

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



“Aislamiento y caracterización molecular de cepas de *E. coli* y *Klebsiella* spp productoras de betalactamasas de espectro extendido, y de *Staphylococcus* spp resistentes a meticilina en murciélagos hematófagos y animales de crianza extensiva en la región de Lima”

**Tesis para optar el Título Profesional de:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

Gabriela María Melgarejo Anamaría

Bachiller en Medicina Veterinaria y Zootecnia

LIMA - PERÚ

2018

*A mis padres y hermanas que siempre creyeron en mí
y me apoyaron de distintas maneras.*

AGRADECIMIENTOS

Al FONDECYT por el financiamiento de esta tesis mediante el proyecto " El rol del murciélago hematófago en la transmisión de bacterias resistentes a los antibióticos utilizados en ganado y humanos" **Convenio/ N°J003-16-FONDECYT**.

Al Dr. Carlos Shiva Ramayoni por ser el director de mi tesis y al PhD Julio Benavides por ser mi asesor externo durante la redacción de este proyecto

Al Biólogo Carlos Tello que me ayudo en la captura de murciélagos y la toma de muestras en ganadería.

Al Dr. Sylvain Godreuil por realizar la prueba de espectrometría de masas, la prueba del Test confirmatorio de BLEE y el análisis molecular en el Hospital Arnaud de Villeneuve de Montpellier, Francia.

A las personas que me ayudaron durante el procesamiento de muestras en el laboratorio y el análisis estadístico de los resultados: MVZ Melisa Romero Morante, MVZ Inés Alejos Tapia, MVZ Rosa Fernández y el Dr. Cesar Losa, así como a todas las personas que me apoyaron a finalizar la tesis.

ABSTRACT

Bacterial resistance is a natural biological phenomenon in which the use of antibiotics forces the microorganism to adapt to the drug by selective pressure or die, therefore the indiscriminate use of antibiotics for prophylactic purposes or for treatment in domestic animals entails possible risks of resistant strain proliferation to other animals, either domestic or wild. The main purpose of this study was the isolation of extended spectrum beta-lactamases producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* (ESBL) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains from hematophagous bats and extensive systems of livestock breeding in five provinces of Lima. Faecal and nasal samples were taken from 218 hematophagous bats (*Desmodus rotundus*) and 134 livestock animals. The isolates were cultivated directly in two chromogenic agars: Hicrome® ESBL agar base, obtaining (130/352) samples, from cattle and bats; and (9/352) in Hicrome® MeReSa agar base, for both species studied. The identification of the isolates were done by the MALDI-TOF technique (desorption/ ionization by laser assisted by matrix), where 87.7% (114/130) was typified as *E. coli*, 3% (4/130) as *Klebsiella pneumoniae* and none (0/9) as *Staphylococcus aureus*. Subsequently, after the strains identification, extended spectrum beta-lactamases production was confirmed with the double –disc synergy test, where ESBL producing *E. coli* and *K. pneumoniae* were detected in 5.5% of bats and 79% of livestock animals. Finally, Broad-spectrum B – lactamase genes (*bla*) were identified by multiplex PCR molecular analysis, expressing the genes *bla* CTX-M-gr1, *bla* CTX-M-gr9, *bla* OXA.-like and *bla* TEM for both population groups.

Key words: Resistance to antibiotics, beta-lactamases, methicillin-resistant *Staphylococcus* spp, blood-sucking bats

RESUMEN

La resistencia bacteriana es un fenómeno biológico natural donde el uso del antibiótico obliga al microorganismo a adaptarse al fármaco por presión selectiva o morir, de allí que el uso indiscriminado de antibióticos con fines profilácticos o como tratamiento conlleva a posibles riesgos de proliferación de cepas resistentes a otros animales, tanto domésticos como de fauna silvestre. El presente estudio tuvo como objetivo el aislamiento de cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) en murciélagos hematófagos y animales domésticos de crianza extensiva en cinco provincias de la región de Lima. Se tomaron muestras fecales y nasales a 218 murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*) y a 134 animales de crianza (Bovino, caprinos y porcinos). Las cuales fueron cultivadas directamente en dos agares cromogénicos: Hicrome® ESBL agar base, obteniéndose crecimiento bacteriano en (130/352) ejemplares de ganado y murciélagos: y (9/352) en Hicrome® MeReSa agar base para ambas especies estudiadas. La identificación de los aislados se hizo mediante la técnica de Maldi Tof (desorción/ionización mediante láser asistida por matriz), donde se tipificó al 87.7% (114/130) como *E. coli*, 3% (4/130) como *Klebsiella pneumoniae* y ninguna (0/9) como *Staphylococcus spp.* Posteriormente, la producción de betalactamasas de espectro extendido se confirmó por la prueba de sinergia del doble disco, donde el 5.5% de las muestras de murciélagos y el 79% de ganado fueron *E. coli* y *K. Pneumoniae* productoras de BLEE. Por último, se identificaron los genes de resistencia β -lactámicos (*bla*), por medio del análisis molecular PCR multiplex, expresándose así los genes *bla* CTX-M-gr1, *bla*CTX-M-gr9, *bla*OXA-like y *bla*TEM para ambos especies.

