

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



“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 optar por el Título Profesional de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Milagros Virhuez Mendoza

Bachiller en Medicina Veterinaria y Zootecnia

Lima – Perú

2017

*A mi familia, en especial a mis padres y hermana que siempre me
motivaron a seguir esta carrera.*

AGRADECIMIENTOS

A la universidad de Glasgow por el financiamiento para el desarrollo y muestreo de mi proyecto de tesis así como al Dr. Daniel Streicker por permitirme participar en el mismo.

Al Dr. Carlos Shiva Ramayoni por ser el director de mi tesis y al Dr. Julio Benavides por ser mi asesor externo durante la ejecución y redacción del presente trabajo.

A los biólogos Carlos Tello y-Jaime Pacheco por su participación fundamental en la captura de murciélagos y la toma de muestras.

Al Dr. Sylvain Godreuil por su apoyo con la ejecución de la prueba MALDI-TOF y los discos de sensibilidad en el Hospital Arnaud de Villeneuve de Montpellier.

A todos aquellos que me ayudaron durante el procesamiento de muestras en el laboratorio: Catherine Salas Riega, Victor Valdivieso, Juan Carrión Carhuatocto y Lucero Huamancha. Así como a todos mis compañeros que me entusiasmaron a finalizar la tesis.

ABSTRACT

Bacteria resistance has become a major challenge for public health due to its propagation into hospital environments, untreated source waters, cattle and wildlife, in which Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) and Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CARBA) play the main role. This project had the purpose of identifying the presence of ESBL and CARBA producing Enterobacteriaceae in the common bat (*Desmodus rotundus*) and in the attacked backyard animals near bats' population in 4 districts of Lima, Peru. 81 bats' fecal samples were collected along with 32 samples belonging backyard animals, which were cultivated in a selective growing media for ESBL and CARBA producing Enterobacteriaceae. In addition, the bacterial colonies were isolated in gelose and were identified by MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight) and a confirmatory antibiogram in the hospital Arnaud Villanueve of Montpellier, France. 13 individuals were identified as carries of Extended spectrum betalactamase producing *Escherichia coli* (ESBL) in populations of bats, cows and pigs, which respective frequencies were 4, 94 % (4/81), 20% (4/20) y 62, 5% (5/8). Multiples factors could contribute in the spreading of ESBL producing Enterobacteriaceae in wildlife populations and domestic backyard cattle, the exposition of contaminated soil and water with human ESBL enterobacteria along with the inadequate antibiotic treatment of cattle are considered as the most important mechanisms. Nevertheless, the strict diet of the hematophagous bat and its gregarious behavior are other factors to take in count in the transmission cycle of resistant bacteria. The mechanisms of bacteria resistant's transmission are complexes and need further studies in order to elucidate its origin and the dynamic of ESBL producing bacteria outside medical centers.

Key words: Resistant bacteria, *Desmodus rotundus*, ESBL, cattle

RESUMEN

La resistencia bacteriana se ha convertido en el mayor desafío para la salud pública debido a su diseminación en ambientes intrahospitalarios, fuentes de agua, ganadería y fauna silvestre, siendo las enterobacterias productoras de Betalactamasas de espectro extendido (ESBL) y productoras de Carbapenemasas (CARBA) unas de las más importantes. Este proyecto tuvo como objetivo de determinar la presencia de enterobacterias ESBL y CARBA en el vampiro común (*Desmodus rotundus*) y en hatos de crianza de traspatio adyacentes atacados por quirópteros en 4 distritos ganaderos de Lima, Perú. Se recolectaron 81 muestras fecales directas de *Desmodus rotundus* y 32 de animales de crianza de traspatio para ser cultivadas directamente en medios selectivos a enterobacterias ESBL y CARBA, así mismo las colonias se aislaron en gelosas y fueron identificadas por medio de la espectrometría de masas (MALDI-TOF) y un antibiograma confirmatorio en el Hospital Arnaud de Villeneuve de Montpellier, Francia. Se identificaron 13 individuos poseedores de *Escherichia.coli* productora de betalactamasas de espectros extendido (ESBL) en poblaciones de *Desmodus rotundus*, ganado bovino y porcino, siendo sus frecuencias de 4,94 % (4/81), 20% (4/20) y 62,5% (5/8) respectivamente. Existen múltiples factores que podrían contribuir a la dispersión de enterobacterias ESBL en poblaciones silvestres de quirópteros y en animales de traspatio, entre ellas se encuentra la exposición a fuentes de agua y suelos con presencia de enterobacterias ESBL de origen humano, así como el inadecuado tratamiento antibiótico en animales de traspatio. Además, la dieta estricta del murciélago hematófago así como su comportamiento gregario son otros factores a tomar en cuenta en el ciclo de transferencia de bacterias resistentes. Los mecanismos que transmisión de resistencia bacteriana suelen ser complejos y requieren mayor investigación para esclarecer su origen, así como la dinámica y comportamiento de enterobacterias ESBL fuera de los ambientes hospitalarios.

Palabras claves: resistencia bacteriana, ESBL, *Desmodus rotundus*, traspatio.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, el uso indiscriminado de antibióticos en medicina humana ha generado un importante aumento de la resistencia bacteriana a nivel mundial, siendo América Latina una de las regiones con mayor incidencia de brotes nosocomiales causados por bacterias resistentes a antibióticos (Cabrera *et al.*, 2007). Así mismo, el Perú es uno de los países con un alto riesgo para el desarrollo resistencia antimicrobiana en áreas periurbanas marginales, debido a la falta de regulación de antibióticos y el limitado acceso a fuentes de agua potable (Pehrsson *et al.*, 2016). Por ende, la rápida diseminación de estos microorganismos resistentes a antibióticos es considerado como una de las principales problemáticas para la salud pública en el País.

A pesar de que microorganismos gram positivos como gram negativos han evidenciado el desarrollo de resistencia bacteriana, diversos estudios han sugerido que las infecciones por bacterias gram negativas resistentes a antibióticos generan una mayor mortalidad así como un mayor tiempo de convalecencia en pacientes pertenecientes a la unidad de cuidados intensivos (Shorr AF, 2009; Slama, 2008). Diversos estudios de vigilancia antimicrobiana con respecto a bacterias gram negativas, designaron a Latinoamérica como el continente con mayor prevalencia de cepas de *E. coli* y *Klebsiella spp* resistentes a antibióticos, además de observar un aumento preocupante de cepas resistentes de *Acinetobacter spp* y *P. aeruginosa* en los últimos años (Moet *et al.* 2007; Gales *et al.*, 2012; Berezin *et al.*, 2014).

Se han descrito diversos mecanismos de resistencia hacia los antibióticos transmitidos por plásmidos o trasposones, entre ellos se encuentran la inactivación enzimática, modificaciones en el sitio blanco y alteraciones de la permeabilidad mediante las porinas, así como por las bombas de eflujo. No obstante, se considera que el principal mecanismo de resistencia en bacterias gram negativas es el desarrollo de betalactamasas de espectro extendido (Maiden, 1998; Tenober, 2006; Al-Bayssari, 2015). La importancia de este mecanismo se evidenció en la década de los años 80 con los primeros reportes de cepas de enterobacterias productoras betalactamasas de espectro extendido (ESBL), siendo *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* los patógenos mayormente aislados (Bradford, 2001).

Las enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (ESBL) muestran resistencia a penicilinas, aztreonam y cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación; generando limitaciones en los tratamientos antibacterianos, conllevando a la utilización de medicamentos de última generación como los carbapenems (Johan Tham, 2012). No obstante, en la actualidad se han identificado enterobacterias productoras de carbapenemasas (CARBA), que además de ser resistentes a los carbapenems, evaden los efectos de betalactámicos, y comúnmente de las fluorquinolonas y aminoglucósidos (Morrill *et al.*, 2015). Entre las enterobacterias que han demostrado ser resistentes a los carbapenems tenemos a *E.coli* y a *K.pneumoniae*, siendo la última reportada en Perú en un paciente con lupus eritematoso sistémico (Velásquez *et al.*, 2013).

Así mismo, los antibióticos son comúnmente usados en producción ganadera con diversos propósitos que van desde fines profilácticos a tratamientos terapéuticos, siendo el uso de antibióticos como promotores de crecimiento un continuo debate en la industria ganadera (Mathew *et al.* 2007). Estudios recientes describen la prevalencia de enterobacterias productoras de ESBL en la industria avícola, lechera y porcina, principalmente de bacterias zoonóticas como *E.coli* y *Salmonella spp.* (Mesa et al., 2006; Geser *et al.*, 2012; Ziech *et al.*, 2016). Estos aislamientos son de importancia epidemiológica y deberían ser considerados como uno de los mayores retos para la inocuidad alimentaria

Latinoamérica no ha estado excluida del uso de antibióticos en la ganadería de crianza intensiva o extensiva. En Chile se ha reportado la presencia bacterias resistentes a antibióticos aisladas de vacas lecheras con mastitis, demostrando así el desarrollo de resistencia bacteriana en la explotación intensiva (San Martín *et al.*, 2002). En el ganado bovino del Perú se ha evidenciado el uso indiscriminado y reiterado de oxitetraciclinas, penicilinas, enrofloxacinas, gentamicina y estreptomina; las cuales poseen características que podrían favorecer la presentación de resistencia por microorganismos bacterianos; (Solimano *et al.*, 2011; Redding, *et al.*, 2013; Redding *et al.*, 2014). Así mismo, la identificación de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina en centros porcicultores en Lima revela que diversos factores pueden estar generando el desarrollo de bacterias resistentes a antibióticos en áreas productivas intensivas como extensivas en el Perú (Arriola *et al.*, 2011).

