

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA
(FISIOPATOLOGIA E TOXICOLOGIA)
ÁREA DE ANÁLISES CLÍNICAS

Relação ancestral e pan-resistoma plasmidial de *Escherichia coli*
produtora de CTX-M-8 e MCR-1 na interface
humana, animal e ambiental

Miriam Rodriguez Fernandes

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Nilton Lincopan

São Paulo
2019

RESUMO

FERNANDES, M. R. **Relação ancestral e pan-resistoma plasmidial de *Escherichia coli* produtora de CTX-M-8 e MCR-1 na interface humana, animal e ambiental.** 2019. 142f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Linhagens de *Escherichia coli* produtoras de β -lactamase de espectro estendido (ESBL) do tipo CTX-M são endêmicas no Brasil, sendo prevalentes em casos de infecções hospitalares e ambulatoriais. Atualmente, cepas produtoras de CTX-M têm sido recuperadas de ambientes urbanos, animais de companhia ou de produção e de alimentos de origem animal, inclusive afetando o agronegócio, o que aponta uma possível rota de disseminação em diferentes ecossistemas. Recentemente, nesta espécie, foi descoberto um novo gene, chamado de *mcr-1*, que confere resistência transferível à colistina, um dos últimos antibióticos eficazes para o tratamento de infecções causadas por bactérias produtoras de ESBL e carbapenemases. Deste modo, o presente estudo tem como objetivo elucidar os aspectos sobre a caracterização e a relação de plasmídeos que carregam genes do tipo *bla*_{CTX-M-8} e *mcr-1* em cepas de *E. coli* isoladas de seres humanos, animais, ambiente aquático e alimentos, no Brasil. Neste estudo são apresentados os resultados da análise plasmidial de 25 cepas de *E. coli*, das quais nove apresentaram o genótipo *bla*_{CTX-M-8}/IncII, 11 apresentaram o genótipo *mcr-1*/IncX4 e cinco apresentaram ambos os genótipos *bla*_{CTX-M-8}/IncII e *mcr-1*/IncX4. Dos resultados, podemos observar que plasmídeos IncII (*bla*_{CTX-M-8}) e IncX4 (*mcr-1*) estão circulando no Brasil desde o ano de 2009 entre diferentes clones (STs) de *E. coli* e em diferentes ambientes e hospedeiros. Os plasmídeos IncII foram conjugativos e pertencentes ao ST113, exceto o plasmídeo recuperado de um isolado humano, que foi pertencente ao ST131. Os plasmídeos IncII apresentaram sua arquitetura conservada, com a presença de genes de replicação, transferência e estabilidade. A partir do alinhamento, os plasmídeos IncII apresentaram 94-99% de similaridade genética entre eles. Dentre os plasmídeos IncX4, independente da fonte de isolamento, todos permaneceram com sua arquitetura altamente conservada. Entretanto, apenas dois plasmídeos (um encontrado em uma cepa de animal e outro encontrado em uma cepa de ambiente aquático) apresentaram uma *IS1294*, truncando o gene de mobilização. Na análise comparativa, todos os plasmídeos IncX4 apresentaram similaridade genética de 95-99,9% entre eles. No alinhamento de plasmídeos IncX4 brasileiros contra plasmídeos de outras regiões geográficas, foi observada similaridade genética > 99,9%, o que confirma a estabilidade e conservação desses plasmídeos. Neste estudo foram reportados dados inéditos da primeira identificação do gene *mcr-1* em diferentes ecossistemas no Brasil, assim como a nova variante *mcr-5.3*. A análise filogenética dos plasmídeos IncII e IncX4, destacam que ambos compartilham uma arquitetura conservada, e a evolução é atribuída à aquisição de genes de resistência. Adicionalmente, um novo vetor de disseminação do gene *mcr-1* no Brasil foi identificado – o plasmídeo IncHI2. Os resultados desse estudo demonstram o grave problema da resistência bacteriana dentro do conceito *One-health* e que, com o avanço de ferramentas moleculares, a identificação e a resolução desse problema poderá estar cada vez mais próxima de ser elucidada.

Palavras-chave: *One-health*. Colistina. ESBL. IncII. IncX4. IncHI2

ABSTRACT

FERNANDES, M. R. **Ancestral relationship and plasmid pan-resistome of CTX-M-8- and MCR-1-producing *Escherichia coli* in human-animal-environmental interface.** 2019. 142f. Thesis (PhD) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

CTX-M-type extended-spectrum- β -lactamase (ES β L)-producing-*Escherichia coli* are endemic in Brazil and are prevalent in cases of nosocomial and ambulatory infections. Currently, CTX-M-producing strains have been recovered from urban environments, companion/production animals and animal source foods, which indicates a possible route of dissemination in different ecosystems. Recently, in this species, a new gene, called *mcr-1*, has been discovered, conferring transferable resistance to colistin, one of the last effective antibiotics for the treatment of infections caused by ESBL- and carbapenemases-producing bacteria. Thus, the present study aims to elucidate unknown aspects of the pan-resistome and ancestral relationship of plasmids carrying *bla*_{CTX-M-8} and *mcr-1* genes in strains of *E. coli* isolated from humans, animals, aquatic environment and food, in Brazil. In this study, we present results from the plasmidial analysis of 25 *E. coli* strains, from which nine presented the *bla*_{CTX-M-8}/IncII genotype, 11 presented the *mcr-1*/IncX4, and five presented both *bla*_{CTX-M-8}/IncII and *mcr-1*/IncX4 genotypes. Among these results, we can observe that IncII (*bla*_{CTX-M-8}) and IncX4 (*mcr-1*) plasmids are circulating in Brazil since 2009, between different *E. coli* clones (STs) and different hosts and environments. IncII plasmids were conjugative and assigned to ST113, with exception of a plasmid recovered from a human isolate, which was assigned to ST131. IncII plasmids presented conserved architecture, with the presence of genes of replication, transference, and stability. From the alignment analysis, IncII plasmids presented 94-99% genetic similarity among them. Among the IncX4 plasmids, regardless the isolation source, their architecture remained highly conserved. However, only two plasmids (one detected in an animal's strain and another detected in an aquatic environment's strain) presented an IS1294, truncating the mobilization gene. In the comparative analysis, all IncX4 plasmids presented 95-99,9% genetic similarity among them. In the alignment of Brazilian IncX4 plasmids against plasmids from other geographic regions, >99.9% genetic similarity was observed, confirming the stability and conservation of these plasmids. In this study, unprecedented data from the first identification of the *mcr-1* gene in different ecosystems in Brazil, as well as the new variant, *mcr-5.3*. Additionally, it was identified a new dissemination vector of the *mcr-1* gene in Brazil – the IncHI2 plasmid. Phylogenetic analysis of IncII and IncX4 plasmids highlight that both share a conserved backbone, and evolution is attributed to the acquisition of clinically relevant antimicrobial resistance genes. The results from this study demonstrate the serious problem of the bacterial resistance within the “One-Health” concept and that, with the advance of molecular tools, identification and resolution of this problem may be increasingly closer to being elucidate.

Key-words: *One-health*. Colistin. ESBL. IncII. IncX4. IncHI2