabilidade de variantes de $bla_{\text{CTX-M}}$;

- Plasmídeos IncI1/ST3-foram identificados como recorrentes na França;

- Houve grande diversidade clonal entre as cepas de origem brasileira;

- Este estudo caracterizou um mapa da prevalência de cepas ESBL produtoras da enzima CTX-M em animais de companhia no Brasil e na França.

8 REFERÊNCIAS

ABRAHAM, E.P AND CHAIN, E. An Enzyme from Bacteria Able to Destroy Penicillin. **Oxford Journals**, v. 10, n. 4, p. 677–678, 1988.

AIZAWA, J. et al. Identification of fluoroquinolone-resistant extended-spectrum β-lactamase (CTX-M-8)-producing *Escherichia coli* ST224, ST2179 and ST2308 in buffalo (Bubalus bubalis). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 10, p. 2866–2869, 2014a.

AL BAYSSARI, C.; OLAITAN, A. O.; DABBOUSSI, F.; HAMZE, M.; ROLAIN, J.-M. Emergence of OXA-48-producing *Escherichia coli* clone ST38 in fowl. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 1, p. 745–6, jan. 2015.

ALCALÁ, L.; ALONSO, C. A.; SIMÓN, C.; GONZÁLEZ-ESTEBAN, C.; ORÓS, J.; REZUSTA, A.; ORTEGA, C.; TORRES, C. Wild Birds , Frequent Carriers of Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL) Producing *Escherichia coli* of CTX-M and SHV-12 Types. **Microbial Ecology**, 2015.

ANASTAY, M.; LAGIER, E.; BLANC, V.; CHARDON, H. Épidémiologie des bêtalactamases à spectre étendu (BLSE) chez les entérobactéries dans un hôpital du sud de la France, 1999–2007. **Pathologie Biologie**, v. 61, n. 2, p. 38–43, abr. 2013.

ANDRADE, L. N.; NOVAIS, Â.; STEGANI, L. M. M.; FERREIRA, J. C.; RODRIGUES, C.; DARINI, A. L. C.; PEIXE, L. Virulence genes, capsular and plasmid types of multidrug-resistant CTX-M(-2, -8, -15) and KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from four major hospitals in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 91, n. 2, p. 164–168, 2018.

ANTACHOPOULOS, C.; IOANNIDOU, M.; TRATSELAS, A.; IOSIFIDIS, E.; KATRAGKOU, A.; KADILTZOGLOU, P.; KOLLIOS, K.; ROILIDES, E. Comparison of cotrimoxazole vs. second-generation cephalosporins for prevention of urinary tract infections in children. **Pediatric Nephrology**, v. 31, n. 12, p. 2271–2276, 2016.

BAEDE, V. O.; WAGENAAR, J. A.; BROENS, E. M.; DUIM, B.; DOHMEN, W.; NIJSSE, R.; TIMMERMAN, A. J.; HORDIJK, J. Longitudinal study of extended-spectrum-β-lactamase- and AmpC-producing Enterobacteriaceae in household dogs. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 6, p. 3117–24, jun. 2015.

BARBATO, L. Detecção e caracterização de bactérias gram-negativas produtoras de β-lactamases de espectro estendido (ESBL) e AmpC plasmidial isoladas de animais de companhia e búfalos no estado de são paulo. 57f. Dissertação (Mestrado).UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2012.

BARTOLONI, A. et. al. Relentless increase of resistance to fluoroquinolones and expanded-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli*: 20 years of surveillance in resource-limited settings from Latin America. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 4, p. 356–361, abr. 2013.

BEN SALLEM, R.; BEN SLAMA, K.; ROJO-BEZARES, B.; PORRES-OSANTE, N.; JOUINI, A.; KLIBI, N.; BOUDABOUS, A.; SÁENZ, Y.; TORRES, C. IncI1 Plasmids Carrying *bla* $_{CTX-M-1}$ or *bla* $_{CMY-2}$ Genes in *Escherichia coli* from Healthy Humans and Animals in Tunisia. **Microbial Drug Resistance**, v. 20, n. 5, p. 495–500, 2014.

BOGAERTS, P.; HUANG, T.-D.; BOUCHAHROUF, W.; BAURAING, C.; BERHIN, C.; EL GARCH, F.; GLUPCZYNSKI, Y. Characterization of ESBL- and AmpC-Producing *Enterobacteriaceae* from Diseased Companion Animals in Europe. **Microbial Drug Resistance**, v. 21, n. 6, p. 643–650, 2015.

BONNET, R. MINIREVIEW Growing Group of Extended-Spectrum β-Lactamases : the CTX-M Enzymes. v. 48, n. 1, p. 1–14, 2004.

BOONYASIRI, A.; TANGKOSKUL, T.; SEENAMA, C.; SAIYARIN, J.; TIENGRIM, S.; THAMLIKITKUL, V. Prevalence of antibiotic resistant bacteria in healthy adults, foods, food animals, and the environment in selected areas in Thailand. **Pathogens and Global Health**, v. 108, n. 5, p. 235–245, 2014.

BOOTHE, D.; SMAHA, T.; CARPENTER, D. M.; SHAHEEN, B.; HATCHCOCK, T. Antimicrobial Resistance and Pharmacodynamics of Canine and Feline Pathogenic *E. coli* in the United States. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 48, n. 6, p. 379–389, 2012.

BRADFORD, P. Extended spectrum betalactamase in the 21 century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistant threat. **Clinical Microbiol Rev**, v. 14, n. 4, p. 933–951, 2001.

BRAGA, I. A.; CAMPOS, P. A.; GONTIJO-FILHO, P. P.; RIBAS, R. M. Multi-hospital point prevalence study of healthcare-associated infections in 28 adult intensive care units in Brazil. **Journal of Hospital Infection**, 2018.

BREWER, N. S.; HELLINGER, W. C. The Monobactams. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 66, n. 11, p. 1152–1157, 1991.

BRISSE, S.; DIANCOURT, L.; LAOUÉNAN, C. et al. Phylogenetic distribution of CTX-M- and non-extended-spectrum-β- lactamase-producing *Escherichia coli* isolates: Group B2 isolates, except clone ST131, rarely produce CTX-M enzymes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 9, p. 2974–2981, 2012.

BROLUND, A.; SANDEGREN, L. Characterization of ESBL disseminating plasmids. **Infectious Diseases**, v. 48, n. 1, p. 18–25, 2016.

BUSH, K.; BRADFORD, P. A. β-Lactams and β-Lactamase Inhibitors: An Overview. **Cold Spring** Bush K, Bradford PA. β-Lactams and β-Lactamase Inhibitors: An Overview. Cold Spring Harb Perspect Med. 2016 Aug 1;6(8). pii: a025247. doi: 10.1101/cshperspect.a025247. Review. PubMed PMID: 27329032; PubMed Central PMCID: PMC4968164.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of β-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969–976, 2010.

BUSH, K, JACOBY GA, MEDEIROS AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob Agents Chemother.** 1995. Jun;39(6):1211-33.

CANTÓN, R.; GONZÁLEZ-ALBA, J. M.; GALÁN, J. C. CTX-M enzymes: Origin and diffusion. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. APR, 2012.

CARATTOLI, A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2227–2238, 2009.

CARATTOLI, A.; BERTINI, A.; VILLA, L.; FALBO, V.; HOPKINS, K. L.; THRELFALL, E. J. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. **Journal of Microbiological Methods**, v. 63, n. 3, p. 219–228, 2005.

CARATTOLI, A.; MIRIAGOU, V.; BERTINI, A.; LOLI, A.; COLINON, C.; VILLA, L.; WHICHARD, J. M.; ROSSOLINI, G. M. Replicon typing of plasmids encoding resistance to newer β-lactams. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 7, p. 1145–1148, 2006.

CARVALHO, A. C.; BARBOSA, A. V.; ARAIS, L. R.; RIBEIRO, P. F.; CARNEIRO, V. C.; CERQUEIRA, A. M. F. Resistance patterns, ESBL genes, and genetic relatedness of *Escherichia coli* from dogs and owners. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 150–158, 2016.

CASELLA, T.; NOGUEIRA, M. C. L.; SARAS, E.; HAENNI, M.; MADEC, J. Y. High prevalence of ESBLs in retail chicken meat despite reduced use of antimicrobials in chicken production, France. **International Journal of Food Microbiology**, v. 257, n. July, p. 271–275, 2017.

CASELLA, T.; RODRÍGUEZ, M. M.; TAKAHASHI, J. T. et al.. Detection of blaCTX-M-type genes in complex class 1 integrons carried by Enterobacteriaceae isolated from retail chicken meat in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 197, p. 88–91, 2015.

CASTELLANOS, L. R.; DONADO-GODOY, P.; LEÓN, M.; CLAVIJO, V.; AREVALO, A.; BERNAL, J. F.; TIMMERMAN, A. J.; MEVIUS, D. J.; WAGENAAR, J. A.; HORDIJK, J. High Heterogeneity of *Escherichia coli* Sequence Types Harbouring ESBL/AmpC Genes on IncI1 Plasmids in the Colombian Poultry Chain. **PloS one**, v. 12, n. 1, p. e0170777, 26 jan. 2017.