La prevalencia de bacterias resistentes no solo se restringe a áreas de producción animal expuesta continuamente a antibióticos. Diversos estudios documentan la presencia de bacterias productoras de betalactamasas en fuentes de agua de áreas urbanas como en cuerpos de agua alejados de la población (Ash *et al.*, 2002; Tissera y Lee, 2013). La presencia de bacterias con genes de resistencia antibiótica a flujos de agua y suelos de áreas naturales representa un gran riesgo para las poblaciones de fauna silvestre ya que implica la introducción de genes de resistencia en a poblaciones nunca antes expuestas a antibioterapia. Así mismo, el contacto directo entre seres humanos y poblaciones de animales silvestres podría generar la introducción de bacterias resistentes como teoriza el hallazgo de *E.coli* y *Salmonella spp.* resistentes solo en reptiles de zonas turísticas de las islas Galápagos (Wheeler *et al.* 2012); sin embargo, la cercanía de fauna silvestre a centros poblados no necesariamente implica una transmisión de cepas resistentes a antibióticos (Benavides *et al.* 2012).

Los quirópteros son un grupo taxonómico que representa un rol epidemiológico importante en la naturaleza ya que se ha demostrado su susceptibilidad a una multitud de diferentes microorganismos incluyendo virus, bacterias, hongos y parásitos (Whitaker *et al.*, 2009; Wibbelt *et al.*, 2009). Entre las familias de virus comúnmente aisladas en quirópteros están *Lyssavirus*, *Coronavirus*, *Henipavirus* y *Filovirus*, priorizándose esfuerzos en el virus rábico y del ébola, los cuales son considerados de importancia epidemiológica debido a su alta letalidad (Kuzmin, 2011). Sin embargo, se tiene escaso conocimiento sobre el ciclo epidemiológico de bacterias como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Bartonella*, *Borrelia*, *Leptospira* y *Campylobacter spp*; las cuales han sido aisladas en el tracto gastrointestinal de diversas familias de murciélagos y dentro de las cuales *Salmonella Enteritidis* y *Salmonella Typhimurium* sobresalen por pertenecer al reducido grupo de serotipos mayormente asociados a patologías en humanos y animales (Sanchez *et al.*, 2002; Foley y Lynne, 2008; Abiodun *et al.*, 2009; Hoelzer *et al.*, 2011; Mühlendorfer, 2013). Los aislamientos de bacterias potencialmente zoonóticas en quirópteros demuestra la necesidad de obtener más información sobre estas poblaciones para entender el ciclo de distribución bacteriana en fauna silvestre, así como su patogenicidad y el riesgo que implica para los centros poblados que cohabitan en el área.

En el Perú, el “vampiro común” (*Desmodus rotundus*) es la especie hematófaga de mayor abundancia y distribución, su refugio suele encontrarse compartido con otras especies de murciélagos debido a su comportamiento gregario y su principal fuente de alimento varía según el área geográfica, se ha reportado que suelen preferir la sangre de animales domésticos por ser más accesible en comparación con la de grandes mamíferos nativos y, eventualmente se reportan ataques a humanos (Voigt y Kelm., 2006; Quintana *et al.*, 2007). Un estudio reciente en Perú revela que los brotes de rabia en ganado bovino de crianza extensiva se han duplicado en los últimos años debido al alto contacto que tiene el ganado con murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*) (Benavides *et al.*, 2016); este escenario se ve reflejado en otros países de Latinoamérica en donde incluso ha generado que la población de *Desmodus rotundus* sea casi el doble en áreas de crianza extensiva en comparación a ecosistemas sin introducción de ganado, siendo las presas más comunes los bovinos, caballos, cerdos y ovejas (Delpietro *et al.*, 1992; Mayen F., 2003; Streicker y Allgeier, 2016)

Diversos estudios realizados en vida silvestre reportan el aislamiento de *E.coli* con resistencia a antibióticos en quirópteros y otras especies de vida libre que nunca han sido expuestas a tratamientos antimicrobianos. Estos estudios postulan teorías sobre la adquisición de agentes resistentes mediante el alimento consumido en su medio ambiente, la cercanía a la ganadería extensiva y el uso indiscriminado de antibióticos en humanos (Levy *et al.*, 1981; Rolland *et al.*, 1985). A pesar de la ausencia de estudios sobre resistencia bacteriana en quirópteros en el Perú, una iniciativa por Abiodun A. y colaboradores tuvo lugar en Trinidad y Tobago, este estudio aisló cepas de *Escherichia coli* resistentes a eritromicina y estreptomicina en individuos de *Desmodus rotundus*. Esto evidencia que el murciélago hematófago puede adquirir bacterias resistentes a antibióticos mediante un ciclo aún desconocido en Latinoamérica, que podría estar relacionado con su medio ambiente o alimentación.

Este proyecto tiene como objetivo principal el identificar la existencia de enterobacterias productoras Betalactamasas de espectro extendido (ESBL) y productoras de Carbapenemasas (CARBA) en el vampiro común (*Desmodus rotundus*) y en animales de crianza de traspatio que cohabitan en cercanía a las cuevas de quirópteros identificadas en los distritos de Huacho, Barranca, Chancay y Mala, pertenecientes al departamento de Lima. Esta zona de estudio es idónea ya que Lima es el departamento de la costa con la mayor población de ganado vacuno y ovino, y es el segundo en ganado porcino según el Censo Nacional Agropecuario (2012), convirtiéndolo en un área ganadera con acceso a antibióticos, expuesta a fuentes de

agua o desagüe provenientes de centros de salud, y en donde los animales de crianza extensiva pueden ser considerados el alimento más accesible para las colonias de *Desmodus rotundus*. Por ende, estos distritos ganaderos presentan diversos factores que aumenta la probabilidad de que exista una presión de selección para el desarrollo de bacterias resistentes, exponiendo a los animales de ganadería extensiva y a su predador oportunista, el murciélago hematófago, a ser portadores de enterobacterias resistentes a antibióticos.

La existencia de enterobacterias resistentes a antibióticos en ganado de crianza de traspatio y murciélagos hematófagos nos podría dar una idea del alcance del ciclo de transferencia de bacterias resistentes en ecosistemas y poblaciones de animales nunca antes expuestos a antibióticos.

METODOLOGÍA

Lugar y tipo de Estudio:

Se realizó un estudio epidemiológico descriptivo, analítico y transversal para identificar la presencia de bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (ESBL) y productoras de carbapenemasas (CARBA) en 4 cuevas de *Desmodus rotundus* ubicadas en los distritos de Huacho, Barranca, Chancay y Mala, pertenecientes al departamento de Lima. Estas cuevas fueron previamente identificadas y estudiadas por Streicker *et al.* (2012), por lo que se usaron como poblaciones base para el muestreo aleatorio simple de *Desmodus rotundus* y animales de crianza de traspatio realizado en el presente estudio en Noviembre del 2016.

Población Objetivo

La población objetivo fueron los quirópteros hematófagos de la especie *Desmodus rotundus* independientemente de su edad o etapa de desarrollo, así como animales de crianza extensiva a una distancia promedio de 5 km y que presentaban mordeduras compatibles con murciélagos hematófagos, además se incluyó a animales de carga, como équidos, que también tenían lesiones o compartían el área de crianza con animales evidentemente atacados. La distancia de desplazamiento promedio del *Desmodus rotundus* ha estado basado en estudios ecológicos previos así como en estudios anteriores realizados en el departamento de Lima. (Fleming *et al.*, 1972; Trajano y Eleonora, 1996; Streicker *et al.*, 2012; Benavides *et al.*, 2016).

Tamaño de muestra

La población total de murciélagos en las colonias pertenecientes a los distritos de Huacho, Barranca, Chancay y Mala fueron estimadas por Streicker *et al.* (2012) mediante modelos lineales de captura-recaptura usando el programa *rcapture* package. Se realizó un muestreo no probabilístico en donde el tamaño de muestra en las poblaciones de murciélagos estuvo limitado a un máximo de 25 placas Petri por día de captura, debido a la capacidad de la incubadora portátil y el tiempo de incubación necesario para garantizar el crecimiento bacteriano.

