



“RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN
ZONAS RURALES ANDINAS EN
CAJAMARCA, PERÚ: ESTUDIO
INTEGRADO BASADO EN EL
ENFOQUE UNA SALUD”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
DOCTOR EN SALUD PÚBLICA

MARIA LUISA MEDINA PIZZALI

LIMA-PERÚ

2024

ASESOR

Dra. Stella Hartinger Peña

CO-ASESOR

Dra. Gabriela Salmón Mulanovich

ASESOR EXTERNO

Dr. Daniel Mäusezahl

JURADO DE TESIS

DR. VICTOR CARRASCO CORTEZ
PRESIDENTE

DR. ANTONIO BERNABE ORTIZ
VOCAL

DR. CÉSAR CÁRCAMO CAVAGNARO
SECRETARIO

DEDICATORIA.

A mi familia, en especial a mi esposo, por acompañarme y alentarme durante todo el proceso.

AGRADECIMIENTOS.

A la Dra. Stella Hartinger, la Dra. Gabriela Salmón, el Dr. Daniel Mäusezahl, al Dr. Víctor Carrasco, y la Dra. Ruth Iguíñez, por su guía y apoyo. Al Dr. Andrés Lescano, al programa de Maestría y Doctorado en Investigación Epidemiológica, a Emerge, la Unidad de Investigación en Enfermedades Emergentes y Cambio Climático, y al financiamiento del Centro Fogarty de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de los Estados Unidos de América (D43TW007393), por permitirme estudiar dentro del programa.

A los pobladores de las comunidades de San Marcos, Cajamarca.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO.

Fundación Novartis (18A059)

9% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe

- ▶ Bibliografía
- ▶ Coincidencias menores (menos de 10 palabras)

Fuentes principales

- 8%  Fuentes de Internet
- 3%  Publicaciones
- 3%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alerta de integridad para revisión

-  **Caracteres reemplazados**
33 caracteres sospechosos en N.º de páginas
Las letras son intercambiadas por caracteres similares de otro alfabeto.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN
ABSTRACT

I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS.....	25
III. DESARROLLO DE ARTÍCULOS	26
IV. DISCUSIÓN	78
V. CONCLUSIONES.....	87
VI. REFERENCIAS	90
VII. ANEXOS	

RESUMEN

La resistencia antimicrobiana (RAM) se acrecienta por el uso de antimicrobianos tanto en animales como humanos, y por la exposición a determinantes de RAM en ecosistemas compartidos; haciéndose necesario el uso del enfoque UNA SALUD para el estudio de la RAM.

El objetivo del presente trabajo fue explorar la contribución de las personas, los animales de granja y el ambiente a la RAM en entornos rurales de América Latina, bajo el enfoque UNA SALUD. Con esta base, orientamos nuestro esquema de muestreo y recojo de información para determinar la prevalencia de RAM en humanos, animales y ambientes del hogar (los tres ejes de UNA SALUD) en zonas rurales de Cajamarca, y caracterizar a genoma completo aislamientos de bacterias RAM productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).

El estudio tuvo dos fases: un *scoping review* basado en la guía PRISMA-ScR, y una colecta de campo de diseño transversal, aplicando métodos microbiológicos, moleculares y genómicos para obtener muestras humanas, animales y ambientales, y su posterior análisis.

Pocos estudios aplican el enfoque UNA SALUD para estudiar la RAM en zonas rurales de la región. Los principales factores que contribuyen a la diseminación de la RAM son los animales de granja al portar y/o transferir genes o bacterias resistentes, las actividades humanas relacionadas con la agricultura y la producción animal, y el agua, suelo y entornos agrícolas contaminados. Identificamos las vías de diseminación de la RAM en Cajamarca rural, demostrando la interconexión existente entre la transmisión animal, humana y ambiental. Encontramos una alta prevalencia de enterobacterias con RAM multidrogo resistente (MDR) en niños,

animales, suelo, y agua en las zonas rurales altoandinas de Cajamarca. Los perfiles de RAM hallados en animales, muestras de agua y niños están relacionados con los tratamientos antimicrobianos más usados en animales y en niños.

Los aislamientos BLEE provenientes de perro y de agua fueron confirmadas como *E. coli* BLEE potencialmente patogénica, perteneciendo a secuenciotipos y complejos clonales diferentes, indicando orígenes y linajes no relacionados. Ambos aislamientos acarreaban diversos genes de virulencia: genes BLEE, y genes de resistencia para otros grupos de antibióticos. Asimismo, eran resistentes a los carbapenémicos.

La presencia de enterobacterias MDR BLEE es un riesgo de salud pública en zonas rurales de Cajamarca, Perú. Factores antropogénicos, los espacios humanos habitables compartidos con animales y el uso de agua contaminada explicarían el hallazgo de bacterias MDR BLEE en esta zona. Se necesitan estudios UNA SALUD, con métodos mixtos, aplicando enfoques microbiológicos, moleculares y genómicos para esclarecer la compleja red de rutas de diseminación de la RAM y explorar otros factores que la favorecen.

PALABRAS CLAVE:

RAM, POBLACIONES ALTOANDINAS, ANIMALES DE GRANJA, AMBIENTES RURALES, ENTEROBACTERIAS BLEE

ABSTRACT

Antimicrobial resistance (AMR) is increased by the use of antimicrobials in both animals and humans, and by exposure to AMR determinants in shared ecosystems; making it necessary to use the ONE HEALTH approach for the study of AMR.

The objective of this work was to explore the contribution of people, farm animals and the environment to AMR in rural environments in Latin America, under the ONE HEALTH approach. With this basis, we oriented our sampling scheme and information collection to determine the prevalence of AMR in humans, animals and home environments (the three axes of ONE HEALTH) in rural areas of Cajamarca, and to characterize complete genome isolates of AMR bacteria. producers of extended spectrum β -lactamases (ESBL).

The study had two phases: a scoping review based on the PRISMA-ScR guideline, and a cross-sectional field collection, applying microbiological, molecular and genomic methods to obtain human, animal and environmental samples, and their subsequent analysis.

Few studies apply the ONE HEALTH approach to study AMR in rural areas of the region. The main contributing factors for the spread of AMR are farm animals carrying and/or transferring resistant genes or bacteria, human activities related to agriculture and animal production, and contaminated water, soil and agricultural environments. We identified the routes of AMR dissemination in rural Cajamarca, demonstrating the interconnection between animal, human and environmental transmission. We found a high prevalence of multidrug-resistant (MDR) AMR enterobacteria in children, animals, soil, and water in the high Andean rural areas

of Cajamarca. The AMR profiles found in animals, water samples and children are related to the most used antimicrobial treatments in animals and children.

ESBL isolates from dogs and water were confirmed as potentially pathogenic ESBL *E. coli*, belonging to different sequence types and clonal complexes, indicating unrelated origins and lineages. Both isolates carried various virulence genes, ESBL genes, and resistance genes for other groups of antibiotics. Likewise, they were resistant to carbapenems.

The presence of MDR ESBL enterobacteria is a public health risk in rural areas of Cajamarca, Peru. Anthropogenic factors, human habitable spaces shared with animals, and the use of contaminated water would explain the finding of MDR ESBL bacteria in this area. ONE HEALTH, mixed-methods studies applying microbiological, molecular and genomic approaches are needed to clarify the complex network of AMR dissemination routes and explore other factors that favor it.

KEYWORDS:

AMR, HIGH ANDEAN POPULATIONS, FARM ANIMALS, RURAL ENVIRONMENTS, ESBL ENTEROBACTERIA

I. INTRODUCCIÓN

La resistencia antimicrobiana (RAM) se reconoce como un problema de salud pública de impacto mundial (1–3). Se considera como una de las principales amenazas para la salud pública debido a que ocurre en una amplia variedad de microorganismos causantes de enfermedades difíciles de tratar, tanto en humanos como en animales y afectando a todas las áreas de la salud, a todos los sectores y a toda la sociedad en conjunto. Sus consecuencias directas en el sistema de salud son infecciones más severas y más prolongadas, mayor mortalidad, tiempo de hospitalización más prolongado, pérdida de protección en pacientes operados y mayores costos (2,3). Sin embargo, la RAM afecta otros ámbitos como el desarrollo de las poblaciones, a través del impacto en sus economías, causando pérdidas económicas relacionadas a baja productividad por enfermedad y mayores costos de tratamiento. Además, esto representa una carga en el sistema de salud de los países (2,3). La RAM se expande en forma muy rápida. En base a un estimado conservador, para el año 2050 el número de muertes atribuidas a la RAM será de 10 millones, más que las atribuidas actualmente a cáncer y diabetes juntas (4).

La RAM es un fenómeno que se da en la naturaleza en forma espontánea, pero éste se ve acelerado por el mal uso de antimicrobianos en humanos y animales. Nuevos mecanismos de resistencia están emergiendo y diseminándose globalmente, lo que ocasiona que un número cada vez mayor de enfermedades infecciosas sean muy difíciles o incluso imposibles de tratar a medida que los antibióticos se hacen cada vez menos efectivos (5).

a. Antibióticos y resistencia

La OMS ha redactado una lista de agentes antimicrobianos (de uso en humanos y animales) y los ha clasificado según su importancia, siendo una herramienta para gestionar adecuadamente el uso de antimicrobianos con el fin de contener la RAM (6).

Todos los antimicrobianos usados en medicina humana han sido clasificados por la OMS en tres grupos, “Antimicrobianos de importancia crítica”, “Antimicrobianos muy importantes” o “Antimicrobianos importantes” según dos criterios de relevancia para su uso en humanos (6):

Criterio 1 (C1): aquellos que son uno de los pocos o el único tratamiento disponible para tratar infecciones bacterianas graves en humanos.

Criterio 2 (C2): aquellos usados para tratar infecciones humanas causada por bacterias posiblemente transmitidas a los humanos a partir de fuentes no humanas, o por bacterias con genes de resistencia provenientes de fuentes no humanas.

Los “antimicrobianos de importancia crítica” cumplen con ambos criterios (C1 y C2), los “muy importantes”, con uno de los dos criterios, y los “importantes” no cumplen con ninguno de los dos criterios.

Asimismo, los “antimicrobianos de importancia crítica” se priorizan en dos grupos, de acuerdo a tres factores (6):

- Se utilizan para tratar una gran cantidad de personas con infecciones para las cuales hay disponible un limitado número de antimicrobianos
- Se utilizan con alta frecuencia en medicina humana o en ciertos grupos de alto riesgo

- Se utilizan para tratar infecciones humanas para las que existe amplia evidencia de la transmisión de bacterias resistentes o genes de resistencia de fuentes no humanas

Esta lista fue establecida a fin de garantizar que todos los antimicrobianos, especialmente aquellos de “importancia crítica” se usen en forma juiciosa tanto en humanos como en animales, pero muchos de éstos últimos se usan en medicina humana y veterinaria de manera indiscriminada (7), entre ellos cefalosporinas, quinolonas (incluyendo fluoroquinolonas), macrólidos, penicilinas y aminoglicósidos de tercera y cuarta generación, aumentando el riesgo de diseminación de la RAM (6). En la Tabla 1 se muestra una lista de antibióticos usados tanto en animales como en humanos (6,8,9).

Tabla 1: Algunos antimicrobianos de importancia en salud pública, sus mecanismos de acción, vías conocidas de transmisión y su categorización de acuerdo a la OMS

Antibiótico	Mecanismo de acción de los antibióticos	Vías de transmisión de determinantes de resistencia	Importancia en salud pública
--------------------	--	--	-------------------------------------

<p>Amoxicilina- ácido clavulánico</p>	<p>El ácido clavulánico inhibe a las β- lactamasas, enzimas bacterianas que degradan a los β- lactámicos, se combina con amoxicilina (aminoampicilina) para evitar la degradación de ésta. B-lactámicos: Inhiben síntesis de pared bacteriana</p>	<p>Elementos transponibles e integrativos median la inserción de genes de resistencia en los cromosomas y en plásmidos; estos últimos son la vía principal de transmisión de RAM en forma horizontal.</p>	<p>De importancia crítica</p>
<p>Ampicilina</p>	<p>β-lactámicos: Inhiben síntesis de pared bacteriana</p>		<p>De importancia crítica</p>
<p>Azitromicina</p>	<p>Macrólidos: Inhiben la síntesis proteica</p>		<p>De importancia crítica</p>

Cefotaxima	Cefalosporinas de 3ra generación: Inhiben síntesis de la pared bacteriana		De importancia crítica
Cefoxitina	Cefalosporinas de 2da generación: Inhiben síntesis de la pared bacteriana		Muy importante
Cloramfenicol	Anfenicoles: Inhiben la síntesis proteica		Muy importante
Gentamicina	Aminoglucósidos: Inhiben la síntesis proteica		De importancia crítica
Ácido nalidíxico	Quinolonas: Alteran el metabolismo o la estructura de los ácidos nucleicos		De importancia crítica
Nitrofurantoina	Nitrofuranos: Alteran el metabolismo o la		Importante

	estructura de los ácidos nucleicos		
Trimetoprim-sulfametoxazol	Sulfamidas, diaminopirimidinas: Bloquean la síntesis de factores metabólicos		Muy importante
Tetraciclina	Tetraciclinas: Inhiben la síntesis proteica		Muy importante

La RAM resulta de la selección de cepas con resistencia inherente durante la exposición a medicamentos o por la aparición de variantes resistentes entre las sensibles al medicamento (10). La generación de resistencia adquirida en especies previamente susceptibles puede darse por:

- mutación y transmisión en forma “vertical” en una misma especie, de una generación a la siguiente, ó
- por la adquisición “horizontal” de material genético de bacterias no relacionadas por herencia, a través de elementos genéticos móviles e incluso por adquisición directa de ADN. Los tres mecanismos de transferencia horizontal conocidos para los mencionados elementos genéticos móviles son: conjugación (transferencia de plásmidos o elementos conjugativos integrativos), transducción (a través de bacteriófagos u otros agentes de

transferencia de genes) y transformación (adquisición activa de ADN del ambiente) (9–11).

Por otro lado, los elementos genéticos móviles son muy variados y éstos a su vez pueden dividirse en dos categorías: aquellos que se pueden movilizar dentro o entre moléculas de ADN (secuencias de inserción, transposones y casetes de genes/integrones); y aquellos que tienen la capacidad de mediar su propia transferencia de bacteria a bacteria (plásmidos y elementos conjugativos integrativos). Estos elementos genéticos móviles interactúan entre sí y establecen sinergismo dándole mayor capacidad de adaptación a las bacterias, siendo los principales responsables de la diseminación de la resistencia (11). Según Sheppard et al. (12), esto ocurre mediante un mecanismo combinado que se da en múltiples niveles genéticos anidados, análogo al mecanismo de una muñeca rusa, donde los genes de resistencia llevados por transposones son capaces de saltar entre diferentes plásmidos siendo cada uno de ellos capaz de infectar a múltiples linajes hospederos. En conjunto, los elementos integrativos y los transponibles hacen posible la inserción de genes de resistencia antimicrobiana en el cromosoma bacteriano y en los plásmidos, pero son estos últimos la vía más importante de transmisión de la RAM de bacteria a bacteria (9,11).

b. Resistencia Antimicrobiana (RAM) como un problema de salud pública

La RAM es un problema de salud pública complejo debido a que es causado por múltiples factores: mal uso de antibióticos en humanos, exposición a fuentes ambientales de bacterias con RAM, presencia de genes de RAM y antibióticos en agua, alimentos, animales, desechos de animales y humanos, así como exposición a desechos hospitalarios y farmacéuticos (3). El mal uso de antibióticos en humanos se refiere al uso excesivo e inapropiado de antibióticos relacionado con la venta sin receta o venta libre, su uso extensivo y muchas veces preventivo en hospitales (13). Los animales y sus desechos son también una importante fuente de exposición debido al uso excesivo de antibióticos en producción animal para uso en masa (uso terapéutico, profilaxis y promoción del crecimiento) (5,14). Cuando el uso de los antimicrobianos se hace en forma no terapéutica o inadecuada, se facilita el incremento de cepas resistentes y la transferencia de determinantes de resistencia a cepas sensibles (15). Recientemente se han identificado otros factores que impulsan la resistencia además de los antibióticos y los genes de RAM, entre ellos resaltan los biocidas y los metales. Éstos llegan al medio ambiente a través de varias vías, entre las que destacan las aguas residuales (de origen humano e industrial), la propagación de estiércol animal y lodos de aguas residuales, y la acuicultura. Se sabe que los antibióticos, biocidas y metales pueden seleccionar y co-seleccionar los genes de RAM cuando se encuentran en las vías mencionadas anteriormente, incluso en bajas concentraciones. La co-selección de genes de RAM se presenta a través de dos mecanismos: co-resistencia y resistencia cruzada (16). La resistencia cruzada tiene lugar cuando un gen de resistencia proporciona protección simultánea contra una serie de sustancias químicas, mientras que la co-resistencia ocurre cuando varios genes se transfieren juntos y la selección de un gen de resistencia

promueve el mantenimiento de otros (16,17). Asimismo, la dinámica entre el uso de antimicrobianos y el desarrollo de resistencia varía según la especie bacteriana, el fármaco o diana farmacológica y la mutación que confiere resistencia. Debido a estos mecanismos complejos y con múltiples canales, es importante resaltar que el uso de antimicrobianos y la aparición de la RAM podría no seguir una relación directa de causa y efecto, y la resistencia no necesariamente sería reversible en todos los casos al detener el uso de antimicrobianos (18).

De acuerdo al reporte de los Centros para la Prevención y Control de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC, por sus siglas en inglés), el problema de RAM se concentra más en bacterias gramnegativas (19). Las bacterias gramnegativas resaltan como contaminantes del agua potable a nivel global. Entre ellas encontramos a los microorganismos indicadores de contaminación fecal (principalmente *E. coli*), que permiten evaluar la calidad del agua potable (20). El mecanismo más importante que explica la RAM en enterobacterias gramnegativas es la producción de enzimas tipo β -lactamasas, las cuales pueden hidrolizar el anillo β -lactámico, inactivando a su vez la actividad antibacteriana de los fármacos β -lactámicos. Estas enzimas incluyen a las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), β -lactamasas AmpC y carbapenemasas (21). Los microorganismos productores de BLEE causan infecciones difíciles de tratar y suelen ser resistentes a otros antimicrobianos (22,23). Además, debido a que las BLEE están codificadas en plásmidos y elementos integrativos conjugativos, se dispersan entre cepas de la misma especie o de especies distintas (22). En América del Sur, no se habían reportado cepas de bacterias patógenas productoras de BLEE hasta el año 1987 (24). Hay más de 200 tipos de BLEE, que se codifican en genes llamados *bla*, y los

más conocidos son TEM, SHV y CTX-M (25). Además, las bacterias productoras de BLEE presentan multidrogo resistencia (MDR). Eso hace que en niños el problema se vuelve más grave, debido a las limitadas opciones de tratamiento antibiótico disponibles para ellos (26). Se sabe que las enterobacterias productoras de BLEE, son frecuentemente asociadas a bacteriemia (presencia de bacterias en la sangre) en hospitales en Perú y son un factor asociado a una elevada mortalidad (27,28). Igualmente, se ha hallado una alta frecuencia de enterobacterias productoras de BLEE en muestras fecales de pacientes ambulatorios atendidos en el Instituto Nacional de Salud del Niño en Perú (29).

Los avances logrados por los programas de salud prioritarios como los de tuberculosis, malaria y VIH/SIDA, entre otros, se ven amenazados por el desarrollo de la RAM (30). En Perú, se ha visto progresivo incremento de la tuberculosis MDR desde el año 1997 (30,31). Esta forma de la enfermedad no responde al tratamiento con isoniazida y rifampicina, los dos medicamentos antituberculosos de primera línea más eficaces. Asimismo, existe la tuberculosis extremadamente resistente, que no responde a medicamentos antituberculosos de segunda línea, dejando a los pacientes con pocas opciones de tratamiento (32).

La crianza intensiva de animales de granja para consumo humano, responde a una gran demanda a nivel mundial, debida entre otras cosas, al constante aumento en la población (33). Los alimentos de origen animal son una fuente de exposición a residuos de antibióticos para el ser humano debido a que no se respeta el periodo de retiro del animal antes del beneficio, originando su presencia en la carne (34).

Por otro lado, los residuos de antimicrobianos contaminan el ambiente, siendo las excretas de los animales la principal fuente de contaminación. Se ha demostrado que los antibacterianos de uso animal pueden excretarse inalterados en grandes proporciones por heces y orina (35). Estos residuos de antimicrobianos, así como genes de RAM ingresan al medioambiente cuando el estiércol se aplica como fertilizante a los campos de cultivo con la consecuente contaminación de aguas superficiales y de subsuelo (36).

En Perú, el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) realiza el monitoreo de contaminantes en alimentos agropecuarios, comparándolos con los estándares del *Codex Alimentarius*. Entre los contaminantes que analiza, el SENASA determina si hay residuos medicamentosos en algunos alimentos de origen animal. Según los resultados del monitoreo para el año 2021 (37), se hallaron residuos medicamentosos en niveles por encima de los límites máximos permisibles: doxiciclina clorhidrato (en leche cruda de bovino), enrofloxacina + ciprofloxacino (en carne de pollo), triclabendazol sulfona y triclabendazol sulfoxido (en leche cruda de bovino) y trimetoprim (en huevo de gallina). Asimismo, se halló la sustancia prohibida AMOZ (5-metil-morfolino-3-amino-2-oxazolidinona, metabolito de un nitrofurano) que no está permitida en la producción animal, en una muestra de carne de porcino. Sin embargo, las acciones del SENASA se limitan a notificar a los proveedores de las muestras de los resultados, y en caso de que haya no conformidades, recomendar acciones correctivas y capacitaciones (38), pero no se especifican consecuencias disuasivas sobre el productor si se sobrepasan los límites establecidos.

Actualmente, Perú no está entre los países con elevados niveles de consumo de antimicrobianos en producción animal (bovinos, ovinos, porcinos y pollos). En América del Sur, destaca Brasil por ser el mayor productor y exportador de carne globalmente (39). Sin embargo, el consumo de antimicrobianos en Perú podría ser mucho mayor, debido a la producción de cuyes y piscicultura. La Organización Mundial de la Salud (OMS) (1) propuso en el año 2014 que los países desarrollen programas de vigilancia integrada para RAM que incluyan muestreo y testeo de bacterias de animales de granja, alimentos, pacientes humanos y fuentes ambientales. Adicionalmente, la integración debería aplicarse al análisis respecto a genes transmisibles en bacterias zoonóticas, comensales y patógenas en humanos, animales y alimentos, así como integrar la información con datos sobre el consumo de antibióticos en humanos (1). En el año 2018, la OMS lanzó *GLASS-One Health*, un sistema integrado de vigilancia multisectorial para identificar *E.coli* BLEE en muestras humanas, de animales de producción y ambientales. Solo un grupo de países aplican el sistema *GLASS-One Health*, y el Perú, aún no se encuentra entre ellos, aunque si aplica otros componentes de la vigilancia GLASS (40). En Perú, el ente encargado de la vigilancia de la RAM es el Instituto Nacional de Salud (INS) pero desde el año 2019, apunta a aplicar un enfoque UNA SALUD involucrando a múltiples sectores (41). Sin embargo, a la fecha aún no se logra regular y vigilar el uso de antimicrobianos en salud animal, ni se ha implementado vigilancia ambiental de la RAM (42). Se menciona que para el año 2019 había cuatro hospitales piloto donde se estaba implementando la vigilancia integrada de la RAM (salud humana, animal y ambiental), pero no se han encontrado reportes de esa vigilancia. El único

informe publicado data del año 2012, el cual sólo se aplica a bacterias de origen hospitalario (43). Esto es un problema, ya que no se conocen los perfiles de las cepas resistentes que circulan a nivel comunitario, animales de granja, alimentos de origen animal y fuentes ambientales.

a. Aplicación del enfoque UNA SALUD

UNA SALUD es la colaboración multidisciplinaria en diferentes niveles y sectores, con el objetivo de lograr el nivel óptimo de salud en humanos, animales y el ambiente. UNA SALUD reconoce que la salud de los seres humanos y la de los animales son interdependientes y están ligadas a la salud del ecosistema donde habitan (44). Así, este enfoque propone utilizar equipos de investigación multidisciplinarios para abordar preguntas de investigación que integren las tres dimensiones de la salud: humana, ambiental y animal. Su implementación permite una mayor comprensión de un amplio rango de impactos en salud y sus soluciones, dado que se investiga bajo puntos de vista diferentes dándole una ventaja comparativa sobre enfoques tradicionales basados en una sola dimensión (45). UNA SALUD está siendo aplicada por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y la OMS en alianza tripartita para enfrentar la RAM (considerada un área prioritaria), y otros problemas sanitarios globales (46). Sin embargo, se encuentra escasa literatura en América Latina que estudien la RAM basándose en los tres ejes de UNA SALUD. Un estudio de este tipo, realizado en una zona rural

del El Salvador y en una zona periurbana en Perú (47), caracterizó los reservorios de genes de RAM (resistomas) de ambos hábitats, tomando muestras de humanos, animales y el ambiente para integrar las tres dimensiones de UNA SALUD. El estudio mostró que los resistomas ambientales y los resistomas humanos se relacionaban a lo largo de una gradiente ecológica correspondiente a la presencia de heces humanas, identificándose a la vez a los genes de RAM más importantes en ambos hábitats (47).

Dado que el problema de la RAM se conecta con los tres ejes de UNA SALUD, se conceptualizó esta investigación como se muestra en la Figura 1.

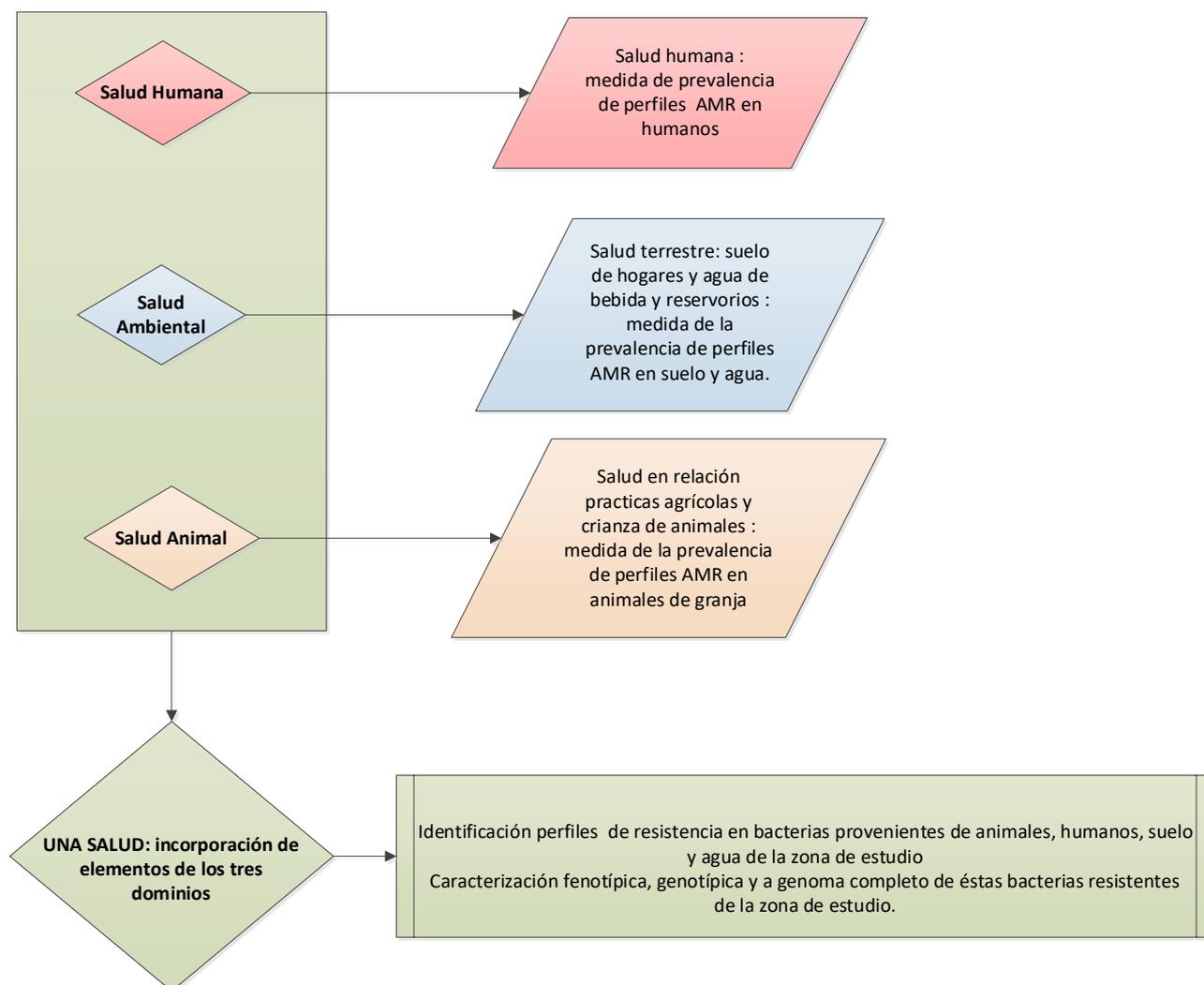


Figura 1: Conceptualización del estudio bajo el enfoque UNA SALUD

b. Factores humanos asociados a RAM

Hay muchos y distintos factores ligados a los humanos y sus actividades que se asocian a la RAM.

I. Factores sociales

Están relacionados con el proveedor de salud, con el sistema de salud, el centro de salud, con el paciente e incluso con la capacidad del estado para hacer cumplir la legislación. Entre estos factores tenemos el uso insuficiente de antimicrobianos por falta de acceso, dosis inadecuadas, incumplimiento o productos de mala calidad, así como su uso excesivo. Igualmente, el uso inadecuado de antimicrobianos que no dan los resultados terapéuticos esperados, por parte del proveedor de salud, puede generar resistencia (48).

Los siguientes factores relacionados con los pacientes contribuyen al problema de la RAM:

- Percepciones erradas respecto a los antimicrobianos: la creencia de que la mayoría de las infecciones se curan con antimicrobianos, o que está bien interrumpir el tratamiento apenas el paciente se siente mejor y reservar lo que queda del antimicrobiano para usarlo a futuro.
- Automedicación: a causa del fácil acceso a los antimicrobianos en farmacias sin receta médica, (donde muchas veces el vendedor es el que receta), sin saber la dosis

adecuada. Asimismo, las falsificaciones o medicamentos de baja calidad exponen al paciente a dosis insuficientes al tener menor cantidad del compuesto activo (48).

- Propaganda y promoción: al promocionar el uso y la venta de antimicrobianos, se ejerce un fuerte efecto sobre su demanda.

- Falta de cumplimiento de los regímenes o dosis: por falta de comunicación con el proveedor de salud, falta de comprensión de las instrucciones, tratamientos muy largos, o falta de dinero para seguir con el tratamiento (48).

II. Actividades antropogénicas

Entre las actividades humanas que impulsan la RAM están la urbanización y el consumo de antibióticos, con la consecuente presencia de hospitales e industrias -resaltando la industria farmacéutica-. Estas actividades generan desechos químicos y aguas contaminadas con bacterias fecales, incluso después de haber pasado por las plantas de tratamiento de aguas. La situación es más grave en zonas rurales donde mayormente no se cuenta con plantas de tratamiento de aguas ni servicios de alcantarillado para la población (49); por ejemplo, solo el 30% de la población rural peruana cuenta con alcantarillado o disposición sanitaria de excretas (50). Así, estas actividades antropogénicas pueden contaminar el ambiente con antimicrobianos, biocidas, metales, bacterias con RAM y genes de RAM los cuales son conocidos impulsores de RAM (49).

Así pues, se han encontrado residuos de antibióticos utilizados en terapia humana en agua potable de reservorio y agua residuales de origen urbano (51), así como en agua de riego agrícola (52). Igualmente, los hospitales y la industria farmacéutica contaminan con antimicrobianos el ambiente a través de descargas que terminan en diversas fuentes de agua (53,54). En Perú, en un estudio en comunidades rurales,

se encontró que la disposición de agua con contaminación fecal de muy alto riesgo para consumo se asocia con una mayor prevalencia de bacterias patógenas con diversos perfiles de RAM, y eso a su vez se asocia a la presencia de personas portadoras de bacterias con RAM (55). Asimismo, los resistomas del ambiente están determinados en gran medida por la contaminación con materia fecal humana (47). Mientras tanto, los biocidas y metales de origen doméstico, industrial (la minería, para el caso de metales) y hospitalario son acarreados por aguas residuales y tienen la misma ruta que los antimicrobianos hacia los ecosistemas (49).

c. Factores relacionados a producción animal asociados a RAM

Además de ser una fuente de exposición a residuos de antimicrobianos para el ser humano, los animales de granja son reservorios de muchos microorganismos. Entre éstos podemos distinguir: bacterias patógenas, causantes de enfermedad en el propio animal; bacterias zoonóticas las cuales pueden transmitirse del animal a las personas, y bacterias indicadoras, las que no causan enfermedad (56,57). En entornos de bajos recursos rurales y periurbanos, las personas mantienen muy cerca de sus viviendas o cohabitan con sus animales de granja, por lo que las excretas animales son un factor principal en la contaminación fecal en esos ambientes (58,59). En la zona altoandina de Cajamarca, se comprobó que la RAM en bacterias indicadoras de contaminación fecal aisladas del agua de bebida en hogares rurales estaba asociada a la crianza de cerdos en el hogar, especialmente si los animales estaban sueltos (60). Por otro lado, entre las bacterias patógenas humanas con potencial zoonótico asociadas a animales de granja están *Campylobacter* sp., serotipos no typhi de *Salmonella enterica*, cepas de *Escherichia coli* productoras

de toxina Shiga y *Listeria monocytogenes* (56), pudiendo ser portadores o reservorios de genes RAM (57). En el año 2017 en Trujillo se determinó la prevalencia de mastitis en ganado vacuno en un establo de esta zona (61). Las bacterias gramnegativas aisladas con mayor frecuencia fueron *E. coli* y *Klebsiella* sp., y la grampositiva más frecuente fue *Staphylococcus aureus*. *E. coli* presentó resistencia a la oxacilina y a la rifampicina, mientras que *Staphylococcus aureus* mostró resistencia a la ampicilina. Todos estos microorganismos son patógenos de animales y a la vez agentes zoonóticos (61).

En relación al uso de antibióticos y la transferencia de genes de RAM en la acuicultura (conjunto de actividades productivas de cultivo de especies acuáticas que puede darse en aguas dulces, marinas o salobres, y en sistemas abiertos o cerrados (62)) la transferencia de los genes de RAM entre el medio acuático y el terrestre es muy rápida debido a las altas concentraciones de bacterias en el agua y los sedimentos acuáticos (63), promoviendo un importante intercambio genético y recombinación (64). El impacto del uso de antimicrobianos en la acuicultura podría ser muy amplio sobre el medio ambiente, dada la naturaleza muchas veces abierta de los sistemas de producción (65). Estos factores permiten que la presión selectiva actúe sobre las bacterias que se encuentran en animales silvestres, incluidos los mariscos (63). Adicionalmente, muchos de los productos de la acuicultura se consumen crudos, incrementando el riesgo de infección alimentaria con patógenos zoonóticos con RAM (66).

Por otro lado, los alimentos tienen un rol importante en la propagación de cepas resistentes a antimicrobianos. Las bacterias drogo-resistentes en carnes, huevos y

leche sin pasteurizar, al ser ingeridos por una persona, podrían infectarla y llegar a causar brotes, pero también podrían quedar como comensales y causar infecciones (67). En el año 2021, el SENASA (37) reportó que más de la mitad de las muestras de alimentos de origen animal en el Perú resultaron no conformes respecto a contaminantes microbiológicos, identificándose entre ellos bacterias patógenas, principalmente *Staphylococcus aureus*, así como *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* O157:H7. Sabemos que la microbiota intestinal de animales de granja es un reservorio de genes RAM, los que pueden diseminarse entre bacterias de ecosistemas distintos, incluyendo el humano a través de varias vías de transmisión, siendo la cadena alimentaria una de ellas (68). En un estudio hecho en Lima, Perú, se encontraron altos niveles de RAM frente a los antibióticos usados en humanos, destacando los pollos y bovinos como potenciales reservorios de *Escherichia coli* productoras de BLEE y AmpC, respectivamente (69).

d. Factores ambientales asociados a RAM

El agua y el suelo juegan un rol importante en la propagación de residuos de antimicrobianos, bacterias o genes RAM, convirtiéndolos en reservorios y focos contaminantes (70). En la zona rural de Cajamarca, Perú, se halló que el agua de consumo humano usada por los habitantes de esta zona altoandina, contenía coliformes termotolerantes, principalmente *E. coli*, indicando contaminación fecal. Más de la mitad de las muestras de *E. coli* mostraban RAM, siendo algunas de ellas MDR (71).

El suelo recibe como fertilizante estiércol, heces humanas y los lodos residuales de aguas servidas, los cuales contienen residuos de antibióticos, bacterias y genes con

RAM, los cuales afectan el ecosistema del suelo y lo convierten en una fuente de exposición para los humanos (49,72). Un estudio en los EUA mostró evidencia que los ambientes usados por animales de compañía y animales de granja presentan contaminación por enterobacterias resistentes a antimicrobianos, siendo ésta más frecuente en ambientes usados por animales de granja, como ferias ganaderas y otros entornos similares (73).

e. Zona de estudio

Cajamarca es una región ganadera, siendo parte de la principal cuenca lechera en Perú (74). En esta región, en la provincia rural de San Marcos, en el año 2014, se evidenció la presencia de coliformes termotolerantes en 48% de las muestras de agua de consumo, así como 23% de *E. coli* diarreagénico. Se halló *E.coli* en alimentos, utensilios y manos de los pobladores para 4%, 16% y 23% de las muestras respectivamente, siendo los secadores de cocina el utensilio más contaminado (75). La mayoría de los hogares en San Marcos crían animales de granja (aves, cerdos, cuyes, etc.) en el ámbito del hogar, cuyos pisos son generalmente de tierra. Los animales se mueven libremente dentro de los ambientes como la cocina, lo que apunta a una contaminación fecal de origen animal, corroborada por la presencia de heces de animales en la cocina y áreas sociales de los hogares (75). De la misma manera, la contaminación fecal podría ser de origen humano, por inadecuadas prácticas de lavado de manos, en las cuales no se utiliza jabón o debido a que la mayoría de las viviendas solo cuentan con pozos ciegos como letrinas y no disponen de un sistema de agua potable ni un sistema de

alcantarillado, contando para su consumo con agua no clorada de pozo o de fuentes superficiales (75). La contaminación podría venir del mismo suelo contaminado por heces animales y humanas, o del agua subterránea o superficial contaminada de la misma manera. Esa agua contaminada sería también usada en producción agrícola, y podría contaminar los vegetales producidos en esa zona (15). Un estudio previo encontró coliformes fecales en más del 40% de hortalizas muestreadas provenientes de los principales mercados de la ciudad de Cajamarca (76). Simultáneamente, el reporte de la línea de base de un ensayo controlado aleatorizado comunitario (IHIP-2) en comunidades rurales andinas de Cajamarca, (registrado en www.isrctn.com bajo ISRCTN-26548981), evidenció una alta contaminación fecal en el agua de bebida, y elevada prevalencia (más del 51%) de RAM en aislamientos de *E. coli*, hallándose mayor resistencia para tetraciclina, ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol y cloranfenicol. Destacó la presencia de cepas productoras de BLEE, siendo una de ellas portadora del gen *bla_{CTX-M-3}* (71). Previamente a la realización de este estudio, no se hallaron publicaciones sobre qué antibióticos son más usados por la población en esta zona. Igualmente, la literatura es muy escasa en relación a prácticas de uso de antibióticos, contándose solo con datos de otras zonas rurales en Perú, que evidencian tasas alarmantes automedicación y de obtención de antibióticos sin prescripción médica (77).

f. Planteamiento del problema

El problema de la RAM es un tema prioritario global, impactando a las poblaciones en diferentes maneras y afectando a diferentes sectores económicos. Es causado por mal uso de antibióticos en humanos y producción animal, exposición a fuentes

ambientales de bacterias con RAM, genes de RAM y antibióticos, que son acarreados por el agua, alimentos, animales, excretas de animales y humanos, desechos hospitalarios y farmacéuticos. Es muy difícil cuantificar la dimensión del problema en el Perú ya que en nuestro país la vigilancia no es integrada, ésta se enfoca solo en hospitales, dejándose de lado la vigilancia en la comunidad, en producción animal y en el ambiente.

De la misma manera, en la literatura existente se investiga el problema por lo general desde un solo punto de vista y no se considera que es un problema que abarca las tres dimensiones de UNA SALUD: “salud animal, salud humana y salud ambiental”, a pesar de que los organismos internacionales pertinentes han declarado que este problema tiene que estudiarse y tratar de resolverse en forma integrada.

En el Perú andino rural se sabe que la RAM está presente, pero se sabe poco. Se desconoce qué perfiles de resistencia bacteriana existen, de dónde provienen estas bacterias y cómo se diseminan, cuáles son sus prevalencias, cuáles son sus características a nivel genotípico, qué linajes existen, y cuáles son sus genomas.

El estudio que se plantea aquí se basa en estudios anteriores en la zona de Cajamarca, que arrojaron resultados preliminares los cuales necesitan ser ampliados y tratados con mayor profundidad abarcando las tres dimensiones ya mencionadas. Además, este estudio se hace mucho más necesario y conveniente dada la poca literatura científica para el tema de RAM en zonas rurales bajo el enfoque UNA SALUD en Latinoamérica, especialmente en Perú.

La pregunta de investigación se resume así:

¿Cuál es la contribución de humanos, animales y ambiente a la RAM en entornos rurales en América Latina bajo el enfoque UNA SALUD, cuál es la prevalencia de perfiles de bacterias con RAM en el ambiente, animales de granja y humanos en la población de estudio en Cajamarca, y cuáles son las características fenotípicas y genotípicas de estas bacterias con RAM?

g. Justificación

Usando el enfoque UNA SALUD, este estudio analizó y explicó lo encontrado en estudios anteriores en la misma zona, los cuales arrojaron resultados de bacterias con RAM en agua de consumo en hogares de esta zona, además de profundizar en el tema e investigar en qué otros ambientes o fuentes cercanas a los hogares podrían encontrarse bacterias con RAM. En la literatura, se encuentran muy pocos estudios similares realizados en Perú, con excepción del estudio de Hartinger et al. (78) y los estudios derivados de éste (60,71) así como el de Kalter et al. (79), aplicado en diversas comunidades de bajos recursos rurales y urbanas, y cuyos resultados indicaban que la contaminación ambiental con bacterias resistentes es un factor de riesgo para los humanos, de ser portadores de *E. coli con RAM*.

Este estudio determinó la prevalencia de bacterias con RAM que se encuentran en humanos (niños), animales, y ambiente (agua de consumo humano y suelo) y a su vez caracterizó estas bacterias, contribuyendo a llenar importantes vacíos de información originados por la escasa literatura científica disponible y en especial por las limitaciones de la vigilancia en nuestro país. La información obtenida del trabajo de campo y de laboratorio permitió establecer prevalencias de perfiles de

RAM, identificar vías de diseminación de la RAM, explorar posibles factores asociados a RAM, identificar características como serotipo, filogrupos, secuenciotipo (ST), complejo clonal (CC), patogenicidad, genes de virulencia, genes BLEE y tipo de plásmidos de bacterias con RAM, y establecer si existe cercanía genética entre ellos, para esclarecer sus interrelaciones en la población rural andina de Cajamarca.

Al ser uno de los primeros estudios en nuestro país a realizarse en zonas rurales con objetivo de entender las vías de propagación de la RAM integrando salud ambiental, salud humana y salud animal, este trabajo brinda el punto de partida para futuras investigaciones que indaguen el problema más a fondo en la misma zona, o en zonas con características similares, que den pie a la formulación de hipótesis, e inclusive ser punto de inicio para establecer futuros programas de vigilancia comunitaria en Perú.

II. OBJETIVOS

a. Objetivo General

El objetivo general de este trabajo es explorar la contribución a la RAM en entornos rurales en América Latina bajo el enfoque UNA SALUD para determinar la prevalencia de resistencia en humanos, animales del hogar y ambientes cercanos al hogar, y caracterizar estas bacterias con RAM en humanos, animales y ambiente de las zonas rurales andinas de Cajamarca, en base al enfoque integrado de UNA SALUD.

Este estudio, a través de investigación microbiológica y epidemiológica, busca llenar los grandes vacíos en el conocimiento de RAM en entornos de bajos recursos rurales andinos del Perú.

b. Objetivos específicos

Objetivo 1: Explorar la contribución de las poblaciones humanas, los animales de granja y el ambiente en la RAM en entornos rurales en América Latina bajo el enfoque UNA SALUD, y determinar vacíos de información respecto a las vías de diseminación de la RAM y los factores que la impulsan, a través de una revisión sistemática de literatura.

Objetivo 2: Determinar la prevalencia de perfiles de bacterias resistentes en agua de consumo, animales de granja, heces de humanos (niños), heces de animales y suelo en viviendas rurales andinas de Cajamarca.

Objetivo 3: Caracterizar a las enterobacterias resistentes aisladas mediante la secuenciación a genoma completo y análisis bioinformático.

III. DESARROLLO DE ARTÍCULOS

a. **Artículo 1: *Antimicrobial Resistance in Rural Settings in Latin America: A Scoping Review with a One Health Lens***

METODOLOGÍA

Se realizó una revisión sistemática exploratoria, aplicando la lista de cotejo del protocolo PRISMA para *scoping reviews* y los lineamientos para su ejecución publicados por Peters et al. (80,81) .

Criterios de Inclusión:

El período de estudio abarcó desde enero de 2001 hasta diciembre de 2018. Posteriormente se hizo una actualización desde enero 2019 hasta el 10 de Julio 2024. Sólo se consideraron artículos de estudios primarios, revisados por pares, publicados en español, portugués e inglés. Se diseñó una estrategia de búsqueda utilizando terminología asociada a los tres dominios de UNA SALUD y enfocada en RAM en zonas rurales para poblaciones humanas en países de América Latina (Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Costa Rica, Cuba, República Dominicana, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Haití, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Perú, Uruguay y Venezuela); los términos clave para la búsqueda en las bases de datos se desarrollaron previamente y se muestran en el Anexo A.

Criterios de Exclusión

No se incluyó la literatura gris. Se excluyeron las revisiones y los metaanálisis; sin embargo, se revisaron sus referencias bibliográficas. Se excluyeron los artículos que no reconocían ni discutían los tres componentes de UNA SALUD.