CLEMENTE, L. et al. Antimicrobial susceptibility and oxymino-β-lactam resistance mechanisms in *Salmonella*enterica and *Escherichia coli* isolates from different animal sources. **Research in Microbiology**, v. 166, n. 7, p. 574–583, 2015.

CLERMONT, O.; CHRISTENSON, J. K.; DENAMUR, E.; GORDON, D. M. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental**

Microbiology Reports, v. 5, n. 1, p. 58–65, 2013.

CLOECKAERT, A. et al. Dissemination of an extended-spectrum-β-lactamase blaTEM-52 gene-carrying IncI1 plasmid in various *Salmonella*enterica serovars isolated from poultry and humans in Belgium and France between 2001 and 2005. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 5, p. 1872–1875, 2007.

COE, E.; KASS, L. B. Proof of physical exchange of genes on the chromosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 19, p. 6641–6, 10 maio 2005.

COELHO, A.; et al. J. J. Role of IncHI2 plasmids harbouring $bla_{\text{VIM-1}}$, $bla_{\text{CTX-M-9}}$, *aac(6')-Ib* and *qnrA* genes in the spread of multiresistant *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae* strains in different units at Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 39, n. 6, p. 514–517, 2012.

CONCEIÇÃO, T.; BRÍZIO, A.; DUARTE, A.; LITO, L. M.; MELO, J.; SALGADO, M. J. First Description of CTX-M-15-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Portugal First Description of CTX-M-15-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Portugal. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 477–479, 2005.

CONTE, D.; KASUKO, J.; NOGUEIRA, S.; MARENDA, T.; LIMA, R. De; ANDRÉ, M.; PONTAROLO, R.; PESQUISA, I. De; PEQUENO, P.; FPP, P. Characterization of CTX-M enzymes, quinolone resistance determinants, and antimicrobial residues from hospital sewage, wastewater treatment plant, and river water. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 136, n. July 2016, p. 62–69, 2017.

D'ANDREA, M. M.; ARENA, F.; PALLECCHI, L.; ROSSOLINI, G. M. CTX-M-type β-lactamases: A successful story of antibiotic resistance. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6–7, p. 305–317, 2013.

DA SILVA, K. C.; CUNHA, M. P. V.; CERDEIRA, L.; DE OLIVEIRA, M. G. X.; DE OLIVEIRA, M. C. V.; GOMES, C. R.; LINCOPAN, N.; KNÖBL, T.; MORENO, A. M. High-virulence CMY-2- and CTX-M-2-producing avian pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from commercial turkeys. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 87, n. 1, p. 64–67, jan. 2017.

DAHMEN, S.; HAENNI, M.; CHâTRE, P.; MADEC, J. Y. Characterization of blactx-M incfii plasmids and clones of *Escherichia coli* from pets in France. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 12, p. 2797–2801, 2013.

DALLÉ, J.; RAMOS, M. C.; JIMENEZ, M. F.; ESCOBAR, F. G.; ANTONELLO, V. S. Oral desensitization to penicillin for the treatment of pregnant women with syphilis: A successful program. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia**, v. 40, n. 1, p. 43–46, 2018.

DALLENNE, C.; DA COSTA, A.; DECRÉ, D.; FAVIER, C.; ARLET, G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β-lactamases in Enterobacteriaceae. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 3, p. 490–495, 2010.

DAMBORG, P.; MORSING, M. K.; PETERSEN, T.; BORTOLAIA, V.; GUARDABASSI, L. CTX-M-1 and CTX-M-15-producing *Escherichia coli* in dog faeces from public gardens. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.

57, n. 1, p. 83, 2015.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417–433, 2010a.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417–433, 2010b.

DEL CHIERICO, F. et al. L. Liver transplantation and gut microbiota profiling in a child colonized by a multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae*: A new approach to move from antibiotic to "eubiotic" control of microbial resistance. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 5, 2018.

DIERIKX, C. M.. Occurrence and characteristics of extended-spectrum-β-lactamase- and AmpC-producing clinical isolates derived from companion animals and horses. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 6, p. 1368–1374, 2012.

DIWAN, V.; CHANDRAN, S. P.; TAMHANKAR, A. J.; STALSBY LUNDBORG, C.; MACADEN, R. Identification of extended-spectrum β-lactamase and quinolone resistance genes in *Escherichia coli* isolated from hospital wastewater from central India. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 4, p. 857–859, 2012.

DOLEJSKA, M. et al. Dissemination of IncFIIK-type plasmids in multiresistant CTX-M-15-producing Enterobacteriaceae isolates from children in hospital paediatric oncology wards. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, n. 6, p. 510–515, 2012.

DONATI, V.; FELTRIN, F.; HENDRIKSEN, R. S.; SVENDSEN, C. A.; CORDARO, G.; GARCIÁ-FERNÁNDEZ, A.; LORENZETTI, S.; LORENZETTI, R.; BATTISTI, A.; FRANCO, A. Extended-spectrum-beta-lactamases, AmpC beta-lactamases and plasmid mediated quinolone resistance in *Klebsiella* spp. from companion animals in Italy. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e90564, 2014.

DROPA, M.; BALSALOBRE, L. C.; LINCOPAN, N.; MATTÉ, G. R.; MATTÉ, M. H. Complex class 1 integrons harboring CTX-M-2-encoding genes in clinical Enterobacteriaceae from a hospital in Brazil. **Journal of infection in developing countries**, v. 9, n. 8, p. 890–7, 29 ago. 2015.

DROPA, M.; LINCOPAN, N.; BALSALOBRE, L. C.; OLIVEIRA, D. E.; MOURA, R. A.; FERNANDES, M. R.; DA SILVA, Q. M.; MATTÉ, G. R.; SATO, M. I. Z.; MATTÉ, M. H. Genetic background of novel sequence types of CTX-M-8- and CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from public wastewater treatment plants in São Paulo, Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 5, p. 4953–4958, 2016.

DUFFEY, G. H. The Structure of B_4Cl_4. **The Journal of Chemical Physics**, v. 21, n. 4, p. 761–761, 1953.

EALAND, C. S.; MACHOWSKI, E. E.; KANA, B. D. Critical Review b -Lactam Resistance : The Role of Low Molecular Weight Penicillin Binding Proteins , b -Lactamases and LD -Transpeptidases in Bacteria Associated with Respiratory Tract Infections. **IUBMB Life**, v. 00, n. February, p. 1–14, 2018.

ELDAROV, M. A.; MARDANOV, A. V.; BELETSKY, A. V.; DUMINA, M. V.; RAVIN, N. V.; SKRYABIN, K. G. Complete mitochondrial genome of the cephalosporin-producing fungus *Acremonium chrysogenum*. **Mitochondrial DNA**, v. 26, n. 6, p. 943–944, 2015.

ELLER, C.; LEISTNER, R.; GUERRA, B.; FISCHER, J.; WENDT, C.; RABSCH, W.; WERNER, G.; PFEIFER, Y. Emergence of extended-spectrum β-lactamase (ESBL) CTX-M-8 in Germany. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 69, n. 2, p. 562–4, 1 fev. 2014.

FALGENHAUER, L.; SCHMIEDEL, J.; GHOSH, H.; FRITZENWANKER, M.; YAO, Y.; BAUERFEIND, R.; IMIRZALIOGLU, C.; CHAKRABORTY, T. Resistenzplasmide in ESBL-kodierenden *Escherichia coli*- Isolaten aus Proben von Menschen, Hunden und Katzen. **Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift**, v. 127, n. 11–12, p. 458–463, 2014.

FERNANDES, M. R.; et al. Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 17, p. 30214, 28 abr. 2016.

FERNANDES, M. R.; SELLERA, F. P.; MOURA, Q.; SOUZA, T. A.; LINCOPAN, N. Draft genome sequence of a CTX-M-8, CTX-M-55 and FosA3 co-producing *Escherichia coli* ST117/B2 isolated from an asymptomatic carrier. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 12, p. 183–184, 2018.

FERREIRA, J. C.; PENHA FILHO, R. A. C.; ANDRADE, L. N.; BERCHIERI, A.; DARINI, A. L. C. Detection of chromosomal blaCTX-M-2 in diverse *Escherichia coli* isolates from healthy broiler chickens. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 10, p. O623–O626, 2014a.

FERREIRA, J. C.; PENHA FILHO, R. A. C.; ANDRADE, L. N.; BERCHIERI, A.; DARINI, A. L. C. Detection of chromosomal bla(CTX-M-2) in diverse *Escherichia coli* isolates from healthy broiler chickens. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 20, n. 10, p. O623-6, out. 2014b..

FERREIRA, M. L.; ARAÚJO, B. F.; GONÇALVES, I. R.; ROYER, S.; CAMPOS, P. A.; MACHADO, L. G.; BATISTÃO, D. W. F.; BRITO, C. S.; GONTIJO-FILHO, P. P.; RIBAS, R. M. Association of Colistin-Resistant KPC Clonal Strains with Subsequent Infections and Colonization and Biofilm Production. **Microbial Drug Resistance**, v. 00, n. 00, p. mdr.2018.0043, 2018.

