



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

“EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE
ENTEROPATÓGENOS EN MICROBIOMAS
DE HUMANOS, AVES Y AGUAS
RESIDUALES”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR
EN CIENCIAS DE LA VIDA

GUILLERMO SANTOS
SALVATIERRA RODRIGUEZ

LIMA-PERÚ

2022

ASESOR:

Dr. Pablo Tsukayama Cisneros

JURADO EVALUADOR

DR. JORGE LUIS AREVALO ZELADA

PRESIDENTE

DRA. MARIA JESUS PONS CASELLAS

VOCAL

DR. ANDRES GUILLERMO LESCANO GUEVARA

VOCAL

DR. PEDRO EDUARDO ROMERO CONDORI

SECRETARIO

DEDICATORIA

A mi familia que siempre me han apoyado en todas mis decisiones.

A mis compañeros del laboratorio que sin ellos esta tesis no hubiese sido posible.

Gracias Ale, Brenda, Diego, Camila y Janet, por su amistad y compartir muchos
momentos inolvidables.

AGRADECIMIENTOS

A Pablo Tsukayama, quien me brindó la posibilidad de formar parte de su equipo de laboratorio y me dio todas las facilidades para empezar y culminar este estudio.

A CONCYTEC - PROCIENCIA - E033-01-08-2018-FONDECYT/Banco Mundial-Programas de Doctorado en Áreas Estratégicas y Generales.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

- CONCYTEC - PROCIENCIA - E033-01-08-2018-FONDECYT/Banco Mundial-Programas de Doctorado en Áreas Estratégicas y Generales
- Innóvate Perú #289-2017
- FONDECYT #088-2018.
- NIH D43 TW010074
- NIH R01 AI108695-01A1
- NIH D43TW007393

EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE ENTEROPATÓGENOS EN MICROBIOMAS DE HUMANOS, AVES Y AGUAS RESIDUALES

INFORME DE ORIGINALIDAD

9%	8%	4%	2%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
2	www.europarl.europa.eu Fuente de Internet	<1%
3	repositorio.unal.edu.co Fuente de Internet	<1%
4	repositorio.ug.edu.ec Fuente de Internet	<1%
5	repositorio.upeu.edu.pe Fuente de Internet	<1%
6	www.dspace.uce.edu.ec Fuente de Internet	<1%
7	www.scielo.org.pe Fuente de Internet	<1%
8	revistafarmaciahospitalaria.sefh.es Fuente de Internet	<1%
9	aprenderly.com Fuente de Internet	

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

RESUMEN

ABSTRACT

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

1

II. CAPÍTULO 1. Resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* de fuentes humanas y animales en Lima, Perú

5

2.1 Introducción

7

2.2 Objetivo

9

2.3 Materiales y Métodos

10

2.4 Resultados

15

2.5 Discusión

25

III. CAPÍTULO 2. Enterobacterias ambientales obtenidas de aguas residuales comunitarios e intrahospitalarios en dos regiones del Perú	34
3.1 Introducción	35
3.2 Objetivo	38
3.3 Materiales y Métodos	39
3.4 Resultados	43
3.5 Discusión	52
3.6 Reporte del gen <i>blaKPC-2</i> en un genoma de <i>Citrobacter braakii</i> aislado de aguas residuales en un hospital pediátrico en Lima, Perú	56
IV. CONCLUSIONES	60
4.1 Conclusiones Capítulo 1	60
4.2 Conclusiones Capítulo 2	60
V. RECOMENDACIONES	61
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
MATERIAL SUPLEMENTARIO	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 1. Resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* de fuentes humanas y animales en Lima, Perú

Figura 1. Resistencia fenotípica de 350 aislados de *E. coli* de humanos y pollos. (A): los aislados fueron agrupados según el número de resistencias a diferentes antibióticos, (B), resultados basados en resistencia a los diferentes antibióticos probados 17

Figura 2. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud construido a partir de la alineación de 2.233 genes centrales de *E. coli* de 118 aislados humanos y animales, utilizando *E. fergusonii* como grupo externo. 21

Figura 3. Secuenciotipos identificados en los genomas de *E. coli* secuenciados (n=118) 22

Figura 4. Genes de resistencia detectados en los genomas de *E. coli* secuenciados (n=118) 23

Figura 5. Movilización del gen *floR* en plásmidos conjugativos en animales y humanos 24

Capítulo 2. Enterobacterias ambientales obtenidas de aguas residuales comunitarios e intrahospitalarios en dos regiones del Perú

Figura 1. Distribución geográfica de los puntos de muestreo en Iquitos y Lima.

43

Figura 2. Resistencia fenotípica de 388 enterobacterias aisladas de aguas residuales de ambientes hospitalarios y no hospitalarios en Iquitos (A) y Lima (B)

45

Figura 3. Árbol filogenético por Máxima Verosimilitud de los genomas de *E. coli* (n=61).

49

Figura 4. Genes de resistencia detectados en los genomas de *E. coli* (n=61) secuenciados. A: no hospital, Iquitos, B: hospital, Iquitos, C: no hospital, Lima, D: hospital, Lima

50

Figura 5. Árbol filogenético por Máxima Verosimilitud de los genomas de *Klebsiella* sp (n=6).

51

ÍNDICE DE TABLAS

Capítulo 1. Resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* de fuentes humanas y animales en Lima, Perú

Tabla 1. Perfiles de resistencia y análisis bivariado de aislados de *E. coli* de humanos y pollos 18

Capítulo 2. Enterobacterias ambientales obtenidas de aguas residuales comunitarios e intrahospitalarios en dos regiones del Perú

Tabla 1. Perfiles de resistencia y análisis bivariado de enterobacterias de aguas residuales hospitalarias y no hospitalarias en Iquitos y Lima. 47

Tabla 2. Susceptibilidad a antibióticos del aislado CF248

Citrobacter braakii. 58

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Capítulo 1. Resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* de fuentes humanas y animales en Lima, Perú

Tabla 1. Localización, tipo y tamaño de muestra de humanos y pollos incluidos en el estudio.	91
Tabla 2. Antibióticos usados para la prueba de susceptibilidad.	92
Tabla 3. Marcadores plasmídicos y análisis bivariado de los genomas de <i>Escherichia coli</i> de pollos y humanos.	93
Tabla 4. Genes de resistencia antimicrobiana identificados en los genomas de <i>Escherichia coli</i>	95

Capítulo 2. Enterobacterias ambientales obtenidas de aguas residuales comunitarios e intrahospitalarios en dos regiones del Perú

Tabla 1. Lugares de muestreo de hospitales y no hospitales en Lima e Iquitos	98
Tabla 2. Genes de resistencia antimicrobiana identificados en los genomas de <i>Escherichia coli</i>	99
Tabla 3. Genes de resistencia antimicrobiana identificados en los genomas de <i>Klebsiella</i> sp.	101

RESUMEN

La resistencia antimicrobiana (RAM) representa una de las mayores amenazas a la salud pública en todo el mundo. Es un problema que no solo afecta la salud humana, sino está relacionado también con la salud animal y ambiental. En este estudio, describimos el papel que cumplen los animales y el medio ambiente en la emergencia de resistencia y como vía de transmisión de enterobacterias resistentes a los seres humanos, utilizando el secuenciamiento del genoma completo y plataformas para análisis bioinformático. En el primer capítulo, describimos cómo la poca regulación del uso de antibióticos en la producción animal puede resultar en un incremento de la emergencia de RAM. Comparamos *Escherichia coli* de pollos y humanos con diferentes niveles de exposición a la carne de pollo en una comunidad en las afueras del sur de Lima, Perú. Se obtuvieron 315 aislaron de *E. coli* de humanos (n=150) y pollos (n=165), y siendo estos últimos los que mostraron las tasas más altas de fenotipos resistentes a múltiples antibióticos. El secuenciamiento del genoma completo de 118 aislados identificó filogrupos compartidos entre las poblaciones humana y animal y 604 hits de genes de resistencia, incluido los genes *mcr-1*, *bla_{CTX-M-55}* y *bla_{KPC-3}*. Nuestros hallazgos sugieren que los aislados de *E. coli* de los pollos de mercado son una fuente potencial de resistencia que pueden transmitirse a humanos. En el segundo capítulo, se tomaron muestras de agua residuales en ambientes hospitalarios y no hospitalarios en Lima e Iquitos. Un total de 388 enterobacterias fueron obtenidos de aguas residuales en Lima (n=241) e Iquitos (n=147). Se evidenciaron altos niveles de resistencia en los aislados de fuentes intrahospitalarias, sin embargo, también se encontraron niveles altos en los aislados provenientes de ambientes no

hospitalarios. Se seleccionó un total de 66 aislados para el secuenciamiento del genoma completo. Genes de resistencia importantes como *bla*_{KPC-1}, *bla*_{CTXM-55} y *mcr-1* fueron identificados tanto en enterobacterias de ambientes intrahospitalarios y hospitalarios. El análisis filogenético evidenció clústeres entre fuentes hospitalarias y no hospitalarias. Nuestros resultados sugieren una contribución potencial de fuentes de agua intrahospitalarias en términos de diseminación de bacterias resistentes o genes de resistencia a ambientes no hospitalarios.

Palabras clave: resistencia antimicrobiana, enterobacterias, aves, aguas residuales, Peru

ABSTRACT

Antimicrobial resistance (AMR) represents one of the greatest threats to public health worldwide. It is a problem that affects human health and is related to animal and environmental health. In this study, we describe the role of animals and the environment in the emergence of resistance and as a route of transmission of resistant *Enterobacteriaceae* to humans, using whole-genome sequencing and platforms for bioinformatics analysis. In the first chapter, we describe how the poorly regulated use of antibiotics in animal production can increase the emergence of AMR. We compared to chicken and human *Escherichia coli* with different levels of exposure to chicken meat in a community on the southern outskirts of Lima, Peru. 315 *E. coli* isolates were obtained from humans (n=150) and chickens (n=165), with chickens showing higher rates of multi-antibiotic resistant phenotypes. Whole-genome sequencing of 118 isolates identified shared phylogroups between the human and animal populations and 604 resistance gene hits, including the *mcr-1*, *bla_{CTX-M-55}*, and *bla_{KPC-3}* genes. Our findings suggest that *E. coli* isolates from market chickens are a potential source of resistance that can be transmitted to humans. In the second chapter, wastewater samples were taken in the hospital and non-hospital environments in Lima and Iquitos. 388 enterobacteria were obtained from wastewater in Lima (n=241) and Iquitos (n=147). High levels of resistance were found in isolates from hospital sources. However, high levels were also found in isolates from non-hospital environments. A total of 66 isolates were selected for whole-genome sequencing. Essential resistance genes such as *bla_{KPC-1}*, *bla_{CTXM-55}* and *mcr-1* were identified in *Enterobacteriaceae* from both

inpatient and hospital environments. The phylogenetic analysis showed clusters between hospital and non-hospital sources. Our results suggest a potential contribution of intrahospital water sources in terms of disseminating resistant bacteria or resistance genes to non-hospital environments.

Keywords: Antimicrobial resistance, enterobacterias, birds, wastewater, Peru

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

La resistencia antimicrobiana (RAM) representa un problema y amenaza para la salud pública en todo el mundo. Se estiman más de 700,000 muertes atribuibles a infecciones por bacterias multidrogo-resistentes (MDR) cada año, y una proyección de más de 10 millones de muertes por año para el 2050 (O'Neill, 2016). Este problema ya ha sido identificado como una prioridad por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), quienes lo reafirmaron en la Asamblea General en 2015 y comprometiéndose a luchar juntos contra la RAM y colaborar en la implementación de un Plan de Acción Mundial (FAO/OMS/OIE, 2022). La RAM implica la transferencia de genes entre poblaciones microbianas de humanos, animales y el medio ambiente. Las bacterias son microorganismos capaces de adquirir genes de resistencia de diversas formas, lo que reduce la capacidad para prevenir y tratar infecciones (Woolhouse *et al.*, 2015). El uso de antibióticos genera inevitablemente una presión selectiva sobre las poblaciones microbianas, principalmente en humanos y animales domésticos, aunque también en entornos ambientales (Kolár *et al.*, 2001). Esta presión promueve de manera activa la movilización y transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos (ARGs) entre diversas especies bacterianas, particularmente las patógenas. Dado que las bacterias y los genes a menudo cruzan límites de los entornos y las especies, es fundamental comprender y reconocer las conexiones entre las bacterias de microbiomas humanos, animales y ambientales (Rousham *et al.*, 2018).

Los seres humanos están expuestos a bacterias resistentes a los antibióticos a través del consumo de alimentos, así como a través del contacto con animales, el medio ambiente y el contacto de persona a persona (Harbarth, *et al.*, 2015). La presencia de bacterias resistentes en los alimentos puede deberse al uso de antibióticos durante la producción agrícola, a la supervivencia de una cepa de bacterias resistentes a los antimicrobianos en la cadena alimentaria (a pesar de un uso escaso o nulo de antimicrobianos), a la adición de bacterias tecnológicas (por ejemplo, cultivos iniciadores, probióticos) que contienen genes de resistencia o a la contaminación cruzada con bacterias resistentes durante el procesamiento y la manipulación de alimentos (ECDC/EFSA/EMA, 2015; Harbarth, *et al.*, 2015). Estas rutas de transmisión incluyen a los patógenos comúnmente transmitidos por los alimentos, siendo principalmente enteropatógenos como *Escherichia coli* (Bintsis, 2017).

Las fuentes ambientales son comúnmente contaminadas con bacterias fecales mediante el contacto directo, aumentando las oportunidades para el intercambio de genes entre bacterias ambientales residentes y bacterias adaptadas al tracto intestinal. Muchas bacterias intestinales también son conocidas como portadoras de elementos genéticos (plásmidos, elementos integrativos conjugativos, secuencias de inserción, transposones o integrones) que pueden facilitar la adquisición de genes y su transferencia a patógenos (Partridge *et al.*, 2018). La contaminación de aguas residuales comunitarias y hospitalarias resulta importante, como consecuencia de una gestión y tratamiento deficiente de desechos humanos y animales, lo que genera mayores emisiones ambientales de bacterias fecales resistentes al medio ambiente, incluyendo enterobacterias tales como *E. coli*, *Klebsiella* sp., *Enterobacter*, *Citrobacter*, entre otros. Este problema es más desafiante en países como el Perú,

debido a los recursos limitados y de otras necesidades básicas como agua y desagüe (Nadimpalli *et al.*, 2020), así como acciones gubernamentales débiles y deficientes.

La vigilancia de RAM ha sido llevada a cabo mediante el uso de diferentes métodos de laboratorio entre microbiología tradicional, molecular y el secuenciamiento de última generación. Las técnicas tradicionales involucran siembra en medios de cultivos en agar, así como métodos de macro o micro dilución (Randall *et al.*, 2013). Estos métodos son altamente informativos, ya que permiten identificar la resistencia a diferentes antibióticos; sin embargo, su desempeño es laborioso y consume mucho tiempo. Existen otros métodos fenotípicos automatizados que también permiten evaluar los niveles de resistencia, los cuales ofrecen una mayor facilidad en su desempeño y rapidez en resultados. Sin embargo, los resultados fenotípicos se relacionan únicamente con la concentración de un antibiótico que inhibe el crecimiento bacteriano en base a un punto de corte establecido, y no da indicación acerca de los mecanismos de resistencia que pueden diseminarse a otras bacterias (Anjum, 2015).

El uso de métodos moleculares ha ido incrementándose con el paso del tiempo como un complemento para la identificación de resistencia. El uso de PCR convencional, múltiple o en tiempo real han permitido la identificación de diferentes genes de resistencia y el estudio de la emergencia de estos genes en poblaciones microbianas (Fang *et al.*, 2008; van der Zee *et al.*, 2014). Se han utilizado también para identificar plásmidos como marcadores epidemiológicos para el estudio de brotes (Anjum *et al.*, 2013). Sin embargo, estas técnicas están limitadas por el gen de resistencia que se busque, pudiendo no incluir variantes de este o pasar por alto otros no incluidos en el desarrollo de cebadores. Por ello, la

introducción de métodos de secuenciamiento de última generación han incrementado considerablemente la caracterización de genes de resistencia presentes en el genoma bacteriano. La presencia de estos genes en una secuencia del genoma completo puede ser determinada mediante una comparación con genes identificados en una base de datos de libre acceso de disponibilidad pública. Estas bases de datos albergan miles de secuencias de genes y son actualizados constantemente, lo que permite identificar y estudiar la emergencia de variantes alélicas diferentes (Anjum, 2015). Durante los últimos años, ha habido una disminución de costos y el aumento de la rapidez y confiabilidad de las tecnologías de secuenciación. La aceptación de la secuenciación del genoma completo (WGS) por parte de los laboratorios de salud pública se ha incrementado en los últimos años, y estos nuevos métodos están destinados a reemplazar los métodos fenotípicos tradicionales para la vigilancia de rutina de la RAM (NIHR, 2020).

El Perú, como muchos países de bajos y medianos ingresos, es particularmente vulnerable a esta crisis de RAM. Esto es debido principalmente a las limitaciones en oportunidades de vigilancia y diagnóstico oportuno, sumado a una falta de regulaciones y control sobre el uso de antibióticos en humanos y animales, hacinamiento en centros de salud, control de higiene insuficiente, y un limitado acceso a antibióticos de segunda o tercera línea que son regularmente más costosos (Nadimpalli *et al.*, 2020; Sulis *et al.*, 2022). En este estudio, describimos mediante dos capítulos, el papel que cumplen los animales y el medio ambiente en la emergencia de resistencia y como vía de transmisión de bacterias resistentes a los seres humanos. Mediante el uso de microbiología clásica, secuenciamiento del genoma completo y plataformas para análisis bioinformáticos, hemos estudiado

cómo las fuentes ambientales y animales proporcionan un reflejo de la situación una importante fuente de bacterias resistentes al humano, complementando así la vigilancia de RAM en el Perú.

II. CAPÍTULO 1

Resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* de fuentes humanas y animales en Lima, Perú

2.1 INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) en patógenos humanos se ha convertido en una importante amenaza para la salud mundial (O'Neill, 2014; OMS, 2017b). Décadas de uso generalizado de antibióticos en la medicina y la agricultura (Silbergeld *et al.*, 2008) han dado lugar a la aparición y propagación de varios determinantes de resistencia en poblaciones microbianas. En particular, la creciente demanda de proteína animal ha llevado a una modernización de la agricultura, incluido el uso regular de antibióticos en los piensos para promover el crecimiento animal además de su uso terapéutico. En dosis bajas pero constantes, los antibióticos sirven como promotores del crecimiento al reducir los niveles de cepas patógenas y alterar el microbiota para permitir que el huésped absorba más nutrientes (Evans y Wegener, 2003). Esta presión selectiva ha aumentado drásticamente la tasa de resistencia a varios fármacos en el microbiota de los animales de granja, incluidos los comensales y patógenos por igual (Woolhouse *et al.*, 2015; Robinson *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018; Nadimpalli *et al.*, 2018; Van Boeckel *et al.*, 2019). Las cepas resistentes pueden transmitirse de animales a humanos a través del consumo de carne, el contacto directo con los animales y la exposición a la escorrentía ambiental (Hoelzer *et al.*, 2017). Además, la transferencia horizontal de genes puede permitir el intercambio rápido de determinantes de resistencia entre diferentes linajes bacterianos entre huéspedes y entornos (Marshall y Levy, 2011; Woolhouse *et al.*, 2015). Debido a que la mayoría de los genes de resistencia a los antibióticos (ARG) se encuentran en bacterias

aisladas tanto de humanos como de animales, la dirección de transferencia de la mayoría de estos genes y organismos resistentes puede ser difícil de demostrar.

Estudios previos han analizado los fenotipos de resistencia a antibióticos en adultos sanos en una comunidad periurbana al sur de Lima, encontrando una gran diversidad y abundancia de genes que codifican la resistencia a los antibióticos principalmente anfenicoles (Pehrsson *et al.*, 2016). Un estudio reciente en Camboya comparó aislados de *E. coli* de humanos, carne y pescado y encontró niveles moderados de resistencia al anfenicol en aislados humanos (Nadimpalli *et al.*, 2019). Aunque se usó ampliamente hasta la década de 1980, el cloranfenicol (un anfenicol) ahora rara vez se prescribe en la medicina humana en Perú y está prohibido en la producción de animales para consumo humano desde 2013. Sin embargo, el florfenicol (un análogo del tiamfenicol fluorado) se usa ampliamente en la cría de pollos de engorde terapéuticamente y como promotor del crecimiento y está disponible en varias premezclas comerciales de piensos (FAO, 2014). Esto ha llevado a la hipótesis de que la resistencia al anfenicol en los comensales humanos no surgió del uso clínico, sino en poblaciones de animales destinados a la alimentación debido al uso veterinario extensivo de cloranfenicol, florfenicol y otros compuestos relacionados. Los pollos, la mayoría de los cuales ahora se cultivan en sistemas locales de cultivo intensivo, proporcionan la fuente principal de proteína animal para la población peruana (Grupo del Banco Mundial, 2017). El consumo promedio per cápita se estimó en 49.5 kg en 2018, y hasta 80.5 kg por persona por año en la capital de Lima (MINAGRI, 2018).

2.2 OBJETIVO

Hipotetizamos que las prácticas actuales en la producción y manejo de pollo en el Perú dan como resultado bacterias comensales resistentes que pueden colonizar potencialmente el intestino humano. Para probar esto, evaluamos la distribución de *E. coli* resistentes y ARGs asociados en pollos de mercado, pollos criados sin antibióticos (pollos orgánicos) y personas residentes de una comunidad periurbana de bajos ingresos en Lima, con diferentes niveles de exposición a la carne de pollo.

