



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

“ESTUDIO EXPLORATORIO DE LA PRESENCIA DE *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTORAS DE β -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO AISLADAS DE MUESTRAS CLÍNICAS DE HUMANOS, CARNE EXPENDIDA EN MERCADOS Y AVES SILVESTRES DE LA ZONA SUR DE LIMA”.

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRA EN MICROBIOLOGÍA

KATHYA CECILIA
ESPINOZA RAMIREZ

LIMA – PERÚ

2023

ASESOR

Blga. MSc. Maribel Riveros Ramirez

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

CO ASESORES

PhD. Maria J. Pons Casellas

UNIVERSIDAD CIENTIFICA DEL SUR

PhD. Joaquim Ruiz

UNIVERSIDAD CIENTIFICA DEL SUR

JURADO DE TESIS

DRA. PATRICIA SHEEN CORTAVARRIA

PRESIDENTE

DR. JOSE LUIS BAUER CUYA

VOCAL

DRA. JASMIN ELENA HURTADO CUSTODIO DE BERASTAIN

SECRETARIA

DEDICATORIA

*A mis padres por su apoyo, amor incondicional y motivación constante
para lograr todo aquello que me propongo.*

*A mi querida prima, Jacky por ser mi guía, mi ángel y quien antes de partir
me enseñó que la perseverancia y el esfuerzo son el camino para alcanzar
el éxito. Si no estás dispuesto a aprender, nadie puede enseñarte. Si estás
determinado a aprender, nadie puede detenerte.*

がんばればすごいチャンス!

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Maria J. Pons, una gran mentora y amiga que me recibió con los brazos abiertos en su laboratorio y me brindó la oportunidad de realizar esta investigación. Su confianza, dedicación y tiempo invertido fue clave para mi desarrollo en esta área de investigación.

Al Dr. Joaquim Ruiz, por su amistad y guía durante el proceso de esta investigación.

A la Dra. Maribel Riveros, por su guía y sugerencias durante la redacción de la tesis.

A mis amigas, Blga. Jacqueline Hernández y Xiomara Caffo, por su guía y apoyo incondicional durante la recolección de muestras de aves silvestres.

A mis amigos del laboratorio, por su apoyo y predisposición para apoyarme y compartir momentos gratos durante este proceso.

FUENTE DE FINANCIAMIENTO

Este trabajo se realizo en el marco del proyecto de investigación: Vigilancia de resistencia antimicrobiana, financiado por Fondecyt-Banco Mundial y la Universidad Científica del Sur mediante la subvención: N° 008-2019-

FONDECYT-BM-INC.INV

ESTUDIO EXPLORATORIO DE LA PRESENCIA DE ESCHERICHIA COLI PRODUCTORAS DE β -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO AISLADAS DE MUESTRAS CLÍNICAS DE HUMANOS, CARNE EXPENDIDA EN MERCADOS Y AVES SILVESTRES DE LA

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	eprints.gla.ac.uk Fuente de Internet	<1 %
2	Submitted to University of Sydney Trabajo del estudiante	<1 %
3	rcastoragev2.blob.core.windows.net Fuente de Internet	<1 %
4	Bilel Hassen, Monia El Bour. "Sub- and Marine Mediterranean Basin Antimicrobial Resistance and Environmental Concerns: A Case Study of Tunisia", Ocean Science Journal, 2022 Publicación	<1 %
5	www.zoores.ac.cn Fuente de Internet	<1 %
6	cris.cientifica.edu.pe Fuente de Internet	<1 %

Tabla de contenido

RESUMEN

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	1
2. MARCO TEORICO	5
2.1. <i>Escherichia coli</i>	5
2.2. Antibióticos	13
2.2.1. Mecanismo de acción de antibióticos.....	13
2.2.2. β -lactámicos	18
2.2.3. Resistencia a antibióticos	22
2.2.4. Resistencia a β -lactámicos.....	23
2.2.5. β -lactamasas	23
3. OBJETIVOS.....	29
4. METODOLOGÍA	30
4.1. Diseño de estudio	30
4.2. Área de estudio.....	30
4.3. Población muestral.....	32
4.4. Métodos	32
4.4.1. Muestras clínicas de humanos	32
4.4.2. Muestras de carnes expandidas en mercados	32
4.4.3. Muestra de aves silvestres.....	33
4.4.4. Procesamiento de muestras:	36
5. RESULTADOS.....	47
5.1. Clínica de humanos	47

5.2. Carne expendida de mercados del Distrito de Villa el Salvador	54
5.3. Aves Silvestres de la Zona de Refugio de vida Silvestres los Pantanos de Villa	61
5.4. Comparación de <i>E. coli</i> productoras de BLEE aisladas en muestras clínicas, carne de mercado y aves silvestres.....	66
6. DISCUSIÓN	71
7. LIMITACIONES	88
8. CONCLUSIONES.....	89
9. RECOMENDACIONES.....	90
10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	91
ANEXOS	

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Porcentaje de E. coli aisladas de diferentes tipos de muestra provenientes del hospital Maria Auxiliadora – San Juan de Miraflores, 2021	48
Gráfico 2. Susceptibilidad antimicrobiana de E. coli aisladas de muestras clínicas de humanos del hospital Maria Auxiliadora, San Juan de Miraflores, 2021.....	49
Gráfico 3. Susceptibilidad antimicrobiana de E. coli productoras de BLEE aisladas de muestras clínicas de humanos del hospital María Auxiliadora, SanJuan de Miraflores, 2021.....	50
Gráfico 4. Susceptibilidad antimicrobiana de E. coli aisladas de muestras de carnade mercado del distrito de Villa el Salvador, Lima, 2021.	54
Gráfico 5. Susceptibilidad antimicrobiana de E. coli productoras de BLEE aisladas de carne de pollo expendidas en Mercados del distrito de Villa El Salvador, Lima (n=25).	56
Gráfico 6. Susceptibilidad antimicrobiana de E. coli productoras de BLEE aisladas de carne de vacuno expendidas en Mercados del distrito de Villa El Salvador, Lima (n=11).	57
Gráfico 7. Susceptibilidad antimicrobiana de E. coli aisladas de aves silvestres de la Zona de Refugio de Vida Silvestre los Pantanos de Villa, Lima Perú (n=24).	63
Gráfico 8. Niveles de resistencia antibiótica de E. coli productoras de BLEE aisladas de Gallinazo cabeza negra (<i>Coragyps atratus</i>) y Cormorán Neotropical (<i>Phalacrocorax brasilianus</i>) de la Zona de Refugio de Vida	

Silvestre los Pantanosde Villa, Lima Perú..... 64

Gráfico 9. Niveles de resistencia a antibióticos en aislados de E. coli
productores de BLEE de muestras clínicas, carnes de mercado y aves de
vida libre de la zona sur de Lima, Perú (n=74)..... 67

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Clasificación y mecanismo de acción de antibióticos. Figura modificaday adaptada de la información de “Antimicrobial mechanism of action” por Calvo y Martinez, 2009.	13
Figura 2. Puntos de inhibición de la síntesis de peptidoglucano por antibióticos. Figura modificada y adaptada de la información del libro “Microbiología veterinaria” de Vadillo, 2002.	16
Figura 3. Zonas de toma de muestras en la zona sur de Lima. 1). Mercados deVilla el Salvador, 2). Hospital Maria Auxiliadora 3). Refugio de vida silvestresLos Pantanos de Villa. Google Earth	31
Figura 4. Ubicación de los “Pantanos de Villa” y puntos de captura de aves silvestre con redes de niebla (círculos rojos). 400m. Google earth.....	31
Figura 5. Identificación de cloaca aviar y sus estadios reproductivos. Fuente: Manual de métodos de campo para el monitoreo de aves terrestres por Ralph, 1996.....	35
Figura 6. Dendrograma de la relación clonal de las E. coli productoras de BLEE aisladas de muestras clínicas de humanos del Hospital Maria Auxiliadora- San Juan de Miraflores, Lima.....	53
Figura 7. Dendrograma de la relación clonal de las E. coli productoras de BLEE aisladas de muestras de carne de pollo y vacuno expendidas en mercados del distrito Villa el Salvador, Lima.....	60
Figura 8. Dendrograma de la relación clonal de las E. coli productoras de BLEE aisladas de muestras clínicas, carne de mercado y aves silvestres de vida libre enla zona sur de Lima, Perú.	70

ÍNDICE CUADROS

Cuadro 1. Esquema de clasificación de los antibióticos β -lactámicos, basado en la estructura química.	20
Cuadro 2. Listado con las secuencias de nucleótidos de los cebadores empleados y las condiciones de PCR para la amplificación de genes de resistencia para β - lactámicos.	41
Cuadro 3. Prevalencia de genes de resistencia aislados de muestras clínicas de humanos del hospital Maria Auxiliadora- San Juan de Miraflores, 2021.....	51
Cuadro 4. Número de cepas E. coli aisladas por tipo de muestras de carne de mercado.....	55
Cuadro 5. Presencia de genes de resistencia para E. coli productora de BLEE aisladas de carne de pollo y vacuno en Mercados del distrito de Villa El Salvador, Lima.	58
Cuadro 6. Porcentaje de aves silvestres capturadas para el estudio divididas por especies de la Zona de Refugio de Vida Silvestre los Pantanos de Villa, Lima Perú.....	61
Cuadro 7. Comparación de perfil de resistencia de antibióticos y presencia de genes de resistencia antibiótica aisladas de Gallinazo cabeza negra (Coragyps atratus) y Cormorán Neotropical (Phalacrocorax brasilianus) de la Zona de Refugio de Vida Silvestre los Pantanos de Villa, Lima Perú.....	65
Cuadro 8. Presencia de genes de resistencia antibiótica detectados en E. coli aisladas de muestras de clínica humana, carne de mercado y aves silvestres de vida libre de la zona sur de Lima, Perú.	68

ÍNDICE DE FOTOS

Foto 1. Identificación visual e hisopado de heces frescas en suelo. a) Heces de Ostrero americano, heces de Cormorán Neotropical, c). Heces de gallinazo cabezanegra. Fuente Propia.....	35
Foto 2. Efecto sinérgico del inhibidor: Efecto tapón de corcho. Fuente propia.	41

ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo 1.** Constancia de aprobación del proyecto de investigación por el comité de ética para el uso de animales de la UPCH.....
- Anexo 2.** Permiso de investigación bajo la Resolución del jefe del refugio de vida silvestre Los Pantanos de Villa.
- Anexo 3.** Carta de consentimiento de ingreso a la ANP los Pantanos de Villa de PROHVILLA.
- Anexo 4.** Constancia del comité institucional de ética en investigación del Hospital María Auxiliadora.
- Anexo 5.** Constancia institucional de ética en investigación de la UCSUR.....

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo determinar los niveles de resistencia a los antimicrobianos y clonalidad de *Escherichia coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas de tres diferentes orígenes: Clínica humana, carne expendida de mercado y aves silvestres de vida libre de la zona sur de Lima.

Se recolectaron 125 muestras (63 muestras clínicas humanas, 21 muestras de carne de mercados y 41 muestras de hisopado cloacal y heces frescas de aves silvestres de vida libre). Se aisló e identificó fenotípicamente un total de 138 *E. coli* que provenían de muestras clínicas humanas (n= 48, 38.4%), carne de mercado (n=66, 52.8%) y aves de vida libre (n=24, 19.2%). Entre estos la presencia total de *E. coli* productoras de BLEE fue de 74 cepas con 70.8% (34/48) en aislados clínicos, 54.6% (36/66) en carnes de mercado y 16.7% (4/24) en aves silvestres de vida libre.

Los niveles de resistencia para *E. coli* productoras de BLEE aislados de muestras clínicas humanas fue 88.2% (30/34) para ácido nalidíxico, ciprofloxacino y levofloxacino, 79.4% (27/34) cotrimoxazol, 55.9% (19/34) tobramicina y 14.7% (5/34) colistina. En carne de mercado, el 97% (35/36) para tetraciclinas, 94% (34/36) para ácido nalidíxico, ciprofloxacino y levofloxacino, 86% (31/36) cotrimoxazol, 78% (28/36) tobramicina y 47% (17/36) colistina. En aves silvestres, solo las muestras de heces frescas de Gallinazo Cabeza negra (*Coragyps atratus*) y Cormorán Neotropical (*Phalacrocorax brasilianus*) presentaron resistencia al 100% (4/4) ácido nalidíxico, ciprofloxacino y

levofloxacino, 50% (2/4) gentamicina, 100% (4/4) para tobramicina, tetraciclina y cotrimoxazol. Se observó un patrón de Multirresistencia (MDR) en los diferentes tipos de muestras.

Entre los aislados de *E. coli* BLEE se reportó con mayor frecuencia la variante CTX-M-55 para los tres orígenes. En humanos y carnes de mercado se detectó la variante CTX-M-15, y, finalmente solo en humanos se detectó la variante CTX-M-27. Además, se detectaron las variantes CTX-M-65 y SHV-27 solo en carne de pollo. No se observó relación clonal entre las *E. coli* productoras de BLEE del estudio, mostrando una elevada diversidad clonal de los aislados.

Palabras claves: *E. coli*, resistencia antibiótica, β -lactamasa de espectro extendido, *bla*_{CTX-M}, Una salud.

ABSTRACT

The aim of this study was to identify, determine the levels of antimicrobial resistance and clonality of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) in *E. coli* from three different origins: Human clinic, Market meat and free-living wild birds in the south of Lima.

A total of 125 samples were collected, corresponding to 63 human clinical, 21 market meat and 41 of cloacal swabs and fresh feces from free-living wildbirds. Subsequently, a total of 138 *E. coli* was isolated and phenotypically identified from human clinical (n=48) market meat (n=66) and free-living wild birds (n=24). Among, the presence of ESBL-producing *E. coli* was 74 strains with 70.8% (34/48) in clinical isolates, 54.6% (36/66) in market meat and 16.7% (4/24) in wild birds.

The resistance levels for ESBL producing *E. coli* from clinical isolated was 88.2% (30/34) for nalidixic acid, ciprofloxacin and levofloxacin, 79.4% (27/34) for cotrimoxazole, 55.9% (19/34) for tobramycin, 14.7% (5/34) for colistin. In market meat samples was 97% (35/36) presented resistance to tetracyclines, 94% (34/36) to nalidixic acid, ciprofloxacin and levofloxacin, 86% (31/36) cotrimoxazole, 78% (28/36) tobramycin and 47% (17/36) for colistin. Finally, in wild birds only the samples of fresh feces of Black Vulture (*Coragyps atratus*) and Neotropical Cormorant (*Phalacrocorax brasilianus*) presented resistance to 100% (4/4) nalidixic acid, ciprofloxacin and levofloxacin, 50% (2/4) gentamicin, 100% (4/4) tobramycin, tetracycline and cotrimoxazole. A Multidrug Resistance (MDR) pattern was observed in the

different types of samples.

Among the ESBL-producing *E. coli* isolates, the CTX-M-55 variant was reported most frequently reported for the three origins. In humans and market meat, the CTX-M-15 variant was detected, while the CTX-M 27 variant was detected only in humans. In addition, the CTX-M-65 and SHV-27 variants, were detected in chicken meat. No clonal relationship was observed between the ESBL-producing *E. coli* in the study, showing high clonal diversity of the isolates.

Keywords: *E. coli*, antibiotic resistance, extended-spectrum β -lactamase, bla_{CTX-M}, One Health.

1. INTRODUCCIÓN

La resistencia antibiótica es un problema multifactorial a nivel mundial, como resultado de una exposición prolongada y/o fallida a los tratamientos terapéuticos o profilácticos con antibióticos, generando una adaptación rápida frente a esa presión selectiva que se observa generalmente en bacterias patógenas primarias y oportunistas, presentando una resistencia a uno o más agentes antibacterianos definido en base a los puntos de corte de la concentración mínima inhibitoria (MIC) (1,2,3).

Por ello, se debe abordar a través del enfoque “Una Salud” (One Health), permitiéndonos reconocer la interconexión entre animales, humanos y medio ambiente. En las últimas décadas se ha observado un incremento en los niveles de resistencia de bacterias patógenas y oportunistas destacando a las enterobacterias como: *Escherichia coli*. Hasta la fecha los estudios con enfoque de “una salud” son limitados, en especial en países de media y baja renta como Perú (3,9,13).

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El incremento de los niveles de resistencia a antibióticos se ha considerado como un problema de salud pública prioritario, estimando que el número de muertes debido a microorganismos resistentes a antibióticos podría aumentar a más de 10 millones al año para el 2050 (4). Recientemente se han atribuido 4,95 millones de muertes anuales asociadas a las infecciones por bacterias resistentes a los antibióticos en el mundo (6).

Por ello, La organización mundial de la salud (OMS) en colaboración con la organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura (FAO) y la organización mundial de sanidad animal (OMSA) formaron la alianza tripartita para fomentar la colaboración multidisciplinaria entre la salud pública, salud animal en combinación con la seguridad alimentaria, donde declararon la resistencia antibiótica como una de las preocupaciones prioritarias destacando la estrategia o enfoque “Una Salud” que desde la perspectiva de este concepto, la resistencia antibiótica necesita de estrategias multisectoriales para mejorar la salud humana, animal y ambiental, reconociendo la interconexión de los ecosistemas en el surgimiento y diseminación de genes de resistencia. (3,6,7).

La OMS realizó una lista global de prioridad de patógenos que se divide en tres categorías crítica, elevada y media para la investigación, descubrimiento y desarrollo de nuevos antibióticos. En el grupo de prioridad crítica incluye bacterias multirresistentes (MDR) donde destaca *E. coli* resistentes a carbapenémicos y productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) (8).

E. coli debido a sus características biológicas, plasticidad genómica, ecología y la fácil diseminación en diferentes entornos, se considera un buen bioindicador de contaminación fecal y actividad antropogénica en estudios de diferentes ambientes, teniendo en cuenta su gran adaptabilidad a ambientes adversos con constantes cambios, como el uso elevado de antibióticos que generan una presión selectiva permitiéndole desarrollar diferentes

mecanismos de resistencia antibiótica, principalmente a mecanismos involucrados con producción de β -lactamasas de espectro extendido (9,10). Por ello, *E. coli* representa un reservorio importante de genes de resistencia, que llegan al humano por contacto directo a través de heces de animales o por cadena alimenticia siendo un riesgo para la salud (9).

La actividad antropogénica es una de las principales causas de la selección y diseminación de genes de resistencia, debido al uso excesivo e inadecuado de antibióticos para el uso clínico. Además, los antibióticos son utilizados como tratamientos profilácticos o promotores de crecimiento en animales destinados a consumo humano. Asimismo, un saneamiento deficiente del manejo de desechos las aguas residuales o aguas contaminadas con efluentes que contienen productos farmacéuticos o provenientes de operaciones ganadera de crianza intensiva también contribuyen a este fenómeno (11,12).

En América Latina se han presentado niveles de resistencia a antibióticos cada vez más altos en los últimos años y ello se ha visto reflejado en la reducción pérdida de la eficacia de estos compuestos, afectando la capacidad para poder tratar algunas infecciones y aumentando los costos de tratamiento. Por ello, en el Perú, la gran mayoría de estudios se han realizado para determinar los niveles de resistencia a antibióticos asociados al sector humano clínico y animal (13).

En Perú existen escasos reportes con abordaje de One Health; así, Murray *et al.*, reportaron diferentes niveles de exposición a antibióticos en bacterias aisladas de heces de pollos de crianza intensiva, pollos de crianza orgánica y humanos (14). Procedieron a identificar *E. coli* de estas muestras y las tasas

más altas de resistencia a antibióticos fueron aisladas de *E. coli* de pollo en comparación con humanos, incluidos MDR (37,3%) además se encontró mayor resistencia a florfenicol (un antibiótico comúnmente utilizado como promotor del crecimiento en aves de corral, pero no aprobado para uso humano) en pollo (43,1%, n=71) que en humanos (16,7%, n=7). Además, presentaron genes que confieren resistencia a antibióticos clínicamente relevantes incluidos *mcr-1* para la resistencia transferible a la colistina, BLEE del grupo *bla*_{CTX-M}, y carbapenemasas, como *bla*_{KPC} (14).

En otro estudio realizado en el norte de Perú, Cajamarca, Hartinger *et al.* reportaron resistencia antibiótica en humanos, agua potable y animales domésticos en esta área rural andina (15). Concretamente, identificaron *E. coli* en heces de niños, animales y en las fuentes de agua potable. Los autores destacan la presencia de *E. coli* en agua por encima de los rangos permitidos por la OMS. Además, detectaron la presencia de *E. coli* en heces de animales y niños que presentaron resistencia a al menos un antibiótico (15).

En el Perú no hay casi datos sobre identificación de enterobacterias resistentes a antibióticos en animales silvestres de vida libre como aves silvestres que pueden actuar como bioindicadores del impacto antropogénico. Sin embargo, se ha reportado la presencia del 66.7% (4/6) de *E. coli* resistentes a al menos 5 familias de antibióticos en heces de aves marinas como *Sula variegata* procedentes de las islas Guañape Norte en Perú (16).

2. MARCO TEORICO

2.1. *Escherichia coli*

2.1.1. Características biológicas

Es una bacteria Gram negativa de la familia *Enterobacteriaceae*. Se caracteriza por ser oxidasa negativa, anaerobia facultativa, mesófila y presenta flagelos peritricos, además es ubicua, versátil y se encuentra integrando la microbiota intestinal de vertebrados homeotermos y poiquilotermos (17,18).

E. coli es un microorganismo con nutrición heterótrofa, es decir, utiliza compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía, destacando el uso principal de la glucosa, para dar inicio a rutas metabólicas como la glucólisis para la obtención de energía rápida, independientemente si hay o no presencia de oxígeno (21). Sin embargo, cuando hay ausencia de glucosa en el medio intercelular, *E. coli* tiene la capacidad de hidrolizar otros azúcares como la lactosa, que genera un subproducto llamado alolactosa el cual actúa como inductor en la regulación del operon lac que permite el metabolismo de la lactosa, liberando la proteína represora (*lacI*) del operador, permitiendo que se una al promotor (135). Al haber ausencia de glucosa también hay un aumento de la concentración de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) y esa se une a la proteína activadora de catabolito (CAP) que forma un complejo que permite el inicio de la transcripción de genes estructurales como *lacZ*, que codifica a la enzima betagalactosidasa, que tiene como función hidrolizar la lactosa en glucosa y galactosa así como catalizar la conversión de lactosa a alolactosa por transglicosilación, *LacY*,

que codifica a la permeasa galactosidasa y *lacA* que codifica para tiogalactosido acetiltransferasa que está involucrada en las reacciones secundarias que facilitan la utilización de los productos de la hidrólisis de lactosa (135,136,137). Sin embargo, se ha reportado que hasta un 20% de aislados de *E. coli* no metabolizan la lactosa debido a la deficiencia de la enzima lactosa permeasa codificada por el gen *lacY* (138). Por otro lado, *E. coli* al ser anaerobio facultativo, activa una ruta metabólica alterna como la fermentación considerando que hay poca o ausencia de oxígeno, donde utiliza la glucosa hidrolizada previamente del metabolismo de la lactosa, que inicialmente entra a glucólisis independientemente si hay o no presencia de oxígeno, sin embargo, al estar en un medio anaeróbico se activa un proceso metabólico llamado fermentación (139).

E. coli es una bacteria potencialmente patógena, aunque en la mayoría de las ocasiones sus cepas son comensales, sin embargo, raras veces causan enfermedad debido a la exposición a una alta carga bacteriana, deficiencia o alteración del sistema inmune, o la presentación de patotipos virulentos que causan enfermedades intestinales y extraintestinales como infecciones urinarias, septicemia, meningitis y neumonía en humanos y animales (18,19). Por ejemplo, en el caso de las *E. coli* causantes de infecciones intestinales, se suelen clasificar según el tipo de factor de virulencia y los síntomas clínicos del huésped, así se pueden clasificar en 6 patotipos: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), Enteroinvasiva (EIEC), Enterohemorrágica (EHEC), Enteroagregativa (EAEC), adherente difuso (DAEC), Enteropatógena (EPEC) (19) y adherente invasora (AIEC) (20).

2.1.2. Características morfológicas

E. coli al ser una bacteria Gram negativa presenta una estructura morfológica compuesta por una pared celular que contiene principalmente una capa delgada de peptidoglucano y en la membrana externa presenta lipopolisacáridos (LPS), ambas estructuras son consideradas sitios blancos o dianas para la acción de algunos antibióticos de importancia (21, 22).

El LPS consta de 3 partes: Lípido A, oligosacárido central y el antígeno O; la principal función de los LPS es actuar como barrera de permeabilidad frente a moléculas tóxicas como antibióticos y sales biliares, siendo uno de los principales mecanismos contribuyentes a la resistencia innata que muestran las bacterias Gram negativas. También tienen un papel importante en las interacciones de bacteria-huésped ya que modula la respuesta inmune del huésped y es considerado como un PAMP (Patrón molecular asociado a patógenos) y actúa como una endotoxina (22,23).

El peptidoglucano es un heteropolímero que presenta cadenas largas de glucanos que están entrecruzados con péptidos cortos como el ácido N-acetilmurámico (NAM) y el N-acetilglucosamina (NAG) unidos por enlaces glucosídicos, ambos disacáridos actúan como precursores para el inicio de la biosíntesis de peptidoglucano desencadenando una serie de pasos complejos que involucra estructuras como: el citoplasma que comprende las reacciones enzimáticas como síntesis de azúcares y aminoácidos activados por nucleótidos, la membrana interna (MI) que involucra síntesis de intermediarios ligados a lípidos y el periplasma que involucra reacciones de polimerización de los monómeros en hebras de glicano seguido de la

reticulación de péptidos para la formación y maduración del peptidoglucano (24,25). Cada fase de la biosíntesis es objetivo principal de varias clases de antibióticos ya que actúan como sitios diana, principalmente las PBP (proteínas fijadoras de penicilina) que cataliza las etapas finales de la biosíntesis del peptidoglucano teniendo la capacidad de formar complejos covalentes estables con antibióticos β -lactámicos que inactivan la PBP, interrumpiendo el crecimiento bacteriano y conduciendo a una muerte celular (25).

2.1.3. Genómica, Genética y plasticidad de *E. coli*

E. coli presenta un genoma completo que varía ampliamente entre 4.6 a 5.9 millones de pares de bases (Mpb), presenta un ADN circular de doble cadena y porta 4200 a 5500 genes. El pangenoma de *E. coli* comprende dos partes: El genoma core o central que está constituido por menos de 1500 genes y el genoma accesorio está constituido por genes que codifican factores de virulencia, rutas metabólicas, resistencia adquirida a antibióticos y elementos de bacteriófagos que le otorga a *E. coli* características adaptativas excepcionales jugando un papel esencial en su ecología y evolución bacteriana (26). La adquisición de genes accesorios se da mediante la movilidad de genes/ADN de una bacteria a otra, que pueden ser una misma especie o de especies diferentes, a través de transferencia genética horizontal (TGH) mediada por elementos genéticos móviles extracromosomales como los plásmidos, que son estructuras muy dinámicas y tienen una movilización intra e interespecífica de determinantes genéticos y son herramienta muy eficiente en la adquisición y diseminación de

resistencia antibiótica entre las bacterias de la familia Enterobacteriaceae(21,27). De manera frecuente, los plásmidos portan genes de resistencia. estando entre los más relevantes clínicamente los que codifican carbapenemasas, β -lactamasas pAmpC y las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) que pueden propagarse a través de clones bacterianos de alto riesgo (28,29,30).

Por ello, *E. coli* presenta una plasticidad genómica y ecológica permitiéndole adaptarse rápidamente a diferentes ambientes y a las condiciones intestinales de cada huésped siendo capaz de vivir como un microorganismo de vida libre o comocomensal mutualista en la microbiota intestinal de humanos y animales vertebrados.