Palabras clave: Resistencia antimicrobiana, betalactamasas, *Staphylococcus spp* meticilino resistente, murciélagos

INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana es un fenómeno biológico natural donde el uso del antibiótico obliga al microorganismo a adaptarse al fármaco por presión selectiva o morir (FAO/OMS, 2005). Como resultado de esta adaptación, los medicamentos se vuelven ineficaces, permitiendo que las infecciones persistan en el organismo (OMS, 2017). Considerando que los antimicrobianos son la principal herramienta terapéutica en el tratamiento de infecciones bacterianas en Medicina Veterinaria (Figuroa, 2004) y que su uso en esta área no solo tiene motivos terapéuticos sino también como promotor de crecimiento (FAO/OMS, 2005; Cota *et al.*, 2014; Wall *et al.*, 2016); se podría atribuir que este uso indiscriminado de antibióticos, ya sea en la ganadería o en la salud de las personas, podría generar el desarrollo de cepas resistentes y tener un impacto en la expresión, selección y transferencia de éstas en la población (FAO/OMS, 2005; Wall *et al.* 2016).

Los grupos de antibióticos más usados en la práctica veterinaria son los fármacos betalactámicos (Smet *et al.*, 2010; Guenther *et al.*, 2012), los cuales tienen una acción bactericida que actúa como sustrato competitivo de las enzimas participantes en la síntesis de membrana del microorganismo; provocando, así, la desestabilización de la pared celular y al final la producción de la lisis bacteriana por autolisinas (García *et al.*, 2011). El desarrollo de resistencia bacteriana hacia estos fármacos; presenta al menos tres a más mecanismos de protección (Figuroa, 2004;-Smet *et al.*, 2010; García *et al.*, 2011): El primero consiste en mutaciones en los genes que codifican las proteínas fijadoras de penicilina (PBP), teniendo una afinidad reducida por las β -lactamasas y manteniendo la pared celular (Smet *et al.*, 2010); el segundo mecanismo consiste en un cambio en la permeabilidad de la pared celular, por alteraciones de porinas y mecanismo de eflujo; y el tercer mecanismo es la inactivación del fármaco por β -lactamasas, el cual sería el mecanismo de

principal resistencia en la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), cuyo sistema de resistencia consiste en la hidrolización del enlace amida del anillo betalactámico en el antibiótico (Smet *et al.*, 2010; Garcia *et al.*, 2011).

Según la OMS (2014), enterobacterias como *E. coli* y *Klebsiella* spp son consideradas de gran preocupación, ya que presentan una elevada resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, fluoroquinolonas y carbapenemos. Así mismo, esta significativa resistencia bacteriana es observada en centros de producción ganadera, donde el 86% de cepas resistentes de *E. coli* presentaron sensibilidad a las gentamicinas, cefquinonas y cefoperazonas en muestras de leche bovina (Figueroa, 2004). En estudios realizados en cerdos y cabras se ha encontrado cepas resistentes de *E. coli* hasta en nueve antibióticos (Yang *et al.*, 2004). Por otro lado, en cepas aisladas de carnes y derivados lácteos se observan casos notables de resistencia hacia las quinolonas y cefalosporinas de tercera generación (Wall *et al.*, 2016). En otro estudio se encontró una prevalencia de 60% y 43.8% de cepas de *E. coli* productoras de BLEE en ganado de leche y en un centro porcino de engorde, respectivamente (Friesse *et al.*, 2013).

En el Continente americano se estima que el 90% de infecciones, tanto en personas como animales, son por *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA); así mismo en otros continentes las cepas meticilino resistentes por *Staphylococcus* spp oscilan entre un 60% a 80% de los casos (OMS, 2017). Esta resistencia se puede hallar tanto en animales sanos o enfermos (García-Álvarez *et al.*, 2011) y puede deberse a la expresión de un gen cromosómico *mecA* en dicha cepa, que codifica la síntesis de la proteína PBP2a encargada de la ligación de la penicilina; existiendo así seis tipos (del I al VI) de este gen (Casellas, 2011). La resistencia a este agente ha sido observada en 73.3% de aislamientos en cerdos de engorde y en 31.8% en otros animales de granja (Frieese *et al.*, 2013). Así mismo, García-Álvarez *et al.* (2012) aislaron cepas meticilino-resistente en leche de bovino de granjas en Inglaterra, cuyo tipo de gen *mecA* era idéntico al de

cepas aisladas en humanos de la misma región. También cabe destacar que las personas involucradas en la crianza de ganado bovino o porcino son más susceptibles a ser infectadas con MRSA a comparación de otras personas con labores diferentes (García-Álvarez *et al.*, 2011).

La transferencia y expresión de la resistencia bacteriana en la población podría deberse a la adquisición de genes móviles como plásmidos, transposones o integrones (Delicado, 2015; Afiukwa *et al.*, 2016; Wall *et al.*, 2016); quienes a menudo codifican el material genético de la bacteria otorgándoles la capacidad de resistir a diferentes fármacos; además de tener la facultad de intercambiar estos genes resistentes entre otros microorganismos (Figueroa, 2004; Afiukwa *et al.*, 2016). En el caso de BLEE son frecuentes los genes betalactámicos (*bla*): *bla*TEM, *bla*SHIV y *bla*CTX-M (Delicado, 2015; Benavides *et al.*, 2017) y en el caso de MRSA se tiene el gen MECA_{Alga251} y *mecA1* (García-Álvarez *et al.*, 2011). Así mismo, según Iroha *et al.* (2015), el ganado representa un reservorio de cepas de BLEE y MRSA, que al ser excretados al medio ambiente afectan a los animales silvestres que se encuentra en contacto con estos. Por ende, en un estudio realizado en gorriones cercanos a centros ganaderos se observó que un 75% de las aves presentaban el gen de resistencia *sulII* y el 25% el gen *tet(A)* (Delicado, 2015); mientras que en otro estudio realizado en ciervos (*Cervus elaphus*) cercanos al ganado se encontró una resistencia bacteriana del 31% de las cepas, siendo oxacilina, penicilina y rifampicina los antibióticos sensibles (Smith *et al.*, 2014).