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio

Se visitaron los puestos del mercado local Óvalo Oasis (-12.22, -76.94) en Villa El Salvador (VES) y Villa Jardín (-12.16, -76.95) en su distrito vecino, San Juan de Miraflores (SJM) en el sur de Lima, para comprar pollos enteros. Se recolectaron muestras fecales humanas de la comunidad que rodea el mercado VES. Estos distritos vecinos comparten características demográficas similares y contienen varios asentamientos urbanos informales (INEI, 2017). Los arreglos de vivienda informal, la falta de agua corriente y el saneamiento inadecuado en la mayoría de los hogares hacen que estos sitios sean representativos de los asentamientos periurbanos en otros países de ingresos bajos y medianos, que se consideran puntos críticos para la resistencia a los antimicrobianos (Nadimpalli *et al.*, 2020). También recolectamos muestras de gallinas ponedoras de una granja orgánica campestre en Vegueta (VEG), ubicada aproximadamente a 150 kilómetros al norte de Lima.

Muestras

Humanos. Se recolectaron muestras fecales en marzo de 2018 de tres grupos residentes en la comunidad VES: vendedores de pollos ($n = 23$) que trabajan en los mercados donde se compraron pollos, bebés ($n = 60$) entre uno y 24 meses de un

estudio de cohorte en curso en la comunidad y adultos no vendedores (n = 48). Los individuos y los tutores legales recolectaron heces frescas según las instrucciones. Las muestras fecales se tomaron con hisopo y se colocaron viales con medio de transporte Cary-Blair, se almacenaron a 4°C y se transfirieron al laboratorio para su posterior procesamiento. Se obtuvo la aprobación ética de los Consejos de Revisión Institucional de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y la Asociación Benéfica Prisma.

Pollos de mercado de crianza convencional. Se compraron 41 pollos enteros recientemente sacrificados en 14 puestos de mercado de VES y SJM de marzo a abril de 2018. Los pollos enteros y los puestos de mercado se seleccionaron por conveniencia. No obtuvimos información sobre las condiciones exactas de cría o el origen de estos pollos. Sin embargo, casi toda la carne de pollo que se vende en Lima proviene de sistemas de producción locales convencionales que dependen en gran medida del uso rutinario de antibióticos como práctica estándar de la industria. Los pollos fueron llevados a laboratorios de campo para la recolección de contenido intestinal. Se colocaron hisopos cloacales e intestinales en tubos estériles con solución salina y se transfirieron en refrigeración y en dos horas al laboratorio para cultivo bacteriano.

Gallinas ponedoras orgánicas. En mayo de 2019 se obtuvieron hisopos cloacales de 20 gallinas ponedoras de la única granja orgánica de corral al aire libre Certified Humane® (HFAC, 2018) en Lima para tener un conjunto de aislados provenientes

de aves de corral criadas sin antibióticos como grupo de comparación con los pollos de mercado. Los hisopos cloacales se colocaron en tubos estériles con medio de transporte Cary-Blair, se almacenaron a 4°C y se trasladaron al laboratorio para su procesamiento.

Aislamiento. Las muestras se sembraron en CHROMagar Orientation Media (CHROMagar Microbiology, París, Francia) para una rápida diferenciación e identificación presuntiva de *E. coli*. Hasta 3-5 colonias de color rosa oscuro a rojo indicadoras de *E. coli* se volvieron a sembrar en agar MacConkey (Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania) para la confirmación de la fermentación de lactosa y luego se seleccionaron para la confirmación de la especie con un panel de perfil bioquímico convencional (Garrity *et al.*, 2005). Los aislados confirmados como *E. coli* (n = 315) se incluyeron en el estudio y se almacenaron en caldo de Trypticase de Soya (TSB, Becton Dickinson) con glicerol a -20 ° C hasta la extracción del ADN.

Pruebas de susceptibilidad a antibióticos. Las pruebas de difusión en disco se realizaron con los estándares CLSI 2018, utilizando definiciones de susceptible, intermedia y resistente para *Enterobacteriaceae* (CLSI, 2018). Se utilizaron un total de 18 antibióticos. La actividad de producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) se detectó utilizando la prueba cefotaxima-ceftazidima-cefepima-aztreonam con amoxicilina con ácido clavulánico, de acuerdo con los estándares EUCAST (EUCAST, 2017). Interpretamos la susceptibilidad al

florfenicol utilizando los puntos de corte CLSI del cloranfenicol, ya que no hay valores de corte aprobados para *E. coli* (White *et al.*, 2000; CLSI, 2018). Un aislado de fármaco multirresistente se definió como el que expresaba resistencia fenotípica a tres o más clases de antibióticos (Magiorakos *et al.*, 2012).

Extracción de ADN y secuenciamiento del genoma. El ADN se extrajo de 1 ml de cultivo de TSB utilizando el kit de purificación de ADN genómico GeneJet (Thermo Scientific, Waltham, MA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN se eluyó en 200 ul de tampón Tris-EDTA y se cuantificó usando el kit Qubit dsDNA BR (Thermo Fisher Scientific). Seleccionamos un subconjunto de 118 aislados para WGS en la plataforma Illumina MiSeq. Las bibliotecas se prepararon a partir de 1 ng de ADNg con el kit Nextera XT (Illumina, San Diego, CA). Se indexaron y secuenciaron lotes de 24 bibliotecas con los kits de secuenciación MiSeq v3 para generar lecturas de extremos emparejados de 300 pb y obtener una media de cobertura del genoma 84x (mínimo 17x, máximo 163x). Las lecturas de Illumina sin procesar se cargaron en Genbank bajo el Bioproyecto PRJNA633873.

Análisis genómicos y filogenéticos. Las lecturas sin procesar se evaluaron con FastQC v0.11.9, se recortaron con Trimmomatic v0.36.6 (Bolger *et al.*, 2014), se ensamblaron con SPAdes v.3.10.0 (Bankevich *et al.*, 2012) y se anotaron con Prokka v1.5 (Seemann, 2014). Los secuenciotipos se determinaron a partir de ensamblajes *de novo* utilizando CGE para Multilocus sequence typing (MLST) (Thomsen *et al.*, 2016) según el esquema de Enterobase

(<http://enterobase.warwick.ac.uk/>) al que se accede a través de PubMLST (<https://pubmlst.org/>). Los genes de resistencia se anotaron consultando los ensamblados en la base de datos CARD (Alcock *et al.*, 2020) con una identidad > 90%. Agrupamos contigs que contienen los genes con CD-HIT (Li y Godzik, 2006) a un umbral de similitud del 80% sobre la longitud del contig. Los ensamblajes anotados por Prokka se utilizaron como entrada para Roary v3.13.0 (Page *et al.*, 2015) para determinar el pangenoma y realizar una alineación de genes centrales de todos los aislados secuenciados utilizando un umbral de identidad de Blastp del 95%. Las posiciones variables se extrajeron de una alineación de 2233 genes centrales (2252,390 pb) y se usaron para construir un árbol filogenético de máxima probabilidad con RAxML v8.2.4 (Stamatakis, 2014) con el modelo de sustitución general reversible en el tiempo (GTR) y la corrección gamma para tasa de heterogeneidad, con un bootstrap de 100 repeticiones. Se utilizó SNP-dists v0.7.0 para construir una matriz de distancias de SNP por pares a partir de la alineación del pangenoma. Se utilizó un genoma publicado de *E. fergusonii* (Manninger *et al.*, 2016) para enraizar el árbol filogenético. Se utilizó CLC Genomics Workbench v20.0 (QIAGEN Bioinformatics) para visualizar y anotar el árbol.

Análisis estadístico. Se tabuló la proporción de aislados resistentes para cada tipo de muestra. Las comparaciones de proporciones se evaluaron mediante la prueba de Chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher, según corresponda. La gestión de datos y el análisis estadístico se realizaron con un nivel de confianza del 95% utilizando STATA 16 (Stata Corp., College Station, TX) y R (v3.5.2).

2.4 RESULTADOS

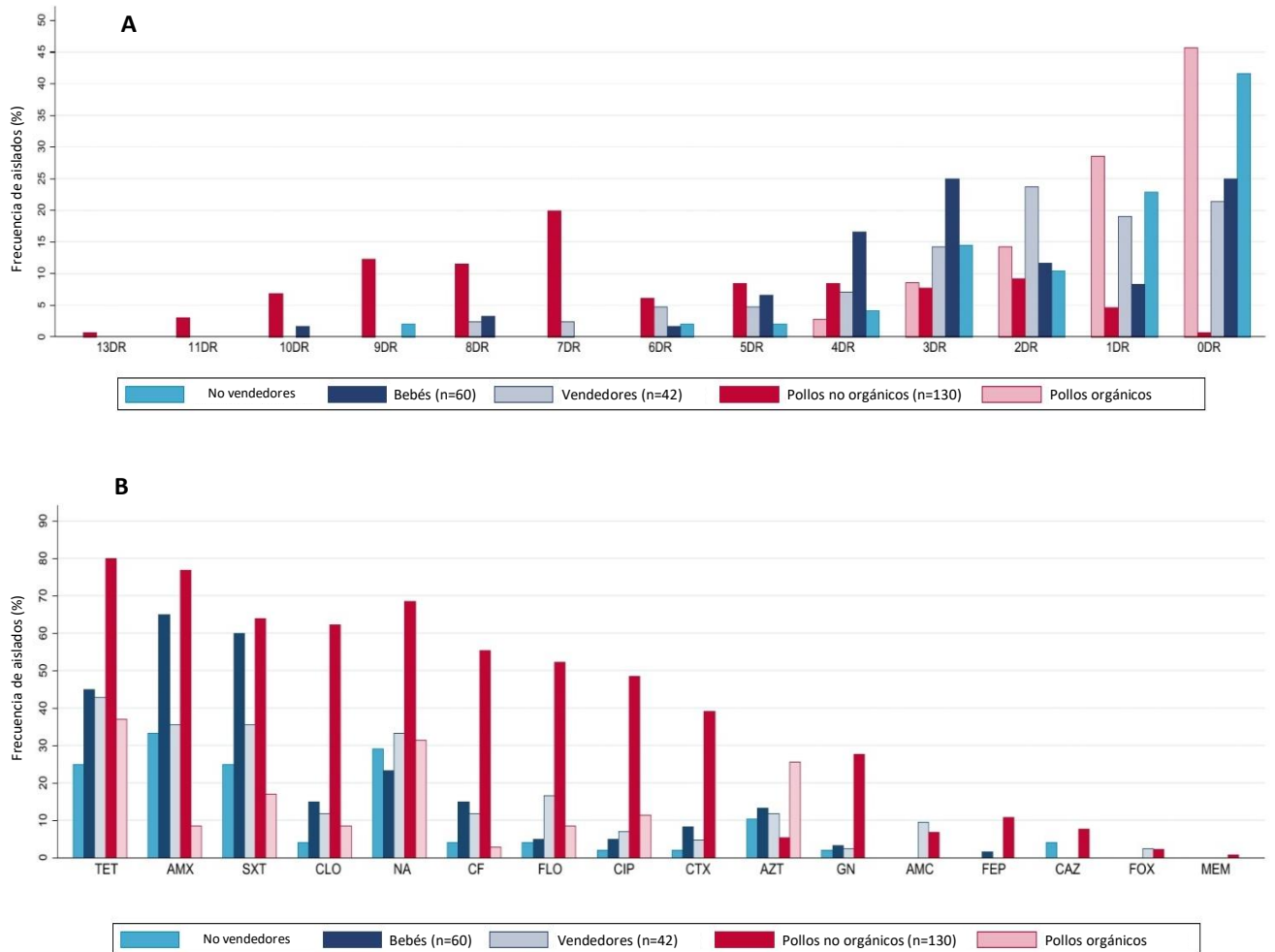
Susceptibilidad antimicrobiana

Pollos. Los aislados aislados de *E. coli* se obtuvieron de pollos de mercado (no orgánicos) (n = 130) y orgánicos (n = 35). Las frecuencias de aislados multidro-resistentes (MDR) fueron más altas en animales no orgánicos (76,9% frente a 11,4%, $p < 0,001$, prueba de Chi-cuadrado). Solo los aislados de pollo no orgánicos fueron productores de BLEE (39,2%, n = 51), y presentaron resistencia a al menos cinco familias de antibióticos (46,2%, n = 60), incluyendo cloranfenicol (62,3%, n = 81), florfenicol (52,3%, n = 68) y meropenem (0,8%, n = 1). Estos aislados presentaron los niveles más altos de resistencia a casi todos los antimicrobianos probados. En contraste, los aislados orgánicos de pollo fueron sensibles a gentamicina, amoxicilina con ácido clavulánico, cefotaxima, cefepima, ceftazidima y cefoxitina (Figura 1). En la Tabla 1 se detalla una comparación de las tasas de resistencia.

Humanos. Los aislados humanos (n = 150) se obtuvieron de bebés de 0 a 2 años (40%, n = 60), adultos no vendedores (32%, n = 48) y vendedores de pollos en los mercados locales (28%, n = 42). Los aislados MDR fueron más frecuentes en los vendedores de pollo (38,1%, n = 16) en comparación con los no vendedores (22,9%, n = 11). Los aislados de los vendedores de pollos presentaron tasas de resistencia más altas al florfenicol (16,7%, n = 7) en comparación con los adultos no vendedores (4,2%, $p = 0,077$, Prueba Exacta de Fisher) y bebés (5%, $p = 0,087$,

Prueba Exacta de Fisher). Sin embargo, no fueron más resistentes al cloranfenicol (11,9% frente a 4,2%, $p = 0,245$, Prueba Exacta de Fisher). Los aislados de *E. coli* de bebés presentaron niveles elevados de resistencia a tetraciclina (45%, $n = 27$), trimetoprima / sulfametoxazol (60%, $n = 36$), amoxicilina (65%, $n = 39$), azitromicina (13,3%, $n = 8$), cloranfenicol (15%, $n = 9$), cefalotina (15%, $n = 9$), cefotaxima (8,3%, $n = 5$) y gentamicina (3,3%, $n = 2$).

Figura 1. Resistencia fenotípica de 350 aislados de *E. coli* de humanos y pollos. (A): los aislados fueron agrupados según el número de resistencias a diferentes antibióticos, (B), resultados basados en resistencia a los diferentes antibióticos probados.



A: Porcentaje de resistencias a diferentes drogas, DR= resistencia a drogas. B: Patrones de resistencia a diferentes antibióticos, TET: tetraciclina, AMX: amoxicilina, SXT: sulfatrimetoprim, NA: ácido nalidíxico, CLO: cloranfenicol, CF: Cefalotina, FLO: florfenicol, CIP: ciprofloxacina, CTX: cefotaxima, AZT: azitromicina, GN: gentamicina, AMC: amoxicilina con ácido clavulánico, FEP: cefepime, CAZ: ceftazidima, FOX: ceftazidima, MEM: meropenem.

Tabla 1. Perfiles de resistencia y análisis bivariado de aislados de *E. coli* de humanos y pollos

Resultados	Humanos - N (%)					p ^a	p ^b	p ^c	Pollos - N (%)				valor p
	Total (n=150)	Adultos (n=48)	Bebés (n=60)	Vendedores (n=42)	Total (n=165)				No orgánicos (n=130)	Organic (n=35)	p ^d	Total	
MDR													
Sí	57 (38)	11 (22.9)	29 (48.3)	17 (40.5)	0.007	0.433	0.073	104 (63.1)	100 (76.9)	4 (11.4)	<0.001	161 (51.1)	<0.001
BLEE													
Sí	6 (4)	1 (2.1)	4 (6.7)	1 (2.4)	0.379*	0.646*	1.000*	51 (30.9)	51 (39.2)	0 (0)	<0.001	57 (18.1)	<0.001
Fenicoles													
Cloranfenicol	16 (10.7)	2 (4.2)	9 (15)	5 (11.9)	0.107*	0.655	0.245*	84 (50.9)	81 (62.3)	3 (8.6)	<0.001	100 (31.8)	<0.001
Florfenicol	12 (8)	2 (4.2)	3 (5)	7 (16.7)	1.000*	0.087*	0.077*	71 (43.1)	68 (52.3)	3 (8.6)	<0.001	83 (26.4)	<0.001
Tetraciclinas													
Tetraciclina	57 (38)	12 (25)	27 (45)	18 (42.9)	0.032	0.830	0.073	117 (70.9)	104 (80)	13(37.1)	<0.001	174 (55.2)	<0.001
Sulfonamidas													
Trimetoprim/Sulfametoxazol	63 (42)	12 (25)	36 (60)	15 (35.7)	<0.001	0.016	0.268	89 (53.9)	83 (63.9)	6 (17.1)	<0.001	152 (48.3)	0.034
Aminoglucósidos													
Gentamicina	4 (2.7)	1 (2.1)	2 (3.3)	1 (2.4)	1.000*	1.000*	1.000*	36 (21.8)	36 (27.7)	0 (0)	<0.001	40 (12.7)	<0.001
Macrólidos													
Azitromicina	18 (12)	5 (10.4)	8 (13.3)	5 (11.9)	0.643	0.831	1.000*	16 (9.7)	7 (5.4)	9 (25.7)	<0.001	34 (10.8)	0.511

Penicilinas													
Amoxicilina	70 (46.7)	16 (33.3)	39 (65)	15 (35.7)	0.001	0.004	0.813	103 (62.4)	100 (76.9)	3 (8.6)	<0.001	173 (54.9)	0.005
Amoxicilina con ácido clavulánico	4 (2.7)	0 (0)	0 (0)	4 (9.5)	N.A.	0.026*	0.044*	9 (5.5)	9 (6.9)	0 (0)	0.207*	13 (4.1)	0.214
Cefalosporinas													
Cefalotina	16 (10.7)	2 (4.2)	9 (15)	5 (11.9)	0.107*	0.655	0.245*	73 (44.2)	72 (55.4)	1 (2.9)	<0.001	89 (28.3)	<0.001
Cefotaxima	8 (5.3)	1 (2.1)	5 (8.3)	2 (4.8)	0.223*	0.697*	0.597*	51 (30.9)	51 (39.2)	0 (0)	<0.001	59 (18.7)	<0.001
Cefepime	1 (0.7)	0(0)	1 (1.7)	0 (0)	1.000*	1.000*	N.A.	14 (8.5)	14 (10.8)	0 (0)	0.042*	15 (4.7)	0.001
Ceftazidima	2 (1.3)	2 (4.2)	0(0)	0(0)	0.195*	N.A.	0.497*	10 (6.1)	10 (7.7)	0 (0)	0.122*	12 (3.8)	0.029
Cefoxitina	1 (0.7)	0 (0)	0 (0)	1 (2.4)	N.A.	0.412*	0.467*	3 (1.8)	3 (2.3)	0 (0)	1.000*	4 (1.3)	0.624*
Carbapenems													
Meropenem	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	N.A.	N.A.	N.A.	1 (0.6)	1 (0.8)	0 (0)	1.000*	1 (0.3)	1.000*
Quinolonas													
Ácido nalidíxico	42 (28)	14 (29.2)	14 (23.3)	14 (33.3)	0.492	0.265	0.670	100 (60.6)	89 (68.5)	11(31.4)	<0.001	142 (45.1)	<0.001
Ciprofloxacina	7 (4.7)	1 (2.1)	3 (5)	3 (7.1)	0.627*	0.688*	0.336	67 (40.6)	63 (48.5)	4 (11.4)	<0.001	74 (23.5)	<0.001

Chi-cuadrado y nivel de confianza del 95%

*: Prueba Exacta de Fisher, nivel de confianza del 95%

p^a: bebés vs. adultos no vendedores, p^b: bebés vs. vendedores, p^c: vendedores vs. adultos no vendedores, p^d: pollos orgánicos vs. no orgánicos, p^e: humanos vs. pollos

MDR: multidrogo resistente, BLEE: detección de betalactamasas de espectro extendido, NA: no aplica

Pollos vs. humanos. En general, las tasas de resistencia fueron más altas entre *E. coli* de pollo en comparación con los aislados humanos (Tabla 1), incluida la MDR (63% frente al 37,3%, $p < 0,001$, prueba de chi-cuadrado) y la *E. coli* productora de BLEE (30,9% vs. 4.0%, $p < 0.001$, prueba de Chi-cuadrado). Además, encontramos una mayor resistencia al florfenicol en el 43,1% ($n = 71$) de los aislados de pollo y el 16,7% ($n = 7$) de los vendedores de pollo en comparación con otros grupos. En la Tabla 1 se muestran más resultados de resistencia.

Análisis genómico

Seleccionamos un subconjunto aleatorio de 118 aislados de bebés ($n = 19$), adultos ($n = 22$), vendedores de pollos ($n = 23$), pollos no orgánicos ($n = 31$) y pollos orgánicos ($n = 23$) para comprender mejor el flujo de filogrupos de *E. coli* y ARG entre animales y humanos. El conjunto de datos genómicos tenía un N50 medio de 102.136 pb (SD = 49.584 pb) y una longitud total media de 4.490.970 pb (SD = 1.222.343 pb). El análisis de pangenoma con Roary identificó un genoma central (es decir, genes que se encuentran en $\geq 99\%$ de los aislados) de 2.304 genes y un genoma accesorio (que se encuentra en $\leq 15\%$ de los aislados) de 26.135 genes. Para evaluar la similitud genómica entre los aislados, construimos un árbol filogenético de máxima verosimilitud a partir de la alineación del pangenoma (Figura 2) y calculamos todas las distancias SNP por pares. Identificamos 58 secuenciotipos (ST) y 14 complejos clonales en el conjunto de datos (Figura 3). ST-10 ($n = 21$), ST-155 ($n = 11$), ST-48 ($n = 5$) y ST-648 ($n = 2$) se asignaron a aislados de origen animal y humano. Solo se encontraron aislados muy similares (que

difieren en menos de 100 SNP en sus pangenomas) dentro de los grupos de huéspedes. Los ST compartidos por humanos y pollos tenían una relación más lejana: se encontraron aislados de ST-155 (que diferían en 951 SNP) en pollos y bebés orgánicos; ST-10 (1,046 SNP), ST-155 (1,141 SNP), ST-48 (1,542 SNP) y ST-648 (13,470 SNP) fueron compartidos por vendedores de pollos, no vendedores y pollos de mercado.

