

**UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA**

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



**“Detección de enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido en primates no humanos de dos centros de rescate en Maynas, Loreto, Perú”**

Tesis para optar el Título Profesional de:

**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**Sandy Lorena Huillca Vilcarromero**

**Bachiller en Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**LIMA – PERÚ**

**2021**

## **AGRADECIMIENTO**

Durante todo el proceso de esta tesis tuve muchos bajos y altos, que solo pude haber sobrellevado gracias a la ayuda de muchas personas, amigos y familiares, que con sus palabras de apoyo me animaron a seguir a delante y terminar mi tesis.

Quiero agradecer de forma especial a mis padres, ya que sin su apoyo no hubiera podido llegar a donde estoy, fueron mis primeros maestros de vida y son el mejor ejemplo a seguir que pudiera pedir, no solo profesionalmente, ya que con su guía y amor me alentaron a ser una mejor persona cada día y me enseñaron que con esfuerzo y perseverancia puedo cumplir mis sueños y mis metas.

A mi asesor el MVZ Luis Jara, quien aceptó ser mi guía y maestro durante todo este proceso. Aunque hubo muchas complicaciones, fue gracias a su apoyo que se pudo salir adelante. Gracias por su paciencia, su comprensión, sus consejos y por todos los conocimientos que compartió conmigo. El resultado de esta tesis se lo debo a usted.

A mi enamorado, por todo lo que hizo para apoyarme y animarme, por no dejar que me rinda, por comprenderme y presionarme para continuar, y tratar de buscar soluciones conmigo a los problemas que se fueron presentando durante todo este proyecto.

Y finalmente, a la Universidad Peruana Cayetano Heredia, por abrirme las puertas en su institución y brindarme todo lo necesario para aprender sobre esta hermosa carrera y a sus docentes, que en cada clase me ayudaron a rectificar que había escogido la carrera correcta para mí.

## RESUMEN

Los animales silvestres representan la fuente de la mayoría de infecciones emergentes a nivel mundial. La resistencia a los antibióticos mediante la producción de betalactamasa de espectro extendido (BLEE) es la más común y de importancia en salud pública. Existen además enterobacterias patógenas o invasivas que pueden presentar factores de virulencia en *Escherichia coli* diarreagénica y *Klebsiella pneumoniae* hipermucoviscosa. El objetivo del presente estudio fue evaluar la frecuencia de *E. coli* y *Klebsiella* sp. productoras de BLEE, junto con la presencia de sus principales genes virulentos *stx1*, *stx2*, *eae* e *hlyA* en el caso de *E. coli* y los genes *magA* y *rmpA* en *K. pneumoniae* en primates no humanos de centros de rescate de la provincia de Maynas, Loreto, Perú. A partir de 28 muestras rectales se aislaron 229 cepas entre *E. coli* con un 89.5%, *Klebsiella* sp. 8.7% (*K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* 8.3% y *K. oxytoca* 0.4%), *Enterobacter aerogenes* 1.3% y *Raoultella ornithinolytica* 0.4%. El 35.7% de los animales muestreados resultaron positivos para el fenotipo BLEE, siendo el 25% positivos para *E. coli*, 7.1% positivo para *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* BLEE y el 3.5% positivo para ambos agentes. No se detectaron genes virulentos en ninguna de las cepas aisladas. Los primates no humanos del Nuevo Mundo en semi cautiverio representan un reservorio de enterobacterias BLEE.

**Palabras clave:** *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *betalactamasas de espectro extendido*, *primates no humanos*.

## ABSTRACT

Wild animals represent the source of most emerging infections globally. Antibiotic resistance through extended spectrum beta-lactamase (ESBL) production is the most common and the most important for public health. There are also pathogenic or invasive Enterobacteriaceae that may present virulence factors in diarrheagenic *Escherichia coli* and hypermucoviscosal *Klebsiella pneumoniae*. The objective of the present study was to evaluate the frequency of *E. coli* and *Klebsiella* sp. producers of ESBL, together with the presence of their main virulent genes *stx1*, *stx2*, *eae* and *hlyA* in the case of *E. coli* and the *magA* and *rmpA* genes in *K. pneumoniae* in non-human primates from rescue centers of the Maynas province, Loreto, Peru. From 28 rectal samples, a total of 229 strains were isolated among *E. coli* with 89.5%, *Klebsiella* sp. 8.7% (*K. pneumoniae* subsp. *Pneumoniae* 8.3% and *K. oxytoca* 0.4%), *Enterobacter aerogenes* 1.3% and *Raoultella ornithinolytica* 0.4%. 35.7% of the animals sampled were positive for the ESBL phenotype, 25% being positive for *E. coli*, 7.1% positive for *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ESBL and 3.5% positive for both agents. It was not detected virulent genes in any of the isolates. Nonhuman primates from the New World in semi-captivity represent a reservoir of ESBL enterobacteria

**Keywords:** *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, extended spectrum betalactamase, non-human primates.

# INTRODUCCIÓN

Los enteropatógenos son bacterias que, bajo ciertas circunstancias, pueden producir enfermedad a nivel del sistema gastrointestinal. La *Escherichia* es un género de enterobacteria Gram negativa que existe sola o en pares, anaerobia facultativa con un tipo de metabolismo fermentador. La especie *E. coli* es reconocida como una de las principales no sólo por su alta prevalencia, sino por la capacidad de generar resistencia a diferentes antimicrobianos (Aguilar, 2015).

La *E. coli* además es uno de los agentes diarreagénicos que se trasmite por el consumo de agua y alimentos contaminados o mal cocidos. Las cepas causantes de diarrea se han agrupado en seis patotipos, según sus propiedades de virulencia: enteropatógena (EPEC), enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), con adherencia difusa (DAEC) y enteroagregativa (EAEC) (Farfán *et al.*, 2016). Algunas cepas de cuadros diarreicos son capaces de sintetizar citotoxinas de la familia de las Shigatoxinas, denominada *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC), mediada por la presencia de genes de bacteriófagos integrados al cromosoma bacteriano, como son el *stx1* y *stx2* (Vivanco, 2011).

El patotipo EHEC es un subgrupo dentro de STEC que se diferencia por la presencia del gen *eae*, responsable de codificar un factor de adhesión, una proteína de membrana externa, denominada intimina. Se describe que EHEC son *eae* (+), mientras que STEC pueden o no ser portadoras de este gen. Además, la STEC puede tener factores de virulencia putativos accesorios, como la hemolisina enterohemorrágica (codificada por enterohemolisina *hlyA*), responsable del daño que se produce en el enterocito (Blanco *et al.*, 2004; Vivanco, 2011).

Entre todos los patotipos, la STEC es importante debido a su capacidad de producir infecciones zoonóticas. Se le atribuyen diversos brotes de enfermedad en humanos asociados a contacto directo con

animales (Marchant, 2013).

Otra de las enterobacterias de importancia clínica son las del género *Klebsiella*, causante de enfermedades infecciosas oportunistas. Son también bacilos Gram negativos cuya capa más externa está formada por una gran cápsula de polisacáridos. En general, se consideran patógenas de baja virulencia y en individuos sanos pueden aislarse del tracto digestivo y vías urinarias, sin que sean nocivas (Contreras, 2014). Las infecciones nosocomiales son causadas principalmente por *K. pneumoniae*, la especie más importante del género desde el punto de vista médico que está asociada a una alta morbilidad y mortalidad. Se estima que el género *Klebsiella* es el responsable del 8% de las infecciones nosocomiales bacterianas en los Estados Unidos y Europa, lo cual la sitúa entre los ocho patógenos infecciosos más importantes en hospitales (Isquierdo, 2003).

Una forma invasiva de *K. pneumoniae*, denominada hipervirulenta y que presenta típicamente un fenotipo hiper mucoviscoso (HMV), ha surgido en las últimas dos décadas. Se han descrito componentes capsulares distintos y una mayor cantidad de material capsular en *K. pneumoniae* HMV. Las cepas de HMV se han asociado con los serotipos K1 – K6 en humanos, primates no humanos y mamíferos marinos. Los aislados de HMV están relacionados con varios genes de virulencia, incluidos *rmpA* (regulador del fenotipo mucoide) y *magA* (asociado a mucoviscosidad). El gen *magA* codifica una proteína de membrana externa de 43 kD, mientras que el gen *rmpA* es un activador transcripcional de la biosíntesis de ácido colánico (Soto *et al.*, 2016).