El Murciélago hematófago (*Desmodus rotundus*) es un mamífero silvestre que se alimenta de la sangre de otros animales; y es una de las especies más abundantes y distribuidas por el territorio peruano, hallándose también en la costa de Lima (Quintana y Pacheco, 2007), Su presencia ha aumentado en sectores de crianza ganadera reportándose casos de mordeduras en animales domésticos y encontrando sus nidos cerca a estos criaderos (Gonzales, 2017). En un estudio realizado en murciélagos en Kenia se halló una completa resistencia bacteriana a cefalosporinas de tercera generación en vampiros hematófagos que vivían cerca de zonas urbanas (Iroha *et al.*,

2015); mientras que en otro estudio no se encontraron cepas productoras de BLEE en murciélagos que cohabitaban cerca de estos criaderos (Afiukwa *et al.*, 2016). Sin embargo, se debe considerar que la producción ganadera y el uso profiláctico de antibióticos puede significar un riesgo de infección hacia la fauna de vida libre que la rodea (García-Álvarez *et al.*, 2011; Iroha *et al.*, 2015). Por ende, esta especie representa un grupo de riesgo involucrado en la transferencia de resistencias bacterianas, donde las enterobacterias productoras de BLEE y las cepas MRSA son mayormente aisladas (FAO, 2005; García-Álvarez *et al.*, 2011; Wall *et al.*, 2016), y encontrados como reservorios naturales en el ganado, pudiendo afectar a animales no expuestos a antibioterapia (Iroha *et al.*, 2015; Wall *et al.*, 2016). Por lo tanto, el presente estudio tuvo como objetivo el aislamiento de cepas de *E. coli* y *Klebsiella* spp productoras de betalactamasas de espectro extendido y de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina en murciélagos hematófagos y en animales de crianza extensiva en la región de Lima, tomándose en cuenta la cercanía existente entre los refugios de murciélagos hematófagos y los centros de producción ganadera.

METODOLOGÍA

Lugar y tipo de estudio

El estudio se realizó en cinco provincias pertenecientes a la región de Lima; donde se tomaron muestras de murciélago y ganado en las localidades de Paramonga, Chancay, Huacho, Mala y Cardal. Las localidades en mención tenían registros de refugios naturales y artificiales de *Desmodus rotundus*, así como notificaciones de mordeduras de vampiros hacia el ganado (Streicker *et al.*, 2012; Gonzales, 2017).

El estudio epidemiológico fue de tipo transversal, descriptivo y analítico; y tuvo como fin identificar bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (MRSA). Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y en el laboratorio de Microbiología del Hospital de Arnaud de Villeneuve en Montpellier, Francia.

Población objetivo y criterios de inclusión

En el caso de los quirópteros hematófagos se tomaron como criterio de inclusión los refugios de vampiros cercanos a la población humana (Streicker y Allgeier, 2016; Gonzales, 2017). Además, los murciélagos fueron muestreados independientemente de su edad, sexo o estado reproductivo.

Para la población ganadera, se muestrearon animales como bovinos, porcinos y caprinos, independientemente, de su edad o sexo; pero cuyo centros de crianza se encontraran dentro de un radio de 10 km a los refugios de los murciélagos además de tener antecedentes de mordeduras (Streicker y Allgeier, 2016; Gonzales, 2017).

Tamaño de la muestra

Este estudio presenta una serie de casos, donde no se puede contemplar el cálculo poblacional de murciélagos. Sin embargo, en estudios realizados en colonias de quirópteros hematófagos en la costa de Lima, se tienen tamaños de muestra de 81 individuos por estudio (Virhuez, 2016) o alrededor de 23 vampiros capturados por refugio en las zonas de Huacho, Chancay y Mala (Streicker y Allgeier, 2016). Por otro lado, utilizando el criterio de detección de cepas productoras de BLEE en el antibiograma, donde se tiene una prevalencia límite del 5% en dichos animales (Virhuez, 2016) y con un nivel de confianza del 95%, el tamaño mínimo de muestra a considerar en el estudio sería de 58 individuos.

Con respecto al ganado; se tomó como base los datos de Gonzales, (2017), quien encuestó a ganaderos que se encontraban a 10 kilómetros de los mismos refugios de quirópteros del presente trabajo. En dicho estudio se estimó cerca de 200 animales de traspatio (incluyendo bovinos, caprinos, porcinos y equinos) alrededor de estas colonias. Con este dato, más la proporción límite de 24% de cepas de BLEE detectadas en el antibiograma en ganado doméstico (Virhuez, 2016), con un nivel de confianza del 95% y con una precisión absoluta del 5%, se consideró un tamaño mínimo muestral de 91 animales para ganadería.

Recolección de muestras

El muestreo se realizó entre enero y mayo del 2017. Los animales fueron sujetados de manera física. Donde los murciélagos fueron manipulados por profesionales con amplia experiencia en la captura y manejo de murciélagos; mientras que en el ganado, un médico veterinario fue el encargado del manejo de los animales y la recolección de las muestras.

En el caso de los murciélagos hematófagos, se utilizaron redes de neblina (2.5 x 3 m) colocadas entre las 18:00 y las 06:00 en las cuevas. Estas redes fueron monitoreadas cada 30 minutos, con

el fin de tomar las muestras de los animales atrapados en las redes (Virhuez, 2016). Además, se utilizaron guantes de protección para contener a los animales y sacar las muestras nasales y fecales, evitando ocasionar estrés innecesario a los murciélagos.

El ganado bovino fue sujetado con una soga corrediza, los cerdos fueron sujetados con una naricera y los caprinos y ovinos fueron sujetados entre dos personas. La recolección de las muestras fecales se realizaron directamente del recto del animal y las muestras nasales de las narinas.