La cantidad de murciélagos muestreados en cada cueva varió de acuerdo a las condiciones climáticas durante la captura, pero la población máxima a muestrear se estimó en un promedio de 25 muestras al día en cada cueva, obteniendo una población de 100 individuos en el departamento de Lima. El porcentaje promedio de la población a muestrear en cada colonia, considerando el número de quirópteros por refugio, se expresa en la siguiente tabla.

Tabla 1

Lugar	Región	Departamento	Distrito	N (95% IC)	N	%N
LM4	Costa	Lima	Mala	112	25	22.32
LM5	Costa	Lima	Barranca	75	25	33.33
LM6	Costa	Lima	Huacho	444	25	5.63
LM10	Costa	Lima	Chancay	105	25	23.81

Descripción: Las áreas de estudio están descritas como LMA4=Mala, LMA5=Barranca, LMA6= Huacho, LMA10= Chancay. N (95%IC) = Tamaño calculado en el 2010, con un intervalo de confianza del 95%. n= Tamaño de muestra promedio para cada colonia. %N= Porcentaje a muestrear de la población total.

Para el muestreo del ganado se buscó animales de crianza de traspatio a una distancia de 5 km de los refugios de *Desmodus rotundus*, de acuerdo a estudios ecológicos previos (Fleming *et al.*, 1972; Trajano y Eleonora, 1996; Streicker *et al.*, 2012; Benavides *et al.*, 2016). No se dispuso de datos previos sobre el tamaño de la población del ganado de crianza extensiva adyacente a las cuevas, por lo que se usó como base el estudio de Streicker y colaboradores (2012), en donde se emplea el número de granjas registradas en cada distrito según el Censo Nacional Agropecuario (CENAGRO III) y la densidad del ganado (vacas, cerdos, ovejas y cabras) determinada por el modelo de estimación de densidad de ganado de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). La información fue procesada mediante el programa *Raster Package* de R (Hijmans & van Etten, 2012) y se detalla en la siguiente tabla.

Tabla 2

Departamento	Código	Animales/5 Km	Aproximación
Lima	LM4	0.000731673	1
Lima	LM5	0.00052767	1
Lima	LM6	3.006248307	3
Lima	LM10	16.33549905	16
Total			21

Esta estimación determinó una muestra mínima de 21 animales en una distancia de 5 km, incluyendo vacas, cerdos, ovejas y cabras, la cual varió según la disponibilidad y densidad del ganado en cada área de muestreo.

Recolección de muestras

La captura de individuos de *D. rotundus* en los distritos de Mala y Chancay se realizó al exterior de las cuevas mediante la utilización de redes de neblina (2,5m x 3m) que fueron colocadas en horario nocturno (18:00 h a 06:00 h) y fueron monitoreadas cada 30 minutos, mientras que en los distritos de Barranca y Huacho la captura fue diurna utilizando redes de lona y guantes de protección. El muestro del ganado de crianza extensiva se realizó a 5km de distancia desde los refugios de *Desmodus rotundus* y el tamaño de muestra dependió directamente del número de animales en los recintos ganaderos anexos y de la disposición de los dueños a participar en la investigación. El muestreo estuvo de acorde a la Resolución Dirección General N° 0142. -2015-SERFOR/DGGSPFFS brindada para la realización de este proyecto.

La recolección de muestras fecales se realizó mediante hisopados rectales con hisopos estériles en cada individuo de *D. rotundus* y fueron directamente cultivados en los medios específicos para bacterias resistentes chromID ESBL (Enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido) y chromID CARBA SMART (Enterobacterias productoras de Carbapenemasas), se mantuvo las condiciones de esterilidad básicas durante la toma de las muestras mediante el uso de guantes, mechero de campo y una superficie desinfectada. Las placas de chromID ESBL y chromID CARBA SMART fueron incubadas en la incubadora portátil Hach (12 Vcc, 30 a 50 C (+/- 0,5 C) por un periodo de 18 a 24 horas siguiendo las normas de uso del laboratorio BioMérieux. Posteriormente las placas fueron selladas con parafilm y guardadas a 4 ° C con un tiempo máximo de almacenamiento de 24 horas hasta su procesamiento en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH).

Para el muestro de ganado de crianza extensiva se realizó una recolección de heces aisladas directamente del recto para realizar el cultivo en los medios chromID ESBL y chromID CARBA SMART de igual manera que en el muestreo de quirópteros. La materia fecal se retiró con un guante de palpación rectal con la intención de extraer heces frescas sin contaminación del medio externo, después se utilizó el hisopo estéril para recolectar una muestra desde el área central intacta del bolo fecal extraído manualmente. En el caso de especies con un recto mucho más estrecho, como los ovinos y équidos, se procedió a hisopar directamente el recto para obtener una muestra de heces ubicada a 2cm de profundidad. Se tomó una muestra directa por lo que se usó materiales que aseguren las condiciones estériles durante la toma de las muestras, como el uso de mascarillas y guantes. Los cultivos fueron incubados por un periodo de 18 a 24 horas a una temperatura de 37 -37.5 °C utilizando la incubadora portátil Hach, siguiendo las normas de uso del laboratorio BioMérieux, posteriormente las placas fueron selladas con parafilm y guardadas a 4 ° C con un tiempo máximo de almacenamiento de 24 horas hasta su procesamiento en la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH).

Cultivo de muestras

La elección del medio de cultivo cromogénico chromID ESBL (BioMérieux SA) estuvo basado en su alta sensibilidad y especificidad que reduce el número de muestras confirmatorias necesarias para identificar enterobacterias productoras de betalactamasas, además el medio posee un conjunto de antibióticos betalactámicos incluyendo cefpodoxima, el cual es considerado un marcador de elección para el mecanismo de resistencia en bacterias ESBL. El agar chromID CARBA SMART (BioMérieux SA) es también un medio cromogénico pero es selectivo para la identificación de Enterobacterias productoras de Carbapenemasas (CPE) en particular microorganismos como *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas (KPC).

Los cultivos se realizaron en el Laboratorio de microbiología de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH). Las placas de cultivo fueron leídas en base a la coloración y el tamaño de las colonias fueron evaluadas de acuerdo a la guía de identificación de los medios chromID ESBL y BioMérieux chromID CARBA SMART que especifica variaciones de colores según cepas bacterianas, relacionando a bacterias como *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* a colores verde claro y fucsia respectivamente.

Las colonias que crecieron en ambos medios fueron resembradas utilizando los mismos medios selectivos a bacterias resistentes para obtener colonias más puras y diferenciadas. La cantidad de resiembras varió según el tamaño, color y número de las colonias bacterianas en la muestra original, dando mayor prioridad a colonias con coloración verde o fucsia, que son características de *E. coli* y *Klebsiella spp.*; no obstante las colonias que no presentaron una coloración característica también fueron tomadas en cuenta ya que alguna cepas de *E.coli* no poseen β -glucuronidasa.

Las resiembras de las colonias positivas se realizaron dentro de la cabina de bioseguridad y fueron incubadas a una temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas. El número de resiembras varió de 1 a 4 por individuo, las cuales se sembraron en medios de gelosa Bio-rad (3ml) específico para la conservación de Enterobacterias a temperaturas entre 2 a 8 °C. Las muestras aisladas en gelosa se mantuvieron a una temperatura de 4°C durante un periodo de dos semanas hasta su envío al Hospital Arnaud de Villeneuve de Montpellier para las pruebas de MALDI-TOF (espectrometría de masas) y discos de sensibilidad a antibióticos.

MALDITOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight)

Se utilizó la espectrometría de masas para la identificación de las colonias enviadas en los medios de gelosa Bio-rad. Este proceso inició con el cultivo de las muestras en los medios de transporte, estas colonias bacterianas eran procesadas después de una incubación máxima de 24h. Después las colonias bacterianas fueron colocadas en la placa de metal del equipo de MALDI-TOF junto con una matriz en solución (conformada por ácido alfaciano-4-hidroxicinamico, acetonitrilo y ácido trifluoroacético).

La espectrometría de masas permite la ionización de proteínas mediante la exposición de la colonia a rayos laser, estas proteínas viajan por una cámara de vacío, determinando así el tiempo de vuelo que es necesario para obtener las diferentes masas de los compuestos proteicos de la bacteria. Los resultados de la espectrometría de masas fueron comparados con la amplia base de datos del Hospital Arnaud de Villeneuve de Montpellier, para determinar si la muestra pertenecía a la familia *Enterobacteriaceae* y descartar cualquier bacteria oportunista o contaminante externo que haya podido crecer en los medios.