2.1.4. Reservorios

2.1.4.1. Reservorio primario:

El reservorio natural de *E. coli* es la microbiota intestinal de humanos y animales vertebrados debido a que presentan una versatilidad que le da facultad desobrevivir en diferentes ambientes, además es el candidato perfecto para estudiar la transición entre el comensalismo y la patogenicidad a nivel del vínculo entre una bacteria y su huésped que puede fluctuar entre mutualismo, comensalismo y patogénesis oportunista (31).

a. Microbiota intestinal de humanos y animales

En la microbiota intestinal, *E. coli* es una de las primeras especies bacterianas que colonizan a los neonatos, primero a partir del canal de parto y posteriores colonizaciones de bacterias del ambiente y/o a través de la

ingesta de alimentos contaminados, volviéndose un microorganismo comensal.

E. coli, al ser ingerido se enfrenta con los niveles bajos de pH del estómago, al cual es capaz de sobrevivir debido a que entran en fase de latencia e inducen sistemas protectores de resistencia al ácido. Al llegar al colon, encuentran los nutrientes necesarios, transitando de la fase de latencia a la fase logarítmica y hay una competencia con los miembros de la microbiota, por si es eliminada a través de las heces o se queda a integrar parte de la microbiota comensal (32).

En humanos el contenido de *E. coli* oscila entre 10^7 a 10^9 células /gramo de heces a diferencia de animales domésticos de 10^4 a 10^7 células /gramo de heces (31,33).

b. Microbiota intestinal de Aves silvestres:

La composición microbiana intestinal de aves silvestres es compleja porque está influenciada por diversos factores intrínsecos y extrínsecos como hábitos de alimentación, patrones migratorios, estación del año, comportamiento social y factores ambientales externos, lo que hace que sus actividades fisiológicas se enfrenten a una presión selectiva más sustancial, contribuyendo a esta complejidad. A pesar de esto puede actuar como reservorio natural para *E. coli* (34,35).

La adquisición de enterobacterias como *E. coli* va a depender de la especie de ave y sus preferencias alimenticias como frugívoras, herbívoras, insectívoras, carnívoras (que va desde carroña hasta invertebrados marinos),

etc, esto genera diferencias significativas en la microbiota intestinal aviar (35,36). Así mismo, la presencia natural de *E. coli* no pertenece a la microbiota intestinal de aves granívoras ya que se ha demostrado que los alimentos compuestos exclusivamente por semillas provocan un efecto inhibitorio de esta especie bacteriana, por ello la presencia de *E. coli* en aves granívoras puede estar asociado a algunas patologías (37, 38).

Por otro lado, la influencia de actividades antropogénicas también puede favorecer las infecciones provenientes de fuentes de alimentos como comederos de jardín, aguas residuales, basureros, carroña, alimentos contaminados con heces de otros animales (39,40).

Se ha propuesto que las aves silvestres de vida libre pueden actuar como centinelas indicándonos la presencia de bacterias resistentes en ambientes contaminados, permitiéndonos una vigilancia activa de bacterias resistentes clínicamente relevantes en el medio ambiente (34, 41, 42).

2.1.4.2. Reservorio secundario:

E. coli también tiene la capacidad de sobrevivir en entornos abióticos debido a sus características metabólicas y reguladoras que facilitan la colonización en diferentes nichos ecológicos permitiendo su supervivencia por largos periodos de tiempo fuera del tracto intestinal. Se consideran reservorios secundarios el agua, suelo, sedimento y subproductos derivados de animales como los productos cárnicos (33).

Los productos cárnicos al ser ricos en nutrientes se convierten en un ambiente propicio para el crecimiento de bacterias, como *E. coli*, debido a

la contaminación cruzada. Esta contaminación se debe al manejo inadecuado de las canales durante el procesamiento de faenado en el camal, donde se puede contaminar con la materia fecal del animal. Así, las bacterias contaminantes pueden quedar en la superficie de la carne o en los utensilios usados por el operador. También se han de considerar las condiciones higiénicas del manejo posterior, tanto en transporte y almacenaje, como en las instalaciones de venta, en todos estos puntos pueden ser foco de contaminación cruzada. Por ello, se considera que *E. coli* es un indicador de contaminación fecal y un indicador para observar resistencia antibiótica transmitido a través de alimentos (43,44).

2.1.5. Transmisión

E. coli se transmite principalmente por vía fecal-oral. En humanos, la transmisión es por fómites, contacto directo con contenido fecal de humanos o animales y por cadena alimenticia debido a un manejo inadecuado de alimentos y/o subproductos de animales (21).

En el caso de aves silvestres, la transmisión también puede ser por vía cloacal teniendo en cuenta que la cloaca aviar es la porción final del tracto digestivo y cumple con dos funciones de excreción y transferencia de gametos. Por lo tanto, la cloaca está expuesta a bacterias fecales, bacterias de transmisión sexual y posiblemente bacterias ambientales asociadas con la cáscara del huevo, material de anidación o componentes ambientales como agua y el suelo, permitiendo diseminar intermitentemente algunas bacterias potencialmente patógenas como la *E. coli* (10,34,35,36).

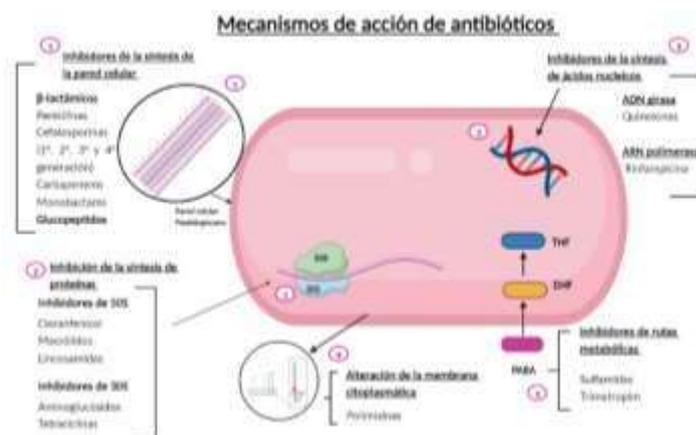
2.2. Antibióticos

Los antibióticos son sustancias naturales producidas por algunos microorganismos, sin embargo, pueden ser producidas sintéticamente, que pueden inhibir el crecimiento de determinados microorganismos. Se clasifican según su espectro de actividad, mecanismo de acción o estructura química.

2.2.1. Mecanismo de acción de antibióticos

Los antibióticos presentan diferentes mecanismos de acción y se clasifican según el efecto que ejercen sobre los microorganismos. Este efecto puede ser bactericida que tiene una acción letal sobre la bacteria a través de la inhibición la síntesis de pared celular, alteración de la membrana citoplasmática o interfiriendo con el metabolismo del ADN, también puede ser bacteriostático, que solo inhibe transitoriamente el crecimiento bacteriano como la inhibición de la síntesis proteica (**Fig.1**). Sin embargo, algunos de los antibióticos pueden tener ambos efectos y va a depender de la concentración o afinidad por la diana del microorganismo de interés, evitando que no sea hidrolizado o transformado en un producto inactivo (45).

Figura 1. Clasificación y mecanismo de acción de antibióticos. Figura modificaday adaptada de la información de “Antimicrobial mechanism of action” por Calvo y Martinez, 2009.



2.2.1.1. Inhibición de la síntesis de pared bacteriana:

La pared celular sirve para dar protección y soporte a la bacteria, la ausencia de esta estructura condiciona e induce a la destrucción de la bacteria causando una lisis celular debido al elevado gradiente de osmolaridad que hay entre el medio y el citoplasma bacteriano (21). Por ello, algunos antibióticos tienen la capacidad de ejercer su acción sobre cualquiera de las 3 etapas de la síntesis del peptidoglucano como:

a. Inhibición a nivel de la etapa citoplasmática:

Comienza a sintetizar los precursores del peptidoglucano como el ácido N-acetilmurámico (NAM) y N-acetil-glucosamida (NAG) a partir de diferentes elementos como uridindifosfato-N-acetil-glucosamina, ácido fosfoenolpiruvico, uridindifosfato-N-acetilmurámico en donde antibióticos como la fosfomicina que inhibirán la acción de la enzima piruviltransferasa y no se dará la unión del fosfoenolpiruvato con el NAG y la cicloserina inhibe la actividad de la L-alanina- racemasa transformando la L-alanin en D-alanina (21) (Fig.2).

b. Inhibición a nivel de la fase de transporte de precursores

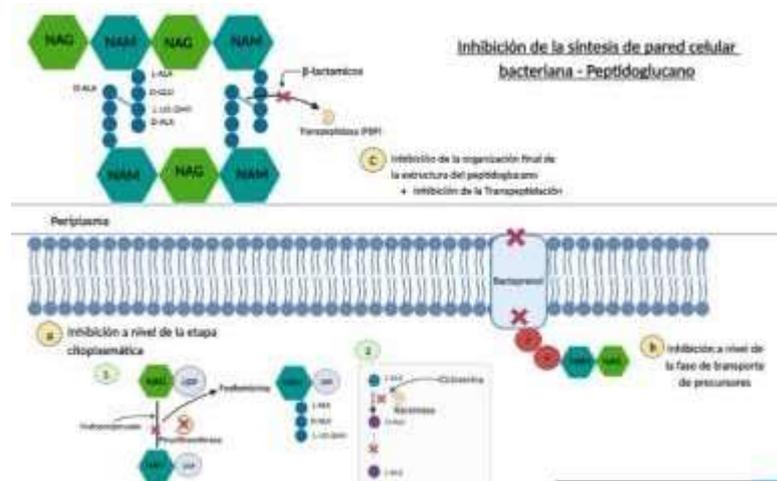
Actúa a nivel de la molécula transportadora llamada undecaprenol o bactoprenol que está anclada en la membrana citoplasmática que permite la incorporación del complejo de una molécula de NAG que se une al NAM mediante enlaces glucosídico. El transportador lleva al complejo glucopeptido a un punto de crecimiento de la pared celular o punto terminal del peptidoglucano en donde queda pirofosforilado, se separa y presenta una desfosforilación para convertirse en su forma monofosfato activo, transportando nuevos precursores a la capa de peptidoglucano cuando concluya su misión se regeneran, sin embargo algunos antibióticos como bacitracina se unen al transportador y bloquean la desfosforilación impidiendo formación de la pared y el paso de nuevas unidades de NAM-NAG (21). (Fig.2).

c. Inhibición de la organización final de la estructura del peptidoglucano

El complejo disacárido, mediante los enlaces glucosídico, forman cadenas que se unen entre sí mediante un enlace peptídico cruzado que se establece entre el tercer aminoácido (DAP) del pentapéptido del NAM que se encuentra en otra cadena. Este último paso de la formación final del peptidoglucano está catalizado por la acción de unas enzimas con función transpeptidasas y carboxipeptidasa, denominadas proteínas fijadoras de penicilinas (PBP). A nivel de esta etapa tienen acción antibióticos como los glucopeptidos que actúan impidiendo la transferencia del disacárido

pentapéptido, unido al transportador lipídico de la membrana citoplasmática, al aceptor de la pared celular. Evita la acción de las glucosiltransferasas y transpeptidasas que impiden la elongación del peptidoglucano. El gran tamaño de estas moléculas impide su paso a través de la pared celular de bacterias Gram negativas de forma que sólo actúan frente a bacterias Gram positivas y los β -lactámicos (21, 45) (Fig.2).

Figura 2. Puntos de inhibición de la síntesis de peptidoglucano por antibióticos. Figura modificada y adaptada de la información del libro “Microbiología veterinaria” de Vadillo, 2002.



2.2.1.2. Alteración de la membrana citoplasmática:

La membrana citoplasmática interviene activamente en los procesos de difusión y transporte activo, controlando la composición del medio interno celular. La alteración de la permeabilidad provoca la salida de iones y macromoléculas por lo tanto la célula se lesiona y muere. Existen antibióticos que actúan a este nivel y tienen acción bactericida tanto en fase de crecimiento activo o en reposo, causando una alta toxicidad, en este grupo

tenemos a las Polimixinas que son un conjunto de antibióticos polipeptídicos que se clasifican en Polimixinas A, B, C, D y E (colistina). Las polimixinas actúan frente a bacterias Gram negativas ya que tienen una afinidad por los lipopolisacáridos (LPS) a nivel del lípido A uniéndose electrostáticamente (46). La polimixina B y la colistina (polimixina E) son las más usadas en clínica humana y veterinaria. La polimixina E estructuralmente presenta un residuo de aminoácidos (D-Leucina) en el anillo peptídico a diferencia de las otras polimixinas (46). La colistina actúa como un detergente catiónico y desplaza los iones de magnesio y calcio que estabilizan la membrana, provocando una alteración estructural de membrana citoplasmática de la bacteria causando una lisis celular (46,47).

2.2.1.3. Inhibición de la síntesis de proteína:

La síntesis de proteínas se da a nivel de los ribosomas, en bacterias está compuesta por dos subunidades, 30S y 50S, que actúan como dianas para la unión de diferentes antibióticos en las diferentes fases de la síntesis de proteínas (iniciación, elongación y terminación) siendo una inhibición selectiva. A nivel de la subunidad 50S actúan antibióticos como el cloranfenicol, macrólidos, lincosamidas y en la subunidad 30S se fijan los aminoglucósidos de forma irreversible interfiriendo con la lectura correcta del código genético, y tetraciclinas(21,45).

2.2.1.4. Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos:

Actúa a nivel de las enzimas que participan en la transcripción y replicación del ADN (polimerasas, topoisomerasas, ADN girasa) evitando que continúe

con el proceso. Aquí se incluyen antibióticos como las quinolonas que actúan bloqueando las topoisomerasas II (DNA girasa) y IV de forma irreversible evitando que continúen la transcripción y replicación del DNA. Existen quinolonas de primera generación como el ácido nalidíxico, segunda generación como el norfloxacin, tercera generación como ciprofloxacino o levofloxacino y cuarta generación como moxifloxacino y gemifloxacino (21,45).

2.2.1.5. Inhibición de vías metabólicas:

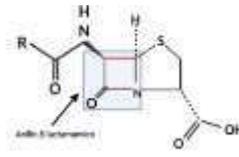
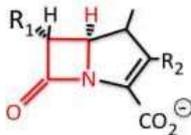
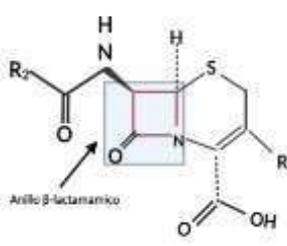
Existen vías metabólicas para la obtención de elementos esenciales como las bases púricas y pirimidínicas del nucleótido y requieren síntesis de folatos para poder formar el ácido nucleico como las sulfamidas que son análogos del ácido paraaminobenzoico (PABA) compitiendo con la enzima dihidropteroatosintetasa bloqueando la vía. El trimetoprim inhibe de forma reversible la enzima dihidrofolato reductasa dihidrofolato reductasa bacteriana. La combinación de ambos antibióticos trimetoprim y sulfametoxazol resulta en una acción sinérgica que bloquea dos etapas consecutivas de esta vía metabólica esencial para diversas bacterias (45).

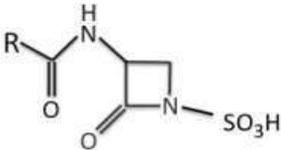
2.2.2. β -lactámicos

Los β -lactámicos inhiben la transpeptidación en la fase final de la síntesis del peptidoglucano en bacterias Gram positivas y Gram negativas. Los β -lactámicos en general presentan una estructura química llamada núcleo betalactámico compuesto por un anillo lactámico el cual está unido a otro anillo secundario que es una estructura variable en función a los radicales

que se unan a este anillo se modificarán las propiedades y características de estos antibióticos dando origen a diferentes grupos como Penicilinas (tipo G y V), Cefalosporinas (1°, 2°, 3° y 4° generación), Monobactams e inhibidores de β -lactamasas (48). Así mismo todos estos grupos de antibióticos tienen como principal objetivo las PBP que son enzimas esenciales para el entrecruzamiento de péptidos durante la síntesis de la pared celular, estos β -lactámicos compiten con el pentapéptido para unirse al PBP, cuando el anillo betalactámico se une covalentemente interrumpe la formación de pared originándose una acumulación de precursores del peptidoglucano (NAG y NAM), también se puede dar una activación de autolisinas que van a hidrolizar el peptidoglucano maduro, lo que generará un desequilibrio causando una deformación de la pared celular, perdiendo su impermeabilidad y llevándola así a una lisis osmótica. Este mecanismo de acción es más efectivo durante la fase logarítmica de crecimiento bacteriano, por ello la actividad de cada grupo de betalactámicos va a depender de tres factores como: la rápida difusión del antibiótico en el espacio periplásmico, la resistencia a las β -lactamasas, la capacidad de evadir los sistemas de expulsión activa y la altaafinidad por las distintas PBP (49,50, 51).

Cuadro 1. Esquema de clasificación de los antibióticos β -lactámicos, basado en la estructura química.

	Clase	Antibióticos	Estructura Química básica
β -lactámicos	Penicilina	Penicilina G y V	 <p>The diagram shows the penam nucleus, a bicyclic system consisting of a five-membered beta-lactam ring fused to a four-membered thiazolidine ring. It features a carbonyl group (C=O) and a side chain (R) attached to the beta-lactam ring, and a carboxylic acid group (-COOH) attached to the thiazolidine ring. A label 'Anillo beta-lactámico' points to the five-membered ring.</p>
	Aminopenicilinas	Ampicilinas Amoxicilina	
	Carbapenems	Imipenem Meropenem Ertapenem Doripenem	 <p>The diagram shows the carbapenem nucleus, a bicyclic system consisting of a five-membered beta-lactam ring fused to a six-membered dihydropyridine ring. It features a carbonyl group (C=O) and a side chain (R1) attached to the beta-lactam ring, and a carboxylate group (-CO2-) and a side chain (R2) attached to the dihydropyridine ring.</p>
	Cefalosporinas	1° Generación: Cefazolina, Cefalexina, Cefalotina 2°	 <p>The diagram shows the cephalexin nucleus, a bicyclic system consisting of a six-membered beta-lactam ring fused to a five-membered thiazolidine ring. It features a carbonyl group (C=O) and a side chain (R2) attached to the beta-lactam ring, and a carboxylic acid group (-COOH) and a side chain (R1) attached to the thiazolidine ring. A label 'Anillo beta-lactámico' points to the six-membered ring.</p>

		<p>Generación:</p> <p>Cefoxitina,</p> <p>Cefuroxima</p> <p>3° Generación:</p> <p>Ceftriaxona,</p> <p>Cefotaxime,</p> <p>Cefzaxidima</p> <p>4°</p> <p>Generación:</p> <p>Cefepime</p>	
	<p>Monobactams</p>	<p>Aztreonam:</p> <p>Tienen un segundo anillo de tiazol que no está fusionado con el anillo β-lactámico</p>	
<p>Inhibidores de β-lactamasa: Se diferencian de los β-lactámicos en que poseen un “grupo saliente” en la posición 1 del anillo de cinco miembros (sulbactam y</p>		<p>Sulbactam</p> <p>Tazobactam</p> <p>Ácido clavulanico</p>	

<p>tazobactam son sulfonas, y el clavulanico tiene un enol éter oxígeno en esta posición), permite una apertura del anillo secundario y la modificación de la enzima β-lactamasas.</p>		
---	--	--

2.2.3. Resistencia a antibióticos

La resistencia a antibióticos es una característica antigua y en principios intrínseca de las bacterias permitiéndole la supervivencia frente a la interacción de muchos organismos con su entorno a lo largo del tiempo (3). Sin embargo, el uso excesivo de antibióticos ejerce una presión selectiva sobre las poblaciones bacterianas, cuando estas poblaciones logran inhibir o inactivar el compuesto se considera una resistencia a antibióticos que es mediada por genes y pueden existir tanto en el cromosoma bacteriano como en elementos genéticos transferibles esto puede darse por dos mecanismos:

- **Resistencia intrínseca:** Se encuentran de forma natural dentro de una especie bacteriana y es independiente de una previa exposición a antibióticos y no está relacionado con la transferencia horizontal de genes como por ejemplo la permeabilidad reducida de la membrana externa por los LPS en Gram negativas y la actividad natural de las bombas de expulsión (52).
- **Resistencia adquirida:** Se da a través del intercambio genético por

transferencia horizontal de genes mediante los procesos de transformación, transposición y conjugación, también se puede dar por mutaciones a nivel cromosómico. Los mecanismos de resistencia adquirida a antibióticos se dan mediante: La inactivación enzimática, disminución de la concentración intracelular por alteraciones en la permeabilidad o por un sistema de bombeo al exterior y cambios en la diana o punto de acción del antibiótico (21).

2.2.4. Resistencia a β -lactámicos

En Enterobacterias se da principalmente resistencia a β -lactámicos a través de la inactivación enzimática mediada por β -lactamasas. La producción de β -lactamasas es uno de los mecanismos de resistencia clínicamente más importante en patógenos oportunistas y los patógenos ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y especies de *Enterobacter*), si bien es cierto en clínica la resistencia es multifactorial y el fenotipo dependerá de las combinaciones de los mecanismos que frecuentemente incluyen modificaciones de la permeabilidad y/o regulación positiva de la bomba de expulsión además de la producción de β -lactamasas (51).

2.2.5. β -lactamasas

Las β -lactamasas son enzimas que inactivan a los β -lactámicos al hidrolizar el enlace amida que está presente en el anillo β -lactámico haciendo que el anillo se abra e impida la unión a las PBP dianas. En el caso de las Enterobacterias, las β -lactamasas son intracelulares, algunas están codificados en elementos genéticos móviles como plásmidos y otros son

codificados por cromosomas, tienen una localización periplásmica y pueden ser inducibles o constitutivas, estas β -lactamasas protegen a la bacteria de los antibióticos que han llegado al espacio periplasmático, manteniéndolo en concentraciones por debajo del nivel de inactivación de las PBP (21).

Las β -lactamasas son numerosas y no comprenden un solo grupo homogéneo, muestran diversidad tanto en estructura como en función. La clasificación molecular es la más usada y fue establecida por Ambler que agrupó las β -lactamasas en 4 clases: Clase A, B, C y D (21,53). Las clases A, C y D son serina hidrolasas; emplean a la serina como nucleófilo de reacción e hidrolizan β -lactámicos a través de un intermedio covalente de acil-enzima. La clase B comprende a las metaloenzimas dependientes de zinc (metalob-lactamasas o MBL) que utilizan un nucleófilo de agua activado por metal para impulsar la reacción hidrolítica. Por otro lado, la clasificación funcional de Bush-Jacoby-Medeiros, comprende 3 grupos de β -lactamasas según la degradación de los sustratos de los β -lactámicos y los efectos de los inhibidores. El grupo 1 comprende a las cefalosporinas que clasifican como clase C según la clasificación molecular y el gen involucrado era originalmente cromosómico. El grupo 2 comprende β -lactamasas distintas al grupo 1 y presenta serina en el centroactivo e incluye las clases A y D según la clasificación molecular. El grupo 3 tiene a las metalob-lactamasas que corresponden a la clase B de la estructura molecular(54).

Sin embargo, las β -lactamasas de clase A forman un grupo molecular heterogéneo que comprende β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)

como las enzimas TEM, SHV (variable de sulfhidrilo), CTX-M (cefotaxima preferentemente hidrolizada), GES y carbapenemasas de *Klebsiella pneumoniae* (KPC). La clase B incluye las metalo β -lactamasas (MBL) como enzimas NDM, IMP y VIM; la Clase C son cromosómicas e incluye AmpC y la clase D incluye las oxacilinasas (OXA), entre ellas de una preocupación particular los grupos OXA-23 y 24/40 y OXA 48 (51,52).

Aunque las cuatro clases están ampliamente distribuidas en múltiples especies de bacterias ambientales y clínicamente significativas, dentro de cada clase, algunas familias de enzimas han tenido éxito y se han diseminado ampliamente entre los patógenos más importantes y son responsables de infecciones oportunistas relacionadas con la atención de pacientes inmunocomprometidos en áreas nosocomiales, incluidas enterobacterias como *E. coli* (55).

2.2.5.1. β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)

Son enzimas que tienen la capacidad de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación y aztreonam. Son inhibidos por los inhibidores de β -lactamasas como el ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam; sin embargo, no tienen acción frente a cefamicinas como ceftioxitina ni carbapenems (como meropenem, imipenem, ertapenem y doripenem). Estos enzimas se transfieren horizontalmente por plásmidos (57,58).

Existen mecanismo de resistencia relacionados con fenotipos BLEE, las variantes que se asocian a BLEE son CTX-M con mayor frecuencia, seguido

de SHV y TEM. Todas las CTX-M poseen actividad BLEE, mientras que en el caso de SHV y TEM sólo algunas variantes poseen actividad BLEE.

2.2.5.1.1. BLEE tipo TEM

Las BLEE tipo TEM están mediadas por plásmidos derivadas de mutaciones en los genes TEM clásicos (TEM-1 y TEM-2) por sustitución de uno o varios aminoácidos alrededor del sitio activo. La primera TEM fue aislada de una *E. coli* de un paciente llamado Temoneira, de ahí su nombre. En bacterias Gram negativas los genes que codifican TEM son resistentes a la ampicilina; TEM-1 hidroliza penicilina y las cefalosporinas de primera generación, al igual que la TEM-2 y otras enzimas derivadas como resultado de mutaciones únicas o múltiples en la secuencia; estas TEM de espectro reducido tienen un perfil hidrolítico similar pero cada una tiene un punto isoeléctrico diferente. Como se ha indicado no todas las enzimas TEM tienen las características BLEE, las más frecuentes son TEM-4, TEM-24, TEM-52 (57).

2.2.5.1.2. BLEE tipo SHV

Los genes *bla_{SHV}* codifican a las enzimas SHV que se identificaron por primera vez en *E. coli*. SHV-1 (reactivo sulfhidrilo variable) (55), estas enzimas poseen una actividad contra penicilinas y cefalosporinas de primera generación, así mismo se han demostrado que varias especies poseen SHV-1 dentro del cromosoma, sin embargo, comúnmente están mediadas por plásmidos. La SHV-2 fue el primer tipo de BLEE detectado

en *Klebsiella* spp. Esta enzima deriva de una mutación puntual en SHV-1 que resultó en la sustitución de glicina por serina en la posición 238 y la extensión de su perfil de sustrato hidrolítico incluyendo cefotaxima y en menor grado ceftazidima (57). A la fecha de escribir esta tesis, en la página de referencia hay listada 186 variantes y algunas poseen la característica BLEE (58).

Las variantes de SHV con acción BLEE presentan un sitio activo donde se ubica un residuo de Ser en posición 70, el cual es responsable del ataque nucleofílico sobre el grupo carbonilo del anillo β -lactámico. Cerca de este residuo se han identificado varios aminoácidos estructurales y funcionales. Entre las SHV BLEE identificadas se encuentran SHV-2, SHV-6, SHV-8, SHV-24, SHV-27, SHV-38, SHV-41, SHV-57, SHV-98, SHV-99, SHV-102 y SHV-104, SHV-128 las cuales tienen de uno a seis sustituciones de aminoácidos en comparación con la SHV-1, estas sustituciones de aminoácidos son suficiente para conferirles un fenotipo de BLEE (55).

