

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 29/09/2022.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

Prevalência, fatores de risco e infecções virais associadas com *Escherichia coli*
resistentes a cefalosporinas de espectro estendido em cães

MARÍLIA SALGADO-CAXITO

Botucatu – SP
Setembro, 2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

Prevalence, risk factors, and viral infections associated with extended-spectrum
cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in dogs

MARÍLIA SALGADO-CAXITO

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Medicina Veterinária da FMVZ - UNESP
para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Antonio Carlos Paes
Coorientadora: Andrea Moreno Switt

Botucatu – SP
Setembro, 2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Salgado-Caxito, Marília.

Prevalência, fatores de risco e infecções virais associadas com *Escherichia coli* resistentes a cefalosporinas de espectro estendido em cães / Marília Salgado-Caxito. - Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Antonio Carlos Paes

Coorientador: Andrea Moreno Switt

Capes: 50502034

1. Cães - Doenças. 2. Animais de estimação. 3. Doenças transmissíveis. 4. *Escherichia coli*. 5. Cinomose.

Palavras-chave: ESBL; Parvovirose; Resistência antimicrobiana; Vermifugação; β -Lactamases; Cinomose.

Autor: Marília Salgado Caxito

Título: Prevalência, fatores de risco e infecções virais associadas com *Escherichia coli* resistentes a cefalosporinas de espectro estendido em cães

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Antonio Carlos Paes
Presidente e Orientador
Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva
FMVZ – UNESP – Botucatu

Profa. Dra. Andrea Moreno Switt
Coorientadora
Escuela de Medicina Veterinaria – Pontificia Universidad Católica de Chile
Directora Alterna Núcleo Milenio MICROB-R

Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro
Membro interno
Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. José Carlos de Figueiredo Pantoja
Membro interno
Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva
FMVZ – UNESP – Botucatu

Profa. Dra. Patricia Alexandra Curado Quintas Dinis Poeta
Membro externo
Departamento de Ciências Veterinárias
Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD) – Vila Real, Portugal

Profa. Dra. Ana Cristina Gales
Membro externo
Departamento de Medicina
Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

Profa. Dra. Jane Megid
Membro suplente interno
Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Rodrigo Cayô
Membro suplente externo
Departamento de Ciências Biológicas
Setor de Biologia Molecular, Microbiologia e Imunologia
Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Campus Diadema

Prof. Dr. Gilberto Igrejas
Membro suplente externo
Departamento de Genética e Biotecnologia
Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD) – Vila Real, Portugal

Data da defesa: 29 de setembro de 2020.

Dedicatória

A todos os cães que foram incluídos neste estudo.

Que este trabalho possa contribuir no combate às enfermidades infecciosas para evitar que animais continuem morrendo por doenças que podem ser prevenidas.

Agradecimentos

Ao Dr. Julio Benavides (8), obrigada por ser meu principal colaborador neste trabalho e por ter de fato mergulhado neste projeto. Pelas (muitas) críticas, correções e paciência comigo (ok, nem tanto) durante todas as etapas desta Tese. Tenho muita sorte de termos objetivos em comum e podermos trabalhar juntos. Você é uma pessoa incrível que me apresentou um mundo que eu não conhecia e me fez enxergar a ciência com outros olhos: os seus! Olhos de quem faz ciência para resolver os problemas do mundo. Com você aprendi que todas as nossas ações devem de alguma forma ajudar quem precisa e proteger os animais e a natureza. Além disso, não teria conseguido escrever esta tese no meio de uma pandemia e 7 meses de quarentena se não fosse com você ao meu lado. Sou muito feliz não apenas por ser a sua *roommate* durante a pandemia por COVID-19, mas por poder compartilhar todos os dias da minha vida com você. *Que não seja imortal, posto que é chama, mas que seja infinito enquanto dure!* (Vinícius de Moraes).

Àquela que sempre acreditou em mim mais do que eu mesma. Que sempre me falou que eu poderia ser quem eu quisesse, sem saber que eu só queria ser como ela. Mãezinha, você segurava a minha mão até que eu dormisse e continua segurando 30 anos depois. Obrigada por ser a minha melhor amiga e por me ensinar a enfrentar os desafios. Hoje subo mais esse degrau, porém foi você que pela mão me conduziu aos pés da escada.

À Família Salgado, meu porto seguro. Vocês são a minha melhor torcida e que fazem da minha querida São Romão o meu lugar preferido no mundo.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Paes que durante esses 8 anos de orientação foi e é o meu maior exemplo. Mais que um professor, você se tornou meu amigo querido. Obrigada por todos os ensinamentos ao longo desses anos e me apresentar o mundo das Doenças Infecciosas. Espero um dia poder compartilhar com futuros veterinários tudo o que aprendi com você e seguir com a nossa missão de salvar cada vez mais animais de doenças totalmente evitáveis.

Aos professores Dr. Márcio Garcia Ribeiro que mesmo não sendo meu orientador sempre estive à disposição para me ajudar e aconselhar e Dra. Jane Megid pelos momentos de risada e descontração. Obrigada principalmente pela amizade todos esses anos e pelo carinho que demonstram ter por mim!

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” que foi a minha casa durante 10 anos, todos os docentes, funcionários, colegas e amigos do Laboratório de Microbiologia e do Setor de Moléstias Infecciosas. A todos do Departamento de Produção animal e Medicina Veterinária Preventiva, muito obrigada por me ajudarem a chegar até aqui!