FONTES, L. C.; NEVES, P. R.; OLIVEIRA, S.; SILVA, K. C.; HACHICH, E. M.; SATO, M. I. Z.; LINCOPAN, N. Isolation of Pseudomonas aeruginosa Coproducing Metallo-β-Lactamase SPM-1 and 16S rRNA Methylase RmtD1 in an Urban River. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 6, p. 3063–3064, jun. 2011.

FURLAN, J. P. R.; STEHLING, E. G. Detection of β-lactamase encoding genes in feces, soil and water from a Brazilian pig farm. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 190, n. 2, 2018.

GARAU, J.; WILSON, W.; WOOD, M.; CARLET, J. Fourth-generation cephalosporins: A review of in vitro activity, pharmacokinetics, pharmacodynamics and clinical utility. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 3, n.

SUPPL. 1, 1997.

GARCIA-FERNANDEZ, a.; CHIARETTO, G.; BERTINI, a.; VILLA, L.; FORTINI, D.; RICCI, a.; CARATTOLI, a. Multilocus sequence typing of IncI1 plasmids carrying extended-spectrum β-lactamases in *Escherichia coli* and *Salmonella*of human and animal origin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 6, p. 1229–1233, 2008.

GARCÍA-FERNÁNDEZ, A.; CHIARETTO, G.; BERTINI, A.; VILLA, L.; FORTINI, D.; RICCI, A.; CARATTOLI, A. Multilocus sequence typing of IncI1 plasmids carrying extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Salmonella*of human and animal origin. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 61, n. 6, p. 1229–33, jun. 2008.

GIAMARELLOU, H. Fourth Generation Cephalosporins in the Antimicrobial Chemotherapy of Surgical Infections. **Journal of Chemotherapy**, v. 11, n. 6, p. 486–493, 18 dez. 1999.

GONULLU, N.; AKTAS, Z.; KAYACAN, C. B.; SALCIOGLU, M.; CARATTOLI, A.; YONG, D. E.; WALSH, T. R. Dissemination of CTX-M-15 β-Lactamase Genes Carried on Inc FI and FII Plasmids among Clinical Isolates of *Escherichia coli* in a University Hospital in Istanbul, Turkey. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 1110–1112, 1 mar. 2008.

GRAMI, R.; MANSOUR, W.; DAHMEN, S.; MEHRI, W.; HAENNI, M.; AOUNI, M.; MADEC, J.-Y. The $bla_{\text{CTX-M-1}}$ IncI1/ST3 plasmid is dominant in chickens and pets in Tunisia. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 12, p. 2950–2952, 2013.

GREENWOOD, D. Detection of antibiotic resistance in vitro. **International journal of antimicrobial agents**, v. 14, n. 4, p. 303–6, 2000.

GUENTHER, S.; SEMMLER, T.; STUBBE, A.; STUBBE, M.; WIELER, L. H.; SCHAUFLER, K. Chromosomally encoded ESBL genes in *Escherichia coli* of ST38 from Mongolian wild birds. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 72, n. 5, p. 1310–1313, 1 maio 2017.

HAENNI, M.; SARAS, E.; METAYER, V.; MEDAILLE, C.; MADEC, J.-Y. High Prevalence of $bla_{\text{CTX-M-1}}$/IncI1/ST3 and $bla_{\text{CMY-2}}$/IncI1/ST2 Plasmids in Healthy Urban Dogs in France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 9, p. 5358–5362, 2014.

HAENNI, M.; SARAS, E.; PONSIN, C.; DAHMEN, S.; PETITJEAN, M.; HOCQUET, D.; MADEC, J. Y. High prevalence of international ESBL CTX-M-15-producing *Enterobacter cloacae* ST114 clone in animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 6, p. 1497–1500, 2016.

HAMMERUM, A. M.; LARSEN, J.; ANDERSEN, V. D.; LESTER, C. H.; SKOVGAARD SKYTTE, T. S.; HANSEN, F.; OLSEN, S. S.; MORDHORST, H.; SKOV, R. L.; AARESTRUP, F. M.; AGERSØ, Y. Characterization of extended-spectrum β-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* obtained from Danish pigs, pig farmers and their families from farms with high or no consumption of third- or fourth-generation

cephalosporins. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 10, p. 2650–2657, 1 out. 2014.

HANSEN, K. H.; BORTOLAIA, V.; NIELSEN, C. A.; NIELSEN, J. B.; SCHONNING, K.; AGERSO, Y.; GUARDABASSI, L. Host-Specific Patterns of Genetic Diversity among IncI1-Igamma and IncK Plasmids Encoding CMY-2 beta-Lactamase in *Escherichia coli* Isolates from Humans, Poultry Meat, Poultry, and Dogs in Denmark. **Applied and environmental microbiology**, v. 82, n. 15, p. 4705–4714, 2016.

HARADA, S.; ISHII, Y.; SAGA, T.; KOUYAMA, Y.; TATEDA, K.; YAMAGUCHI, K. Chromosomal Integration and Location on IncT Plasmids of the $bla_{\text{CTX-M-2}}$ Gene in Proteus mirabilis Clinical Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 2, p. 1093–1096, 2012.

HORDIJK, J.; SCHOORMANS, A.; KWAKERNAAK, M.; DUIM, B.; BROENS, E.; DIERIKX, C.; MEVIUS, D.; WAGENAAR, J. A. High prevalence of fecal carriage of extended-spectrum β-lactamase/AmpC-producing Enterobacteriaceae in cats and dogs. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. AUG, p. 1–5, 2013.

HUANG, W.; WANG, G.; SEBRA, R.; ZHUGE, J.; YIN, C.; AGUERO-ROSENFELD, M. E.; SCHUETZ, A. N.; DIMITROVA, N.; FALLON, J. T. Emergence and Evolution of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* with both bla_{KPC} and $bla_{\text{CTX-M}}$ Integrated in the Chromosome. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 7, p. e00076-17, 2017.

HUBER, H.; ZWEIFEL, C.; WITTENBRINK, M. M.; STEPHAN, R. ESBL-producing uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Switzerland. **Veterinary Microbiology**, v. 162, n. 2–4, p. 992–996, 2013.

JAIN, R.; RIVERA, M. C.; LAKE, J. A. Horizontal gene transfer among genomes: the complexity hypothesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 7, p. 3801–6, 30 mar. 1999.

JAMBOROVA, I.; DOLEJSKA, M.; VOJTECH, J.; GUENTHER, S.; URICARIU, R.; DROZDOWSKA, J.; PAPOUSEK, I.; PASEKOVA, K.; MEISSNER, W.; HORDOWSKI, J.; CIZEK, A.; LITERAK, I. Plasmid-mediated resistance to cephalosporins and fluoroquinolones in various *Escherichia coli* sequence types isolated from rooks wintering in Europe. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 2, p. 648–657, 15 jan. 2015.

JEANNOT, K.; FOURNIER, D.; CHOLLEY, P. Clonal Dissemination of Pseudomonas aeruginosa Isolates Producing. v. 51, n. 2, p. 673–675, 2013.

JOHNSTON, C.; MARTIN, B.; FICHANT, G.; POLARD, P.; CLAVERYS, J.-P. Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 181–196, 10 mar. 2014.

KAREN BUSH, TIMOTHY PALZKILL, G. J. **ß-Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes**. Disponível em: <

https://www.lahey.org/studies/> .

KPODA, D. S.; AJAYI, A.; SOMDA, M.; TRAORE, O.; GUESSENND, N.; OUATTARA, A. S.; SANGARE, L.; TRAORE, A. S.; DOSSO, M. Distribution of resistance genes encoding ESBLs in Enterobacteriaceae isolated from biological samples in health centers in Ouagadougou, Burkina Faso. **BMC Research Notes**, v. 11, n. 1, p. 471, 13 dez. 2018.

KRAHN, T.; WIBBERG, D.; MAUS, I.; WINKLER, A.; BONTRON, S.; SCZYRBA, A.; NORDMANN, P.; PÜHLER, A.; POIREL, L.; SCHLÜTER, A. Intraspecies transfer of the chromosomal *Acinetobacter baumannii* $bla_{\text{NDM-1}}$carbapenemase gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 5, p. 3032–3040, 2016.

LALAK, A.; WASYL, D.; ZAJĄC, M.; SKARŻYŃSKA, M.; HOSZOWSKI, A.; SAMCIK, I.; WOŹNIAKOWSKI, G.; SZULOWSKI, K. Mechanisms of cephalosporin resistance in indicator *Escherichia coli* isolated from food animals. **Veterinary Microbiology**, v. 194, n. 2015, p. 69–73, 2016.

LEIGUE, L.; WARTH, J. F. G.; MELO, L. C.; SILVA, K. C.; MOURA, R. A.; BARBATO, L.; SILVA, L. C.; SANTOS, A. C. M.; SILVA, R. M.; LINCOPAN, N. MDR ST2179-CTX-M-15 *Escherichia coli* co-producing RmtD and AAC(6')-Ib-cr in a horse with extraintestinal infection, Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 4, p. 1263–1265, 2014.