Antibiograma

Se realizó un perfil específico de resistencia antibiótica confirmatoria en medios Mueller Hinton solo a las muestras identificadas como enterobacterias, esta prueba se realizó para descartar cualquier cepa de enterobacteria sobreproductoras de cefalosporinasa que podrían crecer en los medios específicos chromID ESBL. Para evaluar los resultados de los antibiogramas se tomó como patrón el protocolo brindado por El Comité Europeo sobre las pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST), en donde se recomienda la identificación de enterobacterias ESBL por medio de diferentes antibióticos como la cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima y cefpodoxima. Sin embargo, se recomienda la combinación de cefotaxima y ceftazidima que es más específica que la identificación basada mediante a un solo antibiótico. Así mismo, para las bacterias que resultaron con un halo de sensibilidad intermedio se utilizó antibióticos como la cefepima sola o junto con ácido clavulónico para confirmar si la muestra era una enterobacteria productora de betalactamasas de espectro extendido. (EUCAST, 2003)

Así mismo, la prueba de discos de sensibilidad cumplieron las directivas La Sociedad Francesa de Microbiología (SFM), la cual utiliza la zona de inhibición de los discos de cefotaxima, ceftazidima y cefepima a una concentración de 30 µg como base para la detección de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido. La medición de los halos de inhibición se interpretaron según los criterios de la SFM, los rangos de sensibilidad y resistencia según la medición del halo de inhibición fueron los siguientes: cefotaxima ($x \geq 26\text{mm}$, $x < 23\text{mm}$), ceftazidima ($x \geq 26\text{ mm}$, $x < 21\text{mm}$) y cefepima ($x \geq 24\text{mm}$, $x < 21\text{mm}$). Las bacterias con halos de inhibición con diámetros menores a 23mm en caso de la cefotaxima y ceftazidima fueron consideradas como cepas resistentes, de igual manera a las bacterias con halos menores a 21mm en el caso de la cefepima (Bonnet *et al.*, 2012).

Los antibióticos seleccionados para la identificación de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido fueron: amoxicilina, amoxicilina y ácido clavulónico, ticarcilina, ticarciclina y ácido clavulónico, piperacilina, piperacilina y tazobactam, cefoxitina, cefotaxima, ceftazidima, cefepima y aztreonam. Además se utilizó antibióticos de otras familias para evaluar el espectro de resistencia antibiótica de las colonias aisladas, entre los otros antibióticos no confirmatorios usados están: imipenem, ertapenem, gentamicina, tobramicina, netilmicina, amikacina, cloramfenicol,

tetraciclinas, trimetropin y sulfamidas, ácido nalidíxico, ofloxacina, ciprofloxacina, levofloxacino y fosfomicina.

Las muestras que fueron identificadas como enterobacterias por la prueba MALDI-TOF y que además fueron consideradas resistentes según el protocolo de EUCAST y directivas de la SFM, fueron consideradas como muestras positivas.

RESULTADOS

Se muestreó un total de 81 murciélagos de la especie *Desmodus rotundus* en los distritos de Mala, Huacho, Barranca y Chancay, así mismo se recolectó muestras de 37 animales de crianza de traspatio en los primeros tres distritos mencionados, entre el ganado muestreado se encontró 20 vacas criollas, 7 cerdos, 2 caballos y 2 asnos (Tabla 3 y 4) (Anexo 1).

Mala fue el distrito con el mayor número de individuos con *Desmodus rotundus* muestreados (29 individuos) y Huacho fue el distrito que contó con el mayor número de muestras de animales de crianza extensiva (18 individuos). Todas las áreas ganaderas involucradas en este estudio reportaron ataques de quirópteros en sus recintos, las distancias entre las áreas de ganadería y las cuevas de *Desmodus rotundus* variaron desde 0,6 km hasta 3,2 km (Tabla 4) (Fig.1).

Se identificó crecimiento bacteriano en 12 individuos de *Desmodus rotundus* y 9 animales de crianza de traspatio en el medio Chromid CARBA SMART. Sin embargo, ninguna de las bacterias identificadas por la prueba de MALDI-TOF pertenecía a la familia *Enterobacteriaceae*. Por otro lado se identificaron las especies bacterianas pertenecientes a las familias *Alcaligenaceae*, *Moraxellaceae*, *Pseudomonadaceae* y *Xanthomonadaceae* (Tabla 5).

De los cultivos que crecieron en los medios Chromid ESBL, 16 fueron identificados como enterobacterias según la prueba de MALDI-TOF, entre ellos 6 individuos de *Desmodus rotundus*, 4 individuos pertenecientes al ganado vacuno y 6 individuos pertenecientes al ganado porcino. Además, 15 individuos fueron identificados como *Escherichia coli* y solo 1 individuo de *Desmodus rotundus* fue identificado como *Enterobacter cloacae* (Tabla 6).

No obstante, solo 13 individuos fueron confirmados por el antibiograma como enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido según los criterios del EUCAST y la SFM. En consecuencia solo los individuos identificados como *Escherichia coli* en *Desmodus rotundus*, vacas y cerdos fueron considerados como positivos según las pruebas protocolares (Tabla 7).

La frecuencia de bacteria resistentes en las especies de *Desmodus rotundus*, vacas y cerdos fueron de 4,94 % (4/81), 20% (4/20) y 62,5% (5/8) respectivamente. En esta área destaca el grupo del ganado porcino, el cual tuvo el menor número de individuos muestreados pero el mayor número de individuos identificados como *Escherichia coli* ESBL en comparación a las otras especies.

El distrito de Huacho obtuvo el mayor número de individuos *Escherichia coli* ESBL incluyendo *Desmodus rotundus*, ganado vacuno y porcino. A pesar que los quirópteros fueron la única especie muestreada en los 4 distritos, solo se identificó individuos positivos en Mala y Huacho (Tabla 7).

Tabla 3: Ubicación de las cuevas de *Desmodus rotundus* y número de individuos muestreados en los distritos del departamento de Lima.

<i>Distrito</i>	<i>N° de individuos</i>	<i>Tipo de captura</i>
<i>Mala</i>	29	Nocturna. Redes de neblina
<i>Huacho</i>	20	Nocturna. Redes de neblina
<i>Barranca</i>	20	Diurna. Bolsas de lona
<i>Chancay</i>	12	Diurna. Bolsas de lona

Tabla 4: Ubicación de las áreas de crianza de traspatio y número de individuos muestreados en los distritos del departamento Lima.

<i>Distrito</i>	<i>Distancia a cuevas de quirópteros (km)</i>	<i>N° de individuos</i>	<i>Especie *</i>
<i>Mala 1</i>	0.641,26	10	9 vacas, 1 cerdo
<i>Huacho 1</i>	0.655,14	9	4 vacas, 5 cerdos
<i>Huacho 2</i>	1.100	4	3 vacas, 1 burro
<i>Huacho 3</i>	3.280	5	4 vacas, 1 burro
<i>Barranca 1</i>	1.640	4	2 caballos, 2 cerdos
<i>Barranca 2</i>	0.717,82	5	5 ovejas
<i>Chancay</i>	--(1)	--(1)	_(1)

*vaca= *Bos taurus*, burro=*Equus africanus asinus*, cabra=*Capra aegagrus hircus*, caballo=*Equus ferus caballus*, cerdo=*Sus scrofa domesticus*

(1): El muestreo no fue factible debido a la negativa de la comisión porcicultora del área.

Tabla 5: Resumen de resultados, número de individuos con crecimiento en medios BioMérieux para bacterias productoras de Betalactamasas (ESBL) y Cabapenemasas (CARBA), su identificación como enterobacterias por la prueba MALDI-TOF y confirmación por el antibiograma.

Grupos estudiados	Especie	Número de individuos	BioMérieux ESBL ⁽¹⁾	MALDI-TOF ⁽²⁾	Antibiograma ⁽³⁾	BioMérieux CARBA ⁽⁴⁾	MALDI-TOF ⁽⁵⁾
Quirópteros	<i>Desmodus rotundus</i>	81	37	6	4	12	-
Ganado	Vaca	20	11	4	4	1	-
	Oveja	5	4	-	-	-	-
	Cerdo	8	7	6	5	5	-
	Caballo	2	2	-	-	2	-
	Asno	2	-	-	-	1	-
<i>Total</i>		118	61	16	13	21	0

(1) Individuos con crecimiento en Medio BioMérieux ESBL

(2) Individuos identificados como Enterobacterias en prueba MALDI-TOF

(3) Individuos confirmados como bacterias ESBL por el antibiograma

(4) Individuos con crecimiento en Medio BioMérieux CARBA

(5) Individuos CARBA identificados como Enterobacterias en prueba MALDI-TOF

Tabla 6: Número de individuos identificados como enterobacterias mediante la prueba MALDI-TOF en *Desmodus rotundus* y ganado de crianza extensiva en el Departamento de Lima.

Enterobacterias en muestras ESBL	Número De Individuos Identificados						TOTAL
	<i>Desmodus rotundus</i>	vaca	oveja	cerdo	Caballo	asno	
<i>Escherichia coli</i>	5	4	-	6	-	-	15
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	0	0	0	0	0	1
No enterobacterias*	14	0	1	0	1	0	16
No identificadas	17	7	2	1	1	1	29
Total	37	11	3	7	2	1	61

*No enterobacterias: En este grupo se encontró especies pertenecientes a las Familias *Alcaligenaceae*, *Moraxellaceae*, *Pseudomonadaceae* y *Xanthomonadaceae*.