Procesamiento de las muestras

Materiales a utilizar

Se utilizó un hisopo estéril con medio de transporte Amies y dos agares cromogénicos: el Hicrome® ESBL agar base y Hicrome® MeReSa agar. El primero es para la detección de cepas productoras de ESBL y el segundo para la detección de cepas MRSA. Así mismo, se utilizó los suplementos selectivos Hicrome® ESBL, MeReSa y Cefoxitin para inhibir organismos contaminantes en el medio. Para la preparación de los medios Hicrome® ESBL y Hicrome® MeReSa agar base se siguieron los protocolos establecidos por los laboratorios fabricantes (HIMEDIA Laboratorios).

Procesamiento y aislamiento de BLEE

Las muestras de heces fueron incubadas, directamente, en 3 ml de caldo BHI durante 24 horas a 37 °C. Posteriormente, 15 µl de ese contenido fueron sembrados en placas con Hicrome® ESBL agar base e incubados por 24 horas a 37 °C. Las colonias fueron elegidas según su pigmentación, donde los cultivos de coloración rosada fueron sospechosas de *E. coli*, mientras que las azules verdosas fueron sospechosas de *Klebsiella* spp. Ambas cepas fueron resembradas utilizando el

mismo medio selectivo con el fin de obtener colonias más puras. Las colonias aisladas fueron conservadas agregándose 200 µl de glicerina para, finalmente, ser congeladas a -70 °C.

Procesamiento y aislamiento de MRSA:

Las muestras nasales fueron incubadas en 3 ml de caldo BHI durante 24 horas a 37 °C. Luego, 15 µl del contenido fue sembrado en placas con Hicrome® MeReSa agar base e incubadas por 48 horas a 37 °C. Las colonias fueron elegidas según su pigmentación, donde las cepas MRSA que tuvieran una coloración azulada fueron sometidas a las pruebas de catalasa (que deberá ser positiva), tinción Gram (tinción positiva con forma de racimos) y coagulasa positiva. Estas colonias fueron resembradas en el mismo medio selectivo, donde después de su aislamiento y purificación se le agregó 200 µl de glicerina para ser conservadas por congelación a -70 °C.

Identificación de las especies de enterobacterias y *Staphylococcus spp.*

La identificación a nivel de especie se hizo mediante la técnica de MALDI-TOF con el equipo Bruker® Daltonics (Bremen, Alemania). Este método está basado en espectrometría de masas, donde por medio de la ionización de proteínas o péptidos permite crear perfiles que son únicos en cada microorganismo.

Identificación fenotípica de cepas productoras de BLEE – antibiograma

Las cepas de *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* identificadas mediante la técnica de MALDI-TOF fueron sometidas a la prueba confirmatoria BLEE – Sinergia del doble disco. Para esto, las cepas fueron sembradas directamente en agar Mueller Hinton (CDH MICROGEN) y se colocó un disco de amoxicilina/ ácido clavulánico (AMC) en el centro de la placa Petri, junto con discos de ceftazidima/ácido clavulánico (CAZ) cefotaxima (CTX) y cefepime (FEP) a 25 mm de espacio alrededor del primero (Lezameta *et al.*, 2010; Benavides *et al.*, 2017). La presencia de BLEE se

manifestó por la observación del efecto de huevo o cola de pez, el cual es el efecto sinérgico de los discos con la presencia de amoxicilina/ ácido clavulánico (AMC) (Lezameta *et al.*, 2010), este proceso siguió las normativas del Comité de la Sociedad Francesa de Microbiología (CSFM).

Identificación de los genes de resistencia

Las cepas de enterobacterias productoras de BLEE fueron sometidas a análisis moleculares por medio de la técnica de PCR multiplex (Benavides *et al.*, 2017); donde se buscaron los genes de resistencia β -lactámicos (*bla*): *bla*CTX-M-gr1, *bla*CTX-M-gr9, *bla*OXA-like y *bla*TEM CTX-M 1 (Dallene *et al.*, 2010; Benavides *et al.*, 2017).. Los genes de amplificación y secuencia se dieron según el protocolo de Dallene *et al.* (2010).

Plan de análisis de datos

Los datos obtenidos fueron ordenados en una hoja Excel y analizados con STATA 15. Se realizó estadística descriptiva y se prepararon tablas de frecuencia.

Consideraciones éticas

Los propietarios del ganado autorizaron la toma de muestras mediante la firma de un consentimiento de participación en el estudio. Donde, se les informó los procedimientos a realizar con los animales, así como el objetivo de la investigación.

El estudio forma parte del proyecto “El rol del murciélago hematófago en la transmisión de bacterias resistentes a los antibióticos utilizados en ganado y humanos”, el cual tiene autorización del SERFOR para hacer el estudio en esta especie. Así mismo, se encuentra aprobado por el Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales (CIEA) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

RESULTADOS

Se muestrearon 218 murciélagos *Desmodus rotundus* y 134 animales de traspatio (Cuadro 1). El lugar con mayor número de muestras, tanto en murciélagos (n=72) como en ganado (n=36), fue en Paramonga (Cuadro 1). De forma similar, la especie bovina fue el animal con mayor número de muestras obtenidas (Cuadro 2).

De las 352 muestras estudiadas, 130 (36.9%) aislados crecieron en el agar Hicrome® ESBL y nueve (2.55%) en el agar Hicrome® MeReSa (Cuadro 2). En la tipificación de *Staphylococcus* spp no se identificaron cepas perteneciente a dicho género; sin embargo, se identificaron cepas de *Enterococcus mundtii* (3/9), *Arthrobacter creatinolyticus* (2/9) y *Enterococcus faecalis* (1/9) (Cuadro 3). Para la identificación de las especies de enterobacterias, el 87.7% (114/130) eran *E. coli* y el 3% (4/130) eran de *Klebsiella pneumoniae*. Además se identificaron otras especies 3% (4/130), como *Enterobacter cloacae* y *Enterococcus gallinarum* (Cuadro 4).