Nos concentramos en artículos revisados por pares, mediante la búsqueda en las siguientes bases de datos electrónicas: PubMed (ciencias biomédicas), Web of Science (multidisciplinaria), Scopus (multidisciplinaria) y SciELO (multidisciplinaria para Latinoamérica y el Caribe). Realizamos la búsqueda desde el 13 de noviembre al 3 de diciembre de 2018. La búsqueda actualizada la realizó el primer autor entre el 5 al 25 de Julio de 2024. Todos los artículos se cargaron en una base de datos Mendeley (82).

La metodología aplicada para las múltiples etapas del análisis de inclusión del *scoping review* se muestra en la Figura 2. Al concluir este análisis, se incluyeron 21 publicaciones en la síntesis cualitativa, a las que se añadieron 7 publicaciones de la búsqueda actualizada. Cinco revisores llevaron a cabo todas las etapas del *scoping review*, desde la selección hasta la extracción de datos, excluyendo los pasos de la búsqueda actualizada, que fueron realizados por el primer autor. Cada revisor participó en forma individual durante la revisión de los estudios para cada fase de eliminación. Durante el proceso, los revisores discutieron cada estudio que fue identificado y acordaron conjuntamente incluir o excluir dicho estudio para el análisis; en caso de no llegar a un acuerdo, el autor senior tomó la decisión en forma dirimente.

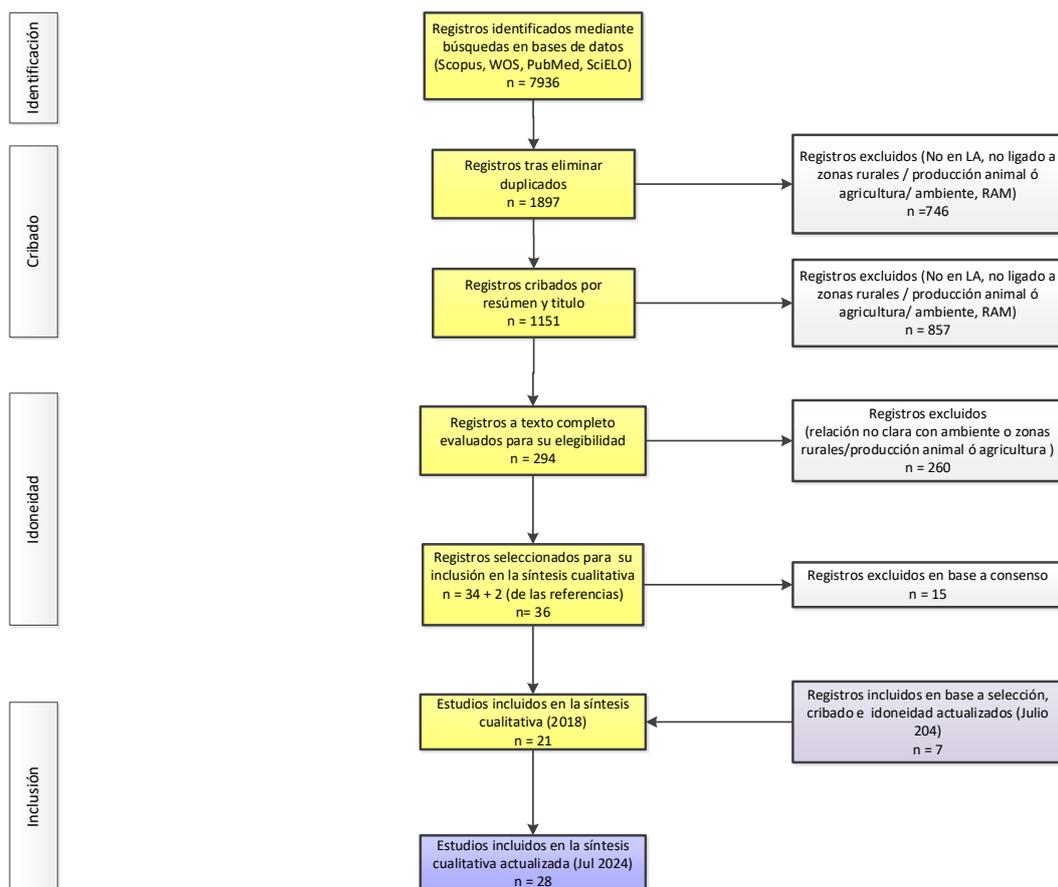


Figura 2: Diagrama de flujo mostrando las etapas para realizar el análisis de inclusión del *scoping review*

Selección de artículos

Consideramos como artículos elegibles sólo a aquellos que presentaron datos de países de América Latina, referentes al entorno humano rural y a las actividades agropecuarias de producción de alimentos y/o de animales para consumo humano; que además estuvieran vinculados a aspectos ambientales (considerando los tres ejes de UNA SALUD), y centrados en el tema de la RAM. Todos los criterios de

inclusión debían cumplirse. Asimismo, se excluyeron aquellos artículos remotamente o tangencialmente relacionados con cualquiera de estos criterios de inclusión.

Manejo de los datos y tabulación

Para la extracción y manejo de los datos utilizamos una hoja de cálculo Excel establecida a priori por los autores como guía. Una vez extraídos los datos de los artículos seleccionados, la información fue tabulada. Se incluyó la siguiente información: autores, año de publicación, título, objetivos de la investigación, DOI, URL, ubicación del estudio, idioma y resumen de los hallazgos.

Análisis, resumen y reporte de los datos

El análisis y síntesis de la literatura incluyó análisis cuantitativo descriptivo y análisis cualitativo de contenido. Para el análisis cualitativo, los revisores extrajeron temas comunes que surgieron de los hallazgos de cada artículo seleccionado, discutiendo sus resultados. Cada artículo fue analizado para identificar el enfoque aplicado para estudiar la RAM y los hallazgos para cada tema.

RESULTADOS

Se identificaron investigaciones centradas en RAM en zonas rurales de Latinoamérica para determinar la contribución de humanos, animales y del ambiente en la generación de RAM, usando el enfoque UNA SALUD como marco para determinar los vacíos de información con relación a las vías de diseminación de la RAM y los factores que la impulsan en zonas rurales de Latinoamérica.

Perfil de literatura

Como se observa en la Tabla 2, se incluyeron 28 artículos en el análisis, originándose en 8 países de Latinoamérica: Brasil, Ecuador, Colombia, Argentina, Chile, México, El Salvador y Perú; siendo Brasil el país que proporcionó la mayor cantidad de artículos (13 de 28). Todos los estudios elegibles abordaron la RAM en áreas rurales; sin embargo, adicionalmente cuatro estudios hicieron muestreo en zonas urbanas o periurbanas con fines comparativos.

Tabla 2. Resumen de las publicaciones incluidas en el análisis

Fuente	Componente UNA SALUD ¹	Contribución humana a RAM	Contribución animal a RAM	Contribución ambiental a RAM	Lugar	Resultados importantes (resumen)
Búsqueda original (2018)						
Armas-Freire 2015 (83)	AH, HH	La resistencia a las fluoroquinolonas (antibiótico de amplio espectro) está relacionada con los humanos, especialmente en entornos clínicos y está muy extendida en Ecuador	Resistencia a fluoroquinolonas mediada por plásmidos ligada a animales productores de alimentos; en Ecuador el uso de fluoroquinolonas no está restringido	No se discute, pero se tomó una muestra de agua de un pozo en la comunidad rural donde se obtuvieron aislamientos de pollo.	Ecuador	Mayor resistencia a fluoroquinolonas en <i>E. coli</i> de pollos tanto en el área rural (22%) como en la operación industrial (10%) que en humanos en comunidades rurales (3%). Aislamientos de humanos en comunidades rurales: tasas más altas de genes <i>qnrB</i> (31%), en comparación con pollos de operaciones industriales (6%) y de comunidades rurales (2.8%). Aislamientos clínicos urbanos: menor prevalencia de genes <i>qnrB</i> (0.9%).
Barbosa 2014 (84)	HH, EH	Expansión de la acuicultura/prácticas incorrectas de crianza de animales	Las bacterias patógenas de los animales de granja pueden penetrar y colonizar los tejidos de los peces, por lo que	El agua se contamina con heces de animales	Brasil	Se aislaron cepas de <i>E. coli</i> de peces para consumo humano, el 43% eran EPEC ² . Los aislamientos presentaron un alto porcentaje de MDR ⁴ .

			los peces se convierten en portadores de patógenos RAM ³ .		
Braykov 2016 (85)	HH, AH, EH	<p>Actividades humanas como la crianza de animales (sistemas de producción a gran escala e incluso a pequeña escala) aumentan la propagación de la RAM³ al ser fuentes de cepas resistentes. Los antibióticos de amplio espectro utilizados en enfermedades humanas contribuyeron a la RAM³ en aves de producción.</p>	<p>Posibles fuentes extrínsecas de resistencia: las aves podrían ser colonizadas por cepas resistentes de los centros de incubación.</p>	<p>Las superficies de los corrales tenían perfiles de resistencia muy similares a los de las muestras de aves de producción: el medio ambiente juega un papel clave en la propagación de la RAM³.</p>	<p>Ecuador</p> <p>Mayor prevalencia de RAM³ en bacterias de aves de producción (52.8%) versus aves domésticas (16%). Cepa resistente a 4 medicamentos exclusiva de un subconjunto de aislamientos de aves de producción (7,6%) y superficies de corrales (6,5%); asociada con un determinado sitio de compra. Prevalencia de RAM³ en aves de producción disminuyó con edad de las aves.</p>

Brisola 2019 (86)	HH, AH, EH	Los sistemas de producción porcina contaminan el medio ambiente y propagan genes de RAM ³ /MDR ⁴	Las heces de los cerdos contaminan el ambiente con <i>E. coli</i> portadora de genes MDR ⁴	Cepas con MDR ⁴ encontrados en agua y suelo.	Brasil	Aislamientos de <i>E. coli</i> en muestras de heces de cerdo, agua y suelo: 37,04% de los aislamientos presentaron MDR ⁴ . El 7,41% fueron productores de BLEE ⁵ , de los cuales el 50% presentó el gen <i>bla_{CMY-M2}</i> , el 40% el <i>bla_{TEM-1}</i> y el 70% el gen <i>qnrS</i> . El 78% de aislamientos MDR ⁴ presentaron alto riesgo potencial de transmisión a humanos.
Campioni 2014 (87)	HH, AH	El uso excesivo de quinolonas en la producción de carne de pollo propaga la resistencia a los antimicrobianos.	Resistencia al ácido nalidíxico en cepas de <i>Salmonella enteritidis</i> en pollo; el patógeno es vehículo para RAM ³ .	RAM ³ no se origina en ambientes de granja, pero éstos se contaminan con los pollos, se encontraron las mismas cepas. Los pollos recibidos del criador podrían ser el origen de RAM ³ .	Brasil	Las cepas se tipificaron, agrupándose en dos clusters, A y B. Algunas cepas aisladas de fuentes diferentes (aves y ambientales) eran indistinguibles. Prevalencia de resistencia al ácido nalidíxico fue 73.3% en las cepas, éstas fueron sensibles a todos los demás antibióticos.

Cervelin 2018 (88)	HH, AH.	Las granjas de producción porcina generan mucho estiércol y usan antibióticos excesivamente, lo que favorece propagación de la RAM ³ por vectores.	Los cerdos son portadores de bacterias zoonóticas RAM ³ , que son patógenas para animales y humanos.	La presencia de moscas es un factor ambiental de gran importancia en la propagación de patógenos portadores de RAM ³ .	Brasil	Enterobacterias resistentes a al menos a dos de los cuatro antibióticos (de uso en humanos o medicina veterinaria) testeados. Máxima probabilidad de infección fué en granja 2, con 80% de probabilidad de infección por EHEC en lechuga contaminada por moscas
Gambero 2018 (89)	HH, EH	La ganadería tiene un mayor impacto en calidad de las aguas superficiales y subterráneas al propagar <i>E. coli</i> con RAM ³ ; bajo porcentaje de <i>E. coli</i> resistente a antibióticos usados en medicina humana.	Las heces de animales contaminan el agua. Alta prevalencia de <i>E. coli</i> resistente a antimicrobianos de uso veterinario en aguas tanto superficiales como subterráneas.	El agua no es segura para el consumo humano debido a su alto número de <i>E. coli</i> . Ayuda a propagar la RAM ³ .	Argentina	Perfiles RAM ³ de <i>E. coli</i> y su relación con usos del suelo indicaron: contaminación fecal en el agua proviene de residuos animales. Mayor prevalencia de perfiles resistentes a la ampicilina (63%) y a la tetraciclina (50%) en agua subterránea.
Kalter 2010 (79)	EH, HH	La carne de pollo producida en sistemas de producción intensivos, y el	El consumo de alimentos de origen animal producidos de forma intensiva	Factores ambientales como: la falta de protección del agua y mal	Perú	Las personas que tomaban “cualquier antibiótico” aumentaban el riesgo de que niños fueran portadores de <i>E. coli</i> resistente. Residencia en una zona donde los hogares servían pollo de

		<p>uso de antibióticos en el hogar influye en el riesgo de bacterias RAM³ en niños.</p>	<p>es un factor que aumenta el riesgo de RAM³ en humanos.</p>	<p>manejo de excretas, influyen en el aumento del riesgo de portar RAM³ en niños.</p>		<p>casa (a diferencia del pollo del mercado) protegía contra la transmisión de <i>E. coli</i> resistente. Contaminación ambiental con bacterias RAM³ pareció contribuir a que los niños sean portadores de <i>E. coli</i> resistente.</p>
<p>Lowenstein 2016 (90)</p>	<p>AH, HH</p>	<p>La producción ganadera en pequeña escala podría tener un impacto en el riesgo de zoonosis y propagación de la resistencia a los antimicrobianos.</p>	<p>La manipulación y el consumo de animales enfermos y muertos se identificaron como factor de riesgo para la propagación de la RAM³. Uso no regulado de antimicrobianos veterinarios en esta comunidad.</p>	<p>El saneamiento del entorno animal no se abordó en las entrevistas, aunque las fuentes de agua y espacios compartidos fueron temas que emergieron.</p>	<p>Ecuador</p>	<p>La manipulación y el consumo de animales enfermos y muertos y la compra de medicamentos veterinarios sin receta aumentan potencialmente riesgo de transmisión de enfermedades zoonóticas, así como la propagación de la RAM. La producción avícola a escala industrial se consideró menos saludable debido al uso de antibióticos.</p>

Mattiello 2015 (91)	HH, EH	<p>Uso de antibióticos como promotores del crecimiento. El saneamiento inadecuado del ambiente/equipo interior favorece la salmonela MDR⁴.</p>	<p>Los animales contribuyen como portadores de <i>Salmonella enterica</i> con RAM³.</p>	<p>El entorno de los corrales contribuyó mucho más a la RAM³ que otras fuentes. Transferencia horizontal de determinantes de RAM³: aislamientos ambientales mostraron MDR⁴ a antibióticos humanos.</p>	Brasil	<p>Muestras ambientales mostraron mayor resistencia a los antimicrobianos respecto a otras fuentes. La mayor prevalencia de perfiles resistentes a las sulfonamidas fue en muestras ambientales (44.4%) y en pollo (51%). La prevalencia de perfiles MDR fue 18.2%. Veintiún aislamientos presentaron susceptibilidad reducida a β-lactámicos y albergaban genes <i>bla</i>_{TEM}, <i>bla</i>_{CMY} y/o <i>bla</i>_{CTX-M}.</p>
Rodriguez 2015 (92)	AH, HH	<p>Las malas prácticas de la industria avícola promueven la diseminación (a animales y humanos) de <i>Salmonella spp</i> patógena, que también presenta una variedad de perfiles de RAM³.</p>	<p>Las gallinas y los huevos son portadores de salmonelas resistentes, que puede ser patógena para humanos y aves.</p>	<p>Muestras ambientales, como piensos y agua, también contenían cepas de <i>Salmonella</i> pp. Muestras fecales de trabajadores agrícolas se incluyeron dentro de muestras</p>	Colombia	<p>Prevalencia de <i>Salmonella spp</i>. fué del 33 % en las 5 granjas; se aislaron dos serovares con MDR⁴. Prácticas agrícolas fueron factores de riesgo potenciales para la propagación de <i>Salmonella spp</i>: molienda de piensos en las granjas (OR= 24), almacenamiento de huevos en casetas avícolas (OR = 11.25) y uso de material inadecuado de construcción (OR= 5.24).</p>

					ambientales, pero no se discutieron.	
Santamaria 6 2011 (93)	EH, AH	Sistemas de producción basados en pastoreo (el uso de antibióticos se limita a enfermedades control y el alimento no contiene antibióticos) todavía crea reservorios para bacterias resistentes.	Los pastizales presentan reservorios animales (ganado) de genes de resistencia a la tetraciclina, que son más diversos que en el medio ambiente.	Los pastizales presentan reservorios ambientales (suelo y agua) de genes de resistencia a la tetraciclina.	Colombia	Alta prevalencia de genes <i>tet</i> (O), <i>tet</i> (W), <i>tet</i> (Q) y <i>tetB</i> (P) en muestras de heces animales: 100, 98, 83 y 70%. Aunque no todos los genes detectados en animales fueron detectados en el ambiente, existe una distribución predominante de <i>tet</i> (W) y <i>tet</i> (Q) tanto en reservorios animales como ambientales. Similitud de las secuencias sugiere transmisión de genes de animales al medio ambiente.
Dos Vieira 2010 (94)	AH, EH, HH	La RAM ³ en ambientes acuáticos aumentó debido al uso indiscriminado de antimicrobianos en el tratamiento humano y en la producción de	Bacterias con RAM ³ o genes de resistencia se transfieren de animales a humanos, o de animales a bacterias que infectan a los	Las bacterias o genes RAM ³ se transfieren de los camarones al medio ambiente (agua de estanque y sedimentos).	Brasil	El índice de resistencia a los antibióticos (IRA) y el índice de resistencia múltiple (MAR) variaron dentro de los rangos de 0,068–0,077 y 0,15–0,39, respectivamente. Más del 90,5% de las cepas de <i>E. coli</i> mostraron diversos perfiles de resistencia a la antibióticos testeados.

		alimentos y animales.	humanos a través de los alimentos.			
Miranda 2002 (95)	AH, HH, EH	La piscicultura intensiva produce más RAM ³ , la terapia profiláctica se ha generalizado en la salmonicultura chilena.	Manejo inadecuado de la piscicultura y de los antimicrobianos	En la crianza de salmónidos agua y alimento podrían comportarse como reservorios de bacterias MDR ⁴ que pueden transmitir genes de RAM ³ a patógenos humanos	Chile	Bacterias Gram negativas resistentes a la oxitetraciclina recuperadas mostraron alta variabilidad taxonómica, el 12.6% de bacterias con RAM eran enterobacterias. Alta frecuencia de MDR ⁴ ; índice de resistencia a los antibióticos (IRA) entre 0,38 y 0,48.
Palhares 2014 (96)	HH, AH, EH	El abuso de antimicrobianos en el ganado produce RAM en animales y humanos, así como prácticas de cría de animales y gestión agrícola y ambiental incorrectas. La densidad humana	Los animales de granja, el estiércol, la piscicultura y los animales salvajes contribuyen a la propagación de <i>Salmonella</i> con RAM ³	La lluvia, la escorrentía agrícola y el caudal de los ríos contribuyen a la propagación de <i>Salmonella</i> spp. con RAM ³ .	Brasil	Prevalencia de <i>Salmonella</i> spp. en las muestras: 62.7%. El 49,5% de los aislados fueron resistentes a al menos un antimicrobiano, ocurriendo MDR ⁴ en el 18% de los aislamientos. Estrecha interacción entre la agricultura basada en animales, la <i>Salmonella</i> spp. y la resistencia a los antimicrobianos

		favorece la presencia de <i>Salmonella</i> spp.				
Pehrsson 2016 (47)	HH, AH, EH	Acceso a antibióticos sin receta, contacto frecuente con reservorios ambientales durante la agricultura de subsistencia y el manejo inadecuado de excretas, favorece RAM ³ en ambientes rurales.	En zonas rurales, los vegetales cultivados y el ganado (vacas y pollos, principalmente) contribuyen a la propagación de la RAM ³ , pero también otros animales domésticos.	En áreas rurales: el suelo recibió aporte de genes RAM ³ de humanos y animales (pollos), a través de las heces. Acceso limitado al agua potable y al saneamiento.	Salvador y Perú	Se identificaron genes RAM ³ que cruzan límites entre hábitats, asociados con elementos genéticos móviles. Intercambio de genes RAM ³ entre comunidades microbianas de origen humano, animal y ambiental. La microbiota fecal humana de El Salvador es similar al suelo cerca de los gallineros tanto en composición filogenética como en RAM ³ , compartiendo 80 proteínas de RAM con una identidad >99%.
Lopez ⁶ 2012 (97)	EH, AH	La producción ganadera extensiva impacta el medio ambiente y a los animales, creando reservorios de RAM ³ a pesar de que utiliza	Los genes de resistencia a las tetraciclinas pueden dispersarse desde los desechos animales al suelo y agua.	Una vez que el suelo se contamina con heces, puede contaminar el agua subterránea y superficial.	Colombia	La prevalencia de al menos un gen <i>tet</i> fue del 87% en todos los aislados. La secuenciación del gen <i>tet</i> no mostró diferencias entre bacterias aisladas de muestras ambientales y las de fluido ruminal y heces. Resistencia a las tetraciclinas en pastizales podría deberse a la

		cantidades bajas de antibióticos.				transferencia horizontal de genes, desde animales al medio ambiente.
Camotti 2018 (98)	EH, AH	Las prácticas agrícolas (uso de estiércol como fertilizante) provocan la acumulación de residuos de fármacos o inducen RAM ³ en los suelos.	El estiércol de aves de corral, ganado vacuno y cerdos contamina los suelos con antibióticos y disemina bacterias RAM ³ , dejando una “huella digital de contaminación” en los suelos.	Los suelos fertilizados contaminan los suelos forestales (no fertilizados con estiércol), por diferentes vías de diseminación.	Brasil	Efecto de aplicación de estiércol en suelos: residuos de antibióticos y modificaciones de la RAM en bacterias. Suelos con estiércol porcino presentaron mayores concentraciones de antibióticos. Suelos sometidos a pastoreo de vacas lecheras por largos períodos de tiempo presentaron mayores concentraciones (10 ⁻⁶ -10 ⁻⁵ genes/bacteria) de gen <i>sulI</i> de resistencia a las sulfonamidas
Resende 2014 (99)	AH EH	Las estrategias de reciclaje de estiércol de ganado (biodigestión) pueden tener implicaciones en la salud animal, humana y ambiental; las	La ganadería genera mucho estiércol con bacterias RAM ³ , este estiércol supuestamente es biodigerido para producir fertilizante “seguro”	el uso de efluentes de biodigestores a temperatura ambiente, contamina el suelo con bacterias RAM ³	Brasil	La prevalencia de perfiles con RAM a al menos un antibiótico fue 36.21% y 55,65% de los aislamientos eran MDR ⁴ . Una proporción importante de aislamientos del afluente del biodigestor exhibieron RAM ³ , y prácticamente el mismo patrón de resistencia se detectó en muestras de efluentes

		bacterias permanecen en el efluente.			
Corzo-Ariyama 2019 (100)	HH, EH	Las prácticas agrícolas contribuyen a la propagación de <i>E. coli</i> patógena, que, al mismo tiempo, muestra RAM ³ . El agua contaminada con aguas residuales juega un papel en la propagación de RAM ³ .	el uso de compost y heces de animales pueden ser fuentes de contaminación para cepas patógenas y resistentes	las manos de los trabajadores, el agua y el suelo pueden transportar bacterias patógenas RAM ³ a los productos agrícolas	México Elevada resistencia a tetraciclina (23.2%) y ampicilina (19.9%). El 3,5% de las cepas presentaron RAM ³ a más de 5 antibióticos. Prevalencia de aislados diarreagénicos fue 1.2 % y la de aislamientos formadores de biopelículas fue 76%. Cepas de <i>E. coli</i> RAM ³ con marcadores de patogenicidad y de formación de biopelículas: riesgos potenciales para consumidores.
Cicuta 2014 (101)	HH, AH	No se discute la contribución humana. Las enterobacterias productoras de BLEE ⁵ son más frecuentes en humanos y animales (mascotas y	Los animales son portadores de una variedad de enterobacterias potencialmente patógenas que producen BLEE ⁵ .	No se discute el aporte del medio ambiente, tomaron muestras de agua, pero no las vinculan con las otras muestras ni discuten los resultados.	Argentina Prevalencia de resistencia a ampicilina en <i>Proteus mirabilis</i> y <i>E. coli</i> , fue de 100% y 31.2%. No se detectaron en forma fenotípica bacterias BLEE ⁵ ni productoras de carbapanemasas.

animales de granja).

Actualización (2024)

Alves Ferreira 2023 (102)	HH, AH, EH	Compostaje como actividad antropogénica contribuye a prevalencia de RAM, ya que bacterias con RAM sobreviven al proceso.	Las heces de animales son reservorios de bacterias con RAM, mayor RAM en heces de aves de corral que en heces de equinos.	El uso de heces animales compostadas en agricultura puede contaminar el suelo con bacterias RAM y modificar el resistoma ambiental.	Brasil	Se evaluó el efecto de compostaje de residuos de caballos y excrementos de aves en sistemas de producción orgánicos y convencionales sobre la prevalencia de enterobacterias e identificó perfiles RAM ³ . <i>E. coli</i> MDR ⁴ no sobrevivió al compostaje, pero otras enterobacterias con RAM ³ persistieron. Compost de caballo mostró menos RAM ³ que el de pollo, y compost orgánico mostró menos que el convencional. Mayor prevalencia de bacterias con RAM ³ a la ampicilina (7-13%), cefoxitina (5-10%), imipenem (4-8%) y amoxicilina + ácido clavulánico (4-8%). Prevalencia de aislamientos MDR ⁴ : 2%
Alves Ferreira 2024 (103)	HH, AH, EH	Agricultura intensiva como actividad antropogénica	Las heces de pollo usadas como fertilizante enriquecen el suelo con genes	Determinantes de RAM esta naturalmente presente en suelos, pero éstos	Brasil	Se evaluaron efectos de sistemas intensivos de manejo del suelo en bosques versus áreas agrícolas intensivas sobre atributos químicos del suelo, composición de

		contribuye a la RAM.	RAM y con metales pesados que ejercen presión selectiva para RAM en las bacterias.	se incrementan en suelos manejados intensivamente, diseminándose a animales y humanos.		comunidades bacterianas y prevalencia de genes RAM ³ . Mayor prevalencia de metales pesados en tierras de cultivo que en bosques. Comunidades microbianas más diversas en tierras de cultivo que en bosques. El 39% de genes RAM ³ testeados se encontraron en suelos agrícolas y forestales. El gen <i>oprD</i> (mecanismo de resistencia) fue más abundante y solo se encontró en tierras agrícolas, los genes <i>sul</i> y <i>tet</i> fueron más abundantes en tierras forestales. Alta correlación positiva entre concentraciones de cobre y gen <i>oprD</i> (0.85, $p < 0.001$).
Cornejo 2020 (104)	HH, AH, EH	Bajos estándares de bioseguridad en crianza de traspatio de aves generan riesgo de propagación de patógenos para la salud animal y humana. Uso excesivo de antibióticos en gallinas explicaría	Interacciones entre animales (domésticos y silvestres) con los humanos median la transmisión de agentes patógenos a las personas. Huevos son fuentes de	La RAM en huevos se puede deber a contaminación del ambiente, donde el agua y suelo estarían contaminados con residuos de antibióticos, exponiendo a las	Chile	Prevalencia de residuos de antimicrobianos en huevos de producción casera (traspatio), específicamente de las familias de las tetraciclinas (20.5%), β -lactámicos (59%), aminoglucósidos (56.6%) y macrólidos (13.3%). El 75% de las aves estaban sueltas y 49% de los dueños reportaron que había un curso de agua cruzando su propiedad y el 20% de los propietarios declararon que sus aves tomaban agua solo de

		presencia de residuos de antibióticos en huevos.	exposición a antimicrobianos.	aves que estan libres.		esas fuentes. El 78% de los propietarios usaban heces de pollo como fertilizante.
Hedman 2020 (105)	HH, AH, EH	La producción de pollos como actividad antropogénica contribuye a la diseminación de la RAM.	Pollos de engorde contribuyen a la diseminación de RAM porque sus heces contienen determinantes de RAM. La cercanía y movilidad de pollos de traspatio contribuyen a esparcir determinantes de RAM entre humanos y animales.	El agua de ríos y el suelo estarían enriquecidos con RAM en las heces de pollos criados en granjas. A su vez, estas fuentes ambientales contaminarían a pollos de traspatio que se movilizan.	Ecuador	Se investigó prevalencia de bacterias con RAM en muestras de humanos y pollos de crianza de traspatio. El predictor fue la distancia a la granja de pollos de engorde más cercana, pero éste no fue significativo. Similitud entre los perfiles RAM ³ de pollos y los de humanos. Alta prevalencia de RAM ³ compartida en <i>E. coli</i> a gentamicina (78%), cefalotina (92%), trimetoprim/sulfametoxazol (70%) y tetraciclina (89%). El alto rango de movilidad de los pollos de traspatio explicaría la transmisión entre hogares y, la propagación ambiental de bacterias con RAM ³ .
Larson 2019 (71)	HH, AH, EH	Los humanos contribuyen a la diseminación de la RAM a través de inadecuadas prácticas de	Los animales juegan un rol importante en la diseminación de la RAM, el cual	El agua de bebida contribuye a la diseminación de <i>E. coli</i> con RAM	Perú	Se analizaron muestras de agua de bebida recogidas en viviendas rurales, junto con datos de encuestas. Se aisló <i>E. coli</i> en el 37,3% de las muestras positivas a coliformes termotolerantes. RAM ³ en más de la

		manejo y almacenamiento del agua potable.	merece ser explorado.	en estas comunidades		mitad (51%) de los aislamientos de <i>E. coli</i> del agua potable. Un 19,7% (IC del 95% [12,9, 28,0], n = 23) de los aislamientos de <i>E. coli</i> fueron MDR ⁴ ,
Larson 2023 (60)	HH, AH, EH	El uso de antibióticos en niños y la crianza de animales de granja de traspatio contribuye a la contaminación con bacterias con RAM del agua de bebida.	Animales que deambulan libre en zonas comunes con humanos tienen un rol importante en la diseminación de bacterias con RAM en el agua de bebida.	El agua de bebida es fuente exposición a determinantes de RAM en estos hogares	Perú	Agua de bebida recolectada de recipientes de boca estrecha tenía menos probabilidades de estar contaminada que la recolectada directamente del grifo (OR = 0,55, p = 0,030) o de recipientes de boca ancha. Presencia de coliformes termotolerantes asociados con crianza de aves y con desechos animales observados en el área de la cocina. La prevalencia de RAM ³ fue mayor entre los propietarios de cerdos (60%), en relación con aquellos que no criaban cerdos (36,4%), así como en los hogares con animales que deambulan libremente en el área de la cocina (59,6%) en comparación con los hogares sin animales que deambulan libremente en el área de la cocina (39,7%).
Moretto 2022 (106)	HH, AH, EH	Seres humanos contribuyen a diseminación de	La contaminación fecal proveniente	El agua es disemina contaminación	Brasil	Se evaluó prevalencia de RAM ³ en bacterias gramnegativas de un sistema fluvial en una comunidad rural,

RAM al desechar su materia fecal en los ríos, cuyas aguas son usadas para recreación y lavar alimentos. de rumiantes en agua de río es evidente en la escorrentía de los campos que bordean el río, incluso dentro de la comunidad. fecal y bacterias con RAM a lo largo de esta zona

muestreando agua de río y agua entubada, heces de humanos y animales. Contaminación fecal media: 219 UFC/ml/punto para coliformes totales y 20 UFC/ml/punto de *E. coli*. Se aislaron bacterias con RAM³ en cada punto analizado, incluyendo suministro de agua potable. El 88 % de aislamientos con RAM³ no eran fermentadores de lactosa, perteneciendo a géneros importantes en la práctica clínica. En mayoría de aislamientos: resistencia a ciprofloxacino, a pesar de que éste no se usa comúnmente en animales destinados al consumo en esta región.

1 HH: *Human Health*; AH: *Animal Health*; EH: *Environmental Health*; 2 *E. coli* enteropatógena; 3 Resistencia antimicrobiana/ resistente a los antimicrobianos; 4 Multidrogo resistencia/multidrogo resistente; 5 β -lactamasas de espectro extendido; 6 Ambas publicaciones pertenecen al mismo proyecto y comparten la misma muestra

En la Tabla 3 se muestran las características básicas de los estudios. Todos los artículos fueron escritos en idioma inglés, veinte y cinco de ellos fueron publicados desde el 2011 en adelante. Todos los estudios fueron cuantitativos y de diseño transversal excepto uno, que fue cualitativo. Un artículo tuvo un diseño experimental de laboratorio y aplicó métodos microbiológicos. Dos artículos abordaron la RAM únicamente mediante técnicas moleculares, ocho combinaron perfiles fenotípicos u otros métodos microbiológicos y técnicas moleculares (como la reacción en cadena de la polimerasa o PCR) y ocho aplicaron únicamente mediante métodos microbiológicos. Seis estudios analizaron datos microbiológicos y epidemiológicos. Sólo dos artículos incluyeron un análisis de identificación química de antibióticos o de características químicas en las muestras además del análisis genético molecular. En la Tabla 4, se observan los tipos de datos recogidos en los estudios seleccionados, siendo en su mayoría muestras de animales y ambientales, y en menor proporción muestras de heces humanas. Sólo un estudio realizó muestreo de alimentos cultivados frescos y ocho recogieron data de cuestionarios y entrevistas.

Tabla 3. Características básicas de los estudios incluidos en el análisis

Características del estudio	Número (n=); Artículos incluidos, n (%)	Numero de artículo en referencias
Tipo de investigación		
Cuantitativa	27 (96.4)	(47,60,71,79,83–89,91–106)
Cualitativa	1 (3.6)	(90)
País de origen (104)		
Brasil	12 (42.8)	(84,86–88,91,94,96,98,99,102,103,106)

Ecuador	4 (14.2)	(83,85,90,105)
Colombia	3 (10.7)	(92,93,97)
Argentina	2 (7.1)	(89,101)
Chile	2 (7.1)	(95,104)
México	1 (3.6)	(100)
El Salvador-Perú	1 (3.6)	(47)
Perú	3 (10.7)	(60,71,79)
Fecha de publicación		
2001-2005	1 (3.6)	(95)
2006-2010	2 (7.1)	(79,94)
2011-2016	13 (46.4)	(47,83–85,87,90–93,96,97,99,101)
2017-2019	6 (21.4)	(71,86,88,89,98,100)
2020-2024	6 (21.4)	(60,102–106)
Idioma		
Inglés	28 (100)	(47,60,71,79,83–106)
Enfoque usado para estudiar RAM		
Microbiológico y molecular	8 (28.5)	(71,83,86,87,91,97,100,106)
Molecular	2 (7.1)	(47,93)
Microbiológico	8 (28.5)	(84,88,89,94–96,99,101)
Microbiológico y epidemiológico	6 (21.4)	(60,79,85,92,104,105)
Químico y molecular	2 (7.1)	(98,103)
Cualitativo	1 (3.6)	(90)
Experimental de laboratorio y microbiológico)	1 (3.6)	(102)

Tabla 4. Tipo de datos recogidos en los estudios seleccionados

Tipo de datos recogidos	Número (n=); Artículos incluidos, n (%)	Número de artículo en las referencias
Muestras de animales (hisopados cloacales, heces, bosta, compost, músculo, huevos, muestras clínicas)	20 (71.4)	(47,79,83–87,91–97,99,101,102,104–106)
Muestras ambientales (suelo, agua, sedimentos de pozas, superficies, manos, vectores, piensos)	22 (78.5)	(47,60,71,79,83–89,91–98,100,103,106)

Muestras de humanos (heces)	5 (17.8)	(47,79,83,92,105,106)
Cuestionarios y entrevistas, observación	8 (28.5)	(60,71,79,85,90,92,104,105)
Muestras de alimentos cultivados frescos	1 (3.6)	(100)

Resistencia Antimicrobiana a través del enfoque UNA SALUD

Trece artículos, Braykov et al., Brisola et al., Dos Vieira et al., Miranda et al., Palhares et al., Pehrsson et al., Alves Ferreira et al., Cornejo et al., Hedman et al., Larson et. al. y Moretto et al. (47,60,71,85,86,94–96,102–106) tuvieron en cuenta los tres componentes de UNA SALUD, mientras que los demás artículos sólo tomaban en cuenta dos de los tres componentes, ya sea en la discusión o en la descripción de los métodos de recojo de datos. En aquellos estudios que discutieron los tres componentes de UNA SALUD, éstos no fueron considerados en su totalidad para el diseño del estudio, con excepción de Pehrsson et al. y Moretto et al. (47,106).

Contribución Humana a la RAM

Los factores antropogénicos que promueven la RAM incluyeron a los sistemas de producción de animal (intensivo y no intensivo) (47,60,71,79,83–89,91–97,104–106) y a la agricultura intensiva (103) y prácticas agrícolas, como el uso de bosta o heces humanas como fertilizante (47,96,98–100,102). De hecho, se encontró evidencia de la supervivencia de bacterias con RAM después de la biodigestión de bosta de vacunos, caballos y pollos, lo que podría contaminar los suelos (99,102). Adicionalmente, se encontró que cada tipo de bosta usada como fertilizante

agrícola, tenía una concentración única de residuos de antimicrobianos y/o de genes RAM, dependiendo del origen y tipo del sistema de producción animal (98,102). Por otro lado, se identificó al manejo inadecuado de excretas humanas como un importante factor que promueve la RAM en áreas rurales (47,79,106). Sólo tres artículos (47,60,79,83) identificaron como contribución humana al problema del uso no restringido, no regulado o reciente de antimicrobianos en humanos. Cicuta et al. (101) no identificaron ningún aporte humano, sin embargo, reconocieron la necesidad de tener un enfoque interdisciplinario para implementar investigación en salud humana y animal. Pehrsson et al. (47) y Moretto et al. (106) obtuvieron evidencia del rol de las heces humanas en la generación de la RAM. Pehrsson et al. (47) evidenciaron que los seres humanos participan en la generación de RAM, modificando los microbiomas y resistomas en entornos rurales al interactuar con los animales y el ambiente mediante la transferencia horizontal de determinantes de la RAM; mientras que Moretto et al. (106) proporcionaron evidencia que apunta a la contribución humana a la RAM, hallando mayor prevalencia de resistencia al ciprofloxacino, cuyo uso es muy controlado en animales en Brasil, pero no así en seres humanos.

Contribución animal a la RAM

Las aves de corral fueron los animales de consumo más comunes (47,60,79,83,85,87,90–92,96,98,102–105), aunque los peces (84,95), cerdos (60,79,86,88–90,96,106) y vacunos (60,79,89,93,96,97,106) también estaban representados. Sólo un estudio investigó la RAM en la producción de camarón (94). Algunos estudios consideraron el aporte de otras especies de animales domésticos

(60,79,89,90,101,102,106) como ovejas, patos, palomas, caballos, perros o cuyes. Corzo-Ariyama et al. (100) y Larson et al. (71) se centraron en identificar perfiles de RAM, en las bacterias de productos agrícolas y en las de muestras de agua de bebida respectivamente, y en ambos casos se reconoció el papel de los animales en general en la propagación de la RAM. El acarreo o transferencia de bacterias y/o determinantes de RAM fue la contribución animal más ampliamente identificada (47,60,71,84–86,91,93–95,97–100,102,103,105,106), y en segundo lugar el uso inadecuado o no regulado de antimicrobianos veterinarios (87–90,94–96,102,104). También se identificó el papel de los alimentos de origen animal en la exposición humana a residuos de antibióticos (104) o en la propagación de bacterias RAM en la cadena alimentaria humana (79,83,84,86,87,93,94). Por el contrario, Cicuta et al. (101) no reconoció ninguna contribución animal para la generación y propagación de la RAM.

Armas-Freire et al. (83), Brisola et al. (86), Campioni et al. (87), Mattiello et al. (91), y López et al. (97) obtuvieron evidencia robusta del papel de los animales como reservorios o portadores de genes de RAM mediante métodos moleculares (107) combinados con pruebas de resistencia fenotípica (108). Alves Ferreira et al. demostraron, aplicando un diseño experimental, una menor prevalencia de RAM en desechos animales de un sistema de producción animal orgánico comparado con uno convencional (102). Santamaría et al. (93) y Pehrsson et al. (47) utilizaron sólo métodos moleculares para estudiar la RAM, pero estos últimos aplicaron la metagenómica para comparar resistomas completos. Camotti et al. (98) y Alves Ferreira et al. (103) utilizaron una combinación de métodos moleculares y químicos; los primeros para identificar genes RAM y moléculas de

antimicrobianos, y los últimos, para evaluar el efecto de la composición del suelo agrícola en la prevalencia de genes de RAM en bacterias. Braykov et al. (85), Kalter et al. (79), Rodríguez et al. (92), Cornejo et al. (104), Hedman et al. (105), y Larson et al. (60,71) incluyeron enfoques epidemiológicos. Uno de estos estudios evidenció que el uso reciente de antibióticos en miembros del hogar y la corta edad (3 – 12 meses) en niños eran factores de riesgo importante para el acarreo de *E. coli* con RAM en niños, mientras que vivir en una comunidad donde la mayoría de hogares consumen pollo criado en casa era un factor protector (79). Por otro lado, Larson et al. (60) hallaron que la crianza de traspatio de cerdos aumenta la probabilidad de hallar bacterias con RAM en agua de bebida.

La mayoría de los artículos propusieron que la transmisión de genes RAM se da por una vía unidireccional, de los animales al medio ambiente. Solo Moretto et al. (106) propusieron una vía de diseminación conjunta de los seres humanos y animales al medio ambiente. Por el contrario, Brisola et al. (86) y Pehrsson et al. (47) propusieron que la diseminación de la RAM ocurre en direcciones opuestas en forma simultánea, vinculando todos los reservorios: humano, animal y ambiental.

Contribución ambiental a la RAM

Más de 60% de los artículos identificaron al agua como un factor que contribuye a la propagación de la RAM (47,60,71,79,84–86,89,93–98,100,106). Otros factores ambientales incluyeron: suelo (47,85,86,93,96–100,102,103), entorno de la granja/gallinero (85,91,92,100), vectores (moscas) (88) y sedimentos de estanques (94). López et al. (97) reconocieron el rol de la contaminación fecal del suelo en la diseminación de RAM en aguas superficiales y de subsuelo, mientras que Alves

Ferreira et al. (102) resaltaron la contribución de desechos animales compostados en la modificación del resistoma del suelo. Santamaría et al. (93) y Palhares et al. (96) destacaron la importancia de la escorrentía en la diseminación de genes RAM en el medio ambiente. Löwenstein et al. (90) consideraron relevante para la diseminación de la RAM, el uso de fuentes de agua potable compartidas entre animales y humanos y el uso de espacios compartidos en las viviendas. Cornejo et al. (104) destacaron el rol del suelo y el agua en la exposición de gallinas de traspatio a antibióticos usados por sistemas de producción animal intensivos. Asimismo, Hedman et al. (105) propusieron que agua y suelo contaminados con heces de aves de sistemas de producción intensiva serían una fuente de exposición a determinantes de RAM en pollos que circulan cerca y libremente. Por otro lado, Miranda et al. (95) señalaron que, en las granjas de salmónidos, el alimento y las aguas que alimentan a las pozas son reservorios de bacterias RAM. Armas Freire et al. (83) y Cicuta et al. (101) no abordaron ninguna contribución ambiental al problema de la RAM.

Brisola et al. (86), Campioni et al. (87), Mattiello et al. (91), Santamaría et al. (93), Pehrsson et al. (47), López et al. (97), Camotti et al. (98) y Alves Ferreira et al. (103) presentaron evidencia robusta sobre el papel del medio ambiente en el mantenimiento y propagación de la RAM, coincidiendo en que los ambientes contaminados con heces son una fuente o reservorio persistente de bacterias RAM desde los cuales se diseminan fácilmente. Asimismo, Braykov et al., Kalter et al. y Larson et al. (60,79,85) proporcionaron evidencia microbiológica/epidemiológica robusta sobre el papel del medio ambiente o de factores relacionados al hogar en la propagación de la RAM. Casi todos los estudios consideraron solo a los animales

como la fuente de la contaminación, excepto Pehrsson et al., y Moretto et al., quienes evidenciaron la contribución de heces humanas y animales (47,106)

Vacíos de Información

En ninguno de los artículos seleccionados se identificó la contribución de la vida silvestre, los efluentes de hospitales rurales o de servicios de salud al medio ambiente como impulsores de la RAM ni su impacto en las poblaciones rurales, los animales y los ecosistemas. Seis de los artículos incluyeron muestras fecales humanas en sus estudios, sin embargo, no se tomaron muestras de las descargas colectivas de desechos humanos o aguas residuales.

Del mismo modo, ninguno de los estudios seleccionados se enfocó en el vínculo entre la minería y la RAM en los entornos rurales, aunque es conocido que los metales son impulsores de la RAM (49), así como la contribución de la minería a la contaminación por metales (109,110). Sin embargo, Alves Ferreira et al. (103) establecieron correlaciones entre la presencia de algunos metales pesados en suelo (a causa de agricultura intensiva) con la RAM.

b. Artículo 2: *Antimicrobial Resistance in Humans, Animals, Water and Household Environs in Rural Andean Peru: Exploring Dissemination Pathways through the One Health Lens*

METODOLOGÍA

Zona de estudio

El estudio se realizó en hogares rurales de las provincias de San Marcos y Cajabamba en la región de Cajamarca, Perú, la cual se encuentra aproximadamente entre 2200 y 4000 msnm. Los hogares obtienen agua potable de reservorios comunitarios centrales que se canalizan directamente a las casas o a sus patios. El método preferido de tratamiento del agua dentro de los hogares es el hervido (71), y la mayoría de los hogares poseen animales de granja, siendo común que los pequeños, como las aves de corral, deambulen libremente en los ambientes del hogar.