Aos amigos que “deixei” no Brasil. Embora não possa nomear a todos os que me ajudaram a alcançar essa conquista, sintam-se abraçados todos vocês que de alguma forma participaram da minha caminhada. Um agradecimento especial às minhas queridas amiga-irmã Lucieny Sierra e amiga-R-parça Erika Morita que apesar de estarmos a um país de distância de alguma forma se fazem presentes nos meus momentos importantes (obrigada Zoom, WhatsApp e redes sociais).

À minha coorientadora Dra. Andrea Moreno que abraçou este trabalho e enriqueceu esta Tese de forma ímpar com suas contribuições. Obrigada por ser minha mentora e por todas as horas sentada ao meu lado, literalmente, para me ensinar a escrever um artigo científico ou me mostrar onde estava errando na hora de fazer uma PCR que não funcionava. Você é meu melhor exemplo de mulher na ciência!

A todos do Laboratório de Colina, por me acolherem de braços abertos (mesmo sem entender “chilenismos”) e compartilharem seus conhecimentos comigo.

Aos professores Dr. José Munita, Dr. Gerardo Gonzales, Dra. Hélia Bello e todos integrantes do grupo MICROB-R (e Nanob-R) que contribuíram para que esta Tese alcançasse níveis tão elevados, o que não seria possível sem a colaboração de renomados investigadores e expertos na área.

Aos integrantes da comissão avaliadora desta Tese, tenho muito orgulho de poder compartilhar os resultados deste trabalho com pesquisadores renomados e de diferentes países. Obrigada pela aceitação e disponibilidade em contribuir com a minha formação como pesquisadora e engrandecer este trabalho.

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e apoiado por FONDECYT 1181167 (concedido a Dra. Andrea Moreno Switt), FONDECYT 11181017 (concedido ao Dr. Julio Benavides) e ANID Millennium Science Initiative/Millennium Initiative for Collaborative Research On Bacterial Resistance, MICROB-R, NCN17_081.

“Sem luta não tem vitória”

(Rosina Pereira da Mota, vizinha)

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Table 1. Summary of features of studies included in the scoping review (n=128).....	15
Table 2. ESBL and virulence genes identified from E. coli isolates among dogs and cats.	23
Table 3. Phylogroup and Sequence Types of ESBL-E. coli isolated from dogs and cats.	25

CAPÍTULO 2

Table 1. Sequences, melting temperature and amplicon size of primers used for detection of CTX-M-type, SHV-type, and TEM-type genes.	69
Table 2. Summary of answers extracted from the owner's questionnaires (n=124).....	72
Table 3. General Linear Model regression to explain the presence of ESCR E. coli in dogs extracted from the owner's questionnaires (n=124).....	76
Table 4. Resistance profile of isolates and extended-spectrum beta-lactamases genes identified in 18 ESCR E. coli isolates from 12 dogs.	79

CAPÍTULO 3

Table 1. Antimicrobial resistance profiles of ESCR-E. coli and ESCR-K. pneumoniae isolates from CPV-infected, CDV-infected, and non-infected dogs, number of isolates obtained from different samples, and ESBL genes detected before antibiotic therapy.	104
--	-----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figure 1. Number of publications per continent over 2000-2020 period.	16
Figure 2. A: Number of publications of ESBL-E. coli in dogs and cats per country in gradient. B: Studies performed exclusively in dogs, or cats, or both per country.....	17
Figure 3. Forest plot of the global prevalence of ESBL-E. coli in dogs and cats.....	19
Figure 4. Forest plot of the prevalence of ESBL-E. coli in dogs across continent.....	20
Figure 5. Forest plot of the prevalence of ESBL-E. coli in cats across continents.....	21

CAPÍTULO 3

Figure 1. Prevalence of faecal carriage of ESCR E. coli in CPV-infected, CDV-infected, and non-infected dogs and prevalence of infected dogs at four moments after antibiotic therapy start.....	102
---	-----

SIGLAS E ABREVIATURAS

AMR/RAM	Antimicrobial Resistance/Resistência Antimicrobiana
<i>bla</i> _{CTX-M}	Gene codificante de enzimas β -lactamase de espectro estendido do tipo CTX-M
<i>bla</i> _{SHV}	Gene codificante de enzimas β -lactamase de espectro estendido de tipo SHV
<i>bla</i> _{TEM}	Gene codificante de enzimas β -lactamase de espectro estendido do tipo TEM
CDV	Canine distemper (cinomose)
CI/IC	Confidence interval/Intervalo de confiança
CPV	Canine parvovirus (parvovirose canina)
DAEC	Diffusely adherent <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> difusamente aderente)
EHEC	Enterohemorrhagic <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> enterohemorrágica)
EPEC	Enteropathogenic <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> enteropatogênica)
ESBL	Extended-spectrum β -lactamases (β -lactamases de espectro estendido)
ESCR	Extended-Spectrum Cephalosporin-Resistant (resistente a cefalosporinas de espectro estendido)
ETEC	Enterotoxigenic <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> enterotoxigênica)
ExPEC	Extraintestinal pathogenic <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> patogênica extra-intestinal)
GDP/PIB	Growth Domestic Product/Produto Interno Bruto
p	Nível de significância
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
ST	Sequence type (tipo sequencial)
STEC	Shiga-toxin producing- <i>E. coli</i>
UPEC	Uropathogenic <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> uropatogênica)