Los problemas asociados con el desarrollo y la propagación de la resistencia a los antibióticos en la práctica clínica han ido en aumento y actualmente se consideran una amenaza importante para la salud pública a nivel mundial. Las bacterias, sobre todo entéricas, vienen evolucionando y adaptándose a situaciones adversas, lo que puede contribuir al desarrollo de infecciones graves (Ahmed *et al.*, 2007; García, 2012). Su incremento por la presión selectiva que representa la utilización de antibióticos a gran escala, sobre todo en hospitales, ha permitido la diseminación de cepas con mecanismos de resistencia que reduce las posibilidades de tratamiento eficaz, prolonga el tiempo de tratamiento u hospitalización y obliga a utilizar medicamentos costosos, aumentando el riesgo de diseminación (Fariña, 2016).

El grupo de bacterias ampliamente difundidas que han incrementado notablemente su resistencia son los bacilos Gram negativos, especialmente por mecanismos que se distribuyen con facilidad, como la producción de enzimas de tipo betalactamasas. Estas son de varios tipos, las de espectro amplio tienen la capacidad de hidrolizar aminopenicilinas, carboxipenicilinas y cefalosporinas de primera generación, mientras que las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) inactivan a aquellas cefalosporinas de tercera e incluso de cuarta generación (Fariña, 2016). Los antibióticos betalactámicos tienen en común su estructura molecular con un anillo betalactámico, el cual es responsable en gran parte de su acción antimicrobiana. Las betalactamasas por tanto rompen este anillo e inactivan estos antibióticos. Esto es posible gracias a los genes que codifican estas enzimas, que pueden encontrarse en el cromosoma bacteriano o plásmidos, lo cual permite su fácil transferencia, representando un reto para el control de las infecciones (Tafur *et al.*, 2008; Amado *et al.*, 2014).

En la actualidad la resistencia antimicrobiana mediante la producción de BLEE es la más común y de importancia en salud pública. Los microorganismos asociados más frecuentes y de mayor relevancia clínica son *K. pneumoniae* y *E. coli*. Su prevalencia es variable en las diferentes regiones del mundo, siendo América Latina la zona con mayores aislamientos a partir de infecciones humanas con una frecuencia de 44% en *K. pneumoniae* y 13.5% en *E. coli* (Amado *et al.*, 2014; Tejada *et al.*, 2015). Los pacientes con infecciones graves por cepas BLEE tratados con antimicrobianos frente a los que poseen resistencia de alto nivel tienen mal pronóstico, con una mortalidad elevada superior al 30% y siendo en algunos casos hasta del 100% (Sánchez, 2004). En Perú, las infecciones por estas bacterias han ido en un aumento progresivo, siendo las del tipo BLEE asociadas a una mayor mortalidad (Valdez, 2017).

La detección de bacterias productoras de BLEE en muestras de origen animal tuvo lugar en el año 2000 y hacía referencia a una cepa de *E. coli* del tipo SHV-12, aislada en 1998 en España en un perro enfermo. A partir de esta fecha, el número de publicaciones que refieren la detección de este tipo de cepas ha ido en incremento, incluyendo a partir de animales destinados al consumo humano, animales de compañía e incluso silvestres (Torres y Zarazaga, 2007).

En cuanto a los animales silvestres, su proximidad en determinadas circunstancias a los seres humanos y animales domésticos juega un papel importante en el intercambio de patógenos, creándose un potencial reservorio ambiental adicional de bacterias resistentes a los antibióticos (Mora y Viso, 2017).

Se han reportado algunos estudios de aislamiento de *E. coli* del tipo BLEE en animales silvestres, uno de ellos en primates no humanos. En Portugal, a partir de muestras fecales de animales silvestres de parques naturales, se halló una frecuencia del 16% de *E. coli* BLEE (Costa *et al.*, 2006). En República Checa, en el 2013, se reportó una frecuencia del 31% de animales portadores también de *E. coli* BLEE (Dobiasova *et al.*, 2013). En España, durante el 2014 y 2015, a partir de mamíferos silvestres, entre zorros y jabalíes, el 10.9% se reportaron como portadores de similar fenotipo (Viso, 2017). Por último, en el 2009 en China se reportó una prevalencia del 32% para *E. coli* productora de BLEE en primates no humanos (Wang *et al.*, 2012).

En cuanto a factores de virulencia, en heces de primates no humanos en Brasil se encontró la ausencia de los genes *stx1* y *stx2*, pero para el gen *eae* fue positivo en el 27% animales aparentemente sanos y el 47% animales con diarrea y / o enteritis. Los aislados de *E. coli* positivos al gen *eae* recuperados de primates no humanos demuestran tener atributos asociados a la virulencia similares con las EPEC implicadas en enfermedades humanas (Carvalho *et al.*, 2003).

Si bien hasta la fecha no se han reportado cepas BLEE de *Klebsiella* en animales silvestres, se sabe que la especie *K. pneumoniae* está presente en primates no humanos del Viejo Mundo y Neotropicales, hallándose tanto en la microbiota oral y fecal, sin producir enfermedad clínica, como en individuos enfermos. Las enfermedades que puede ocasionar esta bacteria se asocian a neumonía, meningitis, peritonitis, cistitis, abscesos multisistémicos y septicemia (Quevedo y Lescano, 2014). En un estudio donde se realizaron hisopados a primates no humanos en la isla de San Cristóbal en el Caribe, el 40% de los animales cautivos y el 20% de los animales capturados en el medio silvestre fueron positivos para *K. pneumoniae* y el 4% de primates no humanos capturados en vida libre presentaron *K. oxytoca*. Además, uno de los primates no humano de vida silvestre estaba infectado con una cepa de *K. pneumoniae* hipermucoide *rmpA* positiva (Whitehouse *et al.*, 2010).



Por lo anteriormente expuesto, el objetivo del presente estudio fue detectar la presencia de enterobacterias productoras de BLEE y del patotipo *E. coli* STEC y *K. pneumoniae* hipermucoviscoide en primates no humanos del Nuevo mundo albergados en centros de rescate en Loreto, Perú.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### a. Diseño del Estudio

Se realizó un estudio transversal del tipo descriptivo.

### b. Lugar de Estudio

La toma de muestras fue realizada en el Centro de Conservación Pilpintuwasi y en el Centro de Rescate la Isla de los Monos, ubicados en el distrito de Punchana e Indiana, respectivamente, ambos ubicados en la Provincia de Maynas, departamento de Loreto, Perú. El procesamiento y análisis de las muestras se realizó en el Laboratorio de Inocuidad Alimentaria de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FAVEZ) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), Lima, Perú.

### c. Población de Estudio

La población del estudio estuvo constituida por primates no humanos del nuevo mundo en semi-libertad, pertenecientes a las especies: *Cacajao calvus* del Centro de Conservación de Pilpintuwasi y *Ateles belzebuth*, *Lagothrix lagotricha*, *Pithecia* sp. y *Callicebus oenanthe* del Centro de Rescate de la Isla de los Monos.

### d. Tamaño de muestra

En base a una población total de 41 individuos registrado entre ambos centros, se utilizó la fórmula para detectar una enfermedad o prevalencia límite, tomando un nivel de confianza del 95% y en base al estudio previo según Wang *et al.* (2012) se utilizó una prevalencia mínima del 32% de animales portadores de bacterias productoras de BLEE. El resultado obtenido fue de 8 individuos como mínimo para muestrear. Considerando los criterios de inclusión y exclusión, se muestreó un total de 28 animales entre ambos centros.

#### **e. Criterio de inclusión y exclusión**

Se incluyó en el estudio todos los animales que pudieron ser contenidos y capturados (considerando el estrés prolongado o posibles lesiones) durante el control sanitario de rutina anual realizado por cada Centro. No se hizo distinción de género, edad, ni condición clínica.

#### **f. Recolección de Información**

Cada animal seleccionado para el muestreo fue identificado con un código para el registro de datos. Se recolectó información sobre especie, edad, sexo, peso (Anexo1).

#### **g. Consideraciones éticas**

El presente estudio fue evaluado y aprobado (Constancia 009-01-20) por el Comité Institucional de Ética para el uso de Animales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

#### **h. Toma de Muestras**

Las muestras fueron recolectadas durante el control sanitario realizado por ambos Centros durante el 2019. Se capturó a los animales con la ayuda de los cuidadores y se los inmovilizó con anestésicos, bajo la supervisión del médico veterinario a cargo de ambos Centros y un especialista en fauna silvestre.