Figura 2. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud construido a partir de la alineación de 2.233 genes centrales de *E. coli* de 118 aislados humanos y animales, utilizando *E. fergusonii* como grupo externo.

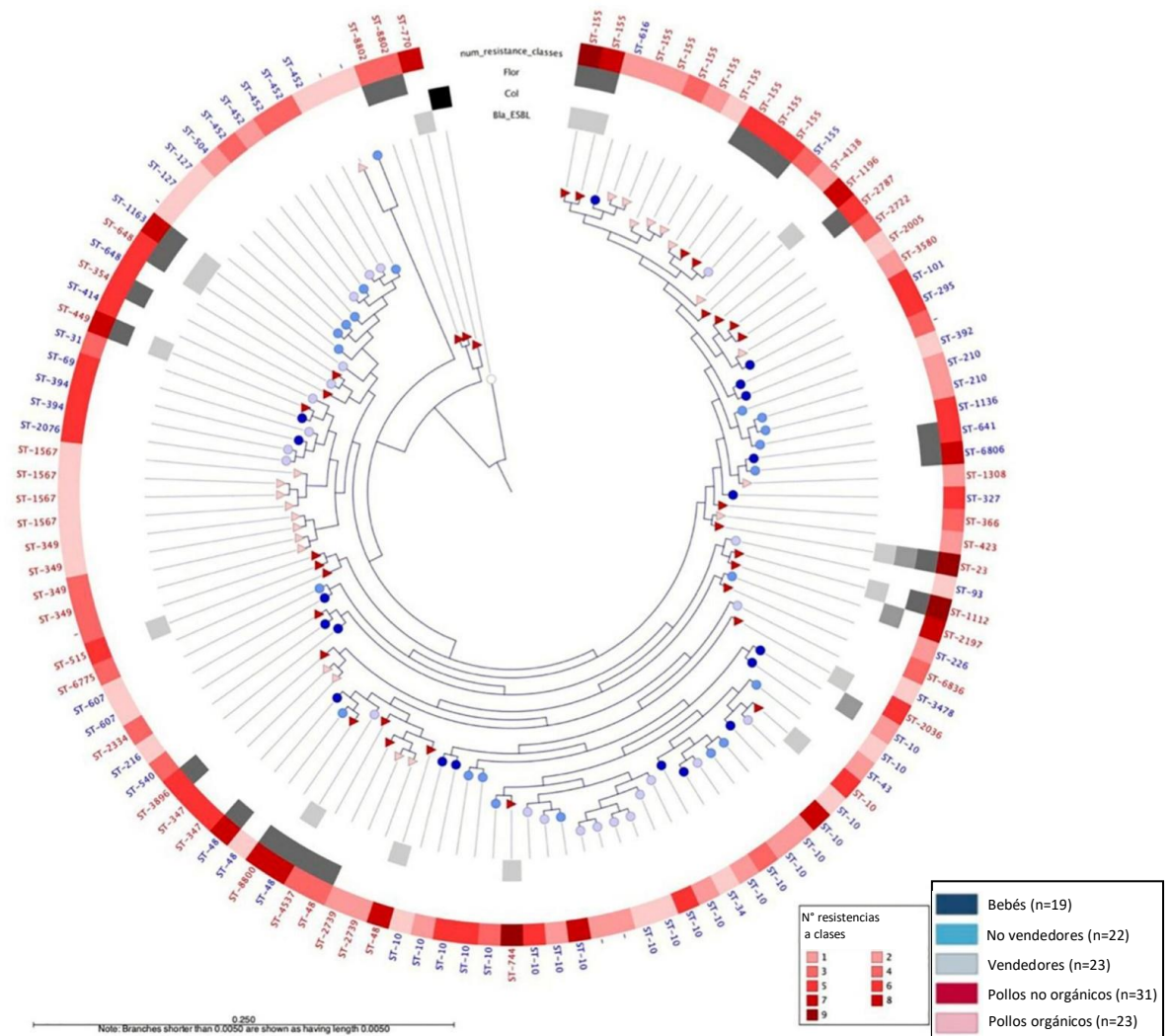
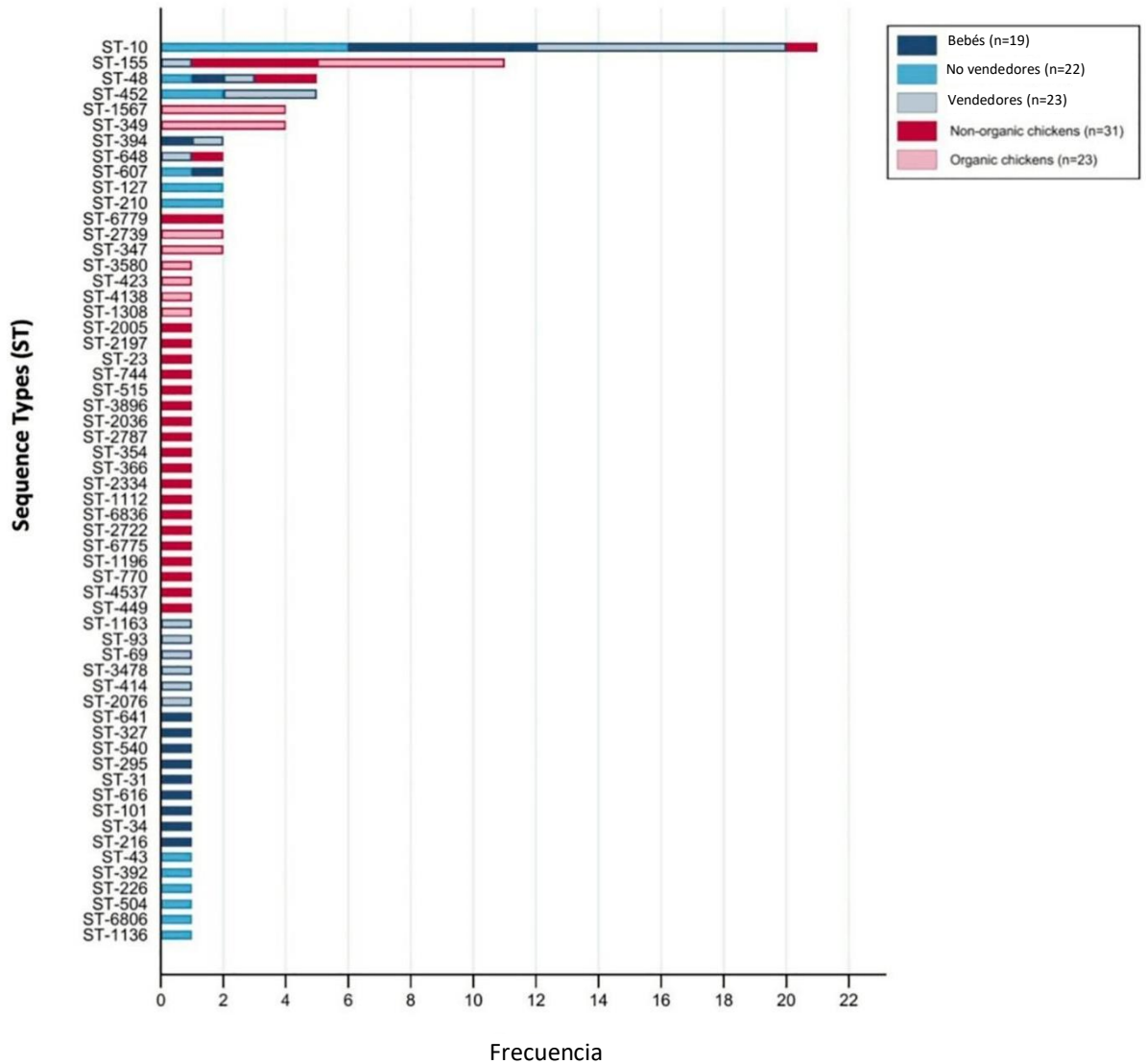


Figura 3. Secuenciotipos (ST) identificados en los genomas de *E. coli* secuenciados (n=118)

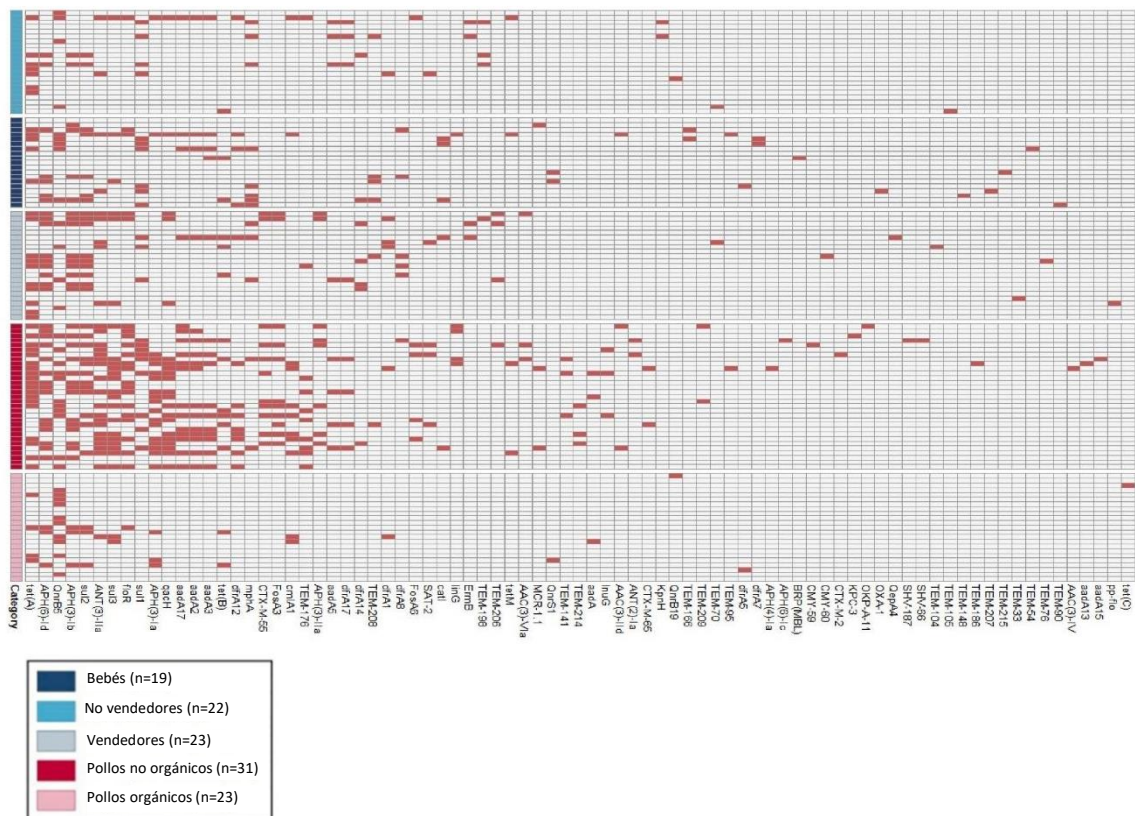


*No se identificaron en 8 genomas.

Identificamos 604 hits de ARG y 81 ARG únicos en el conjunto de datos (Figura 4) con una media de 5,1 genes (IC del 95%: 4,2-6,0) por aislamiento. Los ARG detectados se asocian con resistencia a betalactámicos (n = 30), aminoglucósidos (n = 18), trimetoprim (n = 7), anfenicoles (n = 4), tetraciclinas (n = 4), quinolonas (n

= 4), sulfonamidas (n = 3), fosfomicinas (n = 2), lincosamidas (n = 2), macrólidos (n = 1), glicopéptidos (n = 1), polimixinas (n = 1), estreptograminas (n = 1) y estreptotricinas (n = 1). Quince aislados (13 de pollos de mercado y dos de vendedores) fueron positivos para BLEE; encontramos blaCTX-M-55 en el 73% (11/15) de ellos, en plásmidos contigs que compartían > 96% de similitud de secuencia entre pollos y vendedores.

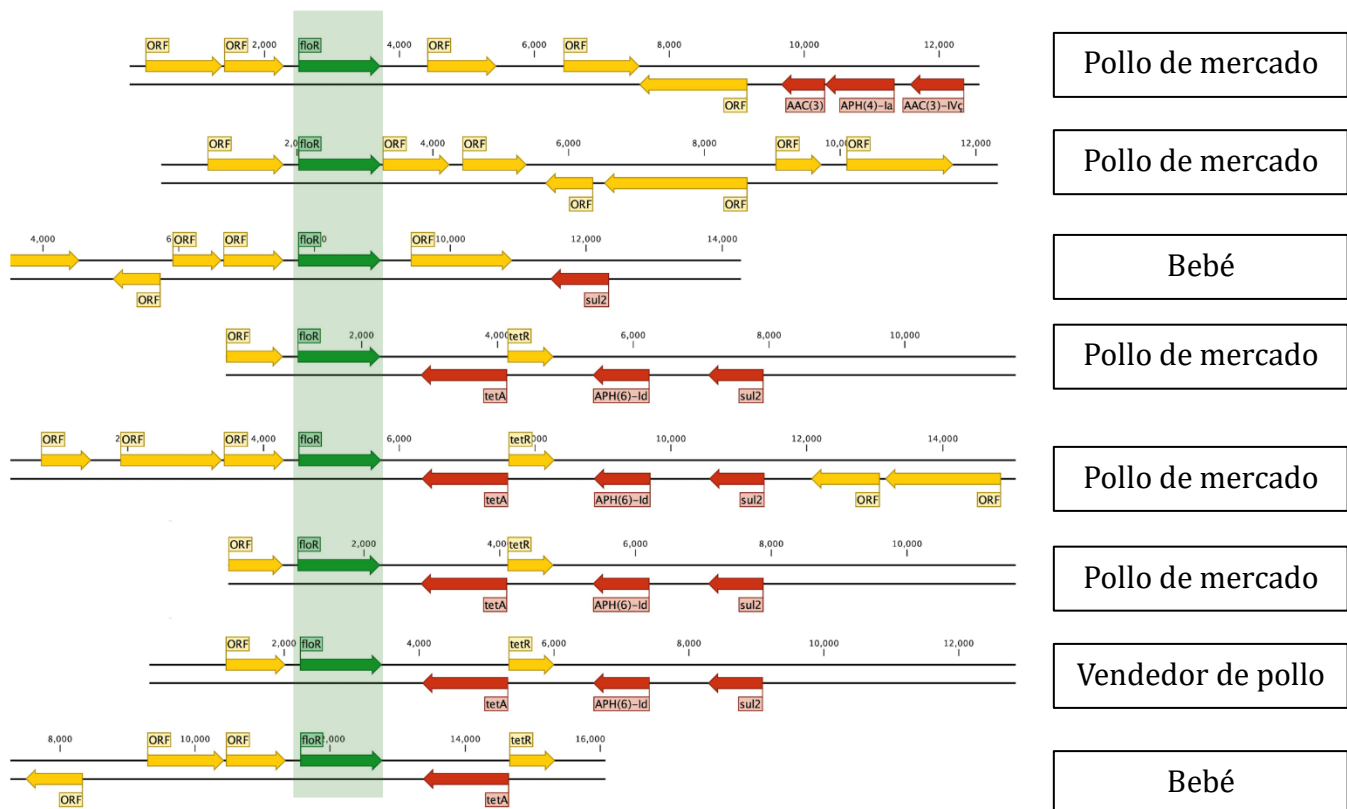
Figura 4. Genes de resistencia detectados en los genomas de *E. coli* secuenciados (n=118)



Encontramos el gen blaKPC-3 que codifica la resistencia a los carbapenémicos en un aislado de pollo del mercado. Además, tres aislados (dos de pollos de mercado y uno de un bebé) tenían el gen de resistencia a la colistina mcr-1 (Figura 2). Identificamos el gen *floR* en el 18,6% (22/118) de los genomas, y sus contigs se

agruparon en ocho secuencias únicas (> 80% de agrupación) que coincidían con los replicones de plásmido de la familia IncF (Figura 5). Compartían un tema común en el que a menudo se encontraba *floR* junto con otros genes de resistencia a antibióticos (*tetA*, APH (6) -Id, *sul2*) y proteínas que se predice que están involucradas en la transferencia horizontal de genes y la recombinación de ADN (transposasas, resolvasas, recombinasas, relajaasas). Esto sugiere que *floR* se ha transferido en múltiples ocasiones a plásmidos MDR comúnmente compartidos por huéspedes animales y humanos. Los genes *cmlA1* y *catA1* (que codifican la resistencia al cloranfenicol, pero no al florfenicol) se encontraron en 11 y cuatro genomas, respectivamente.

Figura 5. Movilización del gen *floR* en plásmidos conjugativos en animales y humanos.



2.5 DISCUSIÓN

Comparamos las tasas de resistencia, distribuciones de genotipos y ARG presentes en aislados de *E. coli* de poblaciones humanas y de pollos. Se identificaron 315 aislados de *E. coli* de humanos (n = 150) y pollos (n = 165), y los pollos mostraron las tasas más altas de fenotipos de MDR (63% frente a 37,3%) y BLEE (30,9% frente a 4%). La producción avícola es una de las industrias más grandes y extendidas en Perú, que utiliza grandes cantidades de diversos antimicrobianos críticos para la medicina humana (Page y Gautier, 2012; OMS, 2017a). A pesar de su importancia para el tratamiento y la prevención de enfermedades, su uso extendido y no regulado como promotores del crecimiento aumenta la presión selectiva para las bacterias MDR (Diarra y Malouin, 2014). Nuestros resultados destacan las posibles consecuencias de esta práctica en la producción avícola.

Dado que muchos países de ingresos bajos y medianos están ahora en transición a modelos industriales de producción animal, existe la preocupación de que la exposición extensa de los animales a los antibióticos pueda dar lugar a la "propagación" de bacterias resistentes y ARG a los seres humanos. Aunque la transferencia de ARG se ha estudiado ampliamente en organismos patógenos, la gran mayoría de los eventos de transferencia ocurren silenciosamente entre bacterias no patógenas en comunidades microbianas ambientales y asociadas al huésped (Smillie *et al.*, 2011; Pehrsson *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017). *E. coli* y los miembros de las *Enterobacteriaceae* están bien adaptados al entorno intestinal,

adquiriendo diversas funciones y ARG para colonizar a sus huéspedes (Szmolka y Nagy, 2013). Por lo tanto, es probable que los ARG puedan acumularse en cepas comensales para enriquecer el resistoma intestinal humano y luego movilizarse en cepas patógenas para volverse resistentes a múltiples fármacos (Penders *et al.*, 2013).

El aumento de la conciencia del consumidor mundial sobre cómo se produce la carne animal ha llevado cada vez más al establecimiento de granjas orgánicas y de pastoreo (Holtcamp, 2011). Este modelo de producción tiene como objetivo detener el uso generalizado de antibióticos como profilácticos y promotores del crecimiento en pollos bajo la premisa de que reducirá las tasas de RAM en las bacterias expuestas debido a la ausencia de esta presión selectiva (Tang *et al.*, 2017). Las tasas más bajas de RAM que se encuentran en los pollos orgánicos en comparación con los criados de manera convencional apoyan esta afirmación. Además, los aislados orgánicos de pollo fueron totalmente sensibles a la gentamicina, amoxicilina con ácido clavulánico, cefotaxima, cefepime, ceftazidima y cefoxitina; los tres primeros, junto con el florfenicol, se encuentran con frecuencia como ingredientes activos en premezclas locales disponibles comercialmente destinadas a la prevención de infecciones y la mejora del rendimiento del crecimiento.

Comparamos las tasas de resistencia, distribuciones de genotipos y ARG presentes en aislados comensales de *E. coli* de poblaciones humanas y de pollos. Se identificaron 315 cepas de *E. coli* de humanos (n = 150) y pollos (n = 165), y los

pollos mostraron tasas más altas de fenotipos de MDR (63% frente a 37,3%) y BLEE (30,9% frente a 4%). La producción avícola es una de las industrias más grandes y extendidas en Perú, que utiliza grandes cantidades de diversos antimicrobianos críticos para la medicina humana (Page y Gautier, 2012; OMS, 2017a). A pesar de su importancia para el tratamiento y la prevención de enfermedades, su uso extendido y no regulado como promotores del crecimiento aumenta la presión selectiva para las bacterias MDR (Diarra y Malouin, 2014). Nuestros resultados destacan las posibles consecuencias de esta práctica en la producción avícola.

Dado que muchos países en vías de desarrollo se encuentran en transición a modelos industriales de producción animal, existe la preocupación de que la exposición extensa de los animales a los antibióticos pueda dar lugar a la "propagación" de bacterias resistentes y ARG a los seres humanos. Aunque la transferencia de ARG se ha estudiado ampliamente en organismos patógenos, la gran mayoría de los eventos de transferencia ocurren silenciosamente entre bacterias no patógenas en comunidades microbianas ambientales y asociadas al huésped (Smillie *et al.*, 2011; Pehrsson *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017). *E. coli* y los miembros de las *Enterobacteriaceae* están bien adaptados al entorno intestinal, adquiriendo diversas funciones y ARG para colonizar a sus huéspedes (Szmolka y Nagy, 2013). Por lo tanto, es probable que los ARG puedan acumularse en cepas comensales para enriquecer el resistoma intestinal humano y luego mobilizarse en cepas patógenas para volverse resistentes a múltiples fármacos (Penders *et al.*, 2013).