SUMÁRIO

RESUMO	xiii
ABSTRACT.....	xv
INTRODUÇÃO.....	1
HIPÓTESES DO ESTUDO	4
OBJETIVOS.....	5
Objetivo geral.....	5
Objetivos específicos.....	5
CAPÍTULO 1	6
Global prevalence and molecular characterization of extended-spectrum β -lactamase producing- <i>Escherichia coli</i> in dogs and cats – A scoping review and meta-analysis	6
Abstract.....	7
1. Background	9
2. Methodology.....	11
3. Results	14
4. Discussion	26
5. Conclusions and future directions	28
6. References	30
ANEXOS	47
CAPÍTULO 2	58
Risk factors associated with fecal carriage of extended-spectrum cephalosporin-resistant <i>Escherichia coli</i> among dogs in southeast Brazil	58
Highlights	59
Abstract.....	60
1. Introduction.....	62
2. Methodology.....	64
3. Results	70
4. Discussion	80
ANEXOS	94
CAPÍTULO 3	96
Potential influence of canine enteric viruses in the increase of prevalence of faecal carriage of extended-spectrum cephalosporin-resistant <i>Enterobacterales</i> in dogs	96
Abstract.....	97
Introduction	98
Material and Methods	99
Results.....	100
Discussion.....	105
Conclusions	107
References.....	107
ANEXOS	112
DISCUSSÃO GERAL	115
CONCLUSÃO GERAL.....	118
REFERÊNCIAS (Introdução e Discussão geral).....	120

1 SALGADO-CAXITO, M. **Prevalência, fatores de risco e infecções virais associadas**
2 **com *Escherichia coli* resistentes a cefalosporinas de espectro estendido em cães.**
3 Botucatu, 2020. 125p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e
4 Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
5 Filho”.

6

7 **RESUMO**

8 A Resistência Antimicrobiana (RAM) é atualmente um dos maiores problemas de saúde
9 animal e humana. Apesar de *Enterobacterales* resistentes a cefalosporinas de espectro
10 estendido (ESCR-E) ser cada vez mais relatado em cães, os fatores de risco promovendo
11 sua circulação entre animais de companhia têm recebido pouca atenção. Em particular, a
12 influência de infecções e tratamentos de vírus entéricos na circulação de ESCR-E é
13 desconhecida. Nesta tese, nosso objetivo foi estimar a prevalência global e a estrutura
14 populacional de *Escherichia coli* produtoras de β -lactamases de espectro estendido
15 (ESBL-*E. coli*) a nível mundial e investigar a influência de vários fatores de risco dos
16 tutores e dos cães na presença de ESCR-*E. coli* em cães, incluindo a infecção e a
17 antibioticoterapia profilática de parvovirose canina (CPV) e cinomose (CDV) no Brasil
18 (Botucatu, São Paulo). No capítulo 1, realizamos uma *scoping review* e meta-análise para
19 estimar a prevalência e estrutura populacional de ESBL-*E. coli* em cães e gatos. A
20 prevalência foi estimada em 8.63% [IC 95%: 8.04; 9.27] em cães e 8.31% [IC 95%: 7.24;
21 9.52] em gatos e 60 diferentes genótipos de ESBL e 171 tipos sequenciais (ST) distintos
22 de cepas *E. coli* resistentes foram descritos em cães e gatos globalmente. Além disso,
23 *bla*_{CTX-M-15} e *bla*_{SHV-12} assim como ST38 e ST131 isolados de animais de companhia
24 foram encontrados em todos os continentes. No segundo capítulo, estimamos a
25 prevalência de ESCR-*E. coli* em cães (9,2%) e conduzimos questionários aos tutores para
26 identificar os fatores de risco associados com a colonização fecal. O uso de antibióticos
27 no último ano, contato direto com animais de produção e ausência de vermifugação
28 aumentou a probabilidade de colonização fecal por ESCR-*E. coli* em cães. No terceiro
29 capítulo, mostramos que a infecção e tratamento para CPV aumentou significativamente
30 a prevalência de ESCR-E (*E. coli* e *Klebsiella pneumoniae*) em cães (36,5%) comparado
31 com a infecção de CDV (15%) ou ausência de doenças infecciosas (9,2%). Além disso,
32 genes ESBL foram amplamente detectados (70%) entre isolados recuperados antes da

33 antibioticoterapia, principalmente *bla*_{CTX-M-type}. Também mostramos que a prevalência
34 aumenta 1-28 dias após antibioticoterapia e ESCR-*E. coli* foram detectados até 50 dias
35 após o tratamento. Nossos resultados sugerem que cães com enteropatógenos
36 (endoparasitas e vírus entéricos) podem exercer um importante papel na disseminação de
37 ESCR-*E. coli* embora os mecanismos responsáveis por essas observações permaneceram
38 desconhecidas. Esta tese sugere que o aumento da vermifugação e cobertura vacinal
39 contra vírus entéricos poderiam potencialmente reduzir a disseminação de ESCR-*E. coli*
40 em cães. Nossos resultados enfatizam a necessidade de implementar programas de
41 vigilância nacional sobre o uso de antibióticos no setor veterinário e bactérias resistentes
42 a antimicrobianos em animais de companhia para implementar estratégias eficazes para
43 limitar a propagação da RAM.