Diseño del estudio

El diseño del estudio fue transversal, seleccionándose intencionalmente 40 hogares de acuerdo a su perfil microbiológico positivo a RAM en el agua de bebida de los niños. Estos hogares procedían de 102 comunidades andinas rurales, que habían participado previamente en un ensayo controlado aleatorio comunitario (registrado en www.isrctn.com como ISRCTN-26548981) (78). Para este estudio trasversal, se seleccionaron e invitaron a participar en este estudio hogares con un niño menor de cinco años, que albergasen animales de granja y con una muestra de agua de bebida positiva para *E. coli* con RAM. El enrolamiento de los hogares se hizo entre mayo

y junio del 2019. Se realizó una colecta de muestras humanas, ambientales y animales y se recogió información a través de un cuestionario, como se describe a continuación.

1) Colecta de muestras

Se visitaron los 40 hogares para coleccionar muestras de heces de niños y animales, muestras de agua de bebida, muestras de las fuentes de agua de la comunidad y muestras de suelo de los patios de los hogares. Asimismo, se aplicó un cuestionario a fin de identificar riesgos potenciales y factores protectores para la RAM, así como vías de diseminación en zonas rurales.

Se obtuvo un total de 266 muestras, las cuales fueron almacenadas hasta 3 días en caldo peptonado en el laboratorio de campo y transportadas para el posterior análisis de identificación de patógenos al Laboratorio de Enfermedades Entéricas, Nutrición y Resistencia Antimicrobiana en el Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima.

i. Muestreo de heces humanas y animales

Muestras humanas: El personal de campo recolectó en frascos estériles una muestra de heces de un niño sano menor de cinco años de cada hogar. Las muestras se transportaron en refrigeración al laboratorio de campo dentro de las primeras cuatro horas de su recolección. Las muestras de heces se almacenaron en medios de transporte Cary Blair y se mantuvieron refrigerados antes de su envío a Lima para su posterior análisis.

Muestras animales: Un veterinario y un trabajador de campo fueron los responsables de recolectar las muestras, las que consistían en dos hisopados cloacales o rectales de muestras de heces frescas, idealmente uno de un animal de compañía y otro de un animal de granja. El manejo del animal fue realizado por el dueño y un trabajador de campo capacitado, mientras el veterinario tomaba la muestra del animal. Transportamos las muestras en un sobre refrigerado al laboratorio de campo dentro de las cuatro horas posteriores a la recolección. Los especímenes se almacenaron en medios de transporte Cary Blair y se mantuvieron en refrigeración antes de su envío a Lima para su posterior análisis.

ii. Muestras ambientales

Muestras de agua: Se recogieron dos muestras de agua, una de la principal fuente de agua potable que consumía el niño, y la segunda de la principal fuente de agua del hogar. Si el hogar solo tenía uno de los dos tipos de fuentes de agua en el momento de la visita, la fuente de agua disponible se recolectó dos veces. Adicionalmente, se recolectaron muestras de agua del reservorio comunitario. Todas las muestras se transportaron al laboratorio de campo dentro de las ocho horas posteriores a la recolección y se analizaron utilizando el método de filtración por membrana del kit de prueba de agua Oxfam DelAgua, código de producto 14867 (111) .

Muestras de suelo: Se recogieron cinco muestras de suelo poco profundas (menos de 5 cm de profundidad) en diferentes puntos (5 g por punto) del área de juego principal del niño (o donde éste pasaba la mayor parte del tiempo), utilizando cucharas metálicas esterilizadas. Las muestras se colocaron en bolsas Ziplock

esterilizadas y etiquetadas, transportándose a la estación de campo, almacenadas y enviadas a Lima.

2) Análisis de laboratorio de las muestras

Muestras humanas y animales: Las colonias aisladas de enterobacterias se identificaron utilizando CHROMagar Orientation (CHROMagar, Francia) y métodos microbiológicos convencionales (112).

Muestras de agua: Se usó el método de filtración por membrana del kit de prueba de agua Oxfam DelAgua para detectar coliformes termotolerantes (fecales) en las muestras de agua. Incubamos las muestras a $44 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$, de 14 a 16 h en caldo Lauril sulfato. Las muestras se evaluaron según las instrucciones del kit, contando las unidades formadoras de colonias (UFC) amarillas en los primeros 15 min, indicando crecimiento de bacterias termotolerantes. Las colonias con morfología similar se almacenaron en viales de medio peptonado y éstos fueron enviados a Lima para las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos, detección de BLEE y su confirmación molecular.

Muestras de suelo: Éstas fueron homogenizadas y 1 g de cada muestra se transfirió a caldo Luria Bertani (25 mL), en la estación de campo. Luego, se incubaron a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h, fueron almacenadas a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y enviadas a Lima para las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos, detección de BLEE y su confirmación molecular.

i. Pruebas de susceptibilidad a antibióticos

Se utilizó la técnica de difusión en disco de Kirby Bauer (113) para determinar la sensibilidad/resistencia a los antibióticos en todos los aislamientos bacterianos, enfrentándolos contra catorce antibióticos: ácido nalidíxico (NA) (disco de 30 µg), cloranfenicol (C) (disco de 30 µg), ciprofloxacino (CIP) (disco de 5 µg), gentamicina (GN) (disco de 10 µg), tetraciclina (TE) (disco de 30 µg), sulfatrimetroprim (SXT) (disco de 25 µg), amoxicilina-clavulánico (AMC) (disco de 30 µg), ampicilina (AMP) (disco de 10 µg), cefotaxima (CTX) (disco de 30 µg), cefepima (disco de 30 µg), aztreonam (disco de 30 µg), cefoxitina (FOX) (disco de 30 µg), ceftriaxona (disco de 30 µg) e imipenem (disco de 10 µg).

ii. Detección fenotípica de producción de BLEE y confirmación molecular de genes BLEE

Detección fenotípica: Se testearon las susceptibilidades de todos los aislamientos bacterianos a los siguientes antibióticos, utilizando el método de Jarlier (114): aztreonam (disco de 5 µg), ceftazidima (disco de 30 µg), cefotaxima (disco de 30 µg), ceftriaxona (disco de 30 µg), amoxicilina-ácido clavulánico (disco de 30 µg) y cefepima (disco de 30 µg). Se confirmaron mediante discos combinados.

Confirmación molecular: los aislamientos de *E.coli* que mostraron actividad fenotípica de BLEE se analizaron mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional para identificar los genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M} (115–118).

Dentro del grupo *bla*_{CTX-M}, se determinaron los subgrupos *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-3}, *bla*_{CTX-M-8}, *bla*_{CTX-M-9} y *bla*_{CTX-M-10}. Los cebadores o *primers* utilizados se muestran en el Anexo B.

3) Cuestionario

Creamos y aplicamos un cuestionario considerando el enfoque UNA SALUD para identificar las vías de diseminación de la RAM en entornos rurales. Las trabajadoras de campo aplicaron el cuestionario, recopilando información sobre las vías de diseminación de la RAM: las prácticas de higiene y la gestión del agua en el hogar, el uso reciente de antibióticos entre los miembros del hogar, el manejo de animales y las prácticas agrícolas.

iii. Análisis de datos

Los datos se ingresaron en el software de procesamiento de encuestas y censos CS Pro 6.3 y se exportaron al software estadístico Stata 15 (STATA CORP, College Station, TX, EE. UU.) para su análisis. Llevamos a cabo un análisis descriptivo y comparativo de las frecuencias de los tipos de bacterias con RAM. Asimismo, se evaluaron los perfiles de resistencia en las muestras de fuentes humanas, animales y ambientales y se determinaron prevalencias.

iv. Aspectos Éticos

Se contó con la aprobación del Comité de Ética en Humanos (418-16-18) y el Comité de Ética en Animales (010-03-20) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Cada participante firmó un consentimiento informado aceptando participar en nuestro estudio.

RESULTADOS

Vías de diseminación RAM en entornos rurales

Utilizando el enfoque de UNA SALUD, intentamos identificar las vías de diseminación de las bacterias con RAM, en el entorno rural de Cajamarca. Encontramos evidencia de algunas vías específicas, y estas están representadas con líneas rojas sólidas en la Figura 3.

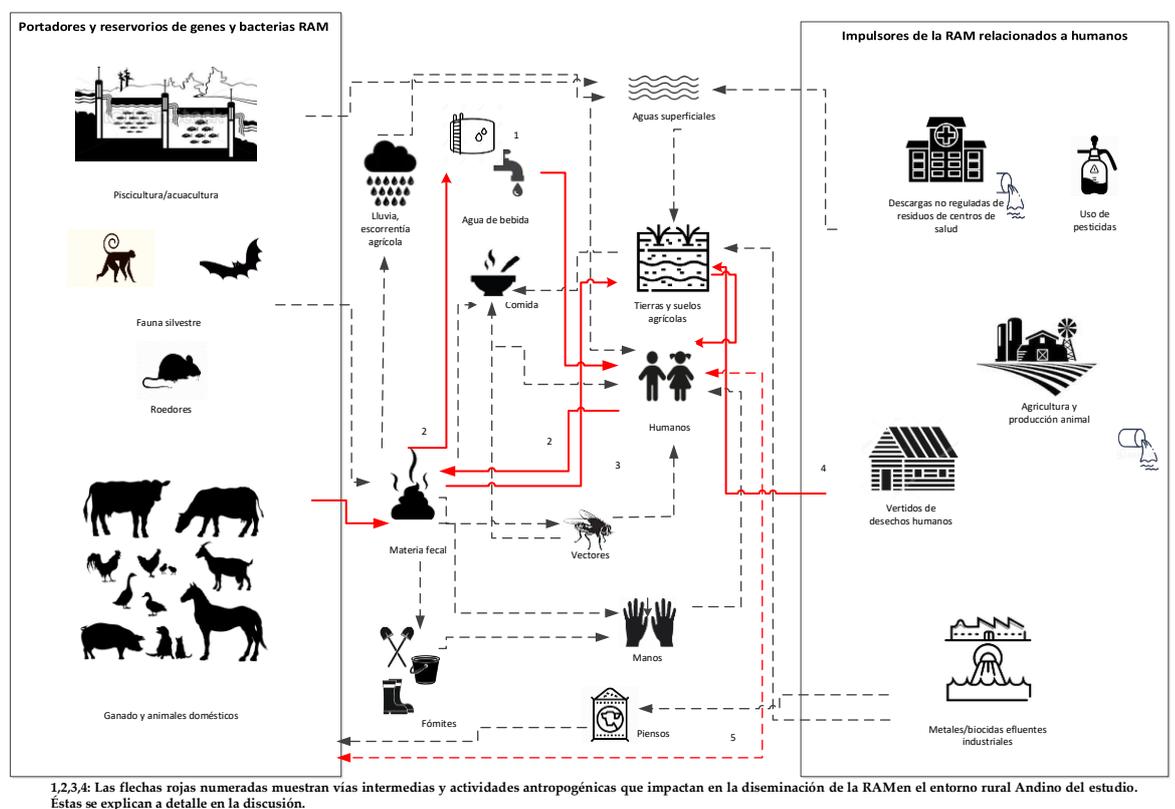


Figura 3: Vías de diseminación de la RAM en zonas rurales andinas, usando la perspectiva de UNA SALUD

Características de los hogares

La Tabla 5 muestra las características de los hogares, el suministro y tratamiento del agua, y el tratamiento de los animales. La mayoría de los hogares tenía acceso a un sistema de agua entubada fuera de la vivienda y solo el 20% tenían acceso a ella dentro del edificio. El 27% de los participantes declararon consumir agua directamente del grifo, el 60% hervían el agua y solo el 12% trataron el agua con cloro o lejía. Respecto al manejo de animales, el 72% de los hogares declararon que el animal recibió antibióticos como parte de su último tratamiento, siendo el más usado la oxitetraciclina, en diferentes presentaciones comerciales.

Tabla 5: Características demográficas de los hogares, suministro y tratamiento del agua, y tratamiento de los animales

Características	N	Media [DS] o % (N)
<i>Características demográficas</i>	40	
Número de personas por hogar		5.0 [1.44]
Número de niños menores de 6 años por hogar		1.4 [0.53]
<i>Características del hogar</i>		
Tipo de paredes de adobe		
- Adobe o tierra apisonada con revestimiento		60 (24)
- Adobe o tierra apisonada sin revestimiento		22.5 (9)
Letrinas con/sin ventilación		
- Pozo séptico		22.5 (9)
- Letrina		75 (30)
Abastecimiento público de agua		
- Sistema público de suministro de agua/agua corriente dentro del hogar		72.5 (29) 20 (8)
- Sistema público de suministro de agua/agua corriente fuera del hogar		2.5 (1) 5 (2)

- Sistema público de suministro de agua/agua entubada fuera del hogar, pero dentro del edificio		
- Agua superficial, manantial		
Fuente de energía		
- Electricidad		87.5 (35)
- Velas		5 (2)
- Panel solar		7.5 (3)
<i>Tratamiento doméstico del agua</i>		
Hervido		60 (24)
Cloro o lejía		12.5 (5)
Ninguno		27.5 (11)
<i>Tratamiento del animal</i>		
La última vez que el animal fue tratado, ¿recibió algún antibiótico?		72.5 (29)
Antibiótico usado para el tratamiento		3.1 (1)
- Amoxicilina		21.8 (7)
- “Biomizona” ¹		50 (16)
- “Ciclosona” ²		3.1 (1)
- “Emicina” ³		3.1 (1)
- “Hipradoxi S” ⁴		6.2 (2)
- “Hipralona” ⁵		6.2 (2)
- “Quinolaba” ⁵		6.2 (2)
- “Tylogen” ⁶		6.2 (2)
¿Dónde consiguió el antibiótico?		18.7 (6)
- Directamente de un veterinario		50 (16)
- Directamente de un técnico veterinario		3.1 (1)
- De un pariente o vecino		18.7 (6)
- En una veterinaria local		0
- En una tienda agro-veterinaria de la zona		0
- En una farmacia		0
- En otro lugar		9.3 (3)

¹Nombre de marca de una formulación comercial de oxitetraciclina y bencidamina, ²Nombre de marca de una formulación comercial de oxitetraciclina y dexametasona., ³Marca comercial de oxitetraciclina, ⁴Marca comercial de doxiciclina

⁵Marca comercial de enrofloxacino, ⁶Nombre de marca de una formulación comercial de gentamicina and tilosina

Muestras de agua

Recolectamos 106 muestras de agua: 26 de reservorio, 40 de la fuente principal en el hogar y 40 de agua de bebida del niño. Todas las muestras fueron positivas para

coliformes termotolerantes, con mayor contaminación en la fuente principal de agua en el hogar. Se aisló *E. coli* de todas las muestras de agua, siendo esta la única bacteria aislada en el agua de reservorio y la principal en las otras muestras de agua, además de *Klebsiella* spp. y *Enterobacter* spp. (ver Tabla 6).

Tabla 6: Contaminación bacteriana, frecuencia y tipo de coliformes termotolerantes identificados en todas las fuentes de agua

Conteo de Coliformes	Agua de reservorio (N=26) % (N)	Agua de fuente principal en hogar (N=40) % (N)	Agua de bebida de niño (N=40) % (N)
Coliformes termotolerantes (IQR 1er – 3er cuartil)	0 – 3.75	0 – 10.5	0 – 9.5
Coliformes termotolerantes (UFC/ml)- media (DS)	14.3 (59.2)	36.2 (108.4)	104.1 (373.5)
Total de muestras positivas a coliformes termotolerantes	34.6 (9)	45 (18)	32.5 (13)
Total de aislamientos bacterianos termotolerantes	N=14 % (n)	N=28 % (n)	N= 27 % (n)
Total de aislamientos positivos de <i>Enterobacteriaceae</i>	92.8 (13)	82.1 (23)	74.0 (20)
<i>E. coli</i>	92.8 (13)	57.1 (16)	44.4 (12)
<i>Klebsiella</i> spp.	0	10.7 (3)	14.8 (4)
<i>Enterobacter</i> spp.	0	14.8 (4)	14.2 (4)

En la Tabla 7 se muestra el perfil fenotípico RAM para los aislamientos de *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. en agua. El 31% de aislamientos de *E. coli* del agua de reservorio mostró resistencia a al menos un antibiótico y la mayor resistencia fue a la tetraciclina y cefotaxima. Todas las *Klebsiella* spp. aisladas de la fuente principal de agua del hogar y del agua de bebida de los niños mostraron resistencia a al menos un antibiótico, con la mayor resistencia a la ampicilina. Se detectó MDR en 33% y 25% de los aislamientos de *Klebsiella* spp. para el agua del hogar principal y el agua potable de los niños, respectivamente. En la fuente principal de agua del hogar, *E. coli* también mostró mayor resistencia a la tetraciclina (31%), ampicilina (19%) y ácido nalidíxico (19%). En la fuente de agua de bebida del niño se halló mayor resistencia a la tetraciclina (42%) y ampicilina (25%).

Tabla 7: Perfiles de resistencia a antibióticos, tipo de agua y proporción de cepas aisladas resistentes a múltiples fármacos.

	Agua de reservorio	Agua de fuente principal en hogar		Agua de bebida de niño	
	<i>E. coli</i> N= 13	<i>E. coli</i> N= 16	<i>Klebsiella</i> spp. N= 3	<i>E. coli</i> N= 12	<i>Klebsiella</i> spp. N= 4
Antibiótico	Resistencia % (N)	Resistencia % (N)		Resistencia % (N)	
Amoxicilina- ácido clavulánico	0	0	0	0	0
Ampicilina	0	18.8 (3)	100 (3)	25 (3)	100 (4)
Aztreonam	0	0	0	0	0
Cefotaxima	15.4 (2)	0	0	8.3 (1)	0
Cefoxitina	0	0	0	0	0

Cloramfenicol	7.7 (1)	12.5 (2)	0	25 (3)	0
Ciprofloxacino	0	6.3 (1)	33.3 (1)	16.7 (2)	25 (1)
Gentamicina	0	6.3 (1)	0	8.3 (1)	0
Ácido nalidíxico	0	18.8 (3)	0	16.7 (2)	0
Sulfatrimetroprim	0	0	33.3 (1)	8.3 (1)	25 (1)
Tetraciclina	15.4 (2)	31.3 (5)	33.3 (1)	41.7 (5)	25 (1)
Ceftriaxona	0	0	0	11.1 (1)	0
Cefepima	0	0	0	8.3 (1)	0
Imipenem	0	0	0	0	0
RAM a por lo menos un antibiótico ¹	30.8(4)	43.8 (3)	100 (3)	41.7 (5)	100 (4)
MDR ²	0 (0)	18.6 (3)	33.3 (1)	33.3 (4)	25 (1)

¹La resistencia a los antimicrobianos (RAM) se define como la capacidad de un microorganismo para impedir que un antimicrobiano actúe contra él. Como resultado, los tratamientos estándar se vuelven ineficaces; las infecciones persisten y pueden propagarse a otras personas (5,119).

²La multidrogo resistencia (MDR) se define como la resistencia a (por lo menos un fármaco) en tres o más clases de antibióticos (120).

Muestras de suelo

En la Tabla 8 podemos ver que se obtuvieron 83 aislamientos de coliformes termotolerantes en las muestras de suelo, las cuales fueron todas positivas. *E. coli* fue la enterobacteria más abundante.

El 34% de los aislamientos de *E. coli* en las muestras de suelo, mostraron resistencia a al menos un antibiótico y uno fue MDR. Como vemos en la Tabla 9, de los aislamientos de *Klebsiella* spp., el 75% mostró resistencia a al menos un antibiótico. Los aislamientos de *E. coli* mostraron mayor resistencia a tetraciclina (26%) y ampicilina (11%), y *Klebsiella* spp. mostró la mayor resistencia a la ampicilina.

Tabla 8: Contaminación bacteriana por frecuencia y tipo de coliformes

termotolerantes en suelos domésticos y agrícolas y heces de animales y humanos

Coliformes	Suelo (N=40) % (n)	Heces de niños (N=40) % (n)	Heces de animales (N=80) % (n)
Coliformes termotolerantes	100 (40)	97.5 (39)	67.5 (54)
Total de aislamientos bacterianos termotolerantes	N=83 % (n)	N=98 % (n)	N=116 % (n)
<i>E. coli</i>	43.3 (36)	45.3 (44)	38.7 (45)
<i>Klebsiella</i> spp.	4.8 (4)	11.3 (11)	5.1 (6)
<i>Enterobacter</i> spp.	24.1 (20)	6.2 (6)	4.3 (5)
<i>Citrobacter</i> spp.	9.6 (8)	9.2 (9)	16.3 (19)

Tabla 9: Perfiles de resistencia a los antibióticos a un panel de antibióticos, por tipo de muestra (suelo, heces de niños y animales) y proporción de cepas aisladas resistentes a múltiples fármacos

	Suelo		Heces de niños		Heces de animales	
	<i>E. coli</i> N= 36	<i>Klebsiella</i> spp. N= 4	<i>E. coli</i> N= 44	<i>Klebsiella</i> spp. N= 11	<i>E. coli</i> N= 45	<i>Klebsiella</i> spp. N= 6
Antibiótico	Resistencia % (N)		Resistencia % (N)		Resistencia % (N)	
Amoxicilina ácido clavulánico	0	25 (1)	0	9.1 (1)	4.4 (2)	0
Ampicilina	11.1 (4)	75 (3)	34.1 (15)	54.5 (6)	11.1 (5)	50 (3)
Aztreonam	0	0	2.3 (1)	0	2.2 (1)	0
Cefotaxima	0	0	0	0	0	0
Cefoxitina	2.8 (1)	25 (1)	0	9.1 (1)	4.4 (2)	0
Cloramfenicol	2.8 (1)	0	4.5 (2)	0	11.1 (5)	0
Ciprofloxacino	5.5 (2)	0	11.4 (5)	0	8.8 (4)	0
Gentamicina	0	0	2.3 (1)	0	0	0
Ácido nalidíxico	5.5 (2)	0	13.6 (6)	0	20 (9)	0

Sulfatrimetroprim	5.5 (2)	0	20.5 (9)	9.1 (1)	11.1 (5)	0
Tetraciclina	25.0 (9)	0	25.0 (11)	9.1 (1)	26.6 (12)	0
Ceftriaxona	0	0	2.3 (1)	0	0	0
Cefepima	0	0	0	0	0	0
Imipenem	0	0	0	0	0	0
RAM a por lo menos un antibiótico ¹	33.3 (12)	75 (3)	52.3 (23)	54.6 (6)	37.7 (17)	50 (3)
MDR ²	2.8 (1)	0 (0)	15.9 (7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

¹La resistencia a los antimicrobianos (RAM) se define como la capacidad de un microorganismo para impedir que un antimicrobiano actúe contra él. Como resultado, los tratamientos estándar se vuelven ineficaces; las infecciones persisten y pueden propagarse a otras personas (5,119).

²La multidrogo resistencia (MDR) se define como la resistencia a (por lo menos un fármaco) en tres o más clases de antibióticos (120).

Muestras de heces de los niños

En la Tabla 8 se observa que 97% de las muestras fueron positivas a coliformes termotolerantes en las heces de los niños, obteniendo 98 aislamientos de bacterias termotolerantes, siendo *E. coli* la más abundante.

Determinamos el perfil fenotípico de RAM para los aislamientos de *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. (Tabla 9). El 52% de todos los aislamientos de *E. coli* mostró resistencia a al menos un antibiótico y el 16% fue MDR. El 55% de los aislamientos de *Klebsiella* spp. mostraron resistencia a al menos un antibiótico.

En los aislamientos de *E. coli* la mayor resistencia fue a ampicilina (34%) y tetraciclina (25%) y en *Klebsiella* spp. la mayor resistencia fue a ampicilina (54%).

Muestra de heces animales

Como se observa en la Tabla 8, el 67% de las muestras de heces animales fueron positivas para coliformes termotolerantes. Obtuvimos un total de 116 aislamientos de bacterias termotolerantes, donde *E. coli* fue la especie más abundante.

En la Tabla 9 vemos los perfiles de resistencia para *E. coli* y *Klebsiella* spp., donde 38% de los aislamientos de *E. coli*, y 50% de los de *Klebsiella* spp. mostraron resistencia a al menos un antibiótico. Ninguno fue MDR.

Perfiles de multidrogo resistencia

Entre los aislamientos de *E. coli* obtenidos de las heces del niño, la fuente de agua de bebida del niño, la fuente principal de agua del hogar y el suelo, el 14% (15/108) eran resistentes (a por lo menos un fármaco) en tres o más clases de antibióticos (120). La mayoría de ellos eran resistentes a ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina, ácido nalidíxico y ciprofloxacino. Solo se identificó un aislamiento de *E. coli* como portador de BLEE (Tabla 10).

Tabla 10: Perfiles MDR de aislamientos de *E. coli* de distintas fuentes

Origen	MDR	Clase de antimicrobiano**
Agua bebida niño	AMP, TE y C	Penicilinas, tetraciclinas, anfenicoles
Agua bebida niño	SXT, TE, C	Sulfonamidas, tetraciclines, quinolonas
Agua bebida niño	NA, CIP y TE	Quinolonas, fluoroquinolonas, tetraciclinas
Agua bebida niño*	AMP, CTX, CRO, FEP, NA, CIP, TE, C y CN	Penicilinas, cefalosporinas de 3ra y 4ta generación, quinolonas, tetraciclinas, anfenicoles, aminoglucósidos

Fuente agua del hogar	NA, TE, C y CN	Quinolonas, tetraciclinas, anfenicoles, aminoglucósidos
Fuente agua del hogar	NA, CIP, SXT, TE, C	Quinolonas, sulfonamidas, tetraciclinas
Fuente agua del hogar	AMP, SXT, TE	Penicilinas, quinolonas, tetraciclinas
Suelo	AMP, NA, CIP, SXT, TE, C	Penicilinas, quinolonas, fluoroquinolonas, sulfonamidas, tetraciclinas, anfenicoles
Heces de niño	AMP, NA, CIP, SXT, TE y CN	Penicilinas, quinolonas, fluoroquinolonas, sulfonamidas, tetraciclinas, aminoglucósidos
Heces de niño	AMP, SXT, TE	Penicilinas, sulfonamidas, tetraciclinas
Heces de niño	AMP, TE, C	Penicilinas, tetraciclinas, anfenicoles
Heces de niño	AMP, SXT, TE	Penicilinas, sulfonamidas, tetraciclinas
Heces de niño	CRO, CIP, SXT	Cefalosporinas de 3ra generación, fluoroquinolonas, sulfonamidas
Heces de niño	AMP, SXT, TE	Penicilinas, sulfonamidas, tetraciclinas
Heces de niño	AMP, NA, CIP, SXT, TE	Penicilinas, quinolonas, fluoroquinolonas, sulfonamidas, tetraciclinas

AMP: ampicilina, STX: trimetoprim-sulfametoxazol, NA: ácido nalidíxico, TE: tetraciclina, CIP: ciprofloxacino, C: cloranfenicol, CN: gentamicina, CTX: cefotaxima, FEP: cefepima and CRO: ceftriaxona

* Aislado de *E. coli* BLEE, **de acuerdo a la clasificación de clases de antimicrobianos de la OMS (121)

Detección de genes de resistencia BLEE

Identificamos dos aislamientos bacterianos que portaban genes BLEE. Uno era un aislamiento de *E. coli* de una muestra de agua y el otro era una *Shigella* spp. obtenida de una muestra fecal de perro. El aislamiento de *E. coli* portaba los genes *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M-U}* y *bla_{CTX-M-8}*; y el aislado de *Shigella* spp. llevaba los genes *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M-U}* y *bla_{CTX-M-3}*, como se muestra en el Anexo C.

c. Artículo 3: *Whole-Genome Characterisation of ESBL-Producing E. coli Isolated from Drinking Water and Dog Faeces from Rural Andean Households in Peru*

METODOLOGÍA

Zona y diseño del estudio

La zona de estudio es la misma zona rural andina de región de Cajamarca, donde se realizó el estudio de Hartinger et al. (122), para explorar las rutas de diseminación de la RAM en humanos, animales y ambiente. En dicho estudio, se muestrearon 40 hogares obteniendo muestras de heces humanas, de heces animales, de agua de consumo y de suelo. Los dos aislamientos BLEE utilizados en este estudio provienen de dos de los 40 hogares ya mencionados, originándose de una muestra de heces de perro y de una muestra de agua de bebida, como se muestra en el Anexo D.

Características de los hogares

Hartinger et al. encontraron solo dos aislamientos positivos a BLEE, uno de las heces un perro y otro de la fuente de agua de bebida, correspondiendo a dos diferentes hogares (122). En éstos, los animales vagaban libremente en la cocina y el patio, observándose sus heces en ambas áreas. Ambos hogares estaban conectados al sistema público de distribución de agua, pero no poseían sistema de desagüe, solo contaban con letrinas.

Identificación microbiológica y pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos

La identificación microbiológica y las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos se realizaron mediante el sistema automatizado VITEK® 2 Compact (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia), utilizando una tarjeta de reactivos colorimétricos (GN) para identificar los bacilos gram negativos fermentadores y no fermentadores, así como tarjetas AST-N249 de sensibilidad a los antimicrobianos, según las instrucciones del fabricante. Registramos las concentraciones mínimas inhibitorias para los siguientes antimicrobianos: ampicilina/sulbactam (SAM), piperacilina/tazobactam (TZP), cefazolina (CFZ), cefuroxima (CXM), cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ), cefepima (FEP), ertapenem (ETP), imipenem (IPM), meropenem (MEM), amikacina (AMK), gentamicina (GEN), ciprofloxacino (CIP), colistina (CST) y tigeciclina (TGC).

Hartinger et al. (122) realizaron pruebas de susceptibilidad a otros antimicrobianos, según se describe en Métodos para el artículo 2.

Identificación fenotípica y molecular de la capacidad de producción de BLEE

Los procedimientos para la identificación y confirmación fenotípica de producción de BLEE de los aislamientos (con los siguientes antibióticos: aztreonam, ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona, amoxicilina/ácido clavulánico y cefepima), así como la confirmación molecular por PCR convencional se describieron previamente en la sección de Métodos para el artículo 2.

Secuenciamiento del genoma y análisis bioinformático

El ADN genómico se extrajo de los cultivos utilizando el kit de purificación de ADN genómico GeneJET (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.), según las instrucciones del fabricante. La concentración de ADN se evaluó mediante el fluorómetro Qubit® 4.0 (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.). La biblioteca genómica se construyó utilizando un kit de preparación de biblioteca de ADN Nextera XT (Illumina, Inc., San Diego, CA, EE. UU.) y posteriormente se secuenció en una plataforma MiSeq (Illumina). El control de calidad de cada secuencia se evaluó utilizando Fastqc v0.11.5 (123) y Trimmomatic v0.38 (124). Las lecturas se ensamblaron *de novo* utilizando SPAdes v.3.15.2 (125). El análisis bioinformático se realizó usando las herramientas del Centro de Epidemiología Genómica (www.genomicepidemiology.org), fijando la identidad en $\geq 90\%$ y la cobertura en $\geq 90\%$.

Realizamos serotipificación de *E. coli* (SerotypeFinder v.2.0), tipificación filogenética in silico (ClermonTyping (<https://github.com/A-BN/ClermonTyping>),

tipificación de secuencia multilocus (MLST v. 2.0), patogenicidad (Pathogen Finder v.1.1), detección de genes de virulencia (VirulenceFinder v.2.0), tipificación de replicones de plásmidos (PlasmidFinder v.2.1 y MobileElementFinder v.1.0) y detección de genes BLEE utilizando ABRicate v.1.0.1 (<https://github.com/tseemann/abricate>), para la base de datos NCBI (Bacterial Antimicrobial Resistance Reference Gene Data Base) y ResFinder, además de AMRFinderplus. Los genes de resistencia comunes para las tres herramientas se muestran en el Anexo E.

Las lecturas sin procesar de Illumina se cargaron en GenBank bajo BioProject PRJNA816508 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA816508/>).

RESULTADOS

Identificación microbiológica y pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de los aislamientos de *E. coli*

Para este análisis, solo se incluyeron los dos aislamientos fenotípicamente y genotípicamente positivos de BLEE obtenidos en el estudio de Hartinger et al (122), uno de heces de perro (aislamiento 1143) y otro de la fuente de agua de bebida (aislamiento 1144). Ambos se identificaron como cepas de *E. coli* (93 % y del 96 % de probabilidad) mediante el sistema automatizado VITEK®2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) y confirmados posteriormente mediante el secuenciamiento a genoma completo.

Según el sistema VITEK®2, ambos aislamientos resultaron resistentes a SAM (efecto combinado); a las cefalosporinas CFZ, CXM y CTX; TZP (combinación de β -lactámico/inhibidor de β -lactamasa); y MEM (un carbapenem). Comparamos las

lecturas de VITEK®2 para la susceptibilidad a los antimicrobianos con los resultados del ensayo de difusión en disco, como se muestra en el Anexo F. Cabe mencionar que el aislamiento 1144 mostró resistencia al FEP por el método de difusión en disco, contrario a los resultados obtenidos por VITEK®2. El sistema VITEK®2 identificó al aislado 1143 como productor de BLEE, mientras que al aislado 1144 lo identificó como BLEE negativo.

Detección de genes BLEE mediante PCR y análisis de secuenciación a genoma completo

La detección de los genes que codifican β -lactamasas más comunes (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA} y *bla*_{CTX-M}) se llevó a cabo mediante PCR. Ambos aislamientos mostraron amplificación sólo de genes *bla*_{TEM} y *bla*_{CTX-M}. El análisis del secuenciamiento a genoma completo utilizando Resfinder y NCBI identificó la presencia de genes que codifican resistencia a cefalosporinas (*bla*_{CTX-M-8}, *bla*_{CTX-M-55}, *bla*_{EC-15}), β -lactamasas de amplio espectro (*bla*_{TEM-1}), tetraciclinas (*tet*(B), *tet*(M)), aminoglucósidos (*aac*(3)-*Iid*, *aph*(3')-*Iia*, *aph*(3'')-*Ib*, *aph*(6)-*Id*, *aadA1* y *aadA2*), sulfonamidas (*sul3*), fenicoles (*floR*, *cmlA1*), fosfomicina (*fosA3*), quinolona (*qnrB19*) y trimetoprima (*dfrA12*) (Tabla 11). La resistencia genotípica de ambos aislamientos se correlacionó con su resistencia fenotípica, excepto para MEM.

Tabla 11. Caracterización de aislamientos de *E. coli* productores de BLEE según origen y fuente, tipo de secuencia y complejo clonal, serotipo, genes de virulencia, fenotipo de resistencia y genotipo.
y tipo de plásmido.

ID de aislados	Fuente	ST/CC	Serotipo	Filogrupo	Genes de virulencia	Fenotipo de resistencia	Genotipo de resistencia	Tipo de plásmido
1143	Heces de perro	5259/-	:-H46	E	<i>astA</i> , <i>chuA</i> , <i>cia</i> , <i>gad</i> , <i>ompT</i> , <i>terC</i>	SAM, TZP, KZ, CXM, CTX, CAZ, FEP, MEM, SXT	<i>aac(3)-IId</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-Id</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>floR</i> , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{EC-15} , <i>bla</i> _{CTX-M-8} , <i>tet(M)</i> , <i>tet(B)</i> <i>dfrA12</i>	Inc11-IAAlpha, IncR, IncFIB(AP00 1918), IncFIC(FII)
1144	Agua de bebida	227/10	O9:H10	A	<i>capU</i> , <i>cea</i> , <i>cia</i> , <i>fyuA</i> , <i>iutA</i> , <i>sitA</i> , <i>irp2</i> , <i>iron</i> , <i>terC</i>	SAM, TZP, KZ, CXM, CTX, MEM, CN, CIP	<i>aph(3')-IIa</i> , <i>cmlA1</i> , <i>bla</i> _{CTX-M-55} , <i>bla</i> _{EC-15} , <i>fosA3</i> , <i>qnrB19</i> , <i>sul3</i> , <i>tet(B)</i>	IncFIB, Col440I, IncFII, Inc11- IAAlpha, IncFII(pHN7 A8)

Abreviaturas: CC, complejo clonal; ST, secuenciotipo. Fenotipo de resistencia: SAM, ampicilina/sulbactam; TZP: piperacilina/tazobactam; KZ, cefazolina; CXM: cefuroxima; CTX, cefotaxima; CAZ, ceftazidima; FEP, cefepima; MEM: meropenem; SXT, trimetoprima/sulfametoxazol; CN, gentamicina; CIP, ciprofloxacino.

El análisis genómico utilizando MLST 2.0 indicó que los aislamientos de *E. coli* 1143 y 1144 pertenecían a los secuenciotipos (ST) 5259 y 227, respectivamente, y

el aislado 1144 pertenecía al complejo clonal (CC) 10. Según el análisis utilizando la herramienta *ClermontTyping*, los aislamientos 1143 y 1144 correspondieron a los grupos filogenéticos E y A, respectivamente. Utilizando *SerotypeFinder* v.2.0, el aislado 1143 correspondía al serotipo -:H46, mientras que el aislado 1144 pertenecía al serotipo O9:H10 (Tabla 11).

Patogenicidad, genes de virulencia y tipos de plásmidos

Utilizando *Pathogenfinder* 1.1 y *VirulenceFinder* 2.0, ambos aislamientos se identificaron como probables patógenos humanos. Se detectaron en total 28 genes de virulencia diferentes en ambos genomas. El gen de virulencia colicina ia (*cia*) se detectó en ambos aislamientos. Otros genes de virulencia incluyeron: *astA*, *iroN*, *chuA*, *gad*, *ompT*, *capU*, *cea*, *fyuA*, *sitA*, *irp2* *iutA* y *terC*. El gen *astA* se halló solo en el aislado 1143.

Utilizando *PlasmidFinder* 2.1 y *MobileElementFinder* 1.0, se detectaron cuatro plásmidos para el aislado 1143, IncR (albergando genes de resistencia a aminoglucósidos, *aph(3'')*-*Ib* y *aph(6)*-*Id*), IncFIC(FII) (albergando el gen *floR* de resistencia al cloranfenicol/florfenicol), IncI1 (portando el gen de virulencia *cia*) e IncFIB (AP001918). Por otro lado, para el aislado 1144, se identificaron cinco plásmidos, Col(pHAD28) (portando el gen de resistencia al ciproflaxacino *qnrB19*), IncFII, IncFII(pHN7A8), IncI1 e IncFIB(AP001918).

IV. DISCUSIÓN

Se identificó la contribución humana, animal y ambiental en la diseminación de la RAM en zonas rurales de LAC y los vacíos de información en la literatura, usando la perspectiva de UNA SALUD. Asimismo, se determinó la prevalencia de bacterias con RAM que se encuentran en humanos (niños), animales, y ambiente (agua y suelo), y se caracterizaron los aislamientos productores de BLEE, provenientes de muestras de animales y de agua de bebida de hogares rurales andinos de Cajamarca, en base al enfoque integrado de UNA SALUD. Este trabajo ahonda en lo encontrado inicialmente por Gil et al. (75) y Hartinger et al. (78), y complementa los pocos trabajos que estudian la diseminación RAM en zonas rurales andinas en Perú con una aproximación de UNA SALUD (60,71). En base a lo reportado por Larson et al (71) se demostró la alta prevalencia de contaminación fecal en agua de bebida en esta zona y la presencia de cepas con RAM y MDR; si bien ellos hicieron estudios moleculares mediante PCR, para amplificar genes BLEE, no secuenciaron los genomas.

Esta investigación doctoral aporta nuevas luces sobre la diseminación de la RAM en la zona de estudio, permitiendo entender mejor la complejidad de las vías de diseminación de la RAM y su interconexión (122,126), y confirmando la presencia de enterobacterias termotolerantes con diversos perfiles de RAM, algunas BLEE y/o MDR no sólo en agua de bebida, sino en todas las muestras: ambientales, humanas y animales (122). Finalmente, este trabajo caracterizó el tipo de bacterias termotolerantes positivas a BLEE aisladas de heces de animal doméstico y de agua de bebida mediante el secuenciamiento de sus genomas, lo cual permitió entender el riesgo que estas bacterias representan para estas comunidades rurales de bajos

recursos, dado que ambos aislamientos de *E. coli* eran patógenos humanos potenciales, mostraban resistencia fenotípica y genotípica a BLEE así como otros grupos de antibióticos, además de una alarmante resistencia fenotípica a los carbapenems (127).

La revisión sistemática exploratoria de la literatura (Anexo G) usó el enfoque UNA SALUD para identificar las contribuciones de animales, humanos y ambiente en la RAM en áreas rurales de Latinoamérica. Las actividades antropogénicas como la agricultura y la crianza de animales (aves de corral principalmente) fueron identificados como los principales factores humanos impulsores de la diseminación de la RAM en Latinoamérica. El ambiente contribuyó a la RAM principalmente a través del agua contaminada por materia fecal de animales portadores de determinantes de RAM; suelo, sedimentos acuícolas también aportaron (126) así como factores asociados al hogar (60,71). La contribución animal a la RAM se dio principalmente a través de la transferencia o acarreo de bacterias RAM por los animales de granja y el uso inadecuado de antimicrobianos de uso veterinario (126), siendo este último un factor impulsor de la RAM en animales y a la larga en seres humanos (128). Esto concuerda con lo reportado en recientemente en Chile y en otros países y regiones del mundo (129–131), agregándose otras fuentes y vías de diseminación dependiendo de si la zona es rural, urbana (e.g. animales de compañía), o periurbana (e.g. botaderos). La mayor parte de los estudios incluidos por lo general no plantearon una interconexión entre las vías de diseminación de la RAM, debido a que estudiaron el problema bajo un solo punto de vista: transmisión animal, o ambiental. Por otro lado, la mayoría de los estudios incluidos propusieron vías de diseminación de la RAM unidireccionales, generalmente desde los animales

al ambiente, y no consideraron rutas simultáneas entre cualquiera de los reservorios (animales, humanos o ambientales) donde la diseminación se dé en ambas direcciones opuestas (126). Casi la mitad de los estudios (incluyendo a todos los estudios de la actualización) discutieron la contribución concomitante de animales, humanos y el ambiente en la generación de la RAM (85,86,94–96),sin embargo únicamente dos estudios tomaron en cuenta los tres componentes del enfoque de UNA SALUD en su esquema de muestreo (47,106). Solo uno de ellos (47) demostró la existencia de una red de vías de diseminación interrelacionadas entre sí debido a las interacciones entre humanos, animales y el ambiente. Asimismo, en base a las vías de diseminación individuales propuestas en dichos trabajos, nosotros planteamos una red integrada de rutas de diseminación (126), que luego fue la base para explicar y aportar evidencia para las vías de diseminación propuestas en el segundo artículo para Cajamarca rural (Figura 3). Considerando las limitaciones inherentes a los estudios transversales (que fueron la totalidad), la evidencia científica más robusta para identificar vías de diseminación de la RAM provino de aquellos estudios que combinaron métodos moleculares y métodos de detección de resistencia fenotípica, junto con un sólido diseño y plan de muestreo, así como una perspectiva integrada de UNA SALUD. Resalta el estudio integral de Pehrsson et. al (47), al usar métodos microbiológicos y genómicos, para estudiar comunidades microbianas, en humanos, animales y ambiente. Recientemente en Perú, Santos, (132), en su tesis doctoral usó métodos microbiológicos, secuenciamiento a genoma completo y análisis bioinformático, para determinar el resistoma de poblaciones bacterianas provenientes de fuentes humanas, animales y ambientales en dos regiones distintas del Perú, sin embargo, no aplicó el marco de UNA SALUD en el

plan muestreo para cada región. Santos (132) consideró efluentes hospitalarios y comunitarios urbanos en su análisis descubriendo que las bacterias estaban relacionadas genéticamente, siendo mayor la MDR en efluentes hospitalarios. Cabe mencionar que en los estudios incluidos en el *scoping review* no hubo representación de efluentes de hospitales rurales, siendo un vacío de información, además pocos trabajos se enfocaron en la contribución fecal humana a la RAM (47,79,83,92,105,106). La contribución de la vida silvestre, así como de la minería, en la generación y diseminación de la RAM, fueron también vacíos de información. Fue notoria la escasa contribución de estudios cualitativos (126). Finalmente, cabe resaltar que fue preocupante hallar tan pocos estudios enfocados en la RAM en nuestra región que consideren la perspectiva de UNA SALUD en sus diseños y planes de muestreo, y probablemente se deba a que existen varias barreras para aplicarlo. Para poder implementarlo se requiere de colaboración entre profesionales de carreras diferentes, que trabajan en diversas instituciones (incluso en diferentes países) con distintas misiones, prioridades y financiamiento, con el fin de que investiguen juntos. Esto presenta muchos retos: dificultad para establecer colaboraciones multisectoriales a diferentes niveles, así como en relación al financiamiento y al personal entrenado y calificado, que suelen ser más disponibles para proyectos en salud humana y mucho menor en salud animal o ambiental, siendo más notorio en países en vías de desarrollo (133,134).

Para nuestro segundo artículo (Anexo H), tomamos en cuenta las limitaciones de diseño de los estudios incluidos en el *scoping review*, lo que nos permitió aplicar un enfoque integrado en el diseño del plan de muestreo y recojo de información

en campo. Usamos métodos epidemiológicos y microbiológicos en hogares rurales andinos de Cajamarca, con los que determinamos prevalencias de RAM en niños, animales y ambiente, y brindamos evidencia descriptiva para las rutas críticas de diseminación de la RAM, demostrando su interconexión para animales, humanos y ambiente (122), como se muestra en la Figura 3. A pesar de que es una zona altoandina rural y bastante aislada encontramos una alta prevalencia de enterobacterias RAM y MDR (principalmente *E. coli*) en niños, suelo de los hogares, y agua, tanto de reservorio como de bebida. Para todas las muestras, la prevalencia de resistencia a al menos un antibiótico en los aislamientos de *E. coli* y *Klebsiella* spp. fue de casi el 43% y la prevalencia de MDR en los mismos aislamientos fue de casi el 9%, sin embargo, este último casi se duplicó en las heces de los niños. Asimismo, casi la mitad de las muestras de agua de bebida en los hogares tuvieron contaminación fecal con una alta prevalencia de *E. coli* MDR, apuntando a una re-contaminación en el hogar, a la presencia de animales en áreas habitables y/o prácticas ineficientes de higiene, lo que otro estudio en la zona corrobora (60). Observamos también, una relación entre los perfiles de RAM hallados en heces de animales, heces de niños y muestras de agua con los tratamientos antimicrobianos más usados en la zona, oxitetraciclina en animales y ampicilina en niños. Esto indicaría una contaminación fecal proveniente de heces animales y heces de niños diseminada al agua de bebida y de reservorio (122), vinculada con la correcta aplicación de procesos de tratamiento del agua potable y su control de calidad microbiológica, los cuales están a cargo de organizaciones comunales, las Juntas Administradoras de Servicios de Saneamiento (JASS), que a nivel nacional tienen bajos niveles de capacitación técnica (50). La alta

prevalencia de RAM y MDR en *E. coli* de origen comunitario ha sido también reportada por Alcedo et al. en niños de zonas rurales de Moyobamba (135). Por otro lado, el estudio de Benavides et al. demostró que, en ganado vacuno en zonas rurales de Lima, también existe una alta prevalencia de *E. coli* MDR BLEE, los cuales son compartidos con animales silvestres (136). Respecto a prevalencias de RAM en enterobacterias en suelo agua u otras muestras ambientales, no hemos encontrado otros reportes en distintas zonas rurales del Perú, excepto nuestro propio estudio (122) y las investigaciones previas realizados en la misma zona (60,71). Se necesitan hacer estudios que amplíen la información que nosotros hemos aportado en relación a la diseminación de la RAM en fuentes ambientales rurales, prestando atención a bacterias MDR BLEE. Estudios como el de Igbnosa et al. (137) en Nigeria, donde se analizaron muestras de suelo agrícola, agua de regadío, bosta de animales y productos agrícolas vegetales serían muy necesarios en nuestro país, donde la vigilancia ambiental y animal no incluye bacterias con RAM. Finalmente, la amplificación molecular de genes BLEE específicos mediante PCR solo arrojó dos cepas portadoras de genes BLEE, un aislamiento de *E. coli* de una muestra de agua (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-U}, and *bla*_{CTX-M-8}) y uno de *Shigella* spp. de una muestra fecal de perro (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-U}, and *bla*_{CTX-M-3}).