El número de comunidades periurbanas ha aumentado drásticamente en las últimas décadas en Perú y otros países de ingresos bajos y medianos, a la par con los mercados vecinales mal regulados. A pesar de la supervisión de las autoridades reguladoras, muchos mercados pequeños funcionan clandestinamente para el sacrificio a fin de satisfacer la demanda de productos "frescos" de los consumidores. Estas preferencias de los consumidores, combinadas con otros factores externos, hacen que la industria avícola comercialice alrededor del 80% de su producción de pollo vivo (De León, 2009). En consecuencia, las prácticas de carnicería y manipulación de aves de corral en puestos de mercado y entornos relacionados (incluidos los hogares) plantean un riesgo de exposición a la contaminación cruzada fecal de las vísceras, una posible ruta de transferencia de *E. coli* de origen animal al intestino humano. A pesar de su estrecho contacto con los pollos y la manipulación regular de las vísceras, los aislados de *E. coli* de los vendedores de pollos no coincidieron completamente con los patrones de resistencia observados en los aislados de pollo; esto puede deberse en parte a que el uso de antibióticos para tratar infecciones humanas también determina los patrones de resistencia de *E. coli* en el intestino humano. Sin embargo, sí identificamos casos en los que se encontraron ST compartidos (por ejemplo, ST-10, ST-155, ST-48) tanto en los vendedores de pollos como en los pollos de mercado. *E. coli* es clasificada epidemiológicamente en secuenciotipos (ST) basado en la variabilidad de secuencias un número de loci conservados que permiten la discriminación a nivel de subespecies (Manges *et al.*, 2019). El ST-10 ha sido ampliamente reportado en el tracto intestinal de humanos, animales y el medio ambiente (Day *et al.*, 2019, Reid *et al.*, 2017). Por otro lado, el ST-155 ha sido reportado también en humanos

y animales, siendo asociado a transmisión zoonótica de variantes productoras de BLEE (Wang *et al.*, 2014; Grall *et al.*, 2015; Skurnik *et al.*, 2016). De manera similar, el ST-48 ha sido aislado de pollos y granjas, habiéndose reportado transmisión a humanos con fenotipos MDR (Rozwandowicz *et al.*, 2018; Clément *et al.*, 2019; Aworth *et al.*, 2019; Aworth *et al.*, 2021).

El florfenicol, que no está aprobado para su uso en humanos, fue el único antibiótico probado para el cual los niveles de resistencia fueron significativamente más altos en los vendedores de pollos que en otros grupos humanos. Encontramos resistencia al florfenicol en el 43% de los aislados de pollo no orgánicos y en el 17% de los vendedores de pollo. El gen *floR* se encontró en 17 genomas de *E. coli* de pollos y cinco de humanos y se asoció con plásmidos conjugativos que eran muy similares entre humanos y animales aislados (Figura 5). La alta diversidad de plásmidos portadores de *floR* y el hecho de que fueron identificados en 15 ST diferentes pueden reflejar una fuerte presión selectiva para mantener la resistencia al florfenicol en las poblaciones de *E. coli* de pollo. El gen *floR* confiere resistencia al florfenicol y al cloranfenicol a través de un mecanismo de bomba de eflujo (Bischoff *et al.*, 2005; Braibant *et al.*, 2005; Van Hoek *et al.*, 2011) y se transfiere fácilmente entre linajes de bacterias Gramnegativas a través de plásmidos conjugativos. (Kruse y Sorum, 1994; Singer *et al.*, 2004). Presumimos que la resistencia al florfenicol en humanos puede ocurrir a través de la colonización por cepas *floR* positivas de origen animal o la conjugación de plásmidos de cepas animales en comensales humanos, ambos facilitados por el manejo inadecuado de la carne de pollo por parte de vendedores y consumidores. Esto identifica a *floR* como un marcador potencial de resistencia a los antibióticos en humanos que se

puede rastrear directamente al uso de antibióticos en animales. La resistencia a los fármacos de último recurso como la colistina y los carbapenémicos está aumentando en todo el mundo (Peyclit *et al.*, 2019). El gen blaKPC-3 y la resistencia fenotípica al meropenem se encontraron en un aislado de pollo comercializado. Además, se encontraron tres aislados que albergaban el gen mcr-1 de resistencia a la colistina en humanos y pollos. La colistina es utilizada como una opción terapéutica para tratar infecciones causadas por bacterias resistentes a los carbapenémicos (Nation *et al.*, 2017).

A pesar de nuestra suposición inicial de que los bebés presentarían niveles más bajos de resistencia en comparación con los adultos, tenían perfiles de resistencia similares a los de los vendedores de pollos y tenían tasas más altas de resistencia fenotípica a amoxicilina y trimetoprim / sulfametoxazol que los adultos. Esto respalda los hallazgos de un estudio anterior en Perú que encontró que la edad avanzada protege contra la resistencia (Kalter *et al.*, 2010). Los niños son propensos a jugar en el suelo y tienen un mayor riesgo de colonización con enteropatógenos a través de la ruta fecal-oral (Fuhrmann *et al.*, 2016). El efecto puede agravarse en esta comunidad, donde el agua y el saneamiento adecuado no están disponibles en todos los hogares. Las encuestas recopiladas durante un estudio de cohorte en curso en VES (datos no publicados) indican que los antibióticos más utilizados en este grupo fueron amoxicilina y amoxicilina con ácido clavulánico, seguidos de trimetoprim / sulfametoxazol y eritromicina, consumidos entre los dos primeros meses y hasta los dos años en una tasa de 3.8 cursos por niño-año (Nadimpalli *et al.*, 2020). Como era de esperar, el 63,9% de los bebés aislados en nuestro estudio

mostraron resistencia a la amoxicilina y el 52,5% a la trimetoprima / sulfametoxazol. Otros antibióticos administrados a este grupo pero sin evidencia de resistencia fueron cefalexina, claritromicina, azitromicina, ciprofloxacina y furazolidona. Las campañas de educación a nivel comunitario sobre la concienciación sobre los antibióticos, junto con las intervenciones de cambio de comportamiento, podrían ayudar a limitar la transmisión de ARG y bacterias resistentes a los bebés.

Muchos informes han identificado altos niveles de RAM en animales destinados al consumo y carnes al por menor en los EE. UU. (Davis *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2018), China (Liu *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2018; He *et al.*, 2019) y Europa (Gelbíčová *et al.*, 2019; Mellor *et al.*, 2019). Otros estudios han evaluado la diseminación de ARG entre aislados de origen humano, animal y ambiental en PIBM (Nadimpalli *et al.*, 2019; Subbiah *et al.*, 2020). Nuestro estudio es innovador porque comparamos animales criados con y sin antibióticos, junto con humanos con diferentes niveles de exposición a la carne de pollo, y usamos WGS para identificar aislados resistentes y ARG entre poblaciones humanas y animales dentro de la misma comunidad. Sin embargo, presenta limitaciones: (i) Nos enfocamos exclusivamente en *E. coli*, y nuestros resultados no tienen en cuenta los efectos en otras especies comensales ni la transferencia de elementos genéticos móviles (MGE) entre ellas; (ii) Incluimos solo un aislado para cada sujeto, por lo que no pudimos evaluar la diversidad de *E. coli* dentro del hospedador; (iii) El cronograma para nuestra recolección de muestras de hece+s humanas y aislados intestinales y cloacales de pollo no se superponen en gran parte del estudio; (iv) La secuenciación basada en Illumina generó lecturas cortas que dificultaron la reconstrucción de secuencias de

plásmido completas. El uso de métodos de secuenciación de lectura larga debería mejorar enormemente los ensamblajes y proporcionar nuevos conocimientos sobre el intercambio y la recombinación de elementos genéticos móviles entre hosts.

Hay muy pocos estudios que puedan relacionar claramente el uso de antibióticos en las granjas con la resistencia a los antibióticos en humanos, en parte debido a la falta de encuestas nacionales sobre el consumo de antibióticos en las granjas y al alto grado de HGT que ocurre en los genomas de enterobacterias (Smillie *et al.*, 2011; Partridge *et al.*, 2018). El Plan de acción mundial de 2017 de la OMS sobre la resistencia a los antimicrobianos exige el fortalecimiento de las capacidades nacionales de vigilancia (OMS, 2017b). Los datos de vigilancia sobre el uso de antibióticos y las tasas de resistencia en las aves de corral pueden servir a las partes interesadas para tomar decisiones y políticas basadas en la evidencia, como es el caso de los países de ingresos altos. Los estudios de vigilancia de RAM realizados en América del Sur son escasos en comparación con otros PIBM (Bazzo *et al.*; Bantar *et al.*, 2000; García *et al.*, 2012; Baker *et al.*, 2017). A medida que el resistoma antibiótico se expande mediante la acumulación de casetes de genes o plásmidos novedosos, y con una mayor transferencia de ARG de animales a cepas humanas comensales, los fármacos de último recurso como la colistina y los carbapenémicos se volverán cada vez más ineficaces para combatir los microorganismos patógenos.

Este estudio destaca la posible diseminación de genes de resistencia en *Escherichia coli* de pollos comerciales a poblaciones humanas. Se necesita un cambio de política

para frenar el uso indebido de antibióticos en la agricultura, que en el pasado ha logrado reducir la carga ambiental de resistencia sin dañar la productividad de los agricultores (Aarestrup *et al.*, 2010; Marshall y Levy, 2011). Se estima que Perú aumentará el uso de antimicrobianos en el ganado en un 160% de 2010 a 2030 (Van Boeckel *et al.*, 2015). Para contrarrestar este escenario, el Plan de Acción Nacional Multisectorial para Combatir la Resistencia a los Antimicrobianos está configurado para proporcionar un conjunto de hitos que involucran regulaciones del uso de antimicrobianos en los animales destinados a la alimentación para 2021 (MINSa, 2019). Apoyamos la opinión de que restringir la suplementación no terapéutica de antibióticos en la alimentación animal y regular las clases de fármacos utilizados para tratar enfermedades ayudará a prevenir la diseminación de la RAM de los animales a los seres humanos. Nuestra investigación puede servir como base para futuras intervenciones que permitan la disminución del uso de antibióticos en la producción animal y limitar la propagación de la RAM en el medio ambiente.

III. Capítulo 2.

Enterobacterias ambientales obtenidas de aguas residuales comunitarios e intrahospitalarios en dos regiones del Perú

3.1 INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es una amenaza para la salud pública en constante crecimiento (Murray *et al.*, 2022). La mortalidad y la carga general de la enfermedad debido al fracaso del tratamiento o las complicaciones adversas se atribuyen principalmente a un grupo de patógenos bacterianos líderes, como *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) y resistentes a los carbapenémicos, entre otras *Enterobacteriaceae* (Tacconelli *et al.*, 2018). A pesar de que la RAM es una respuesta evolutiva en los microorganismos, muchos factores impulsan su rápida aparición y transmisión a nivel humano, comunitario, animal y ambiental, lo que facilita la propagación de organismos y genes resistentes a los antimicrobianos (ARG) (Holmes *et al.*, 2016), a través de varias vías, incluido el intercambio directo o la infección, el uso de estiércol y aguas residuales en la agricultura y alimentos y agua potable contaminados. Los riesgos y el impacto de la RAM en los países de ingresos medianos bajos son particularmente altos (Murray *et al.*, 2022) y están asociados con la falta de programas establecidos de administración de antibióticos e infraestructura de laboratorio en los hospitales, higiene y saneamiento deficientes en la comunidad, tratamiento inadecuado de aguas residuales, uso inadecuado de medicamentos antimicrobianos debido a la facilidad de acceso y toma de decisiones desinformada (Collignon *et al.*, 2018; Laxminarayan *et al.*, 2013; Morgan *et al.*, 2011; M. L. Nadimpalli *et al.*, 2020; Ramay *et al.*, 2020), escorrentía agrícola, uso no regulado de promotores de crecimiento antimicrobianos (Van Boeckel *et al.*, 2015, 2019) y altas densidades de población en la cría de animales (Graham *et al.*,

2019). Varios de estos factores resaltan la importancia de integrar un enfoque de One Health en las estrategias de mitigación (Nadimpalli *et al.*, 2018).

El medio ambiente sirve como una ruta clave en la propagación de bacterias resistentes a los antibióticos, ARG y metabolitos de antibióticos. Estos últimos, ejercen una presión selectiva, a través de la contaminación y la excreción de desechos, principalmente en las comunidades microbianas acuáticas (Larsson y Flach, 2022). Los ciclos urbanos del agua, específicamente los sistemas de aguas residuales juegan un papel importante en la difusión ambiental de la RAM (Sanseverino *et al.*, 2018), lo que sugiere una posible capacidad como embalses (Fouz *et al.*, 2020). Aunque la gestión y el tratamiento de las aguas residuales están diseñados para reducir o eliminar los organismos patógenos (Henze *et al.*, 2008), la gran mayoría de las estrategias de las plantas de tratamiento de aguas residuales modernas no tienen como objetivo la eliminación de los ARG (Alexander *et al.*, 2020; Majeed *et al.*, 2021; Sekizuka *et al.*, 2018; Zieliński *et al.*, 2021).

El monitoreo de la resistencia a los antimicrobianos en diferentes entornos, a diferentes escalas, es crucial para fortalecer el conocimiento de aislados circulantes y emergentes, e identificar brechas de información para informar las políticas de salud pública (Hay *et al.*, 2018; OMS, 2015). Muchos obstáculos restringen las capacidades de vigilancia de la RAM en los países de ingresos bajos y medianos, como financiación limitada, infraestructura de laboratorio, personal capacitado, consumibles y reactivos, así como control de calidad y comunicación deficientes entre el personal médico y de laboratorio (Iskandar *et al.*, 2021). Las encuestas multinacionales dirigidas al estudio de la RAM en Perú son aún escasas, a pesar del esfuerzo de muchos académicos (García *et al.*, 2012; García, Rijnders, *et al.*, 2012;

Hartinger *et al.*, 2021; Ochoa *et al.* al., 2009; Pollett *et al.*, 2012) e instituciones públicas de salud (MINSA, 2017, 2019; Quino *et al.*, 2022; Santos-Lazaro *et al.*, 2021).

3.2 OBJETIVO

Hipotetizamos que existe una transmisión de ARGs y bacterias resistentes entre aguas residuales hospitalarias y no hospitalarias en Iquitos. Para probarlo, nuestro objetivo fue evaluar la transmisión de ARG y *Enterobacteriaceae* resistentes entre las aguas residuales hospitalarias y no hospitalarias en Iquitos, en comparación con las fuentes de aguas residuales en Lima.

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

Sitios de estudio

Iquitos. Se tomaron muestras de drenajes de acceso a la calle de siete barrios diferentes de la ciudad de Iquitos para detectar aguas residuales (Figura 1A). Los puntos de muestreo fueron seleccionados por su distancia en relación con los dos principales hospitales públicos de la ciudad (Figura 1B). Recolectamos las aguas residuales hospitalarias de tres pozos de alcantarillado diferentes en los sistemas de alcantarillado de ambos hospitales, correspondientes a la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), Departamento de Emergencia (SU) y alcantarillado principal, antes de cualquier tratamiento de agua o conexión con el alcantarillado sanitario del municipio. Las ubicaciones y coordenadas están detalladas en el material suplementario.

Lima. Obtuvimos muestras de aguas residuales de seis diferentes drenajes de acceso a la calle en una comunidad periurbana ubicada en el distrito de Villa El Salvador (VES) en el sur de Lima, capital de Perú, para evaluar y comparar el escenario AMR en Iquitos. De la misma manera, recolectamos las aguas residuales hospitalarias de tres hospitales diferentes en el centro y norte de Lima (Figura 1C) correspondientes a Unidad de Cuidados Intensivos, Urgencias, Departamento de Cirugía y los principales puntos de acceso al alcantarillado en cada uno. Las ubicaciones y coordenadas están detalladas en el material suplementario.

Muestras de aguas residuales. Se tomaron muestras de aguas residuales de drenajes de calles y hospitales ubicados en Iquitos y Lima entre 2016 y 2018. Se recogieron dos tubos Falcon de 50 ml con 25 ml de agua residual cada uno de cada punto de muestreo cada vez. Las muestras fueron transportadas a 4°C y procesadas el mismo día del muestreo, de acuerdo con los Métodos Estándar para el Examen de Agua y Aguas Residuales (Rice *et al.*, 2012).

Cultivo y aislamiento. Todas las muestras se sembraron en MacConkey Agar para la diferenciación de *Enterobacteriaceae*. Se realizaron pruebas bioquímicas estándar para su identificación. Los que se confirmaron como fermentadores de glucosa y oxidasa negativos (n=388) se incluyeron en el estudio y se almacenaron en caldo tripticasa de soja (TSB) con glicerol y se almacenaron a -20 °C hasta la extracción de ADN.

Pruebas de susceptibilidad a antibióticos. Las pruebas de difusión en disco se realizaron bajo los estándares CLSI M100, utilizando las definiciones de susceptible, intermedio y resistente (CLSI, 2018) para todos los aislados. Se probaron los siguientes antibióticos: cloranfenicol, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, gentamicina, azitromicina, sulfa-trimetoprima, tetraciclina, meropenem, amoxicilina, amoxicilina-clavulanato, cefalotina, ceftazidima, ceftazidima y cefepima. La detección de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) se realizó mediante la prueba de sinergia de doble disco siguiendo los estándares de EUCAST (EUCAST, 2017).

Extracción de ADN y Secuenciamiento de Genoma Completo. El ADN se extrajo de 1 ml de cultivo de TSB usando kits de purificación de ADN GeneJet Genomic (Thermo Scientific, Waltham, MA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se seleccionaron aleatoriamente un total de 75 aislados. Dividimos toda la muestra en cuatro estratos: comunidades y hospitales de Lima e Iquitos. Luego, dentro de cada grupo, dividimos nuevamente en dos estratos: aislados multirresistentes y no resistentes, terminando con un subconjunto aleatorio de 10 aislados por grupo. Las librerías genómicas se prepararon con el kit Nextera XT (Illumina, San Diego, CA) y se secuenciaron en un instrumento Illumina Miseq generando lecturas de extremos emparejados de 250 pb.

Ensamblaje y análisis del genoma. Las lecturas de extremos emparejados de Illumina se analizaron con el flujo de trabajo Nullarbor v2.0 (Seemann *et al.*, 2019) utilizando parámetros predeterminados. Las lecturas se ensamblaron *de novo* utilizando SPAdes v 3.6.2 (Bankevich *et al.*, 2012). La tipificación de secuencias multilocus (MLST) se realizó utilizando Nullarbor y la base de datos de alelos PubMLST (Jolley *et al.*, 2018) (<https://pubmlst.org/>). Los genes de resistencia a los antibióticos se detectaron usando Abricate (v 0.8) con la base de datos CARD (Alcock *et al.*, 2020) contra ensamblajes implementados a través de la tubería de Nullarbor. Se incluyeron genes antimicrobianos con un valor de corte >95% para la identidad y una cobertura del 100%. Se utilizaron ensamblajes anotados por Prokka (Seemann, 2014) como entrada para Roary v3.6.0 (Page *et al.*, 2015) y Parsnp v1.6.2 (Treangen *et al.*, 2014) para determinar el pan-genoma y realizar un gen central alineación de todos los aislados secuenciados utilizando un umbral de

identidad blastp del 95 %. Roary y Parsnp generaron árboles filogenéticos con un bootstrap de 100 repeticiones y usando un genoma publicado de *E. fergusonii* y *Klebsiella pneumoniae* HS11286 para enraizar los árboles filogenéticos de *E. coli* y *Klebsiella*, respectivamente. Los árboles fueron visualizados y formateados utilizando Interactive Tree of Life (iTOL v5) (Letunic y Bork, 2021).

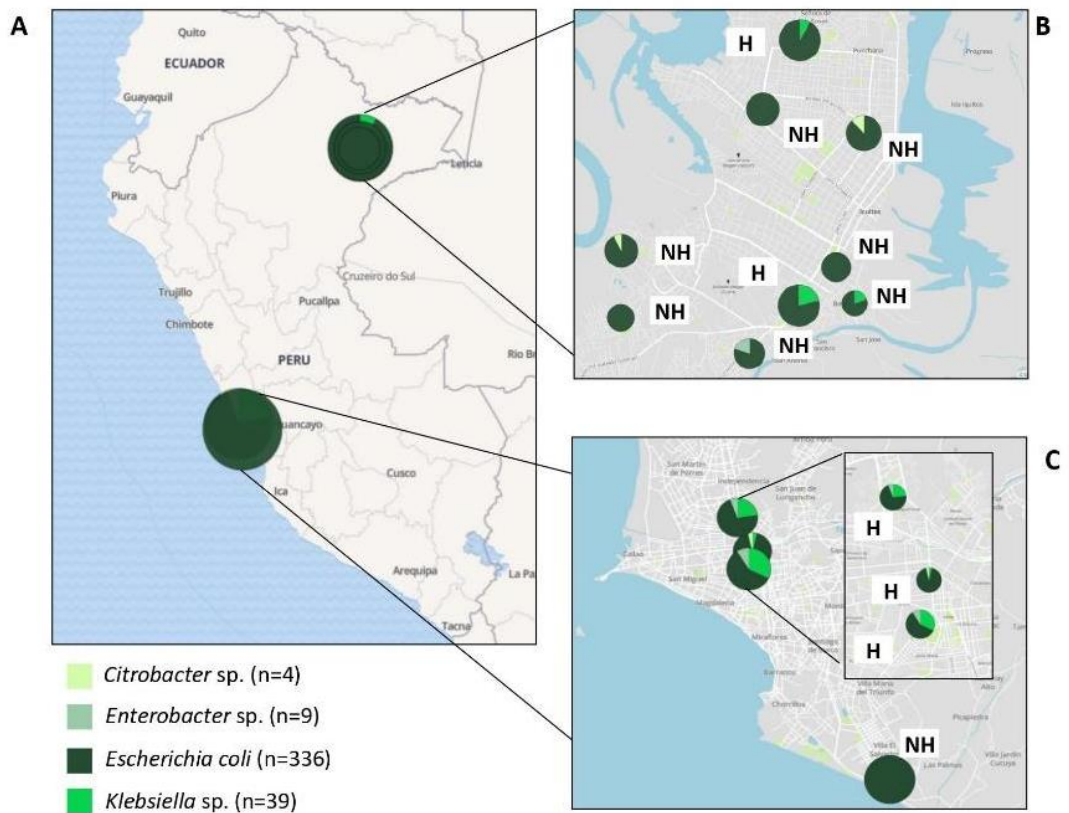
Análisis estadístico. Se utilizaron los estándares CLSI para categorizar los aislados como susceptibles, intermedios o resistentes. Se tabuló la proporción de aislados resistentes para cada grupo: no hospitalario u hospitalario de Lima e Iquitos. El análisis bivariado se realizó mediante la prueba de Chi-cuadrado o la Prueba Exacta de Fisher según convenga. El manejo de datos y el análisis estadístico se realizaron con un nivel de confianza del 95% utilizando STATA 16 (Stata Corp., College Station, TX) y R (versión 3.5.2).