Se procedió a limpiar la región perineal con alcohol de 70° e inmediatamente después se introdujo en el recto un hisopo estéril, que se guardó en un medio de transporte Amies para ser almacenado en una caja isotérmica con 2 bolsas de gel refrigerante, que, posteriormente fueron mantenidos en refrigeración a 4°C. Las 28 muestras fueron recolectadas en el transcurso de 5 días y finalmente fueron transportadas hacia el laboratorio para su procesamiento bajo las mismas condiciones, a los 7 días después de la primera toma.

#### **i. Aislamiento de enterobacterias**

Considerando el tiempo transcurrido del muestreo, cada muestra fue pre – enriquecida en caldo de cultivo Brain Heart Infusion (HIMEDIA, India) a 37°C de un día para otro. Para el aislamiento, cada

muestra individual en caldo se sembró mediante la técnica de agotamiento en un medio MacConkey (Oxoid, EEUU), incubándose seguidamente a 37°C por 24 horas. Luego se seleccionó un mínimo de 5 colonias al azar por placa que tuvieran las características de estar aisladas, fermentar lactosa y ser de aspecto seco o mucoide.

Una vez que las colonias se aislaron completamente en una segunda siembra bajo las mismas condiciones, cada una fue identificada mediante pruebas bioquímicas básicas como: urea, SIM (sulfato-indol-motilidad) y citrato de Simmons. Aquellas colonias que no pudieron ser confirmadas mediante bioquímica básica, fueron identificadas mediante un kit comercial de bioquímica semiautomatizada (API 20E, bioMérieux, Francia), además de la prueba de rojo metilo (Fernández et al., 2010). Seguidamente se seleccionaron solamente aquellas cepas confirmadas como *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp. y *E. coli*, para la posterior determinación del perfil BLEE (Winn et al., 2008).

#### **j. Determinación del fenotipo BLEE**

Para determinar si las cepas seleccionadas eran presuntivamente productoras de BLEE, se sembraron en un agar cromogénico HiCrome® ESBL (HiMedia, India) suplementado con Ceftazidima (1.5 mg), Cefotaxima (1.5 mg), Ceftriazona (1 mg), Aztreonam (1 mg) y Fluconazol (5 mg). Un resultado positivo se consideró cuando hubo crecimiento de la cepa además de una coloración verdosa (*Klebsiella* sp. o *Enterobacter* sp.) o rosada (*E. coli*).

Para la confirmación de la producción de BLEE, se realizó la prueba de difusión en agar con disco combinado con cefalosporinas (CLSI M100, 2018). Se preparó una concentración de McFarland de 0.5 para cada cepa (positiva al agar cromogénico ESBL), con la ayuda de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 625 nm. Posteriormente se sembró con un hisopo en tres direcciones en agar Mueller-Hinton (HiMedia, India), se dejó a temperatura ambiente por 5 minutos y se colocaron para cepas de *E. coli* y *Klebsiella* sp. los siguientes discos de antibióticos: Cefotaxima (CTX, 30 mcg), Cefotaxima más Ac. Clavulánico (CTL, 30/10 mcg), Ceftazidima (CAZ, 30 mcg) y Ceftazidima más Ac. Clavulánico (CAL, 30/10 mcg). Mientras que para *Enterobacter*, se usó Cefepima (FEP, 30 mcg) y Cefepima más Ac. Clavulánico (FEL, 30/10 mcg), en lugar de

Cefotaxima. Cada antibiótico se colocó a 30 mm de su combinación con Ac. Clavulánico en diagonal, formando una X entre los 4 discos. Una cepa fue confirmada como BLEE cuando el halo de inhibición del disco de cefalosporina más el Ac. Clavulánico fue 5 mm respecto al disco de cefalosporina sola. Se incluyó además un control positivo de *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC 700603 productora de BLEE y un control negativo de *E. coli* ATCC 25921 susceptible a antibióticos, ambas cepas pertenecientes al Laboratorio de Nutrición e Inocuidad Alimentaria de FAVEZ-UPCH.

#### **k. Extracción de DNA genómico**

Todas las cepas confirmadas como *K. pneumoniae*. y *E. coli* fueron dispuestas para realizar la extracción de DNA mediante choque térmico, siguiendo el protocolo descrito por Santos *et al.* (2001). Para ello, cada cepa se resembró en medio de cultivo Triptona Soya Agar (Oxoid, Inglaterra), a 37 °C por 24 horas. Luego, con un asa de siembra estéril se cogieron 2 colonias grandes y se diluyó en 1 ml de agua destilada estéril en microtubos de 1.5 ml. Luego se colocó en baño María a 90°C por 10 minutos e inmediatamente después se pasó a congelar a – 20°C por otros 10 min. Finalmente se centrifugó a 13000 rpm por 5 min y se colocó el sobrenadante en un nuevo microtubo. Luego, la cantidad de DNA extraído se midió con un equipo de espectrofotometría NanoDrop (The Thermo Scientific™, EE. UU.).

#### **l. Caracterización molecular de patotipos de *E. coli***

Para las cepas de *E. coli* aisladas se evaluó la presencia de los patotipos STEC y EHEC. Se siguió el protocolo de PCR Multiplex y secuencias de cebadores descritas previamente (Paton A. y Paton J., 1998). Se incluyó además como control positivo DNA de una cepa de *E. coli* O157:H7 perteneciente al Laboratorio de Nutrición e Inocuidad Alimentaria de FAVEZ-UPCH.

Para la preparación del Master Mix de la reacción de PCR se incluyó 2 µl de DNA de cada cepa, con una concentración promedio de 43.1 ng/µl, en una reacción con un volumen final de 20 µl, el cual contenía 10X PCR Buffer, 2 mM de MgSO<sub>4</sub>, 0.25 µM de cada cebador (Cuadro 1), 0.2 mM de

dNTP Mix (QIAGEN, Alemania) y 1.5 U /50 µl de Taq DNA Polimerasa (Applied Biological Materials Inc., Canadá), completando el volumen con agua grado molecular.

Cuadro 1. Secuencia de cebadores para la detección de los genes *stx1*, *stx2*, *eae* e *hlyA* en *E. coli*

Secuencia (5'-3')	Gen	Tamaño (bp)
<b>F: ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC</b>	<i>stx1</i>	180
<b>R: AGAACGCCCACTGAGATCATC</b>		
<b>F: GGCAGTGTCTGAAACTGCTCC</b>	<i>stx2</i>	255
<b>R: TCGCCAGTTATCTGACATTCTG</b>		
<b>F: GACCCGGCACAAGCATAAGC</b>	<i>Eae</i>	384
<b>R: CCACCTGCAGCAACAAGAGG</b>		
<b>F: GCATCATCAAGCGTACGTTCC</b>	<i>hlyA</i>	534
<b>R: AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT</b>		

*Stx1*, *Stx2*: genes de toxina Shiga, *eae*: gen de intimina; *hlyA*: gen de enterohemolisina; F: forward, R: reverse, bp, pares de bases.

Para la amplificación por PCR se utilizó un termociclador (PTC 100TM, Programmable Thermal Controller, EE.UU), que se programó con las siguientes condiciones: temperatura inicial de 95 °C por 4 minutos, seguido de 10 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 minuto, anillamiento a 65°C por 2 minutos, que posteriormente se fue reduciendo hacia 60°C por 2 minutos para el ciclo 15, y extensión a 72°C por 1.5 minutos, que fue aumentando a 2.5 minutos a partir del ciclo 25 al 35, terminando con una extensión final a 72°C por 10 minutos.

Una vez obtenidos los productos post-PCR, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio (13 mg/ml), en un buffer TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1X. Se mezcló 9 µl de cada producto con 3 µl del buffer de Gel Loading Buffer (Sigma-Aldrich, EE.UU) y posteriormente se colocó en cada uno de los pocillos del gel. Además, se incluyó un marcador comercial de tamaño molecular de 100 pares de bases (TrackIt TM 100 bp DNA Ladder, Life technologies, EE.UU), un blanco (Master Mix sin DNA) y DNA control positivo que contenía todos

los genes (*E. coli* O157:H7). El gel de agarosa con los productos fue sometido a 80 V, 120 mA por 70 minutos y luego visualizado bajo luz UV en un transiluminador.