Tabla 7. Número de individuos confirmados como enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (ESBL) y su distribución en los distritos de Mala, Huacho y Barranca pertenecientes al departamento de Lima.

Grupos	Especie	Número de individuos por distrito		
		Mala	Huacho	Barranca
Quirópteros	<i>Desmodus rotundus</i>	2	2	-
Ganado	Vaca	1	3	-
	Cerdo	-	4	1
	Total	3	9	1

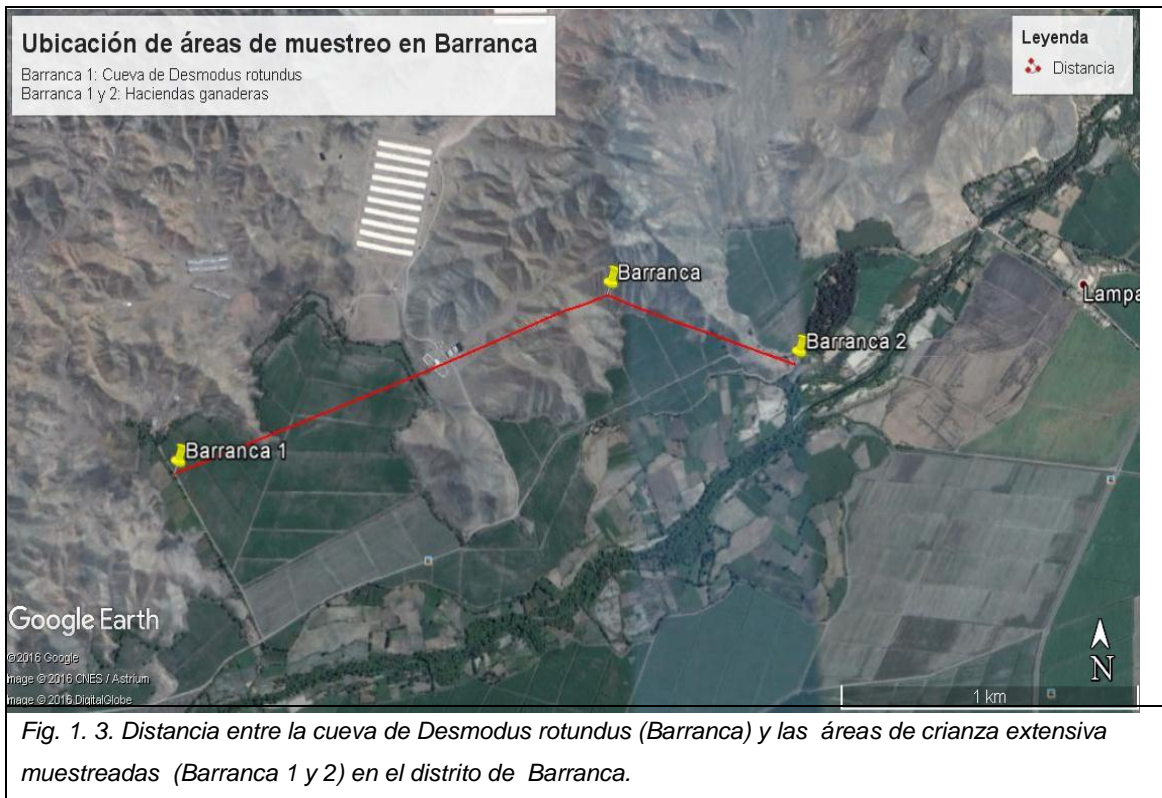
Figura 1



Fig. 1.1. Distancia entre la cueva de *Desmodus rotundus* (Mala) y el área de crianza extensiva muestreada (Mala 1) en el distrito de Mala.



Fig. 1. 2. Distancia entre la cueva de *Desmodus rotundus* (Huacho) y las áreas de crianza extensiva muestreadas (Huacho 1, 2 y 3) en el distrito de Huacho.



DISCUSIÓN

Los resultados en este estudio evidencian la presencia de enterobacterias productoras betalactamasas de espectro extendido (ESBL) en individuos de *Desmodus rotundus* y en animales de traspatio que cohabitan en cercanía a las cuevas de quirópteros en las provincias de Mala, Huacho y Barranca, siendo Chancay el único distrito en este estudio en donde no se identificaron bacterias ESBL en murciélagos. Así mismo, no se identificaron enterobacterias productoras de carbapenemasas (CARBA) en el muestreo realizado en los distritos pertenecientes al departamento de Lima, Perú (Tabla 5 y 7).

El presente estudio confirmó la presencia de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (ESBL) en 13 individuos pertenecientes a las poblaciones de *Desmodus rotundus*, ganado bovino y porcino. La adquisición de genes de resistencia a antibióticos implica la posible presencia de un ciclo de transmisión bacteriana distinto en cada población. En el caso de poblaciones de animales silvestres se postula que la cercanía a centros poblados, fuentes de agua con presencia de desechos intrahospitalarios, suelos contaminados y la exposición a animales domésticos son los vectores más probables de bacterias resistentes (Rolland *et al.*, 1985; Tissera y Lee, 2013; Wheeler *et al.* 2012; Vittecoq *et al.* 2016). Para las poblaciones de animales de crianza doméstica, la principal vía de adquisición de bacterias resistentes podría ser la exposición a antibioterapia, con el fin de tratar o prevenir enfermedades infecciosas, además de su uso como promotores de crecimiento. (Scott *et al.*, 2002; Geser *et al.*, 2012).

Diversos estudios expresan hallazgos de enterobacterias productoras de betalactamasas (ESBL) en centros hospitalarios y en infantes de bajos recursos en el Perú, siendo *E.coli* uno de los patógenos más prevalentes de la familia *Enterobacteriaceae*. (Morales *et al.*, 2005; Suárez, 2007; Pallecchi, 2007; Colquechagua *et al.*, 2015). Los reportes de *E.coli* ESBL coinciden con los resultados obtenidos en el presente estudio, en donde *E.coli* fue la única enterobacteria ESBL aislada en poblaciones de animales de traspatio y *Desmodus rotundus*. Así mismo, estudios realizados en Lima Metropolitana revelan que existe una mayor predisposición a la automedicación en estratos socioeconómicos más bajos, siendo la amoxicilina el antibiótico de elección por los pobladores (Mestanza y Pamo, 1998, Uchupe, 2013; Hermoza *et al.*, 2016).

Estos estudios podrían inferir que las enterobacterias ESBL no necesariamente pertenecerían a ambientes intrahospitalarios, sino que además podrían estar desarrollándose a causa de la automedicación por parte de los ganaderos, que al no poseer sistemas avanzados de agua o desagüe, podrían estar introduciendo enterobacterias resistentes al medio ambiente. Así mismo, un inadecuado manejo de residuos intrahospitalarios podría estar introduciendo enterobacterias ESBL a las fuentes naturales de agua cercanas a los distritos ganaderos, las cuales podrían ser utilizadas como regadíos de pasturas y podrían ser consumidas por el ganado de traspatio, completando así un ciclo de transmisión bacteriana.

Otros factores a considerar es la exposición de poblaciones de *Desmodus rotundus* a suelos que poseen enterobacterias productoras de betalactamasas. El inadecuado manejo del estiércol en crianzas de traspatio podría considerarse uno de los principales factores que genera una alta densidad de enterobacterias, de igual manera el abono de origen desconocido y las corrientes de viento podrían causar la dispersión de bacterias resistentes a múltiples áreas (Rocha *et al.*, 2015; Vittecoq *et al.*, 2016). Cabe resaltar que la menor distancia encontrada entre los centros de crianza de animales de traspatio y refugios de *Desmodus rotundus* fue de 0,65km, por lo que no se podría descartar la introducción de bacterias resistentes mediante los mecanismos ya mencionados, dada a la relativa cercanía entre estas dos poblaciones (Tabla 4).