2.2.5.1.3. BLEE tipo CTX-M

Las enzimas CTX-M son el grupo más reportado y se han descrito abundantemente en *E. coli*. Las CTX-M reciben su nombre por sus niveles altos de actividad contra la cefotaxima en comparación con la ceftazidima (59). Las CTX-M se han dividido en 5 grupos en su función de su homología de secuencia como: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25, además los miembros dentro de un grupo tienen una relación de

aminoácidos >94% y cada grupo consta de una serie de variantes particulares con variantes dominantes restringidas en distribución a áreas geográficas específicas (57,59). Así mismo, existen alrededor de cuatro variantes de CTX-M que exhiben una estructura híbrida, como CTX-M-45 que es un híbrido de CTX-M-14 con una proteína de origen desconocido y CTX-M-64, CTX-M-123 y CTX-M-132 que son híbridos de CTX-M-15 con un segmento diferente CTX-M-14. Se sabe que las principales variantes de CTX-M son biológicamente diferentes. La CTX-M-15 y CTX-M-14 son las enzimas CTX-M más frecuentemente aisladas en humanos, animales y en el medio ambiente a nivel mundial, seguidas del CTX-M-2, CTX-M-3 y CTX-M-1 (57). La presencia de BLEE tipo CTX-M también está asociada a fenotipos de co-resistencia a fluoroquinolonas y aminoglucósidos; además de la co-resistencia a tetraciclina y trimetoprim/sulfametoazol que se observa en BLEE tipo TEM y SHV; facilitando procesos de coselección (60).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL:

- Detectar *E. coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido aisladas de muestras de clínicas de humanos, carne expandida en mercados y aves silvestres de la Zona sur de Lima, Perú.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Identificar microbiológicamente y molecularmente los aislamientos de *E. coli* en muestras de humanos, carne expandida en mercados y aves silvestres de la zona sur de Lima.
- Determinar la resistencia antimicrobiana de *E. coli* de muestras de humanos, carne expandida en mercados y aves silvestres mediante el método de difusión en discos.
- Identificar fenotípicamente las cepas de *E. coli* productoras de BLEE provenientes de muestras clínicas de humanos, carne expandida en mercados y aves silvestres de vida libre mediante el método de Jarlier.
- Detectar los genes de resistencia *bla*_{CTXM}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} por PCR convencional e identificación de las variantes por secuenciación Sanger en *E. coli* provenientes de muestras clínicas de humanos, carne expandida en mercados y aves silvestres de vida libre.
- Establecer la clonalidad de las cepas *E. coli* productoras de BLEE provenientes de muestras clínicas de humanos, carne expandida en mercados y aves silvestres de vida libre mediante la técnica REP-PCR.

4. METODOLOGÍA

4.1. Diseño de estudio

Estudio exploratorio, no probabilístico de corte transversal y muestreo aleatorio, por lo tanto, no tiene tamaño muestral debido a que el origen de las muestras es variable. La recolección de muestras de origen clínico de humanos, carne expendida en mercados y aves en la zona del cono sur de Lima durante el año 2020-2021.

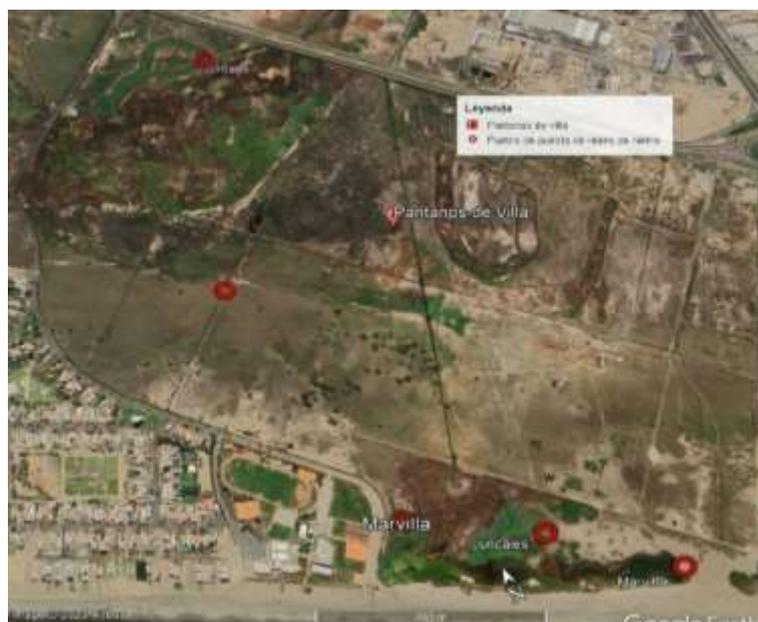
4.2. Área de estudio

El presente estudio se desarrolló en 3 áreas diferentes, según el origen de las muestras, en la zona sur de Lima. Para las muestras de origen alimentario, se seleccionaron diferentes mercados del Distrito de Villa el Salvador con las siguientes coordenadas: S 12°12'19.1", W 76°57'06.0"; S 12°12'02.0", W 76°56'40.6" y S 12°12'37.1", W 76°57'16.1"W (**Fig.3**). Para las aves de vida libre se seleccionó la zona del Refugio de vida silvestre Los Pantanos de Villa (S 12°13'06.8", W 76°59'23.2"), situado en el distrito de Chorrillos (**Fig.4**). Las muestras de origen clínico procedían del Hospital Maria Auxiliadora, situado en San Juan de Miraflores. Todas las muestras se procesaron y analizaron en el laboratorio de Genética Molecular y Bioquímica de la Universidad Científica del Sur.

Figura 3. Zonas de toma de muestras en la zona sur de Lima. 1). Mercados de Villa el Salvador, 2). Hospital Maria Auxiliadora 3). Refugio de vida silvestres Los Pantanos de Villa. Google Earth



Figura 4. Ubicación de los “Pantanos de Villa” y puntos de captura de aves silvestre con redes de niebla (círculos rojos). 400m. Google earth.



4.3. Población muestral

Entre el 2020 y 2021, se recolectaron 125 muestras provenientes de diferentes poblaciones de estudio. Estas correspondieron a muestras clínicas de humanos, carne expandida en mercados del distrito de Villa el Salvador y aves silvestres de vida libre de la Zona de Refugio de Vida Silvestre Los Pantanos de Villa. Se recolectaron 63 muestras clínicas de humanos, 21 muestras de carnes expandidas en mercados y 41 muestras de hisopado cloacal y heces frescas de aves silvestres de vida libre.

4.4. Métodos

4.4.1. Muestras clínicas de humanos

Las muestras provenientes de humanos fueron muestras clínicas de secreciones respiratorias, secreciones de heridas u otros tejidos, hemocultivos y urocultivos que se obtuvieron del Hospital Nacional María Auxiliadora. Las cepas de *E. coli* se identificaron mediante el sistema automatizado Vitek en el laboratorio de Microbiología del hospital Maria Auxiliadora. Las muestras que cumplían el criterio de especie se sembraron en tubos con medio agar tripticasa desoya (TSA) y se conservaron en un cooler (4°C) hasta llegar al laboratorio de la Universidad Científica del Sur.

4.4.2. Muestras de carnes expandidas en mercados

Se seleccionaron de forma aleatoria los puestos de mercado y se recolectó las muestras de carne de pollo y bovino que fueron manipuladas por el vendedor y depositadas en bolsas plásticas de manejo comercial del vendedor, posteriormente se puso en una bolsa estéril hermética y se

colocó en un cooler con gel refrigerante para mantenerlas en cadena de frío a 4°C hasta llegar al laboratorio donde fueron procesadas en un máximo de 4 horas después de la compra.

4.4.3. Muestra de aves silvestres

4.4.3.1. Captura de aves

Para la captura de aves se establecieron cuatro puntos de muestreo y se utilizó seis redes de niebla de 12 m x 2.5 m, las cuales se ubicaron individuales o en grupos de dos redes, se cambió de lugar las redes cada dos días para evitar la reducción de la tasa de captura entre los cuatro puntos establecido. La puesta de redes de niebla duro 15 días consecutivos, se revisó cada 45 minutos desde la apertura de la red (8:00am) hasta el cerrado de red (15:00pm), y en cada evaluación de las redes se capturó de una a seis aves por día esto variaba dependiendo de las condiciones climáticas. Una vez capturada el ave se procedió a la extracción del ave de la red y se introdujeron a las aves en bolsas de tela limpias (se usó una bolsa de tela por ave).

4.4.3.2. Identificación del ave y toma de muestra

Una vez capturada el ave, se procedió a la identificación de la especie por su nombre científico, según lo describe la guía de Aves del Perú (61), se tomó en cuenta la descripción de características generales y los mapas de distribución geográfica de cada grupo de especies de aves que han sido registradas en Perú (61).

Además, se verificó el estado de salud de cada ave a través del peso, la

condición corporal (rango de 1 a 5), presencia o ausencia de muda, evidencia reproductiva (parche incubatriz o protuberancia cloacal) medidas morfológicas como dimensiones del pico (longitud, ancho y alto), longitud de ala, cola y tarso, acompañado de registro fotográfico (62).

Una vez que se tomaron los datos de cada ave se realizó un solo hisopado cloacal por ave capturada, que consistió primero en la inmovilización manual del ave, es decir, se colocó el ave en la palma de la mano izquierda y luego los dedos índices se colocaron alrededor de cuello, y los demás dedos rodearon el cuerpo, la presión aplicada al sostener al ave debe ser la adecuada para tomar la muestra sin lastimarla u obstruir su respiración, conjuntamente con la mano derecha se realizará el hisopado cloacal que consiste en una ligera rotación por 10 segundos para tener el mayor contacto con la mucosa, una vez realizado el hisopado, se colocó en el medio de transporte Cary Blair y en un cooler con gel refrigerante para mantenerlo a 4°C hasta llegar al laboratorio de la Universidad Científica del Sur. Con respecto al ave, después de tomar la muestra se la marcó cortando la punta de una de sus plumas de la cola y se liberó al animal.

Por otro lado, la toma de muestras de heces frescas fue un método no invasivo, es decir, no se realizó captura de las aves sino se realizó la identificación visual de heces en suelo en áreas donde pasaban mayor tiempo cada especie de interés (**Foto1**), se realizó solo un hisopado por heces encontradas y se colocó en un medio de transporte Cary-Blair y en un cooler con gel refrigerante para mantenerlo a 4°C hasta llegar al laboratorio de la Universidad Científica del Sur.

Figura 5. Identificación de cloaca aviar y sus estadios reproductivos. Fuente: Manual de métodos de campo para el monitoreo de aves terrestres por Ralph, 1996.

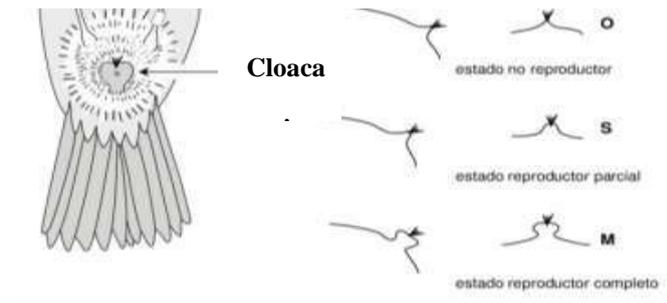
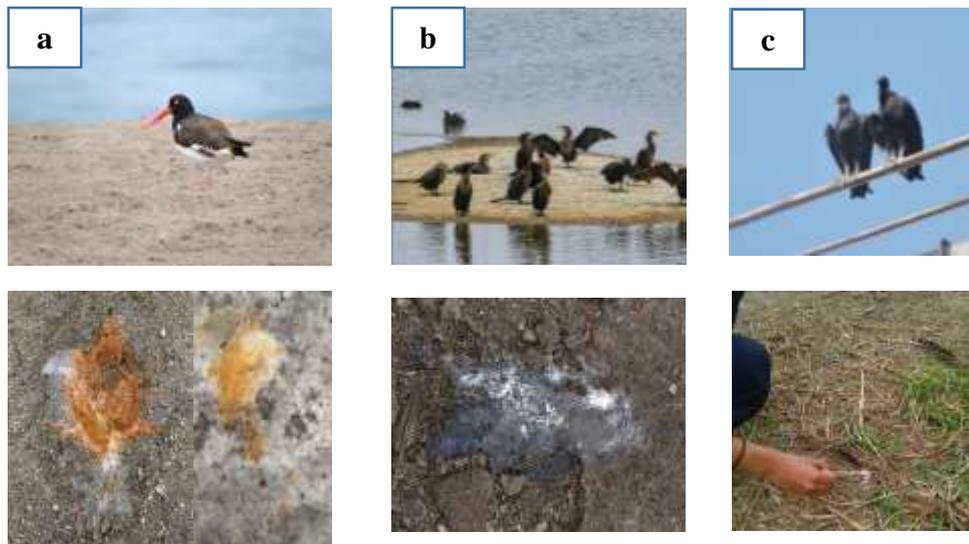


Foto 1. Identificación visual e hisopado de heces frescas en suelo. a) Heces de Ostrero americano, heces de Cormorán Neotropical, c). Heces de gallinazo cabezanegra. Fuente Propia.



4.4.4. Procesamiento de muestras:

4.4.4.1. Aislamiento de *Escherichia coli*

4.4.4.1.1. Muestras clínicas de humanos

Las muestras clínicas venían previamente identificadas como *E. coli*, por lo cual una vez en el laboratorio, se sembraron en agar Mac Conkey y las colonias puras se criopreservaron en medio leche descremada a -80°C.

4.4.4.1.2. Muestras de carnes expandidas en mercados

Las muestras de carne de pollo y bovino se cortaron con un bisturí estéril y se pesó 2.5 gr. de carne para colocarlo en medio de enriquecimiento (caldo Luria- Bertani) o caldo tripticasa de soya (TSA) y se dejó incubar overnight a 37°C (63). Pasado el tiempo de incubación, se sembró con el asa en aro para realizar un sembrado por agotamiento en un medio sólido diferencial como el agar Mc Conkey y se dejó incubar a 37°C por 24 horas (63).

4.4.4.1.3. Muestras de aves silvestres

Las muestras de hisopado cloacal de aves silvestres se enriquecieron en caldo tripticasa de soya (TSA) y se dejó incubar overnight a 37° C. Pasado el tiempo de incubación, se sembró con el asa en aro para realizar un sembrado por agotamiento en un medio sólido diferencial como el agar Mc Conkey y se dejó incubar a 37°C por 24 horas.

4.5. Identificación de *Escherichia coli*

Para la identificación de *E.coli* provenientes de las muestras de carnes e heces de aves silvestres fueron sembradas en agar Macconkey, que es un

agar selectivo que permite solo el crecimiento de bacterias Gram negativas como las enterobacterias, por otro lado, este agar es diferencial porque nos permite diferenciar entre las bacterias que pueden metabolizar o no lactosa debido a presencia del operon lac, que permite la hidrólisis de este azúcar en glucosa y galactosa, utilizadas como fuente de carbono y energía para entrar en vías metabólicas como la glucólisis (135, 140). Sin embargo, en condiciones anaeróbicas este proceso realiza la ruta metabólica de fermentación el cual acidifica el medio disminuyendo el pH en el agar y al tener el indicador de pH como el rojo neutro, el medio cambia de color a fucsia observándose un crecimiento de colonias fucsias o rosadas (140). Las bacterias que no pueden metabolizar la lactosa tienen un crecimiento blanquecino o incoloro. Como se mencionó anteriormente existen cepas de *E. coli* atípicas, es por ello, que se consideró como sospechosas a *E. coli* las cepas que presentaron ambas reacciones, que se criopreservaron en medio leche descremada a -20°C.

4.6. Extracción del material genético de las cepas

Se realizó la extracción del ADN bacteriano mediante el método de shock térmico descrito por Holmes y Quigley (64). Brevemente, se suspendió 3-4 colonias puras en 500 µL de agua libre de nucleasas y se sometió a una temperatura de 100°C por 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a 13.000 RPM por 10 minutos y se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo. Este ADN fue conservado a -20°C para sus posteriores usos.

4.7. Detección del gen *uidA* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las colonias sospechosas a *E. coli* se confirmaron mediante la amplificación del gen *uidA* presente en estas bacterias. El gen *uidA* codifica para la enzima β -D-glucuronidasa, una enzima glicosilhidrolasa que hidroliza enlaces glucosídicos de carbohidratos complejos (65). La presencia de esta enzima se encuentra entre el 94-96% de las cepas de *E. coli* por lo que se considera un buen gen identificador de la especie (66).

Los primers que se utilizaron para la amplificación del gen *uidA* fueron: Forward 5'CATTACGGCAAAGTGTGGGTCAAT 3', Reverse 3'CCATCAGCACGTTATCGAATCCTT 5' correspondientes a 652 pares de bases (67). La amplificación se realizó con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 seg, hibridación a 61°C por 40 seg y extensión a 72°C por 1 min, y una extensión final a 72°C por 5 min (68).

4.8. Prueba de susceptibilidad antibiótica:

Para el estudio de resistencia antibiótica, se siguió el método de difusión en disco (CLSI). Este método consistió en preparar una suspensión bacteriana con una concentración equivalente a un 0.5 Mc Farland en tampón salino, luego se sembró en césped con un hisopo estéril en una placa con agar Muller Hinton, posteriormente se colocó los discos de antibióticos (21 antibióticos).

En el estudio se incluyeron los siguientes antibióticos: ampicilina (10

µg/ml), amoxicilina-clavulánico (20/10 µg/ml), cefotaxima (30 µg/ml), ceftazidima (30 µg/ml), aztreonam (30 µg/ml), cefepime (30 µg/ml), azitromicina (15 µg/ml), gentamicina (10 µg/ml), amikacina (30 µg/ml), tobramicina (10 µg/ml), ácido nalidíxico (30 µg/ml), ciprofloxacino (5 µg/ml), levofloxacino (5 µg/ml), imipenem (10 µg/ml), meropenem (10 µg/ml), tetraciclina (30 µg/ml), tigeciclina (15 µg/ml), nitrofurantoina (300 µg/ml), cefoxitina (30 µg/ml), ceftriaxona (30 µg/ml) y cotrimoxazol (25 µg/ml).

Se incubó a 37°C durante 18 h, pasado este tiempo se procedió a medir el diámetro de los halos de inhibición resultantes. La interpretación y clasificación de la susceptibilidad antimicrobiana se realizó según los puntos de corte según el European Committee On Antimicrobial Susceptibility (EUCAST) y Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (69.70). En el caso de azitromicina se consideraron los valores referenciales para *Shigella* con un halo de ≤ 12 mm para clasificar los aislamientos como resistentes a este antibiótico (69). Se utilizó como control *E. coli* ATCC 25922.

Para la evaluación de la resistencia a colistina, se realizó un primer tamizaje con elagar spot (2 µg/ml), y se realizó la confirmación mediante la técnica de microdilución en caldo. Resumidamente, se preparó una dilución de 0,5 McFarland y seguidamente se realizó una dilución 1/1000 en caldo Mueller Hinton II, ajustado por cationes. Se colocaron diluciones seriadas de colistina (50 µl). Se agregó el inóculo bacteriano (50 µL) y 50 µL de medio MHII a cada pocillo. Finalmente, cada muestra debe incluir un pocillo de

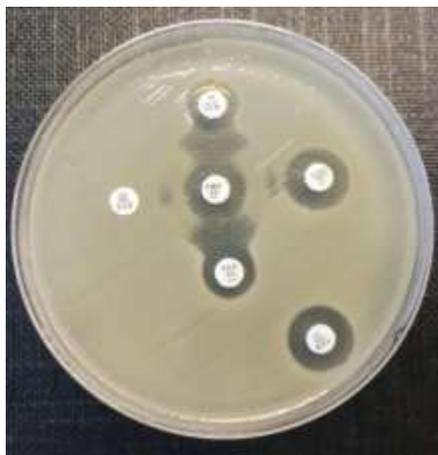
control de crecimiento (sin antibiótico) y un control negativo (con medio sin el inóculo bacteriano). Se incubó la placa a 37°C durante 18h y se realizó la lectura de la OD₆₀₀ en el espectrofotómetro. Se utilizó una CMI de, al menos, 4 mg/mL como punto de corte para determinar las cepas resistentes. Se utilizaron las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922 y una *Serratia* spp., microorganismos intrínsecamente resistentes a colistina, como controles de la microdilución. Para la determinación se utilizó los estándares recomendados por el Grupo de Trabajo conjunto CLSI-European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) sobre puntos de corte de la polimixina (71). Se consideró como cepas MDR las que mostraban resistencia al menos a tres o más familias de antibióticos no relacionados entre ellos (72).

4.9. Detección fenotípica de β - lactamasas:

4.9.1. Prueba de sinergia de Jarlier:

Se evaluó la presencia fenotípica de BLEE a través del método Jarlier, se utilizó placas con agar Muller Hinton y se les inoculó con las cepas sospechosas a *E. coli*, con una turbidez equivalente a 0,5 de la escala de McFarland. Se colocó un disco de amoxicilina-clavulánico (AMC) en el centro de la placa Petri y alrededor se colocaron discos de ceftazidima (CAZ), cefepime (FEP), cefotaxima (CTX) y aztreonam (ATM) a 2 cm de distancia del disco central. Se consideró presencia de BLEE cuando manifestó el efecto sinérgico del inhibidor (**Foto 2**), bajo la forma de ampliación del halo en uno o varios de los β -lactámico (73).

Foto 2. Efecto sinérgico del inhibidor: Efecto tapón de corcho. Fuente propia.



4.10. Detección de genes de mecanismo de resistencia por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se confirmó la presencia y se amplificaron los genes de resistencia a β -lactámicos que codifican CTX-M, TEM y SHV, en cepas de *E. coli* productoras de BLEE detectadas por métodos fenotípicos. La amplificación se realizó con los cebadores y condiciones descritas en el **Cuadro 2**.

Cuadro 2. Listado con las secuencias de nucleótidos de los cebadores empleados y las condiciones de PCR para la amplificación de genes de resistencia para β -lactámicos.

Gen	Cebadores	Producto (pb)	Condiciones	Referencias
<i>bla</i> _{CTX-M}	F 5' CGA TGT GCA GTA CCA GTA A 3' R 3' TTA GTG ACC AGA ATC AGC GG 5'	585 pb	Desnaturalización a 95°C por 5 min, desnaturalización a 94°C por 30 seg, hibridación a 52°C por 30 seg, extensión a 72°C por 1 min,	(74)

			extensión final 72°C por 5 min, en total 30 ciclos.	
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	F 5'GTT ACA ATG TGT GAG AAG CAG 3' R 3'CCG TTT CCG CTA TTA CAA 5'	1041 pb	Desnaturalización a 94°C por 7 min, desnaturalización a 94°C por 50 seg, hibridación a 50°C por 40 seg, extensión a 68°C por 1 min, extensión final 68°C por 5 min, en total 30 ciclos.	(74)
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	F 5'ATG ATG ACT CAG AGC ATT CG 3' R 3'TCA GAA ACC GTG GGT TAC 5'	876 pb	Desnaturalización a 94°C por 5 min, desnaturalización a 94°C por 30 seg, hibridación a 52°C por 30 seg, extensión a 72°C por 1 min, extensión final 72°C por 5 min, en total 30 ciclos.	(74)
<i>bla</i> _{CTX-M-8}	F 5'TGA TGA GAC ATC GCGTTA AG 3'	875 pb	Desnaturalización a 94°C por 5 min, desnaturalización a	(74)

	R 3' TAA CCG TCG GTG ACG ATT TT 5'		94°C por 30 seg, hibridación a 52°C por 30 seg, extensión a 72°C por 1 min, extensión final 72°C por 5 min, en total 30 ciclos.	
<i>bla</i> _{CTX-M-14}	F 5' TGA CCG TAT TGG GAG TTT CAG 3' R 3' GAT TTA TTC AAC AAA ACC AG 5'	917 pb	Desnaturalización a 94°C por 5 min, desnaturalización a 94°C por 30 seg, hibridación a 55°C por 30 seg, extensión a 72°C por 1 min, extensión final 72°C por 5 min, en total 30 ciclos	(74)
<i>bla</i> _{SHV}	F 5' ATG CGT TAT ATT CGC CTG TG 3' R 3' TTA GCG TTG CCA GTG CTC G 5'	841 pb	Desnaturalización a 94°C por 7 min, desnaturalización a 94°C por 1 min, hibridación a 55°C por 1min, extensión a 72°C por 1 min, extensión final 72°C por 8 min, en total 30 ciclos.	(75)
<i>bla</i> _{TEM}	F5' ATT CTT GAA GAC GAA AGG GC 3' R 3' ACG CTC AGT GGA ACG AAA AC 5'	1150 pb	Desnaturalización a 94°C por 7 min, desnaturalización a 94°C por 1 min, hibridación a 55°C por 1 min, extensión a 72°C por 1 min, extensión final 72°C por 8 min, en total 30 ciclos.	(76)

4.11. Electroforesis en gel agarosa

Para la visualización de los amplicones mediante electroforesis en gel agarosa se utilizó concentraciones de agarosa al 1.5% en tampón TBE (concentración 1X) y se agregó un marcador Green Safe DNA gel stain (Canvax) al 5% para su visualización mediante luz UV. Se cargaron 20 ul de producto de PCR con 2ul de Buffer de carga y 4 ul de ladder o marcador de 100 pb (Canvax). Se dejó que el gel migrara a 100 V durante 50 min. Se visualizó el gel con el captador de imágenes (Major Science, Smartview Pro-1100, Estados Unidos).

4.12. Secuenciación de genes de resistencia

El proceso de secuenciación se empleó para analizar la secuencia y sus variaciones de los genes de resistencia como *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV}. Cuando se detectó la amplificación del producto de PCR de interés a partir del gel, se procedió a cortar la banda con un bisturí y se extrajo del gel agarosa, y posteriormente se purificó el ADN mediante el kit E.Z.N.A ® kit de extracción en gel Omega Biotek, Georgia, EEUU). Este kit nos permitió purificar y recuperar fragmentos de ADN que van desde 70 pb hasta 20 kb de todos los grados de geles de agarosa con alta recuperación (> 90%) (77). Los ADN purificados, se enviaron a Macrogen (Seúl, Corea del Sur) para su secuenciación.

Tras obtener las secuencias, los cromatogramas se observaron mediante el programa Chromas (Versión 2.6.6) y se analizaron mediante un programa bioinformático para comparar con la base de datos de Genbank: BLAST (Basic Local Alignment Search Tool): <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

4.13. Estudio de clonalidad

Las cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de muestras clínicas humanas, carnes de mercado y aves silvestres de vida libre se analizaron a través de la técnica REP-PCR para observar la relación clonal entre cada una de estos aislados.

La REP son secuencias Repetitivas Palindrómicas Extragénicas altamente conservadas. La técnica de REP-PCR consiste en la amplificación del

espacio entre estas secuencias dispersas a lo largo del cromosoma. Es una de las técnicas más utilizadas para establecer la relación clonal en varias especies bacterianas.

Concretamente en *E. coli*, estas REP tienen una longitud variable que oscila entre 35 a 40 bp, hay aproximadamente 500 a 1000 copias de secuencias intercaladas en el ADN del cromosoma de *E. coli*, representando aproximadamente el 1% del genoma. Se cree que las secuencias REP son importantes en la regulación de ciertas funciones bacterianas y que proporcionan sitios de unión para el ADN polimerasa I, ADN girasa y para el factor de integración del huésped (78).

El método de tipificación de REP – PCR, es la técnica de huellas dactilares genómicas que genera patrones específicos obtenidas por la amplificación del espacio de las regiones entre las secuencias REP. De esta manera se crean perfiles de bandas de ADN que se pueden visualizar mediante gel de agarosa o electroforesis capilar. El número de bandas de ADN que se observan en los patrones de REP-PCR oscila de 3 a 10 bandas con tamaños variables, lo que permite su fácil interpretación mediante la agrupación de perfiles y clústeres (79).

En la reacción de REP-PCR sólo se utiliza un cebador, porque estos elementos repetitivos son palindrómicos es decir que las secuencias son inversas complementarias (se pueden leer en ambos sentidos) permitiendo que un solo primer sea capaz de unirse a múltiples sitios del genoma generando múltiples productos del PCR (141). Las condiciones que se utilizaron fueron: 5´ GCG CCG ICA TGC GGC ATT 3´ con las siguientes

condiciones: Desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 min, hibridación a 40°C por 1min y extensión a 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 5 min (76). Las muestras de cada producto final de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1.5% a 120 v por 70 min. Con la imagen de los geles resultantes, se realizó un análisis bioinformático mediante el software Gel J, generando los dendrogramas usando el coeficiente DICE de similitud y 1.0 de tolerancia, y la clasificación por el método UPGMA (81).