44 **Palavras-chave:** animais de companhia, Brasil, β -lactamases de espectro estendido,
45 cinomose, doenças infecciosas, ESBL, parvovirose, resistência antimicrobiana,
46 vermifugação.

47 SALGADO-CAXITO, M. **Prevalence, risk factors, and viral infections associated**
48 **with extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in dogs.** Botucatu,
49 2020. 125p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus
50 de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

51

52 **ABSTRACT**

53 Antimicrobial resistance (AMR) is currently one of the major threats for both animal and
54 human health. Despite extended-spectrum cephalosporin-resistant *Enterobacterales*
55 (ESCR-E) being increasingly reported in dogs, the risk factors promoting their circulation
56 among companion animals has received less attention. In particular, the influence of
57 infections and treatments of enteric virus on the circulation of ESCR-E is unknown. In
58 this thesis, we aimed to estimate the global prevalence and population structure of
59 extended-spectrum beta-lactamases producing-*Escherichia coli* (ESBL-*E. coli*)
60 worldwide and to investigate the influence of several owner and dog’s risk factors on the
61 presence of ESCR-*E. coli* in dogs including the infection and prophylactic antibiotic
62 therapy of canine parvovirus (CPV) and canine distemper (CDV) in Brazil (Botucatu, Sao
63 Paulo). In the chapter 1, we performed a scoping review and metanalyses to estimate the
64 global prevalence and population structure of ESBL-*E. coli* in dogs and cats. The
65 estimated prevalence was 8.63% [95% CI: 8.04; 9.27] in dogs and 8.31% [95% CI: 7.24;
66 9.52] in cats and 60 different genotypes of ESBL and 171 distinct sequence types (ST) of
67 resistant *E. coli* strains have been described in dogs and cats worldwide. In addition,
68 *bla*_{CTX-M-15} e *bla*_{SHV-12} as well ST38 and ST131 from companion animals were found in
69 all continents. In the second chapter, we estimated the prevalence of ESCR-*E. coli* in dogs
70 (9.2%) and conducted questionnaires to owners to identify risk factors associated with
71 the fecal carriage. The use of antibiotics in the last year, direct contact with livestock, and
72 absence of deworming increased the likelihood for fecal carriage of ESCR-*E. coli* in dogs.
73 In our third chapter, we showed that CPV infection and treatment significantly increases
74 the prevalence of ESCR-E (i.e., *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae*) in dogs (36.5%)
75 compared to CDV infection (15%) or absence of infectious diseases (9.2%). In addition,
76 ESBL genes were widely detected (70%) among isolates recovered before antibiotic
77 therapy, particularly *bla*_{CTX-M-type}. We also showed that the prevalence increases 1-28 days
78 after antibiotic therapy and ESCR-*E. coli* were detected up to 50 days after the treatment.

79 Our results suggest that dogs with enteropathogens (i.e., endoparasites and enteric
80 viruses) may play an important role in the dissemination of ESCR-*E. coli* although the
81 mechanisms behind of these observations remained unclear. This thesis suggests that
82 increasing deworming and vaccination coverage of enteric virus could potentially the
83 dissemination of ESCR-*E. coli* in dogs. Our result stress the need to implement national
84 surveillance of antibiotic use on the veterinary sector and antimicrobial resistant bacteria
85 in companion animals to implement effective strategies to limit the spread of AMR.

86 **Keywords:** antimicrobial resistance, Brazil, companion animals, deworming, canine
87 distemper, extended-spectrum β -lactamases, ESBL, infectious diseases, canine
88 parvovirus.

89 INTRODUÇÃO

90

91 A Resistência Antimicrobiana é atualmente uma das maiores ameaças à saúde
92 humana e animal (BENGTSSON; GREKO, 2014; WHO, 2017). O aumento da RAM em
93 infecções bacterianas têm causado aproximadamente 700,000 mortes humanas anuais
94 devido a tratamentos antimicrobianos ineficazes (IACG, 2019). Similarmente, a RAM
95 causa grandes perdas econômicas. Estima-se uma perda de até US\$100 trilhões de dólares
96 do PIB mundial até 2050 caso a RAM não seja contida (O'NEILL, 2016). Além do
97 aumento da morbidade e mortalidade em humanos, a RAM também é um grande
98 problema no setor agropecuário, uma vez que a maioria dos antimicrobianos de
99 importância crítica para a saúde humana também é utilizada para tratar infecções em
100 animais de produção (VAN BOECKEL et al., 2019). Entretanto, a circulação e o impacto
101 da RAM entre cães e gatos têm recebido pouca atenção apesar do uso frequente de
102 antimicrobianos para tratar infecções em animais de companhia (SHIMIZU et al., 2017).
103 Mesmo com potencial circulação da RAM entre animais de companhia e humanos ou
104 animais de produção, apenas alguns países de alta renda possuem programas nacionais
105 que abordam o uso de antibióticos entre animais de companhia e a vigilância de ESBL-
106 *E. coli* em cães e gatos (DE JONG et al., 2013; RESAPATH, [s.d.]; SCHWARZ et al.,
107 2007; SVARM, [s.d.]; VET-LIRN, [s.d.]). Em contraste, não existem programas similares
108 para reduzir a RAM em animais de companhia em países de baixa e média renda.