El 5.5% (n=12) de las muestras de murciélagos y el 79% (n=106) de ganado dieron positivas como *E. Coli* y *K. Pneumoniae* productoras de BLEE; por medio del método de sinergia del doble disco. Entre el ganado doméstico, 48 provenían de ganado vacuno, 51 de ganado porcino y 7 de ganado caprinos (Cuadro 5).

También, se expresaron los genes betalactámicos *bla*CTX-M-gr1, *bla*CTX-M-gr9, *bla*OXA-like y *bla*TEM, tanto en ganado como en murciélago, donde los genes con mayor prevalencia fueron *bla*CTX-M gr1 y *bla*TEM (Figura 1). Según el análisis molecular, el 60% de las colonias expresaron más de un gen bla. Siendo [*bla*CTX Mgr1 y *bla*TEM] (n=48) el juego de genes más

frecuente; entre ellos, 8 provenían de murciélagos hematófagos, 20 de ganado bovino, 17 de ganado porcino y 3 de ganado caprinos (Cuadro 6).

De las 118 cepas analizadas, 47 tuvieron la expresión de un solo gen, donde el gen *bla* CTX-Mgr1 (n=40) se expresó en 2 individuos de *Desmodus rotundus*, 17 individuos de ganado bovino, 18 de ganado porcino y 3 en caprinos; Seguido del gen *bla* TEM (n=6) expresándose en dos individuos de murciélago hematófago y en cuatro individuos de ganadería (Cuadro 6).

Cuadro 1: Número de animales muestreados por localidad

Localidad	Murciélago	Ganado	
		Total	Por especie
Paramonga	72	36	30 porcinos, 6 bovinos
Mala	43	18	18 bovinos
Pachacamac	37	26	16 bovinos, 5 caprinos, 5 porcinos
Huacho	36	28	12 bovinos, 13 porcinos, 3 caprinos
Chancay	30	26	14 bovinos, 12 porcinos
Total⁽¹⁾	218	134	

(1) número total de animales muestreados tanto para murciélagos como para ganado

Cuadro 2: Muestras de animales con crecimiento positivo en el medio Hicrome® ESBL para detección de cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y de muestras con crecimiento positivo en el medio Hicrome® MeReSa, para la detección de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRESA)

<i>Animal</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>+BLEE agar⁽¹⁾</i>	<i>+MERESA agar⁽²⁾</i>
<i>Murciélago</i>	218	16	5
<i>Ganado</i>	134	114	4
- <i>Bovino</i>	66	50	1
- <i>Porcino</i>	60	56	3
- <i>Caprino</i>	8	8	-
<i>Total</i>	352	130 (36.9%)	9 (2.55%)

(1) número de muestras con crecimiento positivo en el agar Hicrome® ESBL

(2) número de muestras con crecimiento positivo en el agar Hicrome® MeReSa

Cuadro 3: Identificación de las cepas sospechosas de *Staphylococcus spp* por la técnica de MALDI-TOF

<i>Especie</i>	<i>+MERESA agar</i>	<i>MALDI-TOF</i>
<i>MURCIELAGO</i>	5	2 <i>Enterococcus mundtii</i> , 2 <i>Arthrobacter creatinolyticus</i> , 1 no identificado
<i>GANADO</i>	4	1 <i>Enterococcus faecalis</i> , 1 <i>Enterococcus mundtii</i> , 2 no identificados
<i>Total</i>	9	

Cuadro 4: Identificación de las especies de enterobacterias (*Escherichia. coli* y *Klebsiella pneumoniae*) por la técnica de MALDI-TOF

CEPA	Ganado	Murciélago	Distribución Proporcional	
			n	%
<i>E. coli</i>	102	12	114	87.7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	-	4	3
No identificados ⁽¹⁾	7	1	8	6.2
Otros ⁽²⁾	1	3	4	3
Total	114	16	130	

(1) Cepas que no fueron identificadas por especie con la técnica de MALDI-TOF

(2) Otras especies identificadas con esta técnica: 3 *Enterobacter cloacae* y 1 *Enterococcus gallinarum*

Cuadro 5: Detección fenotípica de cepas de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) por el método de Sinergia del doble disco en antibiograma y su prevalencia sobre el total de muestras sacadas tanto en ganado como en murciélago.

Especie Animal	Cepas positivas a BLEE		Prevalencia de Cepas BLEE	
	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	Total ⁽¹⁾	%
Murciélago (n=218)⁽²⁾	12	-	12	5.5
Ganado (n=134)⁽³⁾	102	4	106	79
- Bovino (n=66)	47	1	48	36
- Porcino (n=60)	48	3	51	38
- Caprino (n=8)	7	-	7	5
Total (n=352)	114	4	118	

(1) Número total de cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido, por animal

(2) Número total de murciélagos muestreados para el estudio

(3) Número total de animales domésticos (Bovino, Porcino y Caprino) muestreados para el estudio