A partir de ambos aislamientos bacterianos con genes BLEE (122), logramos su caracterización a genoma completo y realizamos el análisis bioinformático (127), además de verificar y confirmar su identidad, y determinar sus perfiles de resistencia a antibióticos adicionales a los ya testeados en el estudio de Hartinger et al. (122). En el tercer artículo (Anexo I), los aislamientos 1143 (perro) y 1144

(agua) se confirmaron como *E. coli*; siendo *E. coli* 1143 una cepa atípica, no fermentadora de lactosa, la cual había sido reportada como *Shigella* spp. inicialmente (122). Las cepas lactosa-negativas de *E. coli* son muy parecidas a *Shigella* spp., siendo difíciles de distinguir entre si mediante las pruebas bioquímicas usadas comúnmente (138,139). Cabe resaltar que las *E. coli* lactosa-negativas son usualmente enteroinvasivas (EIEC), produciendo en humanos una diarrea de tipo disentérico (138). Ambos aislamientos, 1143 y 1144, eran patógenos humanos potenciales, con serotipos -:H46 y O9:H10, respectivamente; siendo el serotipo O9:H10 asociado a cepas de *E. coli* enteroagregativa (EAEC) en otros países de la región (140,141). El aislado 1143 y el aislado 1144 pertenecían a los filogrupos E y A, respectivamente. *E. coli* del filogrupo E son infrecuentes, y las cepas virulentas/resistentes de este filogrupo están asociadas con humanos (142). Mayormente, las cepas del filogrupo A son comensales humanos encontrándose en aguas residuales (143) así como en animales, especialmente aves de corral (144). Por lo tanto, el hallazgo de esta cepa de *E. coli* BLEE del filogrupo E en heces de perro daría más peso a la ruta de transmisión desde humanos al animal; mientras que el aislado 1144 podría estar conectada con diversas vías de diseminación (Anexos) que llevan a la contaminación del agua de bebida de la zona, particularmente con origen fecal humano o animal (122).

Los aislamientos 1143 y 1144 pertenecían a secuenciotipos y complejos clonales diferentes, ST/CC 5259/- y 227/10 (127), indicando que no comparten la misma combinación específica de alelos y que tienen orígenes y linajes muy distintos (145).

Ambos aislamientos acarreaban diversos genes de virulencia, sin embargo, la cepa 1143 es particularmente preocupante porque codificaba el gen para la producción de la toxina termoestable EAST1(127). Esta toxina induce diarrea en humanos y animales (146), siendo un peligro potencial para brotes de enfermedades diarreicas en esta zona rural, especialmente por el particular perfil de resistencia de la cepa. Ambos aislamientos se confirmaron como *E. coli* productores de BLEE, portando los genes *bla*_{EC-15}, *bla*_{CTX-M-8} y *bla*_{CTX-M-55} en sus genomas (127). Resalta el gen *bla*_{EC-15}, dado que codifica una β -lactamasa tipo AmpC (147); éstas no son inhibidas por el ácido clavulánico u otros inhibidores de β -lactamasas (148). Sin embargo, la resistencia al ácido clavulánico no se testeó fenotípicamente. A la vez, eran resistentes fenotípicamente al meropenem —pero no albergaban genes de carbapenemasas—; y portaban genes de resistencia a otros grupos de antibióticos en sus genomas o plásmidos (127). Los plásmidos son clave en la diseminación horizontal de genes RAM y de virulencia (149). Uno de los plásmidos asociados comúnmente a la diseminación de genes BLEE en enterobacterias, IncI1, fue hallado en ambos aislamientos, mientras que para *E. coli* 1144, el gen de resistencia a ciprofloxacino (*qnrB19*) estaba en el plásmido Col440I; asociado con genes de carbapenemasas y BLEE en enterobacterias (150). Esta evidencia apunta a una transferencia horizontal de la RAM en la zona de estudio. Finalmente, estos perfiles de resistencia son un riesgo de salud pública y tienen gran importancia clínica dado que tanto la resistencia combinada al ácido clavulánico y a los carbapenems, complican y reducen las opciones de tratamiento (151), y son aún más preocupantes en un contexto geográfico aislado como el de zonas altoandinas en Cajamarca.

Este trabajo presenta varias fortalezas y limitaciones. A la fecha es uno de los pocos en Perú, que intenta explicar cómo se disemina la RAM en zonas andinas rurales con un enfoque integrado UNA SALUD. Al estudiar intencionalmente hogares previamente identificados como positivos a RAM en la zona de estudio, sesgamos nuestras estimaciones y estas serían mayores de lo que podría esperarse en la comunidad promedio; sin embargo, dicha estrategia nos permitió identificar las vías de diseminación existentes en la zona, más no pudimos establecer cuales aportaban más a la RAM, porcentualmente. Es probable que, en comunidades menos contaminadas, estas vías de diseminación también existan, pero sean difíciles de detectar. Asimismo, por restricciones y limitaciones de laboratorio, no pudimos realizar la comprobación de la transferencia horizontal de determinantes RAM a través de plásmidos mediante ensayos de conjugación en bacterias, ni la confirmación fenotípica para β -lactamasas AmpC, patogenicidad y/o producción de toxina EAST1. Asimismo, el reducido número de aislamientos disponibles para su caracterización probablemente redujo las posibilidades de identificar otros genes de virulencia y de RAM circulantes en la zona.

V. CONCLUSIONES

Este trabajo exploró la contribución de las personas, los animales de granja y el ambiente a la RAM en la América Latina rural, usando el enfoque UNA SALUD, y se identificaron los vacíos de información respecto a la propagación de la RAM y los factores que la impulsan, siendo éstos contribuciones animales, antropogénicas y ambientales. Los vacíos de información hallados son la vida silvestre, el uso de pesticidas, efluentes industriales y de centros salud. En base a estos hallazgos, aplicamos un esquema de muestreo y recojo de información para calcular la prevalencia de bacterias de origen fecal con RAM en humanos, animales, agua potable, agua de bebida y de reservorio, así como en ambientes del hogar en zonas rurales de Cajamarca, siendo dicha prevalencia elevada para RAM y MDR en todas las muestras. Finalmente, caracterizamos a genoma completo los dos aislamientos de bacterias BLEE, los cuales fueron dos cepas potencialmente patógenas con linajes distintos de *E. coli* BLEE resistentes al meropenem que acarreaban genes de resistencia a β -lactamasas AmpC y otros genes de resistencia a otros antibióticos.

Asimismo, propusimos una red integral que incluye la contribución de animales, de las personas y el ambiente en las rutas de diseminación de la RAM en entornos rurales de Latinoamérica, y aportamos evidencia para las vías críticas en Cajamarca. Así, demostramos la interconexión existente entre la transmisión animal, humana y ambiental de la RAM, y la necesidad del enfoque UNA SALUD, el cual debe ser central en las políticas públicas sanitarias.

Se concluye que la presencia de *E. coli* BLEE resistentes a los carbapenems en la zona podría explicarse por el uso incorrecto de antibióticos tanto en humanos como

en animales, la convivencia de espacios habitables entre humanos y animales, y el uso de agua contaminada en la zona. Aunque este estudio arrojó información sobre los antibióticos más usados en la zona, los que guardan relación con los perfiles de RAM en animales y en niños, no investigamos de manera profunda el uso de antimicrobianos tanto en humanos como en animales. Futuros estudios deberían abordar este aspecto usando métodos mixtos que permitan una comprensión de los conocimientos, actitudes y prácticas con relación al uso de antibióticos y la RAM. A pesar de que encontramos evidencia descriptiva que da fuerza a las rutas críticas de propagación de la RAM en Cajamarca rural, serían necesarios futuros estudios que cuantifiquen cuanto aporta cada vía a la RAM y que además permitan demostrar causa y efecto. Asimismo, nuestro estudio abre nuevos caminos de investigación para explorar otras rutas para las que no pudimos obtener evidencia, tales como el impacto sobre la RAM de la acuicultura local, la fauna silvestre, el uso de pesticidas, las descargas comunitarias de desechos humanos y las provenientes de centros de salud y de origen industrial.

Asimismo, al enfocar este trabajo en enterobacterias productoras de BLEE, no se buscó desde un principio aislar otras enterobacterias de importancia para la salud pública que podrían estar presentes en estas comunidades rurales, como aquellas resistentes a la colistina y/o a los carpanems, por lo que estos temas representan nuevos caminos de investigación que necesitan ser explorados en la zona.

RECOMENDACIONES

Finalmente, sabiendo que el agua potable en zonas rurales de Cajamarca acarrea bacterias con RAM de origen fecal, se recomienda verificar la implementación de los programas destinados a la mejora la calidad microbiológica del agua potable en zonas rurales andinas, abarcando todas las etapas desde su origen, pasando por el almacenamiento en reservorios, potabilización hasta llegar a su distribución y manejo en los hogares. En paralelo, es preciso implementar sistemas de saneamiento (instalando servicios higiénicos con sistema de agua y alcantarillado, con posterior tratamiento de esas aguas residuales), para reducir la diseminación ambiental de coliformes fecales con RAM de origen humano. Actualmente, el Plan Nacional de Saneamiento 2022-2026 (50), busca reducir brechas en la cobertura y eficiencia de los servicios de saneamiento y agua potable. Sin embargo, aún no se ha hecho público un reporte preliminar que mencione el avance o la efectividad de dicho plan, particularmente en poblaciones rurales, donde está la mayor brecha. Por otro lado, recomendamos la implementación de políticas públicas que incorporen el sistema de vigilancia integrado *GLASS-One Health* propuesto por la OMS, en vista del avance de la RAM y el hallazgo de enterobacterias MDR BLEE de origen ambiental y animal con potencial patógeno en poblaciones alejadas y vulnerables.

VI. REFERENCIAS

1. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance [Internet]. World Health Organization, editor. 2014. 1–256 p. Available from: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/surveillancereport/en/>
2. World Health Organization. Global Action Plan on Antimicrobial Resistance [Internet]. Geneva, Switzerland: WHO; 2015. Available from: www.paprika-annecy.com
3. Nadimpalli M, Delarocque-Astagneau E, Love DC, Price LB, Huynh BT, Collard JM, et al. Combating Global Antibiotic Resistance: Emerging One Health Concerns in Lower- and Middle-Income Countries. *Clinical Infectious Diseases* [Internet]. 2018 Mar 5 [cited 2023 Aug 10];66(6):963–9. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/cid/cix879>
4. O’Neill J. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations [Internet]. 2014 Dec [cited 2023 Aug 10]. Available from: <https://wellcomecollection.org/works/rdpck35v>
5. World Health Organization. Antimicrobial resistance [Internet]. 2021 [cited 2022 Jun 8]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
6. World Health Organization. Critically Important Antimicrobials for Human Medicine [Internet]. 6th revision. Geneva; 2019 [cited 2023 Nov 22]. 1–52 p. Available from: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/312266/9789241515528-eng.pdf?ua=1>
7. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization, International Office of Epizootics. Joint FAO/WHO/OIE Expert Meeting on Critically Important Antimicrobials [Internet]. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2008 [cited 2023 Nov 22]. 1–67 p. Available from: <https://www.fao.org/3/i0204e/i0204e.pdf>
8. Calvo J, Martínez-Martínez L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2009 Jan [cited 2023 Nov 22];27(1):44–52. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-pdf-S0213005X08000177>
9. Hall JPJ, Brockhurst MA, Harrison E. Sampling the mobile gene pool: Innovation via horizontal gene transfer in bacteria. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [Internet]. 2017 Dec 5 [cited 2023 Nov 22];372(1735). Available from: <https://royalsocietypublishing.org/doi/epdf/10.1098/rstb.2016.0424>
10. C Reygaert W. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol* [Internet]. 2018 Jun 26;4(3):482–501. Available from: <http://www.aimspress.com/article/10.3934/microbiol.2018.3.482>
11. Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2018;31(4):1–61. Available from: <https://doi.org/10>
12. Sheppard AE, Stoesser N, Wilson DJ, Sebra R, Kasarskis A, Anson LW, et al. Russian doll-like genetic mobility drives rapid dissemination of the carbapenem resistance gene *bla*kpc. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2016 [cited

- 2023 Nov 26];60(6). Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4879409/>
13. Pan American Health Organization, Florida International University. Recommendations for Implementing Antimicrobial Stewardship Programs in Latin America and the Caribbean: Manual for Public Health Decision-Makers [Internet]. PAHO, FIU, editors. Washington, D.C.; 2018 [cited 2023 Aug 15]. 1–144 p. Available from: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/49645>
 14. Rousham EK, Unicomb L, Islam MA. Human, animal and environmental contributors to antibiotic resistance in low-resource settings: Integrating behavioural, epidemiological and one health approaches. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* [Internet]. 2018 Apr 11 [cited 2023 Aug 16];285(1876). Available from:
<https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rspb.2018.0332>
 15. Arenas NE, Melo VM. Producción pecuaria y emergencia de antibiótico resistencia en Colombia: Revisión sistemática Livestock production and emergency antibiotic resistance in Colombia: Systematic review. *Infectio* . 2018;22(2):110–9.
 16. Singer AC, Shaw H, Rhodes V, Hart A. Review of antimicrobial resistance in the environment and its relevance to environmental regulators. *Front Microbiol* [Internet]. 2016 Nov 1 [cited 2023 Aug 16];7(NOV). Available from:
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.01728/full>
 17. Hoelzer K, Wong N, Thomas J, Talkington K, Jungman E, Coukell A. Antimicrobial drug use in food-producing animals and associated human health risks: What, and how strong, is the evidence? *BMC Vet Res* [Internet]. 2017 Jul 4 [cited 2023 Aug 16];13(1). Available from:
<https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-017-1131-3>
 18. Hoelzer K, Wong N, Thomas J, Talkington K, Jungman E, Coukell A. Antimicrobial drug use in food-producing animals and associated human health risks: What, and how strong, is the evidence? *BMC Vet Res*. 2017;13(1):1–38.
 19. Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States [Internet]. Atlanta, Georgia; 2019 Nov. Available from:
<https://stacks.cdc.gov/view/cdc/82532>
 20. World Health Organization. Guidelines for Drinking-water Quality: fourth edition incorporating the first addendum. Geneva, Switzerland; 2017.
 21. Zhu Y, Huang WE, Yang Q. Clinical Perspective of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *Infect Drug Resist* [Internet]. 2022 [cited 2023 Nov 1];15:735–46. Available from: <https://www.dovepress.com/clinical-perspective-of-antimicrobial-resistance-in-bacteria-peer-reviewed-fulltext-article-IDR>
 22. Peirano G, Pitout JDD. Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: Update on Molecular Epidemiology and Treatment Options [Internet]. Vol. 79, *Drugs*. Springer International Publishing; 2019 [cited 2023 Nov 2]. p. 1529–41. Available from:
<https://link.springer.com/article/10.1007/s40265-019-01180-3>
 23. Rawat D, Nair D. Extended-spectrum β -lactamases in gram negative bacteria. *J Glob Infect Dis*. 2010;2(3):263.
 24. Guzmán-Blanco M, Casellas JM, Silva Sader H. Bacterial resistance to antimicrobial agents in Latin America: The giant is awakening. *Infect Dis Clin North Am*. 2000;14(1).

25. Galindo-Méndez M. Caracterización molecular y patrón de susceptibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli* productora de β -lactamasas de espectro extendido en infección del tracto urinario adquirida en la comunidad. *Revista Chilena de Infectología*. 2018;35(1).
26. Lukac PJ, Bonomo RA, Logan LK. Extended-spectrum β -lactamase-producing enterobacteriaceae in children: Old foe, emerging threat. *Clinical Infectious Diseases*. 2015;60(9).
27. Falconí Sarmiento A, Nolasco Mejia M, Bedoya Rozas A, Amaro Giraldo C, Málaga G. Frequency and risk factors for bacteremia caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae in patients of a public hospital in Lima, Peru. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2018 Jan 1;35(1):62–7.
28. Adrianzén D, Arbizu Á, Ortiz J, Samalvides F, Peru R, Exp M, et al. Mortalidad por bacteremia causada por *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. productoras de beta lactamasas de espectro extendido: cohorte retrospectiva en un hospital de Lima, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* [Internet]. 2013 Jan [cited 2023 Nov 5];30(1):18–25. Available from: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342013000100004
29. Colquechagua Aliaga F, Sevilla Andrade C, Gonzales Escalante E. Enterobacterias productoras de Betalactamasas de espectro extendido en muestras fecales en el Instituto Nacional de Salud del Niño, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* [Internet]. 2015 [cited 2023 Nov 5];32(1). Available from: <https://rpmesp.ins.gob.pe/index.php/rpmesp/article/view/1571>
30. South American Infections Diseases Initiative (SAIDI). Perfil del país Perú - Resistencia -antimicrobiana [Internet]. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud; 2009 [cited 2023 Nov 12]. 1–174 p. Available from: https://www3.paho.org/hq/dmdocuments/2009/Perfil_de_pais_Peru.pdf
31. Jave C. O, Contreras M. M, Hernández U. VA. Situación de la tuberculosis multirresistente en Perú. *Acta Med Peru* [Internet]. 2017 May 31 [cited 2023 Nov 5];34(2):114–39. Available from: <http://www.scielo.org.pe/pdf/amp/v34n2/a07v34n2.pdf>
32. World Health Organization. GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT 2021 [Internet]. Geneva; 2021. Available from: <http://apps.who.int/bookorders>.
33. Heredia N, García S. Animals as sources of food-borne pathogens: A review [Internet]. Vol. 4, *Animal Nutrition*. KeAi Communications Co.; 2018 [cited 2023 Nov 12]. p. 250–5. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405654518300301?via%3Dihub>
34. Hosain MZ, Lutful Kabir SM, Kamal MM. Antimicrobial uses for livestock production in developing countries. *Vet World* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2023 Nov 12];14(1):210–21. Available from: <https://www.veterinaryworld.org/Vol.14/January-2021/27.html>
35. Kumar K, C. Gupta S, Chander Y, Singh AK. Antibiotic Use in Agriculture and Its Impact on the Terrestrial Environment. *Advances in Agronomy* [Internet]. 2005 [cited 2023 Nov 12];87:1–54. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0065211305870014>
36. He Y, Yuan Q, Mathieu J, Stadler L, Senehi N, Sun R, et al. Antibiotic resistance genes from livestock waste: occurrence, dissemination, and treatment [Internet].

- Vol. 3, npj Clean Water. Nature Research; 2020 [cited 2023 Nov 12]. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41545-020-0051-0#Sec6>
37. Servicio Nacional de Sanidad Agraria. Informe del monitoreo de residuos químicos y otros contaminantes en alimentos agropecuarios primarios y piensos, año 2021 [Internet]. Lima; 2022 Apr [cited 2023 Nov 14]. Available from: <https://www.gob.pe/institucion/senasa/informes-publicaciones/2936134-informe-del-monitoreo-de-residuos-quimicos-y-otros-contaminantes-en-alimentos-agropecuarios-primarios-y-piensos-ano-2021>
 38. Servicio Nacional de Sanidad Agraria. Programa Nacional de Monitoreo de Contaminantes en Alimentos Agropecuarios Primarios y Piensos. Lima, Peru; 2011. p. 1–10.
 39. Mulchandani R, Wang Y, Gilbert M, Van Boeckel TP. Global trends in antimicrobial use in food-producing animals: 2020 to 2030. PLOS Global Public Health [Internet]. 2023 Feb 1 [cited 2023 Nov 15];3(2):e0001305. Available from: <https://journals.plos.org/globalpublichealth/article?id=10.1371/journal.pgph.0001305#sec015>
 40. World Health Organization. Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report [Internet]. Geneva, Switzerland; 2021 Jun [cited 2023 Nov 15]. Available from: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/341666/9789240027336-eng.pdf?sequence=1>
 41. Ministerio de Salud. Decreto Supremo que aprueba el Plan Multisectorial para enfrentar la Resistencia a los Antimicrobianos 2019-2021 y crea la Comisión Multisectorial de naturaleza permanente [Internet]. Decreto Supremo N° 010-2019 Peru; May 17, 2019 p. 1–129. Available from: https://antimicrobianos.ins.gob.pe/images/contenido/plan-nacional/Decreto_Supremo_010-2019-SA-c.pdf
 42. Ministerio de Salud. Informe Análisis del Avance del Plan Multisectorial para enfrentar la Resistencia a los Antimicrobianos 2020-2021 y Recomendación de Acciones [Internet]. Lima, Perú; 2023 Feb [cited 2023 Nov 21]. Available from: <https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/5427336/4850155-informe-del-plan-multisectorial-de-amr-2020-2021.pdf?v=1700077149>
 43. Ministerio de Salud. Informe de la resistencia antimicrobiana en bacterias de origen hospitalario 2012. Lima, Peru; 2012.
 44. Robinson TP, Bu DP, Carrique-Mas J, Fèvre EM, Gilbert M, Grace D, et al. Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. Trans R Soc Trop Med Hyg [Internet]. 2016 Jun 30 [cited 2023 Nov 29];110(7). Available from: <https://academic.oup.com/trstmh/article/110/7/377/2588524?login=false>
 45. Lebov J, Grieger K, Womack D, Zaccaro D, Whitehead N, Kowalczyk B, et al. A framework for One Health research. One Health [Internet]. 2017 Jun [cited 2023 Nov 29];3. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352771416300696?via%3Dihub>
 46. World Health Organization. International partnership to address human-animal-environment health risks gets a boost [Internet]. [cited 2023 Nov 29]. Available from: <https://www.who.int/news/item/30-05-2018-international-partnership-to-address-human-animal-environment-health-risks-gets-a-boost>

47. Pehrsson EC, Tsukayama P, Patel S, Mejía-Bautista M, Sosa-Soto G, Navarrete KM, et al. Interconnected microbiomes and resistomes in low-income human habitats. *Nature* [Internet]. 2016 Nov 11 [cited 2023 Nov 29];533. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature17672>
48. World Health Organization. Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos [Internet]. Geneva; 2001 [cited 2023 Nov 29]. Available from: https://antibioticos.sanidad.gob.es/PDF/resist_OMS_estrategia_mundial_contra_resistencias.pdf
49. Singer AC, Shaw H, Rhodes V, Hart A. Review of Antimicrobial Resistance in the Environment and Its Relevance to Environmental Regulators. *Front Microbiol* [Internet]. 2016 Nov 1;7(NOV). Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.01728/full>
50. Ministerio de Vivienda C y S. Plan Nacional de Saneamiento [Internet]. Lima, Perú: Ministerio de Vivienda, Construcción y Saneamiento; 2023 Jan [cited 2024 Sep 23]. Available from: <https://www.gob.pe/institucion/vivienda/informes-publicaciones/2586305-plan-nacional-de-saneamiento-2022-2026>
51. Ramalho R, Mezzomo LC, Machado W, da Silva Morais Hein C, Müller CZ, da Silva TCB, et al. The occurrence of antimicrobial residues and antimicrobial resistance genes in urban drinking water and sewage in Southern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* [Internet]. 2022 [cited 2023 Dec 3]; Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s42770-022-00786-2>
52. Slobodiuk S, Niven C, Arthur G, Thakur S, Ercumen A. Does irrigation with treated and untreated wastewater increase antimicrobial resistance in soil and water: A systematic review. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2023 Dec 3];18(21). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8583129/>
53. Lübbert C, Baars C, Dayakar A, Lippmann N, Rodloff AC, Kinzig M, et al. Environmental pollution with antimicrobial agents from bulk drug manufacturing industries in Hyderabad, South India, is associated with dissemination of extended-spectrum beta-lactamase and carbapenemase-producing pathogens. *Infection* [Internet]. 2017 [cited 2023 Dec 3];45(4). Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s15010-017-1007-2>
54. Zhang S, Huang J, Zhao Z, Cao Y, Li B. Hospital Wastewater as a Reservoir for Antibiotic Resistance Genes: A Meta-Analysis. *Front Public Health* [Internet]. 2020 Oct 28 [cited 2023 Dec 3];8. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpubh.2020.574968/full>
55. Loyola Sosa SO. Contaminación fecal del agua dispuesta para el consumo humano y su asociación con la presencia de bacterias patógenas en niños menores de cinco años de tres comunidades rurales peruanas [Maestría en Ciencias en Investigación Epidemiológica]. [Lima]: UPCH; 2018.
56. Heredia N, García S. Animals as sources of food-borne pathogens: A review. *Animal Nutrition* [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2023 Dec 4];4(3):250–5. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405654518300301?via%3Dihub>
57. Pantozzi FL, Moredo FA, Vigo GB, Giacoboni GI. Resistencia a los antimicrobianos en bacterias indicadoras y zoonóticas aisladas de animales

- domésticos en Argentina. *Rev Argent Microbiol* [Internet]. 2010 [cited 2023 Dec 4];42(1). Available from: <https://www.redalyc.org/pdf/2130/213014884011.pdf>
58. Zambrano LD, Levy K, Menezes NP, Freeman MC. Human diarrhea infections associated with domestic animal husbandry: A systematic review and meta-analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [Internet]. 2014 Jun 1 [cited 2023 Dec 4];108(6):313–25. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4023907/pdf/tru056.pdf>
 59. Schiaffino F, Trigoso DR, Colston JM, Olorategui MP, Shapiama Lopez W V., Garcia Bardales PF, et al. Associations among household animal ownership, infrastructure, and hygiene characteristics with source attribution of household fecal contamination in Peri-urban communities of Iquitos, Peru. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* [Internet]. 2021 Jan 6 [cited 2023 Dec 4];104(1):372–81. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7790101/pdf/tpmd200810.pdf>
 60. Larson A, Haver S, Hattendorf J, Salmon-Mulanovich G, Riveros M, Verastegui H, et al. Household-level risk factors for water contamination and antimicrobial resistance in drinking water among households with children under 5 in rural San Marcos, Cajamarca, Peru. *One Health* [Internet]. 2023 Jun [cited 2024 Jul 30];16:100482. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2023.100482>
 61. Pérez RR, Ganoza EM. Frequency and antimicrobial susceptibility of bacteria causing mastitis in a dairy farm in trujillo, Peru. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2023 Dec 4];28(4):994–1001. Available from: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v28n4/a25v28n4.pdf>
 62. Sociedad Nacional de Pesquería. Acuicultura: Proceso, potencial y retos para su desarrollo [Internet]. 2024. Available from: <https://snp.org.pe/industria-pesquera/acuicultura/>
 63. Cabello FC. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: A growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ Microbiol* [Internet]. 2006 [cited 2023 Dec 4];8(7). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x>
 64. Watts JEM, Schreier HJ, Lanska L, Hale MS. The rising tide of antimicrobial resistance in aquaculture: Sources, sinks and solutions. *Mar Drugs*. 2017;15(6).
 65. Lulijwa R, Rupia EJ, Alfaro AC. Antibiotic use in aquaculture, policies and regulation, health and environmental risks: a review of the top 15 major producers [Internet]. Vol. 12, *Reviews in Aquaculture*. Wiley-Blackwell; 2020 [cited 2023 Dec 4]. p. 640–63. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/raq.12344>
 66. Schar D, Zhao C, Wang Y, Larsson DGJ, Gilbert M, Van Boeckel TP. Twenty-year trends in antimicrobial resistance from aquaculture and fisheries in Asia. *Nat Commun* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2023 Dec 4];12(1). Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-25655-8>
 67. Kim J, Ahn J. Emergence and spread of antibiotic-resistant foodborne pathogens from farm to table. *Food Sci Biotechnol* [Internet]. 2022 Nov 1 [cited 2023 Dec 5];31(12):1481–99. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10068-022-01157-1>
 68. Despotovic M, de Nies L, Busi SB, Wilmes P. Reservoirs of antimicrobial resistance in the context of One Health. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. 2023 Jun

- 1 [cited 2023 Dec 5];73. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527423000280#sec0015>
69. Ruiz-Roldán L, Martínez-Puchol S, Gomes C, Palma N, Riveros M, Ocampo K, et al. Presence of multidrug resistant Enterobacteriaceae and Escherichia coli in meat purchased in traditional markets of Lima. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2022 Jun 15];35(3):425–32. Available from:
<https://www.scielosp.org/pdf/rpmesp/2018.v35n3/425-432>
 70. Singh AK, Kaur R, Verma S, Singh S. Antimicrobials and Antibiotic Resistance Genes in Water Bodies: Pollution, Risk, and Control. *Front Environ Sci* [Internet]. 2022 Apr 28 [cited 2023 Dec 6];10. Available from:
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fenvs.2022.830861/full>
 71. Larson A, Hartinger SM, Riveros M, Salmon-Mulanovich G, Hattendorf J, Verastegui H, et al. Antibiotic-resistant Escherichia coli in drinking water samples from rural Andean households in Cajamarca, Peru. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* [Internet]. 2019 [cited 2024 Jun 22];100(6):1363–8. Available from: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0776>
 72. Li S, Ondon BS, Ho SH, Li F. Emerging soil contamination of antibiotics resistance bacteria (ARB) carrying genes (ARGs): New challenges for soil remediation and conservation. *Environ Res* [Internet]. 2023 [cited 2023 Dec 6];219. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0013935122024598>
 73. Adams RJ, Kim SS, Mollenkopf DF, Mathys DA, Schuenemann GM, Daniels JB, et al. Antimicrobial-resistant Enterobacteriaceae recovered from companion animal and livestock environments. *Zoonoses Public Health* [Internet]. 2018 [cited 2023 Dec 6];65(5). Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/zph.12462>
 74. Ministerio de Agricultura y Riego. Estudio de la ganadería lechera en el Perú [Internet]. Lima; 2017 Nov [cited 2023 Dec 10]. Available from:
<https://repositorio.midagri.gob.pe/handle/20.500.13036/73>
 75. Gil AI, Lanata CF, Hartinger SM, Mäusezahl D, Padilla B, Ochoa TJ, et al. Fecal contamination of food, water, hands, and kitchen utensils at the household level in rural areas of Peru. *J Environ Health* [Internet]. 2014 [cited 2023 Dec 10];76(6). Available from: <https://www.jstor.org/stable/26329963>
 76. Rivera-Jacinto M, Rodríguez-Ulloa C, López-Orbegoso J. Fecal contamination in green vegetables that are sold in markets of Cajamarca city, PERU. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* [Internet]. 2009 [cited 2023 Dec 10];26(1):45–8. Available from: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v26n1/a09v26n1.pdf>
 77. Paredes JL, Navarro R, Watanabe T, Morán F, Balmaceda MP, Reateguá A, et al. Knowledge, attitudes and practices of parents towards antibiotic use in rural communities in Peru: a cross-sectional multicentre study. *BMC Public Health* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2022 Jun 20];22(1). Available from:
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8903626/pdf/12889_2022_Article_12855.pdf
 78. Hartinger SM, Nuño N, Hattendorf J, Verastegui H, Karlen W, Ortiz M, et al. A factorial cluster-randomised controlled trial combining home-environmental and early child development interventions to improve child health and development: Rationale, trial design and baseline findings. *BMC Med Res Methodol* [Internet].

- 2020 Apr 2 [cited 2022 Jul 23];20(1). Available from:
<https://doi.org/10.1186/s12874-020-00950-y>
79. Kalter HD, Gilman RH, Moulton LH, Cullotta AR, Cabrera L, Velapatiño B. Risk factors for antibiotic-resistant *Escherichia coli* carriage in young children in Peru: Community-based cross-sectional prevalence study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* [Internet]. 2010 [cited 2023 Dec 10];82(5). Available from: <https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/82/5/article-p879.xml>
 80. Tricco AC, Lillie E, Zarin W, O'Brien KK, Colquhoun H, Levac D, et al. PRISMA extension for scoping reviews (PRISMA-ScR): Checklist and explanation. *Ann Intern Med* [Internet]. 2018 [cited 2023 Dec 11];169(7). Available from: <https://www.acpjournals.org/doi/10.7326/M18-0850>
 81. Peters MDJ, Godfrey CM, Khalil H, McInerney P, Parker D, Soares CB. Guidance for conducting systematic scoping reviews. *Int J Evid Based Healthc* [Internet]. 2015 [cited 2023 Dec 11];13(3). Available from: https://journals.lww.com/ijebh/fulltext/2015/09000/guidance_for_conducting_systematic_scoping_reviews.5.aspx
 82. Elsevier. Mendeley - Reference Management Software [Internet]. 2023 [cited 2023 Dec 12]. Available from: https://www.mendeley.com/?interaction_required=true
 83. Armas-Freire PI, Trueba G, Proaño-Bolaños C, Levy K, Zhang L, Marrs CF, et al. Unexpected distribution of the fluoroquinolone-resistance gene *qnrB* in *Escherichia coli* isolates from different human and poultry origins in Ecuador. *International Microbiology* [Internet]. 2015 [cited 2023 Dec 12];18(2). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4809633/>
 84. Barbosa MMC, Pinto F de R, Ribeiro LF, Guriz CSL, Ferraudo AS, Maluta RP, et al. Sorologia e suscetibilidade antimicrobiana em isolados de *Escherichia coli* de pesque-pagues. *Arq Inst Biol (Sao Paulo)* [Internet]. 2014 [cited 2023 Dec 12];81(1). Available from: <https://doi.org/10.1590/S1808-16572014000100008>
 85. Braykov NP, Eisenberg JNS, Grossman M, Zhang L, Vasco K, Cevallos W, et al. Antibiotic Resistance in Animal and Environmental Samples Associated with Small-Scale Poultry Farming in Northwestern Ecuador. *mSphere* [Internet]. 2016 [cited 2023 Dec 12];1(1). Available from: <https://doi.org/10.1128/msphere.00021-15>
 86. Brisola MC, Crecencio RB, Bitner DS, Frigo A, Rampazzo L, Stefani LM, et al. *Escherichia coli* used as a biomarker of antimicrobial resistance in pig farms of Southern Brazil. *Science of the Total Environment* [Internet]. 2019 [cited 2023 Dec 12];647. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.438>
 87. Campioni F, Zoldan MM, Falcão JP. Characterization of *Salmonella* Enteritidis strains isolated from poultry and farm environments in Brazil. *Epidemiol Infect* [Internet]. 2014 [cited 2023 Dec 12];142(7). Available from: <https://www.cambridge.org/core/journals/epidemiology-and-infection/article/characterization-of-salmonella-enteritidis-strains-isolated-from-poultry-and-farm-environments-in-brazil/794EA56AAC26F72B93142874D3875380>
 88. Cervelin V, Fongaro G, Pastore JB, Engel F, Reimers MA, Viancelli A. Enterobacteria associated with houseflies (*Musca domestica*) as an infection risk indicator in swine production farms. *Acta Trop* [Internet]. 2018 [cited 2023 Dec 12];185. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.04.024>

89. Gambero ML, Blarasin M, Bettera S, Giuliano Albo J. Tracing contamination sources through phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from surface water and groundwater in an agro-ecosystem. *Hydrological Sciences Journal* [Internet]. 2018 [cited 2023 Dec 12];63(8). Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/02626667.2018.1483582>
90. Lowenstein C, Waters WF, Roess A, Leibler JH, Graham JP. Animal husbandry practices and perceptions of zoonotic infectious disease risks among livestock keepers in a rural parish of Quito, Ecuador. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* [Internet]. 2016 [cited 2023 Dec 12];95(6). Available from: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0485>
91. Mattiello SP, Drescher G, Barth VC, Ferreira CAS, Oliveira SD. Characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* strains isolated from Brazilian poultry production. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* [Internet]. 2015 [cited 2023 Dec 12];108(5). Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10482-015-0577-1>
92. Rodríguez R, Fandiño C, Donado P, Guzmán L, Verjan N. Characterization of salmonella from commercial egg-laying hen farms in a central region of Colombia. *Avian Dis* [Internet]. 2015 [cited 2023 Dec 12];59(1). Available from: <https://doi.org/10.1637/10873-052714-Reg>
93. Santamaría J, López L, Soto CY. Detection and diversity evaluation of tetracycline resistance genes in grassland-based production systems in Colombia, South America. *Front Microbiol* [Internet]. 2011 [cited 2023 Dec 12];2(DEC). Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2011.00252/full>
94. Dos Vieira RHSF, Carvalho EMR, Carvalho FCT, Silva CM, Sousa O V., Rodrigues DP. Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and pond environment in northeastern Brazil. *J Environ Sci Health B* [Internet]. 2010 [cited 2023 Dec 12];45(3). Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03601231003613526>
95. Miranda CD, Zemelman R. Antimicrobial multiresistance in bacteria isolated from freshwater Chilean salmon farms. *Science of the Total Environment* [Internet]. 2002 [cited 2023 Dec 12];293(1–3). Available from: [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(02\)00022-0](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(02)00022-0)
96. Palhares JCP, Kich JD, Bessa MC, Biesus LL, Berno LG, Triques NJ. *Salmonella* and antimicrobial resistance in an animal-based agriculture river system. *Science of the Total Environment* [Internet]. 2014 [cited 2023 Dec 12];472. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.11.052>
97. López L, Santamaría J, Sánchez A, Castro L, Moreno JL. Presence of tetracycline resistant bacteria and genes in grassland-based animal production systems. *Cienc Investig Agrar* [Internet]. 2012 [cited 2023 Dec 12];39(3). Available from: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-16202012000300002>
98. Camotti Bastos M, Rheinheimer dos Santos D, Aubertheau É, de Castro Lima JAM, Le Guet T, Caner L, et al. Antibiotics and microbial resistance in Brazilian soils under manure application. *Land Degrad Dev* [Internet]. 2018 [cited 2023 Dec 12];29(8). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ldr.2964>
99. Resende JA, Silva VL, de Oliveira TLR, de Oliveira Fortunato S, da Costa Carneiro J, Otenio MH, et al. Prevalence and persistence of potentially pathogenic

- and antibiotic resistant bacteria during anaerobic digestion treatment of cattle manure. *Bioresour Technol* [Internet]. 2014 [cited 2023 Dec 12];153. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.007>
100. Corzo-Ariyama HA, García-Heredia A, Heredia N, García S, León J, Jaykus LA, et al. Phylogroups, pathotypes, biofilm formation and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates in farms and packing facilities of tomato, jalapeño pepper and cantaloupe from Northern Mexico. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2019 [cited 2023 Dec 12];290. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.006>
 101. Cicuta ME, Roibón WR, Barceló MC, Arzú OR, Amable VI. Beta-lactam resistance in enterobacteria isolated from animal and water. *Revista Veterinaria* [Internet]. 2014 [cited 2023 Dec 12];25(1). Available from: <https://revistas.unne.edu.ar/index.php/vet/article/view/540>
 102. Ferreira PFA, Xavier JF, Nunes JF, Fonseca IP, de Mattos de Oliveira Coelho S, Soares de Souza MM, et al. Bacteria and antimicrobial resistance profile during the composting process of wastes from animal production. *Brazilian Journal of Microbiology* [Internet]. 2023 Jun 1 [cited 2024 Jul 11];54(2):1157. Available from: <https://pmc/articles/PMC10235383/>
 103. Ferreira PFA, Rocha FI, Howe A, Barbosa DR, da Conceição Jesus E, do Amaral Sobrinho NMB, et al. Chemical attributes, bacterial community, and antibiotic resistance genes are affected by intensive use of soil in agro-ecosystems of the Atlantic Forest, Southeastern Brazil. *Environ Geochem Health* [Internet]. 2024 Apr 1 [cited 2024 Jul 16];46(4):1–17. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10653-024-01894-8>
 104. Cornejo J, Pokrant E, Figueroa F, Riquelme R, Galdames P, Pillo F Di, et al. Assessing Antibiotic Residues in Poultry Eggs from Backyard Production Systems in Chile, First Approach to a Non-Addressed Issue in Farm Animals. *Animals* 2020, Vol 10, Page 1056 [Internet]. 2020 Jun 19 [cited 2024 Jul 17];10(6):1056. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2615/10/6/1056/htm>
 105. Hedman HD, Zhang L, Trueba G, Vinueza Rivera DL, Zurita Herrera RA, Barrazueta JJV, et al. Spatial Exposure of Agricultural Antimicrobial Resistance in Relation to Free-Ranging Domestic Chicken Movement Patterns among Agricultural Communities in Ecuador. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2020 Nov 1;103(5):1803–9.
 106. Moretto VT, Bartley PS, Ferreira VM, Santos CS, Silva LK, Ponce-Terashima RA, et al. Microbial source tracking and antimicrobial resistance in one river system of a rural community in bahia, brazil. *Brazilian Journal of Biology*. 2022;82.
 107. World Health Organization (WHO). Molecular methods for antimicrobial resistance (AMR) diagnostics to enhance the Global Antimicrobial Resistance Surveillance System [Internet]. Vol. 13, Nucl. Phys. 2019 [cited 2023 Dec 17]. Available from: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/310993/WHO-WSI-AMR-2019.1-eng.pdf?ua=1>
 108. McLain JE, Cytryn E, Durso LM, Young S. Culture-based Methods for Detection of Antibiotic Resistance in Agroecosystems: Advantages, Challenges, and Gaps in Knowledge. *J Environ Qual* [Internet]. 2016 [cited 2023 Dec 17];45(2). Available from: <https://acsess.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2134/jeq2015.06.0317>

109. Quispe-Zuniga MR, Santos F, Callo-Concha D, Greve K. Impact of heavy metals on community farming activities in the central peruvian andes. *Minerals* [Internet]. 2019 [cited 2023 Dec 18];9(10). Available from: <https://www.mdpi.com/2075-163X/9/10/647>
110. Zhong Q, Cruz-Paredes C, Zhang S, Rousk J. Can heavy metal pollution induce bacterial resistance to heavy metals and antibiotics in soils from an ancient landmine? *J Hazard Mater* [Internet]. 2021 Jun 5 [cited 2023 Dec 18];411. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124962>
111. DelAgua Water Testing Ltd. DELAGUA portable water testing kit User manual Version 5.2 [Internet]. [cited 2023 Dec 18]. Available from: <https://www.delagua.org/wp-content/uploads/2021/04/DelAgua-Manual-Revised-2020-V1.pdf>
112. MacFaddin JF. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*. 2nd Editio. Williams & Wilkins; 1980. 527 p.
113. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 30th Edition [Internet]. 30th ed. Wayne, Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020. Available from: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>
114. Lezameta L, González-Escalante E, Tamariz JH. Comparison of four phenotypic methods to detect Extended-Spectrum Betalactamases. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* [Internet]. 2010;27(3). Available from: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v27n3/a06v27n3.pdf>
115. Belaouaj A, Lapoumeroulie C, Caniça MM, Vedel G, Névoz P, Krishnamoorthy R, et al. Nucleotide sequences of the genes coding for the TEM-like β -lactamases IRT-1 and IRT-2 (formerly called TRI-1 and TRI-2). *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 1994 [cited 2024 Jan 2];120(1–2). Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb07010.x>
116. Pitout JDD, Thomson KS, Hanson ND, Ehrhardt AF, Moland ES, Sanders CC. β -lactamases responsible for resistance to expanded-spectrum cephalosporins in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* isolates recovered in South Africa. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 1998 [cited 2024 Jan 2];42(6). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.42.6.1350>
117. Jouini A, Vinué L, Slama K Ben, Sáenz Y, Klibi N, Hammami S, et al. Characterization of CTX-M and SHV extended-spectrum β -lactamases and associated resistance genes in *Escherichia coli* strains of food samples in Tunisia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [Internet]. 2007 [cited 2024 Jan 2];60(5). Available from: <https://doi.org/10.1093/jac/dkm316>
118. Batchelor M, Hopkins K, Threlfall EJ, Clifton-Hadley FA, Stallwood AD, Davies RH, et al. blaCTX-M genes in clinical *Salmonella* isolates recovered from humans in England and Wales from 1992 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2005 [cited 2024 Jan 2];49(4). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.49.4.1319-1322.2005>
119. Giono-Cerezo S, Santos-Preciado JI, Morfín-Otero M del R, Torres-López FJ, Alcántar-Curiel MD. Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. *Gac Med Mex* [Internet]. 2020 Feb 19 [cited 2023 Dec 25];156(2). Available from: <https://www.scielo.org.mx/pdf/gmm/v156n2/0016-3813-gmm-156-2-172.pdf>

120. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection* [Internet]. 2012 [cited 2023 Dec 25];18(3). Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
121. World Health Organization. 2021 AWaRe classification [Internet]. 2021 [cited 2023 Dec 26]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/2021-aware-classification>
122. Hartinger SM, Medina-Pizzali ML, Salmon-Mulanovich G, Larson AJ, Pinedo-Bardales M, Verastegui H, et al. Antimicrobial resistance in humans, animals, water and household environs in rural Andean Peru: Exploring dissemination pathways through the One Health lens. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 2021 Feb [cited 2024 Jul 30];18(4604). Available from: <https://doi.org/10.3390/ijerph18094604>
123. Andrews S, others. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010 [Internet]. <https://www.Bioinformatics.Babraham.Ac.Uk/Projects/Fastqc/>. 2019 [cited 2023 Dec 29]. Available from: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
124. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* [Internet]. 2014 [cited 2023 Dec 29];30(15). Available from: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/30/15/2114/2390096>
125. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology* [Internet]. 2012 [cited 2023 Dec 29];19(5). Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/cmb.2012.0021>
126. Medina-Pizzali ML, Hartinger SM, Salmon-Mulanovich G, Larson A, Riveros M, Mäusezahl D. Antimicrobial Resistance in Rural Settings in Latin America: A Scoping Review with a One Health Lens. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 2021 Feb;18(9837). Available from: <https://www.mdpi.com/1660-4601/18/18/9837>
127. Medina-Pizzali ML, Venkatesh A, Riveros M, Cuicapuza D, Salmon-Mulanovich G, Mäusezahl D, et al. Whole-Genome Characterisation of ESBL-Producing *E. coli* Isolated from Drinking Water and Dog Faeces from Rural Andean Households in Peru. *Antibiotics* [Internet]. 2022 May 20 [cited 2022 Jun 15];11(692). Available from: <https://www.mdpi.com/2079-6382/11/5/692>
128. Patel SJ, Wellington M, Shah RM, Ferreira MJ. Antibiotic Stewardship in Food-producing Animals: Challenges, Progress, and Opportunities [Internet]. Vol. 42, *Clinical Therapeutics*. Excerpta Medica Inc.; 2020 [cited 2024 Jan 28]. p. 1649–58. Available from: <https://www.clinicaltherapeutics.com/action/showPdf?pii=S0149-2918%2820%2930338-6>
129. Fresno M, Pavez L, Poblete Y, Cortez A, Del Pozo T. Unveiling antimicrobial resistance in Chilean fertilized soils: a One Health perspective on environmental AMR surveillance. *Front Microbiol* [Internet]. 2023 [cited 2024 Jan 8];14. Available from:

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10722175/pdf/fmicb-14-1239761.pdf>
130. Gunjan, Vidic J, Manzano M, Raj VS, Pandey RP, Chang CM. Comparative meta-analysis of antimicrobial resistance from different food sources along with one health approach in Italy and Thailand. *One Health* [Internet]. 2023 Jun 1 [cited 2024 Jan 8];16. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352771422001094#s0070>
 131. Muloi DM, Jauneikaite E, Anjum MF, Essack SY, Singleton DA, Kasudi MR, et al. Exploiting genomics for antimicrobial resistance surveillance at One Health interfaces. *Lancet Microbe* [Internet]. 2023 Dec 1 [cited 2024 Jan 8];4(12):e1056–62. Available from: <https://www.thelancet.com/action/showPdf?pii=S2666-5247%2823%2900284-7>
 132. Santos Salvatierra Rodriguez G. Epidemiologia molecular de enteropatógenos en microbiomas de humanos, aves y aguas residuales [Internet] [Doctorado en Ciencias de la Vida]. [Lima, Peru]: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2022 [cited 2024 Jan 8]. Available from: <https://repositorio.upch.edu.pe/handle/20.500.12866/13320>
 133. dos S. Ribeiro C, van de Burgwal LHM, Regeer BJ. Overcoming challenges for designing and implementing the One Health approach: A systematic review of the literature. *One Health* [Internet]. 2019 [cited 2024 Jan 13];7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352771418300223?via%3Dihub#s0085>
 134. Kahn LH. The Challenges of Implementing One Health [Internet]. Fairfax Virginia, USA: Institute on Science for Global Policy (ISGP) ; 2012 [cited 2024 Jan 13]. Available from: <https://scienceforglobalpolicy.org/publication/the-challenges-of-implementing-one-health/>
 135. Alcedo K, Ruiz J, Ochoa TJ, Riveros M. High Prevalence of blaCTX-Min Fecal Commensal *Escherichia coli* from Healthy Children. *Infect Chemother* [Internet]. 2022 [cited 2024 Jan 14];54. Available from: <https://doi.org/10.3947/ic.2021.0102>
 136. Benavides JA, Godreuil S, Opazo-Capurro A, Mahamat OO, Falcon N, Oravcova K, et al. Long-term maintenance of multidrug-resistant *Escherichia coli* carried by vampire bats and shared with livestock in Peru. *Science of the Total Environment* [Internet]. 2022 [cited 2024 Jan 14];810. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969721071217?via%3Dihub#s0070>
 137. Igbinsola EO, Beshiru A, Igbinsola IH, Cho GS, Franz CMAP. Multidrug-resistant extended spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* from farm produce and agricultural environments in Edo State, Nigeria. *PLoS One* [Internet]. 2023 Mar 1 [cited 2024 Jan 14];18(3 March). Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0282835>
 138. U.S. Food and Drug Administration. BAM Chapter 4A: Diarrheagenic *Escherichia coli* | FDA [Internet]. 2020 [cited 2024 Jan 9]. Available from: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4a-diarrheagenic-escherichia-coli>
 139. Lan R, Alles MC, Bonohoe K, Martinez MB, Reeves PR. Molecular evolutionary relationships of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *Infect Immun* [Internet]. 2004 Sep [cited 2024 Jan 9];72(9):5080–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC517479/pdf/1801-03.pdf>

140. Ori EL, Takagi EH, Andrade TS, Miguel BT, Cergole-Novella MC, Guth BEC, et al. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* and *Escherichia albertii* in Brazil: Pathotypes and serotypes over a 6-year period of surveillance. *Epidemiol Infect* [Internet]. 2019 [cited 2024 Jan 9];147. Available from: <https://doi.org/10.1017/S0950268818002595>
141. Navarro A, van der Ploeg C, Rogé A, Licona-Moreno D, Delgado G, Morales-Espinosa R, et al. Diversity of potentially pathogenic *Escherichia coli* O104 and O9 serogroups isolated before 2011 from fecal samples from children from different geographic regions. *Microorganisms* [Internet]. 2021 Oct 26 [cited 2022 Mar 18];9(11). Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/11/2227>
142. Clermont O, Condamine B, Dion S, Gordon DM, Denamur E. The E phylogroup of *Escherichia coli* is highly diverse and mimics the whole *E. coli* species population structure. *Environ Microbiol* [Internet]. 2021 Feb;23(11):7139–51. Available from: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/1462-2920.15742>
143. Stoppe N de C, Silva JS, Carlos C, Sato MIZ, Saraiva AM, Ottoboni LMM, et al. Worldwide phylogenetic group patterns of *Escherichia coli* from commensal human and wastewater treatment plant isolates. *Front Microbiol* [Internet]. 2017 [cited 2024 Jan 12];8(DEC). Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.02512/full>
144. Coura FM, Diniz SDA, Silva MX, Mussi JMS, Barbosa SM, Lage AP, et al. Phylogenetic Group Determination of *Escherichia coli* Isolated from Animals Samples. *Scientific World Journal* [Internet]. 2015 [cited 2024 Jan 12];2015. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2015/258424/>
145. Maiden MCJ, Van Rensburg MJJ, Bray JE, Earle SG, Ford SA, Jolley KA, et al. MLST revisited: The gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2013 Oct [cited 2024 Jan 12];11(10):728–36. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3980634/pdf/emss-57777.pdf>
146. Ménard LP, Dubreuil JD. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): A new toxin with an old twist. *Crit Rev Microbiol* [Internet]. 2002 [cited 2024 Jan 12];28(1). Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/1040-840291046687?needAccess=true>
147. National Library of Medicine (US). Reference Gene Catalog [Internet]. 2022. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/>
148. Jacoby GA. AmpC β -Lactamases. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2009 Feb;22(1):161. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18111111/>
149. Carattoli A. Plasmids and the spread of resistance. *International Journal of Medical Microbiology* [Internet]. 2013 Aug [cited 2024 Jan 29];303(6–7):298–304. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.001>
150. Ramsamy Y, Mlisana KP, Amoako DG, Abia ALK, Ismail A, Allam M, et al. Mobile genetic elements-mediated Enterobacterales-associated carbapenemase antibiotic resistance genes propagation between the environment and humans: A One Health South African study. *Science of the Total Environment* [Internet]. 2022 [cited 2024 Jan 29];806. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150641>

151. Tekele SG, Teklu DS, Tullu KD, Birru SK, Legese MH. Extended-spectrum Beta-lactamase and AmpC beta-lactamases producing gram negative bacilli isolated from clinical specimens at International Clinical Laboratories, Addis Ababa, Ethiopia. PLoS One [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2022 Feb 14];15(11 November). Available from:
<https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0241984&type=printable>

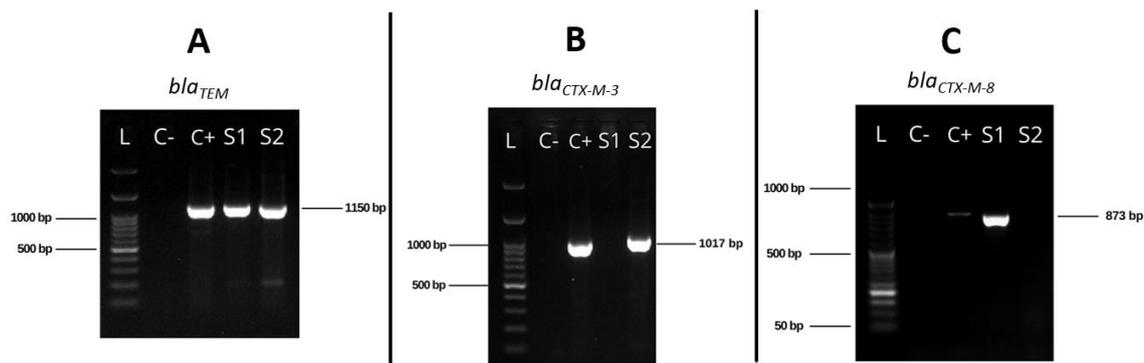
VII. ANEXOS

Anexo A. Palabras clave (con sinónimos) y sintaxis en inglés usada para la búsqueda de literatura

#1: términos de "resistencia antimicrobiana"	#2: términos de "tipo de entorno geográfico"	#3: términos relacionados a "ambiente"	#4: términos de "manejo animal" o "agricultura"	#5: términos de "países en LA"	#6: búsqueda combinada
(<i>"antimicrobial drug resistances"</i> OR <i>"antimicrobial settings" OR drug resistance" OR "antibiotic resistance" OR "drug resistances, microbial"</i>) OR <i>"antibiotic resistance, microbial"</i> OR <i>"antimicrobial resistance"</i>) AND	(<i>rural populations" OR "rural health services"</i>) AND	(<i>environment* OR water OR soil OR lixiviation</i>) AND	(<i>"animal production" OR animal OR livestock OR agricultur* OR "animal husbandry" OR poultry OR food</i>) AND	(<i>Argentina OR Bolivia OR Brazil OR Chile OR Colombia OR "Costa Rica" OR Cuba OR "Dominican Republic" OR Ecuador OR "El Salvador OR Guatemala OR Haiti OR Honduras OR Mexico OR Nicaragua OR Panama OR Paraguay OR Peru OR Uruguay OR Venezuela</i>)	#1 AND #2 AND #3 AND #4 AND #5

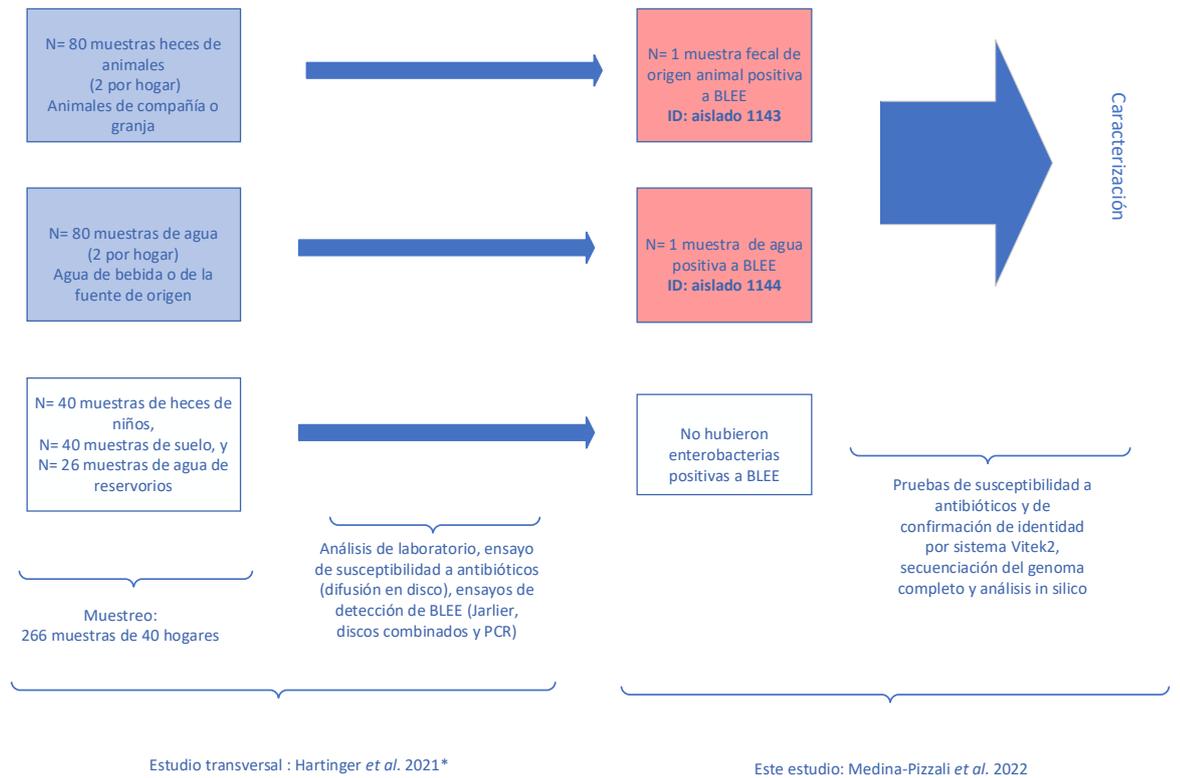
Anexo B. *Primers* usados para la detección de genes que codifican la producción de BLEE

Gen		Secuencia (5' → 3')	Tamaño (bp)	Referencia
<i>bla</i> _{TEM}	F	ATTCTTGAAGACGAAAGGGC	1150	(115)
	R	ACGCTCAGTGGAACGAAAAC		
<i>bla</i> _{SHV}	F	CACTCAAGGATGTATTGTG	885	(116)
	R	TTAGCGTTGCCAGTGCTCG		
<i>bla</i> _{OXA}	F	ACACAATACATATCAACTTCGC	813	(117)
	R	AGTGTGTTTAGAATGGTGATC		
<i>bla</i> _{CTX-M-U}	F	CGATGTGCAGTACCGATAA	585	(118)
	R	TTAGTGACCAGAATCAGCGG		
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	F	ATGATGACTCAGAGCATTTCG	876	(118)
	R	TCAGAAACCGTGGGTTAC		
<i>bla</i> _{CTX-M-3}	F	GTTACAATGTGTGAGAAGCAG	1017	(118)
	R	CCGTTTCCGCTATTACAAAC		
<i>bla</i> _{CTX-M-8}	F	TGATGAGACATCGCGTTAAG	873	(118)
	R	TAACCGTCGGTGACGATTTT		
<i>bla</i> _{CTX-M-9}	F	GTGACAAAGAGAGTGCAACGG	857	(118)
	R	ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC		
<i>bla</i> _{CTX-M-10}	F	CCGCGCTACACTTTGTGGC	944	(118)
	R	TTACAAACCGTTGGTGACG		



Anexo C. Amplificación por PCR de genes de β -lactamasas *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M-8}* y *bla_{CTX-M-3}* en *Shigella* spp. y *E. coli*

(S1) *E. coli* aislado de muestra de agua, (S2) *Shigella* spp. aislado de heces de perro, (L) escalera de ADN de 100 bp, (C-), control negativo, (C+), control positivo, productos de amplificación: (A) *bla_{TEM}* (1150 bp), (B) *bla_{CTX-M-3}* (1017 bp), (C) *bla_{CTX-M-8}* (800 bp).



Muestreo:
266 muestras de 40 hogares

Pruebas de susceptibilidad a antibióticos y de confirmación de identidad por sistema Vitek2, secuenciación del genoma completo y análisis in silico

Estudio transversal : Hartinger *et al.* 2021*

Este estudio: Medina-Pizzali *et al.* 2022

*Hartinger, S.M.; Medina-Pizzali, M.L.; Salmon-Mulanovich, G.; Larson, A.J.; Pinedo-Bardales, M.; Verastegui, H.; Riberos, M.; Müsezahl, D. Antimicrobial Resistance in Humans, Animals, Water and Household Environs in Rural Andean Peru: Exploring Dissemination Pathways through the One Health Lens. *Int J Environ Res Public Health* 2021, 18, doi:10.3390/ijerph18094604.

Anexo D. Obtención de los aislamientos de *E.coli* 1143 y 1144 para su caracterización

Anexo E. Genes de resistencia comunes usando diferentes plataformas

<i>E.coli</i> 1143			<i>E.coli</i> 1144		
AMRFinderplus	ResFinder	NCBI	AMRFinderplus	ResFinder	NCBI
<i>mdtM</i>	<i>mdf(A)</i>	<i>floR</i>	<i>ymgB</i>	<i>aph(3')-Iia</i>	<i>aph(3')-IIa</i>
<i>espX1</i>	<i>floR</i>	<i>aph(3'')-Ib</i>	<i>aph(3')-IIa</i>	<i>tet(B)</i>	<i>tet(B)</i>
<i>parC_E84G</i>	<i>aph(3'')-Ib</i>	<i>aph(6)-Id</i>	<i>ble</i>	<i>sul3</i>	<i>sul3</i>
<i>parC_S80I</i>	<i>aph(6)-Id</i>	<i>blaTEM-1</i>	<i>tet(B)</i>	<i>qnrB19</i>	<i>qnrB19</i>
<i>gyrA_D87N</i>	<i>blaTEM-1B</i>	<i>tet(M)</i>	<i>mchF</i>	<i>blaCTX-M-55</i>	<i>blaCTX-M-55</i>
<i>gyrA_S83L</i>	<i>tet(M)</i>	<i>aadA1</i>	<i>cvaC</i>	<i>fosA3</i>	<i>fosA3</i>
<i>emrD</i>	<i>cmlA1</i>	<i>cmlA1</i>	<i>qacL</i>	<i>mdf(A)</i>	<i>blaEC-15</i>
<i>lpfA1</i>	<i>aadA2</i>	<i>aadA2</i>	<i>sul3</i>		
<i>floR</i>	<i>dfrA12</i>	<i>dfrA12</i>	<i>qnrB19</i>		
<i>aph(3'')-Ib</i>	<i>tet(B)</i>	<i>tet(B)</i>	<i>blaCTX-M-55</i>		
<i>aph(6)-Id</i>	<i>aac(3)-Iid</i>	<i>blaEC-15</i>	<i>blaTEM</i>		
<i>ymgB</i>	<i>blaCTX-M-8</i>	<i>aac(3)-IId</i>	<i>fosA3</i>		
<i>arsR</i>		<i>blaCTX-M-8</i>	<i>dfrA1</i>		
<i>arsD</i>			<i>blaEC</i>		
<i>arsA</i>			<i>espX1</i>		
<i>blaTEM-1</i>			<i>ybtQ</i>		
<i>acrF</i>			<i>ybtP</i>		
<i>tet(M)</i>			<i>mdtM</i>		
<i>qacL</i>			<i>capU</i>		
<i>aadA1</i>			<i>emrE</i>		
<i>cmlA1</i>			<i>fdeC</i>		
<i>aadA2</i>			<i>iroN</i>		
<i>dfrA12</i>			<i>iroE</i>		
<i>astA</i>			<i>iss</i>		
<i>tet(B)</i>			<i>iutA</i>		
<i>blaEC</i>			<i>iucA</i>		
<i>aac(3)-IId</i>			<i>acrF</i>		
<i>blaCTX-M-8</i>					

Anexo F. Perfil de susceptibilidad a los antibióticos^a para *E.coli* 1143 y 1144 mediante el sistema VITEK®2 y comparado con los resultados del ensayo de difusión en disco^b

Antimicrobianos	<i>E. coli</i> 1143		<i>E. coli</i> 1144	
	Vitek MIC(μ g/ml) *	Difusión en disco Diámetro (mm)	Vitek MIC(μ g/ml) *	Difusión en disco Diámetro (mm)
Ampicilina (AMP)		R (6)		R (6)
Amoxicilina- ac. clavulánico (AMC)		I (16)		S (18)
Cefepima (FEP)	R (4)	R (18)	S (2)	R (18.2)
Aztreonam (ATM)		R (13)		S (23.7)
Imipenem (IMP)	S	S (28)	S (\leq 0,25)	S (32.6)
Cefoxitina (FOX)		S (21)		S (19.3)
Cefotaxima (CTX)	R	R (11)	R (\geq 64)	R (17)
Ácido nalidíxico (NA)		R (13)		R (6)
Ciprofloxacino (CIP)	S (\leq 0,25)	S (21)	R (\geq 4)	R (6)
Trimetoprima/sulfametoxazol (SXT)	R (\geq 320)	R (6)	S (\leq 20)	S (24.5)
Tetraciclina (TE)		R (6)		R (6)
Gentamicina (CN)	S (\leq 1)	S (19)	R (\geq 16)	R (6)
Cloranfenicol (C)		S (22)		R (6)
Ceftriaxona (CRO)		R (9)		R (14.3)
Ampicilina/sulbactam (SAM)	R (\geq 32)		R (\geq 32)	
Piperacilina/Tazobactam (TZP)	R (\geq 128)		R (\geq 128)	
Cefazolina (CFZ)	R (\geq 64)		R (\geq 64)	
Cefuroxima (CXM)	R (\geq 64)		R (\geq 64)	
Ceftazidima (CAZ)	R (4)		S (\leq 1)	
Ertapenem (ETP)	S (\leq 0,5)		S (\leq 0,5)	
Meropenem (MEM)	R (\geq 16)		R (\geq 16)	
Amikacina (AMK)	S (\leq 2)		S (4)	
Tigeciclina (TGC)	S (\leq 0,5)		S (\leq 0,5)	
Colistina (CST)	S (\leq 0,5)		S (\leq 0,5)	

*Concentración inhibitoria mínima

^aR= resistente, I=intermedio, S=susceptible

^bHartinger *et al.* (122)

Anexo G: Antimicrobial Resistance in Rural Settings in Latin America: A Scoping Review with a One Health Lens

Review

Antimicrobial Resistance in Rural Settings in Latin America: A Scoping Review with a One Health Lens

Maria Luisa Medina-Pizzali ¹ , Stella M. Hartinger ^{1,2,3,*} , Gabriela Salmon-Mulanovich ^{1,4}, Anika Larson ^{1,5}, Maribel Riveros ⁶  and Daniel Mäusezahl ^{2,3}

- ¹ School of Public Health and Administration, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Av. Honorio Delgado 430, San Martín de Porres, Lima 31, Peru; maria.medina.pibupch.pe (M.L.M.-P.); gsalmonm@puap.edu.pe (G.S.-M.); larsona@uvw.edu (A.L.)
 - ² Department of Epidemiology and Public Health, Swiss Tropical and Public Health Institute, Socinstrasse 57, 4057 Basel, Switzerland; danst.mausezahl@tunib.ch
 - ³ Swiss Tropical and Public Health Institute, University of Basel, Petersplatz 1, 4051 Basel, Switzerland
 - ⁴ Institute for Earth, Nature and Energy at Pontificia Universidad Católica del Perú, Av. Universitaria 1801, San Miguel, Lima 32, Peru
 - ⁵ Department of Environmental and Occupational Health Sciences, University of Washington, Seattle, WA 98195, USA
 - ⁶ School of Medicine, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Av. Honorio Delgado 430, San Martín de Porres, Lima 31, Peru; maribel.riveros@puapch.pe
- * Correspondence: stella.hartinger@puapch.pe



Citation: Medina-Pizzali, M.L.; Hartinger, S.M.; Salmon-Mulanovich, G.; Larson, A.; Riveros, M.; Mäusezahl, D. Antimicrobial Resistance in Rural Settings in Latin America: A Scoping Review with a One Health Lens. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 9837. <https://doi.org/10.3390/ijerph18189837>

Academic Editors: Jay Graham, Ayse Erccemen and Beth J. Feingold

Received: 6 August 2021
Accepted: 14 September 2021
Published: 18 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Antimicrobial resistance (AMR) in rural Latin America is not fully understood. The transmission pathways are partially known since research predominantly focuses on the urban hospital setting. The contribution to AMR from environmental factors is usually only mentioned in large-scale animal production. To understand the state of the literature on AMR in rural LA, we carried out a scoping review using the One Health (OH) perspective. OH recognises the concomitant contributions and interconnectedness of humans, animal, and the environment, thus, we used the OH perspective to select those articles adopting a holistic view of the problem. We searched original articles in English, Spanish, and Portuguese in four peer-reviewed databases and included 21 publications in the analysis. We charted data on bibliometrics, design, data collection sources, and instruments. We identified the human, animal, and environmental contributions to AMR in rural locations, and information gaps on AMR transmission routes and AMR drivers. Intensive and non-intensive animal production systems and agricultural practices were the most frequently found human contributions to AMR. Poultry, swine, cattle, and fish were the most frequent livestock mentioned as sources of AMR bacteria. Animal carriage and/or transfer of AMR determinants or bacteria was recognised as the primary contribution of livestock to the problem, while water, soil, and farming were predominant environmental contributions. We found that only 1 article out of 21 considered the OH approach as a framework for their sampling scheme, whereas 5 out of 21 discussed all the three OH components. There were hardly any descriptions of humans or human waste as reservoirs for AMR in rural locations, and rural health centres or hospitals and wildlife were not represented. No studies identified mining as an anthropogenic activity driving AMR. More OH-oriented studies, with emphasis on molecular approaches—for identification and comparison of AMR genes—are sorely needed to understand better the existence of a network of interconnected transmission routes in rural Latin America and provide efficient strategies to prevent further AMR emergence.

Keywords: anthropogenic activities; livestock; environment; Latin America; one health; antimicrobial resistance

1. Introduction

Antimicrobial resistance (AMR) is a global public health issue [1–3], which is occurring among a wide range of microorganisms with increasing prevalence [2]. AMR is a natural

phenomenon [1] that can arise from mutations or through AMR genes transmitted within the same microbial species or horizontally among different species [4,5]. Drug-resistant microorganisms are found in people, animals, food, plants, and the environment and threaten our ability to treat common infections [6]. The One Health (OH) concept is used by the United Nations (World Health Organization, World Organization for Animal Health, and Food and Agriculture Organization) to address global health issues, specifically AMR [7]. The OH concept recognises that “human health and animal health are interdependent and bound to the health of the ecosystems in which they exist” [8]. Several national actors adopt a OH perspective when analysing human, animal, and environmental health [9] or apply a OH approach when implementing control measures [10].

Using the OH lens, we find that in humans, AMR is linked to diverse social factors such as non-adherence to regimens or doses, self-medication, and misperceptions regarding antibiotics [11]. Likewise, diverse anthropogenic activities also drive AMR, among them, the presence of hospitals, industries (i.e., mining, pharmaceutical), and urbanization, generating chemical waste and faecally-contaminated water. These activities pollute the environment with antimicrobials, biocides, heavy metals, bacteria with AMR, and AMR genes which are known drivers of AMR [3,12]. On the other hand, wild or domestic animals, animal production, and animal-based agricultural systems are linked to the spread of AMR to humans and the environment [13]. The excessive or inadequate use of antibiotics in animal farming drives AMR [14] by favouring the increase in the number of resistant strains in farm animals, animal origin-food, and animal manure [15,16]. AMR bacteria in animal-origin food may cause foodborne-disease outbreaks, remain as commensals, and bring about drug-resistant infections later [17]. Aquaculture stands out as a very important AMR contributor because it promotes significant genetic exchange and recombination at a fast rate [18]. In addition, antimicrobial residues in feed and animal waste pollute soil and water [14]. Thus, animal-based agricultural systems and fish farming are a direct source for the transmission of AMR bacteria and antimicrobial residues to wildlife, humans, and the whole ecosystem [14,19]. In short, the most important routes for the spread of AMR drivers into the environment are communal and industrial wastewater, human and animal waste (i.e., the application of animal manure and sewage sludge for land fertilising), and aquaculture [12].

Specifically, in Latin America (LA), human and veterinary use of antibiotics is loosely regulated, and antibiotics are readily available over the counter without prescription [20–22]. In addition to urban clinical settings [23–25], rural environments have been linked to AMR in Latin America [17,26,27]. In such settings, small-scale animal farming is predominant [28,29] and animal excreta are a key driver of faecal contamination in domestic human environs [30]. Thus, rural settings may be an important eco-sphere for the dissemination of AMR. However, in rural settings of low- and middle-income countries—including Latin American countries [22], AMR transmission routes are not clearly documented, and the evidence shown is limited. Reasons may include: AMR surveillance of agricultural and animal production management is limited and/or poor [14,22]; the available literature is sparse and often lacks scientific rigor, providing insufficient information for an adequate overview [13,22]; and there is scarcity of OH research, involving the human, animal, and environment domains [13].

This study aims at identifying research that focuses on AMR in rural settings in Latin America (LA) using the OH lens as a framework to identify their human, animal, and environmental contributions to AMR. In addition, this work seeks to pinpoint knowledge gaps on AMR transmission routes and AMR drivers to inform researchers and raise awareness in policymakers. Specifically, this review answers the following research question: What are the concomitant contributions of humans, farm animals, and the environment on antimicrobial resistance in rural settings in LA?

2. Materials and Methods

The steps included for our review followed the checklist outlined in the PRISMA Extension for Scoping Reviews (PRISMA-ScR) by Tricco et al. [31] and the guidelines provided by Peters et al. [32].

2.1. Inclusion Criteria

The study period spanned from January 2001 until December 2018. Only original, peer-reviewed articles published in Spanish, Portuguese, and English were considered. A search strategy was designed using terminology associated with the three domains of OH and antimicrobial resistance in rural geographic environments for human populations in Latin American countries. We developed and refined key search terms with online databases prior to the article search (Table A1).

2.2. Exclusion Criteria

We excluded grey literature. Reviews and meta-analyses were excluded, but their reference lists were scanned. Articles not acknowledging or discussing all three OH components were excluded.

We consulted the following electronic databases concentrating on peer-reviewed articles only: PubMed (biomedical sciences), Web of Science (multidisciplinary), Scopus (multidisciplinary), and SciELO (multidisciplinary for LA and the Caribbean). We carried out the search from 13 November to 3 December 2018. All articles were uploaded to a Mendeley database [33].

A multi-step process was applied for the analysis of inclusion (Figure 1). Our initial search produced 7936 articles. After screening for duplicates and evaluating the search criteria (AMR link, rural link, environmental link, animal or agriculture link, and LA country link), we screened 1151 publications. After evaluating the titles and abstracts of the articles in our Mendeley database, we created an initial list of 294 articles meeting the eligibility criteria. These selected articles were then read in full and evaluated for inclusion; 21 publications were finally included for the qualitative synthesis. Five reviewers conducted all stages of the scoping review, from relevance screening to data extraction. The five reviewers individually selected the studies for each phase of elimination. In the process, the reviewers met and discussed each study they had identified, and jointly agreed on including or excluding the study for analysis. If no agreement could be reached, the senior author (SH) decided.

2.3. Article Selection

We defined relevant publications as any original peer-reviewed article published between 1 January 2001 to 3 December 2018; in English, Spanish, and Portuguese language that presented data from LA countries only (Argentina, Bolivia, Brazil, Chile, Colombia, Costa Rica, Cuba, Dominican Republic, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Haiti, Honduras, Mexico, Nicaragua, Panama, Paraguay, Peru, Uruguay, and Venezuela); referred to a rural human setting and to agricultural and/or animal-based food production activities, linked to environmental aspects, and focused on the topic of AMR. To be included, an article needed to refer to any aspects of AMR and to partially or totally match the concept of AMR as defined by the WHO: "Antimicrobial resistance (AMR) is the ability of a microorganism (like bacteria, viruses, and some parasites) to stop an antimicrobial (such as antibiotics, antivirals, and antimalarials) from working against it. As a result, standard treatments become ineffective; infections persist and may spread to others" [34].

Considering an OH perspective, and using it as a screening tool, we searched for articles that linked to human populations in rural settings (e.g., rural hospitals or health services, rural communities, farms), had a connection with agricultural and/or animal production activities (e.g., cattle, fish, poultry, swine farming or animal keeping, transportation, slaughtering, meat-processing), and described a strong connection with AMR and the environment. All the inclusion criteria needed to be met, and thus, the criteria needed to be

explicitly stated and/or discussed in the article. Finally, we excluded studies on AMR that focused only on topics that were remotely linked to agricultural and animal-based-food production activities, such as articles describing urban hospital settings or industrial food production settings, peripherally related to environmental aspects such as publications dealing with economic impacts; loosely linked to AMR discussing molecular/kinetics analyses of enzymes responsible for AMR, and describing research in parks and zoos within urban spaces, since they would not qualify as "rural".

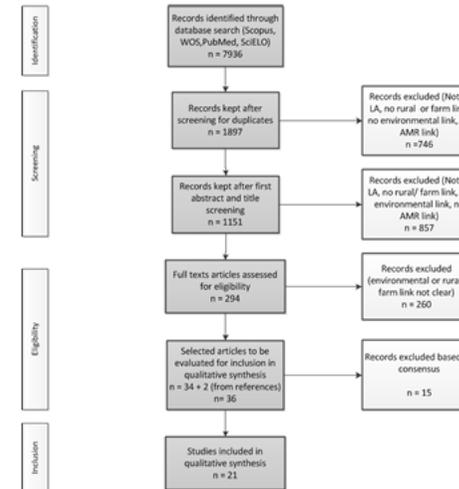


Figure 1. Flowchart of the study selection process.

2.4. Data Management and Characterisation/Charting

We tabulated data extracted from the selected articles, including authors, year of publication, title, research objectives, DOI, URL, location of the study, language, and summary of the findings. We used a charting spreadsheet established a priori as a guide, which was established through team discussions when reviewing the preliminary results. If investigators from individual studies were contacted, their clarifications were included.

2.5. Analysing, Summarising, and Reporting the Results

The analysis and synthesis of literature included quantitative analysis (i.e., descriptive statistics) and qualitative analysis (i.e., content analysis). For the qualitative analysis, reviewers extracted common themes that emerged from the findings, and the team discussed the results. Each article was analysed to identify the approach to study AMR and findings regarding each theme.

3. Results

3.1. Literature Profile

A total of 19 articles were included in the analysis, and 2 articles were added after browsing their references (Figure 1).

The 21 studies included in the analysis originated from 8 Latin American countries: Brazil, Ecuador, Colombia, Argentina, Chile, Mexico, El Salvador, and Peru, with Brazil providing the most articles (9 of 21). All articles but one were published in 2010 and onwards, peaking with five publications in 2014. All of them were written in the English language. Nineteen studies were funded by research funders, public agencies; two did not declare their funding source. One study was partially funded by a microbiological laboratory which supplied *Salmonella* spp. strains, and three studies were partially funded by private LA universities.

All studies were quantitative and had a cross-sectional design except for one, which was qualitative. Two articles addressed AMR only through molecular methods, six combined phenotypic profiling and molecular techniques (PCR), and eight only through microbiological methods. Three studies analysed microbiological and epidemiological data. Only one article included a chemical identification analysis of antibiotics in samples in addition to molecular genetic analysis. All eligible research works addressed AMR in a rural site, but four studies also took samples in urban or peri-urban sites for comparison. In one study, we assumed the location was rural (poultry production sites), based on current poultry production practices, but it was not explicit in the article. Table 1 presents the 21 publications included in our review and their characteristics are summarised in Table 2. Table 3 outlines the methods used in each of the research works.

Table 1. Summary of selected publications.

Citation	One Health Component ¹	Human Contribution to AMR	Animal Contribution to AMR	Environment Contribution to AMR	Location	Important Results (Summary)
Armas-Freire 2015 [35]	AH, HH	FQ ³ resistance linked to humans, especially in clinical settings where its use is widespread.	FQ resistance linked to food-producing animals, no restriction to the use of FQ ³ .	Water samples collected but not discussed.	Ecuador	Higher FQ ³ resistance in <i>E. coli</i> isolates from chickens than in rural human isolates. The latter showed higher rates of <i>qnrB</i> genes compared to chicken isolates. Urban clinical human isolates: low occurrence of <i>qnrB</i> genes.
Barbosa 2014 [36]	HH, EH	Expansion of aquaculture/incorrect animal husbandry practices.	Farm animals' pathogens can colonise fish and become carriers of AMR.	Water gets polluted with animal faeces.	Brazil	<i>E. coli</i> strains isolated from fish for human consumption, 43% were EPEC. MDR ¹² was high in isolates.
Braykov 2016 [37]	HH, AH, EH	Animal production systems boost and are sources for AMR. Broad spectrum antibiotics used in humans contributed to AMR in poultry.	Potential extrinsic sources of resistance: birds could become colonised by resistant strains from hatcheries.	Surfaces of poultry coops: AMR profiles most similar to samples from poultry.	Ecuador	Higher levels of AMR in bacteria from production versus household birds. Prevalence of AMR in production birds declined with bird age.

Table 1. Cont.

Citation	One Health Component ¹	Human Contribution to AMR	Animal Contribution to AMR	Environment Contribution to AMR	Location	Important Results (Summary)
Brisola 2019 [38]	HH, AH, EH	Pig farming production systems contaminate environment and spread AMR/MDR ¹² resistant genes.	Pig faeces contaminated environment with <i>E. coli</i> carrying MDR genes.	MDR ¹² isolates found in water and soil.	Brazil	<i>E. coli</i> isolates in pig faeces, water, and soil samples: 37.04% showed MDR ¹² , 7.41% were ESBL ¹⁰ producers. Most MDR ¹² strains presented a high risk of transmission to humans.
Campioni 2014 [39]	HH, AH	Overuse of QN ⁴ in poultry production spreads AMR.	Resistance to NA ⁵ in <i>Salmonella enteritidis</i> isolates from chicken; the pathogen is vehicle for AMR.	Environ not the source of AMR; they become contaminated by chicken breeders sharing the same strains.	Brazil	Some strains isolated from two sources were indistinguishable. Forty-four strains were resistant to NA ⁵ . QN ⁴ resistance was present.
Cervelin 2018 [40]	HH, AH	Swine production generates manure and overuses antibiotics, fostering AMR spread through vectors.	Pigs carry AMR zoonotic bacteria, which are pathogenic to animals and humans.	Flies are an environmental factor of importance in the spread of AMR.	Brazil	Resistance detected in 2 out of 4 antibiotics tested (used in human or veterinary medicine). Some farms showed MDR ¹² bacteria.
Gambero 2018 [41]	HH, EH	Animal farming impacts on quality of surface and groundwater by spreading AMR <i>E. coli</i> . Small proportion of <i>E. coli</i> resistant to antibiotics used in humans.	Animal faeces contaminate water. High proportion <i>E. coli</i> resistant to veterinary antimicrobials.	Water unsafe for human consumption due to <i>E. coli</i> concentrations, which foster AMR spread.	Argentina	Source of faecal contamination in water is mainly animal residues.
Kalter 2010 [42]	HE, HH	Human use of antibiotics impacts on risk of AMR bacteria carriage in children.	Meat consumption of animals produced commercially drives AMR carriage risk in humans.	Lack of protection of excreta and water play a role in increasing AMR carriage risk in children.	Peru	Individuals taking "any antibiotic" increased children's risk for resistant <i>E. coli</i> . Residence in zones where home-raised chicken was consumed protected against carrying resistant <i>E. coli</i> .
Lowenstein 2016 [43]	AH, HH	Small-scale livestock production could have an impact on the risk of zoonosis and spread of AMR.	Handling and consumption of sick and dead animals: perceived risk factor for AMR spread. Unregulated use of veterinary antimicrobials.	Animal environment sanitation not addressed. Animals and humans sharing water sources and living spaces.	Ecuador	Qualitative study. Handling and consumption of sick and dead animals and over-the-counter purchase of veterinary drugs increase zoonoses risk and AMR spread. Commercial poultry considered less healthy due to antibiotics.

Table 1. Cont.

Citation	One Health Component ¹	Human Contribution to AMR	Animal Contribution to AMR	Environment Contribution to AMR	Location	Important Results (Summary)
Mattiello 2015 [44]	HH, EH	Use of antibiotics as growth promoters. Improper sanitation favours MDR ¹² Salmonella.	Animals' contribution is explained by their carrying AMR pathogenic <i>Salmonella enterica</i> .	Poultry house environment is major contributor to AMR. Environmental isolates showed MDR ¹² to human antibiotics.	Brazil	Poultry house environment produced more AMR isolates. Highest resistance: SA ⁶ . Most resistant isolates: <i>sal</i> genes. Twenty-one isolates with reduced susceptibility to β-lactams and had <i>bla</i> TEM, <i>bla</i> CMY and/or <i>bla</i> CTX-M.
Rodriguez 2015 [45]	AH, HH	Poultry and egg industry malpractices promote dissemination of pathogenic and resistant <i>Salmonella</i> spp.	Hens and eggs carry AMR Salmonella.	Feed and water carried Salmonella. Farm workers' faecal samples collected but not discussed.	Colombia	Salmonella prevalence: 33%; two isolates were MDR ¹² . Farm practices as potential risk factors for Salmonella spread: on-farm feed milling, inappropriate sanitation, egg storage, and inadequate construction material.
Santamaria 2011 [46]	EH, AH	Grassland-based production systems (antibiotics only for disease control) still create reservoirs for AMR bacteria.	Grasslands: cattle are reservoirs of TCN ⁷ resistance genes and are more diverse than environment.	Soil and water are reservoirs of TCN ⁷ resistance genes.	Colombia	Remarkable presence of <i>tet</i> genes. Predominant distribution of <i>tet</i> (W) and <i>tet</i> (Q) in both animal and environmental reservoirs. Probable gene transmission from animals to environment.
dos Veiros 2010 [47]	AH, EH, HH	AMR in aquatic environments increased by indiscriminate use of antimicrobials (human and veterinary).	AMR transferred from animals to humans through food.	AMR transferred from shrimps to the environment (pond water and sediment).	Brazil	More than 90.5% of strains of <i>Escherichia coli</i> showed a variety of AMR profiles.
Miranda 2002 [48]	AH, HH, EH	Prophylactic therapy in Chilean salmon farming produces higher AMR.	Poor fish farming management and incorrect use of antimicrobials.	Water and feed: likely reservoirs of MDR ¹² bacteria.	Chile	Gram-negative OXT ⁸ -resistant bacteria recovered. MDR ¹² was frequent.
Palhares 2014 [49]	HH, AH, EH	Antimicrobials in livestock linked to AMR in animals and humans. Inadequate animal husbandry, agricultural, and environmental practices favour presence of Salmonella.	Farm animals, manure, fish farming, and wild animals contribute to AMR Salmonella spread.	Rain, agricultural runoff, and river flow contribute to AMR Salmonella spread.	Brazil	54 different AMR profiles; 49.5% of isolates with AMR. MDR ¹² : 18% of isolates. Link among animal-based agriculture, Salmonella and AMR.

Table 1. Cont.

Citation	One Health Component ¹	Human Contribution to AMR	Animal Contribution to AMR	Environment Contribution to AMR	Location	Important Results (Summary)
Pehrsson 2016 [50]	HH, EH, AH	Subsistence farming; antibiotic use without prescription and inadequate excreta management favour AMR.	Rural site: backyard farming contributed to AMR spread.	Rural site: soil faecally contaminated with human and animal AMR genes. Limited access to drinking water and sanitation.	Salvador and Peru	Large network of AMR genes shared: microbial communities of humans, animals, and environment.
Lopez ² 2012 [51]	EH, AH	Extensive cattle production impacts environment and animals, creating AMR reservoirs despite low antibiotic use.	TCN ⁷ -resistance genes can flow from animal waste to soil and water.	Faecally contaminated soil can pollute underground and surface water.	Colombia	No differences in isolates from environmental samples vs. animal samples. TCN ⁷ resistance in grasslands likely caused by horizontal gene transfer from animals to environment.
Camotti 2018 [52]	EH, AH	Use of manure as fertiliser drives accumulation of pharmaceutical residues or induces AMR bacteria in soils.	Poultry, cattle, and swine manure contaminate soils and disseminate AMR bacteria.	Fertilised soils contaminate forest soils.	Brazil	Manure application associated with antibiotic residues and AMR in soils. Swine manure had highest antibiotic concentrations. Extended dairy cow grazing linked to high SA ⁶ resistance.
Reende 2014 [53]	AH, EH	Cattle manure recycling may impact animal, human, and environmental health.	Biodigestion of cattle manure does not guarantee "safe" fertiliser.	Effluent use from ambient temperature biogas digesters contaminates soil with AMR bacteria.	Brazil	55.65% of isolated bacteria were MDR ¹² . Some isolates recovered from biogas digester (influent and effluent) were AMR.
Corzo-Arriyama 2019 [54]	HH, EH	Agricultural practices and sewage water contribute to spread of AMR pathogenic <i>E. coli</i> .	Compost use, and animal waste: sources of contamination for pathogenic and resistant strains.	Workers' hands, water, and soil can contaminate produce with pathogenic AMR bacteria.	Mexico	High resistance to TCN ⁷ and AMP ⁹ . 3.5% were MDR ¹² . Potential consumer risk: AMR, pathogenicity, and biofilm formation.
Cicuta 2014 [55]	HH, AH	Human contribution not discussed. ESBL ¹⁰ -producing enterobacteria more frequent in humans and animals.	Animals can carry variety of potentially pathogenic ESBL ¹⁰ -producing enterobacteria.	Water samples collected but not discussed nor linked to other samples.	Argentina	Neither phenotypically ESBL ¹⁰ nor CB ¹¹ -producing bacteria detected.

¹ HH: Human Health; AH: Animal Health; EH: Environmental Health; ² Both publications belong to the same project and share the same sample; ³ Fluoroquinolones; ⁴ Quinolones; ⁵ Nalidixic acid; ⁶ Sulfonamides; ⁷ Tetracyclines; ⁸ Oxetyetracycline; ⁹ Ampicillin; ¹⁰ Extended-spectrum beta-lactamases; ¹¹ Carbapenemase; ¹² Multidrug resistance/multidrug resistant.

Table 2. Basic details of included publications.