### **m. Detección molecular de *K. pneumoniae* hipermucoide**

Para las muestras de *K. pneumoniae*., se evaluó la presencia de los factores de hipermucoviscosidad, siguiendo el protocolo y cebadores de Huang *et al.* (2015) en el cual se identificaron los genes *magA* y *rmpA*. Se utilizó como control positivo DNA de una cepa de *K. pneumoniae* H1134, donada por la Dra. Carmen Ardanuy del Institut –Catalá de la Salut, Barcelona, España.

En cada Master Mix, para cada gen, en reacciones por separado, se incluyó 2 µl de DNA cada cepa, con una concentración promedio de 67.6 ng/µl, en una reacción con un volumen final de 20 µl, el cual contenía 2 µl de 10X PCR Buffer, 0.5 y 0.4 µM de cebador (Cuadro 2), 0.2 mM dNTP Mix, 2.5 mM y 2 mM de MgCl y 5U /µl de Taq DNA Polimerasa, completando el volumen con agua grado molecular.

Cuadro 2. Secuencia de cebadores para la detección de los genes *magA* y *rmpA* en *K. pneumoniae*

<b>Secuencia (5'-3')</b>	<b>Gen</b>	<b>Tamaño (bp)</b>
<b>F: GGTGCTCTTTACATCATTGC</b>	<i>magA</i>	1282
<b>R: GCAATGGCCATTTGCGTTAG</b>		
<b>F: ACTGGGCTACCTCTGCTTCA</b>	<i>rmpA</i>	535
<b>R: CTTGCATGAGCCATCTTTCA</b>		

*magA*: gen asociado a mucoviscosidad; *rmpA*: gen regulador del fenotipo mucoide; F: forward, R: reverse, bp, pares de bases.

Para el Master Mix de *magA*, se programó el termociclador con las siguientes condiciones: inicialmente se colocó a una temperatura inicial a 94 °C por 4 minutos, seguido de 30 ciclos que consistían en desnaturalización a 94 °C por 1 minuto, anillamiento a 55°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto, y, para terminar, una extensión final a 72°C por 5 minutos, y para el Master Mix de *rmpA*, inicialmente se colocó a una temperatura inicial a 94 °C por 4 minutos, seguido de

30 ciclos que consistían en desnaturalización a 94 °C por 45 segundos, anillamiento a 52°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto, y, para terminar, una extensión final a 72°C por 5 minutos,

Una vez obtenidos los productos post-PCR, fueron sometidos a electroforesis bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Además, se incluyó un marcador comercial de tamaño molecular de 100 pares de bases (Invitrogen™ 100 bp DNA Ladder, EE.UU), un blanco (MasterMix sin DNA) y un control positivo que portaba ambos genes, DNA de *K. pneumoniae* H1134.

#### **n. Análisis de resultados**

Para analizar la información descriptiva se utilizó tablas de frecuencia para la presentación de los resultados de acuerdo a la variable especie y a la proporción de monos positivos a la producción de BLEE en cepas de *E. coli* y *Klebsiella*. Así también para la presentación de los genes encontrados al PCR para *E. coli* y *Klebsiella* sp.



## RESULTADOS

Se muestrearon un total de 28 primates no humanos de cinco especies: 10 (*Cacajao calvus*) fueron del Centro de Conservación “Pilpintuwasi” y 18 (*Ateles belzebuth*, *Lagothrix lagotricha*, *Pithecia sp.* y *Callicebus oenanthe*) del Centro de Rescate “La Isla de los Monos”, con un rango de edad de 5 meses a 12 años y un promedio de 4 años y 6 meses (Anexo 1).

De los 28 animales evaluados, el 35.7% resultó ser portador de cepas productoras de BLEE. El 25% fue portador de *E. coli*, el 7.1% de *Klebsiella sp.*, mientras que el 3.5% resultó portador para ambos tipos de bacterias BLEE (Cuadro 3). Ninguno de los animales muestreados presentó signos clínicos evidentes.

Cuadro 3. Distribución de especies de primate no humano portadores de enterobacterias BLEE

Especie de primates no humano	Número de animales	Número de animales portadores BLEE			
		<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella sp.</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. coli</i> y <i>Klebsiella sp.</i>
<i>C. calvus</i>	10	4	1	-	1
<i>A. belzebuth</i>	4	1	1	-	-
<i>L. lagotricha</i>	10	-	-	-	-
<i>Pithecia sp.</i>	3	1	-	-	-
<i>C. oenanthe</i>	1	1	-	-	-
<b>Total</b>	<b>28</b>	<b>7</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>1</b>

Se logró aislar un total de 229 cepas de enterobacterias fermentadoras de lactosa, identificándose como *E. coli* el 89.5%, *Klebsiella sp.* 8.7% (*K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* 8.3% y *K. oxytoca* 0.4%), *Enterobacter aerogenes* 1.3% y *Raoultella ornithinolytica* 0.4% (Cuadro 4).

Cuadro 4. Distribución de enterobacterias aisladas según especie de primate no humano

Especie de primate	Número de muestras	Número de cepas aisladas			
		<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>E. aerogenes</i>	<i>R. ornithinolytica</i>
<i>C. calvus</i>	10	75	9	-	1
<i>A. belzebuth</i>	4	22	7	1	-
<i>L.lagoiricha</i>	10	77	2	-	-
<i>Pithecia</i> sp.	3	23	2	2	-
<i>C. oenanthe</i>	1	8	-	-	-
<b>Total</b>	<b>28</b>	<b>205</b>	<b>20</b>	<b>3</b>	<b>1</b>

A partir del agar cromogénico HiCrome® ESBL, todas las cepas aisladas crecieron con una coloración rosada o verdosa. La prueba de disco combinado para el fenotipo productor de BLEE confirmó que un 7.8% (18/229) del total de cepas fueron positivas; 3.9% (9/229) de *E. coli* y 3.9% (9/229) de *Klebsiella* sp. Del total de cepas de *E. coli* aisladas un 4.3% (9/205) fue positivo y entre las cepas *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* un 45% (9/20) resultó también positivo para BLEE.

Ninguno de los genes de virulencia *eae*, *hly*, *stx1* y *stx2*, de los patotipos STEC y EPEC para *E. coli*, o *magA* y *rmpA* para *Klebsiella* sp. hipermucoide fueron detectados en las cepas aisladas (Anexo 2 y 3).

## DISCUSIÓN

En el presente estudio se logró aislar los géneros de *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Raoultella*, en primates no humanos, aparentemente sanos, muestreados en los dos centros de rescate en el departamento de Loreto.

En el estudio realizado por Sanchez *et al.*, la *E. coli* fue uno de los agentes principales involucrados en diarrea en cría de primates en cautiverio, donde además se identificaron 7 serotipos de EPEC, los cuales tenían relevancia por su potencial zoonótico. Asimismo, mencionan un reporte de colitis ulcerativa en primates causada por cepas EPEC (Sánchez *et al.*, 2015), además que la presencia del gen *eae* en primates no humanos, tanto en animales sanos como en animales con diarrea y/o enteritis, puede resultar en mortalidad (Carvalho *et al.*, 2003). Lo que demuestra que, aunque el animal esté sano puede ser portador de patotipos que bajo ciertas condiciones podría convertirse en patógeno además de transmitirse.

Similar al presente estudio, Carvalho *et al.* (2003) no detectaron la presencia de los genes *stx1* y *stx2* en cepas de *E. coli*. Se han realizado estudios con modelos animales (entre ellos primates no humanos) que imitan los síntomas clínicos de STEC en humanos, para revelar la base molecular de los trastornos del sistema nervioso central inducidos por *stx*. Las respuestas innatas y celulares del huésped excesivas o incontroladas desencadenadas por *stx*, pueden provocar la sensibilización de las células al daño mediado por toxinas lo que conduciría a inmunopatologías (Lee y Tesh, 2019). Es por ello la importancia de realizar estudios de vigilancia molecular de genes virulentos en mención en cepas de *E. coli* comensales, ya que esto significa un problema de salud pública, particularmente en áreas laborales con contacto estrecho con animales o con descarga de aguas tratadas

Clínicamente, en primates no humanos, *K. pneumoniae* se asocia con peritonitis, septicemia, neumonía y meningitis (Burke *et al.*, 2009). La enfermedad se asocia frecuentemente con infección concurrente

de *Pasteurella multocida* y afecta a animales debilitados por estrés, siendo los lactantes y juveniles altamente susceptibles (Terio *et al.*, 2018). En humanos, las cepas invasivas de *K. pneumoniae* causantes de mortalidad han sido asociadas a la presencia del fenotipo de HMV (Quevedo y Lescano, 2014). Además, se han observado múltiples abscesos abdominales después de la infección con este tipo de cepa en monos verdes africanos (*Chlorocebus sabaeus*) (Whitehouse *et al.*, 2010; Terio *et al.*, 2018). En el presente estudio, en el 21% de los animales se halló al menos una cepa de *K. pneumoniae*, y aunque la mayoría eran aún juveniles, ninguno presentó algún síntoma relacionado ni abscesos. Esto puede ser debido a, como ya se mencionó con anterioridad, la capacidad oportunista, por lo que mientras el animal se encuentre en buenas condiciones, no presentaría cuadros de infección.