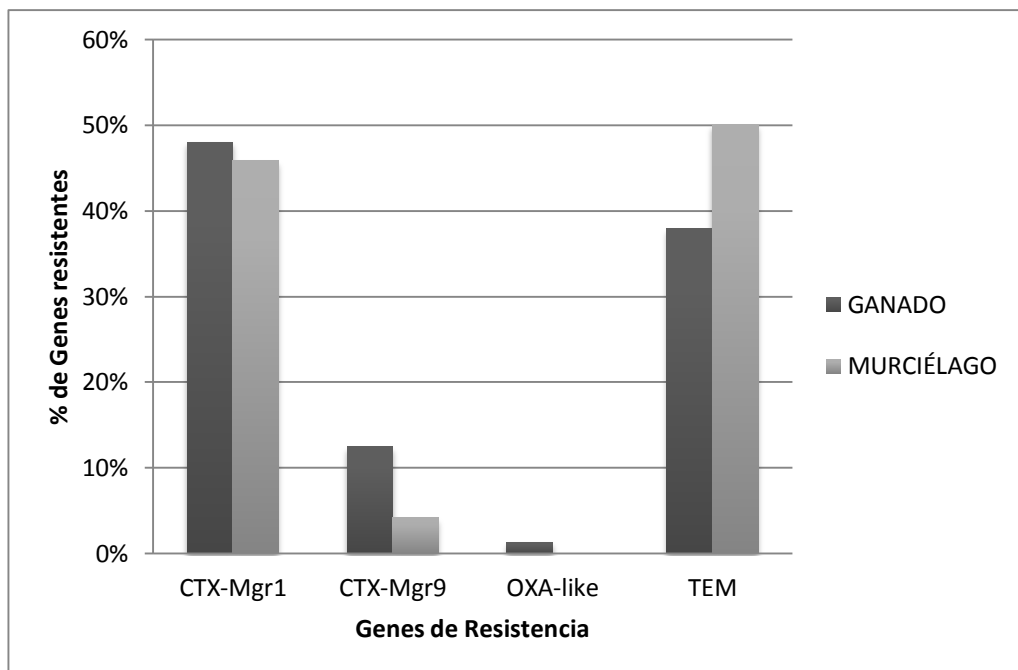


Figura 1 .Proporción de genes (CTX-Mgr1, CTX-Mgr9, OXA-like y TEM) hallados en ganado y en murciélagos hematófagos

Cuadro 6: Proporción de genes de resistencia hallados tanto en murciélagos como en ganado

<i>Genes de resistencia β-lactámicos (bla)</i>	<i>Murciélago</i>	Ganado			Total (Nro. (%))
		Bovino	Porcino	Caprino	
Más de un gen expresado					71 (60%)
[CTX-Mgr1 & TEM]	8	20	17	3	48
[CTX-Mgr9 & TEM]	-	5	10	1	16
[CTXM-gr1 & OXA-like]	-	-	2	-	2
[TEM & OXA-like]	-	-	1	-	1
[CTX-Mgr1 & CTX-Mgr9]	-	4	-	-	4
Solo un gen expresado					47 (40%)
• CTX-Mgr1	2	17	18	3	40
• TEM	2	1	3	-	6
• CTX-Mgr9	-	1	-	-	1
TOTAL	12	48	51	7	118 (100%)

DISCUSIÓN

Según Wall *et al.* (2016) el uso indiscriminado de antibióticos, ya sea en la ganadería o en la salud de las personas, podría tener un impacto en la expresión, selección y transferencia de resistencia bacteriana en la población. Donde la producción ganadera y el uso profiláctico de antibióticos en su crianza, pueden ser una causante de transmisión de BLEE a la fauna silvestre que lo rodea (García-Álvarez *et al.*, 2012; Guenther, *et al.*, 2012; Iroha *et al.*, 2015). Esto se puede observar en un estudio donde la prevalencia de multiresistencia bacteriana fue del 13.6% proveniente de cepas de *E. coli* aisladas en ratones urbanos, y donde el 6% de estas presentaron producción de BLEE (Guenther *et al.*, 2012); Mientras; que en otro estudio, realizados en jabalís provenientes de una zona suburbana en Republica Checa, solo el 2% (5/ 293) presentaron cepas de *E.coli* productoras de BLEE por el método de sinergia del doble disco (Literak *et al.*, 2010).

Considerando la fisiología de ciertas especies de quirópteros, su distribución y cercanía que pueden tener con respecto a zonas urbanas o agrícolas (Quintana y Pacheco, 2007; Streicker *et al.*, 2012; Gonzales, 2017). Se observó que en un estudio hecho con murciélagos localizados en la costa de Lima-Perú y cercanos a centros ganaderos, la prevalencia de cepas de enterobacterias productoras de BLEE era del 5% (Virhuez, 2016); mientras que en otro trabajo relacionado directamente con murciélagos (*Tadarida teniotis*) en Portugal, se encontró que el 9.6% de muestras fecales eran de *E. coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido (Garces *et al.*, 2017). Estas prevalencias concuerdan con nuestro trabajo, donde el 5.5% de *Desmodus rotundus*, eran portadores de cepas de *E coli* productoras de BLEE (Cuadro 5). Sin embargo, en otro estudio, no se aislaron cepas productoras de BLEE en murciélagos que cohabitaban cerca de criaderos ganaderos en Nigeria (Afiukwa *et al.*, 2016).

En el presente trabajo, de las 134 muestras de ganado incubadas por el agar Hichrome ESBL, 106 fueron *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE (Cuadro 5); esta prevalencia del 79% de cepas BLEE en la crianza ganadera, se puede considerar alta, en comparación con otro estudio hecho en el Reino Unido, donde se obtuvo un crecimiento de cepas BLEE de casi el 60% del total de las granjas estudiadas; por medio de cultivos de agar MacConkey con cefotaxime (Friese *et al.*, 2013); mientras que en otro trabajo, realizado en la costa de Lima (Chancay, Huacho, Pachacamac y Paramonga), se observa una prevalencia del 24% de cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido detectadas en animales domésticos que conviven cerca a refugios de murciélagos hematófagos (Virhuez, 2016).