3.4 RESULTADOS

Identificación de aislados

Se obtuvieron un total de 388 de enterobacterias en Iquitos (147, hospitalarios=75, no hospitalarios=72) y Lima (241, hospitalarios=118 y no hospitalarios=123). Según sus características bioquímicas, estos aislados fueron identificados como 336 *E. coli*, 39 *Klebsiella* sp., 9 *Enterobacter* sp. y 4 *Citrobacter* sp. En la Figura 1 se detalla la distribución geográfica de los aislados en Iquitos y Lima.

Figura 1. Distribución geográfica de los puntos de muestreo en Iquitos y Lima.



El color representa las especies bacterianas identificadas. El número total de aislados por especie está indicado en la leyenda. A: total, B: Iquitos, C: Lima. H: hospitalarios, NH: no hospitalarios.

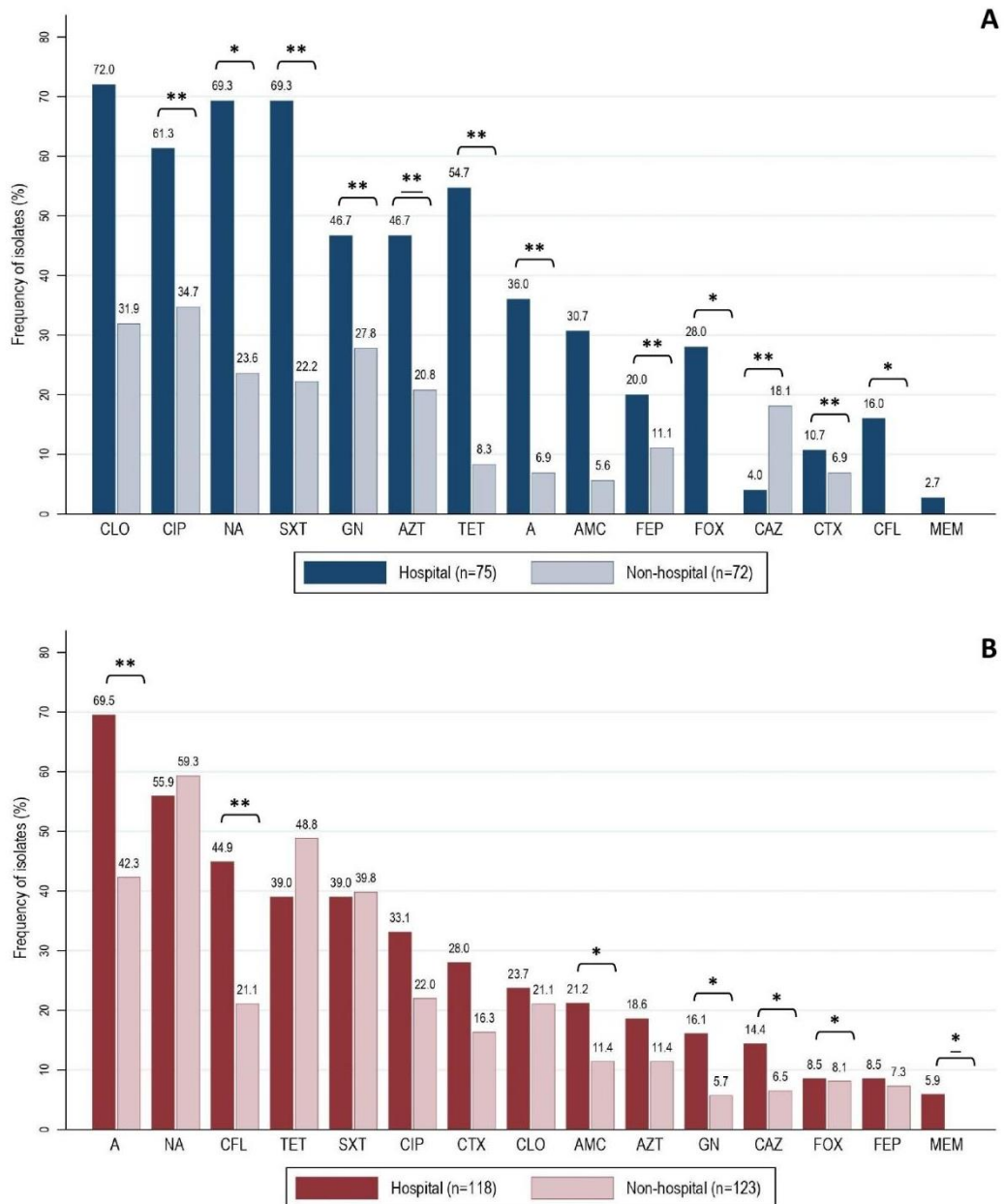
Susceptibilidad antimicrobiana

Iquitos. El 40.8% (60/147) de los aislados fue identificado como MDR, con mayor frecuencia en las aguas residuales de ambientes hospitalarios (64%, 48/75) en comparación con los ambientes no hospitalarios (16.7%, 12/72), siendo esta diferencia estadísticamente significativa (Chi-cuadrado, $p < 0.001$). De manera similar, los aislados productores de BLEE fueron más frecuentes en aguas residuales hospitalarias (41.3% vs. 5.6%, Chi-cuadrado, $p < 0.001$). En general, los niveles de resistencia fueron más altos en los aislados de aguas residuales hospitalarias en comparación con las no hospitalarias, siendo las frecuencias más elevadas para Amoxicilina (72% vs. 31.9%, Chi-cuadrado, $p < 0.001$), Sulfatrimetoprim (69.3% vs. 22.2%, Chi-cuadrado, $p < 0.001$), Tetraciclina (69.3% vs. 23.6%, Chi-cuadrado, $p < 0.001$), Ácido nalidíxico (61.3% vs. 34.7%, Chi-cuadrado, $p < 0.001$) y Ciprofloxacina (54.7% vs. 8.3%, Chi-cuadrado, $p < 0.001$). Solamente los aislados de aguas residuales hospitalarias presentaron resistencia a meropenem, con un 2.7% (2/75) (Figura 2, A).

Lima. Los aislados obtenidos a partir de muestras de aguas residuales de hospitales presentaron una mayor frecuencia de fenotipo MDR y producción de BLEE, sin embargo, estas diferencias no fueron significativas (Chi-cuadrado, $p > 0.05$). Los niveles de resistencia fueron más altos en los aislados provenientes de aguas hospitalarias, siendo más frecuente para Amoxicilina (69.5% vs. 42.3%, Chi-cuadrado, $p < 0.001$), Cefalotina (44.9% vs. 21.1%, Chi-cuadrado, $p < 0.001$), Cefotaxima (28% vs. 16.3%, Chi-cuadrado, $p = 0.028$) y Amoxicilina con ácido clavulánico (21.2% vs. 11.4%, Chi-cuadrado, $p = 0.039$). La resistencia a meropenem fue identificada únicamente en aislados hospitalarios, siendo esta

diferencia estadísticamente significativa (5.9% vs. 0%, Exacta de Fisher, $p=0.006$) (Figura 2, B).

Figura 2. Resistencia fenotípica de 388 enterobacterias aisladas de aguas residuales de ambientes hospitalarios y no hospitalarios en Iquitos (A) y Lima (B).



TET: tetraciclina, AMX: amoxicilina, SXT: Sulfatrimetoprim, NA: ácido nalidíxico, CLO:

cloranfenicol, CF: cefalotina, CIP: ciprofloxacina, CTX: cefotaxima, AZT: azitromicina, GN: gentamicina, AMC: amoxicilina con ácido clavulánico, FEP: cefepime, CAZ: ceftazidima, FOX: cefoxitina, MEM: meropenem. *: $p < 0.05$ Chi-cuadrado; **: $p < 0.001$ Chi-cuadrado; *: $p < 0.05$, Exacta de Fisher; **: $p < 0.001$, Exacta de Fisher.

Iquitos vs. Lima. Los niveles de resistencia más altos fueron identificados en los aislados provenientes de fuentes hospitalarias en Iquitos; sin embargo, los aislados no hospitalarios provenientes de la misma región fueron los que presentaron los menores niveles de resistencia en comparación con los aislados de Lima. Al comparar los resultados entre Lima e Iquitos, solo se evidenciaron diferencias significativas para cloranfenicol (22.4% vs. 8.8%, Chi-cuadrado, $p < 0.001$) y gentamicina (10.8% vs. 21.8%, Chi-cuadrado, $p = 0.003$). La Tabla 1 contiene los detalles de las comparaciones estadísticas entre los resultados de los aislados de hospitalarios y no hospitalarios de Lima e Iquitos.

Tabla 1. Perfiles de resistencia y análisis bivariado de enterobacterias de aguas residuales hospitalarias y no hospitalarias en Iquitos y Lima.

Resultados	Lima							Iquitos							Total		p ^c
	Total (n=241)		Hospital (n=118)		No hospital (n=123)		p ^a	Total (n=147)		Hospital (n=75)		No hospital (n=72)		p ^b	Total (n=388)		
	N	%	N	%	N	%		N	%	N	%	N	%		N	%	
MDR																	
Sí	118	49.0	65	55.1	53	43.1	0.063	60	40.8	48	64.0	12	16.7	<0.001	178	45.9	0.118
BLEE																	
Sí	51	21.2	27	22.9	24	19.5	0.522	35	23.8	31	41.3	4	5.6	<0.001	86	22.2	0.542
Anfenicoles																	
Cloranfenicol	54	22.4	28	23.7	26	21.1	0.630	13	8.8	8	10.7	5	6.9	0.427	67	17.3	0.001
Quinolonas																	
Ciprofloxacina	66	27.4	39	33.1	27	22.0	0.125	47	32.0	41	54.7	6	8.3	<0.001	113	29.1	0.335
Ácido nalidíxico	139	57.7	66	55.9	73	59.3	0.591	71	48.3	46	61.3	25	34.7	0.001	210	54.1	0.072
Sulfonamidas																	
Sulfatrimetoprim	95	39.4	46	39.0	49	39.8	0.892	68	46.3	52	69.3	16	22.2	<0.001	163	42.0	0.185
Aminoglucósidos																	
Gentamicina	26	10.8	19	16.1	7	5.7	0.009	32	21.8	27	36.0	5	6.9	<0.001	58	14.9	0.003
Macrólidos																	
Azitromicina	36	14.9	22	18.6	14	11.4	0.114	27	18.4	23	30.7	4	5.6	<0.001*	63	16.2	0.374
Tetraciclinas																	
Tetraciclina	106	44.0	46	39.0	60	48.8	0.126	69	46.9	52	69.3	17	23.6	<0.001	175	45.1	0.570

Pencilinas																	
Amoxicilina	134	55.6	82	69.5	52	42.3	<0.001	77	52.4	54	72.0	23	31.9	<0.001	211	54.4	0.537
Amoxicilina con ácido clavulánico	39	16.2	25	21.2	14	11.4	0.039	23	15.6	15	20.0	8	11.1	0.138	62	16.0	0.889
Cefalosporinas																	
Cefepime	19	7.9	10	8.5	9	7.3	0.739	12	8.2	12	16.0	0	0.0	<0.001	31	8.0	0.922
Cefoxitina	20	8.3	10	8.5	10	8.1	0.923	16	10.9	3	4.0	13	18.1	0.006	36	9.3	0.394
Ceftazidima	25	10.4	17	14.4	8	6.5	0.044	21	14.3	21	28.0	0	0.0	<0.001	46	11.9	0.248
Cefotaxima	53	22.0	33	28.0	20	16.3	0.028	37	25.2	35	46.7	20	27.8	<0.001	90	23.196	0.472
Cefalotina	79	32.8	53	44.9	26	21.1	<0.001	50	34.0	35	46.7	15	20.8	0.001	129	33.247	0.802
Carbapenémicos																	
Meropenem	7	2.9	7	5.9	0	0.0	0.006*	2	1.4	2	2.7	0	0.0	0.497*	9	2.3196	0.327

Chi-cuadrado, nivel de confianza de 95%

*Prueba Exacta de Fisher, nivel de confianza de 95%

MDR: multidrogo resistente, BLEE: Betalactamasas de Espectro Extendido

p^a: hospital vs. no hospital, Lima

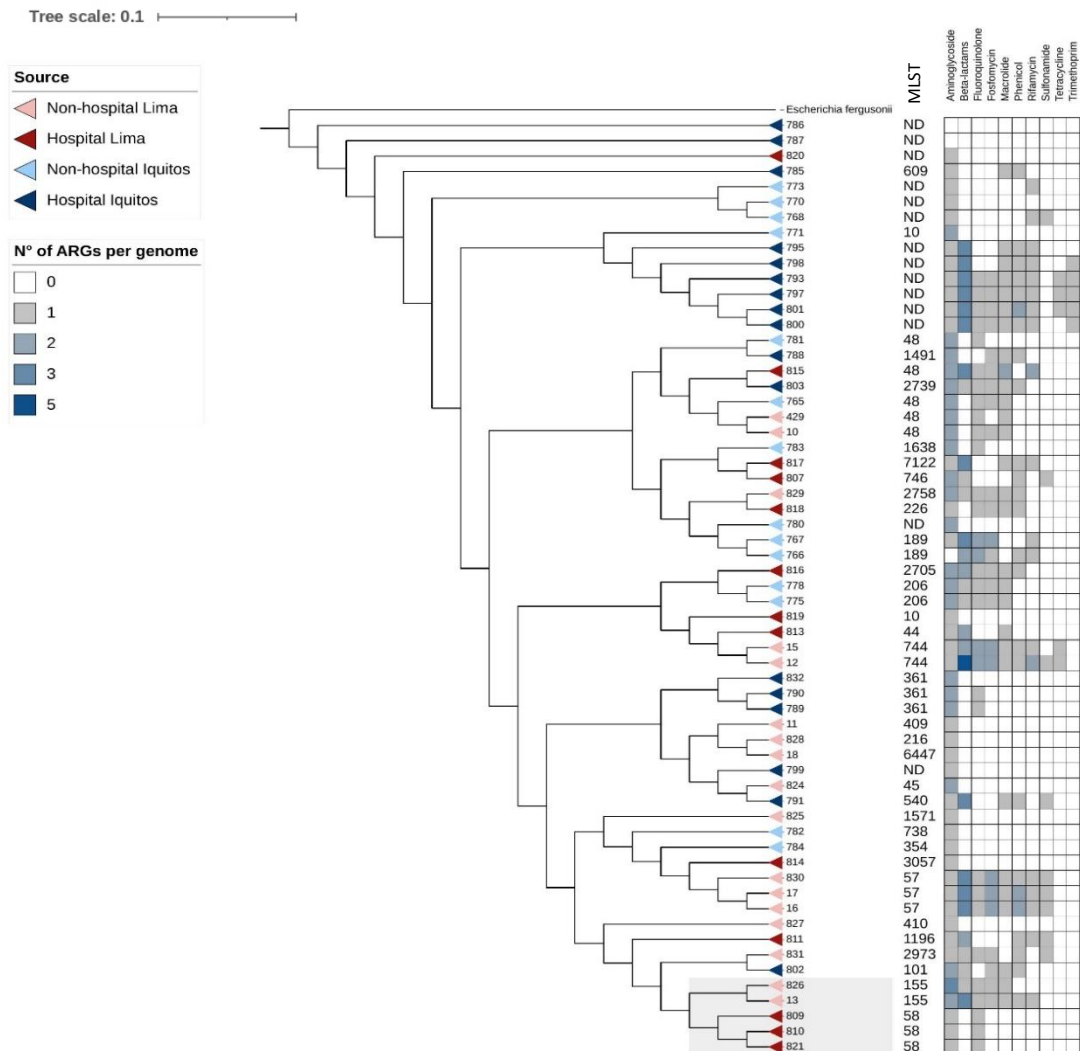
p^b: hospital vs. no hospital, Iquitos

p^c: Iquitos vs. Lima

Análisis genómico

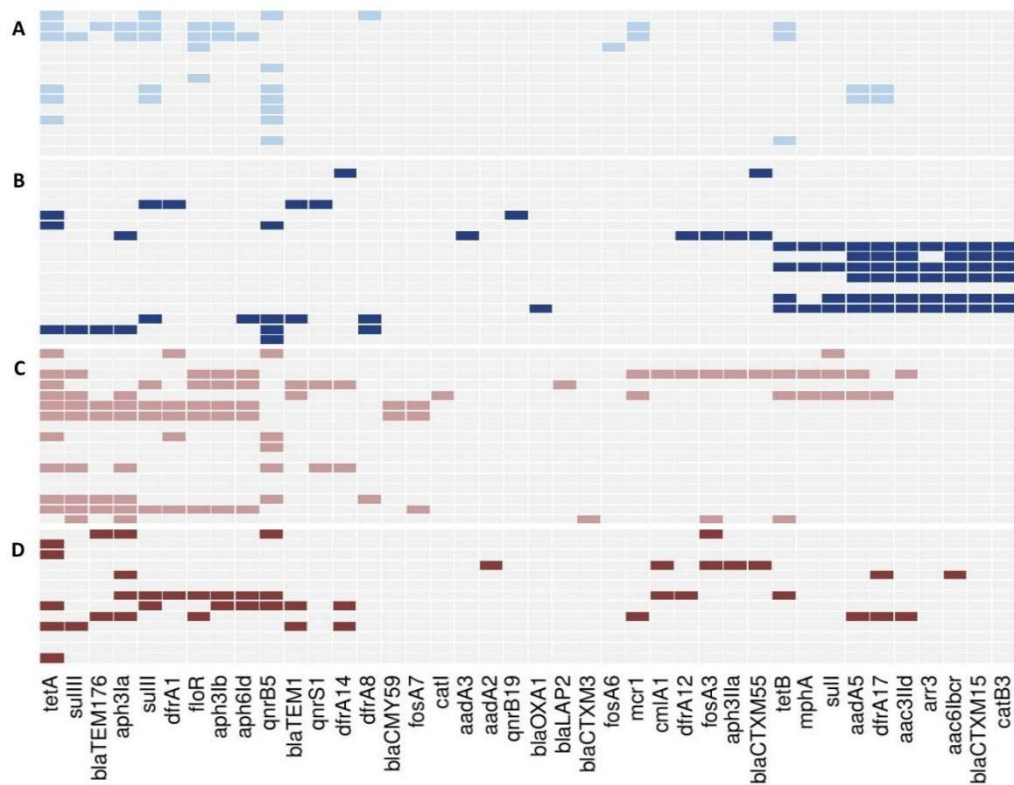
Escherichia coli. Se seleccionó de manera aleatoria un subgrupo de 61 aislados de *E. coli* para el secuenciamiento del genoma completo, estratificando según origen y fenotipo MDR. Para evaluar la similitud genómica entre los aislados de *E. coli*, construimos un árbol filogenético de máxima verosimilitud a partir de la alineación del pangenoma y calculamos todas las distancias SNP por pares. Identificamos 33 secuencias tipos (ST), siendo los más frecuentes ST-48, ST-206, ST-744, ST-289 y ST-361 (Figura 3).

Figura 3. Árbol filogenético por Máxima Verosimilitud de los genomas de *E. coli* (n=61).



Se identificaron 315 hits de ARG y 41 ARG únicos en el conjunto de datos de *E. coli* (Figura 4) con una media de 5,2 genes (IC del 95%: 4.1-6.2) por aislado. Los ARG detectados se asocian con resistencia a aminoglucósidos, betalactámicos, fluroquinolonas, fosfomicinas, macrólidos, fenicoles, rifamicinas, sulfonamidas, metoxazol y tetraciclinas. El número de ARGs por aislado que confiere resistencia a cada grupo de antibióticos se encuentra graficado en la Figura 3. Se identificaron clústeres entre aislados de *E. coli* provenientes de aguas residuales de hospitales y no hospitales en Lima (Figura 3, resaltado en gris).

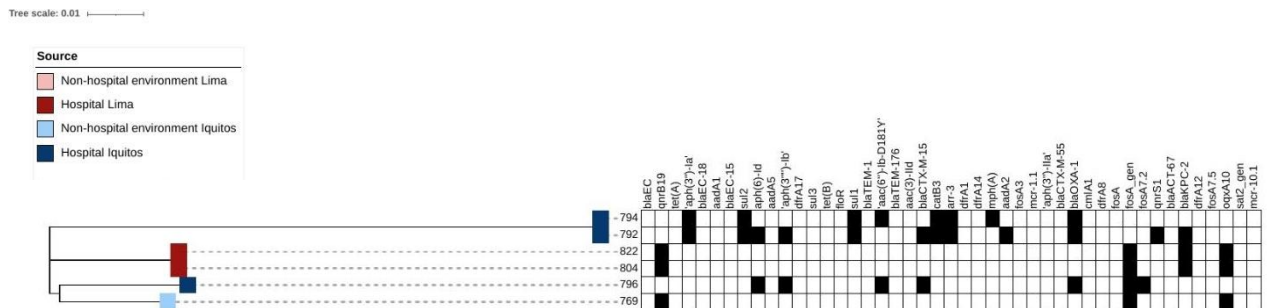
Figura 4. Genes de resistencia detectados en los genomas de *E. coli* (n=61) secuenciados. A: no hospital, Iquitos, B: hospital, Iquitos, C: no hospital, Lima, D: hos



El 6.6% (4/61) de los genomas de *E. coli* presentó el gen blaCTXM-55 asociado con la producción de BLEE. Este fue identificado tanto en Iquitos (hospital, n=2) y Lima (hospital, n=1 y no hospital, n=1). También se encontraron genes que confieren resistencia a antibióticos de último recurso como colistina. El gen mcr-1 se encontró en 5 aislados en Iquitos (no hospital, n=1) y Lima (hospital, n=1 y no hospital, n=2).