En un estudio realizado en Iquitos se aislaron *K. oxytoca* y *E. aerogenes*, además de *E. coli* en primates no humanos con cuadros de diarrea (Sanchez *et al.*, 2015). *E. aerogenes* es considerado un patógeno oportunista que rara vez causa enfermedades en individuos sanos. Como oportunista, se ha reportado como patógeno nosocomial en pacientes humanos en cuidados intensivos, especialmente aquellos que reciben ventilación mecánica. (Sanders W. y Sanders C., 1997; Davin-Regli y Pagès, 2015).

Asimismo, *Raoutella* sp. ha tenido mayor relevancia en los últimos años, en especial las especies *R. planticola* y *R. ornithinolytica*; sin embargo, no se le ha dado la debida atención a infecciones asociadas por la dificultad que presenta su identificación utilizando métodos convencionales ya que presenta características similares a *Klebsiella* sp. Esto resultaría un problema para un mejor entendimiento de su epidemiología y comportamiento en el entorno intrahospitalario (Castillo *et al.*, 2018). Aun así, en el estudio de Silva *et al.* (2019) se identificaron ambas especies de *Raoutella* sp. en primates no humanos en vida libre en Brasil, a partir de hisopados orales y rectales. En el presente estudio, aunque al inicio se tuvo problemas en su identificación, con la ayuda de un kit comercial de bioquímica semiautomatizada se identificó a *R. ornithinolytica* en uno de los primates no humanos muestreados. La baja frecuencia podría representar un papel no importante, sumado a que no existen reportes de su implicación en cuadros clínicos en primates no humanos.

Por otro lado, sobre resistencia antibacteriana, en el Perú un estudio halló enterobacterias con resistencia antibiótica en primates no humanos de otro Centro de Rescate (Ikama Perú), ubicado en el departamento

de Loreto. Las bacterias con mayor porcentaje de aislamiento fueron *E. coli* 42.5% y *Serratia* 27.4%; donde los aislados mostraron mayor frecuencia de resistencia a cefalotina (46.2%), amoxicilina -ácido clavulánico (31.1%), tobramicina (30.2%) y tetraciclina (24.5%) (Medina *et al.*, 2017).

La producción de BLEE, especialmente en Enterobacteriae, es uno de los mecanismos de resistencia antibiótica más importante que ha ido en aumento en los últimos años, no solo en humanos, sino también en animales. El uso indiscriminado de antibióticos, unido a la gran movilización que se da en las poblaciones humanas, facilita la diseminación de bacterias multi-resistentes, en especial las productoras de BLEE (Valdez, 2017).

La diseminación de *E. coli* BLEE es rápida y extensa. Aunque no hay una explicación bien justificada, se sospecha de diferentes factores que pueden participar en su adquisición a través de la comida, transmisión de portadores fecales de persona a persona y diseminación de microorganismos en el ambiente, a través de animales domésticos y silvestres (Aguilar, 2015).

De las 5 especies de primates que fueron muestreados en el presente estudio, 4 de ellos fueron portadores de *E. coli* BLEE, siendo el grupo de *C. calvus* el de mayor frecuencia, seguido de los *A. belzebuth*, *Pithecia* sp. y *Callicebus* sp. En el caso de los *C. calvus* fueron muestreados en mayor cantidad, lo que podría haber influido en encontrar mayor frecuencia de cepas BLEE en este grupo. Sin embargo, en el grupo de *L. lagotricha* que contaba con la misma cantidad de individuos, no se halló el estado de portador a cepas BLEE en ningún individuo. Si bien el primer grupo eran animales adultos y el segundo presentó en su mayoría animales juveniles, no hay reportes que confirmen que haya una predisposición según la edad. No obstante, la probabilidad de presentar estas bacterias puede ser mayor en adultos debido a que pudieron estar más tiempo expuestos a personas, animales o ambientes contaminados.

Según la bibliografía consultada hasta la fecha, el presente estudio sería el primero en donde se detecta *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* productora de BLEE en primates no humanos, con una frecuencia de 10.6 %. Wang *et al.* (2012), en China, encontró solamente *E. coli* BLEE en primates no humanos con una prevalencia de 32%, similar a lo encontrado en el presente estudio, aunque en menor porcentaje para *E. coli*. Sin embargo, a pesar de que ambos estudios fueron en primates no humanos, no pueden ser

del todo comparados, ya que difieren en el tamaño de la población y de muestra, tipo de hábitat (cautiverio o semi libertad), entre otros. Siendo la mayor diferencia el tamaño de muestra, ya que Wang et al. (2012) muestreó a un total de 206 primates en 6 zoológicos de China, mientras que en este estudio se muestreó a 28 animales en 2 centros de rescate.

Las posibles fuentes para la rápida diseminación de bacterias productoras de BLEE incluyen animales, el medio ambiente, la importación a través de viajes y la transmisión directa dentro de los hogares y la comunidad (Doi *et al.*, 2017). Por ello el tipo de hábitat y alimentación son factores importantes de considerar para la presencia de BLEE, los zoológicos cuentan con ambientes especialmente acondicionados para el mantenimiento y exhibición de especímenes, además que los animales deben tener una alimentación apropiada (OSINFOR, 2020), mientras que en los centros de rescate que se visitó, los animales se encontraban semi libertad, y además de la dieta que recibían por parte de cada centro, podían consumir hojas o frutos de la zona, además de estar en contacto con animales de otras especies incluyendo domésticos o humanos.

Otro factor importante a considerar es que en la mayoría de los zoológicos se tiene conocimiento de la procedencia de los animales ya que nacen en cautiverio (son comprados o provienen de otro zoológico), habiendo excepciones que al igual que en los Centros de Rescate, reciben animales que fueron decomisados. Una limitante del estudio fue que algunos de los animales fueron decomisados por lo que no se conoció la historia clínica o antecedentes y se debe considerar que en la mayoría de los decomisos se encuentran hacinados los animales muertos, enfermos y/o desnutridos.

Por otro lado, como se sabe las zoonosis se transmiten de los animales al hombre, como es el caso de la salmonelosis o shigelosis. Sin embargo, también puede ocurrir antropozoonosis, en enfermedades como hepatitis, herpes simple o sarampión. También existe el caso en que la transmisión es por zoonosis o antropozoonosis, como la tuberculosis. Esto puede afectar a los primates no humanos acentuado por el tráfico y tenencia ilegal de especies silvestres, que a su vez pueden retransmitir en ciertas circunstancias una infección al hombre (Acha y Szyfres, 2001; Terio *et al.*, 2018). Se considera que los animales, particularmente silvestres, son la fuente del 70% de todas las infecciones emergentes a nivel mundial (Kuiken *et al.*, 2005). Un informe identificó más de 25 brotes de enfermedades infecciosas en humanos

durante un período de 10 años (1990 a 2000) asociados con visitas a exhibiciones de animales (Ahmed et al., 2007). Por ello, en el presente estudio se realizó un análisis molecular a todas las cepas, tanto *E. coli* como *Klebsiella* sp., a fin de encontrar genes específicos de factores de virulencia. Debido al potencial zoonótico que representarían cepas patogénicas de animales y el impacto que podría representar en la salud pública, es relevante realizar estudios en Centros de Rescate que reciben visitas diarias de turistas internacionales y nacionales que podrían entrar en contacto con estos animales, además de los voluntarios y cuidadores. Debiendo implementarse un protocolo de bioseguridad mayor como prevención y una correcta antibioterapia en cuadros clínicos en base a los resultados del presente estudio.