109 Uma das principais preocupações em relação a RAM é a disseminação de
110 *Enterobacteriaceae* resistentes a cefalosporinas de espectro estendido, em especial
111 *Escherichia coli* (ESCR-*E. coli*) (EWERS et al., 2012). ESCR-*E. coli* têm sido reportada
112 mundialmente em cães e gatos (HONG et al., 2019; LIAKOPOULOS et al., 2018;
113 MAEYAMA et al., 2018; PIRES et al., 2016; UMEDA et al., 2019). No Brasil, onde se
114 encontra a segunda maior população de cães do mundo com mais de 80 milhões
115 (BAQUERO; QUEIROZ, 2019; BENAVIDES et al., 2019; CRMV/SP, 2019), estudos
116 prévios reportaram prevalências de ESCR-*E. coli* em cães de até 25% (CARVALHO et
117 al., 2016; MELO et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2016). Embora comumente reportado,
118 não existem programas nacionais de vigilância sobre a RAM na América Latina, o que

119 dificulta nosso entendimento sobre os fatores influenciando a propagação de ESCR-*E.*
120 *coli*.

121 Identificar os fatores para aquisição e propagação de ESCR-*E. coli* entre animais
122 de companhia é crucial para a implementação de estratégias de prevenção e controle para
123 limitar a sua disseminação. Embora seja esperado que o uso de antimicrobianos esteja
124 relacionado com as taxas de RAM em animais de companhia, poucos estudos testaram
125 essa hipótese. Na Europa, um limitado número de estudos identificou que o uso de
126 antimicrobianos, consumo de carne crua, hospitalização e contato com animais de
127 produção aumenta a probabilidade de colonização fecal em cães (SCHMIDT et al., 2015;
128 VAN DEN BUNT et al., 2020; WEDLEY et al., 2017). No entanto, no nosso
129 conhecimento, não existem estudos conduzidos na América Latina onde fatores
130 semelhantes como contato com animais de produção portadores de ESCR-*E. coli* pode
131 estar promovendo a aquisição e circulação destas bactérias entre animais de companhia
132 (SILVA; LINCOPAN, 2012). Da mesma forma, outros fatores relacionados aos tutores
133 como uso inapropriado de antimicrobianos em seus animais pode estar promovendo a
134 disseminação de ESCR-*E. coli* entre animais de companhia.

135 Outro fator não explorado que pode estar influenciando a emergência e
136 disseminação de ESCR-*E. coli* em cães são as infecções por vírus causadores de enterites
137 severas e que requerem tratamento profilático com antimicrobianos. Por exemplo,
138 parvovirose canina (CPV, do inglês *canine parvovirus*) e cinomose (CDV, do inglês
139 *canine distemper*) são vírus entéricos que causam imunossupressão do hospedeiro e
140 alteram marcadamente a microbiota intestinal (MYLONAKIS; KALLI; RALLIS, 2016;
141 RENDON-MARIN et al., 2019; WANG; WANG, 2019; ZHAO et al., 2017). Além disso,
142 o tratamento de infecções por CPV e CDV geralmente inclui o uso profilático de
143 cefalosporinas de terceira geração para evitar infecções bacterianas secundárias
144 (DELUCCHI; FRAGA; ZUNINO, 2017; KILIAN et al., 2018; MANGIA; PAES, 2016;
145 MYLONAKIS; KALLI; RALLIS, 2016; NOBLEZA et al., 2017; PAES, 2016). Portanto,
146 esses tratamentos poderiam aumentar a colonização fecal de ESCR-*E. coli* de cães
147 tratados, uma vez que cefalosporinas de terceira geração são excretadas em parte na sua
148 forma inalterada pelos sais biliares e podem exercer pressão de seleção para RAM em
149 enterobactérias (BURDET et al., 2019). A associação entre infecções por CPV e CDV e
150 ESCR-*E. coli* pode ser particularmente relevante em países como Brasil onde a baixa

151 cobertura vacinal contra essas viroses resultam em prevalências maiores de 45% (ALVES
152 et al., 2018; BUDASZEWSKI et al., 2014). Contudo, no nosso conhecimento, nenhum
153 estudo explorou se a infecção e tratamento dessas viroses pode influenciar a colonização
154 fecal de ESCR-*E. coli* em cães.

155 A produção de enzimas β -lactamases de espectro estendido (ESBL) é o principal
156 mecanismo associado ao fenótipo ESCR. Embora ESBL-*E. coli* venha sendo reportado
157 mundialmente em animais de companhia (HONG et al., 2020; KASPAR et al., 2018;
158 MELO et al., 2018; WEDLEY et al., 2017), a prevalência global e isolados ESBL-*E. coli*
159 circulando em animais de companhia permanecem desconhecidos. Nesta tese, nosso
160 objetivo foi estimar a prevalência global e estrutura populacional de ESBL-*E. coli* a nível
161 mundial e investigar a influência de severos fatores de risco dos tutores e dos cães para a
162 presença de ESCR-*E. coli* em cães incluindo infecções e antibioticoterapia profilática
163 para CPV e CDV no Brasil.

CONCLUSÃO GERAL

Nesta tese, mostramos que a presença de microorganismos externos (endoparasitas, CPV e CDV) foram associados à colonização fecal de ESCR-*E. coli* em cães, sugerindo que cães infectados por esses enteropatógenos podem exercer um importante papel na disseminação de ESCR-*E. coli*. No entanto, os mecanismos detrás destas observações require maiores investigações. No Brasil, a alta prevalência de viroses entéricas como CPV e CDV podem estar agravando o problema da RAM entre cães. Portanto, nossos resultados sugerem que o aumento da cobertura vacinal de CPV e CDV pode ajudar a reduzir a disseminação de ESCR-*E. coli*.