LI, J.; JI, X.; DENG, X.; ZHOU, Y.; NI, X.; LIU, X. Detection of the SHV genotype polymorphism of the extended-spectrum β-lactamase-producing Gram-negative bacterium. **Biomedical Reports**, v. 3, n. 2, p. 261–265, 2015.

LI, X.; WANG, Y.; BROWN, C. J.; YAO, F.; JIANG, Y.; TOP, E. M.; LI, H. Diversification of broad host range plasmids correlates with the presence of antibiotic resistance genes. n. June 2015, p. 1–12, 2016.

LIAKOPOULOS, A.; MEVIUS, D.; CECCARELLI, D. A Review of SHV Extended-Spectrum β -Lactamases : Neglected Yet Ubiquitous. v. 7, n. September, 2016.

LITERAK, I.; DOLEJSKA, M.; RADIMERSKY, T.; KLIMES, J.; FRIEDMAN, M.; AARESTRUP, F. M.; HASMAN, H.; CIZEK, A. Antimicrobial-resistant faecal *Escherichia coli* in wild mammals in central Europe: Multiresistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in wild boars. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 5, p. 1702–1711, 2010.

LIU, G.; QIAN, H.; TANG, B.; CHEN, Y.; KANG, H.; JIANG, F.; MA, P.; GU, B.; HUO, X. Prevalence and characterization of third generation cephalosporin resistant *Shigella flexneri* isolates from Jiangsu of China, 2013-2015. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, 22 ago. 2018.

LIU, J.; LI, G. M.; LIN, L. Y.; WU, X. L.; HUANG, S. L.; ZHOU, Y.; ZHAO, Z. G. Association of antibiotic resistance with SHV-12 extended-spectrum beta-lactamase in *Enterobacter cloacae*. **Exp Ther Med**, v. 11, n. 1, p. 269–276, 2016.

LIU, X.; THUNGRAT, K.; BOOTHE, D. M. Occurrence of OXA-48 Carbapenemase and Other β-Lactamase

Genes in ESBL-Producing Multidrug Resistant *Escherichia coli* from Dogs and Cats in the United States, 2009-2013. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1057, 2016.

LUPO, A.; SARAS, E.; MADEC, J. Y.; HAENNI, M. Emergence of blaCTX-M-55associated with fosA, rmtB and mcr gene variants in *Escherichia coli* from various animal species in France. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 4, p. 867–872, 2018.

MADEC, J. Y.; HAENNI, M.; MÉTAYER, V.; SARAS, E.; NICOLAS-CHANOINE, M. H. High prevalence of the animal-associated $bla_{\text{CTX-M-1}}$ IncI1/ST3 plasmid in human *Escherichia coli* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 9, p. 5860–5861, 2015.

MADEC, J. Y.; HAENNI, M.; NORDMANN, P.; POIREL, L. Extended-spectrum β-lactamase/AmpC- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in animals: a threat for humans? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 23, n. 11, p. 826–833, 2017a.

MADEC, J. Y.; HAENNI, M.; NORDMANN, P.; POIREL, L. Extended-spectrum β-lactamase/AmpC- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in animals: a threat for humans? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 23, n. 11, p. 826–833, 2017b.

MADEC, J. Y.; HAENNI, M.; PONSIN, C.; KIEFFER, N.; RION, E.; GASSILLOUD, B. Sequence type 48 *Escherichia coli* carrying the $bla_{\text{CTX-M-1}}$ / IncI1/ST3 plasmid in drinking water in France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 10, p. 6430–6432, 2016.

MAEYAMA, Y.; TANIGUCHI, Y.; HAYASHI, W.; OHSAKI, Y.; OSAKA, S.; KOIDE, S.; TAMAI, K.; NAGANO, Y.; ARAKAWA, Y.; NAGANO, N. Prevalence of ESBL/AmpC genes and specific clones among the third-generation cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae from canine and feline clinical specimens in Japan. **Veterinary Microbiology**, v. 216, n. 2010, p. 183–189, 2018.

MARAVIĆ, A.; SKOČIBUŠIĆ, M.; CVJETAN, S.; ŠAMANIĆ, I.; FREDOTOVIĆ, Ž.; PUIZINA, J. Prevalence and diversity of extended-spectrum-β-lactamase-producing Enterobacteriaceae from marine beach waters. **Marine Pollution Bulletin**, v. 90, n. 1–2, p. 60–67, 2015.

MARQUES, C.; BELAS, A.; FRANCO, A.; ABOIM, C.; GAMA, L. T.; POMBA, C. Increase in antimicrobial resistance and emergence of major international high-risk clonal lineages in dogs and cats with urinary tract infection: 16 year retrospective study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. January, p. 1–8, 2017.

MARQUES, V. M. **Biologia Molecular e Genética Bacteriana**. 1. ed. Ribeirão Preto: Editora Cubo, 2012.

MARTINEZ, J. L. General principles of antibiotic resistance in bacteria. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 11, n. 1, p. 33–39, 2014a.

MATSUMOTO, Y.; IKEDA, F.; KAMIMURA, T.; YOKOTA, Y.; MINE, Y. Novel plasmid-mediated β-lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 32, n. 8, p. 1243–1246, 1988.

MCCONEGHY, K. W.; BLEASDALE, S. C.; RODVOLD, K. A. The empirical combination of vancomycin and a β-lactam for staphylococcal bacteremia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 57, n. 12, p. 1760–1765, 2013.

MEDEIROS, A. A. Cooperative evolution of mechanisms of β-lactam resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 6, n. S3, p. 27–33, 2000.

MELO, L. C. Microbiota Comensal De Animais De Companhia Como Reservatório De Genes Codificadores De B -Lactamases De Espectro Estendido (ESBL) E Resistência a Quinolonas Mediada Por Plasmídeos (PMQR). Dissertação (Mestrado). UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2014.

MELO, L. C.; BOISSON, M. N. G.; SARAS, E.; MÉDAILLE, C.; BOULOUIS, H.-J.; MADEC, J.-Y.; HAENNI, M. OXA-48-producing ST372 *Escherichia coli* in a French dog. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. dkw531, 2016.

MELO, L. C.; ORESCO, C.; LEIGUE, L.; NETTO, H. M.; MELVILLE, P. A.; BENITES, N. R.; SARAS, E.; HAENNI, M.; LINCOPAN, N.; MADEC, J. Y. Prevalence and molecular features of ESBL/pAmpC-producing Enterobacteriaceae in healthy and diseased companion animals in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 221, n. January, p. 59–66, 2018.

MEYER, E.; GASTMEIER, P.; KOLA, a.; SCHWAB, F. Pet animals and foreign travel are risk factors for colonisation with extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli*. **Infection**, v. 40, n. 6, p. 685–687, 2012.

MILLER, E. L. The penicillins: A review and update. **Journal of Midwifery and Women's Health**, v. 47, n. 6, p. 426–434, 2002.

MIYOSHI-AKIYAMA, T.; HAYAKAWA, K.; OHMAGARI, N.; SHIMOJIMA, M.; KIRIKAE, T. Multilocus Sequence Typing (MLST) for Characterization of *Enterobacter cloacae*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. 1–10, 2013.

MORATA, L.; MENSA, J.; SORIANO, A. New antibiotics against gram-positives: Present and future indications. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 24, p. 45–51, 2015.

MOURA, Q.; FERNANDES, M. R.; SILVA, K. C.; MONTE, D. F.; ESPOSITO, F.; DROPA, M.; NORONHA, C.; MORENO, A. M.; LANDGRAF, M.; NEGRÃO, F. J.; LINCOPAN, N. Virulent nontyphoidal *Salmonella*producing CTX-M and CMY-2 β-lactamases from livestock, food and human infection, Brazil. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 281–286, 2018a.

MOURA, Q.; FERNANDES, M. R.; SILVA, K. C.; MONTE, D. F.; ESPOSITO, F.; DROPA, M.; NORONHA, C.; MORENO, A. M.; LANDGRAF, M.; NEGRÃO, F. J.; LINCOPAN, N. Virulent nontyphoidal *Salmonella* producing CTX-M and CMY-2 β-lactamases from livestock, food and human infection, Brazil. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 281–286, 2018b.

MOURA, Q.; FERNANDES, M. R.; SILVA, K. C.; MONTE, D. F.; ESPOSITO, F.; DROPA, M.; NORONHA, C.; MORENO, A. M.; LANDGRAF, M.; NEGRÃO, F. J.; LINCOPAN, N. Virulent nontyphoidal

*Salmonella*producing CTX-M and CMY-2 β-lactamases from livestock, food and human infection, Brazil. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 281–286, 1 jan. 2018c.

NASCIMENTO, T.; CANTAMESSA, R.; MELO, L.; FERNANDES, M. R.; FRAGA, E.; DROPA, M.; SATO, M. I. Z.; CERDEIRA, L.; LINCOPAN, N. International high-risk clones of *Klebsiella pneumoniae* KPC-2/CC258 and *Escherichia coli* CTX-M-15/CC10 in urban lake waters. **Science of The Total Environment**, v. 598, p. 910–915, 15 nov. 2017.