*E. coli* STEC es zoonótica debido a su implicancia en diarrea en humanos, por lo que se han realizado diversos estudios en animales a fin de detectar los reservorios de los diferentes patotipos (Marchant ,2013). En el estudio de Marchant (2013) se analizaron 326 animales de diferentes especies, de los cuales 53 eran primates no humanos. Aunque se hallaron animales portadores de *E. coli* STEC, ninguno de los primates del estudio resultó positivo. Otro estudio resultó negativo en la búsqueda de genes de virulencia para STEC en 56 primates no humanos entre sanos y enfermos (Carvalho et al., 2003). En el presente estudio, ninguno de los aislados presentó genes asociados a STEC. Sin embargo, a pesar de los resultados en ambos estudios, no se puede descartar que otros primates no humanos sean portadores, ya que el tamaño de muestra no fue representativo para otras especies y otros lugares.

Por otra parte, los fenotipos emergentes de HMV de *K. pneumoniae* se han asociado con una mayor invasividad y patogenicidad en primates (Soto et al., 2016). En un grupo de *Chlorocebus sabaues* en Estados Unidos, se observó múltiples abscesos abdominales después de la infección con cepas de HMV. Esta infección está asociada con cuadros severos como peritonitis y adherencias mesentéricas que conducen a un absceso multisistémico, el cual puede resultar en un difícil tratamiento farmacológico (Terio et al., 2018). Además, se reportó un caso en un *Macaca fascicularis* (transportado de Cambodia a Japón), que fue diagnosticado con una infección septicémica con meningoencefalitis supurativa difusa severa causada por *K. pneumoniae*, donde se encontró el gen *k2A* y *rmpA* pero fue negativo para el gen *magA*, sumado a la evidencia de resistencia a la bencilpenicilina, ampicilina, colistina, lincomicina y

clindamicina (Kasuya *et al.*, 2017). En humanos, el síndrome de absceso hepático por *K. pneumoniae* está caracterizada por absceso hepático primario, bacteriemia y complicaciones metastásicas (abscesos pulmonares, cerebrales, de psoas, osteomielitis, meningitis y endoftalmitis) con elevada mortalidad (10-40%) (Barbeito-Castiñeiras, 2017). Debido a lo expuesto anteriormente, cepas aisladas poseedoras del genotipo HMV, sumado a la posibilidad de que además tenga resistencia antibiótica por producción de BLEE, podrían ocasionar un sinergismo con consecuencias severas. Por lo que es importante el estudio o vigilancia de la epidemiología molecular de estas cepas en el contexto de animales silvestres, considerando el hallazgo de cepas de *K. pneumoniae* con el fenotipo BLEE en el presente estudio. Asimismo, aunque es necesario realizar más investigaciones para determinar el potencial zoonótico del tipo HMV de *K. pneumoniae*, un estudio en leones marinos de California sugiere la posibilidad de que animales de vida silvestre esté adquiriendo infecciones por exposición a humanos o desechos de los mismos (Whitehouse *et al.*, 2010).

En cuanto a los principales mecanismos de resistencia de las enterobacterias productoras de BLEE, la mayoría son codificados por el *gen bla* (TEM, SHV y CTX-M, siendo CTX-M la más frecuente en la actualidad). En el presente estudio si bien se detectó el fenotipo BLEE en las cepas evaluadas, no se pudo determinar a qué familia del *gen bla* pertenecían, lo cual es necesario para tener un mejor entendimiento de la epidemiología molecular de estas bacterias en fauna silvestre. Por ejemplo, según el estudio de Torres y Zarazaga (2007), cuando se comparó los tipos de CTX-M predominantes en bacterias de origen humano en distintos países con los tipos de CTX-M detectados en cepas de origen animal, se evidenció una cierta relación entre la distribución geográfica de cada tipo de CTX-M en las cepas de origen humano y las de origen animal.

Una de las limitantes que se presentó en el presente estudio fue la conservación de las muestras. Se sabe que la sobrevivencia de las bacterias en el medio de transporte depende de varios factores. Estos incluyen el tipo de bacteria, tiempo de transporte, temperatura de conservación, concentración de bacterias en la muestra y formulación del medio de transporte. Aunque algunos microorganismos pueden resistir en el medio de transporte durante tres o más días, es conveniente que la muestra llegue al laboratorio antes



de las 24 horas (LabLinsan, 2012). En el presente estudio, las muestras estuvieron más de 72 horas en el medio de transporte hasta llegar a la ciudad de Lima.

Considerando los hallazgos del presente estudio que demuestran que los animales muestreados pueden ser portadores de cepas BLEE, se recomienda en lo posible el cultivo y la identificación de los organismos bacterianos infecciosos y su evaluación de la sensibilidad a los antibióticos para una terapia efectiva.

Por otra parte, los animales portadores de las cepas productoras de BLEE podrían representar una fuente de transmisión, siendo de importancia para la medicina de la conservación. Además, a pesar de que hay centros de rescate que no permiten el contacto directo entre los turistas con los animales, aún hay algunos que usan como su mayor atractivo la interacción humano-animal, pudiendo causar impacto en la salud pública.

El hallazgo de estas bacterias productoras de BLEE sugiere que se debe tener en consideración la evaluación de animales decomisados, por ello es importante la vigilancia epidemiológica de patógenos tanto en animales silvestres decomisados como en humanos con los que estuvieron en contacto, para así poder entender mejor la dinámica de las enfermedades, y proponer un mejor protocolo de prevención de posibles brotes y de transmisión de infecciones zoonóticas y antropozoonóticas.

## CONCLUSIONES

- ) Las enterobacterias cultivables fermentadoras de lactosa aisladas de heces de primates no humanos correspondieron a *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. aerogenes* y *R. ornithinolytica*.
- ) Las enterobacterias con fenotipo BLEE encontradas correspondieron a *E. coli* y *K. pneumoniae*, con una frecuencia de 7.8% del total de cepas aisladas.
- ) Los primates no humanos del Nuevo Mundo en semi cautiverio portan enterobacterias resistentes a antibióticos, al presentar una frecuencia de más del 30% de bacterias del tipo BLEE.
- ) No se encontró la presencia de *E. coli* STEC o EPEC y *K. pneumoniae* hipermucoide en los primates no humanos de los Centros de Conservación y Rescate evaluados.

## RECOMENDACIONES

- ) Evaluar en otros centros de rescate, tanto en primates no humanos como en otras especies de animales, la frecuencia de cepas productoras de BLEE.
- ) Genotipificar las cepas productoras de BLEE para determinar el tipo de familia (CTX, SHV o TEM) encargado de codificar la producción de betalactamasas de espectro extendido.
- ) Determinar otros fenotipos de resistencia antimicrobiana diferentes BLEE en las cepas aisladas.
- ) Realizar cultivos microbiológicos y antibiogramas antes de instaurar la terapia antibiótica en animales silvestres que presente infecciones del tipo bacteriano.

## LITERATURA CITADA

**Acha, P., & Szyfres, B. 2001.** Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales: Volumen III: Bacteriosis y Micosis. 3rd ed. Washington, D.C: Organizacion Panamericana de la Salud. p xiv.

**Aguilar D.** 2015. E. coli BLEE, la enterobacteria que ha atravesado barreras. Rev Invest Méd Sur, Mexico, 22(2): 57 - 63.

**Ahmed A., Motoi Y., Sato M., Maruyama A., Watanabe H. & et al.** 2007. Zoo Animals as Reservoirs of Gram-Negative Bacteria Harboring Integrons and Antimicrobial Resistance Genes. American Society for Microbiology. 73(20): 6686–6690.

**Amado N., Fajardo H., Ramírez R. & González G.** 2014. Prevalencia de betalactamasas de espectro extendido en bacilos gramnegativos de una institución de salud de Tunja (Colombia) en el año 2013. Salud & Sociedad Uptc., 1(2):54 - 60.

**Barbeito-Castiñeiras G., Ladra M., Domínguez M., Rivero C.** 2017. Afectación multiorgánica por *Klebsiella pneumoniae* serotipo K1. Enferm Infecc Microbiol Clin. 35(5): 321–326.

**Blanco M., Padola N., Kruger A., Sanz M., Blanco J., Gonzáles E. & et al.** 2004. Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. International Microbiology, 7(4): 270.