***Klebsiella* sp.** Similar a lo elaborado para *E. coli*, construimos un árbol filogenético de máxima verosimilitud a partir de la alineación del pangenoma de los seis genomas de *Klebsiella*, siendo identificados como *K. michiganensis* (n=2), *K. pneumoniae* (n=1), *K. quasipneumoniae* (n=2), y *K. variicola* (n=1). Se identificaron diversos ARGs asociados a resistencia a diferentes grupos de antibióticos (Figura 5). El 50% (3/6) de los genomas secuenciados presentó el gen bla_{KPC-1} que confiere resistencia a carbapenémicos. Estos fueron encontrados en los dos genomas de *K. quasipneumoniae* y en uno de *K. michiganensis*.

Figura 5. Árbol filogenético por Máxima Verosimilitud de los genomas de *Klebsiella* sp (n=6).



3.5 DISCUSIÓN

El estudio provee información novedosa sobre RAM en enterobacterias y variedad de ARGs a los principales grupos de antibióticos presentes en aguas residuales hospitalarias y no hospitalarias en Lima e Iquitos, dos de las ciudades más grandes del Perú. Se identificaron niveles altos de resistencia en aguas residuales hospitalarias, sin embargo, la frecuencia de bacterias resistentes también fue alta en aguas residuales de ambientes no hospitalarios. Los cuerpos acuáticos son uno de los nichos ecológicos más importantes, en los que tienen lugar numerosos fenómenos biológicos (Baquero *et al.*, 2008). Así, la gran diversidad bacteriana y su contenido génico tienen las condiciones óptimas para interactuar y generar asociaciones nuevas. Estas poblaciones bacterianas pueden eventualmente llegar a otros ambientes, actuando como importantes reservorios y vehículos para los mecanismos de resistencia a los antibióticos (Baquero *et al.*, 2008). Los microbiomas en aguas residuales son diversos, no solo en términos de especies bacterianas sino también en linajes y agrupaciones de una misma especie (Vaz-Moreira *et al.*, 2014). Estas poblaciones presentan su propio contenido de resistencia, aunque la información en estos nichos aún es escasa. Los residuos hospitalarios ofrecen una presión selectiva a las poblaciones microbianas, las mismas que pueden diseminarse rápidamente y ser capaces de colonizar e infectar poblaciones humanas y animales, representando un riesgo para la salud pública (Kümmerer, 2008; Hernando-Amado, 2019).

El tratamiento de las aguas residuales de ambientes hospitalarios es crucial para prevenir la propagación de bacterias resistentes y genes de resistencia al medio

ambiente (Karkman *et al.*, 2017; Alexander *et al.*, 2020). Aunque la vigilancia de la RAM en entornos clínicos y animales está bien establecida en la mayoría de los países, la vigilancia en aguas residuales todavía está en desarrollo (Huijbers *et al.*, 2019), acrecentándose el vacío en países de medianos y bajos ingresos como el Perú. Los aislados recuperados de hospitales de la región Iquitos presentaron los niveles de resistencia más altos, con diferencias significativas para casi todos los antibióticos testeados. Lima, la capital del Perú, ha sido objeto de la mayoría de los estudios dirigidos a demostrar el escenario de resistencia en entornos de salud y comunitarios. En contraste, Iquitos, la metrópolis peruana más grande en la cuenca del Amazonas (DS No 022-2016-Vivienda. Reglamento de Acondicionamiento Territorial y Desarrollo Urbano Sostenible, 2016), aún no ha sido ampliamente investigada, a pesar de la alta exposición a patógenos y la frecuencia de infecciones (Johnson *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2004; Kalter *et al.*, 2010; Kosek *et al.*, 2008; Larocque *et al.*, 2006; Marcos-Carbajal *et al.*, 2021; McNally *et al.*, 2019; Mujica *et al.*, 1994; Schiaffino *et al.*, 2021), acceso heterogéneo al agua y vulnerabilidad a la contaminación del agua (Exum *et al.*, 2018; Faldetta *et al.*, 2014). La presión ejercida por ambientes hospitalarios influye directamente en la propagación y acumulación de RAM y ARGs (Bengtsson-Palme *et al.*, 2018). Inclusive, el riesgo de transferencia de ARGs a patógenos aumenta en ambientes con una alta carga y bacterias fecales asociadas (Huijbers *et al.*, 2019). A pesar de que el tratamiento de estas aguas residuales en ambientes hospitalarios es crucial, no erradica por completo los ARGs y su presencia aún representa un riesgo debido a la posibilidad de la transferencia de estos elementos genéticos a otras poblaciones microbianas (Woolhouse *et al.*, 2015).

El monitoreo y vigilancia de aguas residuales está enfocada principalmente de dos maneras, mediante métodos microbiológicos tradicionales y confirmación de genes específicos por biología molecular y la aplicación de WGS (Rizzo *et al.*, 2013). La aplicación de WGS ha revolucionado la salud pública y ha mejorado significativamente la capacidad para analizar escenarios de riesgo potencial y brotes, así como caracterizar la dinámica de transmisión de bacterias resistentes y ARGs. El uso de la vigilancia de aguas residuales basada en genes y aislados es una estrategia atractiva y no invasiva, (Larsson y Flach, 2022) para monitorear el progreso de la RAM y medir los cambios atribuibles a las intervenciones en el tiempo en varias escalas (Aarestrup y Woolhouse, 2020). Como los sistemas de alcantarillado están conectados, las muestras son en su mayoría representativas de la población de interés, si se realizan cerca del sitio (Hendriksen *et al.*, 2019; Huijbers *et al.*, 2019), y en su mayoría se correlacionan con patrones de prevalencia clínica (Hutinel *et al.*, 2019; Pärnänen *et al.*, 2019). El advenimiento de las tecnologías como WGS ha ayudado a los esfuerzos globales de vigilancia de aguas residuales (Hendriksen *et al.*, 2019) en la identificación y el seguimiento de RAM y ARGs clínicamente relevantes (Gouliouris *et al.*, 2019; Kutilova *et al.*, 2021).

El estudio presenta limitaciones. Si bien el WGS permitió identificar el resistoma en enterobacterias en aguas residuales hospitalarias, no es un reflejo exacto de lo que ocurre con los aislados clínicos en el hospital (Talebi *et al.*, 2008; Tuméo *et al.*, 2008; Drieux *et al.*, 2016; Maheshwari *et al.*, 2016). Futuros estudios deberán incluir metagenómica a aguas residuales, lo que permitirá probar nuevas hipótesis sobre qué factores pueden impulsar patrones de abundancia y diversidad de ARGs. Esto a su vez permitirá investigar si la actividad clínica, como el uso de

antimicrobianos en los pacientes afectan la abundancia de resistencia en aguas residuales intrahospitalarias, permitiendo correlacionar la resistencia en pacientes con la abundancia de ARGs en diferentes fuentes de agua.

La aplicación de WGS para la vigilancia de la resistencia a los antibióticos sigue estando limitada en gran medida a entornos clínicos y animales, y aún se presta muy poca atención al medio ambiente (Hendriksen *et al.*, 2019; Su *et al.*, 2019; OMS, 2020). Por lo tanto, hay escasez de datos sobre el papel que juega la vigilancia genómica en la comprensión de las dimensiones ambientales de la resistencia a los antibióticos, particularmente en el Perú. En este estudio, se combinaron métodos microbiológicos y genómicos de manera complementaria para el análisis de presencia/ausencia de enterobacterias y ARGs presentes en su genoma. Se identificaron ARGs de relevancia epidemiológica relacionados con la producción de BLEE (blaCTXM-55) y con resistencia a drogas de último recurso (mcr-1 para colistina y bla_{KPC-1} para carbapenémicos). El encontrar estos genes de relevancia en salud pública resaltan el riesgo potencial que existe de diseminación de estos patógenos de ambientes hospitalarios a otros no hospitalarios. El análisis filogenético reveló clústers de *E. coli* relacionados entre fuentes hospitalarias y no hospitalarias en Lima, sugiriendo una contribución potencial de las aguas residuales hospitalarias en términos de diseminación de bacterias resistentes y/o genes de resistencia a aguas no hospitalarias o comunitarias.

3.6 Reporte del gen *bla*_{KPC-2} en un genoma de *Citrobacter braakii* aislado de aguas residuales en un hospital pediátrico en Lima, Perú

Este constituye el primer reporte de un genoma de *Citrobacter braakii* portador de *bla*_{KPC-2} obtenido del efluente de un hospital pediátrico. El genoma CF248 representa un aislado de *C. braakii* resistente a múltiples fármacos derivado de un entorno clínico en Lima, Perú.

Citrobacter es un miembro móvil, facultativo y anaeróbico de las *Enterobacteriaceae* asociado con infecciones nosocomiales (Liu *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2008). Se ha descrito la aparición de miembros de *Citrobacter* como patógenos nosocomiales que causan infecciones de las vías urinarias y respiratorias (Mohanty *et al.*, 2007; Hammerum *et al.*, 2016; Jiménez *et al.*, 2017; Pletz *et al.*, 2018), junto con informes de aislados clínicos que portan genes de resistencia transferidos horizontalmente, como *bla*_{KPC-2} (Wu *et al.*, 2016). Los efluentes de agua hospitalaria pueden actuar como reservorios de bacterias portadoras de estos genes, incluidas las enterobacteriales productoras de carbapenemasas (Cahill *et al.*, 2019). El monitoreo de rutina de las aguas residuales puede detectar patógenos resistentes liberados en aguas residuales municipales y cuerpos de agua naturales (Cahill *et al.*, 2019, Urase *et al.*, 2020).

El aislado CF248 fue en diciembre de 2017 como parte de un programa piloto para monitorear los efluentes hospitalarios de un hospital pediátrico en Lima, Perú. El precipitado de una muestra de agua de 50 ml recogida de una tubería de alcantarillado se inoculó sobre agar MacConkey (Becton, Dickinson, Heidelberg,

Alemania) y se incubó durante 24 horas a 37 °C. Se seleccionó una colonia fermentadora de lactosa y se identificó como *Citrobacter* sp. con el uso de un sistema de microbiología automatizado Phoenix (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, EE. UU.). Se identificó la resistencia a 11 antibióticos diferentes, incluidos ertapenem, imipenem y meropenem (Tabla 1) (CLSI, 2020). La producción de carbapenemasas se confirmó con la prueba de diagnóstico rápido inmunocromatográfica RESIST-4 OKNV (Coris BioConcept, Gembloux, Bélgica).

El ADN genómico se extrajo de 1 ml de cultivo de colonia única de caldo tripticasa de soja (Becton, Dickinson) incubado a 37 ° C durante 6 horas, utilizando el kit de purificación de ADN genómico GeneJET (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Las librerías genómicas fueron preparadas con el kit Nextera XT (Illumina, Inc., San Diego, CA, EE. UU.) y se secuenciaron con un instrumento MiSeq que generó 1 735 120 lecturas de 250 pb de extremos emparejados. Las lecturas se procesaron y analizaron para la detección de ARG con las herramientas dentro de la canalización Nullarbor v.2.0 (Seeman *et al.*, 2019), utilizando SPAdes (v.3.15.2) (Prjibelski *et al.*, 2020) y Prokka (v.1.13.3) (Seeman, 2014) para ensamblaje y anotación, respectivamente, lo que da como resultado un borrador de genoma de 294 contigs de más de 300 pb (N50, 49 265 pb) y una longitud total de 5 810 531 pb, con una cobertura media de 64 × y un contenido de GC del 52,3 %. La tipificación del replicón de plásmido se realizó utilizando plasmidfinder v.2.0 (Carattoli *et al.*, 2014), que está disponible en el Centro de Epidemiología Genómica (www.genomicepidemiology.org). Se incluyeron genes de resistencia a antibióticos y replicones de plásmidos con un valor de corte de >95 % para la

identidad y una cobertura del 100 %. Se utilizaron parámetros predeterminados para todas las herramientas bioinformáticas.

Tabla 2. Susceptibilidad a antibióticos del aislado CF248 *Citrobacter braakii*.

Antibiótico	CMI (µg/ml)	Resultado
<i>Aminoglucósidos</i>		
Gentamicina	≤2	S
<i>Penicilina</i>		
Ampicilina	>16	R
<i>Penicilina + inhibidor de betalactamasa</i>		
Ampicilina-Sulbactam	>16/8	R
Piperacilina-Tazobactam	>64/4	R
<i>Cefalosporinas</i>		
Cefazolina	>8	R
Cefepime	8	I
Cefoxitina	>16	R
Ceftazidima	16	I
Ceftriaxona	>4	R
<i>Fluoroquinolonas</i>		
Ciprofloxacina	>2	R
Levofloxacina	>4	R
<i>Sulfonamidas</i>		
Sulfatrimetoprim	≤0.5/9.5	S
<i>Gliciliclinas</i>		
Tigeciclina	2	S
<i>Carbapenems</i>		
Ertapenem	>1	R
Imipenem	8	R
Meropenem	8	R

S: susceptible, I: intermedio, R: resistente

El análisis de resistoma identificó ARGs para aminoglucósidos [aph(3')-VIa], fluoroquinolonas (qnrB68) y β -lactámicos (bla_{CMY-83} y bla_{KPC-2}). Identificamos plásmidos de incompatibilidad (Inc) grupos HI1A (CIT), HI1B (CIT), FIB (K) y P6. Ha sido reportado previamente que plásmido IncP6 es portador de bla_{KPC-2} en *Pseudomonas aeruginosa* (Dai *et al.*, 2016), *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* (Yao *et al.*, 2017) y *Citrobacter braakii* (Dong *et al.*, 2020). La evaluación del contig reveló que el gen bla_{KPC-2} estaba ubicado en un elemento de transposón Tn3 de 13.8 kb con la estructura lineal ISKpn27- Δ blaTEM-1-blaKPC-2-ISKpn6-korC-klcA-repB. El análisis BLAST de la secuencia del gen bla_{KPC-2} mostró una identidad de secuencia del 100 % y una cobertura del 100 % con el plásmido pKPHS2 de 111 195 pb (número de acceso NC_016846) aislado de un aislado clínico de *Klebsiella pneumoniae* portador de blaKPC-2 en China.

Este reporte constituye el primer aislado de *C. braakii* productor de bla_{KPC-2} derivado de aguas residuales de un hospital pediátrico en Lima, Perú. Nuestros resultados sugieren que el monitoreo de la resistencia a los antibióticos de las aguas residuales de los hospitales puede detectar la diseminación de la resistencia a los antimicrobianos desde los entornos clínicos al entorno de las aguas residuales.

IV. CONCLUSIONES

4.1 Capítulo 1. Resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* de fuentes humanas y animales en Lima, Perú

- Los aislados de *Escherichia coli* de pollos de mercado criados de forma convencional poseen altos niveles de multidrogo resistencia en comparación con todos los grupos humanos y las gallinas orgánicas criadas sin antibióticos.
- Los aislados de *Escherichia coli* de los pollos de mercado criados de forma convencional presentaron genes de resistencia a antibióticos de relevancia clínica, incluyendo *mcr-1*, *bla_{CTXM-55}* y *bla_{KPC-3}*.
- La resistencia a florfenicol, un antibiótico usado como promotor de crecimiento en pollos, pero no aprobado para seres humanos, fue más alta en los vendedores de pollo comparado con otros grupos humanos.

4.2 Capítulo 2. Enterobacterias ambientales obtenidas de aguas residuales comunitarios e intrahospitalarios en dos regiones del Perú

- Las enterobacterias aisladas de aguas residuales de ambientes hospitalarios en Iquitos presentaron los niveles más altos de multidrogo resistencia.

- Las enterobacterias de aguas residuales de ambientes hospitalarios y no hospitalarios en Lima e Iquitos albergan genes de resistencia de importancia clínica como *bla*_{KPC-1}, *bla*_{KPC-2}, *bla*_{CTXM-55} y *mcr-1*.
- Los genomas de *Escherichia coli* provenientes de aguas residuales de ambientes hospitalarios y no hospitalarios en Lima se encontraron genéticamente relacionados.

V. Recomendaciones

- En el presente estudio aplicamos una combinación de métodos microbiológicos tradicionales, secuenciamiento del genoma completo y análisis bioinformático para dilucidar el resistoma de poblaciones bacterianas provenientes de fuentes humanas, animales y ambientales.
- Los resultados han permitido dar un primer vistazo sobre la situación de la resistencia antimicrobiana en poblaciones de enterobacterias no frecuentemente estudiadas mediante el uso de la genómica y bioinformática.
- Los animales y el medio ambiente cumplen un rol fundamental en la permanencia y transmisión de bacterias resistentes y genes de resistencia antimicrobiana al humano en el Perú.
- El estudio resalta la necesidad de implementar sistemas de vigilancia genómica de estas poblaciones microbianas con el fin de mitigar la transmisión de la resistencia antimicrobiana, representando un problema de salud pública en el Perú.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aarestrup, F. M., & Woolhouse, M. E. J. (2020). Using sewage for surveillance of antimicrobial resistance A global system would exploit metagenomic sequencing. *Science*, 367(6478), 630–632.
- Aarestrup, F. M., Jensen, V. F., Emborg, H. D., Jacobsen, E., and Wegener, H. C. (2010). Changes in the use of antimicrobials and the effects on productivity of swine farms in Denmark. *Am. J. Vet. Res.* 71, 726–733. doi:10.2460/ajvr.71.7.726.
- Alcock, B. P., Raphenya, A. R., Lau, T. T., Tsang, K. K., Boucharad, E., Edalatmand, A., Huynh, W., Nguyen, A.-L. V, Cheng, A. A., Liu, S., Min, S. Y., Miroshnichenko, A., Tran, H.-K., Werfalli, R. E., Nasir, J. A., Oloni, M., Speicher, D. J., Florescu, A., Singh, B., McArthur, A. G. (2020). CARD 2020: antibiotic resistome surveillance with the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Research*, 48, D517–D525. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz935>
- Alexander, J., Hembach, N., & Schwartz, T. (2020). Evaluation of antibiotic resistance dissemination by wastewater treatment plant effluents with different catchment areas in Germany. *Scientific Reports*, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65635-4>
- Anjum MF, Lemma F, Cork DJ et al. (2013). Isolation and detection of extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing enterobacteriaceae from meat using chromogenic agars and isothermal loop-mediated amplification (LAMP)

assays. *J. Food Sci.* 78, M1892–M1898.

Anjum Muna. (2015). Screening methods for the detection of Antimicrobial resistance genes present in bacterial isolates and the microbiota. *Future Microbiology*, Vol10:3.

Baker, K. S., Campos, J., Pichel, M., Della Gaspera, A., Duarte-Martínez, F., Campos-Chacón, E. (2017). Whole genome sequencing of *Shigella sonnei* through PulseNet Latin America and Caribbean: advancing global surveillance of foodborne illnesses. *Clin. Microbiol. Infect.* 23, 845–853. doi:10.1016/j.cmi.2017.03.021.

Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Prjibelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., & Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19(5), 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>

Bantar, C., Famiglietti, A., Goldberg, M., Altschuler, M., Bardi, L., Casellas, J. M., *et al.* (2000). Three-year surveillance study of nosocomial bacterial resistance in Argentina. *Int. J. Infect. Dis.* 4, 85–90. doi:10.1016/S1201-9712(00)90099-7.

Baquero F, Martínez JL, Cantón R (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr. Opin. Biotechnol.*;19:260–265. doi: 10.1016/j.copbio.2008.05.006.

Bazzo, M. L., Golfetto, L., Gaspar, P. C., Pires, A. F., Ramos, M. C., Franchini, M.,

- First nationwide antimicrobial susceptibility surveillance for *Neisseria gonorrhoeae* in Brazil, 2015-16. doi:10.1093/jac/dky090.
- Bengtsson-Palme J., Kristiansson E., Larsson D. G. J. (2018). Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 42 68–80. 10.1093/femsre/fux053
- Bintsis T. (2017). Foodborne pathogens. *AIMS microbiology*, 3(3), 529–563. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.3.529>
- Bischoff, K. M., White, D. G., Hume, M. E., Poole, T. L., Nisbet, D. J. (2005). The chloramphenicol resistance gene *cmlA* is disseminated on transferable plasmids that confer multiple-drug resistance in swine *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 243, 285–291. doi:10.1016/j.femsle.2004.12.017.
- Bolger, A. M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Genome Anal.* 30, 2114–2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170.
- Braibant, M., Chevalier, J., Chaslus-Dancla, E., Pagès, J. M., and Cloeckaert, A. (2005). Structural and functional study of the phenicol-specific efflux pump floR belonging to the major facilitator superfamily. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 2965–2971. doi:10.1128/AAC.49.7.2965-2971.2005.
- Cahill N, O'Connor L, Mahon B, Varley Á, McGrath E, Ryan P, Cormican M, Brehony C, Jolley KA, Maiden MC, Brisse S, Morris D. (2019). Hospital effluent: a reservoir for carbapenemase-producing Enterobacterales? *Sci Total Environ* 672:618–624. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.03.428.

Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Larsen MV, Lund O, Villa L, Aarestrup FM, Hasman H. (2014). In silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother* 58:3895–3903. doi: 10.1128/AAC.02412-14.

Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI] (2018). *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals*. 5th ed. CLSI standard VET01: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2020). Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. M100, 30th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Collignon, P., Beggs, J. J., Walsh, T. R., Gandra, S., Laxminarayan, R. (2018). Anthropological and socioeconomic factors contributing to global antimicrobial resistance: a univariate and multivariable analysis. *The Lancet Planetary Health*, 2(9), e398–e405. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(18\)30186-4](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(18)30186-4)

Dai X, Zhou D, Xiong W, Feng J, Luo W, Luo G, Wang H, Sun F, Zhou X. (2016). The IncP-6 plasmid p10265-KPC from *Pseudomonas aeruginosa* carries a novel Δ ISEc33-associated blaKPC-2 gene cluster. *Front Microbiol* 7:310. doi: 10.3389/fmicb.2016.00310.