Como já descrito no setor agropecuário, a colonização fecal ESCR-*E. coli* entre cães pode refletir um alto, mas não estimado, uso irracional de antimicrobianos entre animais de companhia em países de baixa e média renda como Brasil. Por exemplo, regulamentações nacionais não requerem que as prescrições veterinárias, necessárias para comprar antimicrobianos em estabelecimentos agropecuários, sejam retidas e subsequentemente verificadas pelas autoridades de saúde. Isto certamente incentiva a venda de antimicrobianos aos tutores sem consulta prévia por um veterinário ou diagnóstico dos patógenos causadores dos sintomas favorecendo o mau uso dessas medicações. O Brasil possui a segunda maior população de cães do mundo, mas nenhum programa nacional é implementado para regulamentar o uso e prescrição de antibióticos entre os animais de companhia. Portanto, programas de vigilância são urgentemente necessários para monitorar a extensão do problema da ESBL e avaliar diferentes estratégias para mitigar a sua disseminação. Esta tese também destaca a necessidade de conscientização de veterinários e proprietários de animais de estimação sobre o uso correto de antibióticos.

Apesar do crescente aumento no número de estudos sobre ESBL-*E. coli* nos últimos 10 anos, ainda há uma falta de compreensão sobre o papel dos animais de companhia na disseminação da ESBL-*E. coli*, particularmente em gatos e países de baixa renda. A alta diversidade de clones ESBL-*E. coli* que circulam entre cães e gatos representa potencial ameaça para a saúde humana e animal. Assim, pesquisas futuras devem se concentrar na identificação dos fatores de risco, da relevância clínica dessas

2806 bactérias e do impacto econômico das infecções por ESBL-*E. coli* em animais de
2807 companhia. Além disso, a extensão da transmissão entre cães e outras espécies como
2808 humanos e animais de produção deveria ser estimada.

2809 Várias limitações desta tese poderiam ser abordadas em pesquisas futuras.
2810 Primeiro, apesar do poder estatístico suficiente para detectar diferenças na prevalência
2811 entre cães infectados por CPV, CDV e não infectados, a alta mortalidade de cães
2812 infectados (54,3%) e a falta de interesse de vários proprietários diminuiu o número de
2813 cães que foram seguidos após a terapia antimicrobiana, limitando o poder de detectar
2814 ESBL-*E. coli* dois meses após o tratamento. Em segundo lugar, a tipagem molecular
2815 adicional de bactérias resistentes e genes resistentes permitirá entender se o aumento de
2816 ESCR-*E. coli* observado em cães após a antibioticoterapia é devido à manutenção de
2817 mesmos clones ESCR-*E. coli* detectados antes do tratamento, transmissão de genes
2818 resistentes entre cepas não relacionadas ou aquisição de novas bactérias do hospital
2819 veterinário, da casa do cão, de outras fontes (por exemplo, humanos e animais), ou do
2820 meio ambiente. Finalmente, a potencial influência causal entre CPV ou vermifugação e
2821 ESCR-*E. coli* deve ser investigada e pode exigir a análise do microbioma do cão incluindo
2822 o viroma.

REFERÊNCIAS (Introdução e Discussão geral)

2824

2825 ALVES, C. D. B. T. et al. Identification of enteric viruses circulating in a dog population
2826 with low vaccine coverage. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 790–794,
2827 dez. 2018.

2828 BAQUERO, O. S.; QUEIROZ, M. R. Size, spatial and household distribution, and rabies
2829 vaccination coverage of the Brazilian owned-dog population. **Transboundary and**
2830 **Emerging Diseases**, v. 66, n. 4, p. 1693–1700, 2019.

2831 BENAVIDES, J. A. et al. An evaluation of Brazil's surveillance and prophylaxis of
2832 canine rabies between 2008 and 2017. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 8,
2833 p. e0007564, 5 ago. 2019.

2834 BENGTTSSON, B.; GREKO, C. Antibiotic resistance—consequences for animal health,
2835 welfare, and food production. **Uppsala Journal of Medical Sciences**, v. 119, n. 2, p. 96–
2836 102, maio 2014.

2837 BUCKOVÁ, B. et al. The anti-parasitic effect of probiotic bacteria via limiting the
2838 fecundity of *Trichinella spiralis* female adults. **Helminthologia**, v. 55, n. 2, p. 102–111,
2839 1 jun. 2018.

2840 BUDASZEWSKI, R. DA F. et al. Genotyping of canine distemper virus strains
2841 circulating in Brazil from 2008 to 2012. **Virus Research**, v. 180, p. 76–83, 13 fev. 2014.

2842 BURDET, C. et al. Ceftriaxone and Cefotaxime Have Similar Effects on the Intestinal
2843 Microbiota in Human Volunteers Treated by Standard-Dose Regimens. **Antimicrobial**
2844 **Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 6, 2019.

2845 BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated Functional Classification of β -Lactamases.
2846 **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969–976, mar. 2010.

2847 CARVALHO, A. C. et al. Resistance patterns, ESBL genes, and genetic relatedness of
2848 *Escherichia coli* from dogs and owners. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1,
2849 p. 150–158, jan. 2016.