**Burke R., Whitehouse C., Taylor J. & Selby E.** 2009. Epidemiology of Invasive *Klebsiella pneumoniae* with Hypermucoviscosity Phenotype in a Research Colony of Nonhuman Primates. Comparative Medicine. 59(6): 589–597.

**Castillo A., Florea A., Llaca J., Pérez F. & Casillas N.** 2018. Microbiología del género *Raoultella*, características clínicas y dificultades para su diagnóstico. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 56(4) :486-490.

**Carvalho V., Gyles C., Ziebell K., Ribeiro M., Cataño-Dias J., Sinhorini I. & et al.** 2003. Characterization of Monkey Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Human Typical and Atypical EPEC Serotype Isolates from Neotropical Nonhuman Primates. *Journal Of Clinical Microbiology.* 41(3): 1225–1234.

**Contreras R.** 2014. Infección por *Klebsiella*. La guía de Biología. [internet] [Acceso 9 Mar. 2019]. Disponible en: <https://biologia.laguia2000.com/patologia/infeccion-por-klebsiella>.

**Costa D., Poeta P., Sáenz Y., Vinué L., Rojo-Bezares B., Jouini A. & et al.** 2006. Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum  $\beta$ -lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal. *J Antimicrob Chemother.* 59: 1311-1312.

**Clayton J., Danzeisen J., Trent A., Murphy T. & Johnson T.** 2014. Longitudinal Characterization of *Escherichia coli* in Healthy Captive Non-Human Primates. *Front Vet Sci.* 1(24).

**Davin-Regli A. & Pagès J.** 2015. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Frontiers in Microbiology.* 6 (392).

**Dobiasova H., Dolejska M., Jamborova I., Brhelova E., Blazkova L., Papousek I. & et al.** 2013. Extended spectrum beta-lactamase and fluoroquinolone resistance genes and plasmids among *Escherichia coli* isolates from zoo animals, Czech Republic. *FEMS Microbiology Ecology.* 85: 604–611.

**Doi Y., Lovleva A. & Bonomo R.** 2017. The ecology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in the developed world. *Journal of Travel Medicine.* 24: S44 – S51.

**Farfán A., Ariza S., Vargas F. & Vargas L.** 2016. Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Revista chilena de infectología.* 33(4).

**Fariña N.** 2016. Resistencia bacteriana: un problema de salud pública mundial de difícil solución. Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, 14 (1): 4-5.

**Fernández A., García C., Saéz J., Valdezate S.** 2010. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de Microbiología. Seimc 37 [Internet]. [acceso 3 Nov 2019]. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>

**García C.** 2012. Escherichia coli productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), un problema creciente en nuestros pacientes Resistencia antibiótica en el Perú y América Latina. Acta Médica Peruana, 29(2).

**Huang Y., Li J., Gu D., Fang Y., Chan E., Chen S. & Zhang R.** 2015. Rapid Detection of K1 Hypervirulent Klebsiella pneumoniae by MALDI-TOF MS. Frontiers in Microbiology 6(1435): 1 – 7.

**Isquierdo L.** 2003. Biosíntesis del lipopolisacárido de Klebsiella pneumoniae. Tesis Doctoral. Barcelona: Universidad de Barcelona. 177 p.

**Kasuya K, Takayama K, Bito M, Shimokubo N, Kawashima R & Shibahara T.** 2017. Septicemic invasive Klebsiella pneumoniae infection in a cynomolgus monkey (Macaca fascicularis) with severe diffused suppurative meningoencephalitis. Veterinary Medical Science. 79(7): 1167–1171.

**Kuiken T., Leighton F., Fouchier R., LeDuc J., Peiris J., Schudel A., Stöhr K. & Osterhaus A.** 2005. Pathogen Surveillance in Animals. Science 309(5741):1680-1

**Lee M. & Tesh V.** 2019. Roles of Shiga Toxins in Immunopathology. Toxins 11(212).

**[LabLinsan] Laboratorio Linsan S.A.** 2012. Manual Microdiagnostica. Tercera Parte: Toma de muestras, medios de transporte, medios de cultivo, y pruebas diferenciales. 3ª ed. Chile. 52 p. [Internet] [acceso 8 julio 2020]. Disponible en: [https://www.lablinsan.cl/manual/MANUAL\\_PARTE\\_3.pdf](https://www.lablinsan.cl/manual/MANUAL_PARTE_3.pdf)

**Marchant P.** 2013. Detección de Escherichia coli patógena en mamíferos y aves acuáticas silvestres en cautiverio. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Santiago: Universidad de Chile. 29 p.

**Medina C., Morales S. & Navarrete M. 2017.** Resistencia antibiótica de enterobacterias aisladas de monos (*Ateles*, *Callicebus* y *Lagothrix*) en semicautiverio en un centro de rescate, Perú. *Rev Inv Vet Perú* 28(2): 418 – 425.

**Mora A. & Viso S. 2017.** Estudio de la fauna silvestre como reservorio de cepas de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y del grupo clonal pandémico ST131 en el noroeste de España. Tesis doctoral. Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela.

**[OSINFOR] Organismo de Supervisión de los Recursos Forestales y de Fauna Silvestre. 2020.** Fauna Silvestre en el Perú. Procesos de supervisión, fiscalización y normativa. 35 p.

**Paton A. & Paton J. 1998.** Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb O111*, and *rfb O157*. *J. Clin. Microbiol.* 36(2): 598–602

**Quevedo M. & Lescano J. 2014.** Infección por *Klebsiella pneumoniae* en un mono choro (*Lagothrix lagotricha*) criado como mascota en Lima, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 25(2): 317-323.

**Sanchez B. 2004.** Betalactamasas de espectro extendido (BLEE). *Revista Electrónica de Medicina Intensiva*, 4(8): 152 - 165.

**Sánchez N, Arias I, Galvez H, Carranza V & Romaina A. 2015.** *Escherichia coli* enteropatógena en crías de primate *Aotus* (Aotidae) con diarrea en cautiverio. *Rev. Invest. Vet. Perú* 26 (4): 657 – 663.

**Sanders W. & Sanders C. 1997.** Enterobacter spp.: Pathogens Poised To Flourish at the Turn of the Century. *Clinical Microbiology Reviews*. 10(2): 220 – 241.

**Santos L, Nascimento V, Oliveira S, et. al. 2001.** Polymerase Chain Reaction (PCR) for the Detection of *Salmonella* in Artificially Inoculated Chicken Meat. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*. 43(5): 247-250.

**Silva M., Tavares H, Silva E, et al. 2019.** Perfil de sensibilidade a antimicrobianos por componentes da microbiota bacteriana oral e retal de primatas não humanos. *Ciênc. anim. Bras.* 20: 1 – 12.

- Soto E., Marchi S., Beierschmitt A., Kearney M., Francis S., VanNess K., Vandenplas M., Thrall M. & Palmour R.** 2016. Interaction of non-human primate complement and antibodies with *hypermucoviscous Klebsiella pneumoniae*. *Veterinary Research*, 47(40).
- Tafur J., Torres J. & Villegas M.** 2008. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Revista de la Asociación Colombiana de Infectología*, 12(3): 217 - 226.
- Terio K., McAloose D & Leger J.** 2018. *Pathology of Wildlife and Zoo Animals*. United States: Elsevier. 359 p.
- Tejada P., Huarcaya J., Melgarejo G., Gonzales L., Cahuana J., Pari R., Bohorquez H. & Chacaltana J.** 2015. Caracterización de infecciones por bacterias productoras de BLEE en un hospital de referencia nacional. *Anales de la Facultad de Medicina*, 76(2).
- Torres C. & Zarazaga M.** 2007. BLEE en animales y su importancia en la transmisión a humanos. *Enferm Infecc Microbiol*, 25: 29-37
- Valdez L.** 2017. *Escherichia coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), un problema creciente en nuestros pacientes. *Revista Médica Herediana*, 28(3): 139-141.
- Viso S.** 2017. Estudio de la fauna silvestre como reservorio de cepas de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y del grupo clonal pandémico ST131 en el noroeste de España. Tesis doctoral. Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela. 308 p.
- Vivanco S.** 2011. Detección de genes de virulencia en cepas de *Escherichia coli* productoras de shigatoxina aisladas de bovinos (tesis de pregrado). Universidad de Chile, Santiago de Chile.
- Wang Y., He T., Han J., Wang J., Foley S., Yang G. & et al.** 2012. Prevalence of ESBLs and PMQR genes in fecal *Escherichia coli* isolated from the non-human primates in six zoos in China. *Veterinary Microbiology*, 159: 53-59.