La presencia de enterobacterias productoras de betalactamasas en ganado de traspatio, puede deberse a una constante exposición a antibióticos betalactámicos y tratamientos inconclusos; sin embargo, la exposición a antibióticos es menor en comparación a la ganadería intensiva y solo se utiliza en presencia de cuadros clínicos, lo que haría pensar que este no sería el principal mecanismo de adquisición de bacterias resistentes (Redding *et al.*, 2013 y 2014b). No obstante, la ausencia de una regulación sobre el uso y compra de antibióticos para el ganado de traspatio podría aumentar la probabilidad de resistencia bacteriana en el ganado de crianza extensiva de Lima (Solimano *et al.*, 2011). A pesar que otras especies de animales de traspatio también presentaban ataques de *Desmodus rotundus*, solo se identificó *E.coli* ESBL en el ganado vacuno y porcino, se podría inferir que estas poblaciones reciben una mayor cantidad de antibióticos en comparación a los équidos y ganado ovino, debido a enfermedades de alta prevalencia como mastitis o cuadros entéricos (Esslemont y Kossaibati, 1996; Cameron, 2000). Sin embargo, se necesitan mayores estudios con poblaciones más uniformes de animales de traspatio para comparar evaluar la prevalencia en cada especie

Las cepas de *E.coli* ESBL encontradas en el presente estudio podrían haber adquirido genes de resistencia mediante una transmisión vertical u horizontal. La transmisión vertical de genes de resistencia ocurre mediante mutaciones durante la recombinación del ADN bacteriano, el cual suele considerarse como un evento evolutivo (Lawrence, 1999; Woodford y Ellington, 2007). La transmisión horizontal de genes de resistencia ocurre mediante conjugación, transducción y transformación. La conjugación es el mecanismo más común en enterobacterias ESBL, la cual se basa en transmitir una porción de ADN ubicada en el plásmido mediante un pilus, esta transmisión de genes de resistencia se ha observado en enterobacterias, como *E.coli*, que adquieren genes de resistencia de diferentes cepas así como de distintas bacterias. Además, la exposición continua a un antibiótico genera una presión de selección que aumenta las probabilidades de transmisión horizontal. (Tenover 2006; Vignoli y Seija, 2006, Hudsellon, 2014).

La identificación de bacterias productoras de ESBL en animales de traspatio y en el *Desmodus rotundus* podría tratarse de una transmisión horizontal de genes de resistencia bacteriana, debido a que la transmisión vertical requiere una mutación durante la replicación del ADN bacteriano que suele ocurrir como una respuesta adaptativa a una constante presión de antibióticos. Esto es incompatible con las poblaciones de murciélagos hematófagos, las cuales no están expuestas a ningún tratamiento terapéutico, sugiriendo la adquisición de bacterias ESBL mediante otras fuentes en su medio ambiente, como afluentes de agua, suelos y su alimento. El reducido tiempo de vida de los animales de traspatio en los recintos ganaderos podría hacer pensar en una transferencia horizontal, sin embargo, la transferencia vertical podría ser posible mediante la exposición continua a tratamientos reiterados e inconclusos haciendo uso de betalactámicos, lo cual se ha observado en estudios previos en zonas de ganadería extensiva (Solimano *et al.*, 2011; Redding, *et al.*, 2013; Redding *et al.*, 2014).

La alimentación única del *Desmodus rotundus* podría generar otra hipótesis, este murciélago hematófago podría estar en contacto con niveles plasmáticos altos de antibióticos en sangre al momento de alimentarse de sus presas domésticas, este escenario tomaría lugar durante el uso de betalactámicos como tratamiento de elección en animales de traspatio. Estudios de farmacocinética en rumiantes y alpacas revelan que la ampicilina aplicada vía intramuscular posee una rápida absorción, teniendo un mayor efecto durante la primera hora post-aplicación y con una permanencia en suero de hasta 6 horas (Zurich *et al.*, 1986; Kreil *et al.*, 2001). Al disminuir las concentraciones séricas del antibiótico durante el tiempo, el *Desmodus rotundus* podría

estar alimentándose de plasma con altas y bajas concentraciones de antibióticos, es decir, podría estar expuesto a sobredosis así como a subdosis de betalactámicos.

Una continua exposición a sangre de animales de traspatio con concentraciones impredecibles de antibióticos podría generar el desarrollo de enterobacterias resistentes a betalactámicos en las poblaciones del murciélago hematófago; sin embargo, el acelerado mecanismo de excreción renal del *Desmodus rotundus* en la primera hora posterior al consumo de sangre podría generar la eliminación de antibióticos con mayor rapidez, como la penicilina, la cual se elimina principalmente mediante los túbulos renales en humanos (Barza y Weinstein, 1976; Breidenstein, 1982). Al no tener estudios de la farmacocinética de betalactámicos en murciélagos hematófagos, no se puede especular si el tiempo de permanencia de metabolitos betalactámicos en el organismo del *Desmodus rotundus* sería suficiente para causar una presión de selección que induzca mutaciones en el ADN bacteriano, mecanismo característico de una transmisión vertical.

Así mismo, los quirópteros suelen cohabitar en extensos grupos de distintas especies (Quintana y Pacheco, 2007), esto se evidenció durante el muestreo en los refugios de quirópteros en Lima, en donde se encontró a especies insectívoras y frugívoras compartiendo el mismo refugio del *Desmodus rotundus*. Debido a la alta densidad de quirópteros en un área, estos refugios de podrían ser un área que favorecería la transmisión horizontal de resistencia bacteriana debido la acumulación de grandes cantidades de heces en las bases de las cuevas. Así mismo, comportamientos propios del *Desmodus rotundus*, como el acicalamiento entre individuos y la regurgitación de sangre hacia otros miembros de la colonia, podrían ser factores que permitan el intercambio de bacterias resistentes entre los individuos de una misma colonia. (Wilkinson, 1986; Denault y McFarlane, 1995).

Las enterobacterias productoras de carbapenemasas (CARBA) suelen ser de origen intrahospitalario debido a que los carbapenems son considerados como antibióticos de uso restringido por el Ministerio de Salud del Perú (MINSA), la administración de estos fármacos debe contar con la autorización por el Comité de Control de Infecciones Intrahospitalarias o en su defecto por el Comité Farmacoterapéutico del Perú (MINSA, 2012). Estas restricciones en su uso junto a su alto costo terapéutico (Garro, 2014; Guerra, 2008), reforzarían la idea de que aún no existe una presión de selección bacteriana necesaria para el desarrollo de enterobacterias resistentes a carbapenems en los centros de salud pertenecientes a Mala, Huacho, Barranca y Chancay. Al ser menos

probable la introducción de enterobacterias CARBA mediante fuentes agua o desagüe de origen intrahospitalario, se podría inferir que aún no ha habido una introducción de enterobacterias CARBA en los ambientes en donde cohabitan las poblaciones de *Desmodus rotundus* y animales de traspatio, o en todo caso, su prevalencia es mínima.

Pseudomonas fue el género bacteriano que creció con mayor frecuencia en los medios Biomerieux chromID CARBA SMART a pesar de no pertenecer a la familia *Enterobacteriaceae*. Este crecimiento en medios selectivos a Enterobacterias puede ser atribuido al mecanismo de resistencia intrínseco de las *Pseudomonas* que les permite desarrollar resistencia a los carbapenems. La especie *P. aeruginosa* posee una baja permeabilidad de membrana que junto a múltiples mecanismos simultáneos de resistencia, como la producción de betalactamasas y bombas de expulsión, le permite desarrollar resistencia a múltiples antibióticos (Suarez *et al.*, 2006; Hancock, 1998). La identificación de *Pseudomonas* posiblemente productoras de carbapenems en el presente estudio es compatible con la alta prevalencia de infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenems en centros hospitalarios en Lima y que además han demostrado poseer el gen Metalo- β - lactamasas (M β Ls), responsable de la resistencia a estos antibióticos (Suárez, 2007; Paz *et al.*, 2008; Gonzales, 2013).

La identificación de enterobacterias ESBL en ganado y poblaciones silvestres de *Desmodus rotundus* revelan un ciclo de transferencia bacteriana complejo, la cual requiere una investigación a mayor escala para comparar las frecuencias de enterobacterias ESBL entre las poblaciones de ganado de traspatio y murciélagos, las cuales tuvieron un tamaño de muestra limitado en el presente estudio. Así mismo, para obtener una mayor visión del ciclo de transmisión de enterobacterias resistentes se debería incluir poblaciones humanas y fuentes de agua o desagüe pertenecientes a los distritos estudiados para dilucidar el origen de la resistencia bacteriana. Además, estos hallazgos revelan que el uso indiscriminado o inadecuado de antibióticos está causando una problemática no solo en poblaciones humanas, sino que propone un riesgo en poblaciones de animales domésticos y silvestres en el departamento de Lima.

CONCLUSIONES

De los 81 murciélagos de la especie *Desmodus rotundus* muestreados en los distritos de Lima, 4 individuos fueron confirmados por el antibiograma como *Escherichia coli* ESBL según los criterios del EUCAST y la SFM que correspondieron a los distritos de Mala y Huacho tuvieron 2 individuos positivos cada uno, mientras que las muestras provenientes de los distritos de Barranca y Chancay resultaron negativas.

De las 37 muestras de animales de crianza de traspatio, 4 vacas y 5 cerdos fueron confirmados como *Escherichia coli* ESBL, los cuales pertenecían a los distritos de Mala, Huacho y Barranca.

No se detectaron enterobacterias productoras de carbapenemasas (CARBA) en las poblaciones silvestres quirópteros ni en los animales pertenecientes a las crianzas de traspatio adyacentes a los refugios de *Desmodus rotundus*.

Este estudio evidencia la presencia de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (ESBL) en el ganado vacuno y porcino, además de un ciclo aún desconocido de transferencia de resistencia bacteriana que ha llegado a involucrar a poblaciones silvestres del vampiro común (*Desmodus rotundus*) en el departamento de Lima, Perú.