NEU, H. C. The crisis in Antibiotic resistance BT - Science. v. 257, p. 1064–1073, 1992.

NIERO, G.; BORTOLAIA, V.; VANNI, M.; INTORRE, L.; GUARDABASSI, L.; PICCIRILLO, A. High diversity of genes and plasmids encoding resistance to third-generation cephalosporins and quinolones in clinical *Escherichia coli* from commercial poultry flocks in Italy. **Veterinary Microbiology**, v. 216, p. 93–98, mar. 2018.

NOVICK, R. P.; HOPPENSTEADT, F. C. On plasmid incompatibility. **Plasmid**, v. 1, n. 4, p. 421–434, 1978.

PAIVA, M. C.; NASCIMENTO, A. M. A.; CAMARGO, I. L. B. C.; LIMA-BITTENCOURT, C. I.; NARDI, R. M. D. The first report of the *qnrB19*, *qnrS1* and *aac(6')-Ib-cr* genes in urinary isolates of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 5, p. 687–689, 2012.

PALLARES, C. J.; CATAÑO, J. C. Impacto del uso racional de antimicrobianos en una clínica de tercer nivel en Colombia. **Revista chilena de infectología**, v. 34, n. 3, p. 205–211, 2017.

PAPP-WALLACE, K. M.; ENDIMIANI, A.; TARACILA, M. A.; BONOMO, R. A. Carbapenems: Past, present, and future. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 4943–4960, 2011.

PELTOLA, H. et al. Clindamycin vs. first-generation cephalosporins for acute osteoarticular infections of childhood-a prospective quasi-randomized controlled trial. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 6, p. 582–589, 2012.

PENADÉS, J. R.; CHEN, J.; QUILES-PUCHALT, N.; CARPENA, N.; NOVICK, R. P. Bacteriophage-mediated spread of bacterial virulence genes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 23, p. 171–178, fev. 2015.

PEREZ-JORGE, C.; GOMEZ-BARRENA, E.; HORCAJADA, J.-P.; PUIG-VERDIE, L.; ESTEBAN, J. Drug treatments for prosthetic joint infections in the era of multidrug resistance. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 17, n. 9, p. 1233–1246, 2016.

PETROSILLO, N.; VRANIĆ-LADAVAC, M.; FEUDI, C.; VILLA, L.; FORTINI, D.; BARIŠIĆ, N.; BEDENIĆ, B.; LADAVAC, R.; D'AREZZO, S.; ANDRAŠEVIĆ, A. T.; CAPONE, A. Spread of *Enterobacter cloacae* carrying $bla_{\text{NDM-1}}$, $bla_{\text{CTX-M-15}}$, $bla_{\text{SHV-12}}$ and plasmid-mediated quinolone resistance genes in a surgical intensive care unit in Croatia. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 4, p. 44–48, 2016.

PITART, C.; MARCO, F.; KEATING, T. A.; NICHOLS, W. W.; VILA, J. Activity of Ceftazidime-Avibactam against Fluoroquinolone-Resistant Enterobacteriaceae and Pseudomonas aeruginosa. **Antimicrobial Agents and**

Chemotherapy, v. 59, n. 6, p. 3059–3065, jun. 2015.

PLEISS, J. **The LACtamase Engeneering Database**. Disponível em: <http://www.laced.uni-stuttgart.de/>.

ROBERT, J.; PANTEL, A.; MÉRENS, A.. et al.. Incidence rates of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae clinical isolates in France: a prospective nationwide study in 2011-12. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 69, n. 10, p. 2706–12, 1 out. 2014.

ROCHA, F. R.; PINTO, V. P. T.; BARBOSA, F. C. B. The Spread of CTX-M-Type Extended-Spectrum β-Lactamases in Brazil: A Systematic Review. **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 4, p. 301–311, jun. 2016.

RODRÍGUEZ, I.; THOMAS, K.; VAN ESSEN, A.; SCHINK, A.-K.; DAY, M.; CHATTAWAY, M.; WU, G.; MEVIUS, D.; HELMUTH, R.; GUERRA, B.; SAFEFOODERA-ESBL CONSORTIUM. Chromosomal location of blaCTX-M genes in clinical isolates of *Escherichia coli* from Germany, The Netherlands and the UK. **International journal of antimicrobial agents**, v. 43, n. 6, p. 553–7, jun. 2014.

ROLINSON GN. Evolution of beta-lactamase inhibitors. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 13, n. 9, p. 727–32, 1991.

ROWE-MAGNUS, D. A.; MAZEL, D. The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 292, n. 2, p. 115–125, jan. 2002.

RZEWUSKA, M.; STEFA??SKA, I.; KIZERWETTER-??WIDA, M.; CHROBAK-CHMIEL, D.; SZCZYGIELSKA, P.; LENIAK, M.; BINEK, M. Characterization of extended-spectrum-β-lactamases produced by *Escherichia coli* strains isolated from dogs in Poland. **Polish Journal of Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 285–288, 2015a.

RZEWUSKA, M.; STEFANSKA, I.; KIZERWETTER-SWIDA, M.; CHROBAK-CMIEL, D.; SZCZYGIELSKA, P.; LESNIAK, M.; BINEK, M. Characterization of Extended-Spectrum-beta-Lactamases Produced by *Escherichia coli* Strains Isolated from Dogs in Poland. **Polish journal of microbiology / Polskie Towarzystwo Mikrobiologow = The Polish Society of Microbiologists**, v. 64, n. 3, p. 285–288, 2015b.

SCHLÜTER, A.; NORDMANN, P.; BONNIN, R. A.; MILLEMANN, Y.; EIKMEYER, F. G.; WIBBERG, D.; PÜHLER, A.; POIREL, L. IncH-type plasmid harboring $bla_{\text{CTX-M-15}}$, $bla_{\text{DHA-1}}$, and *qnrB4* genes recovered from animal isolates. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 7, p. 3768–73, jul. 2014..

SCHMIEDEL, J.; FALGENHAUER, L.; DOMANN, E.; BAUERFEIND, R.; PRENGER-BERNINGHOFF, E.; IMIRZALIOGLU, C.; CHAKRABORTY, T. Multiresistant extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae from humans, companion animals and horses in central Hesse, Germany. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 1–13, 2014a.

SCHMIEDEL, J.; FALGENHAUER, L.; DOMANN, E.; BAUERFEIND, R.; PRENGER-BERNINGHOFF, E.; IMIRZALIOGLU, C.; CHAKRABORTY, T. Multiresistant extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae from humans, companion animals and horses in central Hesse, Germany. **BMC Microbiology**,

v. 14, n. 1, p. 187, 2014b.

SEIFFERT, S. N.; CARATTOLI, a.; TINGUELY, R.; LUPO, a.; PERRETEN, V.; ENDIMIANI, a. High Prevalence of Extended-Spectrum β-Lactamase, Plasmid-Mediated AmpC, and Carbapenemase Genes in Pet Food. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 10, p. 6320–6323, 2014.

SEKI, L. M.; PEREIRA, P. S.; DE SOUZA CONCEIÇÃO, M.; SOUZA, M. J.; MARQUES, E. A.; CARBALLIDO, J. M.; DE CARVALHO, M. E. S.; ASSEF, A. P. D. A. C.; ASENSI, M. D. Molecular epidemiology of CTX-M producing Enterobacteriaceae isolated from bloodstream infections in Rio de Janeiro, Brazil: Emergence of CTX-M-15. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 6, p. 640–646, 2013.

SENI, J.; FALGENHAUER, L.; SIMEO, N.; MIRAMBO, M. M.; IMIRZALIOGLU, C.; MATEE, M.; RWEYEMAMU, M.; CHAKRABORTY, T.; MSHANA, S. E. Multiple ESBL-producing *Escherichia coli* sequence types carrying quinolone and aminoglycoside resistance genes circulating in companion and domestic farm animals in Mwanza, Tanzania, harbor commonly occurring plasmids. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. FEB, p. 1–8, 2016.

SHAHEEN, B. W.; NAYAK, R.; FOLEY, S. L.; KWEON, O.; DECK, J.; PARK, M.; RAFII, F.; BOOTHE, D. M. Molecular characterization of resistance to extended-spectrum cephalosporins in clinical *Escherichia coli* isolates from companion animals in the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 12, p. 5666–5675, 2011.

SHAHRAKI-ZAHEDANI, S.; RIGI, S.; BOKAEIAN, M.; ANSARI-MOGHADDAM, A.; MOGHADAMPOUR, M. First report of TEM-104-, SHV-99-, SHV-108-, and SHV-110-producing *Klebsiella pneumoniae* from Iran. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 4, p. 441–445, 2016.

SHAKIL, S.; KHAN, A. U. Detection of CTX-M-15-Producing and Carbapenem-Resistant *Acinetobacter Baumannii* Strains from Urine from an Indian Hospital. **Journal of Chemotherapy**, v. 22, n. 5, p. 324–327, 2010.