4.14. Aspectos éticos

El presente estudio cuenta con la aprobación de los comités de ética respectivos según cada sección. Así, fue aprobado por el comité de ética para el uso de animales (CIEA) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia con el código de inscripción; 203912 y por el servicio nacional de áreas protegidas (SERNANP) con la resolución jefatural: N°008-2021-SERNANP-JEFI y PROHVILLA. Además, tiene la aprobación del hospital Maria Auxiliadora, y de la Universidad Científica del Sur. Ver las aprobaciones en los anexos (**Anexo 1,2,3,4 y 5**).

5. RESULTADOS

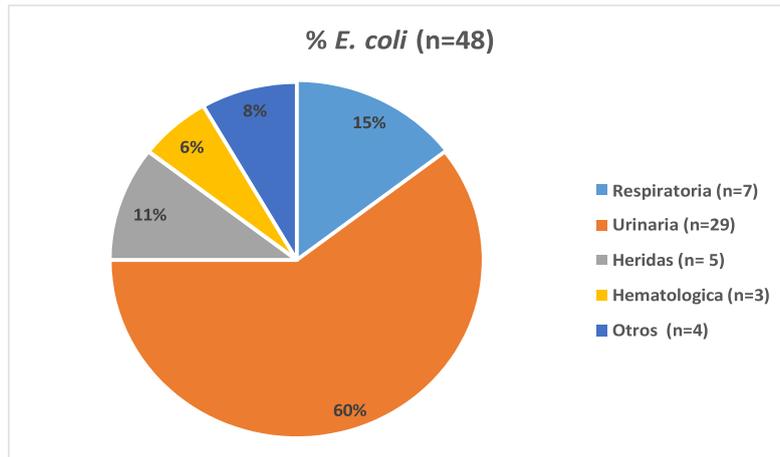
En el presente estudio analizo 125 muestras que provenían de 63 muestras de humanos, 21 carnes y 41 de aves. Se obtuvo 138 aislamientos de *E. coli* (13.7% (19/138) fueron *E. coli* lactosa negativa y el 86,2% fueron *E. coli* lactosa positiva) provenientes de muestras clínicas del hospital Maria Auxiliadora, carne de mercado y aves silvestres de vida libre del Refugio de vida Libre Los Pantanos de Villa.

5.1. Clínica de humanos

5.1.1. Presencia y resistencia antibiótica de *E. coli* aisladas de muestras clínicas de Humanos:

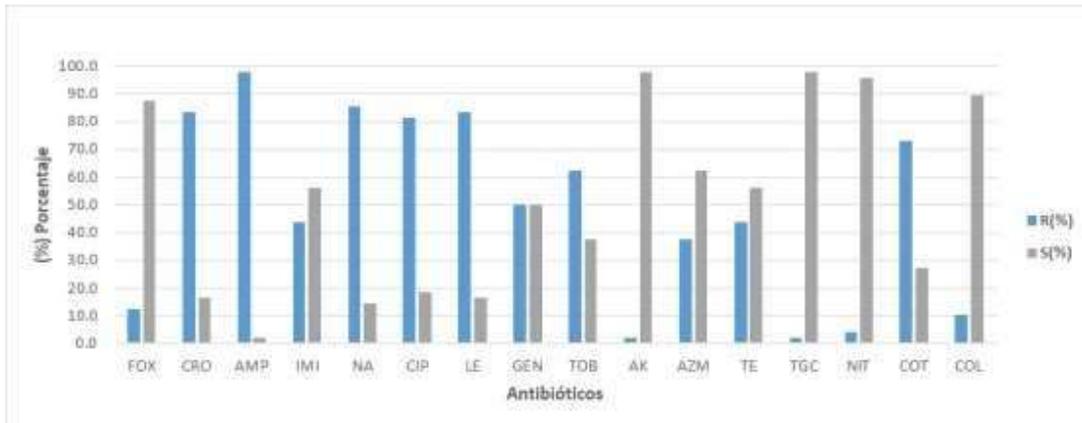
El hospital Maria Auxiliadora (HMA) remitió 63 aislamientos procedentes de muestras clínicas de diferentes orígenes como muestras urinarias, respiratorias, heridas, hematológicas y otros (como líquido seminal, líquido biliar y de pie diabético) recolectadas en el período de enero a febrero 2021. Se identificó 76.2 % (48/63) cepas positivas a *E. coli*. El mayor porcentaje de cepas de *E. coli* provenían de muestras urinarias con el 60.4% (29/48), seguido de muestras respiratorias 14.6% (7/48), 10.4% (5/48) de heridas, 6.3% (2/48) hematológicas y 8.3% (4/48) otros (**Gráfico.1**).

Gráfico 1. Porcentaje de *E. coli* aisladas de diferentes tipos de muestra provenientes del hospital Maria Auxiliadora – San Juan de Miraflores, 2021



A nivel general las cepas de *E. coli* de origen clínico eran altamente resistentes a ampicilina (97.9%), niveles superiores a 80% a quinolonas y ceftriaxona, seguido de 72.9% a cotrimoxazol y aminoglucósidos como tobramicina con 60% y gentamicina con 48%. Destacar la presencia de valores de resistencia cercanos al 40% en tetraciclina, azitromicina e imipenem. Los niveles de resistencia más bajos fueron a tigeciclina, nitrofurantoína, amikacina y colistina (**Gráfico 2**).

Gráfico 2. Susceptibilidad antimicrobiana de *E. coli* aisladas de muestras clínicas de humanos del hospital Maria Auxiliadora, San Juan de Miraflores, 2021.



Antibióticos: AK: Amikacina; AMP: Ampicilina; AZM: Azitromicina; CIP: Ciprofloxacino; CRO: Ceftriaxona; FOX: Cefoxitina; GEN: Gentamicina; IMI: Imipenem; LE: Levofloxacino; NA: Ac. Nalidixico; NIT: Nitrofurantoina; TE: Tetraciclina; TGC: Tigeciclina; TOB: Tobramicina; COT: Cotrimoxazol. R = Resistencia y S = Sensibilidad

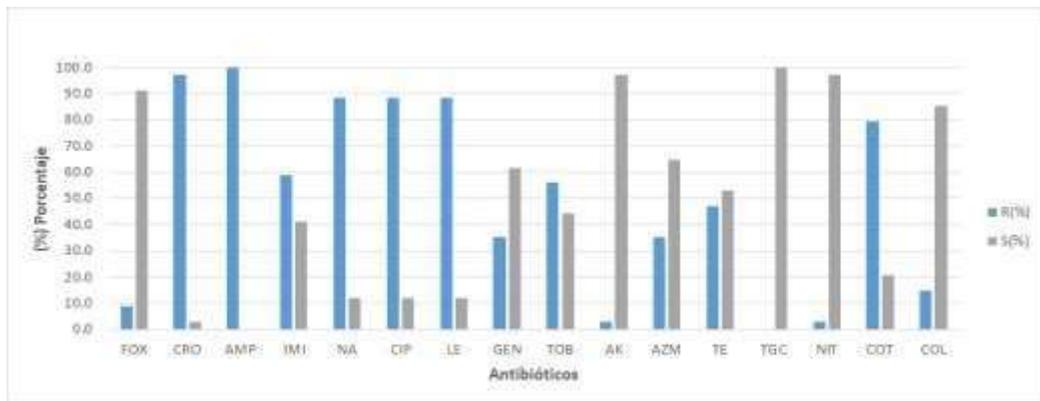
5.1.2. Presencia y resistencia antibiótica en *E. coli* BLEE:

Se determinó que el 70.8% (34/48) de las *E. coli* fueron productoras de BLEE y fueron aisladas principalmente de muestras urinarias 58.8% (20/34), muestras respiratorias 20.6% (7/34), 11.7% (3/37) muestras de heridas, 2.9% (1/34) muestras hematológicas y 10.8% (4/34) muestras de otros orígenes como líquido seminal, líquido biliar y pie diabético.

Estas presentaron resistencia a ampicilina (100%, 34/34), ceftriaxona con 97.1% (33/34), ciprofloxacino con 88.2% (30/34), levofloxacino 88.2% (30/34), ácido nalidíxico 88.2% (30/34), cotrimoxazol con 79.4% (27/34),

imipenem con 58.8% (20/34) y colistina con 14.7% (5/34). Presentaron niveles bajos de resistencia a tigeciclina (0%), seguido de amikacina y nitrofurantoina 2.9% (1/34) y cefoxitina con 8.8% (3/34) (Gráfico 3).

Gráfico 3. Susceptibilidad antimicrobiana de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de muestras clínicas de humanos del hospital María Auxiliadora, SanJuan de Miraflores, 2021.



Antibióticos: AK: Amikacina; AMP: Ampicilina; AZM: Azitromicina; CIP: Ciprofloxacino; CRO: Ceftriaxona; FOX: Cefoxitina; GEN: Gentamicina; IMI: Imipenem; LE: Levofloxacina; NA: Ac. Nalidixico; NIT: Nitrofurantoina; TE: Tetraciclina; TGC: Tigeciclina; TOB: Tobramicina; COT: Cotrimoxazol. R =Resistencia y S = Sensibilidad.

5.1.3. Caracterización molecular de *E. coli* productoras de BLEE:

Se caracterizaron los genes implicados en el fenotipo BLEE. Así, el 61.8% (21/34) de los aislados BLEE se detectó el gen *bla*_{CTX-M}, seguidos de los genes *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV} con 11.8% (4/34) en ambos casos (**Cuadro 3**). Cabe resaltar que cinco cepas no amplificaron para ningún gen BLEE de interés de este estudio.

Dentro del gen *bla*_{CTX-M}, el grupo *bla*_{CTX-M-grupo1} fue el más común (47.1 %), seguido de *bla*_{CTX-M-grupo14} (11.7%). Al secuenciar los genes *bla*_{CTX-M-grupo1}, se obtuvo el gen *bla*_{CTX-M-55} que fue el más común, seguido de *bla*_{CTX-M-15}. Solo se identificó una variante del gen *bla*_{CTX-M-grupo14} que fue la *bla*_{CTX-M-27}.

Cuadro 3. Prevalencia de genes de resistencia aislados de muestras clínicas de humanos del hospital María Auxiliadora- San Juan de Miraflores, 2021.

Grupos	<i>E. coli</i> BLEE (n)	Genes de Resistencia	N	%
CTX-M grupo 1	17	<i>bla</i> _{CTX-M-55}	6	35.3%
		<i>bla</i> _{CTX-M-15}	2	11.8%
		ND	9	52.9%
CTX-M grupo 14	4	<i>bla</i> _{CTX-M-27}	1	2.9%
		ND*	3	8.8%
TEM	4	<i>bla</i> _{TEM}	4	100%
SHV	4	<i>bla</i> _{SHV}	4	100%
Negativas*	5	Ninguno	5	14.7%
Total	34		25	73.3 %

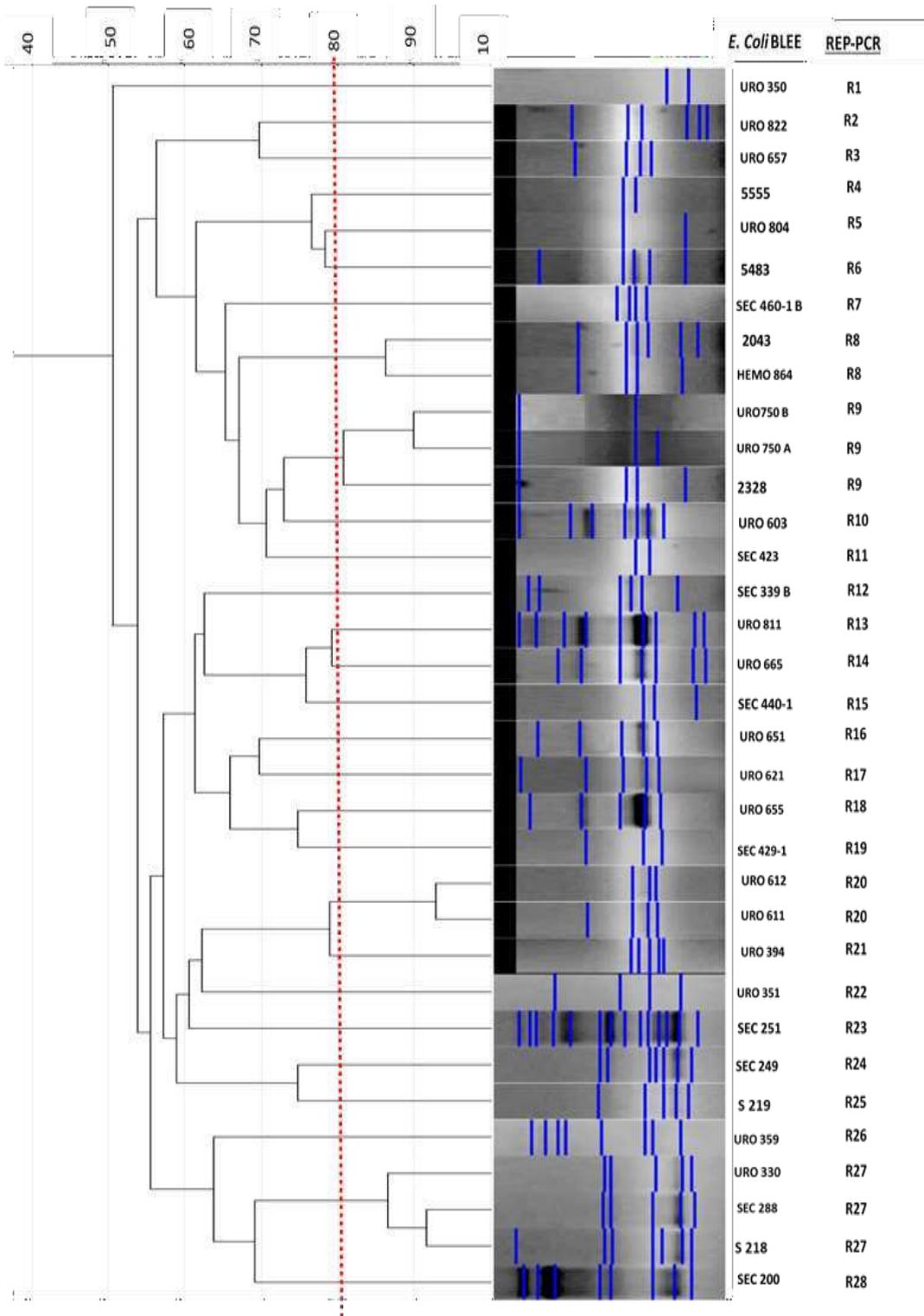
Negativas: resultado negativo para CTX-M, TEM, SHV, ND: No determinado, positivo para el grupo, pero no se logró secuenciar.

5.1.4. Clonalidad de *E. coli* productoras de BLEE de las muestras clínicas de humanos

Se incluyeron las 34 cepas de *E. coli* productoras de BLEE en el análisis de REP-PCR. En el dendrograma se puede observar una alta variabilidad entre las cepas. Se identificaron 28 patrones clonales (R1-R28) entre los 34 aislados. Los patrones R8 agruparon dos aislamientos y los patrones, R9,

R20 y R27 agruparon tres aislamientos cada uno y presentaron una homología superior al 80% (**Fig.6**).

Figura 6. Dendrograma de la relación clonal de las *E. coli* productoras de BLEE aisladas de muestras clínicas de humanos del Hospital María Auxiliadora- San Juan de Miraflores, Lima.



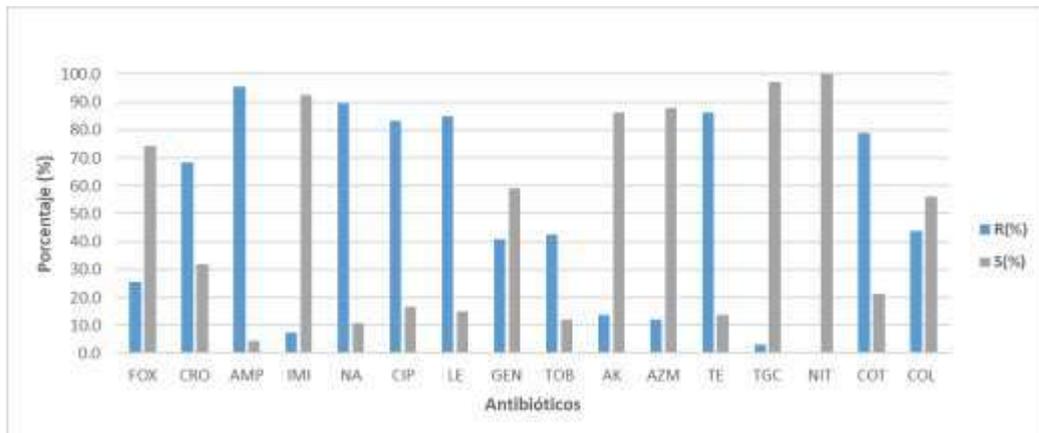
5.2. Carne expendida de mercados del Distrito de Villa el Salvador

5.2.1. Presencia y resistencia antibiótica de *E. coli* aisladas de muestras de carne de mercado

Se recolectó un total de 21 muestras cárnicas: 14 (66.6%) de carne de pollo y 7 (33.3%) de carne de vacuno. De estas se identificaron 66 cepas de *E. coli*, 46 de carne de pollo y 20 *E. coli* en muestras de carne de vacuno (Cuadro 4).

Los niveles de resistencia fueron elevados para ampicilina (>90%), así como tetraciclina y quinolonas (superior al 80%). Seguido de resistencia a cotrimoxazol (78%) y ceftriaxona (67%). Los valores de resistencia a aminoglucósidos, tanto en tobramicina como gentamicina, fueron del 40% y menor para amikacina (15%). Destacar que la resistencia a colistina fue superior al 40% superior incluso a la resistencia a carbapenems como imipenem con(7.6%). No se reportaron cepas resistentes a nitrofurantoína (Gráfico 4).

Gráfico 4. Susceptibilidad antimicrobiana de *E. coli* aisladas de muestras de carne de mercado del distrito de Villa el Salvador, Lima, 2021.



Antibióticos: AK: Amikacina; AMP: Ampicilina; AZM: Azitromicina; CIP: Ciprofloxacino; CRO: Ceftriaxona; FOX: Cefoxitina; GEN: Gentamicina; IMI: Imipenem; LE: Levofloxacina; NA: Ac. Nalidíxico; NIT: Nitrofurantoina; TE: Tetraciclina; TGC: Tigeciclina; TOB: Tobramicina; COT: Cotrimoxazol. R = Resistencia y S = Sensibilidad.

5.2.2. Presencia y resistencia antibiótica en *E. coli* BLEE

Se confirmó la presencia fenotípica de *E. coli* productoras de BLEE en un 54.6% de los aislamientos, en concreto, 54.3% (25/46) de muestras de carne de pollo y 55% (11/20) de muestras de carne de vacuno (**Cuadro 4**).

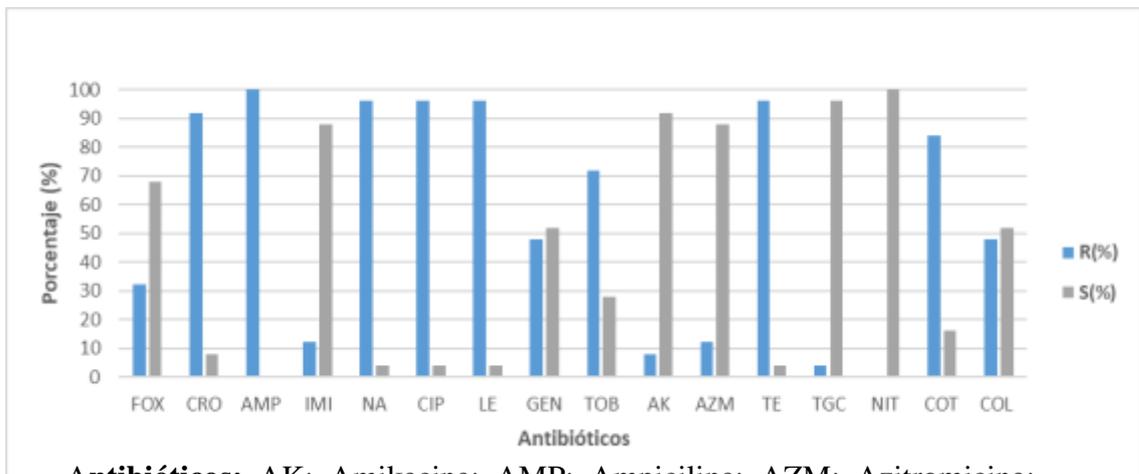
Cuadro 4. Número de cepas *E. coli* aisladas por tipo de muestras de carne de mercado.

Muestras	Muestras recolectadas (n)	<i>E. coli uidA</i> (+) (n%)	<i>E. coli</i> BLEE (n%)
Pollo	14	46 (69.7%)	25 (54.3%)
Vacuno	7	20 (30.3%)	11 (55%)
Total	21	66 (100%)	36 (54.6%)

En las cepas de *E. coli* productoras de BLEE de carne de pollo, el mayor porcentaje de resistencia observado fue a ampicilina con un 100% (25/25). Los niveles de resistencia a tetraciclina, ácido nalidíxico, ciprofloxacino y levofloxacino fueron del 96% (24/25), mientras que los de ceftriaxona y cotrimoxazol fueron de 92% (23/25) y 84% respectivamente. Cabe destacar que el 48% (12/25) fueron resistentes a colistina (**Gráfico 5**). Por el contrario, no se detectaron cepas resistentes a nitrofurantoina, y sólo el 4%,

8% y 12% fueron resistentes a tigeciclina, amikacina e imipenem respectivamente.

Gráfico 5. Susceptibilidad antimicrobiana de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de carne de pollo expandidas en Mercados del distrito de Villa El Salvador, Lima (n=25).

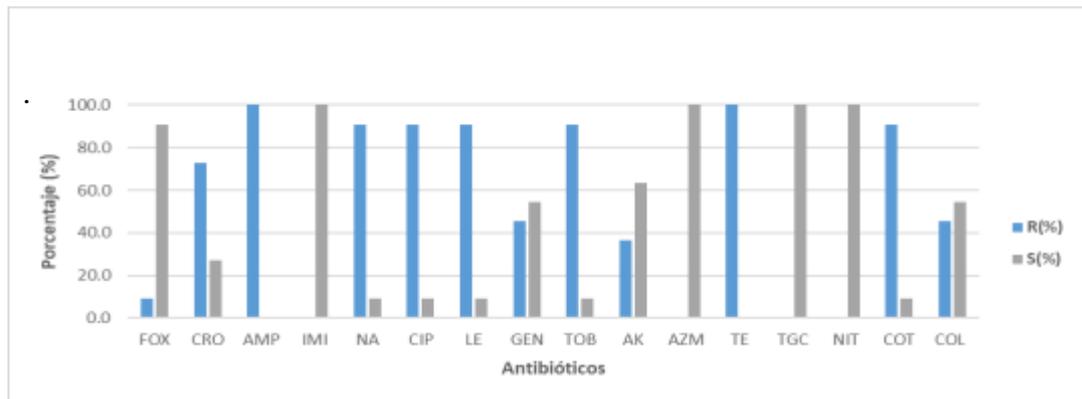


Antibióticos: AK: Amikacina; AMP: Ampicilina; AZM: Azitromicina; CIP: Ciprofloxacino; CRO: Ceftriaxona; FOX: Cefoxitina; GEN: Gentamicina; IMI: Imipenem; LE: Levofloxacina; NA: Ac. Nalidixico; NIT: Nitrofurantoina; TE: Tetraciclina; TGC: Tigeciclina; TOB: Tobramicina; COT: Cotrimoxazol. R = Resistencia y S = Sensibilidad.

En carne de vacuno, las *E. coli* BLEE mostraron niveles de altos de resistencia con 100% (11/11) para los antibióticos ampicilina y tetraciclina cada uno. Por otro lado, también se presentaron niveles de resistencia a ácido nalidíxico, ciprofloxacino, levofloxacino tobramicina y cotrimoxazol fueron del 90.9% (10/11), mientras los de ceftriaxona fueron de 72.7% (8/11). Cabe destacar que el 45.5% (5/11) de los aislados mostraron resistencia a colistina. No se detectó resistencia a imipenem, azitromicina,

tigeciclina ni a nitrofurantoina (**Gráfico 6**).

Gráfico 6. Susceptibilidad antimicrobiana de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de carne de vacuno expandidas en Mercados del distrito de Villa El Salvador, Lima (n=11).



Antibióticos: AK: Amikacina; AMP: Ampicilina; AZM: Azitromicina; CIP: Ciprofloxacino; CRO: Ceftriaxona; FOX: Cefoxitina; GEN: Gentamicina; IMI: Imipenem; LE: Levofloxacino; NA: Ac. Nalidíxico; NIT: Nitrofurantoina; TE: Tetraciclina; TGC: Tigeciclina; TOB: Tobramicina; COT: Cotrimoxazol. R = Resistencia y S = Sensibilidad.

5.2.3. Caracterización molecular de *E. coli* productoras de BLEE

En los aislados de *E. coli* productoras de BLEE procedentes de muestras de pollo se detectaron bla_{CTX-M} de los grupos $bla_{CTX-M-grupo1}$ con 88% (22/25), como $bla_{CTX-M-55}$ con el 86.4% (19/22) y $bla_{CTX-M-15}$ con 4.5% (1/22) y $bla_{CTX-M-grupo14}$ con 12% (3/25) como el $bla_{CTX-M-65}$ con 66.7% (2/3). Además, se detectó un aislado portador de bla_{SHV27} y adicionalmente se detectaron β -lactamasas de espectro reducido como bla_{TEM-1} con 93.3% (14/15) $bla_{TEM-176}$ con 6.7% (1/15) y bla_{SHV1} 50% (1/2) (**Cuadro 5**).

En el caso de las muestras de carne de vacuno en los aislados de

E. coli productores de BLEE se detectó un 45.5% (5/11) de *bla*CTX-M-grupo1, todas ellas identificadas como *bla*CTX-M-55. Adicionalmente se detectaron 4 *bla*TEM (36.4%) todas ellas *bla*TEM-1 (**Cuadro 5**).

Cuadro 5. Presencia de genes de resistencia para *E. coli* productora de BLEE aisladas de carne de pollo y vacuno en Mercados del distrito de Villa El Salvador, Lima.