Con respecto a cepas de MRSA, en un estudio realizado en Alemania se encontró una prevalencia del 73.3% de cepas meticilino resistentes en ganado de engorde porcino, donde el método utilizado fue la incubación directa en el agar cromogénico CHRO-MagarMRSATM (Friese *et al.*, 2013); mientras que en otro estudio se detectó el gen *mecA* en ganado bovino en el Reino Unido (García-Alvares *et al.*, 2011). Sin embargo en el presente trabajo no se obtuvo ninguna cepa sospechosa de MRSA tanto para murciélago como para ganado, esto podría deberse a que se utilizó un medio de transporte para la recolección directa de las muestras fecales o que se tendría que cambiar el protocolo de aislamiento y detección de cepas de MERESA.

Con los datos obtenidos en el presente trabajo más los otros estudios, anteriormente mencionados, se debe considerar que la cercanía de los hábitats silvestres; con la ganadería o zona urbana; podría implicar un riesgo de transmisión de resistencia bacteriana. Donde esta transferencia puede estar dada por la adquisición de Genes Móviles de Enterobacterias (MGEs) productores de Betalactamasas de espectro extendido (Delicado, 2015; Afiukwa *et al.*, 2016); los cuales por medio de plásmidos, tranposones o integrones pueden saltar información genética desde un cromosoma a un plásmido dentro de una célula bacteriana o movilizarse entre varias células,

dándoles así la capacidad de resistir a diferentes fármacos (Smet *et al.*, 2010; Wall *et al.* 2016). Por ende en el caso de cepas de BLEE se han identificado los genes *bla*TEM, *bla*SHIV y *bla*CTX-M, *bla* SHV (Smet *et al.*, 2010; Delicado, 2015) donde en un estudio hecho en jabalís provenientes de zonas suburbanas de Republica Checa, se identificaron los genes *bla*CTX-M-1 y *bla*TEM provenientes de cepas de *E. coli* (Literak *et al.*, 2010); mientras que en otro estudio hecho en Perú, el análisis molecular reveló la presencia del gen *bla* CTX Mgr15 tanto en murciélagos como en ganado de traspatio (Benavides *et al.*, 2017). Así mismo, estos datos se pueden relacionar al trabajo actual, donde tanto para ganado como para murciélagos, se identificaron los genes *bla* CTX Mgr1, *bla*TEM, *bla*OXA-like y *bla* CTX M-gr9. Siendo el gen *bla* CTX M gr1, seguido del gen *bla*TEM los que tuvieron mayor prevalencia entre la población de murciélagos (Cuadro 6). Esta alta incidencia en esos genes también se observó en otro estudio realizado en quirópteros en Portugal, donde el 57.9% de los animales silvestres estudiados tuvieron una expresión del gen *bla* CTX - M gr1 y el 21.1% del gen *bla*TEM (Garces *et al.*, 2017)

CONCLUSIONES

Se aislaron 16 de 218 muestras fecales de *Desmodus rotundus* y 114 de 134 de ganado doméstico; como sospechosas a BLEE por medio del agar Hicrome® ESBL agar base, Además, 9 de 352 muestras nasales crecieron en el agar Hicrome® MeReSa; tanto para murciélagos (n=5) como para ganado (n=4).

Por medio de la técnica de MALDITOF se identificó que el 87.7% (114/130) de las cepas aisladas de murciélago y ganado eran de *E. coli* y 3% (4/130) de *Klebsiella pneumoniae*. No se identificaron cepas de *Staphylococcus* spp.

El 5.5% (12/218) de las muestras de murciélago fueron confirmadas como *E. coli* productora de BLEE.

El 79% (106/134) de las muestras de ganado fueron confirmadas como *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE y la especie doméstica con mayor número de cepas BLEE fue la del ganado Porcino (n=51), seguida del ganado Bovino (n=48).

La técnica de PCR multiplex confirmó la presencia de genes de resistencia *bla*CTXM gr1, *bla*CTXMgr9, *bla*OXA-like y *bla*TEM, siendo el primero el más frecuente para ambos grupos de animales estudiados.

El 40% expresó solo un gen *bla*, donde el gen *bla* CTX-Mgr1 (n=40) fue el más común, expresándose en 2 individuos de *Desmodus rotundus*, 17 individuos de ganado bovino, 18 de ganado porcino y 3 en caprino

BIBLIOGRAFIA

- Afiukwa, N. Iroha, R. Afiukwa, A. (2016). First Report of blaCTX2M215 Extended Spectrum Beta2 Lactamase (ESBL) Producing *E. Coli* Isolated from Cloacal Swabs of Birds in South Eastern Nigeria. Department of Applied Microbiology, Faculty of Science, Ebonyi State University. Ebonyi – Nigeria. BioMedical and Clinical Research. Vol. 2. P. 35-39.
- Benavides, J. Shiva, C. Tello, C. Appelgren, A. Vendrell, J. Solassol, J. Godreuil, S. Streicker, D. (2017). Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in common vampire bats *Desmodus rotundus* and livestock in Peru. *Zoonoses Public Health*;1–5.
- Casellas, M. (2011). Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. *Rev Panam Salud Publica*, 2011;30(6):519–28.
- Cota, E. Hurtado, L. Pérez, E. Alcántara, L. (2014). Resistencia a antibióticos de cepas bacterianas aisladas de animales destinados al consumo humano. *Revista Iberoamericana de Ciencias*. Universidad Autónoma de Baja California; Tijuana, México. Vol. 1 No.1 . P. 75-85.
- Dallenne, C. Da Costa, A. Decre, D. Favier, C. Arlet, G. (2010). Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important b-lactamases in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. doi:10.1093/jac/dkp498.
- Delicado, V. (2015). Gorrión común (*Passer domesticus*) y genes de resistencia a antimicrobianos. Estudio comparado entre entorno ganadero y urbano. Madrid. Universidad Complutense de Madrid.. Grupo de Epidemiología y Sanidad Ambiental. CISA-INIA. P. 2-37.
- FAO/OMS. La necesidad de fortalecer los programas nacionales de monitoreo del uso de los antimicrobianos en medicina veterinaria en la región. Conferencia Regional sobre inocuidad de los alimentos para las Américas y el Caribe. San José, Costa Rica, 6-9 de diciembre de 2005