Davis, G. S., Waits, K., Nordstrom, L., Grande, H., Weaver, B., Papp, K. (2018). Antibiotic-resistant *Escherichia coli* from retail poultry meat with different antibiotic use claims. *BMC Microbiol.* 18, 174. doi:10.1186/s12866-018-

1322-5.

De León, I. (2009). *An Institutional Assessment of Antitrust Policy: The Latin American Experience*. The Netherlands: Kluwer Law International B.V.

Diario Oficial El Peruano. (2013). Resolución Directoral N° 0072-2013-MINAGRI-SENASA-DIAIA - Norma Legal Diario Oficial El Peruano Available online at: <https://busquedas.elperuano.pe/normaslegales/prohiben-importacion-y-comercializacion-de-diversos-principi-resolucion-directoral-n-0072-2013-minagri-senasa-diaia-991128-1/> [Accessed October 16, 2020].

Diarra, M. S., and Malouin, F. (2014). Antibiotics in Canadian poultry productions and anticipated alternatives. *Front. Microbiol.* 5, 282. doi:10.3389/fmicb.2014.00282.

Dong D, Mi Z, Li D, Gao M, Jia N, Li M, Tong Y, Zhang X, Zhu Y. (2020). Novel IncR/IncP6 hybrid plasmid pCRE3-KPC recovered from a clinical KPC-2-producing *Citrobacter braakii* isolate. *mSphere* 5:e00891-19. doi: 10.1128/mSphere.00891-19.

Drieux L., Haenn S., Moulin L., Jarlier V. (2016). Quantitative evaluation of extended spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains in the wastewater of a French teaching hospital and relation to patient strain. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 5, 1–5. doi: 10.1186/s13756-016-0108-5

DS No 022-2016-Vivienda. Reglamento de Acondicionamiento Territorial y desarrollo Urbano Sostenible. (2016). Diario El Peruano, 45. <https://busquedas.elperuano.pe/normaslegales/decreto-supremo-que-aprueba->

el-texto-unico-ordenado-de-la-le-decreto-supremo-n-006-2017-vivienda-
1491051-10/

European Centre for Disease Prevention and Control [ECDC], European Food Safety Authority [EFSA], European Medicines Agency [EMA] (2015). ECDC/EFSA/EMA first joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals. *EFSA Journal* 2015;13(1):4006, 114 pp. doi:10.2903/j.efsa.2015.4006

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing [EUCAST]. (2017). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 7.1.

Evans, M. C., and Wegener, H. C. (2003). Antimicrobial growth promoters and *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. in poultry and swine, Denmark. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 489–492. doi:10.3201/eid0904.020325.

Exum, N. G., Lee, G. O., Olórtégui, M. P., Yori, P. P., Salas, M. S., Trigoso, D. R., Colston, J. M., Schwab, K. J., McCormick, B. J. J., & Kosek, M. N. (2018). A longitudinal study of household water, sanitation, and hygiene characteristics and environmental enteropathy markers in children less than 24 months in Iquitos, Peru. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 98(4), 995–1004. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0464>

Faldetta, K. F., Reighard, D. A., Dickinson, K. L., Wang, C. Q., George, D. R., Benavides, L. R., & Strosnider, W. H. J. (2014). Assessing domestic water quality in Belén municipality, Iquitos, Peru. *Journal of Water Sanitation and Hygiene for Development*, 4(3), 391–399.

<https://doi.org/10.2166/washdev.2014.051>

Fang H, Ataker F, Hedin G, Dornbusch K. (2008). Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases among *Escherichia coli* isolates collected in a Swedish hospital and its associated health care facilities from 2001 to 2006. *J. Clin. Microbiol.* 46, 707–712.

Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], World Organisation for Animal Health [OIE], World Health Organization [WHO] (2022). Strategic Framework for collaboration on antimicrobial resistance. Available online at: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/352625/9789240045408-eng.pdf> [Accessed January 23, 2022].

Fouz, N., Pangesti, K. N. A., Yasir, M., Al-Malki, A. L., Azhar, E. I., Hill-Cawthorne, G. A., & El Ghany, M. A. (2020). The contribution of wastewater to the transmission of antimicrobial resistance in the environment: Implications of mass gathering settings. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 5(1). <https://doi.org/10.3390/tropicalmed5010033>

Fuhrimann, S., Winkler, M. S., Stalder, M., Niwagaba, C. B., Babu, M., Kabatereine, N. B (2016). Disease burden due to gastrointestinal pathogens in a wastewater system in Kampala, Uganda. *Microb. Risk Anal.* 4, 16–28. doi:10.1016/j.mran.2016.11.003.

García, C., Horna, G., Linares, E., Ramírez, R., Tapia, E., Velásquez, J., Medina, V., Guevara, J., Urbina, M., Zevallos, S., Espinoza, N., Samalvides, F., & Jacobs, J. (2012). Antimicrobial drug resistance in Peru. *Emerging Infectious*

Diseases, 18(3), 520–521. <https://doi.org/10.3201/eid1803.100878>

García, C., Rijnders, M. I. A., Bruggeman, C., Samalvides, F., Stobberingh, E. E., & Jacobs, J. (2012). Antimicrobial resistance and molecular typing of *Staphylococcus aureus* bloodstream isolates from hospitals in Peru. *Journal of Infection*, 65(5), 406–411. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2012.06.009>

Garrity, G., Brenner, D. J., Krieg, N. R., and Staley, J. R. eds. (2005). “Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria,” in *Bergey’s Manual® of Systematic Bacteriology* (Springer US), 1106. doi:10.1007/0-387-28022-7.

Gelbíčová, T., Baráková, A., Florianová, M., Jamborová, I., Zelendová, M., Pospíšilová, L. (2019). Dissemination and Comparison of Genetic Determinants of mcr-Mediated Colistin Resistance in Enterobacteriaceae via Retailed Raw Meat Products. *Front. Microbiol.* 10, 2824. doi:10.3389/fmicb.2019.02824.

Gouliouris, T., Raven, K. E., Moradigaravand, D., Ludden, C., Coll, F., Blane, B., Naydenova, P., Horner, C., Brown, N. M., Corander, J., Limmathurotsakul, D., Parkhill, J., & Peacock, S. J. (2019). Detection of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* hospital-adapted lineages in municipal wastewater treatment plants indicates widespread distribution and release into the environment. *Genome Research*, 29(4), 626–634. <https://doi.org/10.1101/gr.232629.117>

Graham, D. W., Bergeron, G., Bourassa, M. W., Dickson, J., Gomes, F., Howe, A., Kahn, L. H., Morley, P. S., Scott, H. M., Simjee, S., Singer, R. S., Smith, T. C., Storrs, C., & Wittum, T. E. (2019). Complexities in understanding

antimicrobial resistance across domesticated animal, human, and environmental systems. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1441(1), 17–30. <https://doi.org/10.1111/nyas.14036>

Hammerum AM, Hansen F, Nielsen HL, Jakobsen L, Stegger M, Andersen PS, Jensen P, Nielsen TK, Hansen LH, Hasman H, Fuglsang-Damgaard D. (2016). Use of WGS data for investigation of a long-term NDM-1-producing *Citrobacter freundii* outbreak and secondary in vivo spread of blaNDM-1 to *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca*. *J Antimicrob Chemother* 71:3117–3124. doi: 10.1093/jac/dkw289.

Harbarth, S., Balkhy, H.H., Goossens, H. *et al* (2015). Antimicrobial resistance: one world, one fight!. *Antimicrob Resist Infect Control* 4, 49. <https://doi.org/10.1186/s13756-015-0091-2>

Hartinger, S. M., Medina-Pizzali, M. L., Salmon-Mulanovich, G., Larson, A. J., Pinedo-Bardales, M., Verastegui, H., Riberos, M., & Mäusezahl, D. (2021). Antimicrobial resistance in humans, animals, water and household environs in rural andean peru: Exploring dissemination pathways through the one health lens. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(9). <https://doi.org/10.3390/ijerph18094604>

Hay, S. I., Rao, P. C., Dolecek, C., Day, N. P. J., Stergachis, A., Lopez, A. D., Murray, C. J. L. (2018). Measuring and mapping the global burden of antimicrobial resistance. *BMC Medicine*, 16(1), 1–3. <https://doi.org/10.1186/s12916-018-1073-z>

He, T., Wang, R., Liu, D., Walsh, T. R., Zhang, R., Lv, Y (2019). Emergence of

plasmid-mediated high-level tigecycline resistance genes in animals and humans. *Nat. Microbiol.* 4, 1450–1456. doi:10.1038/s41564-019-0445-2.

Hendriksen, R. S., Munk, P., Njage, P., van Bunnik, B., McNally, L., Lukjancenko, O., Röder, T., Nieuwenhuijse, D., Pedersen, S. K., Kjeldgaard, J., Kaas, R. S., Clausen, P. T. L. C., Vogt, J. K., Leekitcharoenphon, P., van de Schans, M. G. M., Zuidema, T., de Roda Husman, A. M., Rasmussen, S., Petersen, B., Aarestrup, F. M. (2019). Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08853-3>

Henze, M., Van Loosdrecht, M., Ekama, G., & Brdjanovic, D. (2008). Biological wastewater treatment: principles, modelling and design. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (p. 511).

Hernández-Gómez, C., Hercilla, L., Mendo, F., Pérez-Lazo, G., Contreras, E., Ramírez, E., Flores, W., Julca, Á., Chuquiray, N., Arenas, B., Abarca, S., Viñas, M., Linares, E., Villegas, M. V., & Illescas, L. R. (2019). Programas de optimización del uso de antimicrobianos en Perú: Un acuerdo sobre lo fundamental. *Revista Chilena de Infectología*, 36(5), 565–575. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182019000500565>

Hernando-Amado S, Coque TM, Baquero F, Martínez JL (2019). Defining and combating antibiotic resistance from one health and global health perspectives. *Nat. Microbiol*;4:1432–1442. doi: 10.1038/s41564-019-0503-9.

Hoelzer, K., Wong, N., Thomas, J., Talkington, K., Jungman, E., and Coukell, A. (2017). Antimicrobial drug use in food-producing animals and associated

human health risks: What, and how strong, is the evidence? *BMC Vet. Res.* 13. doi:10.1186/s12917-017-1131-3.

Holmes, A. H., Moore, L. S. P., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., Guerin, P. J., & Piddock, L. J. V. (2016). Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet*, 387(10014), 176–187. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00473-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00473-0)

Holtcamp, W. (2011). Poultry Relief? Organic Farming May Reduce Drug Resistance. *Environ. Health Perspect.* 119. doi:10.1289/ehp.119-a489b.

Huijbers P. M. C., Flach C. F., Larsson D. G. J. (2019). A conceptual framework for the environmental surveillance of antibiotics and antibiotic resistance. *Environ. Int.* 130:104880. 10.1016/j.envint.2019.05.074

Huijbers, P. M. C., Flach, C. F., & Larsson, D. G. J. (2019). A conceptual framework for the environmental surveillance of antibiotics and antibiotic resistance. *Environment International*, 130(February), 104880. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.05.074>

Humane Farm Animal Care [HFAC]. (2018). HFAC Standards for Production of Egg Laying Hens. Available online at: <http://certifiedhumane.org/wp-content/uploads/Std18.Layers.3A-5.pdf> [Accessed October 16, 2020].

Hutinel, M., Huijbers, P. M. C., Fick, J., Ahrén, C., Larsson, D. G. J., & Flach, C. F. (2019). Population-level surveillance of antibiotic resistance in *Escherichia coli* through sewage analysis. *Eurosurveillance*, 24(37), 1–11. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.37.1800497>

Instituto Nacional de Estadística e Informática [INEI] (2017). Compendio Estadístico Provincia de Lima 2017. Available online at: https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitaes/Est/Lib1477/libro.pdf [Accessed October 16, 2021].

Iskandar, K., Molinier, L., Hallit, S., Sartelli, M., Hardcastle, T. C., Haque, M., Lugova, H., Dhingra, S., Sharma, P., Islam, S., Mohammed, I., Naina Mohamed, I., Hanna, P. A., Hajj, S. El, Jamaluddin, N. A. H., Salameh, P., & Roques, C. (2021). Surveillance of antimicrobial resistance in low- and middle-income countries: a scattered picture. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 10(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s13756-021-00931-w>

Jiménez A, Castro JG, Munoz-Price LS, de Pascale D, Shimose L, Mustapha MM, Spychala CN, Mettus RT, Cooper VS, Doi Y. (2017). Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Citrobacter freundii* at a tertiary acute care facility in Miami, Florida. *Infect Control Hosp Epidemiol* 38:320–326. doi: 10.1017/ice.2016.273.

Johnson, M. A. S., Smith, H., Joseph, P., Gilman, R. H., Bautista, C. T., Campos, K. J., Cespedes, M., Klatsky, P., Vidal, C., Terry, H., Calderon, M. M., Coral, C., Cabrera, L., Parmar, P. S., Vinetz, J. M. (2004). Environmental exposure and leptospirosis, Peru. *Emerging Infectious Diseases*, 10(6), 1016–1022. <https://doi.org/10.3201/eid1006.030660>

Jolley, K. A., Bray, J. E., & Maiden, M. C. J. (2018). Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Research*, 3(0), 124.

<https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>

Jones, F. R., Sanchez, J. L., Meza, R., Batsel, T. M., Burga, R., Canal, E., Block, K., Perez, J., Bautista, C. T., Escobedo, J., & Walz, S. E. (2004). Short report: High incidence of Shigellosis among Peruvian soldiers deployed in the Amazon river basin. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 70(6), 663–665. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2004.70.663>

Kalter, H. D., Cabrera, L., Gilman, R. H., Velapatiño, B., Moulton, L. H., & Cullotta, A. R. (2010). Risk Factors for Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Carriage in Young Children in Peru: Community-Based Cross-Sectional Prevalence Study. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82(5), 879–888. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0143>

Karkman A., Do T. T., Walsh F., Virta M. P. J. (2017). Antibiotic-resistance genes in wastewater. *Trends Microbiol.* 26 220–228. [10.1016/j.tim.2017.09.005](https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.09.005)

Kolár M, Urbánek K, Látal T (2001). Antibiotic selective pressure and development of bacterial resistance. *Int J Antimicrob Agents.* 2001 May;17(5):357-63. doi: [10.1016/s0924-8579\(01\)00317-x](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(01)00317-x).

Kosek, M., Pan, W. K., Olortegui, P., Gilman, R. H., Perez, J., Chavez, C. B., Sanchez, G. M., Burga, R., Hall, E. (2008). Epidemiology of Highly Endemic Multiply Antibiotic-Resistant Shigellosis in Children in the Peruvian Amazon. *Pediatrics.*, 122(3), e541–e549. <https://doi.org/10.1542/peds.2008-0458>.Epidemiology

Kruse, H., and Sorum, H. (1994). Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. *Appl.*

Environ. Microbiol. 60, 4015–4021.

Kümmerer K. Antibiotics in the aquatic environment-a review-part II. *Chemosphere*. 2009;75:435–441.

doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.12.006.

Kutilova, I., Medvecký, M., Leekitcharoenphon, P., Munk, P., Masarikova, M., Davidova-Gerzova, L., Jamborova, I., Bortolaia, V., Pamp, S. J., & Dolejska, M. (2021). Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and antimicrobial resistance in municipal and hospital wastewaters in Czech Republic: Culture-based and metagenomic approaches. *Environmental Research*, 193, 110487. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110487>

Larocque, R., Casapia, M., Gotuzzo, E., MacLean, J. D., Soto, J. C., Rahme, E., & Gyorkos, T. W. (2006). A double-blind randomized controlled trial of antenatal mebendazole to reduce low birthweight in a hookworm-endemic area of Peru. *Tropical Medicine and International Health*, 11(10), 1485–1495. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2006.01706.x>

Larsson, D. G. J., & Flach, C. F. (2022). Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology*, 20(5), 257–269.

Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A. K. M., Wertheim, H. F. L., Sumpradit, N., Vlieghe, E., Hara, G. L., Gould, I. M., Goossens, H., Greko, C., So, A. D., Bigdeli, M., Tomson, G., Woodhouse, W., Ombaka, E., Peralta, A. Q., Qamar, F. N., Mir, F., Cars, O. (2013). Antibiotic resistance-the need for global solutions. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(12), 1057–1098. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70318-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70318-9)

- Letunic, I., y Bork, P. (2021). Interactive tree of life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W293–W296. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>
- Li, W., and Godzik, A. (2006). Cd-hit: A fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* 22, 1658–1659. doi:10.1093/bioinformatics/btl158.
- Lietzau, S., Raum, E., von Baum, H., Marre, R., and Brenner, H. (2007). Household contacts were key factor for children’s colonization with resistant *Escherichia coli* in community setting. *J. Clin. Epidemiol.* 60, 1149–1155. doi:10.1016/j.jclinepi.2007.01.016.
- Liu LH, Wang NY, Wu AYJ, Lin CC, Lee CM, Liu CP. (2018). *Citrobacter freundii* bacteremia: risk factors of mortality and prevalence of resistance genes. *J Microbiol Immunol Infect* 51:565–572. doi: 10.1016/j.jmii.2016.08.016.
- Liu, B. T., Song, F. J., Zou, M., Zhang, Q. Di, and Shan, H. (2017). High incidence of *Escherichia coli* strains coharboring *mcr-1* and *bla*NDM from chickens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61. doi:10.1128/AAC.02347-16.
- Liu, C. M., Stegger, M., Aziz, M., Johnson, T. J., Waits, K., Nordstrom, L (2018). *Escherichia coli* ST131-H22 as a foodborne uropathogen. *MBio* 9. doi:10.1128/mBio.00470-18.
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 268–281.

doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.

Maheshwari M., Yaser N. H., Naz S., Fatima M., Ahmad I. (2016). Emergence of ciprofloxacin-resistant extended-spectrum beta-lactamase-producing enteric bacteria in hospital wastewater and clinical sources. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 5, 22–25. doi: 10.1016/j.jgar.2016.01.008

Majeed, H. J., Riquelme, M. V., Davis, B. C., Gupta, S., Angeles, L., Aga, D. S., Garner, E., Pruden, A., Vikesland, P. J. (2021). Evaluation of Metagenomic-Enabled Antibiotic Resistance Surveillance at a Conventional Wastewater Treatment Plant. *Frontiers in Microbiology*, 12(May), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.657954>

Manninger, P., Koziol, A., and Carrillo, C. D. (2016). Draft whole-genome sequences of *Escherichia fergusonii* strains isolated from beef trim (GTA-EF02), ground beef (GTA-EF03), and chopped kale (GTA-EF04). *Genome Announc.* 4. doi:10.1128/genomeA.00185-16.

Marcos-Carbajal, P., Salvatierra, G., Yareta, J., Pino, J., Vásquez, N., Diaz, P., Martínez, I., Asmat, P., Peralta, C., Huamani, C., Briones, A., Ruiz, M., Laura, N., Luque, Á., Arapa, L., & Tsukayama, P. (2021). Microbiological and molecular characterization of antimicrobial resistance in uropathogenic *Escherichia coli* from peruvian public hospitals. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 38(1), 119–123. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2021.381.6182>

Marquis, G. S., Ventura, G., Gilman, R. H., Porras, E., Miranda, E., Carbajal, L (1990). Fecal contamination of shanty town toddlers in households with non-

corralled poultry, Lima, Peru. *Am. J. Public Health* 80, 146–149.
doi:10.2105/AJPH.80.2.146.

Marshall, B. M., and Levy, S. B. (2011). Food animals and antimicrobials: Impacts on human health. *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 718–733.
doi:10.1128/CMR.00002-11.

McNally, T. W., De Wildt, G., Meza, G., & Wiskin, C. M. D. (2019). Improving outcomes for multi-drug-resistant tuberculosis in the Peruvian Amazon - A qualitative study exploring the experiences and perceptions of patients and healthcare professionals. *BMC Health Services Research*, 19(1), 1–17.
<https://doi.org/10.1186/s12913-019-4429-y>

Mellor, K. C., Petrovska, L., Thomson, N. R., Harris, K., Reid, S. W. J., and Mather, A. E. (2019). Antimicrobial Resistance Diversity Suggestive of Distinct *Salmonella* Typhimurium Sources or Selective Pressures in Food-Production Animals. *Front. Microbiol.* 10, 708. doi:10.3389/fmicb.2019.00708.

Ministerio de Agricultura y Riego [MINAGRI] (2018). Sistema Integrado de Estadísticas Agraria: MINAGRI - DGESEP - DEA. Boletín Estadístico Mensual de la Producción y Comercialización de Productos Avícolas. Available online at: <http://siea.minagri.gob.pe/siea/?q=publicaciones/boletin-estadistico-mensual-de-la-produccion-y-comercializacion-avicola> [Accessed October 16, 2020].

Ministerio de Salud [MINSa] (2017). Plan Nacional para enfrentar la resistencia a los antimicrobianos 2017-2021.
<http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/Acceso/URM/Ge>

stionURMTrabSalud/ReunionTecnica/VIII/Dia2/Antimicrobianos/PlanNacio
nalATM-2017-2021.pdf

Ministerio de Salud [MINSA] (2019). Plan Multisectorial para enfrentar la Resistencia a los Antimicrobianos 2019-2021. Available online at: <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/per188340anx.pdf> [Accessed October 16, 2020].

Mohanty S, Singhal R, Sood S, Dhawan B, Kapil A, Das BK. (2007). *Citrobacter* infections in a tertiary care hospital in Northern India. *J Infect* 54:58–64. doi: 10.1016/j.jinf.2006.01.015.