Microorganismo	Origen	Genes de Resistencia		
<i>E. coli</i> BLEE (n=36)	Carne de pollo (n=25)	CTX-M grupo 1 (n=22)		
		<i>bla</i> CTX-M-55	<i>bla</i> CTX-M-15	ND*
		19(86.4%)	1(4.5%)	2(9.1%)
		CTX-M grupo 14 (n= 3)		
		<i>bla</i> CTX-M-65	ND*	
		2(66.7%)	1	
		TEM (n=15)		
		<i>bla</i> TEM-1	<i>bla</i> TEM-176	
		14 (93.3%)	1(6.7%)	
		SHV (n=2)		
		<i>bla</i> SHV1	<i>bla</i> SHV27	
	1(50%)	1(50%)		
	Carne de vacuno (n=11)	Genes de Resistencia		
		CTX-M grupo 1 (n=5)		
<i>bla</i> CTX-M-55				
5(100%)				

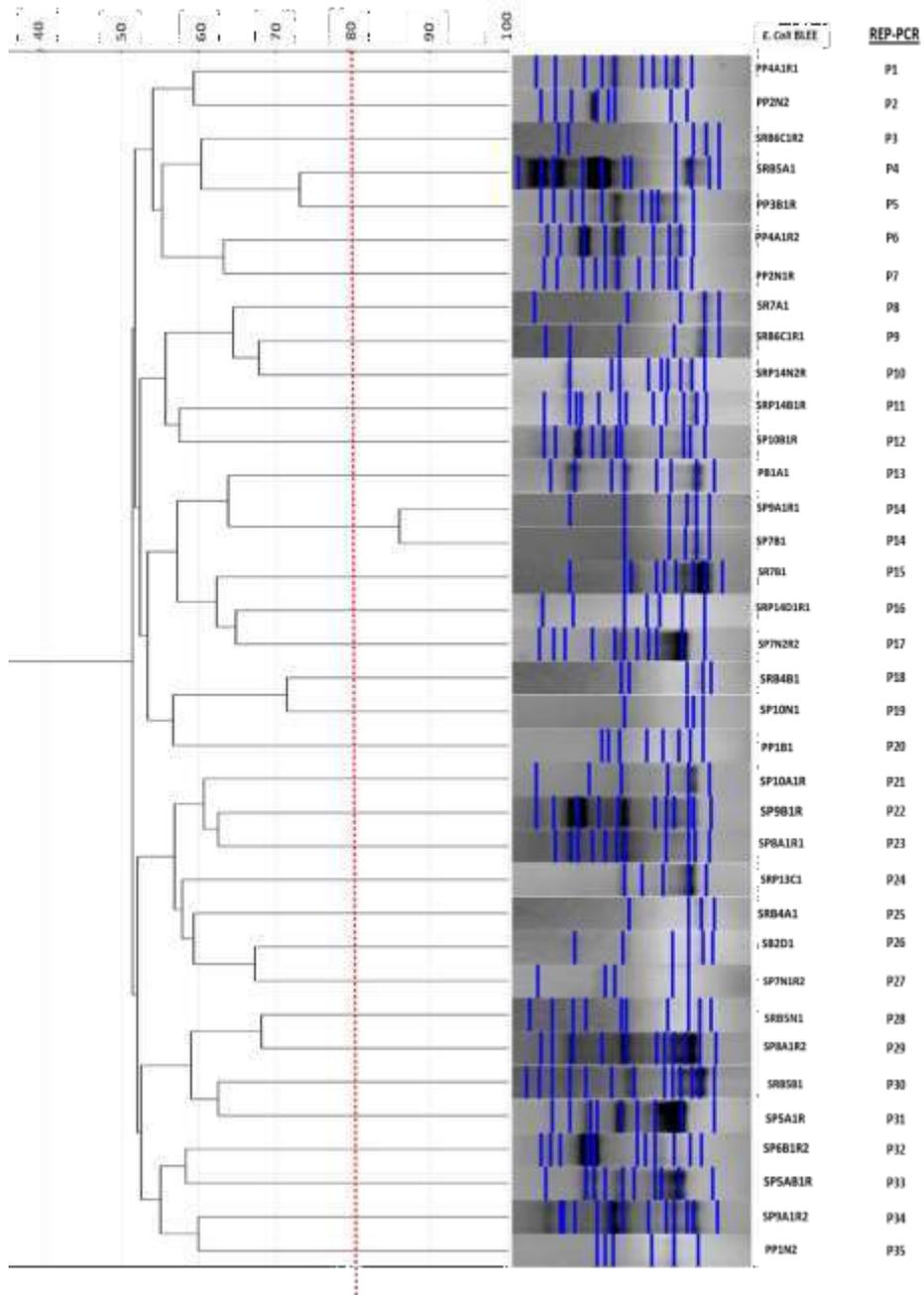
		TEM (n=4)
		<i>bla</i> _{TEM-1}
		4(100%)

ND*: No determinado, positivo para el grupo, pero no se logró secuenciar.

5.2.4. Clonalidad de las *E. coli* productoras de BLEE de las muestras de carne de pollo y vacuno expandidas en mercados:

Se incluyeron 36 cepas de *E. coli* productoras de BLEE en el análisis de clonalidad por REP-PCR. En el dendrograma se puede observar una alta diversidad clonal entre las cepas. Se identificaron 35 patrones clonales (de P1 a P35) todos ellos compuestos por un único aislado, excepto el patrón P14 compuesto por dos aislados de *E. coli* (SP9A1R1 y SP7B1) por lo que se las clasificó como cepas posiblemente relacionadas (**fig.7**); ambas muestras provienen de carne de pollo del mismo mercado, pero de diferentes puestos.

Figura 7. Dendrograma de la relación clonal de las *E. coli* productoras de BLEE aisladas de muestras de carne de pollo y vacuno expandidas en mercados del distrito Villa el Salvador, Lima.



5.3. Aves Silvestres de la Zona de Refugio de vida Silvestres los Pantanos de Villa

5.3.1. Presencia y resistencia antibiótica de *E. coli* aisladas de muestras fecales de aves silvestres

Se muestrearon 41 aves silvestres de vida libre de forma aleatoria mediante hisopado cloacal y por identificación de heces frescas en suelo, se obtuvieron muestras de 15 especies de aves. De las 41 aves silvestres se logró aislar 24 cepas de *E. coli*.

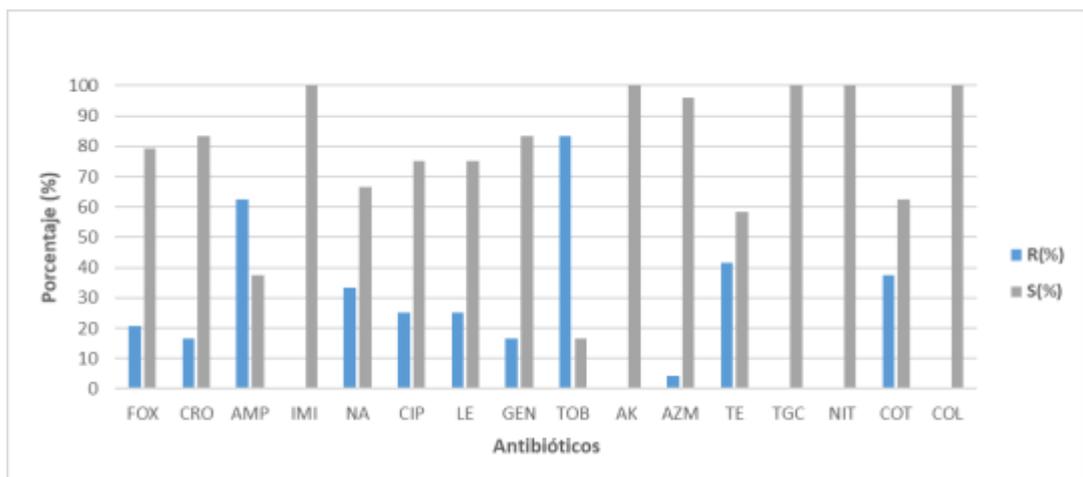
Cuadro 6. Porcentaje de aves silvestres capturadas para el estudio divididas por especies de la Zona de Refugio de Vida Silvestre los Pantanos de Villa, Lima Perú.

Orden	Especie	Espécimen (n)	<i>E. coli</i> (n)	<i>E. coli</i> BL EE (n)
Passeriforme	Junquero (<i>Phleocryptes melanops</i>)	3	4	0
	Golondrina azul y blanca (<i>Notiochelidon cyanolepta</i>)	1	3	0
	Gorrión común (<i>Passer domesticus</i>)	1	0	0
	Mielero común (<i>Coereba flavoela</i>)	4	2	0

	Chirigüe oliváceo (<i>Sicalis olivascens</i>)	2	3	0
	Cucarachero común (<i>Troglodytes aedon</i>)	2	0	0
	Siete colores (<i>Tachuris rubrigastra</i>)	3	1	0
	Turtupilin (<i>Phyrocephalus rubinus</i>)	2	0	0
	Tirano melancólico (<i>Tyrannus melancholicus</i>)	1	0	0
Trochiliformes	Amazilia Costeña (<i>Amazilia amazilia</i>)	11	0	0
Suliformes	Piquero peruano (<i>Sula variegata</i>)	1	1	0
	Cormoran Neotropical (<i>Phalacrocorax brasilianus</i>)	3	5	3
	Cormoran guanay (<i>Leucocarbo bougainvillii</i>)	1	0	0
Cathartiformes	Gallinazo de cabeza negra (<i>Coragyps atratus</i>)	2	3	1
Charadriiformes	Ostrero Americano (<i>Haematopus palliatus</i>)	4	2	0
TOTAL DE MUESTRAS		41	24	4

Se ha reportado niveles de resistencia elevados a tobramicina (>80%), seguido de los de ampicilina (60%), y valores cercanos al 40% para tetraciclina y cotrimoxazol. Cabe destacar que no hubo presencia de resistencia a colistina, tigeciclina, imipenem, amikacina o nitrofurantoína (Gráfico 7).

Gráfico 7. Susceptibilidad antimicrobiana de *E. coli* aisladas de aves silvestres de la Zona de Refugio de Vida Silvestre los Pantanos de Villa, Lima Perú (n=24).



Antibióticos: AK: Amikacina; AMP: Ampicilina; AZM: Azitromicina; CIP: Ciprofloxacino; CRO: Ceftriaxona, FOX: Cefoxitina; GEN: Gentamicina; IMI: Imipenem; LE: Levofloxacina; NA: Ac. Nalidixico; NIT: Nitrofurantoina; TE: Tetraciclina; TGC: Tigeciclina; TOB: Tobramicina; COT: Cotrimoxazol; COL: Colistina. R = Resistencia y S = Sensibilidad

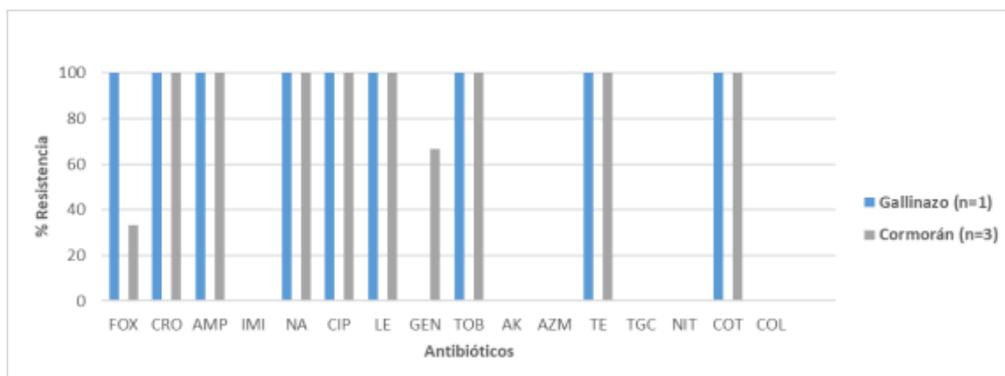
5.3.2. Presencia y resistencia antibiótica en *E. coli* BLEE

Se confirmó la presencia fenotípica de *E. coli* productora de BLEE, se obtuvo 16.7% (4/24) aislados de *E. coli* productoras de BLEE de Gallinazo

cabeza negra (*Coragyps atratus*) 25% (1/4) y Cormoran Neotropical (*Phalacrocorax brasilianus*) 75% (3/4).

En el caso del gallinazo cabeza negra se identificó solo una *E. coli* productora de BLEE que presentó resistencia a diferentes antibióticos como tobramicina, ácido nalidíxico, ciprofloxacino, levofloxacino, ampicilina, tetraciclina y cotrimoxazol. En Cormorán Neotropical se identificaron tres cepas de *E. coli* productora de BLEE, todas ellas presentaron resistencia a diferentes antibióticos como tobramicina 100 % (3/3), ácido nalidíxico 100% (3/3), ciprofloxacina 100% (3/3), levofloxacina 100% (3/3), ampicilina 100% (3/3), tetraciclina 100% (3/3) y cotrimoxazol 100% (3/3). Cabe destacar que ninguna de las *E. coli* productoras BLEE presentaron resistencia a imipenem, amikacina, nitrofurantoína y colistina (**Gráfico 8**).

Gráfico 8. Niveles de resistencia antibiótica de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de Gallinazo cabeza negra (*Coragyps atratus*) y Cormorán Neotropical (*Phalacrocorax brasilianus*) de la Zona de Refugio de Vida Silvestre los Pantanos de Villa, Lima Perú.



Antibióticos: AK: Amikacina; AMP: Ampicilina; AZM: Azitromicina; CIP: Ciprofloxacina; CRO: Ceftriaxona, FOX: Cefoxitina; GEN:

Gentamicina; IMI: Imipenem; LE: Levofloxacin; NA: Ac. Nalidixico; NIT: Nitrofurantoina; TE:Tetraciclina; TGC: Tigeciclina; TOB: Tobramicina; COT: Cotrimoxazol; COL: Colistina. R = Resistencia y S = Sensibilidad.

5.3.3. Caracterización molecular *E. coli* productoras de BLEE

Los aislados de *E. coli* de ambas especies de aves presentaron genes de resistencia a cefalosporinas tipo *bla*_{CTX-M-grupo1}, en concreto *bla*_{CTX-M-55} en el cormorán (*Phalacrocorax brasilianus*), mientras que la procedente del gallinazo cabeza negra (*Coragyps atratus*) presentó los genes *bla*_{CTX-M-grupo1} y *bla*_{TEM}; no se pudo determinar las variantes (**Cuadro 7**).

Cuadro 7. Comparación de perfil de resistencia de antibióticos y presencia de genes de resistencia antibiótica aisladas de Gallinazo cabeza negra (*Coragyps atratus*) y Cormorán Neotropical (*Phalacrocorax brasilianus*) de la Zona de Refugio de Vida Silvestre los Pantanos de Villa, Lima Perú.

Orden	Especie	<i>E.coli</i> BLEE (n)	Perfil de resistencia	Genes de resistencia a BLEE	Genes de resistencia no BLEE
Suliformes	Cormorán Neotropical (<i>Phalacrocorax brasilianus</i>)	3	CAZ, AMC, ATM, CTX, FEP, GEN, TOB, CIP, LE, TE, FOX, CRO, COT, NA	<i>bla</i> _{CTX-M-55}	No
Cathartiformes	Gallinazo de cabeza negra (<i>Coragyps atratus</i>)	1	CAZ, AMC, ATM, CTX, FEP, TOB, CIP, LE, TE, FOX, CRO, COT, NA	<i>bla</i> _{CTX-M-grupo1}	<i>bla</i> _{TEM}
Total		4			

Antibióticos: AMC= Amoxicilina + Ac. Clavulánico ATM= Aztreonam, CAZ= Ceftazidima; CIP= Ciprofloxacini; CRO= Ceftriaxona, CTX= Cefotaxima; FEP = Cefepime; FOX=Cefoxitina; GEN= Gentamicina; LE=

Levofloxacina; NA= Ac.Nalidixico, TE= Tetraciclina; TOB= Tobramicina, COT= Cotrimoxazol.

5.3.4. Clonalidad de las *E. coli* productoras de BLEE de las muestras de aves silvestres

Se analizaron los cuatro aislados de *E. coli* productoras de BLEE por REP-PCR, sin embargo, solo se logró amplificar una sola cepa proveniente de cormorán (*Phalacrocorax brasilianus*) (**Fig.8**). Debido a ello no se pudo establecer la presencia de relaciones clonales.

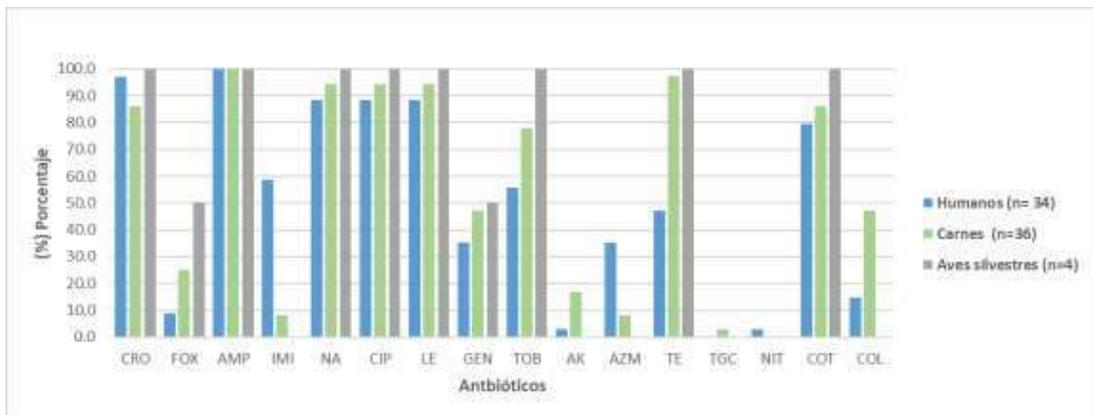
5.4. Comparación de *E. coli* productoras de BLEE aisladas en muestras clínicas, carne de mercado y aves silvestres

5.4.1. Niveles de resistencia a antibióticos en *E. coli* productoras de BLEE de los tres orígenes:

Los niveles de resistencia fueron altos para los antibióticos más usados como quinolonas (ácido nalidíxico, ciprofloxacino y levofloxacino) y cotrimoxazol (>80%). Referente a aminoglucósidos, los niveles de resistencia a gentamicina fueron cercanos al 40%, siendo menor en aislados de origen clínico. Referente a tobramicina, los aislados de origen cárnico y sobre todo aves silvestres presentaron niveles más elevados (>60% y 100% respectivamente). Referente a amikacina, solo se encontró resistencia en aislados de carne (cerca del 20%) y humano (cerca 5%). La resistencia a azitromicina sólo se detectó en cerca del 40% de aislados de origen clínico y cerca del 10% de origen cárnico. Referente a antibióticos de uso como último recurso, se ha reportado resistencia a carbapenems como imipenem en el 58.8% de los aislados BLEE de origen clínico y cerca del 8 % en

aislados de origen cárnico. Referente a colistina se detectó niveles moderados de resistencia de origen clínico y cárnico con 14.7% y 47% respectivamente (**Gráfico 9**).

Gráfico 9. Niveles de resistencia a antibióticos en aislados de *E. coli* productores de BLEE de muestras clínicas, carnes de mercado y aves de vida libre de la zona sur de Lima, Perú (n=74).



Antibióticos: AK: Amikacina; AMP: Ampicilina; AZM: Azitromicina; CIP: Ciprofloxacina; CRO: Ceftriaxona; FOX: Cefoxitina; GEN: Gentamicina; IMI: Imipenem; LE: Levofloxacina; NA: Ac. Nalidixico; NIT: Nitrofurantoina; TE: Tetraciclina; TGC: Tigeciclina; TOB: Tobramicina; COT: Cotrimoxazol. COL: Colistina. R = Resistencia y S = Sensibilidad

5.4.2. Presencia de *E. coli* BLEE y el análisis de los genes de resistencia relacionados con fenotipo BLEE en los tres orígenes

La presencia de *E. coli* productoras de BLEE ha sido mayor en aislados de origen clínico (70.8%), seguido de 54.6% de carnes y un 16.7% en aves de vida libre.

Los genes de tipo *bla*_{CTX-M} fueron los más involucrados en el desarrollo del

fenotipo BLEE. Específicamente, *bla*_{CTX-M-grupo1} es el más frecuente, destacando *bla*_{CTX-M-55} en todos los orígenes y *bla*_{CTX-M-15} (en clínicas y carne) también se han reportado *bla*_{CTX-M-grupo14} en muestras de origen clínico y cárnicas (**Cuadro 8**).

Cuadro 8. Presencia de genes de resistencia antibiótica detectados en *E. coli* aisladas de muestras de clínica humana, carne de mercado y aves silvestres de vida libre de la zona sur de Lima, Perú.

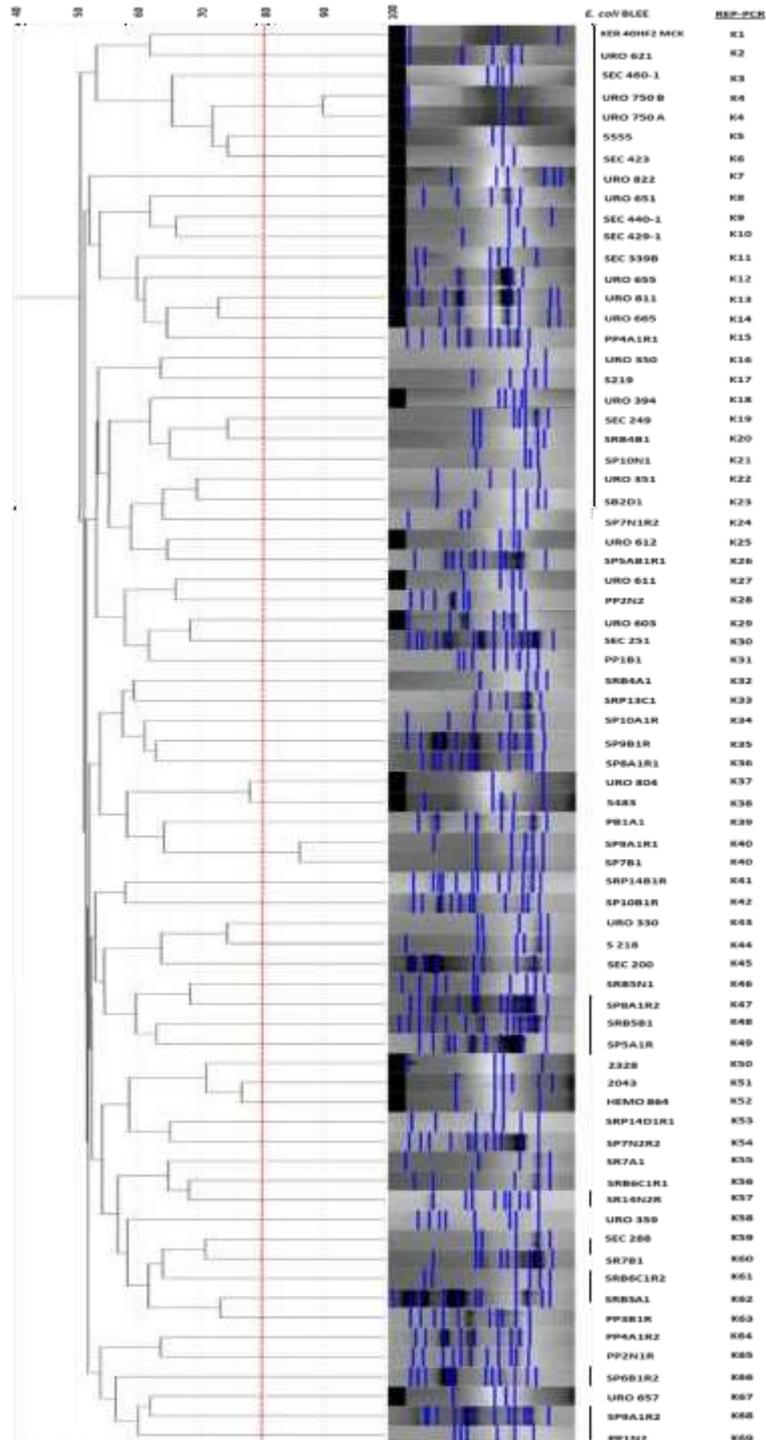
Muestra	<i>E. coli</i> (N)	<i>E. coli</i> BLEE (%)	Genes de Resistencia BLEE	Genes de resistencia No BLEE
Humanos	48	34 (70.8%)	<i>bla</i> _{CTX-M-55} , <i>bla</i> _{CTX-M-27} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV}
Carne de Mercado	66	36 (54.6%)	<i>bla</i> _{CTX-M-55} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{CTX-M-65} , <i>bla</i> _{SHV-27}	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{TEM-176} , <i>bla</i> _{SHV-1}
Aves Silvestres	24	4 (16.7%)	<i>bla</i> _{CTX-M-grupo} , <i>bla</i> _{CTX-M-55}	<i>bla</i> _{TEM}
TOTAL	138	74		

5.4.3. Clonalidad de *E. coli* productora de BLEE aisladas de muestras clínicas, carne de mercado y aves silvestres

Se incluyeron 71 cepas de *E. coli* productoras de BLEE en el análisis de clonalidad por REP-PCR: 34 (47.9%) de clínica humana, 36 (50.7%) de carne de mercado y una (1.4%) de aves silvestres de vida libre. En el dendrograma se observó una alta variabilidad clonal entre las cepas de los

tres orígenes. Se identificaron 69 patrones clonales (desde K1 a K69) entre los 71 aislados. Sólo los patrones K4 y K40 contenían 2 aislados. En el caso de K4 provenientes de muestras clínicas (URO 705 A Y URO 750B) y en el de K40 en dos aislados provenientes de muestras de carne de diferentes muestras de pollo (SP9A1R1 Y SP7B1) (**Figura8**).

Figura 8. Dendrograma de la relación clonal de las *E. coli* productoras de BLEE aisladas de muestras clínicas, carne de mercado y aves silvestres de vida libre en la zona sur de Lima, Perú.



6. DISCUSIÓN

El presente estudio identificó, determinó los niveles de susceptibilidad antimicrobiana y estableció la clonalidad de *E. coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas de tres diferentes orígenes bajo un enfoque de “Una salud”: Clínica humana, carne expandida de mercado y aves silvestres de vida libre de la zona sur de Lima.

E. coli es un patógeno importante en los centros de salud, asociado a todo tipo de muestras, principalmente a urocultivos, hemocultivos y otras fuentes (82). Es importante la vigilancia de los niveles de resistencia a antibióticos en estas cepas, para guiar el tratamiento empírico y observar la vigilancia de la resistencia a antimicrobianos (RAM).

Los niveles de resistencia exhibida por los aislados de *E. coli* de origen clínico fue alta para la mayoría de los antibióticos de uso rutinario en los centros de salud, como cefalosporinas, fluoroquinolonas y aminoglucósidos. Nuestros resultados coinciden con estudios recientes de aislados de *E. coli* de origen clínico de diferentes tipos de muestras y poblaciones. En Perú, estudios como el de Blas *et al.*, reportaron una alta diversidad de patrones de resistencia a antibióticos en pacientes de ambientes hospitalarios y comunitario del instituto nacional materno perinatal mostrando una elevada resistencia a ciprofloxacino (90%), ampicilina (80%) y cotrimoxazol (53%) (83). Otro estudio de Matta-Chuquisapon *et al.* reportaron niveles de resistencia a ciprofloxacina y gentamicina en un 91% y 53% respectivamente en muestras de orina de pacientes oncológicos (84). Mientras, Sosa y Chapoñan reportaron en *E. coli* aisladas de muestras de

orina de pacientes hospitalizados en Chiclayo, niveles de resistencia mayores del 70% a ampicilina, ciprofloxacina, levofloxacina y trimetoprim/sulfametoxazol, 50% a aztreonam y tobramicina y 43.4% a gentamicina (85).

Por otro lado, la presencia de *E. coli* productoras de BLEE ha ido en aumento en los últimos años, siendo un problema global emergente (74), en especial en entornos hospitalarios, que oscilan entre el 54% y el 77% (74), destacando los elevados niveles de cepas que circulan en UCI (Unidad de cuidados intensivos) (86), así como en pacientes hospitalizados y ambulatorios de los centros de salud (83).

En nuestro estudio se destaca que la mayoría de *E. coli* presentaron fenotipo BLEE con un 70.8% (34/48) coincidiendo con estudios previos realizados en diferentes hospitales del Perú. En el norte, en un hospital de Chiclayo, Escalante- Montoya *et al.* reportaron 61% (36/59) de *E. coli* productoras de BLEE (87). En un hospital del Callao, Tejada-Llacsca *et al.*, reportaron un 32.8% (672/2047) de aislamientos de *E. coli* BLEE y el 92.1% (619/672) de estas provenían de muestras de urocultivos (88). En un hospital de la zona norte de Lima, Falconí sarmiento *et al.*, reportaron un 55.8% (24/43) de *E. coli* productoras de BLEE de diferentes orígenes (89). Así mismo, en un estudio en hospitales públicos regionales de Madre de Dios y Ucayali, León-Luna *et al.*, reportaron 42.6% (26/61) de *E. coli productoras* BLEE (90).