Study Characteristics	Number (n =); Included Articles, n (%)	Article Number in References
Quantitative research	20 (95.2)	[35–42,44–55]
Qualitative research	1 (4.8)	[43]
Country of origin		
Brazil	9 (42.9)	[36,38–40,44,47,49,52,53]
Ecuador	3 (14.3)	[35,37,43]
Colombia	3 (14.3)	[45,46,51]
Argentina	2 (9.5)	[41,55]
Chile	1 (4.8)	[49]
Mexico	1 (4.8)	[54]
Peru *	2 (9.5)	[42,50]
El Salvador *	1 (4.8)	[50]
Publication year		
2001–2005	1 (4.8)	[48]
2006–2010	2 (9.5)	[42,47]
2011–2016	13 (61.9)	[35–37,39,43–46,49–51,53,55]
2017–2019	5 (23.8)	[38,40,41,52,54]
Language		
English	21 (100)	[35–55]
Approach used to study AMR		
Microbiological and molecular	6 (28.6)	[35,38,39,44,51,54]
Molecular	2 (9.5)	[46,50]
Microbiological	8 (38.1)	[36,40,41,47–49,53,55]
Microbiological and epidemiological	3 (14.3)	[37,42,45]
Chemical and molecular	1 (4.8)	[52]
Other (qualitative)	1 (4.8)	[43]

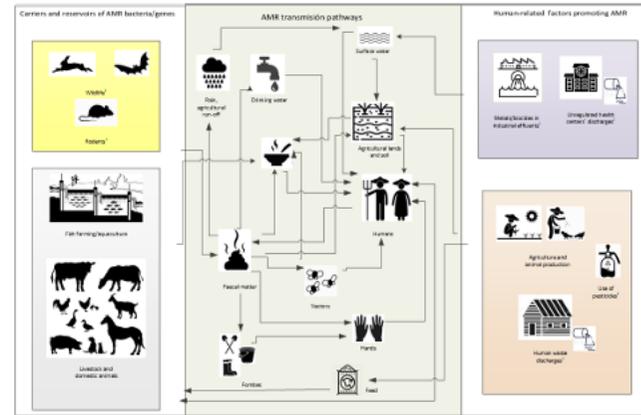
* The study carried out in El Salvador also included Peru.

Table 3. Data collection sources/instruments used in selected publications.

Type of Data Collection	Number (n =); Included Articles, n (%)	Article Number in References
Animal collection (cloacal swabs, faeces, manure, compost, muscle, eggs, veterinary clinical samples)	16 (76.2)	[35–39,42,44–51,53,55]
Environment collection (soil, water, pond mud, surfaces, workers' hands, vectors, feed)	18 (85.7)	[35–42,44–52,54]
Human collection (faeces)	4 (19.1)	[35,42,45,50]
Questionnaires and interviews, observation	4 (19.1)	[37,42,43,45]
Produce collection	1 (4.8)	[54]

3.2. Antimicrobial Resistance through the One Health Lens

Figure 2 shows AMR contributions from animal, environmental, and human domains, applying the OH perspective; it describes how various specific human activities, animal-related factors, and environmental factors are connected based on the information extracted from the selected articles.



* Not represented in the reviewed literature, research gaps

Figure 2. Proposed pathways for the spread of antimicrobials and/or AMR genes in rural settings, based on the publications included in the review.

As shown in Table 1, in most articles, only two OH components were considered, either in the discussion or the description of the sampling procedures. Only Braykov et al. [37], Brisola et al. [38], dos Vieira et al. [47], Miranda et al. [48], and Palhares et al. [49] discussed all three components, but their study designs did not include sampling for all of them. Pehrsson et al. [50] took samples of human, animal, and environmental origin but did not discuss the relevance or impact of their results on animal health.

3.2.1. Human Contribution

Anthropogenic drivers of AMR included intensive and non-intensive (small-scale/extensive) animal production systems [35–51] and agricultural practices [49,50,52–54], such as the use of recycled or composted animal or human manure as fertiliser. Resende et al. [53] showed microbiological evidence of survival of AMR bacteria after biodegradation treatment of cattle manure, which could contaminate soils when applied as fertiliser. Carnotti et al. [52] found that each type of manure used as fertiliser in agricultural soils had a unique concentration of antibiotic residues and AMR genes, specific to the particular animal production system it originated from. Pehrsson et al. [50] and Kalter et al. [42] identified inadequate human excreta management as an important human AMR-promoting factor in rural sites. Only three articles [35,42,50] identified unrestricted, unregulated, or recent use of antimicrobials in humans as a human contribution to the problem. Cicuta et al. [55] did not identify any human input but acknowledged the need to have an interdisciplinary approach to implement human and animal health-oriented research. Only Pehrsson et al. [50] gave direct evidence of the human role in the generation of AMR; they proved that humans modify microbiomes and resistomes in rural settings by interacting with animals and the environment by means of horizontal transfer of AMR determinants.

3.2.2. AMR and Contributions from Animals

Poultry was the most common livestock [35,37,39,42–45,49,50,52], but fish [36,48], swine [38,40–43,49], and cattle [41,42,46,49,51] were also studied. Only dos Vieira et al. [47] focused on AMR in shrimp production. Some studies considered the input of other domestic animal species [41–43,55] such as sheep, ducks, pigeons, horses, dogs, or guinea pigs. Corzo-Ariyama et al. [54] did not specify the type of animal under study; their focus was solely on identifying AMR patterns from bacteria in produce; therefore, they recognised the animal role in the spread of AMR more generally. By far, animal AMR carriage and/or transfer of AMR determinants or bacteria was the most widely identified animal contribution [36–38,44,46–48,50–54], while several studies mentioned the inadequate or unregulated use of veterinary antimicrobials [39–41,43,47–49]. The role of food of animal origin in the spread of AMR bacteria in the human food chain was mentioned as well [35,36,38,39,42,46,47].

In contrast, Cicuta et al. [55] did not acknowledge any of the above-mentioned contributions of animals to the generation and spread of AMR, but only discussed the phenotypic resistance screening results and their likely cellular resistance mechanisms.

Armas-Freire et al. [35], Brisola et al. [38], Campioni et al. [39], Mattiello et al. [44], and Lopez et al. [51] showed strong evidence of the animal role as reservoirs or carriers of AMR genes obtained by molecular methods—allowing identification and comparison of AMR genes [56]—combined with phenotypic resistance testing—based on viable culturable bacteria [57]. Santamaria et al. [46] and Pehrsson et al. [50] used only molecular methods to study AMR, but the latter applied metagenomics to compare entire resistomes. Camotti et al. [52] used a combined molecular and chemical methodology to identify AMR genes and antimicrobial molecules. Braykov et al. [37], Kalter et al. [42], and Rodriguez et al. [45] included an epidemiological methodology and one of them provided sound evidence regarding the risk and protective factors for AMR presence in humans. One of the main risk factors for AMR were children's or household members' recent antibiotic use. At the same time, AMR was less often described among older children and those living in a community where a greater proportion of homes consumed home-raised chicken [42]. Most of the above-mentioned articles proposed a one-way transmission pathway of AMR genes from animals to the environment. However, Brisola et al. [38] and Pehrsson et al. [50] proposed a more complex scenario of interactions where the dissemination of AMR occurs simultaneously and in two opposite directions linking all reservoirs: human, animal, and environmental, although Brisola et al. [38] pointed at the animal reservoir as the origin.

3.2.3. Environment Contribution

More than half of the articles identified water as a contributing factor for AMR spread [36–38,41,42,46–52,54]. Other environmental inputs included: soil [37,38,46,49–54], farm/bird coop's environment (which included surfaces, feed, shoe soles, and/or hands of workers) [37,44,45,54], vectors (flies) [40], and pond sediments [47]. Lopez et al. [51] recognised the importance of soil-containing faeces in the contamination of underground and surface water. Santamaria et al. [46] and Palhares et al. [49] highlighted the importance of runoff in disseminating AMR genes into the environment. Lowenstein et al. [43] considered questions about the use of shared animal-human drinking water sources and shared living spaces. Interestingly, Miranda et al. [48] pointed at feed and influent water—as opposed to effluent water—as reservoirs for AMR bacteria in salmon farms. On the other hand, Armas Freire et al. [35] and Cicuta et al. [55] did not address any environmental contributions to the AMR problem.

Brisola et al. [38], Campioni et al. [39], Mattiello et al. [44], Santamaria et al. [46], Pehrsson et al. [50], Lopez et al. [51], and Camotti et al. [52] produced sound evidence regarding the role of the environment in the maintenance and dissemination of AMR. All these articles agreed that the faecally-contaminated environments are a persistent source or reservoir for AMR bacteria from which AMR could easily disseminate. Most of them considered animals as the contamination source but Pehrsson et al. [50] verified

the contribution of both animal and human faecal matter in this contamination of the environment. Strong microbiological/epidemiological evidence was provided by Braykov et al. [37] and Kalter et al. [42] for the role of the environment in the spread of AMR.

3.3. Information Gaps

As shown in Figure 2, neither of the selected articles investigated nor identified the contribution of effluents of rural hospitals or health services to the environment and their impact on rural populations, animals, and ecosystems. Four articles included human faecal samples in their studies, but human waste collective discharges were not sampled. Likewise, the link between mining and AMR in rural settings was not the focus of any of the eligible studies, despite the role of metals as drivers of AMR [12] and the contribution of mining to metal pollution [58,59]. Moreover, wild animal reservoirs and/or their contribution to the AMR problem in rural locations were not discussed in the selected articles. Even though many studies published in Portuguese or Spanish language were found at the initial steps of the search, none of them met the inclusion criteria, so they were not represented in our selection.

4. Discussion

This review identified key contributors to AMR in LA considering the OH concept. The following anthropogenic activities were identified as drivers for AMR dissemination in rural Latin American settings: animal husbandry, fish farming, agriculture, and other related practices such as animal waste recycling. The carriage and/or transfer of AMR determinants were the most frequent animal contributions, in addition to the inadequate or unregulated use of veterinary antimicrobials and the role of food of animal origin in the spread of AMR bacteria in the human food chain. Water was the most commonly identified environmental contributor for AMR spread but also soil, farm/bird coops, vectors (flies), and pond sediments were also important contributors mentioned.

Nearly half of the eligible studies showed robust evidence confirming the human, animal, or environmental contributions to the generation or the spread of AMR. However, only one study [50] provided evidence embracing a OH framework to suggest a global scenario in which all the reservoirs—human, animal, and environmental—contribute to the problem, sharing AMR genes through horizontal transfer. Rather than illustrating a mere pathway, this work embraces the numerous interactions between human, animal, and environmental domains portraying an intricate network of AMR spread. Pehrsson et al. [50] took samples of human, animal, and environmental origin simultaneously and compared their resistomes, allowing them to produce strong evidence for the interconnectedness of human, animal, and environmental drivers of AMR. As these AMR drivers converge, the environment might function as both a reservoir and a bridge for antimicrobial determinants giving rise to other potential pathways of AMR transmission to non-contaminated wildlife, humans, and animals [12].

Most of the assessed articles studied the AMR problem from a single viewpoint or emphasised one of the OH components. Five studies [37,38,47–49] considered the importance of animal, human, and environment inputs to the AMR generation and spread, but did not collect samples from all these interconnected sources or omitted discussing the results in an integrated manner. The reasons were not explicit.

One of the most important insights from our study is the scarce research on humans or human waste as sources of AMR determinants in rural locations described in the Latin American literature. Studies focusing on AMR in rural health centres or rural hospitals were not found in the articles eligible for analysis. However, the impacts of rural hospital effluents on the environment and hence, on human and animal microbiomes cannot be ignored [60], mainly because wastewater collection and treatment in rural settings are significantly reduced or absent compared to urban settings in LA [61,62].

We found some information gaps in the selected literature. Mining is an important economic activity in many countries in LA [63] and it has been identified as a contributor

to the spread of AMR, however, we did not find any studies on the topic. Mining activities lead to the release of metal-containing effluents into the environment, driving AMR in bacteria due to shared mechanisms of resistance to both metals and antimicrobials [12].

Wildlife is a neglected likely significant contributor to the spread of AMR in rural LA. Although it was not identified as a contributor in the eligible articles, the interaction between humans, wild animals, and farm and domestic animals occurs in rural settings, sharing AMR bacteria [64]. Thus, studying wild animals' AMR gene sources and their genetic similarity in farm animals, human, and environmental reservoirs in LA, should be the focus for future research worth working on. More public health research focusing on wildlife is needed to better understand the impacts of human activities on the environment (habitat fragmentation, land-use change, urbanisation) and the role of wildlife species—as reservoirs, melting pots, and/or vectors for AMR determinants—in the dissemination of resistance [65]. Our findings underscore the importance of adopting an OH approach as a framework for the design of future studies aimed at understanding the interconnections among its three components to assess AMR more efficiently and propose better strategies to prevent AMR emergence in LA.

Only one article used qualitative methods [43]. Qualitative approaches are useful when trying to elucidate the reasons behind practices, knowledge, attitudes and perceptions, and prove useful in understanding the complexity of AMR transmission pathways. We suggest incorporating a qualitative approach in AMR research since it could be a significant added value to quantitative studies. Mixed-methods approaches allow researchers to identify any contradictions between the quantitative and qualitative findings [66], and could be valuable for identifying deficiencies in sanitation and biosecurity practices in animal production and agricultural systems, knowledge and attitudes regarding these practices, and the structural and economic limitations contributing to AMR dissemination in LA rural settings.

On the other hand, the most robust evidence for the role of animals, humans, and/or the environment in the spread of AMR originated from studies combining molecular methods, phenotypic resistance screening methods, sound study design and sampling, and an integrated OH perspective. A few studies relied upon a combined phenotypic resistance testing and an epidemiological approach, thus identifying risk factors and protective factors for AMR. However, due to the limitations of culturing in assessing AMR, they could not give insight into the specific AMR determinants associated with the AMR phenotypes [56]. Phenotypic resistance profiling enables cultivation of target bacteria. However, assessing AMR through culture-based methods carries an inherent bias since these methods cannot detect cells in a viable but non-culturable state [57]. In contrast, molecular methods provide information regarding the underlying mechanism of resistance, identifying the determinants for that resistance, even if they are not always expressed in the host bacteria [56,67]. In addition, with the use of genomic tools, typing, comparing, and tracing specific allele profiles, it is now possible [68]. Thus, it is necessary to apply molecular methods along with phenotypic profiling methods to have a more detailed and complete picture when assessing AMR [57]. We believe that studies focusing on the total environment using microbiological, epidemiological, and molecular approaches in an integrative way are needed to better understand the existence of a network of interconnected transmission routes. Additionally, given the cross-sectional nature of the eligible studies, they could not demonstrate the directionality of their proposed pathways of transmission of AMR, which—in most cases—pointed at a one-way path only, from animals to the environment.

It is important to note that only one study in Brazil [47], mentioned that local governmental agencies were concerned with the results of the antibiotics' indiscriminate use in aquaculture. However, no other mention was made to the uptake of research findings by local authorities or any other local actors in any sector. This finding may imply the need of a more effective dissemination of scientific findings from academia to government agencies and local actors in LA. Likewise, an OH approach to provide robust evidence on AMR

emergence and transmission is key to translate AMR's research results when designing public health and animal production policies.

We did not include grey literature, which we believe would have enriched our findings. There was no systematic way to search for country-level surveillance reports. Since most literature reviews only include publications in the English language, we purposely looked for articles produced in LA written in Spanish and Portuguese languages, finding a considerable number during the screening process. However, none of them fulfilled the eligible criteria for this review. This limitation may be due to the kind of settings in which these studies have been conducted—urban as opposed to rural—and the AMR perspective applied, which may be one-sided, favouring any of the OH components but not comprising the three domains, as we specified in our inclusion criteria. Since AMR was recognised as a global threat to public health, virtually all countries adopted a national action plan to tackle the problem [69]; however, actions developed in LA may not have had an explicit focus on an integrated OH approach.

Other reasons may explain the scarcity of truly integrated OH research works in LA—as in other low- and middle-income regions. Establishing OH research involves facing barriers such as lack of OH training and expertise, and difficulty in establishing collaboration among multiple and cross-sectoral actors—resulting in scarcity of multidisciplinary training programs—and limited government support and research funding [70,71]. Funding bias could partially explain the absence of articles written in these languages: most comprehensive and well-funded AMR studies adopting an OH approach tended to be published in English.

5. Conclusions

This scoping review on AMR in rural settings in LA identified the human, animal, and environmental contributions to AMR using an OH lens, and pinpointed the information gaps on AMR transmission routes and AMR drivers in the literature. Human activities contributed to the spread of AMR through animal husbandry (mainly poultry), fish farming, agriculture, and animal waste recycling (composting). Farm animals contributed by carrying and/or transferring resistant genes or resistant bacteria. Main environmental contributors are faecally-contaminated water, contaminated soil or pond sediments, and farm environments.

Adopting an OH lens proved useful as a framework to determine whether the selected articles considered the impact of AMR on the three aspects of health, animal, human, and environment, and to what extent they did so. However, a small percentage of articles took into account the three OH components in the sampling or in the discussion. Thus, we recommend following the OH approach as a framework for the design of future studies—emphasising on the use of mixed methods and a combination of approaches—molecular-, epidemiological-, and culture-based—to tackle AMR more efficiently and to tailor strategies to prevent AMR emergence in the region, where these efforts are still scant and considerably needed.

Future research efforts should give more attention to the role of mining, wildlife, and rural hospitals' or health services' effluents on the emergence and spread of AMR in rural Latin America, given that these aspects were not identified in the selected literature and were considered information gaps.

Author Contributions: M.L.M.-P. and S.M.H. conceived the original idea for this review; D.M. and S.M.H. obtained the funding; M.L.M.-P., S.M.H., G.S.-M., M.R. and A.L. analysed and interpreted the data; M.L.M.-P. wrote the first draft of the manuscript; S.M.H., G.S.-M., M.R., A.L. and D.M. interpreted the data, contributed to the writing and performed critical revisions of the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study received financial support from the Novartis Foundation (grant number 18A059). The sponsor had no involvement in the decision to submit the article for publication.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board for humans and animal subjects of the Universidad Peruana Cayetano Heredia, protocol code 418-16-18.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in Table 1. Additional data are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Appendix A

Table A1 shows the full electronic search strategy used in this review.

Table A1. Keywords (with synonyms) and syntax used for the literature search.

#1: "Antimicrobial Resistance" Terms	#2: "Type of Geographical Setting" Terms	#3: "Environmental" Terms	#4: "Animal Handling or Agriculture" Terms	#5: "Countries in LA" Terms	#6: Combined Search
("antimicrobial drug resistances" OR "antimicrobial drug resistance" OR "antibiotic resistance" OR "drug resistances, microbial") OR "antibiotic resistance, microbial" OR "antimicrobial resistance" AND	(rural OR "rural populations" OR "rural settings" OR "antibiotic resistance, microbial" OR "antimicrobial resistance" AND	(environment * OR water OR soil OR lixiviation) AND	("animal production" OR animal OR livestock OR agricultural * OR "animal husbandry" OR poultry OR food) AND	(Argentina OR Bolivia OR Brazil OR Chile OR Colombia OR "Costa Rica" OR Cuba OR "Dominican Republic" OR Ecuador OR "El Salvador" OR Guatemala OR Haiti OR Honduras OR Mexico OR Nicaragua OR Panama OR Paraguay OR Peru OR Uruguay OR Venezuela)	#1 AND #2 AND #3 AND #4 AND #5

References

- Yewale, V.N. Antimicrobial resistance—A ticking bomb? *Indian Pediatr.* **2014**, *51*, 171–172. [CrossRef] [PubMed]
- WHO. *Global Action Plan on Antimicrobial Resistance*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2015; Volume 28.
- Nadimpalli, M.; Delarocque-Astagneau, E.; Love, D.C.; Price, L.B.; Huynh, B.-T.; Collard, J.-M.; Lay, K.S.; Borand, L.; Ndir, A.; Walsh, T.; et al. Combating Global Antibiotic Resistance: Emerging One Health Concerns in Lower- and Middle-Income Countries. *Clin. Infect. Dis.* **2018**, *66*, 963–969. [CrossRef]
- Schmanis, G.A. *Prologo. Resistencia Antimicrobiana en las Americas: Magnitud del Problema y su Contencion*; Organizacion Panamericana de la Salud: Washington, DC, USA, 2000.
- Hoelzer, K.; Wong, N.; Thomas, J.; Talkington, K.; Jungman, E.; Coukell, A. Antimicrobial drug use in food-producing animals and associated human health risks: What, and how strong, is the evidence? *BMC Veter. Res.* **2017**, *13*, 211. [CrossRef] [PubMed]
- WHO. Antimicrobial Resistance: Fact Sheets. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> (accessed on 3 February 2021).
- World Organization for Animal Health. *International Partnership to Address Human-Animal-Environment Health Risks Gets a Boost*; OIE—World Organisation for Animal Health n.d.; Paris, France, 2018.
- World Organization for Animal Health. One Health: OIE—World Organisation for Animal Health n.d. Available online: <https://www.oie.int/en/for-the-media/onehealth/> (accessed on 21 April 2021).
- Lebov, J.; Grieger, K.; Womack, D.; Zaccaro, D.; Whitehead, N.; Kowalecyk, B.; MacDonald, P. A framework for One Health research. *One Health* **2017**, *3*, 44–50. [CrossRef] [PubMed]
- Cumming, D.H.M.; Cumming, G.S. One Health: An ecological and conservation perspective. In *One Health: The Theory and Practice of Integrated Health Approaches*; CAB: Wallingford, UK, 2015; pp. 38–52.
- Organización Mundial de la Salud. *Estrategia Mundial de la OMS para Contener la Resistencia a los Antimicrobianos*; CDS Centro de Recursos de Información, Organización Mundial de la Salud: Geneva, Switzerland, 2001. [CrossRef]
- Singer, A.C.; Shaw, H.; Rhodes, V.; Hart, A. Review of Antimicrobial Resistance in the Environment and Its Relevance to Environmental Regulators. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1728. [CrossRef]

- Rousham, E.K.; Unicomb, L.; Islam, M.A. Human, animal and environmental contributors to antibiotic resistance in low-resource settings: Integrating behavioural, epidemiological and One Health approaches. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **2018**, *285*, 20180332. [CrossRef]
- Wall, B.A.; Mateus, A.; Marshall, L. *Pfeiffer du. Drivers, Dynamics and Epidemiology of Antimicrobial Resistance in Animal Production*; FAO: Rome, Italy, 2016.
- Ma, F.; Xu, S.; Tang, Z.; Li, Z.; Zhang, L. Use of antimicrobials in food animals and impact of transmission of antimicrobial resistance on humans. *Biosaf. Health* **2021**, *3*, 32–38. [CrossRef]
- Huygens, J.; Daeseleire, E.; Mahillon, J.; Van Elst, D.; Decrop, J.; Meirlaen, J.; Dewulf, J.; Heyndrickx, M.; Rasschaert, G. Presence of Antibiotic Residues and Antibiotic Resistant Bacteria in Cattle Manure Intended for Fertilization of Agricultural Fields: A One Health Perspective. *Antibiotics* **2021**, *10*, 410. [CrossRef]
- Arenas, N.E.; Melo, V.M. Producción pecuaria y emergencia de antibiótico resistencia en Colombia: Revisión sistemática. *Infectio* **2018**, *22*, 110–119. [CrossRef]
- Watts, J.E.M.; Schreier, H.F.; Lanska, L.; Hale, M.S. The Rising Tide of Antimicrobial Resistance in Aquaculture: Sources, Sinks and Solutions. *Mar. Drugs* **2017**, *15*, 158. [CrossRef]
- Cabello, F.C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: A growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ. Microbiol.* **2006**, *8*, 1137–1144. [CrossRef]
- Sosa, A. Antibiotic Policies in Developing Countries. In *Antibiotic Policies*; Springer Science and Business Media LLC: Berlin/Heidelberg, Germany, 2005; pp. 593–616.
- Wolff, M. Use and Misuse of Antibiotics in Latin America. *Clin. Infect. Dis.* **1993**, *17*, S346–S351. [CrossRef] [PubMed]
- Grace, D. *Review of Evidence on Antimicrobial Resistance and Animal Agriculture in Developing Countries*; Evidence on Demand: UK, 2015. Available online: <https://cgspage.cgiar.org/handle/10568/67092> (accessed on 5 August 2021). [CrossRef]
- Miranda, J.; Pinto, J.; Faustino, M.; Sánchez-Jacinto, B.; Ramirez, F. Resistencia antimicrobiana de uropatógenos en adultos mayores de una clínica privada de Lima, Perú. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública* **2019**, *36*, 87–92. [CrossRef] [PubMed]
- Granda, A.; Riveros, M.; Martínez-Puchol, S.; Ocampo, K.; Laureano-Adame, L.; Corujo, A.; Reyes, L.; Ruiz, J.; Ochoa, T.J. Presence of Extended-Spectrum β -lactamase, CTX-M-65 in Salmonella enterica serovar Infantis Isolated from Children with Diarrhea in Lima, Peru. *J. Pediatr. Infect. Dis.* **2019**, *14*, 194–200. [CrossRef]
- Pribul, B.R.; Festivo, M.L.; Souza, M.; Rodrigues, D.D.P. Characterization of quinolone resistance in Salmonella spp. isolates from food products and human samples in Brazil. *Braz. J. Microbiol.* **2016**, *47*, 196–201. [CrossRef]
- Hartinger, S.; Medina-Pizzali, M.; Salmon-Mulanovich, G.; Larson, A.; Pinedo-Bardales, M.; Verastegui, H.; Riberos, M.; Misusezahl, D. Antimicrobial Resistance in Humans, Animals, Water and Household Environments in Rural Andean Peru: Exploring Dissemination Pathways through the One Health Lens. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 4604. [CrossRef] [PubMed]
- Alzamora, M.C.; Echevarría, A.C.; Ferraro, V.M.; Riveros, M.D.; Zambruni, M.; Ochoa, T.J. Resistencia antimicrobiana de cepas comensales de Escherichia coli en niños de dos comunidades rurales peruanas. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública* **2019**, *36*, 459–464. [CrossRef]
- Graham, J.P.; Eisenberg, J.N.; Trueba, G.; Zhang, L.; Johnson, T. Small-Scale Food Animal Production and Antimicrobial Resistance: Mountain, Molehill, or Something in-between? *Environ. Health Perspect.* **2017**, *125*, 104501. [CrossRef]
- Benavides, J.A.; Streicker, D.G.; Gonzales, M.S.; Rojas-Paniagua, E.; Shiva, C. Knowledge and use of antibiotics among low-income small-scale farmers of Peru. *Prev. Veter. Med.* **2021**, *189*, 105287. [CrossRef]
- Penakalapati, G.; Swarthout, J.; Delahoy, M.J.; McAliley, L.; Wodnik, B.; Levy, K.; Freeman, M.C. Exposure to Animal Feces and Human Health: A Systematic Review and Proposed Research Priorities. *Environ. Sci. Technol.* **2017**, *51*, 11537–11552. [CrossRef] [PubMed]
- Tricco, A.C.; Lillie, E.; Zarin, W.; O'Brien, K.K.; Colquhoun, H.; Levac, D.; Moher, D.; Peters, M.; Horsley, T.; Weeks, L.; et al. PRISMA Extension for Scoping Reviews (PRISMA-ScR): Checklist and Explanation. *Ann. Intern. Med.* **2018**, *169*, 467–473. [CrossRef]
- Peters, M.D.J.; Godfrey, C.M.; Khalil, H.; McInerney, P.; Parker, D.; Soares, C.B. Guidance for conducting systematic scoping reviews. *Int. J. Evid.-Based Health* **2015**, *13*, 141–146. [CrossRef]
- Elsevier. *Reference Manager and Academic Social Network—Mendeley Database*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2021.
- World Health Organization. Antimicrobial Resistance n.d. Available online: <https://www.who.int/health-topics/antimicrobial-resistance> (accessed on 30 March 2021).
- Armas-Freire, P.L.; Trueba, G. Unexpected distribution of the fluoroquinolone-resistance gene qnrB in Escherichia coli isolates from different human and poultry origins in Ecuador. *Int. Microbiol.* **2015**, *18*, 85–90. [CrossRef]
- Barbosa, M.M.C.; Pinto, F.D.R.; Ribeiro, L.F.; Guriz, C.S.L.; Ferraudo, A.S.; Maluta, R.P.; Rigobelo, E.C.; Ávila, F.A.; Amaral, L.A. Sorologia e susceptibilidade antimicrobiana em isolados de Escherichia coli de pesque-pagues. *Arq. Inst. Biológico* **2014**, *81*, 43–48. [CrossRef]
- Braykov, N.P.; Eisenberg, J.N.S.; Grossman, M.; Zhang, L.; Vasco, K.; Cevallos, W.; Muñoz, D.; Acevedo, A.; Moser, K.A.; Marrs, C.F.; et al. Antibiotic Resistance in Animal and Environmental Samples Associated with Small-Scale Poultry Farming in Northwestern Ecuador. *mSphere* **2016**, *1*, e00021-15. [CrossRef] [PubMed]
- Brisola, M.C.; Creccencio, R.B.; Bitner, D.S.; Frigo, A.; Rampazzo, L.; Stefani, L.M.; Faria, G.A. Escherichia coli used as a biomarker of antimicrobial resistance in pig farms of Southern Brazil. *Sci. Total Environ.* **2019**, *647*, 362–368. [CrossRef]

39. Campioni, F.; Zeldan, M.M.; Falcão, J.P. Characterization of *Salmonella* Enteritidis strains isolated from poultry and farm environments in Brazil. *Epidemiol. Infect.* **2014**, *142*, 1403–1410. [CrossRef] [PubMed]
40. Cervelin, V.; Fongaro, G.; Pastore, J.; Engel, F.; Reimers, M.; Viancelli, A. Enterobacteria associated with houseflies (*Musca domestica*) as an infection risk indicator in swine production farms. *Acta Trop.* **2018**, *185*, 13–17. [CrossRef]
41. Gambero, M.L.; Blarasin, M.; Bettera, S.; Albo, J.G. Tracing contamination sources through phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from surface water and groundwater in an agro-ecosystem. *Hydrobiol. Sci. J.* **2018**, *63*, 1150–1161. [CrossRef]
42. Kalter, H.D.; Cabrera, L.; Gilman, R.H.; Velapato, B.; Moulton, L.; Cullotta, A.R. Risk Factors for Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Carriage in Young Children in Peru: Community-Based Cross-Sectional Prevalence Study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2010**, *82*, 879–888. [CrossRef]
43. Lowenstein, C.; Roess, A.; Leibler, J.H.; Graham, J.P.; Waters, W.F. Animal Husbandry Practices and Perceptions of Zoonotic Infectious Disease Risks Among Livestock Keepers in a Rural Parish of Quito, Ecuador. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2016**, *95*, 1450–1458. [CrossRef]
44. Mattiello, S.P.; Drescher, G.; Barth, V.C.; Ferreira, C.A.S.; Oliveira, S.D. Characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* strains isolated from Brazilian poultry production. *Antonie Leeuwenhoek* **2015**, *108*, 1227–1238. [CrossRef] [PubMed]
45. Rodriguez, R.; Fandino, C.; Donado, P.; Guzman, L.; Verjan, N. Characterization of *Salmonella* from Commercial Egg-Laying Hen Farms in a Central Region of Colombia. *Asian Dis.* **2015**, *59*, 57–63. [CrossRef] [PubMed]
46. Santamaria, J.; López, L.; Soto, C.Y. Detection and diversity evaluation of tetracycline resistance genes in grassland-based production systems in Colombia, South America. *Front. Microbiol.* **2011**, *2*, 252. [CrossRef]
47. Vieira, R.H.S.D.F.; Carvalho, E.M.R.; Carvalho, F.C.T.; Silva, C.M.; Sousa, O.; Rodrigues, D.P. Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and pond environment in northeastern Brazil. *J. Environ. Sci. Health Part B* **2010**, *45*, 198–203. [CrossRef] [PubMed]
48. Miranda, C.D.; Zemelman, R. Antimicrobial multiresistance in bacteria isolated from freshwater Chilean salmon farms. *Sci. Total Environ.* **2002**, *293*, 207–218. [CrossRef]
49. Palhares, J.C.P.; Kich, J.D.; Bessa, M.; Biesus, L.L.; Berno, L.G.; Triques, N.J. *Salmonella* and antimicrobial resistance in an animal-based agriculture river system. *Sci. Total Environ.* **2014**, *472*, 654–661. [CrossRef] [PubMed]
50. Pehrsson, E.; Tsukayama, P.; Patel, S.; Mejia-Bautista, M.; Sosa-Soto, G.; Navarrete, K.M.; Calderon, M.; Cabrera, L.; Hoyos-Arango, W.; Bertoli, M.T.; et al. Interconnected microbiomes and resistomes in low-income human habitats. *Nat. Cell Biol.* **2016**, *533*, 212–216. [CrossRef]
51. López, L.; Santamaria, J.; Sanchez, A.; Castro, L.; Moreno, J.L. Presence of tetracycline resistant bacteria and genes in grassland-based animal production systems. *Cienc. Investig. Agrar.* **2012**, *39*, 411–423. [CrossRef]
52. Bastos, M.C.; Dos Santos, D.R.; Aubertheau, E.; Lima, J.A.M.D.C.; Le Guel, T.; Caner, L.; Mondameri, L.; Labanowski, J. Antibiotics and microbial resistance in Brazilian soils under manure application. *Land Degrad. Dev.* **2018**, *29*, 2472–2484. [CrossRef]
53. Resende, J.A.; Silva, V.L.; de Oliveira, T.L.R.; Fortunato, S.D.O.; Carneiro, J.D.C.; Otieno, M.H.; Diniz, C.G. Prevalence and persistence of potentially pathogenic and antibiotic resistant bacteria during anaerobic digestion treatment of cattle manure. *Bioresour. Technol.* **2014**, *153*, 284–291. [CrossRef]
54. Corzo-Arriyama, H.A.; Garcia-Heredia, A.; Heredia, N.; Garcia, S.; León, J.; Jaykus, L.; Solis-Soto, L. Phylogroups, phenotypes, biofilm formation and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates in farms and packing facilities of tomato, jalapeño pepper and cantaloupe from Northern Mexico. *Int. J. Food Microbiol.* **2019**, *290*, 96–104. [CrossRef]
55. Ciuta, M.E.; Roibón, W.R.; Barceló, M.C.; Arzu, O.R.; Amable, V.I. Beta-lactam resistance in enterobacteria isolated from animal and water. *Rev. Veter.* **2014**, *25*, 3–6. [CrossRef]
56. World Health Organization. *Molecular Methods for Antimicrobial Resistance (AMR) Diagnostics to Enhance the Global Antimicrobial Resistance Surveillance System*; WHO: Geneva, Switzerland, 2019. Available online: <https://doi.org/10.16309/j.cnki.issn.1007-1776.2003.03.004> (accessed on 30 March 2021).
57. McLain, J.E.; Cytryn, E.; Durso, L.M.; Young, S. Culture-based Methods for Detection of Antibiotic Resistance in Agroecosystems: Advantages, Challenges, and Gaps in Knowledge. *J. Environ. Qual.* **2016**, *45*, 432–440. [CrossRef] [PubMed]
58. Fashola, M.O.; Ngole-Jeme, V.M.; Babalola, O.O. Heavy Metal Pollution from Gold Mines: Environmental Effects and Bacterial Strategies for Resistance. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2016**, *13*, 1047. [CrossRef]
59. Quispe-Zamiga, M.R.; Santos, F.; Callo-Concha, D.; Greve, K. Impact of Heavy Metals on Community Farming Activities in the Central Peruvian Andes. *Minerals* **2019**, *9*, 647. [CrossRef]
60. Rodriguez-Mozaz, S.; Chamorro, S.; Martí, E.; Huerta, B.; Gros, M.; Sánchez-Melsió, A.; Borrego, C.; Barceló, D.; Balcazar, J.L. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. *Water Res.* **2015**, *69*, 234–242. [CrossRef] [PubMed]
61. Martín-Hurtado, R.; Nolasco, D. Managing Wastewater as a Resource in Latin America and the Caribbean. *Int. J. Water Resour. Dev.* **2016**, *14*, 293–303.
62. Balcazar, C. *Agua y Saneamiento Para las Zonas Programadas de Agua y Saneamiento Marginales Urbanas de América Latina*; Water and Sanitation Program: Washington, DC, USA, 2008.
63. Evidence and lessons from Latin America (ELLA). Mining in Latin America: Attracting Quantity and Quality in FDI. *WOM Min. E-J.* **2011**, *1*, 1–6.

64. Subbiah, M.; Caudell, M.A.; Mair, C.; Davis, M.A.; Matthews, L.; Quinlan, R.J.; Quinlan, M.B.; Lyimo, B.; Buza, J.; Keyyu, J.; et al. Antimicrobial resistant enteric bacteria are widely distributed amongst people, animals and the environment in Tanzania. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 228. [CrossRef]
65. Dolejska, M.; Literak, I. Wildlife Is Overlooked in the Epidemiology of Medically Important Antibiotic-Resistant Bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*, e01167–19. [CrossRef]
66. Coyne, L.A.; Latham, S.M.; Dawson, S.; Donald, I.J.; Pearson, R.B.; Smith, R.F.; Williams, N.J.; Pinchbeck, G.L. Exploring Perspectives on Antimicrobial Use in Livestock: A Mixed-Methods Study of UK Pig Farmers. *Front. Veter. Sci.* **2019**, *6*, 257. [CrossRef] [PubMed]
67. Luby, E.; Ihekwe, A.; Zilles, J.; Pruden, A. Molecular Methods for Assessment of Antibiotic Resistance in Agricultural Ecosystems: Prospects and Challenges. *J. Environ. Qual.* **2016**, *45*, 441–453. [CrossRef] [PubMed]
68. Hendriksen, R.S.; Bortololaia, V.; Tate, H.; Tyson, G.H.; Aarestrup, F.; McDermott, P.F. Using Genomics to Track Global Antimicrobial Resistance. *Front. Public Health* **2019**, *7*, 242. [CrossRef] [PubMed]
69. Marston, H.D.; Dixon, D.M.; Knisely, J.M.; Palmore, T.N.; Fauci, A.S. Antimicrobial Resistance. *JAMA* **2016**, *316*, 1193–1204. [CrossRef] [PubMed]
70. McKenzie, J.S.; Dahal, R.; Kalkar, M.; Debnath, N.; Rahman, M.; Dorjee, S.; Naeem, K.; Wijayathilaka, T.; Sharma, B.K.; Maidanwal, N.; et al. One Health research and training and government support for One Health in South Asia. *Infect. Ecol. Epidemiol.* **2016**, *6*, 33842. [CrossRef]
71. Ribeiro, C.D.S.; van de Burgwal, L.; Regeer, B. Overcoming challenges for designing and implementing the One Health approach: A systematic review of the literature. *One Health* **2019**, *7*, 100085. [CrossRef]

Anexo H: Antimicrobial Resistance in Humans, Animals, Water and Household Environs in Rural Andean Peru: Exploring Dissemination Pathways through the One Health Lens



Article

Antimicrobial Resistance in Humans, Animals, Water and Household Environs in Rural Andean Peru: Exploring Dissemination Pathways through the One Health Lens

Stella M. Hartinger ^{1,2,3,*}, Maria Luisa Medina-Pizzali ¹, Gabriela Salmon-Mulanovich ^{1,4}, Anika J. Larson ^{1,5}, Maria Pinedo-Bardales ⁶, Hector Verastegui ^{1,2,3}, Maribel Riveros ⁷ and Daniel Müsezahl ^{2,3}

- ¹ School of Public Health and Administration, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima 15102, Peru; maria.medina.p@upch.pe (M.L.M.-P.); hector.verastegui@uinvestph.d (H.V.)
 - ² Department of Epidemiology and Public Health, Swiss Tropical and Public Health Institute, 4002 Basel, Switzerland; daniel.muesezahl@humbas.ch
 - ³ Swiss Tropical and Public Health Institute, University of Basel, 4001 Basel, Switzerland
 - ⁴ Institute for Nature, Earth and Energy, Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima 15102, Peru; gsalmon@pucp.edu.pe
 - ⁵ School of Medicine, University of Washington, Seattle, WA 98195, USA; larsona@uw.edu
 - ⁶ Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima 15102, Peru; maria.pinedo@upch.pe
 - ⁷ School of Medicine, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima 15102, Peru; maribel.riveros@upch.pe
- * Correspondence: stella.hartinger@upch.pe



Citation: Hartinger, S.M.; Medina-Pizzali, M.L.; Salmon-Mulanovich, G.; Larson, A.J.; Pinedo-Bardales, M.; Verastegui, H.; Riveros, M.; Müsezahl, D.

Antimicrobial Resistance in Humans, Animals, Water and Household Environs in Rural Andean Peru: Exploring Dissemination Pathways through the One Health Lens. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 4604. <https://doi.org/10.3390/ijerph18094604>

Academic Editors: Aneta Nowakowicz and Sebastian Gut

Received: 4 February 2021
Accepted: 12 April 2021
Published: 27 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Antimicrobial resistance (AMR) has been labelled a public health threat, particularly for developing economies [1]. Treatment failures caused by AMR result in an increased risk of mortality and unnecessary burden to healthcare infrastructure, among others [2,3]. The AMR consequences for the health systems and patient health outcomes [4–6] are a policy challenge that directly influences community life. As the threat of AMR grows for many infectious diseases, filling the research gaps of AMR in Peru is essential.

Escherichia coli (*E. coli*)—and other commensal and enteric bacteria—may play a key role in the propagation of AMR genes. [7] Since fecal microbiota serves as the reservoir of these genes [8], which could be transferred to pathogenic organisms [9], the risk for resistant infections in the community increases. Multiple studies in Peru reported growing rates of AMR in commensal and enteric bacteria [10–12]. Many AMR genes significant in clinical settings are believed to have originated from non-pathogenic bacteria [13]. Resistance to ampicillin, cotrimoxazole, tetracycline, chloramphenicol, nalidixic acid and ciprofloxacin was reported in *E. coli* recovered among children in a periurban population in Peru [14]. Likewise, there is evidence of AMR in enterobacteria found in children across different environments: rural towns of the Amazon and Andean regions, periurban slums in desert coastal cities, and villages in the Amazon region [15–17]. Nevertheless, most of the evidence for AMR in human populations is focused on urban and periurban settings rather than rural areas [15]. On the other hand, extended-spectrum β -lactamases (ESBL) production is common in *E. coli* and other enterobacteria. ESBL-producing microorganisms cause high-mortality infections, given that ESBL hydrolyses the therapeutically important carbapenems and other beta-lactam antibiotics. As a result, therapeutic options available are greatly narrowed down [18].

The increase in AMR worldwide is a result of inappropriate antibiotics prescription by healthcare providers, treatment adherence among patients who do not use the antibiotics as prescribed, over-the-counter availability of antibiotics without a prescription [19], the inadequate use of antimicrobials in animal production, and the absence of integrated surveillance programs for antimicrobial resistance [20], which should focus on humans, animals and the environment [21]. In addition, unhygienic living conditions and the exposure to untreated or poorly treated water aggravate the AMR problem in developing countries [18], especially in rural settings [17].

The amount of antimicrobials used in animal production exert environmental pressure favoring the generation, and spread of AMR bacteria through different routes, mainly soil, water, food and farm animals [19,22,23]. Food-producing animals are commonly carriers of AMR and MDR bacteria, causing dissemination of AMR into humans—farm workers being at a higher risk—and ecosystems [7]. Sewage and surface water contaminated with sewage effluents are commonly used in the irrigation of crops, and animal drinking supply, driving the spread and maintenance of AMR bacteria in the environment [24]. Other factors prompting AMR include environmental contamination with industrial effluents containing metals and biocides, and the use of pesticides in agriculture, which can select for AMR genes in bacteria [25]. The lack of water treatment in the households, [17] consumption of conventional chicken—raised with antibiotics—[16] and the presence of antibiotics in dairy products [26] are factors favoring the dissemination of AMR in Peruvian ecosystems.

The One Health concept recognizes that “human health and animal health are interdependent and bound to the health of the ecosystems in which they exist” [27]. It has been specifically proposed as a framework to address AMR by the World Health Organization (WHO), the Food and Agriculture Organization, and the World Organization for Animal Health [28,29]. The WHO 2018 report on antimicrobial use and AMR, recommended their surveillance under a One Health approach [30]. While there are existing regulations on the use of antimicrobials for animal production in Peru, these are not closely enforced [26]. Regulations center on the types of antibiotics used and the detection of residue in products for human consumption and are also included in the National Plan to Confront Antimicrobial Resistance [31]. Furthermore, there are several additional barriers to implementing this

2.2.3. Questionnaires

We created and applied a questionnaire that considered the One Health approach to identify the transmission pathways to explain AMR dissemination. Trained fieldworkers applied the questionnaire to collect information on AMR dissemination pathways, household hygiene practices, household water management, recent antibiotic use by household members, animal management, and agricultural practices to identify routes for the spread of AMR in rural settings.

2.3. Data Analysis

The data was entered in the Census and Survey Processing System (CS Pro 6.3) and exported to Stata 15 Statistical software (STATA CORP, College Station, TX, USA) for analysis. We carried out a descriptive analysis, and compared the frequencies of AMR bacterial types between human, animal, and environmental sources. We assessed AMR patterns identified in the household drinking water samples and animal samples from the same site and water sources from the area.

2.4. Ethics

Human (418-16-18) and Animal (010-03-20) ethical review boards from the Universidad Peruana Cayetano Heredia approved the study. Each participant signed a written informed consent, agreeing to participate in our study.

3. Results

3.1. AMR Dissemination Pathways in Rural Settings

Using the One Health approach, we tried to establish an AMR bacteria dissemination pathway, and evaluated how the AMR bacteria could spread, and how AMR drivers would prompt the dissemination in Cajamarca's rural setting (Figure 1). We found evidence for specific pathways, and these are represented in red solid lines in Figure 1.

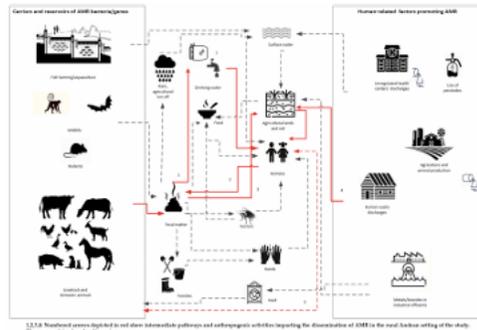


Figure 1. Identified dissemination pathways in Peruvian rural settings applying a One Health lens.