SHIBATA, N.; KUROKAWA, H.; DOI, Y.; YAGI, T.; YAMANE, K.; WACHINO, J.; SUZUKI, S.; KIMURA, K.; ISHIKAWA, S.; KATO, H.; OZAWA, Y.; SHIBAYAMA, K.; KAI, K.; KONDA, T.; ARAKAWA, Y. PCR classification of CTX-M-type beta-lactamase genes identified in clinically isolated gram-negative bacilli in Japan. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 2, p. 791–5, 1 fev. 2006.

SHIMIZU, T.; HARADA, K.; TSUYUKI, Y.; KIMURA, Y.; MIYAMOTO, T.; HATOYA, S.; HIKASA, Y. In vitro efficacy of 16 antimicrobial drugs against a large collection of β-lactamase-producing isolates of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from dogs and cats. **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 1085–1091, 1 ago. 2017.

SHINTANI, M.; SANCHEZ, Z. K.; KIMBARA, K. Genomics of microbial plasmids: Classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. MAR, p. 1–16, 2015.

SHOAI TEHRANI, M. et al. Gram-negative bacteremia: Which empirical antibiotic therapy? **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 44, n. 4, p. 159–166, 2014.

SIDJABAT, H. E.; SEAH, K. Y. on.; COLEMAN, L.; SARTOR, A.; DERRINGTON, P.; HENEY, C.; FAOAGALI, J.; NIMMO, G. R.; PATERSON, D. L. Expansive spread of IncI1 plasmids carrying $bla_{\text{CMY-2}}$ amongst *Escherichia coli*. **International journal of antimicrobial agents**, v. 44, n. 3, p. 203–208, 2014.

SILBERGELD, E. K.; GRAHAM, J.; PRICE, L. B. Industrial Food Animal Production, Antimicrobial Resistance, and Human Health. **Annual Review of Public Health**, v. 29, n. 1, p. 151–169, 2008.

STERNEBERG-VAN DER MAATEN, T.; TURNER, D.; VAN TILBURG, J.; VAARTEN, J. Benefits and Risks for People and Livestock of Keeping Companion Animals: Searching for a Healthy Balance. **Journal of Comparative Pathology**, p. 1–10, 2015.

STEWART, A.; HARRIS, P.; HENDERSON, A.; PATERSON, D. Treatment of Infections with OXA-48 producing *Enterobacteriaceae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n. August, p. AAC.01195-18, 2018.

STOLLE, I.; PRENGER-BERNINGHOFF, E.; STAMM, I.; SCHEUFEN, S.; HASSDENTEUFEL, E.; GUENTHER, S.; BETHE, A.; PFEIFER, Y.; EWERS, C. Emergence of OXA-48 carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in dogs. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 12, p. 2802–2808, 2013.

SUÁREZ, C.; GUDIOL, F. Antibióticos betalactámicos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica**, v. 27, n. 2, p. 116–129, 2009.

TAMANG, M. D.; NAM, H.-M.; GURUNG, M.; JANG, G.-C.; KIM, S.-R.; JUNG, S.-C.; PARK, Y. H.; LIM, S.-K. Molecular Characterization of CTX-M β-Lactamase and Associated Addiction Systems in *Escherichia coli* Circulating among Cattle, Farm Workers, and the Farm Environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 13, p. 3898–3905, 1 jul. 2013.

THEURETZBACHER, U. Future antibiotics scenarios: is the tide starting to turn? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, n. 1, p. 15–20, 2009.

TOLLENTINO, F. M.; POLOTTO, M.; NOGUEIRA, M. L.; LINCOPAN, N.; MAMIZUKA, E. M.; REMELI, G. A.; ALMEIDA, M. T. G. De; RU, F. G.; NOGUEIRA, M. C. L. High Prevalence of bla CTX-M Extended Spectrum Beta-Lactamase Genes in *Klebsiella pneumoniae* Isolates from a Tertiary Care Hospital : First report of $bla_{\text{SHV-12}}$,$bla_{\text{SHV-3}}$1, $bla_{\text{SHV-38}}$, and $bla_{\text{CTX-M-15}}$ in Brazil. v. 17, n. 1, p. 7–16, 2011.

TROTT, D. B-lactam Resistance in Gram-negative Pathogens Isolated from Animals. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 2, p. 239–249, 2013.

UR RAHMAN, S.; ALI, T.; ALI, I.; KHAN, N. A.; HAN, B.; GAO, J. The Growing Genetic and Functional Diversity of Extended Spectrum Beta-Lactamases. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1–14, 2018.

VALAT, C.; AUVRAY, F.; FOREST, K.; MÉTAYER, V.; GAY, E.; PEYTAVIN DE GARAM, C.; MADEC, J.-Y.; HAENNI, M. Phylogenetic Grouping and Virulence Potential of Extended-Spectrum-β-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains in Cattle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 13, p. 4677–4682, 1 jul. 2012.

VAN DUIN, D.; KAYE, K. S.; NEUNER, E. A.; BONOMO, R. A. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a review of treatment and outcomes. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 75, n. 2, p. 115–120, fev. 2013.

VILLA, L.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, A.; FORTINI, D.; CARATTOLI, A. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 12, p. 2518–2529, 2010.

VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Digital PCR. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 16, p. 9236–41, 3 ago. 1999.

VON WINTERSDORFF, C. J. H.; PENDERS, J.; VAN NIEKERK, J. M.; MILLS, N. D.; MAJUMDER, S.; VAN ALPHEN, L. B.; SAVELKOUL, P. H. M.; WOLFFS, P. F. G. Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. FEB, p. 1–10, 2016.

WANG, X.; CHEN, J.; KANG, Y.; JIANG, N.; AN, S.; GAO, Z. Prevalence and characterization of plasmid-mediated *bla* ESBL with their genetic environment in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in patients with pneumonia. **Chinese medical journal**, v. 125, n. 5, p. 894–900, mar. 2012.

WEESE, J. S. Investigation of *Enterobacter cloacae* infections at a small animal veterinary teaching hospital. **Veterinary Microbiology**, v. 130, n. 3–4, p. 426–428, 2008.

WIRTH, T.; FALUSH, D.; LAN, R.; COLLES, F.; MENSA, P.; WIELER, L. H.; KARCH, H.; REEVES, P. R.; MAIDEN, M. C. J.; OCHMAN, H.; ACHTMAN, M. Sex and virulence in *Escherichia coli*: An evolutionary perspective. **Molecular Microbiology**, v. 60, n. 5, p. 1136–1151, 2006.

WOERTHER, P.-L.; BURDET, C.; CHACHATY, E.; ANDREMONT, a. Trends in Human Fecal Carriage of Extended-Spectrum β-Lactamases in the Community: Toward the Globalization of CTX-M. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 744–758, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Widespread misunderstanding about antibiotic resistance threatens public health – UN health agency**. Disponível em: <https://news.un.org/en/story/2015/11/515602-widespread-misunderstanding-about-antibiotic-resistance-threatens-public-health#.VkoWmtKrSM8>. Acesso em: 13 set. 2018.

XU, Y.; WEI, W.; LEI, S.; LIN, J.; SRINIVAS, S.; FENG, Y. An evolutionarily conserved mechanism for intrinsic and transferable polymyxin resistance. **mBio**, v. 9, n. 2, p. 1–18, 2018.

YAMANE, K.; WACHINO, J. I.; SUZUKI, S.; KIMURA, K.; SHIBATA, N.; KATO, H.; SHIBAYAMA, K.;

KONDA, T.; ARAKAWA, Y. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 9, p. 3354–3360, 2007.

YILMAZ, N.; AĞUŞ, N.; BAYRAM, A.; ŞAMLIOĞLU, P.; CEM ŞIRIN, M.; DERICI, Y. K.; HANCI, S. Y. Antimicrobial susceptibilities of *Escherichia coli* isolates as agents of community-acquired urinary tract infection (2008-2014). **Turk Uroloji Dergisi**, v. 42, n. 1, p. 32–36, 2016.

YOUSFI, M.; MAIRI, A.; TOUATI, A.; HASSISSENE, L.; BRASME, L.; GUILLARD, T.; DE CHAMPS, C. Extended spectrum β-lactamase and plasmid mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* fecal isolates from healthy companion animals in Algeria. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 22, n. 7, p. 431–435, 2016.

YOUSFI, M.; TOUATI, A.; MUGGEO, A.; MIRA, B.; ASMA, B.; BRASME, L.; GUILLARD, T.; DE CHAMPS, C. Clonal dissemination of OXA-48-producing *Enterobacter cloacae* isolates from companion animals in Algeria. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 12, p. 187–191, 2018.

ZHANG, W.; LIN, X.; XU, L.; GU, X.; YANG, L.; LI, W.; REN, S. CTX-M-27 Producing *Salmonella*enterica Serotypes Typhimurium and Indiana Are Prevalent among Food-Producing Animals in China. v. 7, n. March, p. 1–11, 2016.

ZOGG, A. L.; ZURFLUH, K.; SCHMITT, S.; NÜESCH-INDERBINEN, M.; STEPHAN, R. Antimicrobial resistance, multilocus sequence types and virulence profiles of ESBL producing and non-ESBL producing uropathogenic *Escherichia coli* isolated from cats and dogs in Switzerland. **Veterinary Microbiology**, v. 216, p. 79–84, 2018.