Si bien es cierto, en los últimos años se ha reportado una alta prevalencia de *E. coli* productoras de BLEE, estos casos reportados son principalmente en pacientes con ITU (Infecciones del tracto urinario) que se considera como

la segunda causa de infección en pacientes ambulatorios e intrahospitalarios. Marcos-Carbajal *et al.*, reportaron un 55.7% (39/70) de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de muestras urinarias de 8 hospitales públicos de diferentes provincias del Perú (91). Se destaca a *E. coli* como causante de sepsis de focos urinarios, sin embargo, también puede estar asociada a otros focos de infección con neumonía e infecciones intraabdominales. Por otro lado, cabe destacar que las *E. coli* no BLEE y *E. coli* BLEE de origen clínico de este estudio presentaron patrones de resistencia a al menos a una familia de antibióticos, siendo la más relevante la presencia de resistencia a colistina con 10.4%(5/48) en *E.coli* no BLEE y 14.7%(5/34) en *E.coli* BLEE, esto coincide con un estudio previo de Yauri-condor *et al.*, que reportaron enteropatógenos productores de BLEE entre ellos *E.coli* que presentaron un 15.2%(25/165) de resistencia a colistina y estos presentaron el gen *mcr-1* en pacientes oncológico del instituto nacional de Enfermedades Neoplásicas (92). Este hecho pone en relevancia el riesgo de la posible co-expresión y co-selección de diferentes mecanismos de resistencia en *E. coli* con fenotipo BLEE, que podría contribuir a cepas más resistentes a diferentes antimicrobianos, dejando pocas alternativas de tratamiento en el ámbito clínico.

Aparte de la vigilancia en clínica, la cadena alimentaria también actúa como vía de transmisión de *E coli*, a pesar que la normativa sanitaria peruana (NTS N°071 aprobada por R.M. 591-2008/MINSA/DIGESA-V-01) que asegura que la carga microbiana cumpla con los criterios microbiológicos establecidos, existe carga de bacterias que se relaciona principalmente a un

manejo inadecuado de alimentos y/o productos cárnicos durante el proceso de distribución del camal hasta el punto final de la venta en los mercados del país (93). Mencionar que el Perú es un gran consumidor de carne, en especial de pollo, debido a su accesibilidad, siendo de hecho la principal fuente de proteína de las familias peruanas y el insumo central de nuestra cocina; solo en 2021, el consumo per cápita fue de 85 Kg/hab/año mientras que el de carne de vacuno fue 6 Kg/hab/año (94).

Nuestro estudio reportó la presencia de *E. coli* aisladas de carne de pollo con 69.7% (46/66) y vacuno con 30.3% (20/66) expandidas de mercados del distrito de Villa el Salvador. Como se mencionó anteriormente la presencia de carga microbiana en productos cárnicos tiene límites microbiológicos permisibles que nos asegura la inocuidad de los productos regido por una norma técnica, sin embargo, en nuestro estudio no determinó la carga, sino se destaca la alta presencia de resistencia a antibióticos de *E. coli* con patrones de MDR a las familias de antibióticos como quinolonas, aminoglucósidos, tetraciclinas, carbapenems y colistina. Destacando la presencia de *E. coli* productora de BLEE aislados de ambos tipos de carne con niveles de resistencia a colistina con 48% (12/25) en carne de pollo y 45.5% (5/11) en carne de vacuno. Este hecho es preocupante para la salud pública, a pesar de que está prohibido en nuestro país el uso de colistina y sus derivados en animales para consumo humano a través de la resolución directoral N°0091-2019-MINAGRI-SENASA-DIAIA (95).

Estudios previos reportaron valores similares a nuestro estudio como el de Murray et al., que reportaron *E.coli* productoras de BLEE en pollos no

orgánicos con 39.2% (51/130), presentaron patrones de multirresistencia a más de cinco familias de antibióticos, así como dos cepas presentaron el gen *mcr-1* que da resistencia a colistina, por otro lado, en pollos orgánicos presentaron niveles inferiores de multirresistencia 11.4% (4/35), por lo tanto, podrían estar vinculados al tratamiento y la alimentación de estos en las granjas de producción (14).

Además, Benavides *et al.*, reportaron el uso de antibióticos en granjas de animales de producción, junto con el escaso conocimiento y el posible mal uso de los antibióticos entre los medianos y pequeños productores (96), que ayuda a la selección de cepas resistentes que se transmitirán a través de la cadena alimentaria.

Otros estudios en carne expandidas en mercados de Lima coincidieron parcialmente con nuestros hallazgos, Ruiz-Roldan *et al.*, reportaron la presencia de *E. coli* productoras de BLEE con 59.4% (19/32) en carne de pollo, sin embargo, no hubo presencia de *E. coli* productoras de BLEE en carne de vacuno (63). Cortez-Sandoval *et al.*, reportó la presencia de enterobacterias productoras de BLEE en carne de pollo expandidas en el mercado de Santiago de Surco y aisló e identificó *E. coli* productoras de BLEE con 23.5 % (8/34) en carne de pollo (97). Estos resultados ponen en manifiesto la necesidad de implementar medidas de control para minimizar la transmisión de bacterias resistentes en la cadena alimentaria.

En el ámbito de la vida silvestre, no hay muchos estudios con un abordaje sobre el impacto de la resistencia antibiótica debido a que está influenciado por muchos factores bióticos y abióticos, sin embargo, la vigilancia

ambiental de la resistencia a los antibióticos es de gran importancia para comprender el impacto antropogénico en la vida silvestre. Se ha descrito el papel importante de la fauna silvestre en la diseminación de la resistencia a los antibióticos en el medio ambiente. Las aves silvestres, en particular, por su capacidad para ocupar distintos nichos ecológicos y adaptarse a muchos entornos urbanos, suburbanos y ganaderos, representan verdaderas centinelas de la resistencia antimicrobiana ya que pueden adquirir y transportar fácilmente bacterias humanas y ambientales (98,99).

Dado que casi todos los entornos y la vida silvestre están influenciados por actividades antropogénicas, la aparición de bacterias RAM cada vez es más elevada en diferentes ambientes. La urbanización cerca de áreas naturales protegidas en la ciudad de Lima, como los humedales costeros que brindan amplios servicios ecosistémicos como corredores biológicos, así como espacios de refugio para muchas especies que están altamente influenciado por actividad antropogénica como la Zona de refugio de vida silvestre Los Pantanos de Villa, ubicado en una zona periurbana de la ciudad de Lima, conocido por ser un cuerpo de aguas que constituye un espacio silvestre para la reproducción, refugio y ruta migratoria de aves a lo largo de la costa pacífica de América del Sur (100). Las presiones antropogénicas en Los pantanos de Villa revisten especial importancia debido a que están bajo la influencia de asentamientos humanos que lo rodean, por la exposición de los efluentes, desechos sólidos y desmontes a la zona (111). Por ello, la presencia de bacterias resistentes a antibióticos representaría un riesgo para las poblaciones de fauna silvestre porque se pudieran introducir genes de

resistencia en poblaciones que nunca antes han sido expuestas a antibióticos. La Zona de refugio de vida silvestre los de Pantanos de villa, alberga 211 especies de aves de las cuales 97 especies son residentes, 82 son migratorias y 32 son visitantes ocasionales y el 80.1% de especies están presentes en cualquiera de los hábitats de pantanos de Villa (111). La presencia de *E. coli* en aves silvestres es variable y se asocia a la exposición de la actividad antropogénica y el tipo de alimentación (102).

En nuestro estudio, el porcentaje de aves silvestres que presento *E. coli* fue de 58.5% (24/41) provenientes de 9 especies de aves residentes del orden Paseriformes como *Coereba flaveola*, *Tachuris rubrigastra*, *Pygochelidon cyanoleuca*, *Phleocryptes melanops*, *Sicalis olivascens*, que tienen una alimentación omnívora (a base de semillas ,frutas e insectos) y habitan alrededor de grandes áreas residenciales con alta actividad humana; aves marinas del orden Suliformes y Charadriiformes como *Haematopus palliatus*, *Sula variegata* y *Phalacrocorax brasilianus* con una alimentación piscívora y aves del orden Cathartiformes como *Coragyps atratus* con una alimentación carroñera. Nuestro resultado fue mayor al de un estudio previo que reportó *E. coli* en el 23% de aves examinadas, donde se encontró que la presencia de *E. coli* dependía de la asociación con el contacto humano, la dieta y la masa corporal, siendo estos predictores significativos de la prevalencia de *E. coli* en aves silvestres (102).

Por otro lado, en nuestro estudio se observó que las *E. coli* presentaron niveles elevados de resistencia a antibióticos de uso humano como tobramicina (80%), seguido de ampicilina (63%), tetraciclina (42%) y

cotrimazol (38%) considerándose cepas con patrones de multiresistencia. En Perú existen pocos estudios de resistencia antibiótica, pero un estudio en aves del norte del Perú, Espinoza *et al.*, reportaron niveles de resistencia de *E. coli* en heces de piqueros peruanos (*Sula variegata*) a al menos 5 familias de antibióticos como ampicilina, tetraciclina, cotrimoxazol, gentamicina, azitromicina y quinolonas (16). En Brasil, Fortes Beleza *et al.*, reportaron la presencia de 26% (13/50) de *E. coli* con niveles de resistencia a antibióticos como ampicilina del 53.8% (7/13) y del 15.4% (2/13) a ácido nalidíxico en aves de vida libre en la ciudad de Mulungu, indicándonos que pudo haber algún contacto con residuos antropogénicos (38). Aunque la fuente de estos aislamientos bacterianos sigue siendo incierta, la vida silvestre no está directamente expuesta a los antibióticos en la mayoría de los casos y se deben considerar otras vías antropogénicas de transmisión como el contacto de agua contaminada y depredación de animales infectados.

Otro punto relevante es la presencia de *E. coli* productora de BLEE en estudios de aves migratorias, que se ha reportado ampliamente en todo el mundo y probablemente estén involucradas en la propagación de estos patógenos a largas distancias incluidas reservas naturales y áreas pelágicas con bajo impacto antropogénico (103).

En nuestro estudio se identificó fenotípicamente un 16.7% de *E. coli* productoras de BLEE. Estas cepas fueron aisladas de gallinazos de cabeza negra (*Coragyps atratus*) con 4.2% (1/24) y cormorán neotropical (*Phalacrocorax brasilianus*) con 12.5% (3/24), ambos con un comportamiento social y alimentario diferente. Los buitres del nuevo mundo

como el gallinazo cabeza negra (*Coragyps atratus*) tiene un comportamiento gregario y está altamente asociado a la actividad humana debido a su alimentación carroñera. Sin embargo, estas aves también quedan expuestas a los residuos de antibióticos ingeridos mientras se alimentan de cadáveres de animales domésticos, desechos agrícolas y material no biológico (104,105). Los subproductos de animales que no están destinados a consumo humano y no se les aplica los tiempos de retiro de antibióticos son desechados al ambiente; estos lugares pueden representar fuentes de alimento abundante para un gran número de estas aves, aumentando la adquisición, la transmisión cruzada intra e interespecífica y la propagación de patógenos en el ganado, la vida silvestre y humanos (105).

Además, las actividades antropogénicas en ecosistemas acuáticos tienen un alto impacto, especialmente en cuerpos de agua naturales influenciados por descargas de aguas residuales, presencia de vertederos costeros, descarte de la pesca y la industria acuícola, provocando que las aves marinas interactúen con mayor frecuencia con los humanos (106,107). El *Phalacrocorax brasilianus* o Cormoran Neotropical, es un ave marina que tiene una amplia distribución y está presente en diferentes ecosistemas costeros, amazónicos y altoandinos, se alimenta en aguas poco profundas, tanto en cuerpo de agua continentales como marinos y su dieta es piscívora, compuesta principalmente por peces bentónicos(106), por lo tanto también son perfectos bioindicadores para ver la aparición de bacterias resistentes a antibióticos ya que rara vez se alimenta de desechos antropogénicos.

Estudios similares han reportado que el porcentaje de *E. coli* productoras

BLEE es mayor en comparación con nuestros resultados, en el caso de gallinazo cabeza negra (*Coragyps atratus*), a pesar de ser carroñero y tener mecanismos de defensa a nivel gástrico hacia bacterias patógenas, Rodrigues de Carvalho *et al.*, reportaron la presencia de *E. coli* a nivel intestinal (108). En otro estudio, en una zona urbana de Brasil, Batalha de Jesus *et al.*, reportaron un 31.7% (13/41) de *E. coli* productora BLEE en *Coragyps atratus* (109). Por otro lado, en Ecuador, Reyes Capuliña reportó 17.2% (5/29) de *E. coli* productora BLEE aisladas de heces de Cormorán Neotropical (*Phalacrocorax brasilianus*) de una laguna altoandina (110). A nivel molecular, existen pocos estudios que hayan caracterizado las variantes de los genes *bla*_{CTX-M} en enterobacterias productoras de BLEE de diferentes ambientes en Perú.

A nivel humano, la variante CTX-M-15 se reportó por primera vez en cepas aisladas de niños sanos de comunidades rurales de la selva peruana como Moyobamba y Yurimaguas (111,112), así como en niños con bacteriemia causada por *E. coli* productoras de BLEE (74). Recientemente Ymaña *et al* reportaron la presencia de CTX-M-15 aisladas también en entornos clínicos, concretamente en celulares y uniformes de trabajadores de unidades de cuidados intensivos (UCI) (86).

Por otro lado, la variante CTX-M-27, que presenta una sustitución (D240G) de la variante CTX-M-14 (113,114), se ha detectado en muestras de origen clínico. Este hallazgo se ha reportado previamente en la vigilancia mundial del clon *E. coli* ST131, si bien es cierto este clon está asociado a la variante CTX-M-15, se diferencia en que la CTX-M-27 solo se encuentra en las

ST131 mientras que las variantes CTX-M-14 y CTX-M-15 pueden estar entre los aislados de *E. coli* ST131 y no ST131 y estas variantes están relacionadas con la presencia y diseminación de clones internacionales de *E. coli* extraintestinales patógenos de alto riesgo(114,115,116). Inicialmente la CTX-M-27 reportó en Europa central y Japón en aislamientos no clínicos en humanos, en animales domésticos y aves acuáticas (114). Además, se ha reportado en cepas de origen clínico y pollos de engorde (117), así como en muestras de agua residuales (118). En América del Sur, Fernandes et al., reportaron por primera vez la presencia de ST131 productoras de CTX-M-27 en ecosistema marítimo de mejillones pardos y ostras en Brasil, en áreas de intenso tráfico marítimo impactadas por actividades de transporte transoceánico y efluentes contaminados de aguas residuales urbanas, desechos animales y efluentes hospitalarios con presencia positivas para esta cepa (119). Sin embargo, en nuestro estudio CTX-M-27 solo se aisló de muestras de origen clínico con un porcentaje bajo.

Si bien es cierto que CTX-M-15 se considera el gen con mayor prevalencia a nivel mundial en cepas con fenotipo BLEE, parece que en América Latina esta posición la tiene CTX-M-55; en los últimos años la región está reportando con mayor frecuencia la variante CTX-M-55, similar a CTX-M-15 pero con una sustitución de aminoácidos (Ala-80-Val) que le confiere mayor eficiencia catalítica contra ceftazidima (120).

La variante CTX-M-55, que ha sido la de mayor frecuencia en nuestro estudio, está distribuido ampliamente en Asia y América del sur, y existe una serie de estudios principalmente en China que muestran la presencia

común de CTX-M- 55; además han sugerido que esta variante reportada tanto en muestras clínicas y no clínicas de humanos podría provenir de fuentes de alimentos de origen animal ya que previamente se ha aislado de animales domésticos y de producción (121,122). Destacar que también en nuestro estudio la variante CTX-M-55 tuvo mayor presencia y se aisló de los 3 orígenes estudiados, en muestras clínicas con 35.3%, en carne de pollo y res de mercado (86.4% y 100% respectivamente) y en aves silvestres de vida libre 25% (1/4).

En Perú, en muestras de origen clínico, Deshpande *et al.*, reportaron previamente en humanos la presencia de un aislado de *E. coli* productor de *mcr-1* que también era productor de CTX-M-55 en muestras de infecciones de piel, acotando que la presencia de enterobacterias productoras de BLEE que portan el gen *mcr-1* estaba aumentando en la región (123).

Nuestros resultados en carne de pollo coincidieron con otros reportes sobre la presencia de variantes de CTX-M, como en Ecuador donde Ortega-Paredes *et al.*, reportaron la presencia de CTX-M-55 (42.2%), CTX-M-65 (21.7%), CTX-M-15 (0.7%), en carne de pollo (124). Otro estudio en Portugal, Clemente *et al.*, reportaron el aislamiento de variantes poco comunes para Europa de CTX-M-55 en carne de pollo (11.6%) y carne de vacuno (3.8%), así como CTX-M-65 (11.6%) de carne de vacuno (125). Cabe resaltar que la CTX-M-65 está ampliamente distribuida en Asia, América del Norte y Sur, y es prevalente en la producción avícola (124). Es importante mencionar que en Perú se ha reportado esta variante tanto en *Salmonella enterica* serovar Infantis aisladas de pollo, como en muestras

clínicas en niños, comprobándose que estos aislados de diferente origen estaban relacionadas clonalmente (126).

Dentro de la carne expedita en mercados, la carne de pollo ha presentado una mayor variedad de genes *bla*_{CTX-M} comparado con la carne de vacuno. Este hecho es importante a nivel de salud pública, teniendo en cuenta que nuestro país tiene una población urbana y periurbana de grandes cifras, y la carne de pollo es la principal fuente de proteína de la comunidad (94). Esto se traduce en sistemas de producción avícola masificados para abastecer al consumidor, además de camales legales y clandestinos, una poca regulación que hace que se favorezcan las contaminaciones cruzadas en los alimentos. Entre los reportes recientes que implicaron el estudio de *E. coli* de carne aviar destinados al consumo humano en nuestro país, se destaca el estudio de Murray et al., reportaron la presencia de *bla*_{CTX-M-55} en heces de pollo de engorde y vendedores en el cono sur de Lima (14). Posteriormente, Carhuaricra et al., reportaron el aislamiento de cinco *E. coli* productoras del gen *mcr-1* que también eran portadoras de *bla*_{CTX-M-55} aisladas de heces de pollo de engorde y cerdo de granja en Lima metropolitana (127). Si bien es cierto, nuestro estudio fue en carne de pollo y vacunos expeditas en mercados, se puede observar que a nivel intestinal de animales de producción hay una presencia de *E. coli* productora de CTX-M-55, lo cual puede facilitar la contaminación cruzada durante la manipulación en el camal o en los puestos de mercado siendo un riesgo para la seguridad alimentaria y salud pública.

En el ámbito de fauna silvestre periurbana, en nuestro estudio se reportó una

sola especie de ave, Cormorán neotropical (*Phalacrocorax brasilianus*) con presencia de la variante CTX-M-55. No se han encontrado otros reportes en esta especie hasta el momento, sin embargo, otros estudios en aves silvestres en América del sur han reportado la presencia de *bla*_{CTX-M-55} aisladas de Cóndor andino (*Vultur gryphus*) en Chile (128), en Gallinazo cabeza negra (*Coragyps atratus*) en áreas peri urbanas de Brasil (129) y gaviotas Franklin (*Leucophaeus pipixcan*) en Chile (130).

Así mismo, en nuestras muestras de carne de pollo se identificó la variante SHV- 27, que también es considerada una BLEE debido a que es una β -lactamasa capaz de hidrolizar cefotaxima, ceftazidima y aztreonam, a diferencia de otras variantes de SHV no BLEE. La SHV-27 presenta tres mutaciones silenciosas y una sustitución de aminoácidos (Gly-156-Asp). Esta variante se reportó por primera vez en Brasil en el 2001 (131), y se ha reportado la presencia de esta variante en *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli* aisladas de animales de producción destinados a consumo humano como cerdos y peces de cultivo en China y en leche de vacas asintomáticas a mastitis en Japón (55). En el Perú se describió este gen previamente en aislados clínicos de neonatos con sepsis vinculad a *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE (132).

Referente a los genes relacionados con las β -lactamasas no BLEE, en nuestro estudio se observó la presencia de los genes *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV}. En las muestras de origen cárnico, las muestras de carne de pollo presentaron la variante TEM-1 mayormente, pero también TEM-176 y SHV-1. Cabe resaltar que en las muestras clínicas de humanos y aves silvestres se detectó

la presencia de *bla*_{TEM}, sin embargo, no se logró secuenciar.

A pesar de que en Perú existen pocos estudios donde se ha secuenciado el gen *bla*_{TEM} y no se conocen muy bien las variantes que circulan en nuestro país, nuestros resultados han coincidido con la presencia de la variante TEM-176 que se reportó en una *E. coli* enterotoxigénica aislada de niños con diarrea (133). Esta variante difiere en un aminoácido (Ala222Val) con respecto a la TEM-1, esto puede influenciar en el espectro de actividad en lo betalactámicos y se ha aislado de muestras de diferentes orígenes principalmente de pollos de engorde (134). Asimismo esta variante presenta una amplia distribución geográfica como Austria, Australia, Ecuador, Singapur o Tanzania (133).

Referente a la variante SHV-1, se ha reportado en varias especies de enterobacterias y se considera una enzima codificada por plásmidos, su espectro de actividad hidrolítica es similar al de la TEM-1 pero logra una mejor actividad frente a ampicilina.

Se ha reportado una elevada diversidad de patrones, en acuerdo con la diversidad de genes de resistencia reportados. A excepción de pocas cepas, podemos decir que la presencia de cepas *E. coli* productoras BLEE en los 3 ambientes estudiados no se debe a la expansión de un clon, sino a la selección y diseminación de cepas BLEE de varios orígenes, seleccionadas seguramente por el elevado uso de las cefalosporinas tanto en humanos como en animales de producción que pueden llegar hasta el ambiente, como demuestra su detección en aves de vida libre. Mencionar que no hay una división entre los patrones de humanos y las provenientes de animales, sino

que hay una mezcla de clones en los diferentes orígenes.

Finalmente, nuestro estudio contribuye con el enfoque Una Salud abordando la circulación de *E. coli* productoras BLEE entre cepas clínicas humanas, carne de mercados y aves silvestres de vida libre en la zona sur de Lima, Perú. La propagación de la resistencia a los antibióticos en la interfaz entre humanos, alimentos y aves silvestres de vida libre sigue sin comprenderse bien. En este estudio se reportó la elevada variabilidad de genes y clones y como estos son compartidos en los diferentes ambientes. Si bien es cierto estos mecanismos son naturales, ante una presión selectiva por factores antropogénicos se seleccionan positivamente, favoreciendo la supervivencia de las bacterias que los poseen,

generando una población bacteriana con resistencia a antibióticos adquirida. Por ello, la resistencia antibiótica representa un problema de salud a nivel mundial.

Se recomienda hacer más vigilancia a nivel molecular de los genes implicados en la resistencia, no solo en humanos, sino extender a animales, alimentos y ambiente. Es importante conocer los niveles en clínica y en animales domésticos y de consumo por su uso de antibióticos, y cómo estos microorganismos llegan a los animales de vida libre. De hecho, hasta ahora se ha descuidado el papel de animales silvestres periurbanos como bioindicadores o como posibles diseminadores de patógenos bacterianos siendo un tema poco abordado desde la perspectiva ecológica y científica.

Resaltar la importancia del presente estudio, donde además del ámbito clínico en humanos, se observaron niveles elevados de resistencia y presencia de *E. coli* productoras BLEE en cepas aisladas de alimentos y animales silvestres, pudiendo actuar como reservorio y posibles diseminadores de bacterias productoras de BLEE y sus genes de resistencia en áreas periurbanas de ciudades densamente pobladas, que es una cuestión crítica desde la perspectiva Una Salud.

7. LIMITACIONES

Este estudio tuvo algunas limitaciones, principalmente en no disponer de la información clínica de los pacientes, y no siempre en la base de datos se encontraron los datos necesarios para completar la información del estudio.

Mencionar que el tamaño muestral de aves silvestres fue limitado debido a la dificultad de la colecta de las muestras en las redes de niebla, impidiendo una estimación más precisa de la prevalencia de *E. coli* BLEE en las diferentes especies de aves de la zona.

La técnica REP-PCR es una aproximación para estudios de clonalidad, pero convendría poder caracterizar las cepas con técnicas de mayor resolución como la electroforesis en campo pulsado (PFGE) o Multi Locus Sequence Typing (MLST).

8. CONCLUSIONES

Este estudio reporta la presencia de *E. coli* productoras de BLEE con 53.6% (74/138) aisladas de los tres orígenes, siendo más frecuentes en las muestras clínicas y cárnicas comparado con las de aves silvestres de vida libre.

Se confirmó la presencia de *E. coli* productoras de BLEE con elevados niveles de resistencia a antibióticos no β -lactámicos, principalmente en el caso de los aislados de origen clínico humano y cárnico para quinolonas, cotrimoxazol y tetraciclina, siendo cercanos al 80%. Para colistina se detectó 14% de resistencia en aislados clínicos y valores cercanos al 40% en los de carne de mercado. Para los aislados de aves silvestres la resistencia a los antimicrobianos fue menor, en comparación con los otros orígenes, pero se destacan niveles muy elevados de resistencia a tobramicina con 80% y valores cercanos al 40% para tetraciclina y cotrimoxazol.

Se confirmó que la presencia de *E. coli* productoras de BLEE están relacionadas con la presencia del gen *bla*_{CTX-M-grupo-1}. La variante CTX-M-55 fue la mayoritaria, tanto en muestras clínicas, carnes de mercado como de aves de vida libre. Además, en humanos y cárnicos se detectó la variante CTX-M-15. Solo en humanos se detectó la variante CTX-M-27. Además de las variantes CTX-M-65 y SHV-27 solo en carne de pollo.

No se presenció relación clonal entre las cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de las tres muestras, excepto en algún caso en concreto como las muestras de origen clínico y cárnicos que se relacionaron entre ellas. Esto nos indica un origen y diseminación no clonal.