LITERATURA CITADA

1. Abiodun A. Adesiyun, Alva Stewart-Johnson, and Nadin N. Thompson. 2009. Isolation of enteric pathogens from bats in Trinidad. *J Wildlife Dis.* 45(4), 952-961.
2. Alan G. Mathew, Robin Cissell, and S. Liamthong. 2007. Antibiotic Resistance in Bacteria Associated with Food Animals: A United States Perspective of Livestock Production. *Foodborne Pathog Dis.* 4(2), 115-133.
3. Al-Bayssari, C., Dabboussi, F., Hamze, M., & Rolain, J. M. 2015. Detection of expanded-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria in the 21st century. *Expert review of anti-infective therapy*, 13(9), 1139-1158.
4. Arriola, C. S., Güere, M. E., Larsen, J., Skov, R. L., Gilman, R. H., Gonzalez, A. E., & Silbergeld, E. K. 2011. Presence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Pigs in Peru. *PLoS ONE* 6(12), e28529.
5. Ash RJ, Mauck B, Morgan. 2002. M.Antibiotic resistance of gram-negative bacteria in rivers, United States. *Emerg Infect Dis.* 8(7), 713-716.
6. Barza, M., & Weinstein, L. 1976. Pharmacokinetics of the penicillins in man. *Clinical pharmacokinetics*, 1(4), 297-308.
7. Bautista, Ortencia Uchupe; Ríos, Graciela Dina Palomino. 2013. Automedicación en los pobladores de villa el salvador del grupo I y II del sector 6. Instituto superior tecnológico privado Daniel Alcides Carrión.
8. Benavides, J. A., Valderrama, W., & Streicker, D. G. 2016. Spatial expansions and travelling waves of rabies in vampire bats. In *Proc. R. Soc. B* . 283(1832), 20160328.
9. Benavides, Julio Andre, Sylvain Godreuilc, Rebecca Bodenham, Sandra Ratiarisone, Céline Devose, Marie-Odile Petrettoe, Michel Raymonda and Patricia Escobar-Páramoa. 2012. No evidence for transmission of antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains from humans to wild western lowland gorillas in Lope National Park, Gabon. *Appl Environ Microb* 78(12), 4281-4287.
10. Berezin EN, Solórzano F; Latin America Working Group on Bacterial Resistance. 2014. Gram-negative infections in pediatric and neonatal intensive care units of Latin America. *The J Infect Dev Ctries.* 8(08), 942-953.
11. Bradford, P. A. 2001. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical microbiology reviews.* 14(4), 933-951.
12. Breidenstein, C. P. 1982. Digestion and assimilation of bovine blood by a vampire bat (*Desmodus rotundus*). *Journal of Mammalogy.* 63(3), 482-484.

13. Cabrera, C. E., Gómez, R. F., & Zúñiga, A. E. 2007. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colomb Medica*. 38(2), 149- 158.
14. Cameron, R. D. A. 2000. A review of the industrialisation of pig production worldwide with particular reference to the Asian region. *Animal. Health and Area-wide Integration. FAO*. 8-21
15. Christian C. Voigt, Detlev H. Kelm. 2006. Host Preference of the Common Vampire Bat (*Desmodus rotundus*; Chiroptera) Assessed by Stable Isotopes. *Journal of Mammalogy*. 87 (1), 1-6
16. Colquechagua Aliaga, Fabiola; Sevilla Andrade, Carlos y Gonzales Escalante, Edgar. 2015. Enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en muestras fecales en el Instituto Nacional de Salud del Niño, Perú. *Rev. perú. med. exp. salud publica*. 32(1), 26-32.
17. Daza Pérez, R. M. 1998. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información terapéutica del sistema nacional de salud*, 22(3), 57-67.
18. Delpietro HA, N. Marchevsky, E. Simonetti. 1992. Relative population densities and predation of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*) in natural and cattle-raising areas in north-east Argentina. *Prev Vet Med*. 14(1-2), 13-20
19. DeNault, L. K., & McFarlane, D. A. 1995. Reciprocal altruism between male vampire bats, *Desmodus rotundus*. *Animal Behaviour*. 49(3), 855-856.
20. Esslemont, R.J., Kossaibati, M.A. 1996. Incidence of production diseases and other health problems in a group of dairy herds in England. *Veterinary Record*. 139, 486-490.
21. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2013. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. 1, 12-40.
22. Fleming T.H; E.T Hooper y D.E Wilson. 1972. Three central American bat communities: Structure, reproductive cycles and movement patterns. *Ecology*. 53(4), 555-569.
23. Fleming, T. H., Hooper, E. T., & Wilson, D. E. 1972. Three Central American Bat Communities: Structure, Reproductive Cycles, and Movement Patterns. *Ecology*, 53(4), 555-569.
24. Foley, S. L., and A. M. Lynne. 2008. Food animal-associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. *J. Anim. Sci.* 86, 173-187.
25. Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. 2012. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial

- Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 73(4),354-60.
26. Garro Nuñez Gladys. 2014. Enterobacterias resistentes a carbapenems, un desafío para la atención hospitalaria. *Boletín epidemiológico*. 23, 667 – 668.
 27. Geser, N., Stephan, R., & Hächler, H. 2012. Occurrence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals, minced meat and raw milk. *BMC veterinary research*, 8(1), 21.
 28. Gonzales, E. 2013. Detección y Caracterización molecular de metalo- β -lactamasas en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* recuperados en un instituto especializado pediátrico de lima-peru. Universidad Nacional Mayor De San Marcos.
 29. Guerra Ñique, Diana Paola. 2009. Consumo y costo de imipenem 500mg y meropenem 500mg en los servicios de hospitalización del Hospital Victor Lazarte Echegaray, enero-diciembre 2008. Universidad Nacional de Trujillo.
 30. Hancock, Robert EW. 1998. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clinical Infectious Diseases*, 27(1), 93-99.
 31. Hermoza-Moquillaza, R., Loza-Munarriz, C., Rodríguez-Hurtado, D., Arellano-Sacramento, C., & Hermoza-Moquillaza, V. 2016. Automedicación en un distrito de Lima Metropolitana, Perú. *Revista Medica Herediana*, 27(1), 15-21.
 32. Hoelzer, K., A. I. Moreno Switt, and M. Wiedmann. 2011. Animal contact as a source of human non-typhoidal salmonellosis. *BMC Vet. Res.* 42, 34.
 33. Huddleston JR. 2014. Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. *Infection and Drug Resistance*. 7,167-176.
 34. Kreil, V., Luders, C., Hallu, R., Rebuelto, M., & Betancourt, L. 2001. Farmacocinética de la ampicilina en Alpacas (*Lama pacos*). *Arch. med. vet.* 33(2), 241-246
 35. Kuzmin, Ivan V. et al. 2011. Bats, emerging infectious diseases, and the rabies paradigm revisited. *Emerging Health Threats Journal*. 1, 1752-8550.
 36. Lawrence, J. G. 1999. Gene transfer, speciation, and the evolution of bacterial genomes. *Current opinion in microbiology*. 2(5), 519-523.
 37. Levy, Stuart B., Royston C. Clowes, Koenig, Ellen L. 1981. Molecular biology, pathogenicity and ecology of bacterial plasmids. Plenum Publishing Corporation. 708- 709.
 38. Maiden MC. 1998. Horizontal genetic exchange, evolution, and spread of antibiotic resistance in bacteria. *Clin Infect Dis*. S1, S12-20.
 39. Mayen F. 2003. Haematophagous bats in Brazil, their role in rabies transmission, impact on public health, livestock industry and alternatives to an indiscriminate reduction of bat population. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 50(10):469-72.