9 ANEXOS

Première description d'un *E. coli* OXA-48 chez un chien en France

Luana C. Melo[1,3], Marine Boisson[2], Estelle Saras[1], Christine Médaille[2], Henri-Jean Boulouis[2], Jean-Yves Madec[1] and Marisa Haenni[1]

[1] Unité Antibiorésistance et Virulence Bactériennes, ANSES Site de Lyon, France
[2] École Nationale Vétérinaire d'Alfort, France
[3] Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

Laboratoire de Lyon
contact: lua.cmelo@gmail.com

anses
French agency for food, environmental and occupational health & safety

INTRODUCTION:

Les animaux de compagnie peuvent être traités avec des céphalosporines de dernières générations. L'usage sélectionnant la résistance, la présence de BLSE a été décrite à de nombreuses reprises chez les chiens et les chats. Au contraire, les carbapénèmes sont totalement interdits en médecine vétérinaire et, de fait, la présence de carbapénémases n'a été que très rarement rapportée chez l'animal. Le but de notre étude était de déterminer la prévalence des BLSE et des carbapénémases en portage sain chez des chiens et des chats à Paris.

MATERIEL ET METHODES:

- Entre janvier et juillet 2015, 227 écouvillons rectaux de chats et 166 de chiens ont été prélevés lors de consultation de routine.
- La recherche d'entérobactéries a été effectuée sur milieux sélectifs ChromID BLSE et CarbaSMART.
- Les isolats ont été identifiés par MALDI-TOF et leur profil de résistance déterminé par antibiogramme en milieu gélosé.
- Tous les isolats ont été caractérisés par PFGE et MLST, et les gènes de résistance recherchés par PCR et séquençage.
- Le plasmide porteur des gènes de résistance BLSE a été caractérisé par PBRT et S1-PFGE suivi d'un Southern blot.
- Le gene bla_{OXA-48} a été localisé dans un Tn*1999.2* transposon, tel que révélé par la rupture de l'élément IS1999 amont par IS1R utilisant la PCR mapping.

RESULTATS:

Six *E. coli* ont été collectés, dont trois isolats appartenant aux ST973, ST141 et ST68, provenaient de chats et portant respectivement les gènes $bla_{CTX-M-1}$, $bla_{CTX-M-15}$, et $bla_{CTX-M-14}$ sur des plasmides de type IncFIB, Inc I1 et IncFII. Les trois autres isolats ont été isolés de chiens et portaient les gènes bla_{CMY-2} (ST55 et ST963) et bla_{OXA-48} (ST372), ce dernier sur un plasmide de type IncL.

Seuls les 2 animaux portant les gènes $bla_{CTX-M-1}$ et bla_{OXA-48} avaient été hospitalisés dans les 12 mois précédant l'écouvillonnage et avaient reçu un traitement antibiotique.

Souche	Animal	Infection dans les dérnieres douze mois	Hospitalisation	Antibiothérapie	Séquence type	Phenotype	bla gene	bla gene plasmid type	Plasmid Size (kbp)	Resistances Associées[2]
39594	Chien	Non	Non	Non	55	pAmpC	bla_{CMY-2}	NT[2]	ND[3]	NAL
40232	Chat	Non	Non	Non	68	ESBL	$bla_{CTX-M-14}$	IncF	150	aucun
40236	Chat	Oui, infection respiratoire	Oui, 3-8 jours	Oui, traitement inconnu	973	ESBL	$bla_{CTX-M-1}$	IncFIB	210	STR, TMP
41285	Chien	Non	Non	Non	141	ESBL	$bla_{CTX-M-15}$	IncI1	200	GEN
41286	Chien	Non	Non	Non	963	pAmpC	bla_{CMY-2}	NT[2]	ND[3]	aucun
39597	Chien	Oui, infection abdominale	Oui, >3 jours	amoxicillin-clavulanic acid	372	Erta nonS[1]	bla_{OXA-48}	IncL	60	aucun

[1] Erta NonS: non susceptible à l'ertapenem [2] NT: non typable [3] ND: non determiné

CONCLUSION:

Cette étude confirme la faible prévalence des BLSE chez les chiens (<2%). Cependant, la diversité des clones et des enzymes est grande. Il s'agit également de la première description d'*E. coli* producteur de carbapénémase en France chez un chien. L'isolement d'une OXA-48 est étonnant, sachant que la proportion estimée d'*E. coli* producteurs de carbapénémases en France était de 0.01% en 2012.

CIÊNCIA sem fronteiras · CNPq Conselho Nacional de Desenvolvimento · anses.fr

Journal of Antimicrobial Chemotherapy Advance Access published December 30, 2016

Journal of Antimicrobial Chemotherapy

J Antimicrob Chemother
doi:10.1093/jac/dkw531

OXA-48-producing ST372 *Escherichia coli* in a French dog

Luana C. Melo[1,2], Marine N. G. Boisson[3], Estelle Saras[1], Christine Médaille[4], Henri-Jean Boulouis[3], Jean-Yves Madec[1] and Marisa Haenni[1]*

[1]*Unité Antibiorésistance et Virulence Bactériennes, Université Lyon-ANSES Site de Lyon, 31 avenue Tony Garnier, Lyon 69364, France;* [2]*Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil;* [3]*Biopole Alfort, ENVA, 7 Avenue du Général de Gaulle, 94704 Maisons-Alfort cedex, France;* [4]*CHUVA, ENVA, 7 Avenue du Général de Gaulle, 94704 Maisons-Alfort cedex, France*

*Corresponding author. Tel: +33-4-78-72-65-43; Fax: +33-4-78-61-91-45; E-mail: marisa.haenni@anses.fr

Sir,

In veterinary medicine, extended-spectrum cephalosporins (ESCs) are widely used, contrary to carbapenems, which have no legal indication. Consequently, enzymes conferring resistance to ESCs, such as ESBLs and plasmidic AmpCs (pAmpCs), have been repeatedly reported in animals, whereas carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) are still uncommon in non-human sources and have been recognized only sporadically in domestic animals and wildlife in certain countries and continents.[1–5] Moreover, these cases were largely observational and not reported from prevalence studies. Here, our aim was to ascertain the prevalence of faecal carriage of acquired resistance to ESCs and carbapenems in a large set of healthy cats and dogs in France.

Rectal swabs of unrelated healthy cats ($n = 227$) and dogs ($n = 166$) attending the Veterinary School of Maisons-Alfort (suburb of Paris) for routine vaccination and/or general check-up were sampled between January and June 2015. Each owner filled in a short questionnaire about their own health and their animal's health, and contacts and travels in the last 12 months. Most animals were young (median age of 10 months for cats and 4 years for dogs) and very few presented a history of hospitalization and/or antibiotic treatment within the last 12 months. Selective plates for the detection of ESBL/pAmpC producers (ChromID ESBL) and carbapenem-resistant isolates (CarbaSMART) were used (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France), and the positive isolates were identified and characterized molecularly.

Six non-clonal isolates, as assessed by PFGE of Xba1-digested DNA and MLST, recovered from four dogs and two cats, were identified as *Escherichia coli* by MALDI-TOF (Table 1). Susceptibility testing by disc diffusion (www.sfm-microbiologie.org) allowed the detection of three ESBL and two AmpC phenotypes, whereas one isolate presented a reduced susceptibility to ertapenem while remaining susceptible to ESCs. This latter isolate was susceptible to colistin and tigecycline (Etest, bioMérieux), but presented MICs of imipenem, ertapenem and meropenem of 1.5, 0.75 and 0.75 mg/L, respectively.

The three ESBL-producing *E. coli* originated from one dog and two cats and belonged to ST973, ST68 and ST141 (Table 1). As detected by PCR/sequencing, each isolate harboured a different bla_{CTX-M} gene, i.e. $bla_{CTX-M-1}$, $bla_{CTX-M-15}$ and $bla_{CTX-M-14}$, located on IncFIB, IncI1 and IncF plasmid types, respectively, according to the PCR-based replicon typing (PBRT; Diatheva, Fano, Italy) and PFGE-S1 gels followed by Southern blot using adequate probes. One cat had suffered from a respiratory tract infection in the last 12 months and had been treated with antibiotics (unrecorded molecule), whereas the two other animals presented no history of illness, travel or contact with people working in healthcare centres. The two AmpC-producing *E. coli* originated from dogs, presented a bla_{CMY-2} gene located on non-typeable plasmids and belonged to ST55 and ST963. Neither of these dogs presented any identified risk factor for being colonized with ESC-resistant bacteria. Altogether, this study shows a very weak prevalence of ESC-resistance carriage in cats (2/227, 0.9%) and dogs (3/166, 1.8%) in a large set of randomly chosen animals.

The ertapenem-non-susceptible *E. coli* isolate belonged to ST372 and displayed a unique bla_{OXA-48} gene located on an ~60 kbp IncL plasmid. The bla_{OXA-48} gene was located in a Tn*1999.2* transposon as revealed by the disruption of the upstream IS*1R* element by IS*1R* using PCR mapping. This isolate was recovered from a 3.5-year-old German shepherd dog that had been hospitalized for 3–8 days in the last 12 months (abdominal infection) and treated with amoxicillin/clavulanic acid. The owner had also been hospitalized in France for a short period of time, but had never travelled outside Europe.