3.2. Setting Description

The main demographics, household's characteristics, household's water treatment, and animal management and treatment, are found in Table 1. 72.5% of homes had access to a piped water system and 20% to the yard or household premises. Both systems are

a gravity-based piped water supply system. For drinking water, 27.5% of participants consumed water directly from the faucet without any treatment, 60% declared boiling the water and a small proportion (12.5%) reported treating the water with chlorine or bleach. For animal handling and treatment, 72.5% of the households responded that they received antibiotics as part of their last treatment. The main antibiotic brands used were "Ciclosoma" (50%) and "Biomizona" (21.8%), both containing oxytetracycline and an anti-inflammatory drug. More than 80% of the homes reported that they got the antibiotics from a veterinary doctor, technician, or a local veterinary store.

Table 1. Descriptive statistics of households' demographic characteristics, water supply and treatment, animal keeping.

	N	Mean [SD] or % (N)
Demographic characteristics	40	
Number of inhabitants per household		5.0 [1.44]
Number of children under 6 per household		1.4 [0.53]
Household characteristics		
Adobe wall type		
- Coated adobe or rammed earth		60 (24)
- Uncoated adobe or rammed earth		22.5 (9)
Latrines w/o ventilation		
- Septic tank		22.5 (9)
- Latrine		75 (30)
Piped water supply		
- Public water supply system/piped water in the house		72.5 (29)
- Public water supply system/piped water outside the house		20 (8)
- Public water supply system/piped water outside the house but inside the building		2.5 (1)
- Surface water, spring		5 (2)
Energy source		
- Electricity		87.5 (35)
- Candle		5 (2)
- Solar Panel		7.5 (3)
Household Water Treatment		
Boiling		60 (24)
Chlorine or bleach		12.5 (5)
None		27.5 (11)
Animal Management and treatment		
The last time the animal was treated; did the animal receive any antibiotic?		72.5 (29)
Antibiotic used for the treatment		
- Amoxicillin		3.1 (1)
- "Biomizona" ¹		21.8 (7)
- "Ciclosoma" ²		50 (16)
- "Emicina" ³		3.1 (1)
- "Hipradoxi S" ⁴		3.1 (1)
- "Hipralona" ⁵		6.2 (2)
- "Quinolaba" ⁵		6.2 (2)
- "Tylogen" ⁶		6.2 (2)

Table 1. Cont.

	N	Mean [SD] or % (N)
Where did they get the antibiotic?		
- Directly from a veterinarian		18.7 (6)
- Directly from a veterinarian technician		50 (16)
- From a neighbour or relative		3.1 (1)
- At a local veterinary store		18.7 (6)
- At a veterinary store in the area		0
- At a pharmacy		9.3 (3)
- Other place		9.3 (3)

¹ Brand name for a commercial formulation of oxytetracycline and benzylamine, ² brand name for a commercial formulation of oxytetracycline and desamethasone, ³ brand name for oxytetracycline, ⁴ brand name for doxycycline, ⁵ brand names for enrofloxacin, ⁶ brand name for a commercial formulation of Gentamicin and Tylosin.

3.3. Water Samples

In total, we collected 106 water samples, 26 from the reservoir, 40 from the main's household water source, and 40 from the child's drinking water source. As shown in Table 2, nine out of the 26 water reservoir samples (34.6%) were positive for thermotolerant coliforms. From these positive samples, we obtained a total of 14 bacteria isolates, and 92.8% were positive for *E. coli*. For the main household water samples (collected from faucet or pitcher), 18 out of 40 (45%) were positive for thermotolerant coliforms. We obtained a total of 28 thermotolerant bacterial isolates, and 82.1% of them were *Enterobacteriaceae*. Of the enterobacteria isolates, 57.1% were *E. coli*, 10.7% *Klebsiella* spp. and 14.8% were *Enterobacter* spp. Thirteen out of the 40 (32.5%) child's drinking water samples were positive for thermotolerant coliforms, and a total of 27 thermotolerant bacteria were isolated from these positive samples. *Enterobacteriaceae* represented 74% of all the isolates, and 44.4% of the enterobacteria isolates were *E. coli*, 14.8% were *Klebsiella* spp. and 14.2% *Enterobacter* spp. (Table 2).

Table 2. Descriptive statistics of bacterial contamination, frequency and type of thermotolerant coliform identified from all water sources.

Coliforms (Count)	Water from Reservoir (N = 26) % (N)	Main Household's Water (N = 40) % (N)	Child's Drinking Water (N = 40) % (N)
Thermotolerant coliform count (IQR 1st–3rd Quantile)	0–3.75	0–10.5	0–9.5
Thermotolerant coliform (CFU/mL)—mean (SD)	14.3 (59.2)	36.2 (108.4)	104.1 (373.5)
Total positive thermotolerant sample	34.6 (9)	45 (18)	32.5 (13)
Total thermotolerant bacterial isolates *	N = 14 % (n)	N = 28 % (n)	N = 27 % (n)
Total positive <i>Enterobacteriaceae</i> isolates	92.8 (13)	82.1 (23)	74.0 (20)
<i>E. coli</i>	92.8 (13)	57.1 (16)	44.4 (12)
<i>Klebsiella</i> spp.	0	10.7 (3)	14.8 (4)
<i>Enterobacter</i> spp.	0	14.8 (4)	14.2 (4)

* Correspond only to the positive enterobacteria isolates.

We determined the phenotypic antibiotic resistance profile for *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. isolates. From the 13 *E. coli* isolates found in the reservoir's water, 30.8% displayed resistance to at least one antibiotic. The *E. coli* antibiotic profile showed the highest resistance to tetracycline. All *Klebsiella* spp. isolates from the main household's water and child's drinking water displayed resistance to at least one antibiotic, showing the highest resistance to ampicillin. Multidrug resistance was displayed in 33.3% and 25% of the *Klebsiella* spp. isolates for the main household's water and child's drinking water, respectively (Table 3). *E. coli* also showed the highest resistance towards tetracycline (31.3%), ampicillin and nalidixic acid (18.8%) in the main household's water source. We found the highest resistance to tetracycline (41.6%) and ampicillin (25%) in the child's drinking water source (Table 3).

Table 3. *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. antibiotic resistance profile to a panel of antibiotics, water type (reservoir, main household water source, child drinking water), and proportion of multidrug-resistant isolates.

Antibiotic	Water from Reservoir	Main Household's Water		Child's Drinking Water	
	<i>E. coli</i> N = 13 Resistance % (N)	<i>E. coli</i> N = 16 Resistance % (N)	<i>Klebsiella</i> spp. N = 3 Resistance % (N)	<i>E. coli</i> N = 12 Resistance % (N)	<i>Klebsiella</i> spp. N = 4 Resistance % (N)
Amoxicillin-clavulanic acid	0	0	0	0	0
Ampicillin	0	18.8 (3)	100 (3)	25 (3)	100 (4)
Aztreonam	0	0	0	0	0
Cefotaxime	15.4 (2)	0	0	8.3 (1)	0
Cefoxitin	0	0	0	0	0
Chloramphenicol	7.7 (1)	12.5 (2)	0	25 (3)	0
Ciprofloxacin	0	6.3 (1)	33.3 (1)	16.7 (2)	25 (1)
Gentamicin	0	6.3 (1)	0	8.3 (1)	0
Nalidixic acid	0	18.8 (3)	0	16.7 (2)	0
Trimethoprim-sulfamethoxazole	0	0	33.3 (1)	8.3 (1)	25 (1)
Tetracycline	15.4 (2)	31.3 (5)	33.3 (1)	41.7 (5)	25 (1)
Ceftriazone	0	0	0	11.1 (1)	0
Cefepime	0	0	0	8.3 (1)	0
Imipenem	0	0	0	0	0
AMR to at least one antibiotic ¹	30.8(4)	43.8 (3)	100 (3)	41.7 (5)	100 (4)
Multidrug resistance ²	0 (0)	18.6 (3)	33.3 (1)	33.3 (4)	25 (1)

¹ Antimicrobial resistance (AMR) is defined as "the ability of a microorganism to stop an antimicrobial from working against it. As a result, standard treatments become ineffective; infections persist and may spread to others" [43]. ² Multidrug resistance is defined as resistance to three or more classes of antibiotics [46].

3.4. Soil Samples

All soil was positive for thermotolerant coliforms. We obtained 83 isolates from the samples. Of these, 43.3% were identified as *E. coli*, 4.8% *Klebsiella* spp., 24.1% *Enterobacter* spp. and 9.6% *Citrobacter* spp. (Table 4).

Table 4. Bacterial contamination by frequency and type of thermotolerant coliform in household and agricultural soil and animal and human feces.

Coliforms	Soil (N = 40) % (n)	Child Faeces (N = 40) % (n)	Animal Faeces (N = 80) % (n)
Thermotolerant coliforms	100 (40)	97.5 (39)	67.5 (54)
Total thermotolerant bacterial isolates	N = 83 % (n)	N = 98 % (n)	N = 116 % (n)
<i>E. coli</i>	43.3 (36)	45.3 (44)	38.7 (45)
<i>Klebsiella</i> spp.	4.8 (4)	11.3 (11)	5.1 (6)
<i>Enterobacter</i> spp.	24.1 (20)	6.2 (6)	4.3 (5)
<i>Citrobacter</i> spp.	9.6 (8)	9.2 (9)	16.3 (19)

Some 36 *E. coli* isolates were found in the soil samples of which 33.3% displayed resistance to at least one antibiotic and one showed multidrug resistance. From the *Klebsiella* spp. isolates, 75% displayed resistance to at least one antibiotic, but no multidrug resistance was observed. The *E. coli* antibiotic profile displayed highest resistance to tetracycline (25%) and ampicillin (11.1%), and *Klebsiella* spp. showed the highest resistance to ampicillin (Table 5).

Table 5. *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. antibiotic resistance profile to a panel of antibiotics, per sample type (soil, child and animal feces), and proportion of multidrug-resistant isolates.

Antibiotic	Soil		Child Faeces		Animal Faeces	
	<i>E. coli</i> N = 36	<i>Klebsiella</i> spp. N = 4	<i>E. coli</i> N = 44	<i>Klebsiella</i> spp. N = 11	<i>E. coli</i> N = 45	<i>Klebsiella</i> spp. N = 6
	Resistance % (N)	Resistance % (N)	Resistance % (N)	Resistance % (N)	Resistance % (N)	Resistance % (N)
Amoxicillin-clavulanic acid	0	25 (1)	0	9.1 (1)	4.4 (2)	0
Ampicillin	11.1 (4)	75 (3)	34.1 (15)	54.5 (6)	11.1 (5)	50 (3)
Aztreonam	0	0	2.3 (1)	0	2.2 (1)	0
Cefotaxime	0	0	0	0	0	0
Cefoxitin	2.8 (1)	25 (1)	0	9.1 (1)	4.4 (2)	0
Chloramphenicol	2.8 (1)	0	4.5 (2)	0	11.1 (5)	0
Ciprofloxacin	5.5 (2)	0	11.4 (5)	0	8.8 (4)	0
Gentamicin	0	0	2.3 (1)	0	0	0
Nalidixic acid	5.5 (2)	0	13.6 (6)	0	20 (9)	0
Trimethoprim-sulfamethoxazole	5.5 (2)	0	20.5 (9)	9.1 (1)	11.1 (5)	0
Tetracycline	25.0 (9)	0	25.0 (11)	9.1 (1)	26.6 (12)	0
Ceftriazone	0	0	2.3 (1)	0	0	0
Cefepime	0	0	0	0	0	0
Imipenem	0	0	0	0	0	0
AMR ¹	33.3 (12)	75 (3)	52.3 (23)	54.6 (6)	37.7 (17)	50 (3)
MDR ²	2.8 (1)	0 (0)	15.9 (7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

3.5. Child Fecal Samples

97.5% of the child fecal samples were positive for thermotolerant coliforms (Table 4). We obtained a total of 98 thermotolerant bacteria isolates. Of these, almost half of the samples had *E. coli* (45.3%), followed by *Klebsiella* spp. (11.3%), *Citrobacter* spp. (9.2%) and *Enterobacter* spp. (6.2%).

We carried out antibiotic resistance profiling for *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. isolates in the child fecal samples (Table 5). From all *E. coli* isolates, 52.3% displayed resistance to at least one antibiotic and 15.9% were multidrug-resistant; 54.6% of the *Klebsiella* spp. isolates displayed resistance to at least one antibiotic, but we did not find multidrug resistance. The highest resistance for the *E. coli* isolates was to ampicillin (34.1%) and tetracycline (25.0%) and the highest resistance for *Klebsiella* spp. was to ampicillin (54.5%).

3.6. Animal Fecal Samples

Of the 80 animal fecal samples, 67.5% were positive for thermotolerant coliforms. We obtained a total of 116 thermotolerant bacteria isolates, and they were identified as *E. coli* (38.7%), *Klebsiella* spp. (5.1%), *Citrobacter* spp. (16.3%) and *Enterobacter* spp. (4.3%) (Table 4).

We performed antibiotic resistance profiling for *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp. and *Enterobacter* spp. in the isolates. From the isolates 37.7% of *E. coli*, 50% of *Klebsiella* spp. and 60% of the *Enterobacter* spp. isolates displayed resistance to at least one antibiotic. None were multidrug-resistant (Table 5).

3.7. Multidrug Resistance Profiles

Among the *E. coli* isolates obtained from the child's feces, child's drinking water source, household's main water source and soil, 13.9% (15/108) were resistant to three or more classes of antibiotics [46]. Most of them were resistant to ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, tetracycline, nalidixic acid, and ciprofloxacin. Only one isolate of *E. coli* was identified as a carrier of ESBL (Table 6).

Table 6. Profile of all multidrug-resistant *E. coli* isolates from different sources.

Source Type ***	MDR	Antimicrobial Class **
Child Water	AMP, TE, y C	Penicillin
Child Water	SXT, TE, C	Sulfonamides, tetracycline, quinolone
Child Water	NA, CIP, y TE	Quinolone, tetracycline
Child Water*	AMP, CTX, CRO, FEP, NA, CIP, TE, C y CN	Penicillin, 3rd & 4th generation cephalosporin, quinolone, tetracycline
HH Water Source	NA, TE, C y CN	Quinolone, tetracycline
HH Water Source	NA, CIP, SXT, TE, C	Quinolone, sulfonamides, tetracycline
HH Water Source	AMP, SXT, TE	Penicillin, quinolone, tetracycline
Soil	AMP, NA, CIP, SXT, TE, C	Penicillin, quinolone, sulfonamides, tetracycline
Child faeces	AMP, NA, CIP, SXT, TE y CN	Penicillin, quinolone, sulfonamides, tetracycline
Child faeces	AMP, SXT, TE	Penicillin, sulfonamides, tetracycline
Child faeces	AMP, TE, C	Penicillin, tetracycline, quinolone
Child faeces	AMP, SXT, TE	Penicillin, sulfonamides, tetracycline
Child faeces	CRO, CIP, SXT	3rd generation cephalosporin, quinolone, sulfonamides
Child faeces	AMP, SXT, TE	Penicillin, sulfonamides
Child faeces	AMP, NA, CIP, SXT, TE	Penicillin, quinolone, sulfonamides, tetracycline

AMP: ampicillin, SXT: trimethoprim-sulfamethoxazole, NA: nalidixic acid, TE: tetracycline, CIP: ciprofloxacin, C: chloramphenicol, CN: gentamicin, CTX: cefotaxime, FEP: cefepime and CRO: ceftriaxone. * *E. coli* isolates harboring ESBL, ** as per WHO antimicrobial class classification. *** HH: household.

3.8. Detection of ESBL Resistance Genes

We identified two bacterial isolates harbouring ESBL genes. One was an *E. coli* isolate from a water sample, and one was a *Shigella* spp. isolate from a dog faecal sample. The ESBL *E. coli* isolate carried the *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M.14}, and *bla*_{CTX-M.3} genes; and the ESBL *Shigella* spp. isolate carried the *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M.14}, and *bla*_{CTX-M.3} genes. PCR amplification of β-lactamase genes for both samples are found in Supplementary Figure S1.

4. Discussion

Our study is among the first to investigate specific aspects related to AMR's spread in the Andean region in Peru. Adopting the One Health lens provided a unique and important insight into the complex, interlinked problem between human, animal, and environment health [47].

Our results provide descriptive evidence for the pathways shown in red in Figure 1. AMR thermotolerant bacteria—mainly *E. coli*—were found in children's stools and animal faeces, and they were also detected in the reservoir water, the household's and child's drinking water sources; as well as in the soil from the household's yard. For all the samples, the prevalence of resistance to at least one antibiotic in the *E. coli* and *Klebsiella* spp. isolates was almost 43% and the prevalence of MDR in the same isolates was nearly 9%, yet the latter nearly doubled (15.9%) in children's stools.

Our finding of thermotolerant coliforms in the reservoir's water indicates recent fecal contamination [48]. 34.6% of reservoir water samples were positive for thermotolerant coliforms, with counts above the Peruvian and WHO threshold guidelines (0 CFU in 100 mL) [48,49]. We provide two likely explanations for these findings. Poor reservoir infrastructure and/or the distribution network results in contamination, possibly with animal faeces. In Peruvian rural Andean settings, about 30% of water storage and supply systems are older than 20 years, and some 20% have collapsed [50]. Another potential explanation is that agricultural run-off, rain, surface or underground water containing animal or human fecal matter seep into the system [48,51]. Further, inadequate water supply management, infrequent cleaning or disinfection, irregular treatment (automated chlorination systems or manual chlorination) of the reservoir, and/or the lack of a maintenance backlog and the use of old materials are also frequent concerns [50,52]. According to the Peruvian Ministry of Housing, Construction and Sanitation [50], only 6.9% of water storage and supply facilities apply proper treatment guaranteeing water safety in rural Peru. In all Cajamarca, including the San Marcos Province, reservoirs do not have an automated disinfection system; most use manual chlorination and are managed unreliably by the community water supply and irrigation committees (JASS) [52]. In fact, an earlier study in the same area found that the spring water stored at the reservoir was unfiltered, untreated, and chlorination was performed infrequently [53]. Given that 27.3% of all *E. coli* isolates from the reservoirs' water displayed AMR and had faecal origin, the water distribution network could play an important role in spreading AMR in the population (See Figure 1, pathway 1).

In the households, we found that 25% of the households' heads reported consuming water directly from the faucet or bucket without any previous household water treatment (HWT), exposing residents to potential contamination in case of failures in the central water treatment facility. Most households reported boiling or adding chlorine as their preferred HWT methods; however, it is most likely that the real proportion of homes treating their water regularly is much lower, based on the findings of this study and previous ones from the area [35]. We found that nearly half of the household water samples were positive for thermotolerant coliforms, and of the 57.1% *E. coli* isolates, 18.6% showed multidrug resistance. It is not clear whether the home-treated water is being recontaminated from bacteria found within the household environs or the recontamination is caused by inadequate storage. However, it could also be due to poor hygienic practices in the household, lack of handwashing, and free-roaming animals and vectors. Thus, the AMR bacterial isolates in drinking water could originally come from human or animal waste [54], as shown in pathway 2, Figure 1.

We found that the AMR profiles show a relationship with the most commonly used antibiotics in the area. Oxytetracycline was the most common antibiotic used for animal treatment reported by the household head. Coincidentally, the highest resistance for the *E. coli* isolates in animals' faeces was tetracyclines, and similar resistance profiles were observed in all the water samples (reservoir and drinking water samples). This underscores the hypothesis that faeces are contaminating water within the water delivery system. Tetracyclines are a family of antibiotics widely used in veterinary medicine and animal

production; compared to other antibiotics used in livestock farming, they are applied in greater amounts and tend to persist in the environment for longer periods [55]. Tetracycline use and resistance have been reported in other rural environments with animal production activity [26,56,57]. Children's drinking water samples also displayed resistance to ampicillin, which is the most common antibiotic used in the area for treating childhood illnesses. This indicates that treated drinking water for children's consumption could be recontaminated with children's feces due to mismanagement and poor personal hygiene within the home (Figure 1, pathway 2).

Multidrug-resistant and thermotolerant coliform bacteria were prevalent in the study area. We found that one third of all *E. coli* isolates from the child's drinking water were positive for MDR. According to the WHO list of critically important antimicrobials classification, third and fourth generation cephalosporins, quinolones and tetracycline in the child's drinking water could indicate a severe public health risk for children in rural areas, given the lack of treatment options for multidrug-resistant infections. Multidrug resistance in coliforms is escalating worldwide, and it may be explained by their high tendency to transfer and receive AMR genes horizontally [58]. In a recent study in the rural Andean regions of Peru, Larson et al. [17] found a lower percentage (19.7%) but still alarming frequency of multidrug resistant *E. coli* in children's drinking water just four years ago. It is unclear whether the propagation of resistant bacteria and/or the spread of AMR genes are rising in this rural area. The higher percentage of MDR bacteria found among *E. coli* isolates and bacteria carrying ESBL genes (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-II} and *bla*_{CTX-M-3}) in children's drinking water compared to the main household water, could be due to poor water treatment and hygiene practices, inappropriate use (unpublished data) or contaminated storage containers [59]. Nearly 59% of the households that reported treating their water, also reported storing it in different types of containers; the use of wide-mouth containers increased the possibility of recontamination (unpublished data). Similar findings are described in a study investigating drinking water samples in rural households in Ecuador [60].

The high prevalence of thermotolerant coliforms found in the soil indicates significant fecal contamination, given that most animals roam freely in the courtyard and in the community. Evidence shows that in rural areas, soil fecal contamination is mainly attributed to animals [61,62]. The environs of family households and farms may be more affected by AMR due to the presence of animal manure. In many cases, animal manure is used to fertilize crops, increasing the chances of AMR spread to farmland and produce [56]. The prevalence of resistance to any antibiotic in *E. coli* and *Klebsiella* spp. in animal faeces was 37.7% and 50%, whereas in soil it was 33.3% and 75%, respectively, supporting pathway 3 in Figure 1. The finding of ESBL genes (*bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M-3}) on a *Shigella* spp. isolate from a dog illustrates the importance of strengthening surveillance programmes for MDR to gain a better understanding of community source dissemination. Given that humans are *Shigella* spp. main reservoir [63], its finding in a dog flags the possibility of transmission from humans to animals (pathway 5, Figure 1). We found evidence in South America of the presence of *E. coli* carrying ESBL genes in dog feces in public parks [64]. Another possible source of soil contamination is water run-offs from poorly designed and poorly maintained pit latrines. Fifty-three percent of the households in the study area own and use pit latrines [36]. Pit latrines seep nightsoil into the ground and potentially contribute to the propagation of AMR bacteria in the environment [65]. Pathway 4 in Figure 1 seems plausible, given that in children's stools the prevalence of resistance to any antibiotic in *E. coli* and *Klebsiella* spp. was 52.3% and 54.6%, respectively. The finding of multidrug resistance in 15.9% of all *E. coli* isolates from the children's faeces indicates a high public health risk and calls for AMR surveillance to control the exposure to AMR bacteria in rural Andean settings like ours. However, no ESBL genes were found in these samples.

5. Limitations

By intentionally focusing on studying AMR high-level households, we biased our estimates to be higher than what could potentially be expected in the average community.

Nevertheless, this decision allowed us to establish the principal pathways of transmission. We must assume that in less contaminated communities, those routes pertain as well and contribute to the AMR problem, but, due to their low numbers, they are difficult to detect.

6. Conclusions

The AMR problem in Peru is still largely underexplored, especially in rural regions. Using a One Health perspective to identify transmission pathways for AMR and acknowledging the convergence of animal, human, and environment health dimensions in the spread, we identified critical pathways of infection for rural settings. Our epidemiological findings demonstrate the interconnectedness of animal, human and environmental transmission. However, molecular analysis is needed to elucidate if the isolates found in each type of sample are clones, proving that the same AMR bacteria strains are shared. The high prevalence of AMR and MDR bacteria in children, soil, and water samples is alarming. Specifically for animal and child feces, we found that the resistance profiles seem to relate to the antibiotics most commonly used for treatment. This poses a critical public health threat as it can limit the use of these first line drugs in future. Drinking water is a neglected potential source of community exposure to antibiotic-resistant organisms. The presence of ESBL genes in drinking water and animal faeces samples show the anthropogenic origins of AMR. A standard microbiological water quality testing and management is needed and where protocols for the management and specific treatment of delivery networks exist, they need to be reinforced to reduce the current risk exposure to these harmful pathogens.

Supplementary Materials: The following supplementary files are available online at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijerph18094604/s1>. Table S1: Primers used for the detection of genes encoding the production of ESBL. Figure S1: PCR amplification of β -lactamase genes harboring blaTEM, blaCTX-M-8 and blaCTX-M-3 genes in *Shigella* spp. (S1) isolate from a dog faecal sample and *E. coli* (S2) isolate from a water sample. L, 100 bp DNA ladder, C-, negative control, C+, positive control. (A) blaTEM (1150 bp), (B) blaCTX-M-3 (1017 bp), (C) blaCTX-M-8 (800 bp) amplification products.

Author Contributions: Conceptualization, S.M.H. and D.M.; methodology, S.M.H., A.J.L. and D.M.; data collection and lab analysis: M.P.-B. and M.R.; writing—original draft preparation, S.M.H. and M.L.M.-P.; analysis, H.V., G.S.-M. and S.M.H.; writing—review and editing, G.S.-M., M.L.M.-P., A.J.L., M.R. and D.M.; supervision, H.V., M.R. and D.M.; project administration, S.M.H. and D.M.; funding acquisition, S.M.H. and D.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Novartis Foundation (grant number 18A059).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board for humans and animal subjects of the Universidad Peruana Cayetano Heredia, protocol code 418-16-18.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: The authors would like to express their appreciation to the study families for their kind participation, our field staff and the local authorities for their continuous support. We also express our gratitude to the field coordinators, especially to Angelica Fernández and Raymi Alosilla for their unfailing support. Jordyn Wallenborn reviewed the article and provided valuable editorial assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

Abbreviations

AMR	Antimicrobial resistance
LMIC	Low- and middle-income countries
CFU	colonies forming units
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
JASS	community water supply and irrigation committee
HWT	Household water treatment
MDR	Multidrug-resistant

References

- Pokharel, S.; Raut, S.; Adhikari, B. Tackling antimicrobial resistance in low-income and middle-income countries. *BMJ Glob. Health* **2019**, *4*, 4–6. [\[CrossRef\]](#)
- Dadgostar, P. Antimicrobial resistance: Implications and costs. *Infect. Drug Resist.* **2019**, *12*, 3903–3910. [\[CrossRef\]](#)
- World Health Organization. *Global Action Plan on Antimicrobial Resistance*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2015; ISBN 9789241509763.
- Ochoa, T.J.; Egoavil, M.; Castillo, M.E.; Reyes, I.; Chaparro, E.; Silva, W.; Campos, F.; Sienz, A. Invasive pneumococcal diseases among hospitalized children in Lima, Peru. *Rev. Panam. Salud Publica/Pan Am. J. Public Health* **2010**, *28*, 121–127. [\[CrossRef\]](#)
- Pan American Health Organization. *Tuberculosis in the Americas 2018 Regional Report*; Pan American Health Organization: Washington, DC, USA, 2018.
- Tien, V.; Punjabi, C.; Holubar, M.K. Antimicrobial resistance in sexually transmitted infections. *J. Travel Med.* **2020**, *27*, 1–11. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Szemplika, A.; Nagy, B. Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health. *Front. Microbiol.* **2013**, *4*, 1–13. [\[CrossRef\]](#)
- Van Schaik, W. The human gut resistome. *Philos. Trans. R. Soc. B* **2015**, *370*, 20140087. [\[CrossRef\]](#)
- Purohit, M.R.; Lindahl, L.F.; Dwan, V.; Marrone, G.; Lundborg, C.S. High levels of drug resistance in commensal *E. coli* in a cohort of children from rural central India. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–11. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Pons, M.J.; Mosquito, S.; Gomes, C.; Del Valle, L.J.; Ochoa, T.J.; Ruiz, J. Analysis of quinolone-resistance in commensal and diarrheagenic *Escherichia coli* isolates from infants in Lima, Peru. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2014**, *108*, 22–28. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Miranda, J.; Panto, J.; Faustino Arias, D.M.; Sánchez-Jacinto, B.; Ramirez, F. Antimicrobial resistance of uropathogens in older adults in a private clinic in Lima, Peru. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica* **2019**, *36*, 87–92. [\[CrossRef\]](#)
- Marcos-Carbajal, P.; Galarza-Pérez, M.; Huancahuera-Vega, S.; Otiniano-Trujillo, M.; Soto-Pastrana, J. Comparación de los perfiles de resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* uropatógena e incidencia de la producción de betalactamasas de espectro extendido en tres establecimientos privados de salud de Perú. *Biomédica* **2020**, *40*, 139–147. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Von Wintersdorff, C.J.H.; Penders, J.; Van Niekerk, J.M.; Mills, N.D.; Majumder, S.; Van Alphen, L.B.; Savelkoul, P.H.M.; Wolfs, P.F.G. Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1–10. [\[CrossRef\]](#)
- Pons, M.J.; Mosquito, S.; Ochoa, T.J.; Vargas, M.; Molina, M.; Lluque, A.; Gil, A.I.; Ecker, L.; Barletta, F.; Lanata, C.F.; et al. Niveles de resistencia a quinolonas y otros antimicrobianos en cepas de *Escherichia coli* comensales en niños de la zona periurbana de Lima, Peru. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica* **2012**, *29*, 82–86. [\[CrossRef\]](#)
- Alzamora, M.C.; Echevarría, A.C.; Ferraro, V.M.; Riveros, M.D.; Zamborini, M.; Ochoa, T.J. Resistencia Antimicrobiana de cepas comensales de *Escherichia coli* en niños de dos comunidades rurales peruanas. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica* **2019**, *36*, 439–464. [\[CrossRef\]](#)
- Kalter, H.D.; Gilman, R.H.; Moulton, L.H.; Cullotta, A.R.; Cabrera, L.; Velapaitiño, B. Risk factors for antibiotic-resistant *Escherichia coli* carriage in young children in Peru: Community-based cross-sectional prevalence study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2010**, *82*, 879–888. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Larson, A.; Hartinger, S.M.; Riveros, M.; Salmon-Mulanovich, G.; Hattendorf, J.; Verastegui, H.; Huaylinos, M.L.; Mäusezahl, D. Antibiotic-resistant *Escherichia coli* in drinking water samples from rural Andean households in Cajamarca, Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2019**, *100*, 1–6. [\[CrossRef\]](#)
- World Health Organization. *Antimicrobial Resistance: An Emerging Water, Sanitation and Hygiene Issue*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2015.
- González Mendoza, J.; Maguina Vargas, C.; de Gonzales Ponce, F.M. Resistance to antibacterial agents: A serious problem. *Acta Med. Peru.* **2019**, *36*, 145–151. [\[CrossRef\]](#)
- Organización Panamericana de la Salud. *Plan de Acción Sobre la Resistencia a los Antimicrobianos*; Organización Panamericana de la Salud: Washington, DC, USA, 2015.
- World Health Organization. *Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2014.
- Palhares, J.C.P.; Kich, J.D.; Bessa, M.C.; Biesus, L.L.; Bierno, L.G.; Triques, N.J. Salmonella and antimicrobial resistance in an animal-based agriculture river system. *Sci. Total Environ.* **2014**, *472*, 654–661. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Miranda, C.D.; Zemelman, R. Antimicrobial multiresistance in bacteria isolated from freshwater Chilean salmon farms. *Sci. Total Environ.* **2002**, *293*, 207–218. [\[CrossRef\]](#)

24. Bengtsson-Palme, J.; Kristiansson, E.; Larsson, D.G.J. Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **2018**, *42*, 68–80. [CrossRef]
25. Singer, A.C.; Shaw, H.; Rhodes, V.; Hart, A. Review of antimicrobial resistance in the environment and its relevance to environmental regulators. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1–22. [CrossRef]
26. Redding, L.E.; Cubas-Delgado, F.; Sammel, M.D.; Smith, G.; Galligan, D.T.; Levy, M.Z.; Hennessy, S. Antibiotic residues in milk from small dairy farms in rural Peru. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* **2014**, *31*, 1001–1008. [CrossRef]
27. World Organisation for Animal Health One Health at a Glance. Available online: <https://www.oie.int/en/for-the-media/onehealth/> (accessed on 9 March 2021).
28. World Organisation for Animal Health International Partnership to Address Human-Animal-Environment Health Risks Gets a Boost. Available online: <https://www.oie.int/en/for-the-media/press-releases/detail/article/international-partnership-to-address-human-animal-environment-health-risks-gets-a-boost/> (accessed on 9 March 2021).
29. World Health Organization Global Framework for Development & Stewardship to Combat Antimicrobial Resistance: Draft. Available online: <https://www.who.int/publications/m/item/global-framework-for-development-stewardship-to-combat-antimicrobial-resistance-draft> (accessed on 9 March 2021).
30. World Health Organization. *WHO Report on Surveillance of Antibiotic Consumption 2016–2018 Early Implementation*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2018; ISBN 9789241514880.
31. Dirección General de Medicamentos Insumos y Drogas (DIGEMID). *Plan Nacional Contra la Resistencia a los Antimicrobianos*; DIGEMID: Lima, Peru, 2017.
32. Elias, R.; Berenguel, R.; Beraín, Y.; Enrique, C.; Vásquez, P. Gestión y vigilancia sanitaria de la fauna silvestre en el Perú. *Salud Tecnol. Vet.* **2020**, *8*, 19–26. [CrossRef]
33. Schneider, M.C.; Aguilera, X.P.; Smith, R.M.; Moyrhan, M.J.; Da Silva, J.B.; Aldighieri, S.; Almiron, M. Importance of animal/human health interface in potential Public Health Emergencies of International Concern in the Americas. *Rev. Panam. Salud Publica/Pan Am. J. Public Health* **2011**, *29*, 371–379. [CrossRef]
34. Queenan, K.; Garnier, J.; Nielsen, L.R.; Buttigieg, S.; De Meneghi, D.; Holmberg, M.; Zirasstag, J.; Rüegg, S.; Hasler, B.; Kock, R. Roadmap to a one health agenda 2030. *CAB Rev.* **2017**, *12*, 17. [CrossRef]
35. Rosa, G.; Huaylinos, M.L.; Gil, A.; Lanata, C.; Clasen, T. Assessing the consistency and microbiological effectiveness of household water treatment practices by urban and rural populations claiming to treat their water at home: A case study in Peru. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e114997. [CrossRef]
36. Hartinger, S.M.; Ntsho, N.; Hattendorf, J.; Verastegui, H.; Karlen, W.; Ortiz, M.; Mäusezahl, D. A factorial cluster-randomised controlled trial combining home-environmental and early child development interventions to improve child health and development: Rationale, trial design and baseline findings. *BMC Med Res. Methodol.* **2020**, *20*, 1–12. [CrossRef] [PubMed]
37. OXFAM-DELAGUA. *Oxfam-Delagua Portable Water Testing Kit-Users Manual-Version 4.3*; OXFAM-DELAGUA: Wiltshire, UK, 2012; pp. 1–64.
38. MacFaddin, J.F. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*, 3rd ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2000.
39. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. Available online: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/> (accessed on 8 March 2021).
40. Autoridad Nacional del Agua Comparison of Four Phenotypic Methods to Detect Extended-Spectrum Betalactamases. Available online: <https://www.ana.gob.pe/normatividad/resolucion-administrativa-no-656-2017-ana-aaa-xipaala-bap> (accessed on 8 February 2021).
41. Belaouaj, A.; Lapoumeroulie, C.; Caniça, M.M.; Vedel, G.; Névot, P.; Krishnamoorthy, R.; Paul, G. Nucleotide sequences of the genes coding for the TEM-like β -lactamases IRT-1 and IRT-2 (formerly called TRI-1 and TRI-2). *FEMS Microbiol. Lett.* **1994**, *120*, 75–80. [CrossRef]
42. Pitout, J.D.D.; Thomson, K.S.; Hanson, N.D.; Ehrhardt, A.F.; Moland, E.S.; Sanders, C.C. β -lactamases responsible for resistance to expanded-spectrum cephalosporins in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* isolates recovered in South Africa. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 1350–1354. [CrossRef]
43. Jouini, A.; Vinné, L.; Ben Slama, K.; Sáenz, Y.; Klibi, N.; Hammami, S.; Boudabous, A.; Torres, C. Characterization of CTX-M and SHV extended-spectrum β -lactamases and associated resistance genes in *Escherichia coli* strains of food samples in Tunisia. *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *60*, 1137–1141. [CrossRef]
44. Batchelor, M.; Hopkins, K.; Threlfall, E.J.; Clifton-Hadley, F.A.; Stallwood, A.D.; Davies, R.H.; Liebana, E. blaCTX-M genes in clinical *Salmonella* isolates recovered from humans in England and Wales from 1992 to 2003. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 1319–1322. [CrossRef]
45. World Health Organization. Antimicrobial Resistance. Available online: <https://www.who.int/health-topics/antimicrobial-resistance> (accessed on 30 March 2021).
46. Magiorakos, A.P.; Srinivasan, A.; Carey, R.B.; Carmeli, Y.; Falagas, M.E.; Giske, C.G.; Harbarth, S.; Hindler, J.F.; Kahlmeter, G.; Olsson-Liljequist, B.; et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* **2012**, *18*, 268–281. [CrossRef] [PubMed]
47. Lebov, J.; Grieger, K.; Womack, D.; Zaccaro, D.; Whitehead, N.; Kowalecyk, B.; MacDonald, P.D.M. A framework for One Health research. *One Health* **2017**, *3*, 44–50. [CrossRef]

48. World Health Organization. *Guidelines for Drinking Water*, 4th ed.; WHO: Geneva, Switzerland, 2017; ISBN 9789241549950.
49. Ministerio de Salud. *Reglamento de la Calidad del Agua para Consumo Humano*; Ministerio de Salud: Lima, Peru, 2011; pp. 1–46.
50. MVCS. *DATASS: Modelo Para la Toma de Decisiones en Saneamiento Sistema de Diagnóstico Sobre Abastecimiento de Agua y Saneamiento en el Ambiente Rural*; Ministerio de Vivienda, Construcción y Saneamiento: Lima, Peru, 2019.
51. Bartram, J.; Bos, R.; Dufour, A. (Eds.) *Animal Waste, Water Quality and Human Health*; World Health Organizations: London, UK, 2013; Volume 12. ISBN 9781780401232.
52. CARE-Perú. *Diagnóstico de Saneamiento Integral de la Región Cajamarca*; CARE-Perú: Lima, Peru, 2008.
53. Gil, A.I.; Lanata, C.F.; Hartinger, S.M.; Mäusezahl, D.; Padilla, B.; Ochoa, T.J.; Lozada, M.; Pineda, I.; Verastegui, H. Fecal contamination of food, water, hands, and kitchen utensils at the household level in rural areas of Peru. *J. Environ. Health* **2014**, *76*, 102–106.
54. WHO. *Managing Water in the Home: Accelerated Health Gains from Improved Water Supply*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2002; Volume 8, pp. 1–83.
55. Granados-Chinchilla, F.; Rodriguez, C. Tetracyclines in Food and Feedingstuffs: From Regulation to Analytical Methods, Bacterial Resistance, and Environmental and Health Implications. *J. Anal. Methods Chem.* **2017**, *2017*. [CrossRef]
56. Gu, Y.; Shen, S.; Han, B.; Tian, X.; Yang, F.; Zhang, K. Family livestock waste: An ignored pollutant resource of antibiotic resistance genes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2020**, *197*, 110567. [CrossRef]
57. Wang, L.; Wang, J.; Wang, J.; Zhu, L.; Yang, L.; Yang, R. Distribution characteristics of antibiotic resistant bacteria and genes in fresh and composted manures of livestock farms. *Sci. Total Environ.* **2019**, *695*, 133781. [CrossRef]
58. Mishra, M.; Arukha, A.P.; Patel, A.K.; Behera, N.; Mohanta, T.K.; Yadav, D. Multi-drug resistant coliform: Water sanitary standards and health hazards. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 1–8. [CrossRef]
59. Agensi, A.; Tibyangye, J.; Tamale, A.; Agwu, E.; Amongi, C. Contamination Potentials of Household Water Handling and Storage Practices in Kirundo Subcounty, Kisoro District, Uganda. *J. Environ. Public Health* **2019**, *2019*, 1–8. [CrossRef]
60. Levy, K.; Nelson, K.L.; Hubbard, A.; Eisenberg, J.N.S. Following the water: A controlled study of drinking water storage in Northern Coastal Ecuador. *Environ. Health Perspect.* **2008**, *116*, 1533–1540. [CrossRef]
61. Ercumen, A.; Pickering, A.J.; Kwong, L.H.; Arnold, B.F.; Parvez, S.M.; Alam, M.; Sen, D.; Islam, S.; Kullmann, C.; Chase, C.; et al. Animal Feces Contribute to Domestic Fecal Contamination: Evidence from E. coli Measured in Water, Hands, Food, Flies, and Soil in Bangladesh. *Environ. Sci. Technol.* **2017**, *51*. [CrossRef]
62. Zambrano, L.D.; Levy, K.; Menezes, N.P.; Freeman, M.C. Human diarrhea infections associated with domestic animal husbandry: A systematic review and meta-analysis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2014**, *108*, 313–325. [CrossRef] [PubMed]
63. Centers for Disease Control and Prevention Shigellosis-Chapter 4-2020 Yellow Book | Travelers' Health | CDC. Available online: <https://www.cdc.gov/travel/yellowbook/2020/travel-related-infectious-diseases/shigellosis> (accessed on 31 March 2021).
64. Ortega-Paredes, D.; Haro, M.; Leoro-Garzaín, P.; Barba, P.; Louiza, K.; Mora, F.; Fors, M.; Vinueza-Burgos, C.; Fernández-Moreira, E. Multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from canine faeces in a public park in Quito, Ecuador. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2019**, *18*, 263–268. [CrossRef]
65. Ferrer, N.; Folch, A.; Masó, G.; Sanchez, S.; Sanchez-Vila, X. What are the main factors influencing the presence of faecal bacteria pollution in groundwater systems in developing countries? *J. Contam. Hydrol.* **2020**, *228*, 103556. [CrossRef] [PubMed]

Anexo I: Whole-Genome Characterisation of ESBL-Producing *E. coli* Isolated from Drinking Water and Dog Faeces from Rural Andean Households in Peru



Article

Whole-Genome Characterisation of ESBL-Producing *E. coli* Isolated from Drinking Water and Dog Faeces from Rural Andean Households in Peru

María Luisa Medina-Pizzali ¹, Apoorva Venkatesh ^{2,3}, Maribel Riveros ⁴, Diego Cuicapaza ⁵, Gabriela Salmon-Mulanovich ^{1,6}, Daniel Mäusezahl ^{1,2,3} and Stella M. Hartinger ^{1,2,3,4}

- ¹ Research Unit in Integral Development, Environment and Health, School of Public Health and Administration, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima 15102, Peru; maria.medina.p@upch.pe (M.L.M.-P.); gsalmon@pucp.edu.pe (G.S.-M.); daniel.mausezahl@unibas.ch (D.M.)
 - ² Department of Epidemiology and Public Health, Swiss Tropical and Public Health Institute, 4123 Allschwil, Switzerland; apoorva.venkatesh@swisstph.ch
 - ³ University of Basel, 4001 Basel, Switzerland
 - ⁴ School of Medicine, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima 15102, Peru; maribel.riveros@upch.pe
 - ⁵ Laboratory of Microbial Genomics, Department of Cellular and Molecular Sciences, School of Science and Philosophy, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima 15102, Peru; diego.cuicapaza@upch.pe
 - ⁶ Institute for Earth, Nature and Energy, Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima 15088, Peru
- * Correspondence: stella.hartinger@upch.pe



Citation: Medina-Pizzali, M.L.; Venkatesh, A.; Riveros, M.; Cuicapaza, D.; Salmon-Mulanovich, G.; Mäusezahl, D.; Hartinger, S.M. Whole-Genome Characterisation of ESBL-Producing *E. coli* Isolated from Drinking Water and Dog Faeces from Rural Andean Households in Peru. *Antibiotics* **2022**, *11*, 692. <https://doi.org/10.3390/antib11050692>

Academic Editor: Jie Fu

Received: 2 April 2022

Accepted: 11 May 2022

Published: 20 May 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: *E. coli* that produce extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) are major multidrug-resistant bacteria. In Peru, only a few reports have characterised the whole genome of ESBL enterobacteria. We aimed to confirm the identity and antimicrobial resistance (AMR) profile of two ESBL isolates from dog faeces and drinking water of rural Andean households and determine serotype, phylogroup, sequence type (ST)/clonal complex (CC), pathogenicity, virulence genes, ESBL genes, and their plasmids. To confirm the identity and AMR profiles, we used the VITEK² system. Whole-genome sequencing (WGS) and bioinformatics analysis were performed subsequently. Both isolates were identified as *E. coli*, with serotypes -H46 and O9:H10, phylogroups E and A, and ST/CC 5259/- and 227/10, respectively. The isolates were ESBL-producing, carbapenem-resistant, and not harbouring carbapenemase-encoding genes. Isolate 1143 ST5259 harboured the *estA* gene, encoding the EAST₁ heat-stable toxin. Both genomes carried ESBL genes (*bla*_{TEM-15}, *bla*_{CTX-M-8}, and *bla*_{CTX-M-55}). Nine plasmids were detected, namely IncR, IncFIC(FII), IncI, IncFIB(AP001918), Col(pHAD28), IncFII, IncFII(pHN7A8), Inc1, and IncFIB(AP001918). Finding these potentially pathogenic bacteria is worrisome given their sources and highlights the importance of One-Health research efforts in remote Andean communities.

Keywords: phylogenomic analysis; one health; ESBL-producing *E. coli*; carbapenem resistance; whole-genome sequencing

1. Introduction

Antimicrobial resistance (AMR)—particularly in the *Enterobacteriaceae* family—has become a problem of great relevance worldwide due to its increasing prevalence, and the emergence of multiple-drug-resistant strains AMR can affect everyone, irrespective of age. It is estimated that, in 2019, 4.95 million people died from illnesses associated with bacterial AMR. Of those, 1.27 million deaths, mostly in low- and middle-income countries (LMICs), were directly attributable to bacterial AMR [1]. Enterobacteria are the most important etiological agents of serious hospital-acquired and community-onset bacterial infections in humans [2–5]. In South America, resistance to β -lactam antibiotics and fluoroquinolones is a major problem when treating enterobacterial infections [6]. In addition, reports of the emergence of colistin resistance in this region have been recently published [7,8]. South

American countries show some of the highest rates of AMR in *Enterobacteriaceae* worldwide. Huge socioeconomic differences, broad access to antimicrobials, and ineffective health systems and sanitation problems favour the emergence and spread of resistant bacterial strains [6]. In this region, antibiotic use is widespread in human medicine and animal production; thus antibiotic residues and resistant enterobacteria and AMR genes have been detected in soil, water from different environs, agricultural products (produce), and livestock. In rural Latin America, anthropogenic activities such as animal husbandry, fish farming, and agriculture were identified as drivers for antimicrobial resistance dissemination [9]. The most frequent animal contributions were the carriage and/or transfer of antimicrobial resistance determinants, the inadequate or unregulated use of veterinary antimicrobials, and the spread of resistant bacteria throughout the food supply chain via foods of animal origin [10]. Water was the most frequently identified among the environmental contributors to AMR spread in Andean Peru [9,11,12].