40. Maza, G. S., Cuadros, C. F., Romero, R. E., & Pérez, N. F. 2011. Antibacterianos de empleo frecuente en ganado bovino destinado a la producción de leche y carne en Lima, Perú. *Una Salud*, 2(2), 81-94.
41. Mesa, R. J., Blanc, V., Blanch, A. R., Cortés, P., González, J. J., Lavilla, *et al.* 2006. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *Journal of Antimicrobial chemotherapy*, 58(1), 211-215.
42. Mestanza, Francisco y Pamo, Oscar. 1992. Estudio muestral del consumo de medicamentos y automedicación en Lima Metropolitana. *Rev. méd. Hered.* 3(3).101-108.
43. Ministerio Nacional de Salud. 2012. Petitorio Nacional Único de Medicamentos Esenciales para el Sector Salud Perú 2012.
44. Moet GJ, Jones RN, Biedenbach DJ, Stilwell MG, Fritsche TR. 2007. Contemporary causes of skin and soft tissue infections in North America, Latin America, and Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-2004). *Diagn Microbiol Infect Dis.*; 57(1):7-13.
45. Morales José-Luis, Reyes Karina, Monteghirfo Mario, Roque Mirtha e Irey José. 2005. Presencia de beta-lactamasas de espectro extendido en dos hospitales de Lima, Perú. *An. Fac. med.* 66(1).
46. Morrill H., Pogue J., Kaye K., LaPlante K. 2015. Treatment options for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections. *Open Forum Infect Dis.* p ofv050
47. Mühlendorfer K. Bats and bacterial pathogens: a review. 2013. *Zoonoses and public health.* 60(1), 93-103.
48. Pallecchi L, Bartoloni A, Fiorelli C, et al. 2007. Rapid Dissemination and Diversity of CTX-M Extended-Spectrum β -Lactamase Genes in Commensal *Escherichia coli* Isolates from Healthy Children from Low-Resource Settings in Latin America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 51(8), 2720-2725.
49. Paz Rojas, Enrique Luis; De Leon Pandolfi, Darío Ponce; Ramirez Ponce, Rafael. 2008. Resistencia bacteriana en cuidados intensivos y tendencia actual: Departamento de Cuidados Críticos, Servicio de Cuidados Intensivos del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen, Essalud, Lima, Perú, 2004-2006. *Acta méd. Peruana.* 25 (3).
50. Pehrsson, E.C., Tsukayama, P., Patel, S., Mejía-Bautista, M., Sosa-Soto, G., Navarrete, K.M., Calderon, M., Cabrera, L., Hoyos-Arango, W., Bertoli, M.T., Berg, D.E., Gilman, R.H. & Dantas, G. 2016. Interconnected microbiomes and resistomes in low-income human habitats. *Nature.* 533(7602), 212–216
51. Quintana, H., & Pacheco, V. 2007. Identificación y distribución de los murciélagos vampiros del Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 24(1), 81-88.

52. R Development Core Team. 2011. R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
53. R. Bonnet, F. Caron, J.D. Cavallo, H. Chardon, C. Chidiac, P. Courvalin, H. Drugeon, L. Dubreuil et al. 2012. Comité De L'antibiogramme De La Société Française De Microbiologie. 21-16
54. Redding LE, Barg FK, Smith GS, Galligan DT, Levy MZ, Hennessy S. 2013. The role of veterinarians and feed-store vendors in the prescription and use of antibiotics on small dairy farms in rural Peru. *J Dairy Sci.* 96:7349–7354.
55. Redding, LE, Cubas-Delgado, F, Sammel, MD, Smith, G, Galligan, DT., Levy, MZ, & Hennessy, S. 2014. The use of antibiotics on small dairy farms in rural Peru. *Preventive Veterinary Medicine*, 113(1), 88–95.
56. Robert J. Hijmans & Jacob van Etten. 2012. raster: Geographic analysis and modeling with raster data. R package version 2.0-12.
57. Rocha, C., Reynolds, N. D., & Simons, M. P. 2015. Resistencia emergente a los antibióticos: una amenaza global y un problema crítico en el cuidado de la salud. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública.* 32(1), 139-145.
58. Rolland Hansfater, B. Marshall, and Levy. 1985. Antibiotic-resistant bacteria in wild primates: Increased prevalence in baboons feeding on human refuse. *Applied and Environmental Microbiology.* 49: 791–794.
59. San Martín B, Kruze J, Morales MA, Agüero H, León B, Espinosa S, Iragüen D, Puga M y Borie C. 2002. Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región, Región Metropolitana y Xª Región, Chile. *Arch Med Vet.* 34, 221-34.
60. Sanchez, S., C. L. Hofacre, M. D. Lee, J. J. Maurer, and M. P. Doyle. 2002. Animal sources of salmonellosis in humans. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 221, 492–497.
61. Scott A. McEwen, Paula J. Fedorka-Cray; Antimicrobial Use and Resistance in Animals. 2002. *Clin Infect Dis.* 34 (3), S93-S106.
62. Shorr AF. 2009. Review of studies of the impact on Gram-negative bacterial resistance on outcomes in the intensive care unit. *Crit Care Med.*; 37(4), 1463-9.
63. Slama, T. G. 2008. Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. *Critical Care*, 12(4), S4.
64. Streicker, D. G., & Allgeier, J. E. 2016. Foraging choices of vampire bats in diverse landscapes: potential implications for land-use change and disease transmission. *Journal of Applied Ecology.* 53(4), 1280-1288.
65. Streicker, D. G., Recuenco, S., Valderrama, W., Benavides, J. G., Vargas, I., Pacheco, V et al. 2012. Ecological and anthropogenic drivers of rabies exposure in vampire bats: implications for transmission and control. In *Proc. R. Soc. B.* 279 (1742), 3384-3392.

66. Suárez Víctor. 2007 .Vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos en bacterias de origen hospitalario. Bol – Inst Nac Salud . N.º 11 – 12, 217-220.
67. Tenover, F. C.2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. The American journal of medicine, 119(6), S3-S10.
68. Tham, Johan. 2012. Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: Epidemiology, Risk Factors, and Duration of Carriage. Lund University.19-31.
69. Tissera, S., & Lee, S. M. 2013. Isolation of Extended Spectrum β -lactamase (ESBL) Producing Bacteria from Urban Surface Waters in Malaysia. 20(3): 14–22.
70. Trajano, Eleonora. 1996. Movements of Cave Bats in Southeastern Brazil, with Emphasis on the Population Ecology of the Common Vampire Bat, *Desmodus Rotundus* (Chiroptera). Biotropica. 28(1), 121-29.
71. Velásquez, J., Hernández, R., Pamo, O., Candiotti, M., Pinedo, Y., Sacsquispe, R., ... & Fernández, N.2013. *Klebsiella pneumoniae* resistente a los carbapenemes. Primer caso de carbapenemasa tipo KPC en Perú. Rev Soc Peru Med Interna, 26(4), 193.
72. Vittecoq, M., Godreuil, S., Prugnotte, F., Durand, P., Brazier, L., Renaud, N., Arnal, A., Aberkane, S., Jean-Pierre, H., Gauthier-Clerc, M., Thomas, F. and Renaud, F. 2016. Antimicrobial resistance in wildlife. J Appl Ecol. 53: 519–529
73. Wheeler E, Hong PY, Bedon LC, Mackie RI. 2012.Carriage of antibiotic-resistant enteric bacteria varies among sites in Galapagos reptiles. J Wildl Dis. 48(1), 56-67.
74. Whitaker Jr, J. O., C. M. Ritzi, and C. W. Dick .2009. Collecting and preserving ectoparasites for ecological study. In: Kunz, T. H., and S. Parsons. Ecological and Behavioral Methods for the Study of Bats. The Johns Hopkins University Press. 2, 806–827.
75. Wibbelt, G., S. Speck, and H. Field, 2009. Methods for assessing diseases in bats. In: Kunz, T. H., and S. Parsons. Ecological and Behavioral Methods for the Study of Bats.The Johns Hopkins University Press.2, 775–794.
76. Wilkinson, G. S. 1986.Social grooming in the common vampire bat, *Desmodus rotundus*. *Animal Behaviour*. 34(6), 1880-1889.
77. Woodford, N., & Ellington, M. J.. 2007. The emergence of antibiotic resistance by mutation. Clinical Microbiology and Infection. 13(1), 5-18.
78. Ziech Rosangela Estel, Lampugnani Camila, Perin Ana Paula, Sereno Mallu Jagnow, Sfaciotte Ricardo Antônio Pilegi, Viana Cibeli et al. .2016. Multidrug resistance and ESBL-producing *Salmonella* spp. isolated from broiler processing plants. Braz. J. Microbiol. 47(1), 191-195.
79. Zurich, L., Villalobos, M., & Calderón, M. T. 1986. Niveles sanguíneos de ampicilina en rumiantes (*). Monografías de Medicina Veterinaria. 8(2).

ANEXOS

Anexo 1: Latitud y longitud de las cuevas de *Desmodus rotundus* en los distritos de Mala, Huacho, Barranca y Chancay.

<i>Cuevas de Desmodus rotundus</i>			<i>Áreas de crianza de traspatio</i>		
<i>Distrito</i>	<i>Latitud (S)</i>	<i>Longitud (O)</i>	<i>Nombre</i>	<i>Latitud (S)</i>	<i>Longitud (O)</i>
<i>Mala</i>	12°39'56.075"	76°40'4.726"	Mala 1	12°39'35.406"	76° 40' 2.953"
<i>Huacho</i>	11° 3' 36"	77° 27' 35.999"	Huacho 1	11° 3' 49.792"	77° 27' 2.153"
			Huacho 2	11° 4' 2.928"	77° 27' 59.543"
			Huacho 3	11° 4' 48.54"	77° 28' 54.768"
<i>Barranca</i>	10° 38' 24"	77° 49' 11.999"	Barranca 1	10°38'42.936"	77° 50' 2.4"
			Barranca 2	10°38'31.308"	77° 48' 49.643"
<i>Chancay</i>	11° 35' 18.045	77° 16' 42.254"	--(1)	--(1)	_(1)

(1): El muestreo no fue factible debido a la negativa de la comisión porcicultora del área.