- Figuroa, M. (2004). *Escherichia coli* como bacteria indicadora en el monitoreo de la resistencia a antimicrobianos de uso en ganado bovino. Tesis de Medico Veterinario. Santiago. Universidad de Chile. P. 56.
- Friese A, Schulz J, Laube H, von Salviati C, Hartung J, Roesler U. (2013). Faecal occurrence and emissions of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (laMRSA) and ESbl/AmpC-producing *E. coli* from animal farms in Germany. Berl Munch Tierarztl Wochenschr;126(3–4):175–80.
- Garces A, Correia S, Amorim F, Pereira JE, Igrejas G, Poeta P, (2017), First report on extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* from European free-tailed bats (*Tadarida teniotis*) in Portugal: A One-Health approach of a hidden contamination problem, Journal of Hazardous Materials <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.12.053>.
- García A, García E, Hernández A, Ruiz J, Yague G, Herrero J, Gómez J. (2011). Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. Rev Esp Quimioter; 24(2): 57-66.
- García-Álvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb C, Brown D, Curran M, *et al.* (2011). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. Lancet Infect Dis; 11: 595–603.
- García-Álvarez, L. Dawson, S. Cookson, B. Hawkey, P. (2012). Working across the veterinary and human health sectors. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 67 Suppl 1: p. 37–49.
- Gonzales, M. (2017). Frecuencia y distribución geográfica de las mordeduras por murciélagos hematófagos en animales de producción de crianza a traspatio en la región Lima, Peru. Tesis de Medico Veterinario Zootecnista. Lima. Universidad Peruana Cayetano Heredia. P. 38

- Guenther S, Bethe A, Fruth A, Semmler T, Ulrich RG, et al. (2012) Frequent Combination of Antimicrobial Multiresistance and Extraintestinal Pathogenicity in *Escherichia coli* Isolates from Urban Rats (*Rattus norvegicus*) in Berlin, Germany. *PLoS ONE* 7(11): e50331.
- Iroha J, Afiukwa F, Oji A, Ejikeugwu P, Nwakeze E. (2015). occurrence of extended spectrum beta lactamase producing *escherichia coli* from human clinical and wild birds (pigeons, bats, parrots and ducks) samples from ebonyi state, nigeria. Department of Applied Microbiology, Faculty of Biological Sciences 4, 20-29.
- [OMS] Organización Mundial de la Salud. (2014). Resistance to antibacterial drugs in selected bacteria of international concern. Francia: OMS. *ANTIMICROBIAL RESISTANCE, Global Report on surveillance*. NLM classification: QV 250. P. 10-20.
- [OMS] Organización Mundial de la Salud. [internet] Resistencia a los antimicrobianos. [actualizado sept 2016; citado 13 de Mayo 2017] disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
- Quintana, H. Pacheco, V. (2007). Identificación de los murciélagos vampiros del Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 2007; 24(1): 81-88
- Smet, A. Martel, A. Persoons, D. Dewulf, J. Heyndrickx, M. Herman, L. Haesebrouck, F. Butaye, P. (2010). Broad-spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* of animal origin: molecular aspects, mobility and impact on public health. *FEMS Microbiol Rev* 34. 295–316.
- Smith S, Wang J, Faning S, McMahon B. (2014). Antimicrobial resistant bacteria in wild mammals and birds: a coincidence or cause for concern?. *Irish Veterinary Journal*, 67:8.
- Literak, I. Dolejska, M. Radimersky, T. Klimes, J. Friedman, M. Aarestrup, F. Hasman, H. (2010). Antimicrobial-resistant faecal *Escherichia coli* in wild mammals in central Europe: multiresistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in wild boars *Journal of Applied Microbiology* 108 1702–1711

- Lezameta, L., Gonzáles, E., &Tamariz, J. (2010). Comparación de cuatro métodos fenotípicos para la detección de beta-lactamasas de espectro extendido. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.*, 27(3), pp. 345-51.
- Streicker D, Recuenco S, Valderrama W, Benavides J, Vargas I, Pacheco V, et al. (2012). Ecological and anthropogenic drivers of rabies exposure in vampire bats: implications for transmission and control. *P R Soc B.* 279 3384-3392.
- Streicker D, Allgeier J. (2016). Foraging choices of vampire bats in diverse landscapes: potential implications for land-use change and disease transmission. *J Appl Ecol.* 53: 1280–1288.
- Virhuez, M. (2016). Identificación de enterobacterias resistentes a antibióticos en el vampiro común (*Desmodus rotundus*) y en animales de traspatio en el departamento de Lima, Perú. Tesis para Medico Veterinario Zootecnista. Lima. Universidad Peruana Cayetano Heredia. P. 37
- Wall B, Mateurs A, Marshall L, Pfeiffer D. (2016). Drivers Dynamics and Epidemiology of Antimicrobial Resistance in Animal Production. Roma: [FAO]. P. 9- 33.
- Yang H, Chen S, While D, Zhao S, Mc Dermantt P, Walker R, Merig J. (2004). Characterization of multiple- antimicrobial- resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chicken and swine in China. *Journal of Clinical Microbiology.* 2004; 42(8):3483-3489.