9. RECOMENDACIONES

- Implementar programas de vigilancia activa a nivel molecular y genómico de cepas de importancia clínica en la interfaz de humanos, animales, alimentos y ambientes contaminados, a fin de informar la diseminación y el papel como reservorios.
- A nivel de cadena alimenticia, se recomienda la realización de controles de calidad microbiológica a lo largo del proceso para establecer un punto crítico de contaminación. Este control permitiría determinar el nivel de cumplimiento de las buenas prácticas en producción animal y/o su procesamiento.
- Informar, capacitar y concienciar a los sectores de animales productivos, también el agropecuario, con respecto al problema de resistencia antibiótica.
- Realizar investigaciones de animales silvestres periurbanos como bioindicadores o posibles diseminadores de bacterias resistentes a antibióticos para tener una perspectiva del impacto antropogénico.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1) Olivares J, Bernardini A, Garcia-Leon G, Corona F, Sánchez M, Martínez J (2013). The intrinsic resistome of bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*; 4:103. Doi: 10.3389/fmicb.2013.00103
- 2) WBG [World Bank Group] (2017). Drug-resistant infections. A threat to our economic future. Recuperado: 08/01/2022, International Bank for Reconstruction and Development. Disponible en: <https://www.worldbank.org/en/topic/health/publication/drug-resistant-infections-a-threat-to-our-economic-future>.
- 3) Palma E, Tilocca B, Roncada P (2020). Antimicrobial resistance in veterinary medicine: an overview. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(6):1914. Doi:10.3390/Ijms21061914
- 4) O'Neill J. (2014). Antimicrobial resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. Londres (Reino Unido): Hm Government/Wellcome Trust; Disponible en: <https://amr-review.org/>
- 5) Antimicrobial Resistance Collaborators (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *The Lancet*. 399(10325):629-655. Doi:10.1016/s0140-6736(21)02724-0
- 6) Hernando-Amado S, Coque T, Baquero F, Martínez J (2019). Defining and combating antibiotic resistance from one health and global health perspectives. *Nature Microbiology*. 4:1432-1442. Doi: 10.1038/s41564-019-0503-9
- 7) Aslam B, Khurshid M, Imran M, Muzammil S, Rasool M, Yasmeen N, Shah T, Chaudhry T.H, Rasool H.M, Shahid A,

- Xueshan X, Baloch Z (2021). Antibiotic resistance: One health one world outlook. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 11:771510. Doi: 10.3389/fcimb.2021.771510
- 8) OMS [Organización mundial de la salud] (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery and development of new antibiotics. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- 9) Poirel LT, Madec J.Y, Lupo A, Schink A.K, Kieffer N, Nordmann P, Schwarz S T. (2018) Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*. 6(4):1-27. Doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017
- 10) Nji E, Kazibwe J, Hambridge T, Joko C.A, Larbi A.A, Dampsey L, Nkansa-Gyamfi N.A, Stalsby Lundborg C, Lien T.Q. (2021). High prevalence of antibiotic resistance in commensal *Escherichia coli* from healthy human sources in community settings. *Scientific Reports*. 11(1):3372. Doi: 10.1038/s41598-021-82693-4
- 11) Medina-Pizzali ML, Hartinger SM, Salmom-Mulanovich G, Larson A, Riveros M, Mausezahl D (2021). Antimicrobial resistance in rural settings in Latin America: A scoping review with a One health lens. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 18(18):9837. Doi: <https://doi.org/10.3390/ijerph18189837>
- 12) Hooban B, Fitzhenry K, O'connor L, Miliotis G, Joyce A, Chueiri A, Farrell MI, Delappe N, Tuohy A, Cormican M, Morris D (2022). A longitudinal

survey of antibiotic-resistant enterobacterales in the Irish environment 2019-2020. *Science of The Total Environment*. 828:154488. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.154488

13) Castillo AK, Espinoza K, Chavez AF, Guibert F, Ruiz J, Pons MJ (2022). Antibiotic susceptibility among non-clinical *Escherichia coli* as a marker of antibiotic pressure in Peru (2009-2019): One health approach. *Heliyon*. 8(9):e10573. Doi: 10.1016/j.heliyon. 2022.e10573

14) Murray M, Salvatierra G, Dávila-Barclay A, Ayzanoa B, Castillo-Vilcahuaman C, Huang M, Pajuelo MJ, Lescano AG, Cabrera L, Calderón M, Berg DE, Gilman RH, Tsukayama P (2021). Market chickens as a source of antibiotic-resistant *Escherichia coli* a peri-urban community in Lima, Peru. *Frontiers in Microbiology*.12:635871. Doi:10.3389/fmicb.2021.635871

15) Hartinger S.M, Medina-Pizzali M.L, Salmon-Mulanovich G, Larson AJ, Pinedo-Bardales M, Verastegui H, Riberos M, Mäusezahl D (2021). Antimicrobial resistance in humans, animals, water and household environs in rural Andean Peru: Exploring dissemination pathways through the one health lens. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 18(9): 4604. Doi: 10.3390/ijerph18094604

16) Espinoza K, Zavalaga C, Irigoien-Lovera C, Gonzales-Del Carpio D, Santibañez I, Pons MJ, Ruiz J (2021). Antimicrobial resistance levels among gram-negative bacteria from peruvian boobies (*Sula variegata*) in northern Peru. *Journal of Wildlife Diseases*, 57(3):722-725. Doi:10.7589/Jwd-D-21-00003

- 17) Van Den Bogaard A, Stobberingh E. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics. links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 14(4): 327-335. Doi: 10.1016/s0924-8579(00)00145-x
- 18) Vila J, Sáez-López E, Johnson Jr, Römling U, Dobrindt U, Cantón R, Giske C, Naas T, Carattoli A, Martínez-Medina M, Bisch J, Retamar P, Rodríguez-Baño J, Baquero F, Soto MI (2016). *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. *Fems Microbiology Reviews*. 40(4): 437-463. Doi: 10.1093/femsre/fuw005.
- 19) Ramos S, Silva V, Enes ML, Canica M, Tejedor-Jucno M, Igrejas G, Poeta P (2020). *Escherichia coli* as commensal and pathogenic bacteria among food-producing animals: Health implications of extended spectrum β -lactamase (ESBL) production. *Animal (basel)*. 10(12): 2339. Doi: 10.3390/ani10122239
- 20) Pamela C, Chevarin C, Xu Z, Torres J, Sevrin S, Hirten R, Barnich N, Ng SC, Colombel JF (2018). Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut*. 67(3) :574-587. Doi: 10.1136/gutjnl-2017-314903
- 21) Vadillo S, Piriz S, Mateos E (2002). *Manual de microbiología veterinaria*. Me Graw Hill interamericana, Cuarta edición, España.
- 22) Ebbensgaard A, Mordhorst H, Aarestruo F, Hansen E (2018). The role of outer membrane proteins and lipopolysaccharides for the sensitivity of *Escherichia coli* to antimicrobial peptides. *Frontiers in Microbiology*. 9:2153. Doi: 10.3389/fmicb.2018.02153

- 23) Bertani B, Ruiz N. Function and biogenesis of lipopolysaccharides (2018). *Eco sal plus*. 8:1 Doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0001-2018
- 24) Barreteau H, Kovac A, Boniface A, Sova M, Gobec S, Blazit D (2008). Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*. 32(2):168-207. Doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00104.x
- 25) Garder S, Kumar P, Reddy M (2021). Peptidoglycan: Structure, synthesis and regulation. *Eco Sal plus*.9(2). Doi: <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0010-2020>
- 26) Robins-Browne R, Holt K, Ingle D, Hocking D, Yang J, Tauschek (2016). Are Escherichia coli pathotypes still relevant in the era of whole genome sequencing? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 6:141. Doi: 10.3389/fcimb.2016.00141
- 27) Frost L, Leplae R, Summers A, Toussaint A (2005). Mobile genetic elements: The agents of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology* (3):722-732. Doi:10.1038/nrmicro1235
- 28) Bennett P (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology*. 153(1):347-357. Doi: 10.1038/sj.bjp.0707607
- 29) Stokes H, Gillings M (2011). Gene flow, mobile genetic elements and recruitment of antibiotic resistance genes into Gram- negative pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*. 35(5): 790-819. Doi: :10.1111/j.1574-6976.2011.00273.x
- 30) Beyrouthy R, Sabenca C, Robin F, Poeta P, Igrejas G, Bonnet R (2021). Successful dissemination of plasmid-mediated extended spectrum β -lactamases in Enterobacterales over humans to wild fauna.

Microorganisms. 9(7):1471. Doi: 10.3390/microorganisms9071471

31) Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. Nature Reviews Microbiology. 8(3):207-2017. Doi:10.1038/nrmicro2298

32) Jordan KN, Oxford L, O'Byrne CP (1999). Survival of low- pH stress by *Escherichia coli* O157:H7: Correlation between alterations in the cell envelope and increased acid tolerance. Applied and Environmental Microbiology. 65(7): 3048-3055. Doi: 10.1128/aem.65.7.3048-3055.1999

33) Jang J, Hur H, Sadowsky M, Byappanahalli M, Yan T, Ishii S (2017). Environmental *Escherichia coli*: Ecology and public health implications a review. Journal of Applied Microbiology-123(3): 570-581. Doi: 10.1111/jam.13468

34) Albureesh H, Goulder R, Scoot G (2007). Wild birds and human pathogens in the context of rining and migration. Ringning and Migration. 23(4):193-200. Doi: 10.1080/03078698.2007.9674363

35) Sun F, Chen J, Liu K, Tang M, Yang Y (2022). The avian gut microbiota: Diversity, influencing factors, and future directions. Frontiers in Microbiology.13: 934272. Doi: 10.3389/fmicb.2022.934272

36) Grond K, Sandercock B, Jumpponen A, Zeglin L (2018). The avian gut microbiota: community, physiology and Function in wild birds. Journal of avian biology. 49(11): e01788. Doi: 10.1111/jav.01788

37) Glunder (2002). Influence of diet on the occurrence of some bacteria in the intestinal flora of wild and pet birds. Dtsch tierarztl wochenschr. 109(6):266-270.Disponible en:

<https://europepmc.org/article/med/12125172#impact>

38) Fortes Beleza AJ, Cardoso Maciel W, Silva Carreira A, Ribeiro Marques A, Guedes Nogueira C, Pascoal Filho N, Goes Da Silva I, Horn Vasconcelos R, Rodrigues Ribeiro L, De Castro Teixeira R (2021). Wild birds as reservoirs of multidrug-resistant enterobacteria in Mulungu, Brazil. *BioRxiv*. Doi: 10.1101/2021.11.04.467336

39) Benskin C, Wilson K, Jones, Hartley I (2009). Bacterial pathogens in wild birds: a review of the frequency and effects of infection. *Biological Reviews*. 84(3):349-373. Doi: 10.1111/j.1469-185X.2008.00076.x

40) Teyssier A, Matthysen E, Hudin N, De Neve L, White J, Lens L (2020). Diet contributes to urban-induced alterations in gut microbiota: experimental evidence from wild passerine. *Proceeding of the royal society B: Biological Sciences*. 287(1920): 20192182. Doi: 10.1098/rspb.2019.2182

41) Wu J, Huang Y, Rao D, Zhang Y, Yang K (2018). Evidence for environmental dissemination of antibiotic resistance mediated by wild birds. *Frontiers in Microbiology*. 9:745. Doi: 10.3389/fmicb.2018.00745

42) Ewbank A., Esperón F., Sacristán C., Sacristán I., Krul R., Cavalcante De Macedo E., Calatayudo O., Bueno I., De Francisco Strefezzi R., Catão-Dias J.(2021). Seabirds as anthropization indicators in two different tropical biotopes: a one health approach to the issue of antimicrobial resistance genes pollution in oceanic islands. *Science of the Total Environment*. 754:142141. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.142141

- 43) Jiménez M, Chaidez C, León J (2012). Calidad microbiológica de carne de res comercializada en el mercado municipal de Culiacán, Sinaloa. *Veterinaria Mexico* 43(4):273-284. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-50922012000400002&lng=es&tlng=es.
- 44) Kassem I, Nasser N, Salibi J (2020). Prevalence and loads of fecal pollution indicators and the antibiotic resistance phenotypes of *Escherichia coli* in raw minced beef in Lebanon. *Foods*. 9(11): 1543. Doi: 10.3390/foods9111543
- 45) Calvo, J, Martínez-Martínez L. (2009) Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 27(1): 44-52. Doi: 10.1016/j.eimc.2008.11.001
- 46) Andrade F, Silva D, Rodrigues A, Pina-Vaz C (2020). Colistin update on its mechanism of action and resistance, present and future challenges. *Microorganisms*. 8(11): 1716. Doi: 10.3390/microorganisms8111716
- 47) Trimble M, Mlynarick P, Milan K, Hancock R (2016). Polymyxin: Alternative mechanisms of action and resistance. *Cold Spring harbor perspectives in medicine*. 6(10): a025288. Doi: 10.1101/cshperspect.a025288
- 48) Fernandes R, Amador P, Prudêncio C (2013). β -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. *Reviews in Medical Microbiology*: 24(1): 7-17. Doi:10.1097/MRM.0b013e3283587727
- 49) Suárez C, Gudiol F(2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 27(2):116-29. Doi:

10.1016/j.eimc.2008.12.001

50) Boothe DM (2017). β -Lactam Antibiotics. MSD Veterinary Manual. Disponible en:

<https://www.msdrvetermanual.com/pharmacology/antibacterial-agents/%CE%B2-lactam-antibiotics>

51) Tooke C, Hinchliffe P, Bragginton E, Colenso CH, Hirvonen V, Takebayashi Y, Spencer J, (2019). B-Lactamases and β -lactamase inhibitors in the 21st century. *Journal of Molecular Biology*. 431(18): 3472-3500. Doi: 10.1016/j.jmb.2019.04.002

52) Reygaert W (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*. 4(3): 482-501. Doi: 10.3934/microbiol.2018.3.482

53) Palzkill T (2018). Structural and mechanistic basis for extended-spectrum drug-resistance mutations in altering the specificity of TEM, CTX-M, and KPC β -lactamases. *Frontier in Molecular Bioscience*. 5:16. Doi: 10.3389/fmolb.2018.00016

54) Sawa T, Kooguchi K, Moriyama K (2020). Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and Carbapenemases and antimicrobial resistance. *Journal of Intensive Care*. 8:13. Doi: 10.1186/s40560-020-0429-6

55) Liakopoulos A, Mevius D, Ceccarelli D (2016). A review of SHV extended-spectrum- β -lactamases: Neglected yet ubiquitous. *Frontiers in Microbiology*. 7: 1374 Doi : 10.3389/fmicb.2016.01374

56) Chong Y, Ito Y, Kamimura T (2011). Genetic and clinical impact in

extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Infection, Genetic and Evolution. 11: 1499-1504. Doi: 10.1016/j.meegid.2011.06.001

57) Rahman S, Ali T, Ali I, Khan N, Han B, Gao J (2018). The growing genetic and functional diversity of extended spectrum beta-lactamases. Biomed Research International. 2018: 14 Doi: 10.1155/2018/9519718

58) National library of medicine [NIH] (2023). Bacterial Antimicrobial Resistance Reference Gene Database. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#SHV>

59) Zeynundin A, Pritsch M, Schubert S, Messerer M, Liegl G, Hoelscher M, Belachew T, Mieser A (2018). Prevalence and antibiotic susceptibility pattern of CTX-M type extended- spectrum β - lactamases among clinical isolates of gram- negative bacilli in Jimma, Ethiopia. BMC Infectious Diseases. 18:524. Doi: 10.1186/s12879-018-3436-7

60) Lahlaoui H, Haj A, Moussa M, (2014). CTX-M type extended spectrum β -lactamase (ESBL). Médecine et Maladies Infectieuses. 44(9): 400-404. Doi: 10.1016/j.medmal.2014.03.010

61) Schulenberg T, Stotz D, Lane D, O'Neill J, Parker T (2010). Aves del Perú. Centro de Ornitología y Biodiversidad, Primera edición, Perú.

62) Ralph J, Geupel G, Pyle P, Tomas M, De sante O, Bo~a M. Manual de métodos de campo para el monitoreo de aves terrestres. Pacific Southwest Research Station, Forest Service, 1996. Disponible en: https://www.birdpop.org/docs/pubs/Ralph_et_al_1996_Manual_de_Metodos_Para_El_Monitoreo_De_Aves.pdf

- 63) Ruiz-Roldan L, Martinez-Puchol S, Gomes C, Palma N, Riveros M, Ocampo K, Durand D, Ochoa TJ, Ruiz J, Pons MJ (2018). Presencia de enterobacteriaceae y *Escherichia coli* multirresistente a antimicrobianos en carne adquirida en mercados tradicionales en Lima. Revista peruana de Medicina Experimental Salud Pública. 35(3): 425-32. Doi: 10.17843/rpmesp.2018.353.3737
- 64) Holmes D, Quigley M (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Analytical Biochemistry. 114(1): 193–197. Doi: 10.1016/0003-2697(81)90473-5
- 65) Arul L, Benita G, Balasubramanian P (2008). Functional insight for β -glucuronidase in *Escherichia coli* and *Staphylococcus* sp. RLH1. Bioinformation. 2(8): 339-343. Doi: 10.6026/97320630002339
- 66) Lim J (2017). Protein engineering of *Escherichia coli* β -glucuronidase [Thesis of Doctor]. The Australian National University. Repository: <https://openresearch-repository.anu.edu.au/handle/1885/136125>
- 67) Ji XW, Liao YL, Zhu YF, Wang HG, Gu L, Gu J, Dong C, Ding HL, Mao XH, Zhu FC, Zou QM (2010). Multilocus sequence typing and virulence factors analysis of *Escherichia coli* O157 strains in China. The Journal of Microbiology. 48:849-855. Doi:10.1007/s12275-010-0132-8
- 68) Walk S, Walm E, Gordon D, Ram J, Toranzos G, Tiedje J, Whittman T (2009). Cryptic lineages of the genus *Escherichia*. Applied Environmental Microbiology. 75(20): 6534-6544. Doi: 10.1128/aem.01262-09
- 69) European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

[EUCAST] (2022). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters versión 12. 2022. Disponible en: https://www.eucast.org/clinical_breakpoints .

70) Clinical & Laboratory Standards Institute [CLSI] (2021). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Disk diffusion and MIC testing. M100, 31th ed. MI: CLSI; 2021

71) Turlej-Rogacka A, Britto Xavier B, Janssens L, Lammens C, Zarkotou S, Goossens H, Malhotra-kumar S (2018). Evaluation of colistin stability in agar and comparison of four methods for MIC testing of colistin. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 38(2): 345-353. Doi: 10.1007/s10096-017-3140-3

72) Magiorakos AP, Srinivasan Am Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, RiceLB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection*. 18(3): 268-281. Doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x

73) Lezameta L, Gonzáles-Escalante E, Tamariz J (2010). Comparación de cuatro métodos fenotípicos para la detección de Beta-lactamasas de espectro extendido. *Revista Peruana de Medicina Experimental Salud Pública*. 27(3): 345- 51. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342010000300006&lng=es&tlng=es.

- 74) Palma N, Pons M.J, Gomes C, Mateu J , Riveros M ,García W, Jacobs J , García C, Ochoa T , Ruiz J (2017). Resistance to quinolones, cephalosporins and macrolides in *Escherichia coli* causing bacteraemia in Peruvian children. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*.11:28-33. Doi: 10.1016/j.jgar.2017.06.011
- 75) Cabrera R, Ruiz J, Marco F, Oliveira I, Arroyo M, Aladueña A, Usera M.A, Jiménez de Anta M.T, Gascón J, Vila J. (2004). Mechanism of resistance to several antimicrobial agents in *Salmonella* clinical isolates causing traveler 's diarrhea. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48(10):3934–3939. Doi: 10.1128/aac.48.10.3934-3939.2004
- 76) Sáenz Y, Briñas L, Domínguez E, Ruiz J, Zarazaga M, Vila J, Torres C (2004). Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48(10): 3996–4001 10.1128/aac.48.10.3996-4001.2004
- 77) Omega Bio-Tek (2019). E.Z.N.A Gel Extraction Kit Manual. Disponible en: <https://www.omegabiotek.com/product/pcr-gel-extraction-kit-e-z-n-a-gel-extraction-kit/>
- 78) Messing S, Ton-Hoang B, Hickman A, McCubbin A.J, Peaslee G.F, Ghirlnado R, Chandler M, Dyda F (2012). The processing of repetitive extragenic palindromes: the structure of a repetitive extragenic palindromic bound to its associated nuclease. *Nucleic Acids Research*. 40(19): 9964-9979. Doi: 10.1093/nar/gks741
- 79) Fernández F, López L, Pascual A (2013). Técnicas de tipificación

molecular para la vigilancia y control de la infección. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 31(1):20-25. Doi: 10.1016/S0213-005X(13)70110-1

80) Navia, M, Capitano L, Ruiz J, Vargas M, Urassa H, Schelleberg D, Gascon J, Vila, J (1999). Typing and characterization of mechanisms of resistance of *Shigella* spp. isolated from feces of children under 5 years of age from Ifakara, Tanzania. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(10), 3113–3117. Doi:10.1128/JCM.37.10.3113-3117.1999

81) Heras j, Domínguez C, Mata E, Pascual V, Lozano C, Torres C, Zarazaga M (2015). GelJ- a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. *BMC Bioinformatic*. 16:270. Doi: 10.1186/s12859-015-0703-0

82) Xia J, Gao J, Tang W (2016). Nosocomial infection and its molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Bioscience Trends*. 10(1): 14-21. Doi: 10.5582/bst.2016.01020

83) Blas WV, Gerónimo IB, Ulloa GM, Huaman M, Pons MJ (2021). *Escherichia coli* multidrogorresistente en urocultivos realizados en el instituto nacional materno perinatal de Lima, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*.38(4): 668-669. Doi: 10.17843/rpmesp.2021.384.8970

84) Matta-Chuquisapon J, Valencia-Bazalar E, Sevilla-Andrade C, Barron-Pastor H J (2022). Filogenia y resistencia de cepas de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido a los antibióticos

en pacientes con cáncer hospitalizados en Perú. *Biomedica*. 42(3):470-478.

Doi: 10.7705/biomedica.6263

85) Sosa Flores JL, Chapoñan Mendoza JF (2023). Resistencia antibiótica de *Escherichia coli*, según producción de betalactamasas de espectro extendido en urocultivos en un hospital III-1, Chiclayo, Perú 2020.

Revista del Cuerpo Médico Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo. 15(4). Disponible en:

<http://cmhnaaa.org.pe/ojs/index.php/rcmhnaaa/article/view/1627/741>

86) Ymaña B, Luque N, Ruiz J, Pons MJ. Worrying levels of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria isolated from cell phones and uniforms of peruvian intensive care unit workers (2022).

Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 116(7): 676-678. Doi: 10.1093/trstmh/trab186

87) Escalante-Montoya JC, Síme-Díaz A, Díaz-Vélez C. (2013). Características clínicas y epidemiológicas en pacientes con infección intrahospitalaria por bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido. *Revista Peruana de Epidemiología*.

17(1): 01-06. Disponible en:

<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-706056>

88) Tejada-Llacsá PJ, Huarcaya J, Melgarero GC, Gonzales LF, Cahuana J, Pari RM, Bohorquez H, Chacaltana J (2015). Caracterización de infecciones por bacterias productoras de BLEE en un hospital de referencia nacional. *Anales de la facultad de medicina*. 76(2): 161-166. Doi: 10.15381/anales.v76i2.11143

- 89) Falconí Sarmiento A, Nolasco Mejia M, Bedoya Rozas A, Amaro Giraldo C, Málaga G (2018). Frecuencia y factores de riesgo para bacteriemia por enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en pacientes de un hospital público de Lima, Perú. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica. 35(1):62-67. :Doi: 10.17843/rpmesp.2018.351.3601
- 90) León-Luna D, Fajardo-Loyola A, Yareta-Yareta J, Burgos-Espejo A, Peralta-Siesquen C, Galarza-Pérez M, Marcos Carbajal P (2021). Molecular characterization of multiresistant enterobacteria in two departments of the peruvian jungle. Biomedica: Revista del Instituto Nacional de Salud. 41(2): 180- 187. Doi: 10.7705/biomedica.5720
- 91) Marcos- Carbajal P, Salvatierra G, Yareta J, Pino J, Vásquez N, Díaz P, Martínez I, Asmat P, Peralta C, Huamani c, Briones A, Ruiz M, Laura N, Luque A, Arapa L, Tsukayama P. (2021). Caracterización microbiológica y molecular de la resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* uropatógenas de hospitales públicos peruanos. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. 38(1): 119-123. Doi: 10.17843/rpmesp.2021.381.6182
- 92) Yauri-Condor k, Zavaleta M, Sevilla-Andrade CR, Piscocoya SJ, Villoslado C, Vicente W, Gonzales-Escalante E (2020). Enterobacteriales productores de betalactamasa de espectro extendido portadores del gen *mcr-1* en Lima, Perú. Revista peruana de Medicina Experimental y Salud Publica. 37(4):711-5. Doi: 10.17843/rpmesp.2020.374.5832.
- 93) Ministerio de Salud [MINSA] (2008). Resolución ministerial N°591-2008. Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/minsa/normas->

[legales/247682-591-2008-minsa](#)

- 94) Ministerio de desarrollo agrario y riego [MIDAGRI] (2021). Anuario estadístico de Producción ganadera y avícola. Disponible en: <https://siea.midagri.gob.pe/portal/publicacion/boletines-anuales/5-ganadera-avicola>
- 95) Ministerio de agricultura y riego [MINAGRI] (2019). Resolución directoral N°0091-2019-MINAGRI-SENASA-DIAIA. Disponible en <https://busquedas.elperuano.pe/normaslegales/disponen-prohibir-la-importacion-comercializacion-fabricac-resolucion-directoral-no-0091-2019-minagri-senasa-diaia-1832393-1/>
- 96) Benavides JA, Streicker DG, Gonzales MS, Rojas-Paniagua E, Shiva C (2021). Knowledge and use of antibiotics among low-income small-scale farmers of Peru. *Preventive Veterinary Medicine*. 189:105287. Doi: 10.1016/j.prevetmed.2021.105287
- 97) Cortez-Sandoval V, Gonzáles R, Ramos D (2022). Detección de enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas en carne de pollo de mercados de abasto de un distrito de Lima, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 33(3): e22899. Doi: 10.15381/rivep.v33i3.22899
- 98) Dolejska M, Literak D (2019). Wildlife is overlooked in the epidemiology of medically important antibiotic-resistance bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 63(8): e01167-19. Doi:

10.1128/AAC.01167-19.

99) Lin Y, Zhang L, Wu J, Yang K (2023). Wild birds-the sentinel of antibiotic resistance for urban river: Study on egrets and Jinjiang river in Chengdu, China. *Environmental Research*. 216(3):114566. Doi: 10.1016/j.envres.2022.114566

100) Pulido V., Salinas L., Del Pino J., Arana C. (2020). Preferencia de hábitats y estacionalidad de las especies de aves de los Pantanos de Villa en Lima, Perú. *Revista peruana de Biología*.,27(3): 349 – 360. Doi: <https://doi.org/10.15381/rpb.v27i3.18681>

101) Pulido V., Olivera E., Farías E., Chirinos A., Reynaga A., Ruiz R. (2020). Conservación de las aves amenazadas que habitan en los Pantanos de Villa, Lima, Perú. *Revista de Investigaciones de la Universidad le Cordon Bleu*. 7(2), 87-97. <https://doi.org/10.36955/riulcb.2020v7n2.009>

102) Gordon, D. (2004) The influence of ecological factors on the distribution and the genetic structure of *Escherichia coli*. *Eco Sal plus* 1(1):1-14. Doi: 10.1128/ecosalplus.6.4.1

103) Islam MS, Sobur MA, Rahman S, Ballah FM, Levy S, Siddique MP, Rahman M, Kafi MA, Rahman MT (2022). Detection of bla TEM, blaCTX-M, blaCMY and blaSHV genes among extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from migratory birds travelling to Bangladesh. *Microbial ecology*.83(4): 942-950. Doi:10.1007/s00248-021-01803-x

104) Ballejo F, De Santis L.J.M (2013). Dieta estacional del Jote cabeza negra(*Coragyps atratus*) en un área rural y una urbana en el noroeste

patagónico. ElHornero. 28(1):07-14. Disponible en:

http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-34072013000100002&lng=es&tlng=es.