- 2850 CRMV/SP. **Animais de rua: um problema que demanda participação coletiva.**
 2851 Disponível em: <<https://www.crmvsp.gov.br/site/releases.php>>. Acesso em: 27 jul. 2020.
- 2852 DAHMS, C. et al. Occurrence of ESBL-Producing *Escherichia coli* in Livestock and
 2853 Farm Workers in Mecklenburg-Western Pomerania, Germany. **PLOS ONE**, v. 10, n. 11,
 2854 p. e0143326, 25 nov. 2015.
- 2855 DE JONG, A. et al. Pan-European resistance monitoring programmes encompassing
 2856 food-borne bacteria and target pathogens of food-producing and companion animals.
 2857 **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 41, n. 5, p. 403–409, 1 maio 2013.
- 2858 DELUCCHI, L.; FRAGA, M.; ZUNINO, P. Effect of the probiotic *Lactobacillus murinus*
 2859 LbP2 on clinical parameters of dogs with distemper-associated diarrhea. **Canadian**
 2860 **Journal of Veterinary Research**, v. 81, n. 2, p. 118–121, abr. 2017.
- 2861 DIAB, M. et al. High Prevalence of Non-ST131 CTX-M-15-Producing *Escherichia coli*
 2862 in Healthy Cattle in Lebanon. **Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 23, n.
 2863 2, p. 261–266, mar. 2017.
- 2864 EWERS, C. et al. Extended-spectrum β -lactamase-producing and AmpC-producing
 2865 *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on
 2866 public health: a global perspective. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 7, p.
 2867 646–655, jul. 2012.
- 2868 GERBABA, T. K. et al. *Giardia duodenalis* -induced alterations of commensal bacteria
 2869 kill *Caenorhabditis elegans*: a new model to study microbial-microbial interactions in
 2870 the gut. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.
 2871 308, n. 6, p. G550–G561, 15 mar. 2015.
- 2872 HONG, J. S. et al. Clonal Spread of Extended-Spectrum Cephalosporin-Resistant
 2873 *Enterobacteriaceae* Between Companion Animals and Humans in South Korea.
 2874 **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1371, 18 jun. 2019.
- 2875 HONG, J. S. et al. Molecular Characterization of Fecal Extended-Spectrum β -Lactamase-
 2876 and AmpC β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* From Healthy Companion Animals
 2877 and Cohabiting Humans in South Korea. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 674, 15
 2878 abr. 2020.

- 2879 IACG. **No Time to Wait: Securing the future from drug-resistant infections.**
 2880 Disponível em: <[http://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-](http://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/final-report/en/)
 2881 [group/final-report/en/](http://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/final-report/en/)>. Acesso em: 23 jul. 2020.
- 2882 KASPAR, U. et al. Zoonotic multidrug-resistant microorganisms among small
 2883 companion animals in Germany. **PLOS ONE**, v. 13, n. 12, p. e0208364, 7 dez. 2018.
- 2884 KILIAN, E. et al. Long-term effects of canine parvovirus infection in dogs. **PLoS ONE**,
 2885 v. 13, n. 3, 16 mar. 2018.
- 2886 LIAKOPOULOS, A. et al. Occurrence and characterization of extended-spectrum
 2887 cephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae* in healthy household dogs in Greece.
 2888 **Journal of Medical Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 931–935, 1 jul. 2018.
- 2889 MAEYAMA, Y. et al. Prevalence of ESBL/AmpC genes and specific clones among the
 2890 third-generation cephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae* from canine and feline
 2891 clinical specimens in Japan. **Veterinary Microbiology**, v. 216, p. 183–189, mar. 2018.
- 2892 MANGIA, S.; PAES, A. Cinomose. **Megid J, Ribeiro MG, Paes AC. Doenças**
 2893 **Infeciosas em Animais de Produção e de Companhia.** 1st ed. Rio de Janeiro: Roca,
 2894 p. 560–579, 2016.
- 2895 MELO, L. C. et al. Prevalence and molecular features of ESBL/pAmpC-producing
 2896 *Enterobacteriaceae* in healthy and diseased companion animals in Brazil. **Veterinary**
 2897 **Microbiology**, v. 221, p. 59–66, jul. 2018.
- 2898 MYLONAKIS, M. E.; KALLI, I.; RALLIS, T. S. Canine parvoviral enteritis: an update
 2899 on the clinical diagnosis, treatment, and prevention. **Veterinary Medicine : Research**
 2900 **and Reports**, v. 7, p. 91–100, 11 jul. 2016.
- 2901 NOBLEZA, C. K. D. et al. **Molecular detection and characterization of Canine**
 2902 **distemper virus from domestic dogs (Canis familiaris) in Quezon City, Philippines.**
 2903 Disponível em: <[/paper/Molecular-detection-and-characterization-of-Canine-Nobleza-](https://doi.org/10.1016/j.jm.2020.07.001)
 2904 [Racho/bd54d548602ff9f561ff039e682acc3e408e88e0](https://doi.org/10.1016/j.jm.2020.07.001)>. Acesso em: 6 jul. 2020.
- 2905 OLIVEIRA, P. A. DE et al. Detection of extended spectrum beta-lactamases and
 2906 resistance in members of the *Enterobacteriaceae* family isolated from healthy sheep and