**Whitehouse C., Keirstead N., Taylor J., Reinhardt J. & Beierschmitt A. 2010.** Prevalence of Hypermucoid *Klebsiella pneumoniae* among Wildcaught and Captive Vervet Monkeys (*Chlorocebus aethiops sabaues*) on the Island of St. Kitts. *Journal of Wildlife Diseases*, 46(3): 971–976.

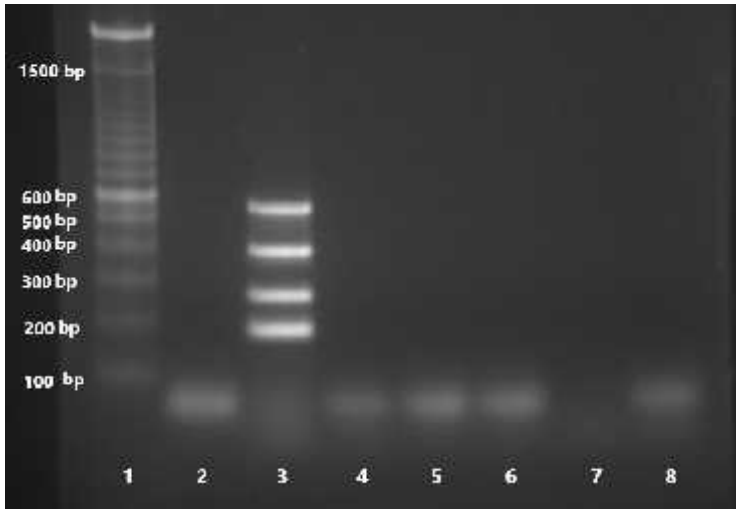
**Winn W., Koneman E., Allen S., Janda W., Procop G., Schreckenberger P. & Woods G. 2008.** *Koneman Diagnóstico Microbiológico*. 6<sup>a</sup> ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana. p 228-229.

## ANEXOS

**Anexo 1.-** Datos coleccionados de los primates no humanos muestreados de ambos centros

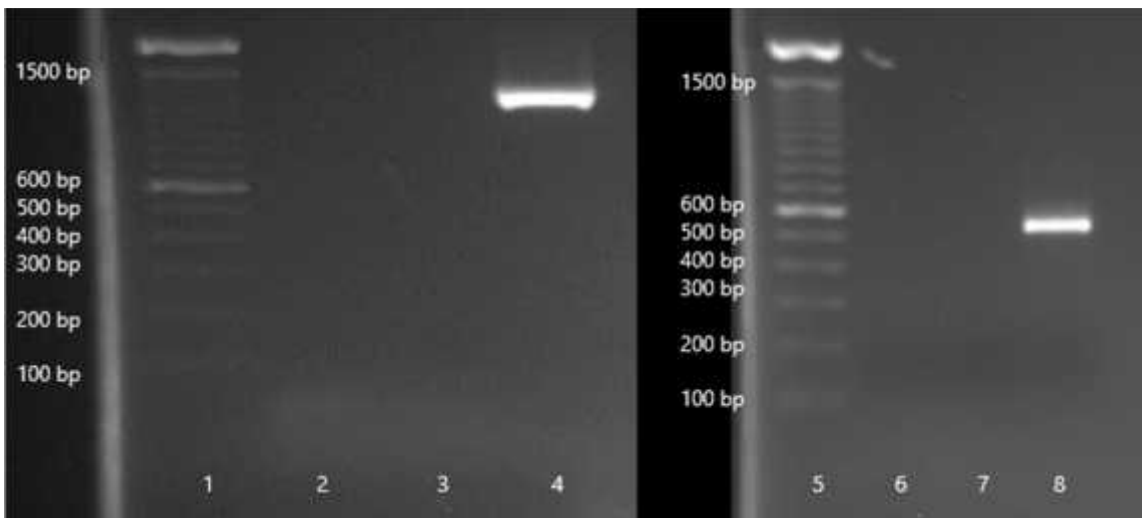
<b>Código</b>	<b>Nombre</b>	<b>Especie</b>	<b>Edad</b>	<b>Sexo</b>	<b>Peso</b>	<b>Procedencia</b>
<b>P1</b>	Cristian	Cacajao calvus	8 años	Macho	4,31 kg	Pilpintuwasi
<b>P2</b>	Greg	Cacajao calvus	7 años	Macho	4,14 kg	Pilpintuwasi
<b>P3</b>	Eva	Cacajao calvus	6 años	Hembra	3,45 kg	Pilpintuwasi
<b>P4</b>	Lisa	Cacajao calvus	7 años	Hembra	3,51 kg	Pilpintuwasi
<b>P5</b>	Britta	Cacajao calvus	6 años	Hembra	4,83 kg	Pilpintuwasi
<b>P6</b>	Angie	Cacajao calvus	10 años	Hembra	4,86 kg	Pilpintuwasi
<b>P7</b>	Paulie	Cacajao calvus	12 años	Hembra	3,94 kg	Pilpintuwasi
<b>P8</b>	Perla	Cacajao calvus	8 años	Hembra	3,50 kg	Pilpintuwasi
<b>P9</b>	Kiara	Cacajao calvus	3 años	Hembra	3,33 kg	Pilpintuwasi
<b>P10</b>	Lola	Cacajao calvus	5 años	Hembra	4,20 kg	Pilpintuwasi
<b>IM1</b>	Lucero	Ateles belzebuth	2 años y medio	Hembra	5,50 kg	Isla de los Monos
<b>IM2</b>	Emma	Ateles belzebuth	2 años y medio	Hembra	6,40 kg	Isla de los Monos
<b>IM3</b>	Panchita	Lagothrix	3 años	Hembra	4,30 kg	Isla de los Monos
<b>IM4</b>	Mosita	Lagothrix	2 años y medio	Hembra	4,00 kg	Isla de los Monos
<b>IM5</b>	Azucena	Ateles belzebuth	5 años	Hembra	6,50 kg	Isla de los Monos
<b>IM6</b>	Tonia	Lagothrix	3 años	Hembra	5,30 kg	Isla de los Monos
<b>IM7</b>	Pepito	Lagothrix	3 años	Macho	3,60 kg	Isla de los Monos
<b>IM8</b>	Maruja	Lagothrix	3 años	Hembra	4,10 kg	Isla de los Monos
<b>IM9</b>	Carlos	Lagothrix	10 años	Macho	6,20 kg	Isla de los Monos
<b>IM10</b>	Ben	Pithecia	1 año y medio	Macho	1,30 kg	Isla de los Monos
<b>IM11</b>	Sarita	Pithecia	1 año	Hembra	1,45 kg	Isla de los Monos
<b>IM12</b>	Tim	Pithecia	1 año	Macho	1,50 kg	Isla de los Monos
<b>IM13</b>	Max	Callicebus		Macho	0,80 kg	Isla de los Monos
<b>IM14</b>	Coffe	Lagothrix	5 meses	Macho	1,20 kg	Isla de los Monos
<b>IM15</b>	Lino	Ateles belzebuth	4 años	Macho	7,00 kg	Isla de los Monos
<b>IM16</b>	Lili	Lagothrix	1 año	Hembra	2,30 kg	Isla de los Monos
<b>IM17</b>	Paquito	Lagothrix	1 año	Macho	2,20 kg	Isla de los Monos
<b>IM18</b>	Moana	Lagothrix	1 año y 2 meses	Hembra	2,20 kg	Isla de los Monos

**Anexo 2.-** Electroforesis en gel del PCR amplificado de la cepa control para *E. coli* con los genes *eae*, *hlyA*, *Stx1* y *Stx2* y algunas cepas de *E. coli* aisladas en el estudio.



(1) Ladder. (2) Blanco. (3) Control positivo para los 4 genes. (4, 5, 6, 7, 8) Cepas de *E. coli* aislados de los primates no humanos muestreados.

**Anexo 3.-** Electroforesis en gel del PCR amplificado de la cepa control para *K. pneumoniae* con el gen *magA* y el gen *rpmA*



(1,5) Ladder. (2,6) Blanco. (3,7) Control negativo. (4) Control positivo para gen *magA*. (8) Control positivo para gen *rpmA*.