This is the first report of CPE in an animal in France. This finding adds to the very limited number of studies reporting CPE in animals worldwide. In particular, OXA-48-producing Enterobacteriaceae in animals have been reported only in four countries so far, i.e. in poultry in Lebanon and in dogs in Algeria, Germany and the USA.[1–5] Of note, most reports were from pets, which may indicate a human-to-animal transfer through close contacts. In our study, the OXA-48-positive animal was living in France, where OXA-48 is not endemic in humans.[6] This suggests that OXA-48 producers in animals might be underreported in OXA-48-endemic countries. The origin of the OXA-48 *E. coli* in this dog could not be traced. No $bla_{CTX-M-15}$ gene was identified along with bla_{OXA-48}, a combination that is, on the contrary, rather common in human isolates. Also, carbapenem-susceptible ST372 *E. coli* isolates have already been associated with human and canine infections.[7]

In conclusion, even though resistance to carbapenems is uncommon in animals, carbapenemase genes are associated with a high potential for dissemination and their prevalence in non-human sources may be underestimated, potentially even in countries or continents where CPE are not highly prevalent in humans. CPE in animals should be more thoroughly monitored

Downloaded from http://jac.oxfordjournals.org/ at ANSES on December 31, 2016

© The Author 2016. Published by Oxford University Press on behalf of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. All rights reserved. For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com.

Table 1. Molecular and epidemiological characteristics of the *E. coli* isolates investigated in this study

Isolate	Animal species	Infection in the last 12 months	Hospitalization	Antibiotherapy	ST	Phenotype	*bla* gene	*bla* gene plasmid type	Plasmid size (kbp)	Associated resistance
39594	dog	no	no	no	55	pAmpC	bla_{CMY-2}	NT	ND	NAL
40232	cat	no	no	no	68	ESBL	$bla_{CTX-M-14}$	IncF	150	none
40236	cat	yes, respiratory tract infection	yes, <3 days	yes, unknown treatment	973	ESBL	$bla_{CTX-M-1}$	IncFIB	210	STR, TMP
41285	dog	no	no	no	141	ESBL	$bla_{CTX-M-15}$	IncI1	200	GEN
41286	dog	no	no	no	963	pAmpC	bla_{CMY-2}	NT	ND	none
39597	dog	yes, abdominal infection	yes, 3–8 days	amoxicillin/ clavulanic acid	372	non-susceptible to ertapenem	bla_{OXA-48}	IncL	60	none

NT, non-typeable; ND, not determined; NAL, nalidixic acid; STR, streptomycin; TMP, trimethoprim; GEN, gentamicin.

worldwide in order to clarify the role of non-human settings as possible reservoirs of carbapenemase genes.

Funding

This work was supported by the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES) and by the National EcoAntibio Action Plan funded by the Ministry in charge of Agriculture.

Transparency declarations

None to declare.

References

1 Stolle I, Prenger-Berninghoff E, Stamm I *et al.* Emergence of OXA-48 carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in dogs. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 2802–8.

2 Schmiedel J, Falgenhauer L, Domann E *et al.* Multiresistant extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae from humans, companion animals and horses in central Hesse, Germany. *BMC Microbiol* 2014; **14**: 187.

3 Liu X, Thungrat K, Boothe DM. Occurrence of OXA-48 carbapenemase and other β-lactamase genes in ESBL-producing multidrug resistant *Escherichia coli* from dogs and cats in the United States, 2009-2013. *Front Microbiol* 2016; **7**: e1057.

4 Al Bayssari C, Olaitan AO, Dabboussi F *et al.* Emergence of OXA-48-producing *Escherichia coli* clone ST38 in fowl. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; **59**: 745–6.

5 Yousfi M, Touati A, Mairi A *et al.* Emergence of carbapenemase-producing *Escherichia coli* isolated from companion animals in Algeria. *Microb Drug Resist* 2016; **22**: 342–6.

6 Robert J, Pantel A, Merens A *et al.* Incidence rates of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae clinical isolates in France: a prospective nationwide study in 2011-12. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**: 2706–12.

7 Wagner S, Gally DL, Argyle SA. Multidrug-resistant *Escherichia coli* from canine urinary tract infections tend to have commensal phylotypes, lower prevalence of virulence determinants and *ampC*-replicons. *Vet Microbiol* 2014; **169**: 171–8.

Downloaded from http://jac.oxfordjournals.org/ at ANSES on December 21, 2016

Veterinary Microbiology 221 (2018) 59–66

Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetmic

Prevalence and molecular features of ESBL/pAmpC-producing Enterobacteriaceae in healthy and diseased companion animals in Brazil

Luana C. Melo[a,b], Cíntia Oresco[a], Lucianne Leigue[a], Hildebrando M. Netto[c], Priscilla A. Melville[d], Nilson R. Benites[d], Estelle Saras[b], Marisa Haenni[b,*], Nilton Lincopan[a], Jean-Yves Madec[b]

[a] Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil
[b] Unité Antibiorésistance et Virulence Bactériennes, ANSES Laboratoire de Lyon - Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France
[c] Center of Zoonosis Control, São Paulo, Brazil
[d] Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
ESBL
pAmpC
Dog
Cat
Pet
Brazil
Plasmid

ABSTRACT

Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)- and plasmid-mediated AmpC (pAmpC)-carrying Enterobacteriaceae have widely disseminated in human, animal and environmental reservoirs. Pets have been recognized as a source of ESBL/pAmpC worldwide, and are possibly also a source of human contamination. The aim of this study was to document to what extent cats and dogs may act as a driving force in the spread of ESBLs and pAmpCs in Brazil. A total of 113 healthy stray cats and dogs and 74 sick pets were sampled, and extended-spectrum cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae (ESC-R) were detected in 28/113 (24.8%) and 8/74 (10.8%) tested animals, respectively. Different Enterobacteriaceae isolates (mostly *E. coli*), a large number of *E. coli* clones (with ST90, ST457, ST973 and ST2541 being predominant), and several ESBL/pAmpC genes and plasmids were characterized, highlighting the ability of stray and pet cats and dogs to further spread a wide range of ESC-resistance determinants. The ESBL phenotype was due to the $bla_{CTX-M-2}$ and $bla_{CTX-M-8}$ genes, as found in human epidemiology in Brazil, but $bla_{CTX-M-9}$ and $bla_{CTX-M-15}$ were also identified. The pAmpC phenotype was systematically due to the presence of the bla_{CMY-2} gene, mostly carried by IncI1 ST12 plasmids. Our results showed that pets can be considered a significant reservoir of multidrug-resistant bacteria in Brazil. This is especially true for healthy stray dogs that displayed the highest prevalence (24.8%) of ESBLs/pAmpC resistance determinants, which can then be further spread both to the environment and to other animals or humans by contact.

1. Introduction

Antimicrobial resistance has become a major issue on a worldwide scale, not only in human healthcare but also in non-human settings. Certain known factors contribute to the increased spread of antimicrobial resistant genes, such as the uncontrolled use of antibiotics in low-income countries in human and veterinary medicine, and the use of antibiotics as growth promoters in animal husbandry in many countries on several continents (Lalak et al., 2016; Silbergeld et al., 2008). The epidemiology of antimicrobial resistance at the human/animal interface is highly complex and has contributed to the emergence and spread of numerous resistance determinants.

The current expansion of resistance genes mediated by plasmids has become a major concern. An important example is the dissemination among Enterobacteriaceae of the extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)- and plasmid-mediated AmpC (pAmpC)-encoding genes that are mostly located on mobile elements and confer resistance to broad-spectrum cephalosporins (Carattoli, 2011). CTX-M enzymes are the predominant ESBL group reported worldwide, and more than 200 CTX-M variants have been reported so far (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA313047). Among these, CTX-M-15 has been recognized frequently in humans, whereas CTX-M-1 is predominant in animals (Bevan et al., 2017; Zurfluh et al., 2014). On the other hand, pAmpCs seem to be more frequently distributed in the animal sector compared to the human sector, and are primarily represented by the CMY-2-type enzyme (Dorado-Garcia et al., 2018; Haenni et al., 2014; Hiki et al., 2013; Martin et al., 2012). Numerous data demonstrate that identical ESBL/pAmpCs genes, plasmids or clones are shared by animals and humans, suggesting possible inter-sectorial transfers (de Been et al., 2014; Dierikx et al., 2013; Dorado-Garcia et al., 2018). Among animals, pets have been recognized as a reservoir of ESBLs worldwide. Companion animals are a source of human contamination but may also be contaminated by human bacteria due to close contacts with owners, which offers favorable conditions for transmitting resistant bacteria

* Corresponding author.
• *E-mail address:* marisa.haenni@anses.fr (M. Haenni).

https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.05.017
Received 31 January 2018; Received in revised form 13 May 2018; Accepted 29 May 2018
0378-1135/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.