- 2907 dogs in Umuarama, Paraná, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 2, p. 829, 26
2908 abr. 2016.
- 2909 O'NEILL, J. **The Review on Antimicrobial Resistance**. Disponível em: <[https://amr-](https://amr-review.org/)
2910 [review.org/](https://amr-review.org/)>. Acesso em: 29 jul. 2020.
- 2911 PAES, A. Parvovirose canina. **Megid J, Ribeiro MG, Paes AC. Doenças Infecciosas**
2912 **em Animais de Produção e de Companhia**. 1st ed. Rio de Janeiro: Roca, p. 768–785,
2913 2016.
- 2914 PIRES, J. et al. Intestinal colonisation with extended-spectrum cephalosporin-resistant
2915 *Escherichia coli* in Swiss pets: molecular features, risk factors and transmission with
2916 owners. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, n. 6, p. 759–760, dez.
2917 2016.
- 2918 RENDON-MARIN, S. et al. Tropism and molecular pathogenesis of canine distemper
2919 virus. **Virology Journal**, v. 16, n. 1, p. 30, 7 mar. 2019.
- 2920 RESAPATH. **RESAPATH | Réseau d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance**
2921 **des bactéries pathogènes animales**. Disponível em: <<https://resapath.anses.fr/>>. Acesso
2922 em: 29 jul. 2020.
- 2923 RODRÍGUEZ-BAÑO, J.; PASCUAL, A. Clinical significance of extended-spectrum β -
2924 lactamases. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 6, n. 5, p. 671–683, out. 2008.
- 2925 SCHMIDT, V. M. et al. Antimicrobial resistance risk factors and characterisation of
2926 faecal *E. coli* isolated from healthy Labrador retrievers in the United Kingdom.
2927 **Preventive Veterinary Medicine**, v. 119, n. 1–2, p. 31–40, abr. 2015.
- 2928 SCHWARZ, S. et al. The BfT-GermVet monitoring program--aims and basics. **Berliner**
2929 **Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift**, v. 120, n. 9–10, p. 357–362, out. 2007.
- 2930 SHIMIZU, T. et al. In vitro efficacy of 16 antimicrobial drugs against a large collection
2931 of β -lactamase-producing isolates of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from
2932 dogs and cats. **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 1085–1091, 1 ago. 2017.

- 2933 SILVA, K. C. DA; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro
2934 estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **Jornal Brasileiro**
2935 **de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 2, p. 91–99, abr. 2012.
- 2936 SNOW, L. C. et al. Risk factors associated with extended spectrum beta-lactamase
2937 *Escherichia coli* (CTX-M) on dairy farms in North West England and North Wales.
2938 **Preventive Veterinary Medicine**, v. 106, n. 3, p. 225–234, 1 out. 2012.
- 2939 SVARM. **Svarm – resistance monitoring - SVA**. Disponível em: </en/our-
2940 topics/antibiotics/svarm-resistance-monitoring/>. Acesso em: 29 jul. 2020.
- 2941 UMEDA, K. et al. Prevalence and genetic characterization of cephalosporin-resistant
2942 *Enterobacteriaceae* among dogs and cats in an animal shelter. **Journal of Medical**
2943 **Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 339–345, 1 mar. 2019.
- 2944 VAN BOECKEL, T. P. et al. Global trends in antimicrobial resistance in animals in low-
2945 and middle-income countries. **Science**, v. 365, n. 6459, 20 set. 2019.
- 2946 VAN DEN BUNT, G. et al. Faecal carriage, risk factors, acquisition and persistence of
2947 ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in dogs and cats and co-carriage with humans
2948 belonging to the same household. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 2,
2949 p. 342–350, 1 fev. 2020.
- 2950 VET-LIRN. **Veterinary Laboratory Investigation and Response Network**. Disponível
2951 em: <[https://www.fda.gov/animal-veterinary/science-research/veterinary-laboratory-](https://www.fda.gov/animal-veterinary/science-research/veterinary-laboratory-investigation-and-response-network)
2952 [investigation-and-response-network](https://www.fda.gov/animal-veterinary/science-research/veterinary-laboratory-investigation-and-response-network)>. Acesso em: 29 jul. 2020.
- 2953 WANG, B.; WANG, X.-L. Species diversity of fecal microbial flora in *Canis lupus*
2954 *familiaris* infected with canine parvovirus. **Veterinary Microbiology**, v. 237, p. 108390,
2955 1 out. 2019.
- 2956 WEDLEY, A. L. et al. Carriage of antimicrobial resistant *Escherichia coli* in dogs:
2957 Prevalence, associated risk factors and molecular characteristics. **Veterinary**
2958 **Microbiology**, v. 199, p. 23–30, fev. 2017.
- 2959 WHO. **Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research,**
2960 **discovery, and development of new antibiotics**, 2017. Disponível em:

2961 <[https://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-](https://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/)
2962 [bacteria/en/](https://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/)>

2963 WOERTHER, P.-L.; ANDREMONT, A.; KANTELE, A. Travel-acquired ESBL-
2964 producing *Enterobacteriaceae*: impact of colonization at individual and community level.
2965 **Journal of Travel Medicine**, v. 24, n. Suppl 1, p. S29–S34, 29 abr. 2017.

2966 ZHAO, N. et al. Impacts of canine distemper virus infection on the giant panda population
2967 from the perspective of gut microbiota. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 39954, 4 jan.
2968 2017.