β -Lactamases are the leading cause of resistance to β -lactam antibiotics, and β -lactamase production is the primary mechanism of antibiotic resistance in *Escherichia coli* [13]. Among β -lactamases, extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) that mediate resistance to all penicillins, third-generation cephalosporins, and aztreonam are of utmost importance, given that they substantially reduce the available antibiotic treatment options [14]. ESBLs include the extended-spectrum TEM-, SHV-, OXA-, and ceftaxime (CTX)-M-type enzymes [15], while *E. coli* that produce CTX-Ms are most commonly associated with ESBLs [16]. AmpC β -lactamases—which function as cephalosporinases—are also clinically important. They hydrolyse cephamycins and other extended-spectrum cephalosporins and are poorly inhibited by clavulanic acid; in some cases, they confer resistance to carbapenems [17].

In Peru, previous studies have investigated ESBLs in enterobacteria isolated from clinical, community, and peri-urban settings. However, few reports have characterised ESBL-producing enterobacteria at the molecular level, and if so, mostly in clinical settings [18–22]. Using molecular methods, we previously characterised ESBL-producing enterobacteria from rural Andean communities [12,23]. However, literature on genomic characterisation of ESBL bacteria in Peru is very scarce [24–26]. The present study is the first report of the whole-genome characterisation of ESBL-producing *E. coli* isolates from water and farm/companion animals in a rural Andean setting in Peru. This study aims to confirm the identity and AMR profile and determine the serotype, phylogroup, sequence type (ST) and clonal complex (CC), pathogenicity, virulence genes, ESBL genes, and type of plasmids for ESBL-producing *E. coli* isolates.

2. Materials and Methods

2.1. Study Setting and Design

Hartinger et al. studied the dissemination pathways of AMR in humans, animals, and the environment in the Cajamarca Region in the northern highlands of Peru. The cross-sectional study design and sampling scheme are described elsewhere [23]. In brief, they sampled 40 households. Their study collected two rectal or cloacal swabs of fresh stool samples from a domestic animal (dog, cat) and/or a farm animal (cow, pig, fowl) from each household ($n = 80$). Additionally, two water samples per household were collected, one from the household's drinking water (DW) source and/or one from the household's primary water source ($n = 80$). The two ESBL-positive isolates analysed in the present study originated from two out of 40 households sampled. They were isolated from one water sample and one dog faeces sample, as shown in Supplementary Materials Figure S1.

2.2. Households' Characteristics

Hartinger et al. found only one ESBL isolate from a dog and an ESBL isolate from the DW source from two homes [23]. In these households, animals were allowed to roam freely in the kitchen and courtyard, and their faeces were found in both areas. Both homes used

piped water from the public water network system but had no sewage system, as they had installed latrines instead.

2.3. Microbiological Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing

The microbiological identification and the antimicrobial susceptibility testing were performed using a VITEK[®] 2 Compact automated system (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). A colorimetric reagent card (GN) to identify the most significant fermenting and non-fermenting Gram-negative bacilli was used according to the manufacturer's instructions. AST-N249 cards were prepared according to the manufacturer's instructions. The minimum inhibitory concentrations for the following antimicrobials were recorded (ampicillin/sulbactam (SAM), piperacillin/tazobactam (TZP), ceftazidime (CFZ), cefuroxime (CXM), cefotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ), ceftazidime (CEP), meropenem (MEM), imipenem (IPM), meropenem (MEM), amikacin (AMK), gentamicin (GEN), ciprofloxacin (CIP), colistin (CST), and tigecycline (TGC). Previously [23], antimicrobial susceptibility testing for other antimicrobials has been performed using commercial discs [27]; *Escherichia coli* ATCC 25922 was used as a reference strain for quality assurance of the susceptibility testing of *E. coli*.

2.4. Phenotypical and Molecular Identification of ESBL-Producing Ability

The phenotypical ESBL-producing ability of the isolates was determined using the Jarlier method [28] for the following antibiotics: aztreonam (5 µg disk), ceftazidime (30 µg disk), cefotaxime (30 µg disk), ceftaxime (30 µg disk), amoxicillin/clavulanic acid (30 µg disk) and ceftazidime (30 µg disk), and confirmed by the combined disc method [27]. Further molecular confirmation was performed using conventional polymerase chain reaction PCR. These procedures have been described elsewhere [23]. Briefly, genes encoding TEM-, SHV-, OXA-, and CTX-M-type β-lactamases (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA}, *bla*_{CTX-M-U}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-3}, *bla*_{CTX-M-8}, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{CTX-M-10}) were PCR-amplified using the primers shown previously [23].

2.5. Genome Sequencing and Bioinformatic Analysis

The genomic DNA was extracted from overnight cultures using the GeneJET genomic DNA purification kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), according to the manufacturer's instructions. DNA concentration was evaluated by Qubit[®] 4.0 fluorometer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The genomic library was constructed using a Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) and subsequently sequenced using a 2 × 250 paired-end library on a MiSeq platform (Illumina). The quality control of each sequence was evaluated using FastQC v0.11.5 [29], and Trimmomatic v0.38 [30] was used to remove adapters and filter low-quality reads. The reads were assembled de novo using SPAdes v3.15.2 [31]. The bioinformatic analysis was carried out using the tools available at the Center of Genomic Epidemiology (www.genomicsepidemiology.org) (accessed on 1 October 2021), setting identity at ≥90% and coverage at ≥90%. We performed *E. coli* serotyping (SerotypeFinder v2.0), in silico phylogenetic typing (ClermonTyping (<https://github.com/A-BN/ClermonTyping>) (accessed on 1 January 2022)), multilocus sequence typing (MLST v2.0), pathogenicity (Pathogen Finder v1.1), virulence genes detection (VirulenceFinder v2.0), plasmid replicon typing (PlasmidFinder v2.1 and MobileElementFinder v1.0), and ESBL genes detection using ABRicate v1.0.1 (<https://github.com/tseemann/abrigate>) (accessed on 1 January 2022) NCBI and ResFinder databases. Raw Illumina reads were uploaded to GenBank under BioProject PRJN4816508. The complete outputs for all the results of the bioinformatic tools are shown in Supplementary Materials Table S2.

3. Results

3.1. Microbiological Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of the *E. coli* Isolates

For this analysis, only ESBL-phenotypically-positive isolates obtained in the mother study were included, one from dog faeces (Isolate 1143) and one from the household's DW

source (Isolate 1144). Isolates 1143 and 1144 were identified as *E. coli* strains with a 93% and 96% probability using VITEK[®]2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) automated reading and further confirmed by WGS.

Based on the VITEK[®]2 system, both isolates were resistant to SAM (combined effect); cephalosporins CFZ, CXM, and CTX; TZP (β-lactam/β-lactamase inhibitor combination); and MEM (a carbapenem). However, only Isolate 1143 was resistant to important cephalosporins CAZ and FEP and the combination antibiotic SXT. On the other hand, only Isolate 1144 was resistant to GEN and CIP, while 1143 was not. We compared the VITEK[®]2 automated readings for antimicrobial susceptibility to the disk diffusion assay results, as shown in Supplementary Materials Table S1. It is noteworthy that Isolate 1144 showed resistance to FEP by the disk diffusion method, contrary to the results obtained using the automated VITEK[®]2 platform. The VITEK[®]2 system identified Isolate 1143 as an ESBL producer. Isolate 1144, however, was characterised as ESBL negative based on the MIC results, which were interpreted automatically by the system based on the VITEK[®]2 breakpoints (see Supplementary Materials Table S1).

3.2. Detection of ESBL-Encoding Genes by PCR and Whole-Genome Sequencing Analysis (WGS)

Detection of the most common β-lactamase-encoding genes (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA}, and *bla*_{CTX-M}) was carried out using PCR. None of the isolates showed amplification for *bla*_{SHV} and *bla*_{OXA} genes, but both harboured *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M} genes. WGS analysis using ResFinder and NCBI identified the presence of genes encoding resistance to cephalosporins (*bla*_{CTX-M-8}, *bla*_{CTX-M-55}, *bla*_{CC-13}), broad-spectrum β-lactamases (*bla*_{TEM-1}), tetracyclines (*tet*(B), *tet*(M)), aminoglycosides (*aac*(3)-*IId*, *aph*(3')-*Ia*, *aph*(3')-*Ib*, *aph*(6)-*IId*, and *andA1* and *andA2*), sulphonamides (*sul*3), phenicols (*floR*, *cmiA1*), fosfomycin (*fosA3*), quinolone (*qnrB19*), and trimethoprim (*dfrA12*), as shown in Table 1. The genotypic resistance of both isolates correlated with their phenotypical resistance, except for MEM; the resistance to this carbapenem was only phenotypically observed.

Table 1. Characterisation of the ESBL-producing *E. coli* isolates according to origin and source, sequence type and clonal complex, serotype, virulence genes, resistance phenotype and genotype, and plasmid type.

ID <i>E. coli</i> Strains	Source	ST/CC	Serotype	Phylogroup	Virulence Genes	Resistance Phenotype	Resistance Genotype	Plasmid Type
1143	dog faeces	5259/-	-H46	E	<i>astA</i> , <i>chuA</i> , <i>cia</i> , <i>gad</i> , <i>ompT</i> , <i>terC</i>	SAM, TZP, KZ, CXM, CTX, CAZ, FEP, MEM, SXT	<i>aac</i> (3)- <i>IId</i> , <i>aph</i> (3')- <i>Ib</i> , <i>aph</i> (6)- <i>IId</i> , <i>andA1</i> , <i>andA2</i> , <i>floR</i> , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-8} , <i>tet</i> (M), <i>tet</i> (B) <i>dfrA12</i>	Inc11-4Alpha, IncR, IncF(A)(XIS98), IncFIC(FII)
1144	drinking water	227/10	O9:H10	A	<i>capU</i> , <i>caa</i> , <i>cia</i> , <i>fyuA</i> , <i>intA</i> , <i>sitA</i> , <i>irp2</i> , <i>iroN</i> , <i>terC</i>	SAM, TZP, KZ, CXM, CTX, MEM, CN, CIP	<i>aph</i> (3')- <i>IId</i> , <i>cmiA1</i> , <i>bla</i> _{CTX-M-55} , <i>bla</i> _{CC-13} , <i>fosA3</i> , <i>qnrB19</i> , <i>sul</i> 3, <i>tet</i> (B)	IncFIB, Col1440I, IncFII, IncFII(pHN7A8)

Abbreviations: CC, clonal complex; ST, sequence type. Resistance phenotype: SAM, ampicillin/sulbactam; TZP, piperacillin/tazobactam; KZ, ceftazidime; CXM, cefuroxime; CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; FEP, ceftazidime; MEM, meropenem; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; CN, gentamicin; CIP, ciprofloxacin.

Genomic analysis using MLST 2.0 indicated that the *E. coli* Isolates 1143 and 1144 belonged to ST5259 and ST227, respectively, and 1144 belonged to CC 10. According to the genomes' analysis using the ClermontTyping tool, the 1143 and 1144 isolates corresponded to the phylogenetic groups E and A, respectively. Using SerotypeFinder v2.0, Isolate 1143 was classified as serotype -H46, whereas isolate 1144 belonged to serotype O9:H10, as presented in Table 1.

3.3. Pathogenicity, Virulence Genes, and Type of Plasmids

Using Pathogenfinder 1.1 and VirulenceFinder 2.0, both isolates were identified as likely human pathogens, but Shiga-toxin genes were not detected in their genomes. A

total of 28 different virulence genes were detected from the *E. coli* genomes. The colicin ia (*cia*) virulence gene was detected in both *E. coli* isolates. Other prevalent virulent genes included: *astA*, *iroN*, *chuA*, *gad*, *ompT*, *capU*, *cca*, *fyuA*, *sitA*, *irp2*, *iutA*, and *terC*. The *astA* gene (gene product: EAST₁ heat-stable toxin) was found in Isolate 1143 only.

Using the PlasmidFinder 2.1 and the MobileElementFinder 1.0 tools, four plasmids were detected for Isolate 1143, IncR (harbouring the *aph(3'')-Ib* and *aph(6)-Id* aminoglycoside resistance genes), IncFIC(FII) (harbouring the florfenicol/chloramphenicol resistance *floR* gene), IncII (carrying the *cia* virulence gene), and IncFIB(AP001918). On the other hand, for Isolate 1144, five plasmids were identified, Col(pHAD28) (harbouring the *qnrB19* ciprofloxacin resistance gene), IncFII, IncFII(pHN7A8), IncI1, and IncFIB(AP001918).

4. Discussion

We confirmed the identity of the two enterobacteria isolates (1143 and 1144) as *E. coli*; Isolate 1143—obtained from dog faeces—was an atypical non-lactose fermenter. Lactose-negative uropathogenic *E. coli* strains have been recently isolated from dogs in Brazil [32], and they cause urinary tract infections in humans [33]. Further, lactose-negative *E. coli* are usually enteroinvasive (EIEC), are closely related to *Shigella* spp., and produce a dysenteric form of diarrhoea in humans [34]. Both isolates were likely human pathogens, with serotypes -H46 and O9:H10, respectively. The *E. coli* O9:H10 serotype has been listed among the typical enteroaggregative (EAEC) *E. coli* serotypes in Brazil [35], and the same serotype was identified among samples of Shiga-toxin-producing *E. coli* (STEC) and Enteroaggregative *E. coli* (EAEC) from Mexico [36].

Both isolates were confirmed as ESBL producers given their genomes encoded ESBL genes (*bla*_{CTX-M-8}, *bla*_{CTX-M-55}, *bla*_{EC-15}), contrary to the VITEK[®]2 automated system's classification of Isolate 1144 as a non-ESBL producer. The VITEK[®]2 ESBL test has a varying sensitivity for detecting ESBL-producing enterobacteria correctly; it ranges between 86% and 98.1% [37,38]. The VITEK[®]2 AST N249 card used in our study identified Isolate 1143 as an ESBL producer, but not Isolate 1144, since it was not resistant to FEP and CAZ. However, Isolate 1144 showed a phenotypical resistance to other oxymino cephalosporins CXM and CTX.

Isolate 1143 and Isolate 1144 belonged to phylogroups E and A, respectively. Phylogroup E includes the O157:H7 EHEC lineage, which is only a small subset of the whole genetic diversity found within the group. Phylogroup-E strains are rarely isolated compared to other phylogroup strains. They have been isolated from animals, the environment, and humans, and virulent/resistant strains are linked to humans [39]. Thus, finding an ESBL-producing, potentially pathogenic, phylogroup-E isolate in dog faeces points to a probable transmission route from humans. On the other hand, most phylogroup-A strains are human commensals and can be found in wastewater [40] and animals, especially poultry [41]. Notably, in our setting, backyard chicken farming is widespread (83% of households), and farm animals, in general, are administered antibiotics by the owners without prescription nor technical supervision (unpublished data from our research group). Other studies carried out in rural locations in Peru show similar findings [42,43]. Chickens roam freely, and household members are in contact with their animals and their scattered faeces. On the other hand, the piped water supply and the soil near the houses were contaminated with faecal coliforms originating from the environment, humans, or animals [23]. The fact that both isolates in this study displayed resistance to carbapenems is of great concern, given that this “third line” antimicrobial medication is exclusively for human use [44]. Thus, the ESBL/AmpC carbapenem-resistant *E. coli* isolates found in DW and dog faeces could originate from other farm animals or humans and be transmitted by different pathways, as shown by Hartinger et al. in our study area [23].

Isolates 1143 and 1144 belonged to ST/CC 5259/- and 227/10, respectively. We found that *E. coli* ST227 are considerably common and have been frequently reported around the world. In the public database Enterobase (<https://enterobase.warwick.ac.uk>) (accessed on 1 February 2022), we found 84 publicly available *E. coli* ST227 genome assemblies from

human, animal, and environmental sources. In Tunisia, an ST227 carbapenem-resistant *E. coli* isolate of human origin was reported in 2016, carrying the *bla*_{OXA-48}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{TEM}, and *bla*_{OXA-1} genes [45]. A carbapenem-resistant *E. coli* isolate of the ST227 lineage was isolated from clinical samples in Lebanon, carrying the *bla*_{OXA-48} and the *bla*_{TEM-1} genes [46]. *E. coli* ST5259 are scarce; only two were found in Enterobase, one of them originated from poultry in Ecuador and the other from humans in the United States of America. In China, an *E. coli* ST5259 genome of human origin was mentioned as part of BioProject PRJNA400107, being reported along with other *E. coli* genomes as carriers of the *mcr-1* gene, which is a plasmid-mediated colistin resistance gene [47].

Many of the identified virulence genes were associated with iron acquisition systems, and a small part was associated with toxin production, metal resistance (tellurite), and other virulence determinants, as shown in Supplementary Materials Table S2. The *cia* gene—involved in killing other bacteria—was found in both isolates. The iron uptake genes detected were: *iroN*, *chuA*, *fyuA*, *iutA*, and *sitA*. The *chuA* gene encodes an outer membrane hemin receptor, and the *fyuA* gene encodes the yersiniabactin receptor, and both contribute most during infection of the urinary tract by uropathogenic *E. coli* [48]. The *chuA* gene was detected in Isolate 1143, whereas the *fyuA* gene was found in Isolate 1144 along with the other iron acquisition genes. This flags Isolate 1144 as a possible uropathogenic strain, given it harboured many genes that enable iron uptake, best suited for iron-deprived environments such as human urine [49]. On the other hand, Isolate 1143 harboured the *astA* gene, encoding the EAST₁ heat-stable toxin, which is associated with enteroaggregative *E. coli* (EAEC) in humans and enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) in porcines [50]. None of the isolates' genomes harboured Shiga-toxin genes.

The *bla*_{CTX-M-55} is one of the most abundant ESBL genes in the *Enterobacteriaceae* family, with a rising prevalence in *E. coli* from livestock and humans, especially in China [51,52]. It is usually carried by plasmids, but it has also been found chromosomally [52]. In Canada, enterobacteria isolated from turkeys carried the *bla*_{CTX-M-55} gene mediated by *IncF* plasmids [53]. In Japan, the *bla*_{CTX-M-8} gene was found in *E. coli* from humans and retail chicken meat, and its transmission was associated with *IncI1* plasmids [54].

Unlike *bla*_{CTX-M-55} and *bla*_{CTX-M-8}, which code for Class A ESBL, the *bla*_{EC-15} gene product belongs to the Class C β-lactamases [55], also known as AmpC-type β-lactamases. In comparison to ESBL (including Class A β-lactamases), AmpC-type β-lactamases hydrolyse broad- and extended-spectrum cephalosporins (cephamycins as well as oxymino-β-lactams) but are not inhibited by clavulanic acid or other β-lactamase inhibitors. EC β-lactamases—encoded in *bla*_{EC} genes—are a specific type of AmpC β-lactamases found in *E. coli* [56]. In a recent One-Health study in Canada, the *bla*_{EC-15} gene was detected in *E. coli* isolates from different human, animal, and environmental sources. It did not occur in all isolates, having a prevalence of 16% [57]. The fact that both isolates in our study carried genes for Class A ESBL and AmpC β-lactamases has great clinical importance, given that AmpC/ESBL *E. coli* cannot be treated with clavulanic acid, which complicates the treatment [58]. However, we did not include a cephalosporin/clavulanic acid combination in the disc diffusion assay, so resistance to clavulanic acid was not phenotypically confirmed. Further, both isolates expressed resistance to other antibiotics such as fluoroquinolones and a carbapenem, narrowing treatment options even further. According to Guzmán-Blanco et al. [59], in Latin America, the rates of nosocomial infection caused by ESBL-producing enterobacteria—especially CTX-M enzyme producers—are higher than in other regions. A One-Health-based study in Brazil—the biggest country in the region—showed that ESBL-producing *E. coli* carrying a diversity of *bla*_{CTX-M} gene variants and *mcr-1* genes are endemic across their territory at the interface between humans and animals [60]. ESBL-producing enterobacteria can also be resistant to cefepime and exhibit resistance to fluoroquinolones and ampicillin/sulbactam, as well as to aminoglycosides and piperacillin/tazobactam. Fortunately, more than 90% of ESBL-producing enterobacteria are still susceptible to carbapenems [59], although reports of carbapenem-resistant enterobacteria alarmingly increase in Latin American countries [61].

Despite the phenotypic resistance to meropenem of both isolates in our study, we did not find evidence of well-known carbapenemase-encoding genes—*bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{NDM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}* and *bla_{OXA-48}*—or their variants [62]. Thus, non-carbapenemase mechanisms could be suspected for the isolates in our study. For instance, point mutations in porin genes reduce membrane permeability to carbapenems, in combination with hyperproduction of the β -lactamase AmpC or ESBL. Therefore, the isolates could be characterised as non-carbapenemase, carbapenem-resistant *E. coli* [63,64]. In Singapore, the emergence of this type of bacteria in clinical settings was suggested to result from selective antibiotic pressure along with *de novo* mutations or genetic reassortment in carbapenem-sensitive enterobacteria [65].

Plasmids play a major role in the dissemination of AMR genes in Gram-negative bacteria. Usually, they harbour multiple physically connected genetic determinants, conferring resistance to different classes of antibiotics simultaneously, such as extended-spectrum β -lactams, carbapenems aminoglycosides, sulfonamides, and quinolones [66,67]. Plasmid families, including IncF, IncI1, IncI2, IncX, IncA/C, and IncHI2, play an important part in ESBL gene spread [67]. It is noteworthy that both *E. coli* genomes carried IncI1 plasmid. Our findings show that for isolate 1143, some AMR genes were harboured in plasmids or other mobile genetic elements, e.g., aminoglycoside resistance genes in the IncR plasmid and the *bla_{TEM-1}* gene (resistance to ampicillins) were found to be carried in the Tn2 transposon (<https://transposon.lstmed.ac.uk/tn-registry/>) (accessed on 1 January 2022). Conversely, for isolate 1144, the ciprofloxacin resistance gene (*qnrB19*) was carried by Col4401; this is a plasmid recently associated with enterobacteria-carrying ESBL and carbapenemases genes isolated from environment and humans in South Africa [68]. In our analysis, we found that many AMR genes appeared to be inserted in the chromosome—such as *bla_{CTX-M-55}* and *bla_{CTX-M-8}*—pointing to the mobility of these genes from mobile genetic elements to the chromosome and vice versa and between different plasmids [69].

Our study has some limitations. The presence of AMR genes harboured in plasmids points to horizontal transfer of AMR determinants. However, conjugation assays should be performed for these isolates to confirm the transfer of genes via plasmids to other bacteria. In addition, isolates were not tested to phenotypically confirm AmpC, pathogenicity, and/or EAST1 toxin production. Due to laboratory limitations and restrictions, it was impossible to perform these confirmatory assays. Another limitation is the low number of isolates available for characterisation, which may have limited the scope of detection of important resistance/virulence genes and plasmids.

5. Conclusions

Isolates 1143 and 1144 were identified as ESBL-producing *E. coli*, with serotypes -H46 and O9:H10; phylogroups E and A, and ST/CC 5259/- and 227/10, respectively. They were characterised as potential human pathogens, and they carried multiple virulence genes; isolate 1143 ST5259 harboured the *astA* gene, encoding the EAST1 heat-stable toxin. Both genomes were carriers of a *bla_{EC-15}* gene (AmpC), displaying carbapenem resistance, but not harbouring carbapenemase genes. Other ESBL genes (*bla_{CTX-M-8}* and *bla_{CTX-M-55}*) among various AMR genes were detected, mainly located in plasmids or the chromosome. *E. coli* of the ST227 lineage were reported in other countries, while *E. coli* ST5259 reports were rare. Both isolates were found in a remote area in the highlands of Peru, which is of public health concern considering the likely anthropogenic origin derived from incorrect and often unrestricted use of antibiotics in both humans and livestock. Our results can help identify and track *E. coli* strains that pose a risk to human, animal, and environmental health in rural Andean communities. The *E. coli* isolates originated from an animal and DW, highlighting the importance of comprehensive research for preventive action along the One-Health continuum in isolated Andean communities. The sharing of living spaces between humans and animals and the use of contaminated DW could facilitate the transfer of these pathogens to all environs in the community. Thus, new research paths to limit

the spread of AMR should focus on the epidemiology of ESBL/AmpC *E. coli*, particularly carbapenem-resistant strains.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/antibiotics11050692/s1>, Figure S1: Obtention of the *E. coli* isolates 1143 and 1144; Table S1: Antibiotic susceptibility^a profile for *E. coli* isolates 1143 and 1144 determined by the VITEK[®]2 system and compared to the disk diffusion assay results^b; Table S2: Outputs of bioinformatic tools.

Author Contributions: Conceptualisation, S.M.H., M.R. and D.C.; methodology, M.R. and D.C.; bioinformatic analysis, D.C. and M.L.M.-P.; visualisation, D.C.; writing—original draft preparation, M.L.M.-P., A.V. and D.C.; writing—review and editing, M.L.M.-P., A.V., D.C., M.R., S.M.H., G.S.-M. and D.M.; supervision, D.M., S.M.H. and G.S.-M.; funding acquisition, S.M.H. and D.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Novartis Foundation (Grant Number 18A059), and D.C. was supported by a scholarship from Emerge, the Emerging Diseases Epidemiology Research Training D43 TW007393 training grant awarded by the Fogarty International Center of the US National Institutes of Health.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Review Board for humans and animal subjects of the Universidad Peruana Cayetano Heredia, Protocol Codes 418-16-18 and 010-03-20.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The raw reads and assembled data have been submitted to National Center for Biotechnology Information (NCBI) under BioProject Number PRJNA816508.

Acknowledgments: We thank Pablo Tsukayama for his comments on the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

- Murray, C.J.; Ikuta, K.S.; Sharara, F.; Swetschinski, L.; Robles Aguilar, G.; Gray, A.; Han, C.; Bisignano, C.; Rao, P.; Wool, E.; et al. Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis. *Lancet* **2022**, *399*, 629–655. [\[CrossRef\]](#)
- D'Agostino, M.; Cook, N. Foodborne Pathogens. In *Encyclopedia of Food and Health*; Caballero, B., Finglas, P., Toldrá, F., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2015; pp. 83–86.
- Guentzel, M.N. *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, and *Proteus*. In *Medical Microbiology*; Baron, S., Ed.; University of Texas Medical Branch at Galveston: Galveston, TX, USA, 1996.
- Larsson, D.G.J.; Flach, C.-F. Antibiotic Resistance in the Environment. *Nat. Rev. Microbiol.* **2021**, *20*, 257–269. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Laxminarayan, R.; Duse, A.; Watal, C.; Zaidi, A.K.M.; Wertheim, H.F.L.; Sumpradit, N.; Vlieghe, E.; Hara, G.L.; Gould, L.M.; Goossens, H.; et al. Antibiotic Resistance—the Need for Global Solutions. *Lancet Infect. Dis.* **2013**, *13*, 1057–1098. [\[CrossRef\]](#)
- Bonelli, R.R.; Moreira, B.M.; Picão, R.C. Antimicrobial Resistance among Enterobacteriaceae in South America: History, Current Dissemination Status and Associated Socioeconomic Factors. *Drug Resist. Updat.* **2014**, *17*, 24–36. [\[CrossRef\]](#)
- Mendes Oliveira, V.R.; Paiva, M.C.; Lima, W.G. Plasmid-Mediated Colistin Resistance in Latin America and Caribbean: A Systematic Review. *Travel Med. Infect. Dis.* **2019**, *31*, 101459. [\[CrossRef\]](#)
- Rapoport, M.; Faccione, D.; Pasteran, F.; Ceriana, P.; Albornoz, E.; Petroni, A.; Corso, A.; Maldonado, M.L.; Lucero, C.; Amalfa, F.; et al. First Description of Mcr-1-Mediated Colistin Resistance in Human Infections Caused by *Escherichia coli* in Latin America. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60*, 4412–4413. [\[CrossRef\]](#)
- Medina-Pizzali, M.L.; Hartinger, S.M.; Salmon-Mulanovich, G.; Larson, A.; Riveros, M.; Mäusezahl, D. Antimicrobial Resistance in Rural Settings in Latin America: A Scoping Review with a One Health Lens. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 9837. [\[CrossRef\]](#)
- Van Boeckel, T.P.; Pires, J.; Silvester, R.; Zhao, C.; Song, J.; Crisuculo, N.G.; Gilbert, M.; Bonhoeffer, S.; Laxminarayan, R. Global Trends in Antimicrobial Resistance in Animals in Low- And Middle-Income Countries. *Science* **2019**, *365*, eaaw1944. [\[CrossRef\]](#)
- Ahmad, I.; Malak, H.A.; Abulreesh, H.H. Environmental Antimicrobial Resistance and Its Drivers: A Potential Threat to Public Health. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2021**, *27*, 101–111. [\[CrossRef\]](#)

12. Larson, A.; Hartinger, S.M.; Riveros, M.; Salmon-Mulanovich, G.; Hattendorf, J.; Verastegui, H.; Huaylinos, M.L.; Mäusezahl, D. Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* in Drinking Water Samples from Rural Andean Households in Cajamarca, Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2019**, *100*, 1363–1368. [CrossRef]
13. Pitout, J.D.D. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: An Update on Antimicrobial Resistance, Laboratory Diagnosis and Treatment. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2012**, *10*, 1165–1176. [CrossRef] [PubMed]
14. World Health Organization. *Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2014.
15. Sawa, T.; Kouguchi, K.; Moriyama, K. Molecular Diversity of Extended-Spectrum β -Lactamases and Carbapenemases, and Antimicrobial Resistance. *J. Intensive Care Med.* **2020**, *8*, 13. [CrossRef] [PubMed]
16. Peirano, G.; Pitout, J.D.D. Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: Update on Molecular Epidemiology and Treatment Options. *Drugs* **2019**, *79*, 1529–1541. [CrossRef] [PubMed]
17. Mohamudha, P.R.; Harish, B.N.; Parija, S.C. AmpC Beta Lactamases among Gram Negative Clinical Isolates from a Tertiary Hospital, South India. *Braz. J. Microbiol.* **2010**, *41*, 596–602. [CrossRef] [PubMed]
18. Colquechagua Alhaja, F.; Andrade Sevilla, C.; Escalante Gonzales, E. Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in Fecal Samples at the National Institute of Child Health, Peru. *Rev. Peru Med. Exp. Salud Publica* **2015**, *32*, 26–32. [CrossRef] [PubMed]
19. Loyola, S.; Gutierrez, L.R.; Horna, G.; Petersen, K.; Agapito, J.; Osada, J.; Rios, P.; Lescano, A.G.; Tamariz, J. Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Cell Phones of Health Care Workers from Peruvian Pediatric and Neonatal Intensive Care Units. *Am. J. Infect. Control* **2016**, *44*, 910–916. [CrossRef] [PubMed]
20. Garcia, C.; Hinojosa, N.; Astocondor, L.; Ochoa, T.; Jacobs, J. Characterization of ESBL-Producing Salmonella Enterica Serovar Infantis Infection in Humans, Lima, Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2019**, *101*, 746–748. [CrossRef]
21. León-Luna, D.; Fajardo-Loyola, A.; Yareta-Yareta, J.; Burgos-Espejo, A.; Peralta-Siesquen, C.; Galarza-Pérez, M.; Marcos-Carbalaj, P. Molecular Characterization of Multi-Resistant Enterobacteria in Two Departments of the Peruvian Jungle. *Biomédica* **2021**, *41*, 180–187. [CrossRef]
22. Benavides, J.A.; Shiva, C.; Vinueza, M.; Tello, C.; Appelgren, A.; Vendrell, J.; Solassol, J.; Godreuil, S.; Streicker, D.G. Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Common Vampire Bats *Desmodus Rotundus* and Livestock in Peru. *Zoonoses Public Health* **2018**, *65*, 454–458. [CrossRef]
23. Hartinger, S.M.; Medina-Pizzali, M.L.; Salmon-Mulanovich, G.; Larson, A.J.; Pinedo-Bardales, M.; Verastegui, H.; Riberos, M.; Mäusezahl, D. Antimicrobial Resistance in Humans, Animals, Water and Household Environments in Rural Andean Peru: Exploring Dissemination Pathways through the One Health Lens. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 4664. [CrossRef]
24. Quino, W.; Hurtado, C.V.; Escalante-Maldonado, O.; Flores-León, D.; Mestanza, O.; Vences-Rosales, F.; Zamudio, M.L.; Gavilán, R.G. Multidrug Resistance of Salmonella infantis in Peru: A Study through next Generation Sequencing. *Rev. Peru Med. Exp. Salud Publica* **2019**, *36*, 37–45. [CrossRef] [PubMed]
25. Benavides, J.A.; Godreuil, S.; Opazo-Capurro, A.; Mahamat, O.O.; Falcon, N.; Oravcova, K.; Streicker, D.G.; Shiva, C. Long-Term Maintenance of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Carried by Vampire Bats and Shared with Livestock in Peru. *Sci. Total Environ.* **2022**, *810*, 152045. [CrossRef] [PubMed]
26. Murray, M.; Salvatierra, G.; Dávila-Barclay, A.; Ayzanoa, B.; Castillo-Vilcahuaman, C.; Huang, M.; Pajuelo, M.J.; Lescano, A.G.; Cabrera, L.; Calderón, M.; et al. Market Chickens as a Source of Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* in a Peri-Urban Community in Lima, Peru. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 635871. [CrossRef] [PubMed]
27. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 30th ed.; Clinical Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2020.
28. Lezameta, L.; González-Escalante, E.; Tamariz, J.H. Comparison of four phenotypic methods to detect Extended-Spectrum β -Lactamases. *Rev. Peru Med. Exp. Salud Publica* **2010**, *27*, 345–351. [CrossRef] [PubMed]
29. Andrews, S. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. Available online: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (accessed on 28 February 2022).
30. Bolger, A.M.; Lohse, M.; Usadel, B. Trimmomatic: A Flexible Trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2114–2120. [CrossRef] [PubMed]
31. Bankevich, A.; Nurk, S.; Antipov, D.; Gurevich, A.A.; Dvorkin, M.; Kulikov, A.S.; Lesin, V.M.; Nikolenko, S.I.; Pham, S.; Pribelski, A.D.; et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J. Comput. Biol.* **2012**, *19*, 455–477. [CrossRef] [PubMed]
32. Siqueira, F.M.; de Carli, S.; Lopes, C.E.; Machado, L.; Vieira, T.R.; Pöppel, G.; Cardoso, M.R.I.; Zaha, A. Non-Lactose-Fermenting Uropathogenic *Escherichia coli* from Dogs: Virulence Profile Characterization. *Lett. Appl. Microbiol.* **2021**, *72*, 596–603. [CrossRef]
33. Gajdács, M.; Ábrók, M.; Lázár, A.; Burián, K. Differential Epidemiology and Antibiotic Resistance of Lactose-Fermenting and Non-Fermenting *Escherichia coli*: Is It Just a Matter of Taste? *Biol. Futur.* **2020**, *71*, 175–182. [CrossRef]
34. Food and Drug Administration. Chapter 4A: Diarrheogenic *Escherichia coli*. Available online: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4a-diarrheogenic-escherichia-coli> (accessed on 1 January 2022).
35. Ori, E.L.; Takagi, E.H.; Andrade, T.S.; Miguel, B.T.; Cergole-Novella, M.C.; Guth, B.E.C.; Ferrnandes, R.T.; Dias, R.C.B.; Pinheiro, S.R.S.; Camargo, C.H.; et al. Diarrheogenic *Escherichia coli* and *Escherichia* Albertii in Brazil: Pathotypes and Serotypes over a 6-Year Period of Surveillance. *Epidemiol. Infect.* **2019**, *147*, e10. [CrossRef]

36. Navarro, A.; van der Ploeg, C.; Rogé, A.; Licona-Moreno, D.; Delgado, G.; Morales-Espinosa, R.; Cravioto, A.; Esalva, C. Diversity of Potentially Pathogenic *Escherichia coli* O104 and O9 Serogroups Isolated before 2011 from Fecal Samples from Children from Different Geographic Regions. *Microorganisms* **2021**, *9*, 2227. [CrossRef]
37. Spanu, T.; Sanguinetti, M.; Tumbarello, M.; D'Inzeo, T.; Fiori, B.; Posteraro, B.; Santangelo, R.; Cauda, R.; Fadda, G. Evaluation of the New VITEK 2 Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) Test for Rapid Detection of ESBL Production in Enterobacteriaceae Isolates. *J. Clin. Microbiol.* **2006**, *44*, 3257–3262. [CrossRef] [PubMed]
38. Wiegand, I.; Geiss, H.K.; Mack, D.; Stürenburg, E.; Seifert, H. Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamases among Enterobacteriaceae by Use of Semiautomated Microbiology Systems and Manual Detection Procedures. *J. Clin. Microbiol.* **2007**, *45*, 1167–1174. [CrossRef] [PubMed]
39. Clermont, O.; Condamine, B.; Dion, S.; Gordon, D.M.; Denamur, E. The E Phylogroup of *Escherichia coli* Is Highly Diverse and Mimics the Whole E. Coli Species Population Structure. *Environ. Microbiol.* **2021**, *23*, 7139–7151. [CrossRef] [PubMed]
40. De Castro Stoppe, N.; Silva, J.S.; Carlos, C.; Sato, M.I.Z.; Saraiva, A.M.; Ottoboni, L.M.M.; Torres, T.T. Worldwide Phylogenetic Group Patterns of *Escherichia coli* from Commensal Human and Wastewater Treatment Plant Isolates. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 2512. [CrossRef]
41. Coura, F.M.; Diniz, S.D.A.; Silva, M.X.; Mussi, J.M.S.; Barbosa, S.M.; Lage, A.P.; Heinemann, M.B. Phylogenetic Group Determination of *Escherichia coli* Isolated from Animals Samples. *Sci. World J.* **2015**, *2015*, 258424. [CrossRef]
42. Alberca, V.; León, D.; Falcón, N. Keeping Backyard Animals and Evaluation of Knowledge and Practices Associated with Exposure to Zoonotic Agents in La Coipa, Cajamarca, Peru. *Rev. Inv. Vet. Peri* **2020**, *31*, e18733. [CrossRef]
43. Benavides, J.A.; Streicker, D.G.; Gonzales, M.S.; Rojas-Paniagua, E.; Shiva, C. Knowledge and Use of Antibiotics among Low-Income Small-Scale Farmers of Peru. *Prev. Vet. Med.* **2021**, *189*, 105287. [CrossRef]
44. World Organisation for Animal Health. *OIE List Of Antimicrobial Agents Of Veterinary Importance*; World Organisation for Animal Health: Paris, France, 2007.
45. Tarríos, F.B.; Alonso, C.A.; Aebour, W.; Ruiz-Rips, L.; Torres, C.; Hassen, A.B. First Description of KPC-2-Producing *Escherichia coli* and ST15 OXA-48-Positive *Klebsiella pneumoniae* in Tunisia. *Microb. Drug Resist.* **2017**, *23*, 365–375. [CrossRef]
46. Beyrouthy, R.; Robin, F.; Dabboussi, F.; Mallat, H.; Hamzi, M.; Bonnet, R. Carbapenemase and Virulence Factors of Enterobacteriaceae in North Lebanon between 2008 and 2012: Evolution via Endemic Spread of OXA-48. *J. Antimicrob. Chemother.* **2014**, *69*, 2699–2705. [CrossRef]
47. Peng, Z.; Hu, Z.; Li, Z.; Zhang, X.; Jia, C.; Li, T.; Dai, M.; Tan, C.; Xu, Z.; Wu, B.; et al. Antimicrobial Resistance and Population Genomics of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* in Pig Farms in Mainland China. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 1116. [CrossRef]
48. Spurbeck, R.R.; Dinh, P.C.; Walk, S.T.; Stapleton, A.E.; Hooton, T.M.; Nolan, L.K.; Kim, K.S.; Johnson, J.R.; Mobley, H.L.T. *Escherichia coli* Isolates That Carry Vat, FyuA, Chua, and Yfc Efficiently Colonize the Urinary Tract. *Infect. Immun.* **2012**, *80*, 4115–4122. [CrossRef] [PubMed]
49. Gonzales-Rodriguez, A.O.; Varillas, S.F.I.; Pastor, H.J.B.; Mitma, Y.L.; Canales, D.H.; Chero, P.A.W.; Gutierrez, C.; Cunza, S.S. Immunological and Biochemical Response from Older Adults with Urinary Tract Infection to Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence Factors. *Rev. Peru Med. Exp. Salud Publica* **2020**, *37*, 527–531. [CrossRef] [PubMed]
50. Zhang, W.; Berberov, E.M.; Freeling, J.; He, D.; Moxley, R.A.; Francis, D.H. Significance of Heat-Stable and Heat-Labile Enterotoxins in Porcine Colibacillosis in an Additive Model for Pathogenicity Studies. *Infect. Immun.* **2006**, *74*, 3107–3114. [CrossRef] [PubMed]
51. Zeng, S.; Luo, J.; Li, X.; Zhou, C.; Wu, A.; Chen, X.; Huang, L.S. Molecular Epidemiology and Characteristics of CTX-M-55 Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* From Guangzhou, China. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 730012. [CrossRef] [PubMed]
52. Zhang, C.Z.; Ding, X.M.; Lin, X.L.; Sun, R.Y.; Lu, Y.W.; Cai, R.M.; Webber, M.A.; Ding, H.Z.; Jiang, H.X. The Emergence of Chromosomally Located Bla_{TX-M-55} in *Salmonella* from Foodborne Animals in China. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1268. [CrossRef] [PubMed]
53. Mofatt, J.; Chalmers, G.; Reid-Smith, R.; Mulvey, M.R.; Agunos, A.; Calvert, J.; Cormier, A.; Ricker, N.; Weese, J.S.; Boerlin, P. Resistance to Extended-Spectrum Cephalosporins in *Escherichia coli* and Other Enterobacteriales from Canadian Turkeys. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0236442. [CrossRef]
54. Norizuki, C.; Wachino, J.; Suzuki, M.; Kawamura, K.; Nagano, N.; Kimura, K.; Arakawa, Y. Specific Bla_{CTX-M-8/Incl1} Plasmid Transfer among Genetically Diverse *Escherichia coli* Isolates between Humans and Chickens. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e00663-17. [CrossRef]
55. National Library of Medicine (US). *Reference Gene Catalog*; National Library of Medicine: Bethesda, MD, USA, 2022.
56. Alcock, B.P.; Rappahy, A.R.; Lau, T.T.Y.; Tsang, K.K.; Bouchard, M.; Edalatmand, A.; Huynh, W.; Nguyen, A.L.V.; Cheng, A.A.; Liu, S.; et al. CARD 2020: Antibiotic Resistance Surveillance with the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, D517. [CrossRef]
57. Adator, E.H.; Walker, M.; Narvaez-Bravo, C.; Zaheer, R.; Goji, N.; Cook, S.R.; Tymensen, L.; Hannon, S.J.; Church, D.; Booker, C.W.; et al. Whole Genome Sequencing Differentiates Presumptive Extended Spectrum Beta-Lactamase Producing *Escherichia coli* along Segments of the One Health Continuum. *Microorganisms* **2020**, *8*, 448. [CrossRef]
58. Tekele, S.G.; Teklu, D.S.; Tullu, K.D.; Birru, S.K.; Legese, M.H. Extended-Spectrum Beta-Lactamase and AmpC Beta-Lactamases Producing Gram Negative Bacilli Isolated from Clinical Specimens at International Clinical Laboratories, Addis Ababa, Ethiopia. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0241984. [CrossRef]

59. Guzmán-Blanco, M.; Labarca, J.A.; Villegas, M.V.; Gotuzzo, E. Extended Spectrum β -Lactamase Producers among Nosocomial Enterobacteriaceae in Latin America. *Braz. J. Infect. Dis.* **2014**, *18*, 421–433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Fuga, B.; Sellera, F.P.; Carneira, L.; Esposito, F.; Cardoso, B.; Fontana, H.; Moura, Q.; Cardenas-Arias, A.; Sano, E.; Ribas, R.M.; et al. WHO Critical Priority *Escherichia coli* as One Health Challenge for a Post-Pandemic Scenario: Genomic Surveillance and Analysis of Current Trends in Brazil. *Microbiol. Spectr.* **2022**, *10*, 1–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Escandón-Vargas, K.; Reyes, S.; Gutiérrez, S.; Villegas, M.V. The Epidemiology of Carbapenemases in Latin America and the Caribbean. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2017**, *15*, 277–297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Cui, X.; Zhang, H.; Du, H. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Detection and Antimicrobial Therapy. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1823. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). CRE Technical Information. Available online: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/cre/technical-info.html> (accessed on 19 February 2022).
64. Temkin, E.; Adler, A.; Lerner, A.; Carmeli, Y. Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: Biology, Epidemiology, and Management. *Ann. NY Acad. Sci.* **2014**, *1323*, 22–42. [[CrossRef](#)]
65. Marimuthu, K.; Ng, O.T.; Cherng, B.P.Z.; Fong, R.K.C.; Pada, S.K.; De, P.P.; Cui, S.T.; Smitasin, N.; Thoon, K.C.; Krishnan, P.U.; et al. Antecedent Carbapenem Exposure as a Risk Factor for Non-Carbapenemase-Producing Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae and Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*, e00845-19. [[CrossRef](#)]
66. Carattoli, A. Plasmids and the Spread of Resistance. *Int. J. Med. Microbiol.* **2013**, *303*, 298–304. [[CrossRef](#)]
67. Carattoli, A. Resistance Plasmid Families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 2227–2238. [[CrossRef](#)]
68. Ramsamy, Y.; Mlisana, K.P.; Amoako, D.G.; Abia, A.L.K.; Ismail, A.; Allam, M.; Mbanga, J.; Singh, R.; Essack, S.Y. Mobile Genetic Elements-Mediated Enterobacteriales-Associated Carbapenemase Antibiotic Resistance Genes Propagation between the Environment and Humans: A One Health South African Study. *Sci. Total Environ.* **2022**, *806*, 150641. [[CrossRef](#)]
69. Partridge, S.R.; Kwong, S.M.; Firth, N.; Jensen, S.O. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **2018**, *31*, e00088-17. [[CrossRef](#)]