105) Blanco G, Bautista LM (2020). Avian scavengers as bioindicators of antibiotic resistance due to livestock farming intensification. International Journal of Environmental Research and Public health. 17(10): 3620. Doi:10.3390/ijerph17103620

106) Lozano-Sanllehi S, Zavalaga CB (2021). Nonrandom spatial distribution of Neotropic cormorants (*Phalacrocorax brasilianus*) along coastal highway in Lima, Peru. Plos One. 16(3): e0242835. Doi: 10.1371/journal.pone.0242835

107) Gross S, Muller A, Seinige D, Oliveira M, Steinhagen D, Siebert U, Kehrenberg C (2022). High rates of multidrug-resistant *Escherichia coli* in great cormorants (*Phalacrocorax carbo*) of the German Baltic and North Sea Coasts: indication of environmental contamination and a potential public health risk. Pathogens. 11(8):836. Doi: 10.3390/pathogens11080836

108) Rodrigues de Carvalho L, Macedo Farias L, Robert Nicoli JR, Silva MC, Corsino A, Lima L, Redondo R, Ferreira P, Pinto M (2003). Dominant culturable bacterial microbiota in digestive tract of the american black vulture (*Coragyps atratus* Bechstein 1793) and Search for antagonistic substance. Brazilian Journal of Microbiology. 34(3): 218-224. Doi: 10.1590/S1517-83822003000300007

- 109) Batalha de Jesus AA, Freitas AAR, Carmo de Souza J, Martins N, Batista Botelho LA, Carvalho VB, Martins Teixeira L, Woodland Riley L, Meurer Moreira B (2018). High-level multidrug-resistance *Escherichia coli* isolates from wild birds in a large urban environment. *Microbial Drug Resistance*. 25(2):167- 172. Doi: 10.1089/mdr.2018.0180
- 110) Reyes Calupiña N (2017). Identificación de genes de resistencia a Betalactámicos de cepas (BLEE) en dos especies de aves silvestres: Cormorán Neotropical (*Phalacrocorax brasilianus*) y la Focha Andina (*Fulica ardesiaca*) en la laguna de Yahuarcocha- Imbabura [Tesis de grado] Universidad central del Ecuador. Repositorio: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/11940>
- 111) Pallecchi L, Malossi M, Mantella A, Gotuzzo E, Trigoso C, Bartoloni A, Paradisi F, Kronvall G, Rossolini GM (2004). Detection of CTX-M-Type β -lactamase genes in fecal *Escherichia coli* isolates from healthy children in Bolivia and Peru. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 48(12): 4556-4561. Doi:10.1128/AAC.48.12.4556-4561.2004
- 112) Pallecchi L, Bartoloni A, Fiorelli C, Mantella A, Di Maggio T, Gamboa H, Gotuzzo E, Kronvall G, Paradisi F, Rossolini GM (2007). Rapid dissemination and diversity of CTX-M Extended-spectrum β -lactamase genes in comensal *Escherichia coli* isolates from healthy children from low-resource setting in Latin America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 51(8):2720-2725. Doi: 10.1128/AAC.00026-07
- 113) Bonnet R, Recule C, Baraduc R, Chanal C, Sirot D, De Champs C,

- Sirot J (2003). Effect of D240G substitution in a novel ESBL CTX-M.27. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 52(1): 29-36. Doi: 10.1093/jac/dkg256
- 114) Matsumura Y, Pitout JDD, Gomi R, Matsuda T, Noguchi T, Yamamoto M, Peirano G, Deviney R, Bradford PA, Motyl MR, Tanaka M, Nagao M, Takakura S, Ichiyama S (2016). Global *Escherichia coli* Sequence type 131 clade with blaCTX-M-27 gene. *Emerging Infectious Diseases*. 22(11): 1900-1907. Doi: 10.3201/eid2211.160519
- 115) Merino I, Hernández-García M, Turrientes Mc, Pérez-Viso B, López-Fresneña N, Diaz-Agero C, Maechler F, Fankhauser- Rodriguez C, Kola, Schrenzel J, Harbarth S, Bonten M, Gastmeier P, Canton R, Ruiz-Garbojosa P, R- Gnosis study group (2018). Emergence of ESBL-producing *Escherichia coli* ST131-C1-M27 clade colonizing patients in Europe. *The journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 72(11): 2973-2980. DOI: 10.1093/jac/dky296
- 116) Kocsis B, Gulyás D, Szabó D (2022). Emergence and dissemination of extraintestinal pathogenic high-risk international clones of *Escherichia coli*. *Life*. 12(12): 2077. Doi:10.3390/life12122077
- 117) Mikhayel M, Leclercq S, Karam Sarkis D, Doublet B (2021). Occurrence of the colistin resistance gene mcr-1 and additional antibiotic resistance genes in ESBL/AmpC- Producing *Escherichia coli* from Poultry in Lebanon: A nationwide survey. *Antimicrobial Chemotherapy*. 9(2): e00025-21. Doi:10.1128/Spectrum.00025-21
- 118) Sghaier S, Salah Abbassi M, Pascual A, Serrano L, Díaz-De Alba P,

Ben Said M, Hassen B, Ibrahim CH, Hassen A, López-Cerero L. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae from animal origin and wastewater in Tunisia: first detection of 025 β -B23-CTX-M-27-ST131 *Escherichia coli* and CTX-M-15/OXA-204-producing *Citrobacter freundii* from wastewater. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 17: 189-194. :Doi: 10.1016/j.jgar.2019.01.002

119) Fernandes MR, Sellera FP, Cunha FPV, Lopes R, Cerdeira L, Lincopan N.(2020). Emergence of CTX-M-27- producing *Escherichia coli* of ST131 and clade C1-M27 in an impacted ecosystem with international maritime traffic in South America. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 75(6):1647-1649. Doi: 10.1093/jac/dkaa069

120) De la Cadena E, Mojica MF, Castillo N, Correa A, Appel TM, Gactía- Betancur JC, Pallares CJ, Villegas MV (2020). Genomic analysis of CTX-M- Group-1- Producing Extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEc) from patients with urinary tract infections (UTI) from Colombia. Antibiotics (Basel Switzerland). 9(12):899. Doi:10.3390/antibiotics9120899

121) Zhang J, Zheng B, Zhao L, Wei Z, Ji J, Li L, Xiao Y. (2014) Nationwide high prevalence of CTX-M and increase of CTX-M-55 in *Escherichia coli* isolated from patients with community-onset infections in Chinese county hospitals. BMC Infectious Diseases. 14: 659. Doi: 10.1186/s12879-014-0659-0

122) Bevan ER, Jones AM, Hawkey PM (2017). Global epidemiology of CTX- M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 72(8):2145-2155. Doi:

10.1093/jac/dkx146

- 123) Deshpande, LM, Hubler C, Davis AP, Castanheira M. Updated prevalence of mcr-like genes among *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in the SENTRY program and characterization of mcr-1.11 variant. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 63(4): e02450-18. Doi: 10.1128/AAC.02450-18.
- 124) Ortega- Paredes, D, De janon S, Villavicencio F, Jaramillo Ruales K, Dela Torre K, Villacis JE, Wagenaar JA, Matheu J, Bravo- Vallejo C, Fernández- Moreira E, Vinueza-Burgos C (2020). Broiler farms and carcasses are an important reservoir of multi-drug resistant *Escherichia coli* in Ecuador. *Frontiers in Veterinary Science*. 7: 547843. Doi: 10.3389/fvets.2020.547843
- 125) Clemente L, Leão C, Moura L, Albuquerque T, Amaro A (2021). Prevalence and characterization of ESBL/AmpC producing *Escherichia coli* in fresh meat in Portugal. *Antibiotics (Basel)*. 10(11):1333. Doi: 10.3390/antibiotics10111333
- 126) Martinez-Puchol S, Riveros M, Ruidias K, Granda A, Ruiz-Roldán L, Zapata-Cachay T, Pons MJ, Ruiz J (2021). Dissemination of a multidrug resistance CTX-M-65 producer *Salmonella enterica* serovar infantis clone between marketed chicken meat and children. *International Journal of Food Microbiology*. 344:109109 Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109109
- 127) Carhuaricra D, Durán Gonzáles CG, Rodriguez Cueva CI, Ignacio León Y, Silvestre Espejo T, Marcelo Monge G, Rosadio Alcántara RH, Lincopan N, Luna Espinoza L, Maturrano Hernández L (2022). Occurrence

and genomic characterization of *mcr-1*- harboring *Escherichia coli* isolates from chicken and pig farms in Lima Peru. *Antibiotics*. 11(12):1781. Doi: 10.3390/antibiotics11121781

128) Fuentes-Castillo D, Esposito F, Cardoso B, Dalazen G, Moura Q, Fuga B, Fontana H, Cerdeira L, Dropa M, Rottmann J, Gonzáles-Acuña D, Catao- Dias JL, Lincopan N (2020). Genomic data reveal international lineages of critical priority *Escherichia coli* harbouring wide resistome in Andean condors (*Vultur gryphus* Linnaeus, 1758). *Molecular Ecology*.29(10):1919-1935.Doi:10.1111/mec.15455

129) De Carvalho M.P.N, Fernades M.R, Sellera F.P, Lopes R, Monte D.F, Hippólito A.G, Milanelo L, Raso T.R, Lincopan N (2020). International clones of extended-spectrum β -lactamase (CTX-M)-producing *Escherichia coli* in peri- urban wild animals, Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases*. 67(5): 1804- 1815. Doi: 10.1111/tbed.13558

130) Fuentes-Castillo D, Castro- Tardón D, Esposito F, Neves I, Rodrigues L, Fontana H, Fuga B, Catao-dias JL, Lincopan N (2023). Genomic evidences of gulls as reservoirs of critical priority CTX-M-producing *Escherichia coli* in Corcovado Gulf, Patagonia. *Science of The Total Environment*. 874-(2):162564. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.162564

131) Corkill JE, Cuevas LE, Gurgel RQ, Greensill J, Hart A (2001). SHV-17, a novel cefotaxime-hydrolysing β -lactamase, identified in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a Brazilian hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 47(4): 463-465. Doi:10.1093/jac/47.4.463

- 132) Garcia C, Astocondor L, Rojo-Bezares B, Jacobs J, Saénz Y (2016). Molecular characterization of extended-spectrum β - lactamase-producer *Klebsiella pneumoniae* isolates causing neonatal sepsis in Peru. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 94(2):285-288. Doi:10.4269/ajtmh.15-0373
- 133) Ruiz J, Pons MJ, Mosquito S, Ochoa TJ, Sáenz Y (2021). Caracterización de *Escherichia coli* D7111 productora de β -lactamasa TEM-176. Revista peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. 38(1):130-135. Doi: 10.17843/rpmesp.2021.381.6727
- 134) Vinuesa-Brugos C, Ortega-Paredes D, Narváez C, De Zutter L, Zurita J (2019). Characterization of cefotaxime resistance *Escherichia coli* isolated from broiler farms in Ecuador. Plos One. 14(4): e0207567. Doi: 10.1371/journal.pone.0207567
- 135) Huber RE, Lytton J, Fung E (1980) Efflux of beta-galactosidase products from *Escherichia coli*. 141(2):528-533. Doi: 10.1128/jb.141.2.528-533.1980
- 136) Pinto C, Melo-Miranda R, Gordo I, Sousa A (2021). The selective advantage of the *lac* operon for *Escherichia coli* is a conditional on diet and microbiota composition. Frontiers in microbiology. 12:709259. Doi: 10.3389/fmicb.2021.709259
- 137) Roderick SL (2005). The *lac* operon galactoside acetyltransferase. Comptes rendus biologiques. 328:568-575. Doi: 10.1016/j.crvi.2005.03.005

- 138) Mazumder R, Hussain A, Phelan JE, Campino S, Haider SM, Mahmud A, Ahmed D, Asadulghani M, Clark TG, Mondal D (2022). Non-lactose fermenting *Escherichia coli*: Following in the footsteps of lactose fermenting *E. coli* high-risk clones. *Frontiers in microbiology*. 13:1027494. Doi: 10.3389/fmicb.2022.1027494
- 139) Yuki S, Yamaji T, Hanai T (2022). Dynamic metabolic engineering of *Escherichia coli* improves fermentation for the production of pyruvate and its derivatives. *Journal of bioscience and Bioengineering*. 133(1):56-63. Doi:10.1016/j.jbiosc.2021.09.015
- 140) Jung B, Hoilat GJ. MacConkey Medium. [Subido 2022 Sep 26]. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557394>
- 141) Olive MD, Bean P (1999). Principles and applications of methods for DNA-Based Typing of microbial organisms. *Journal of clinical microbiology*. 37(6):1661-1669. Doi: 10.1128/jcm.37.6.1661-1669.1999

Anexo 2. Permiso de investigación bajo la Resolución del jefe del refugio de vidasilvestre Los Pantanos de Villa.



RESOLUCIÓN DEL JEFE DEL REFUGIO DE VIDA SILVESTRE LOS PANTANOS DE VILLA N° 008 -2021-SERNANP-JEF

Chorrillos, 24 de junio del 2021

VISTO:

El Informe Técnico N°011-2021-SERNANP-RVSLPV-MDS de fecha 24 de junio de 2021, que evalúa la solicitud presentada por la Srta. María de Jesús Pons Casellas para realizar la investigación científica que incluye ingreso a ámbitos de acceso restringido y colecta o extracción de muestras biológicas, en el marco del proyecto denominado "One Health caracterización epidemiológico-molecular de Enterobacteriales y bacterias Gramnegativas no fermentadoras de interés clínico aisladas de muestras de aves silvestres de vida libre y agua del Refugio de Vida Silvestre Los Pantanos de Villa, Perú", por el periodo de 6 meses.

CONSIDERANDO:

Que, según lo previsto en los incisos g) e i) del artículo 2° de la Ley N° 26834, Ley de Áreas Naturales Protegidas, unos de sus principales objetivos de protección es servir de sustento y proporcionar medios y oportunidades para el desarrollo de la investigación científica;

Que, en concordancia con ello, en el artículo 29° de la precitada Ley, se establece que el Estado reconoce la importancia de las Áreas Naturales Protegidas para el desarrollo de la investigación científica básica y aplicada, siempre que no afecte los objetivos de conservación, se respete la zonificación y las condiciones establecidas en el Plan Maestro;

Que, la actualización del Plan Director de las Áreas Naturales Protegidas, aprobada por Decreto Supremo N° 016-2009-MINAM, refiere que la investigación científica constituye una herramienta básica para la generación de información que permita mejorar el conocimiento sobre la diversidad biológica, así como para el manejo de recursos naturales y la gestión de riesgos y amenazas;

Que, mediante Decreto Supremo N° 010-2015-MINAM, publicado el 23 de setiembre de 2015, se declara de interés nacional el desarrollo de investigaciones al interior de las Áreas Naturales Protegidas de administración nacional, determinándose su gratuidad, así como los procedimientos de aprobación automática y evaluación previa para su otorgamiento;

Que, en el artículo 4° del mencionado Decreto Supremo, se prevé cinco supuestos en los que la autorización de investigación requiere de evaluación previa: a) ingreso a ámbitos de acceso restringido, b) la colecta o extracción de muestras biológicas, c) se prevea la alteración del entorno o instalación de infraestructura en el caso de áreas naturales protegidas de administración nacional, d) el uso de equipo o infraestructura perteneciente a las ANP de administración nacional, e) investigación en predios privados;

Anexo 2. Permiso de investigación bajo la Resolución del jefe del refugio de vidasilvestre Los Pantanos de Villa. (continuación)



Que, mediante Resolución Presidencial N° 287-2015-SERNANP, publicada el 20 de enero de 2016, se aprueban las Disposiciones Complementarias al Reglamento de la Ley de Áreas Naturales Protegidas en materia de investigación, las mismas que establecen las normas y lineamientos que regulan las investigaciones realizadas al interior de las Áreas Naturales Protegidas de administración nacional;

Que, en el artículo 23° de las precitadas Disposiciones Complementarias se establecen los criterios de evaluación del Plan de Investigación;

Que, mediante la Resolución Presidencial N° 099-2017-SERNANP, publicado el 18 de abril de 2017, se modifica el proceso GAN-01-10-Otorgamiento de Certificado de Procedencia, asimismo deja sin efecto la Resolución Presidencial N° 250-2013-SERNANP que aprobó el Certificado de Procedencia de los recursos naturales renovables forestales, flora y/o fauna silvestre provenientes de las Áreas Naturales Protegidas de administración nacional;

Que, mediante el Decreto Supremo N° 013-2018-MINAM del 05 de noviembre del 2018, se aprueba la reducción del plástico de un solo uso y promueve el consumo responsable del plástico en las entidades del Poder Ejecutivo.

Que, mediante el Decreto Supremo N° 001-2019-MINAM del 02 de febrero de 2019, se actualizan los procedimientos administrativos a cargo del SERNANP que otorgan Títulos Habilitantes;

Que, mediante Resolución Presidencial N°169-2019-SERNANP de fecha 05 de julio del 2019 se aprueba la modificación del Mapa de Procesos de Gestión de Áreas Naturales Protegidas;

Que, mediante Resolución Presidencial N°106-2020-SERNANP de fecha 10 de julio de 2020 se aprueba el Plan de Acción para la promoción de investigaciones en el Sistema Nacional de Áreas Naturales Protegidas por el Estado (SINANPE) del periodo 2020-2022;

Que, a través del documento del visto, la Srta María de Jesús Pons Casellas, solicita autorización para realizar la investigación científica que incluye ingreso a ámbitos de acceso restringido y colecta o extracción de muestras biológicas, en el marco del proyecto denominado "One Healthcaracterización epidemiológico-molecular de Enterobacteriales y bacterias Gramnegativas no fermentadoras de interés clínico aisladas de muestras de aves silvestres de vida libre y agua del Refugio de Vida Silvestre Los Pantanos de Villa, Perú", por el periodo de seis meses;

Que, mediante Informe Técnico N°011-2021-SERNANP-RVSLPV-MDS de fecha 22 de junio de 2021 se evalúa la solicitud presentada, concluyendo que el expediente cumple con los requisitos establecidos en el artículo 18° de las Disposiciones Complementarias al Reglamento de la Ley de Áreas Naturales Protegidas en materia de investigación, y que el Plan de Investigación se encuentra conforme a los criterios establecidos en el artículo 23° de las Disposiciones Complementarias en mención;

Anexo 2. Permiso de investigación bajo la Resolución del jefe del refugio de vidasilvestre Los Pantanos de Villa. (continuación)



En uso de las atribuciones conferidas por el numeral 2.1 del artículo 2° del Decreto Supremo N° 010-2015-MINAM, el artículo 14° de las Disposiciones Complementarias al Reglamento de la Ley de Áreas Naturales Protegidas en materia de investigación, aprobadas por Resolución Presidencial N° 287-2015-SERNANP, y el artículo 27° del Reglamento de Organización y Funciones del SERNANP, aprobado mediante Decreto Supremo N° 006-2008-MINAM.

SE RESUELVE:

Artículo 1°.- Autorizar el desarrollo de la investigación científica denominada: "One Healthcaracterización epidemiológico-molecular de Enterobacteriales y bacterias Gramnegativas no fermentadoras de interés clínico aisladas de muestras de aves silvestres de vida libre y agua del Refugio de Vida Silvestre Los Pantanos de Villa, Perú", a favor de María de Jesús Pons Casellas, a ser realizada en el ámbito del Refugio de Vida Silvestre Los Pantanos de Villa por el periodo de seis meses, contados a partir de la fecha de la presente Resolución.

Artículo 2°. - Autorizar el ingreso al Refugio de Vida Silvestre Los Pantanos de Villa, de las siguientes personas, integrantes del equipo de investigación:

Nombre	Cargo
María de Jesús Pons Casellas	responsable
Kathya Cecilia Espinoza Ramírez	Lic. Médico veterinario zootecnista-UCSUR, colaborador
Jacqueline Hernández Mejía	Bachiller en Biología, colaborador
Xiomara Leslie Caffo Valentin	colaborador
Joaquin Ruiz Blázquez	Universidad Científica del Sur - investigador
Fernando Enrique Guibert Chipoco	Bachiller en Farmacia y Boquímica colaborador

Artículo 3°.- Autorizar la colecta de 30 individuos en total y liberación posterior, de acuerdo a lo indicado en el Cuadro 1, que no incluye extraer los individuos del ANP.

Anexo 2. Permiso de investigación bajo la Resolución del jefe del refugio de vidasilvestre Los Pantanos de Villa. (continuación)



Precisar que la presente autorización no otorga derechos sobre los recursos genéticos o productos derivados de las muestras colectadas.

Artículo 4°.- Los integrantes del equipo de investigación son responsables de conocer y cumplir las disposiciones contenidas en la Ley N° 26834, Ley de Áreas Naturales Protegidas, y su Reglamento, aprobado mediante Decreto Supremo N° 038-2001-AG, modificado por Decreto Supremo N° 010-2015-MINAM, así como en la Resolución Presidencial N° 287-2015-SERNANP. Asimismo, los investigadores deberán cumplir con las normas que la Jefatura y su personal dispongan durante el desarrollo de la investigación, entre ellas por el Decreto Supremo N° 013-2018-MINAM.

Artículo 5°.- La Srta María de Jesús Pons Casellas, autorizado en el artículo 1° de la presente Resolución, en su calidad de investigador principal asume las siguientes obligaciones y compromisos:

- a. Presentar copia de la presente autorización al personal del ANP que lo solicite.
- b. No extraer muestras biológicas distintas a las autorizadas.
- c. Tramitar el certificado de procedencia, cuando se requiera trasladar las muestras de material biológico colectado fuera del ámbito del ANP.
- d. Comunicar al SERNANP cualquier nuevo registro para la ciencia, debiendo entregar una copia del depósito del holotipo del nuevo taxa en una institución científica nacional autorizada. La extracción de dichos ejemplares incluyendo los nuevos registros para el ANP deberán ser reportados a la Jefatura de ANP (en el Puesto de Control o sede administrativa más cercana) para su respectiva consignación en el certificado de procedencia.
- e. Gestionar los permisos de exportación ante la autoridad competente, cuando se requiera enviar al extranjero parte del material biológico colectado.
- f. Entregar una vez publicado los resultados de la investigación, una copia digital del informe o la publicación al SERNANP y autorizar su registro en la biblioteca digital del SERNANP.
- g. No utilizar las muestras biológicas con fines de acceso a recursos genéticos o sus productos derivados; así como, no utilizar los conocimientos colectivos vinculados a los recursos biológicos de pueblos indígenas; sin contar con el contrato de acceso correspondiente.
- h. No ingresar bolsas de plástico de un solo uso, sorbetes plásticos y envases de tecnopor (poliestireno expandido) para bebidas y alimentos de consumo humano en el ámbito del ANP.
- i. Solicitar el ingreso al ANP con diez días de anticipación
- j. Cumplir con la normativa dictada por el gobierno peruano por la situación sanitaria actual debido a la pandemia por el COVID-19.

Anexo 2. Permiso de investigación bajo la Resolución del jefe del refugio de vidasilvestre Los Pantanos de Villa. (continuación)



El incumplimiento injustificado de estos compromisos producirá el ingreso del investigador en la lista de investigadores inhabilitados para próximas autorizaciones emitidas por el SERNANP.

Artículo 6°.- La autorización a la que se refiere el Artículo 1° caducará automáticamente al vencer el plazo concedido, por el incumplimiento injustificado de los compromisos adquiridos o por cualquier daño al patrimonio natural, sin perjuicio de las responsabilidades administrativas, civiles o penales que pudieran originarse.

Artículo 7°.- El SERNANP se abstiene de toda responsabilidad por los accidentes o daños que puedan sufrir los integrantes del equipo de investigación durante el desarrollo del proyecto de investigación.

Artículo 8°.- Regístrese la presente Resolución en el Módulo de Seguimiento a las autorizaciones de investigación del SERNANP, en el archivo de autorizaciones del Refugio de Vida Silvestre Los Pantanos De Villa y publíquese en la página web del SERNANP (www.sernanp.gob.pe).

Regístrese y comuníquese,

Ing. Omar Antonio Ubillús Tolentino
JEFE RVSLPV
Servicio Nacional de Áreas Naturales
Protegidas por el Estado - SERNANP



Anexo 3. Carta de consentimiento de ingreso a la ANP los Pantanos de Villa dePROHVILLA.



"Año del Bicentenario del Perú: 200 años de Independencia"



CARTA DE CONSENTIMIENTO

La suscrita, DANIELA CHANGANAQUI ALFARO, en mi calidad de Jefe de la Oficina de Investigación Científica y Desarrollo de Proyectos de la Autoridad Municipal de Los Pantanos de Villa – PROHVILLA, emito la presente Carta de Consentimiento de Ingreso a la Propiedad del SERPAR bajo nuestra administración a favor de la Sra. MARIA JESÚS PONS CASELLAS identificada [REDACTED] responsable del proyecto de investigación *One Health-caracterización epidemiológico-molecular de Enterobacteriales y bacterias Gram-negativas no fermentadoras de interés clínico aisladas de muestras de aves silvestres de vida libre y agua de la Zona de Refugio de Vida Libre-Los Pantanos de Villa, Perú*; así como a los investigadores involucrados (investigadores responsables y colaboradores del proyecto).

El ingreso a la propiedad bajo nuestra administración el Humedal Pantanos de Villa se efectuará con la presentación de la Carta de Autorización para Realizar Investigaciones dentro del ANP de los Pantanos de Villa, emitida por el Servicio Nacional de Áreas Naturales Protegidas por el Estado – SERNANP¹. Finalmente se adjunta lista de los investigadores involucrados en el proyecto.

Atentamente,

Chorrillos, 26 de abril del 2021

[REDACTED]
DANIELA CHANGANAQUI ALFARO
JEFE DE LA OFICINA DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA
Y DESARROLLO DE PROYECTOS
PROHVILLA

¹ D.S. N° 010-2015-MINAM, que promueve el desarrollo de investigaciones al interior de las áreas naturales protegidas (23/09/2015).

Anexo 4. Constancia del comité institucional de ética en investigación del Hospital María Auxiliadora.

PERU Ministerio de Salud **Comité Institucional de Ética en Investigación** Hospital María Auxiliadora "Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres" "Año del Bicentenario del Perú: 200 Años de Independencia"

CONSTANCIA

El que suscribe, el **Presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación del Hospital María Auxiliadora, CERTIFICA** que el **PROYECTO DE INVESTIGACION**, Versión del **24 de junio del presente**; **Titulado: "CARACTERIZACION MOLECULAR DE LA RESISTENCIA ANTIBACTERIANA DE CEPAS AISLADAS DEL HOSPITAL NACIONAL MARIA AUXILIADORA"**, con Código Único de Inscripción: **HMA/CIEI/006/21**, presentado por la Investigadora **Maria Jesús PONS CASELLAS**; ha sido **REVISADA**.

Asimismo, concluyéndose con la **APROBACIÓN** expedida por el **Comité Institucional de Ética en Investigación**. No habiéndose encontrado objeciones de acuerdo con los estándares propuestos por el Hospital María Auxiliadora.

Esta aprobación tendrá **VIGENCIA hasta el 23 de junio del 2022**. Los trámites para su renovación deben iniciarse por lo menos a 30 días hábiles previos a su fecha de vencimiento.

San Juan de Miraflores, 24 de Junio de 2021.

Atentamente,


*Comité Institucional de Ética en Investigación
Hospital María Auxiliadora*

AEZF/abf.
c.c. Investigadores.

Av. Miguel Iglesias N° 96B
San Juan de Miraflores
Central Telef. 217-1818

www.hma.gob.pe

EL PERÚ PRO

Anexo 5. Constancia institucional de ética en investigación de la UCSUR.

COMITÉ INSTITUCIONAL DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN



CONSTANCIA N° 176-CIEI-CIENTÍFICA-2020

El presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación de la Universidad Científica del Sur (CIEI-CIENTÍFICA) da constancia que el proyecto de investigación, cuyos datos se registran a continuación, ha sido aprobado por el CIEI-CIENTÍFICA.

Código de registro: 053-2019-PRO99
Título: Vigilancia de la resistencia a antimicrobianos: visión *One Health*
Investigador(a): María Pons Casellas

La aprobación del proyecto de investigación implica que el documento presentado a evaluación cumple con los lineamientos de Universidad en materia de investigación y ética, los cuales se sustentan en la normativa internacional vigente. Adicionalmente, en el contexto de la pandemia de enfermedad por COVID-19, le recomendamos cumplir con las normas publicadas por el estado peruano.

En tal sentido, esta aprobación carecerá de valor si es que el proyecto de investigación arriba indicado es modificado de cualquier forma. Toda enmienda, añadido, eliminación o eventualidad (eventos adversos, etc.) posterior a la fecha de aprobación debe ser reportado al CIEI-CIENTÍFICA.

La vigencia de la aprobación de este documento es de dieciocho (18) meses (hasta el 08 de enero del 2021), período en el que puede desarrollarse el proyecto. Cualquier trámite para su renovación deberá ser enviado antes del término de la vigencia de este documento, debiendo suspenderse todo desarrollo hasta que la renovación sea aprobada.

Villa El Salvador, 09 de julio de 2020



Méd. Fernando M. Runzer Colmenares
Presidente
Comité Institucional de Ética en Investigación