Morgan, D. J., Okeke, I. N., Laxminarayan, R., Perencevich, E. N., & Weisenberg, S. (2011). Non-prescription antimicrobial use worldwide: A systematic review. *The Lancet Infectious Diseases*, 11(9), 692–701. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70054-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70054-8)

Mujica, O. J., Quick, R. E., Palacios, A. M., Beingolea, L., Vargas, R., Moreno, D., Barrett, T. J., Bean, N. H., Seminario, L., & Tauxe, R. V. (1994). Epidemic cholera in the amazon: The role of produce in disease risk and prevention. *Journal of Infectious Diseases*, 169(6), 1381–1384. <https://doi.org/10.1093/infdis/169.6.1381>

Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic

analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)

Nadimpalli, M. L., Marks, S. J., Montealegre, M. C., Gilman, R. H., Pajuelo, M. J., Saito, M., Tsukayama, P., Njenga, S. M., Kiiru, J., Swarthout, J., Islam, M. A., Julian, T. R., & Pickering, A. J. (2020). Urban informal settlements as hotspots of antimicrobial resistance and the need to curb environmental transmission. *Nature Microbiology* 2020 5:6, 5(6), 787–795. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0722-0>

Nadimpalli, M., Delarocque-Astagneau, E., Love, D. C., Price, L. B., Huynh, B.-T., Collard, J.-M., Lay, K. S., Borand, L., Ndir, A., Walsh, T. R., & Guillemot, D. (2018). Combating Global Antibiotic Resistance: Emerging One Health Concerns in Lower-and Middle-Income Countries. *Clinical Infectious Diseases*, 66(6), 963–969. <https://doi.org/10.1093/cid/cix879>

Nadimpalli, M., Vuthy, Y., de Lauzanne, A., Fabre, L., Criscuolo, A., Gouali, M. (2019). Meat and fish as sources of extended-spectrum β -Lactamase-producing *Escherichia coli*, Cambodia. *Emerg. Infect. Dis.* 25, 126–131. doi:10.3201/eid2501.180534.

Nation, R. L., Garonzik, S. M., Thamlikitkul, V., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Forrest, A., Paterson, D. L (2017). Dosing guidance for intravenous colistin in critically ill patients. *Clin. Infect. Dis.* 64, 565–571. doi:10.1093/cid/ciw839.

NIHR Global Health Research Unit on Genomic Surveillance of AMR (2020). Whole-genome sequencing as part of national and international surveillance programmes for antimicrobial resistance: a roadmap. *BMJ global*

health, 5(11), e002244. <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2019-002244>

Nordmann, P., Cuzon, G., and Naas, T. (2009). The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect. Dis.* 9, 228–236. doi:10.1016/S1473-3099(09)70054-4.

O’Neill J (2016). Trust UgaW. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: final report and recommendations. Available online at: https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf [Accessed January 23, 2022].

O’Neill, J. (2014). Antimicrobial resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. The review on antimicrobial resistance.

Ochoa, T. J., Ruiz, J., Molina, M., Del Valle, L. J., Vargas, M., Gil, A. I., Ecker, L., Barletta, F., Hall, E., Cleary, T. G., & Lanata, C. F. (2009). High frequency of antimicrobial drug resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* in infants in Peru. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(2), 296–301. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.81.296>

Page, A. J., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., Holden, M. T. G., Fookes, M., Falush, D., Keane, J. A., & Parkhill, J. (2015). Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*, 31(22), 3691–3693. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv421>

Page, S. W., and Gautier, P. (2012). Use of antimicrobial agents in livestock. *OIE Rev. Sci. Tech.* 31, 145–188. doi:10.20506/rst.31.1.2106.

Pärnänen, K. M. M., Narciso-Da-Rocha, C., Kneis, D., Berendonk, T. U., Cacace,

D., Do, T. T., Elpers, C., Fatta-Kassinos, D., Henriques, I., Jaeger, T., Karkman, A., Martinez, J. L., Michael, S. G., Michael-Kordatou, I., O'Sullivan, K., Rodriguez-Mozaz, S., Schwartz, T., Sheng, H., Sørum, H., ... Manaia, C. M. (2019). Antibiotic resistance in European wastewater treatment plants mirrors the pattern of clinical antibiotic resistance prevalence. *Science Advances*, 5(3). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau9124>

Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clinical microbiology reviews*, 31(4), e00088-17. <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>.

Pehrsson, E. C., Tsukayama, P., Patel, S., Mejía-Bautista, M., Sosa-Soto, G., Navarrete, K. M. (2016). Interconnected microbiomes and resistomes in low-income human habitats. *Nature* 533, 212–216. doi:10.1038/nature17672.

Penders, J., Stobberingh, E. E., Savelkoul, P. H. M., and Wolffs, P. F. G. (2013). The human microbiome as a reservoir of antimicrobial resistance. *Front. Microbiol.* 4, 1–7. doi:10.3389/fmicb.2013.00087.

Peyclit, L., Baron, S. A., and Rolain, J. M. (2019). Drug repurposing to fight colistin and carbapenem-resistant bacteria. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9. doi:10.3389/fcimb.2019.00193.

Pletz MW, Wollny A, Dobermann UH, Rödel J, Neubauer S, Stein C, Brandt C, Hartung A, Mellmann A, Trommer S, Edel B, Patchev V, Makarewicz O, Maschmann J. (2018). A nosocomial foodborne outbreak of a VIM carbapenemase-expressing *Citrobacter freundii*. *Clin Infect Dis* 67:58–64. doi: 10.1093/cid/ciy034.

Pollett, S., Rocha, C., Zerpa, R., Patiño, L., Valencia, A., Camiña, M., Guevara, J., Lopez, M., Chuquiray, N., Salazar-Lindo, E., Calampa, C., Casapia, M., Meza, R., Bernal, M., Tilley, D., Gregory, M., Maves, R., Hall, E., Jones, F., Kasper, M. (2012). Campylobacter antimicrobial resistance in Peru: a ten-year observational study. *BMC Infectious Diseases*, 12, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-12-193>

Prjibelski A, Antipov D, Meleshko D, Lapidus A, Korobeynikov A. (2020). Using SPAdes *de novo* assembler. *Curr Protoc Bioinformatics* 70:e102. doi: 10.1002/cpbi.102.

Quino, W., Caro-Castro, J., Hurtado, V., Flores-León, D., Gonzalez-Escalona, N., & Gavilan, R. G. (2022). Genomic Analysis and Antimicrobial Resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Peru. *Frontiers in Microbiology*, 12(January), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.802404>

Ramay, B. M., Caudell, M. A., Córdón-Rosales, C., Archila, L. D., Palmer, G. H., Jarquin, C., Moreno, P., McCracken, J. P., Rosenkrantz, L., Amram, O., Omulo, S., Call, D. R. (2020). Antibiotic use and hygiene interact to influence the distribution of antimicrobial-resistant bacteria in low-income communities in Guatemala. *Scientific Reports*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70741-4>

Randall LP, Lemma F, Rogers JP, Cheney TE, Powell LF, Teale CJ. (2014). Prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from pigs at slaughter in the UK in 2013. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 2947–2950.

- Request for Revision/Information to the Database on Countries' Needs for MRLs (2014). Disponible en: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/committees/committee/related-circular-letters/en/?committee=CCRVDF> [Accessed October 16, 2020].
- Rice, E. W., Baird, R. B., Eaton, A. D., Cllesceri, L. (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (22nd editi). American Water Works Association.
- Robinson, T. P., Wertheim, H. F. L., Kakkar, M., Kariuki, S., Bu, D., and Price, L. B. (2016). Animal production and antimicrobial resistance in the clinic. *Lancet* 387, e1–e3. doi:10.1016/S0140-6736(15)00730-8.
- Rousham, E. K., Unicomb, L., & Islam, M. A. (2018). Human, animal and environmental contributors to antibiotic resistance in low-resource settings: integrating behavioural, epidemiological and One Health approaches. *Proceedings. Biological sciences*, 285(1876), 20180332. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.0332>
- Sanseverino, I., Navarro Cuenca, A., Loos, R., Marinov, D., & Lettieri, T. (2018). State of the art on the contribution of water to antimicrobial resistance. In Publications Office of the European Union. <https://doi.org/doi:10.2760/771124>
- Santos-Lazaro, D., Gavilan, R. G., Solari, L., Vigo, A. N., & Puyen, Z. M. (2021). Whole genome analysis of extensively drug resistant Mycobacterium tuberculosis strains in Peru. *Scientific Reports*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88603-y>

Schiaffino, F., Trigoso, D. R., Colston, J. M., Olortegui, M. P., Shapiama Lopez, W. V., Garcia Bardales, P. F., Pisanic, N., Davis, M. F., Yori, P. P., & Kosek, M. N. (2021). Associations among household animal ownership, infrastructure, and hygiene characteristics with source attribution of household fecal contamination in Peri-urban communities of Iquitos, Peru. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 104(1), 372–381. <https://doi.org/10.4269/AJTMH.20-0810>

Seemann T, Goncalves da Silva A, Bulach DM, Schultz MB, Kwong JC, Howden BP. (2019). Nullarbor Github. <https://github.com/tseemann/nullarbor>.

Seemann T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30:2068–2069. doi: 10.1093/bioinformatics/btu153.

Sekizuka, T., Yatsu, K., Inamine, Y., Segawa, T., Nishio, M., Kishi, N., & Kuroda, M. (2018). Complete Genome Sequence of a bla KPC-2 -Positive *Klebsiella pneumoniae* Strain Isolated from the Effluent of an Urban Sewage Treatment Plant in Japan . *MSphere*, 3(5), 1–9. <https://doi.org/10.1128/msphere.00314-18>

Silbergeld, E. K., Graham, J., and Price, L. B. (2008). Industrial Food Animal Production, Antimicrobial Resistance, and Human Health. *Annu. Rev. Public Health* 29, 151–169. doi:10.1146/annurev.publhealth.29.020907.090904.

Singer, R. S., Patterson, S. K., Meier, A. E., Gibson, J. K., Lee, H. L., and Maddox, C. W. (2004). Relationship between phenotypic and genotypic florfenicol resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 4047–4049.

doi:10.1128/AAC.48.10.4047-4049.2004.

Smillie, C. S., Smith, M. B., Friedman, J., Cordero, O. X., David, L. A., and Alm, E. J. (2011). Ecology drives a global network of gene exchange connecting the human microbiome. *Nature* 480, 241–244. doi:10.1038/nature10571.

Stamatakis, A. (2014). RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies. *Bioinformatics* 30, 1312–1313. doi:10.1093/bioinformatics/btu033.

Subbiah, M., Caudell, M. A., Mair, C., Davis, M. A., Matthews, L., Quinlan, R. J., *et al.* (2020). Antimicrobial resistant enteric bacteria are widely distributed amongst people, animals and the environment in Tanzania. *Nat. Commun.* 11, 1–12. doi:10.1038/s41467-019-13995-5.

Sulis G, Sayood S, Gandra S (2022). Antimicrobial resistance in low- and middle-income countries: current status and future directions, *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 20:2, 147-160, DOI: 10.1080/14787210.2021.1951705

Szmolka, A., and Nagy, B. (2013). Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health. *Front. Microbiol.* 4, 1–13. doi:10.3389/fmicb.2013.00258.

Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outterson, K., Patel, J., Cavaleri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Singh, N., ... Zorzet, A. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(3), 318–327.

[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)

- Talebi M., Pourshafie M. R., Katouli M., Mollby R. (2008). Molecular structure and transferability of Tn1546-like elements in *Enterococcus faecium* isolates from clinical, sewage, and surface water samples in Iran. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1350–1356. doi: 10.1128/AEM.02254-07
- Tang, K. L., Caffrey, N. P., Nóbrega, D. B., Cork, S. C., Ronksley, P. E., Barkema, H. W., *et al.* (2017). Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Planet. Heal.* 1, e316–e327. doi:10.1016/S2542-5196(17)30141-9.
- Thomsen, M. C. F., Ahrenfeldt, J., Cisneros, J. L. B., Jurtz, V., Larsen, M. V., Hasman, H., *et al.* (2016). A bacterial analysis platform: An integrated system for analysing bacterial whole genome sequencing data for clinical diagnostics and surveillance. *PLoS One* 11, 1–14. doi:10.1371/journal.pone.0157718.
- Treangen, T. J., Ondov, B. D., Koren, S., & Phillippy, A. M. (2014). The harvest suite for rapid core-genome alignment and visualization of thousands of intraspecific microbial genomes. *Genome Biology*, 15(11). <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0524-x>
- Tuméo E., Gbaguidi-Haore H., Patry I., Bertrand X., Thouverez M., Talon D. (2008). Are antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitalised patients recovered in the hospital effluents? *Int. J. Hyg. Environ. Health* 211, 200–204. doi: 10.1016/j.ijheh.2007.02.010
- Urase T, Okazaki M, Tsutsui H. (2020). Prevalence of ESBL-producing

Escherichia coli and carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in treated wastewater: a comparison with nosocomial infection surveillance. *J Water Health* 18:899–910. doi: 10.2166/wh.2020.014.

Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., Teillant, A., & Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(18), 5649–5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>

Van Boeckel, T. P., Pires, J., Silvester, R., Zhao, C., Song, J., Criscuolo, N. G., Gilbert, M., Bonhoeffer, S., & Laxminarayan, R. (2019). Global trends in antimicrobial resistance in animals in low- and middle-income countries. *Science* 366(September). <https://doi.org/10.1126/science.aaw1944>

Van der Zee A, Roorda L, Bosman G et al. Multi-centre evaluation of real-time multiplex PCR for detection of carbapenemase genes OXA-48, VIM, IMP, NDM and KPC. (2014). *BMC Infect. Dis.* 14, 27.

Van Hoek, A. H. A. M., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A. P., and Aarts, H. J. M. (2011). Acquired antibiotic resistance genes: An overview. *Front. Microbiol.* 2, 203. doi:10.3389/fmicb.2011.00203.

Vaz-Moreira I, Nunes OC, Manaia CM (2014). Bacterial diversity and antibiotic resistance in water habitats: searching the links with the human microbiome. *FEMS Microbiol. Rev.* 38:761–778. doi: 10.1111/1574-6976.12062.

Wang, Y., Zhang, R., Li, J., Wu, Z., Yin, W., Schwarz, S., *et al.* (2017). Comprehensive resistome analysis reveals the prevalence of NDM and MCR-

1 in Chinese poultry production. *Nat. Microbiol.* 2, 1–7.
doi:10.1038/nmicrobiol.2016.260.

White, D. G., Hudson, C., Maurer, J. J., Ayers, S., Zhao, S., Lee, M. D., *et al.* (2000). Characterization of chloramphenicol and florfenicol resistance in *Escherichia coli* associated with bovine diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 38, 4593–4598. doi:10.1128/jcm.38.12.4593-4598.2000.

Woolhouse, M., Ward, M., van Bunnik, B., & Farrar, J. (2015). Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 370(1670), 20140083. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0083>

World Bank Group (2017). *Gaining Momentum in Peruvian Agriculture: Opportunities to Increase Productivity and Enhance Competitiveness. Rep. Prod. Under Peru Agric. Oppor. World Bank Gr.*

World Health Organization [WHO] (2017a). *Critically Important Antimicrobials for Human Medicine, 5th Revision 2016.* Geneva: WHO.

World Health Organization [WHO] (2017b). *Global action plan on antimicrobial resistance.* Geneva: WHO.

World Health Organization [WHO]. (2015). *Global action plan on antimicrobial resistance.* WHO. <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/en/>

Wu W, Espedido B, Feng Y, Zong Z. (2016). *Citrobacter freundii* carrying bla KPC-2 and bla NDM-1: characterization by whole genome sequencing. *Sci*

Rep 6:30670. doi: 10.1038/srep30670.

Wu, C., Wang, Y., Shi, X., Wang, S., Ren, H., Shen, Z., *et al.* (2018). Rapid rise of the ESBL and *mcr-1* genes in *Escherichia coli* of chicken origin in China, 2008-2014. *Emerg. Microbes Infect.* 7, 1–10. doi:10.1038/s41426-018-0033-1.

Yao Y, Lazaro-Perona F, Falgenhauer L, Valverde A, Imirzalioglu C, Dominguez L, Cantón R, Mingorance J, Chakraborty T. (2017). Insights into a novel *bla*KPC-2-encoding IncP-6 plasmid reveal carbapenem-resistance circulation in several Enterobacteriaceae species from wastewater and a hospital source in Spain. *Front Microbiol* 8:1143. doi: 10.3389/fmicb.2017.01143.

Zhang R, Yang L, Jia CC, Hong WZ, Chen GX. (2008). High-level carbapenem resistance in a *Citrobacter freundii* clinical isolate is due to a combination of KPC-2 production and decreased porin expression. *J Med Microbiol* 57:332–337. doi: 10.1099/jmm.0.47576-0.

Zieliński, W., Korzeniewska, E., Harnisz, M., Drzymała, J., Felis, E., & Bajkacz, S. (2021). Wastewater treatment plants as a reservoir of integrase and antibiotic resistance genes – An epidemiological threat to workers and environment. *Environment International*, 156. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106641>

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Capítulo 1. Resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* de fuentes humanas y animales en Lima, Perú

Tabla 1: Localización, tipo y tamaño de muestra de humanos y pollos incluidos en el estudio.

Localización	Tipo de muestra	Tamaño
VES	Pollos de mercado	32
SJM	Pollos de mercado	9
VEG	Pollos orgánicos	20
VES	Bebés	60
VES	Vendedores de pollos	23
VES	No vendedores	48

VES: Villa El Salvador, SJM: San Juan de Miraflores, VEG: Vegueta

Tabla 2. Antibióticos usados para la prueba de susceptibilidad.

Antibiótico	Concentración (μg)
Cloranfenicol	30
Florfenicol	30
Ácido nalidíxico	30
Ciprofloxacina	5
Gentamicina	10
Azithromicina	15
Trimethoprim / Sulfamethoxazol	1.25+23.75
Tetracyclina	30
Meropenem	10
Amoxicilina	20
Amoxicilina / ácido clavulánico	20+10
Cefalotina	30
Cefoxitina	30
Aztreonam	30
Cefotaxima	30
Ceftazidima	30
Cefepime	30

Tabla 3. Marcadores plasmídicos y análisis bivariado de los genomas de *Escherichia coli* de pollos y humanos.

Plasmid markers	N (%)			p-value*
	Total (n=118)	Humans (n=59)	Chickens (n=52)	
IncFIB(AP001918)	50(42.4)	21(35.6)	29(55.8)	0.037
Col(pHAD28)	42(35.6)	19(32.2)	20(38.5)	0.553
IncFII	33(28.0)	19(32.2)	13(25.0)	0.529
IncX1	23(19.5)	5(8.5)	19(36.5)	<0.001
IncFII(pHN7A8)	21(17.8)	5(8.5)	16(30.8)	0.003
p0111	19(16.1)	3(5.1)	17(32.7)	<0.001
IncFII(pRSB107)	14(11.9)	8(13.6)	5(9.6)	0.568
IncFII(29)	14(11.9)	5(8.5)	8(15.4)	0.376
Col(MG828)	13(11.0)	8(13.6)	4(7.7)	0.373
IncB/O/K/Z_4	12(10.2)	12(20.3)	0(0.0)	<0.001
IncFII(pSE11)	12(10.2)	5(8.5)	7(13.5)	0.543
IncHI1B(pNDM-CIT)	11(9.3)	0(0.0)	11(21.2)	<0.001
IncB/O/K/Z	11(9.3)	9(15.3)	2(3.8)	0.058
Col156	10(8.5)	9(15.3)	0(0.0)	0.003
IncFIA	10(8.5)	6(10.2)	4(7.7)	0.748
IncFIC(FII)	9(7.6)	4(6.8)	5(9.6)	0.732
IncFIB(K)	8(6.8)	1(1.7)	7(13.5)	0.025
IncI1-I(Gamma)	7(5.9)	3(5.1)	4(7.7)	0.704
ColRNAI	7(5.9)	6(10.2)	1(1.9)	0.118
Col440I	7(5.9)	1(1.7)	6(11.5)	0.049

Col(BS512)	4(3.4)	4(6.8)	0(0.0)	0.121
IncFIB(pLF82-PhagePlasmid)	4(3.4)	3(5.1)	1(1.9)	0.621
ColpVC	4(3.4)	2(3.4)	2(3.8)	1.000
Col8282	4(3.4)	2(3.4)	2(3.8)	1.000
IncN	4(3.4)	1(1.7)	3(5.8)	0.339
IncX2	4(3.4)	1(1.7)	3(5.8)	0.339
IncFII(pCoo)	3(2.5)	2(3.4)	1(1.9)	1.000
IncB/O/K/Z_3	3(2.5)	2(3.4)	1(1.9)	1.000
IncFII(pSFO)	3(2.5)	0(0.0)	3(5.8)	0.100
Col(MP18)	3(2.5)	3(5.1)	0(0.0)	0.246
IncY	3(2.5)	1(1.7)	2(3.8)	0.599
IncFIB(pHCM2)	2(1.7)	1(1.7)	1(1.9)	1.000
IncFIB(pB171)	1(0.8)	1(1.7)	0(0.0)	1.000
IncFII(Yp)	1(0.8)	1(1.7)	0(0.0)	1.000
Col440II	1(0.8)	1(1.7)	0(0.0)	1.000
IncHI2A	1(0.8)	0(0.0)	1(1.9)	0.468
IncX4_2	1(0.8)	0(0.0)	1(1.9)	0.468
IncI2(Delta)	1(0.8)	0(0.0)	1(1.9)	0.468
IncFII(pAMA1167-NDM-5)	1(0.8)	1(1.7)	0(0.0)	1.000
Col(Ye4449)	1(0.8)	0(0.0)	1(1.9)	0.468
IncI2	1(0.8)	1(1.7)	0(0.0)	1.000
IncFIA(HI1)	1(0.8)	0(0.0)	1(1.9)	0.468
IncX1_4	1(0.8)	1(1.7)	0(0.0)	1.000
IncFIB(pLF82-PhagePlasmid)	1(0.8)	1(1.7)	0(0.0)	1.000
IncHI2	1(0.8)	0(0.0)	1(1.9)	0.468

*Prueba Exacta de Fisher, nivel de confianza 95%

Tabla 4. Genes de resistencia antimicrobiana identificados en los genomas de *Escherichia coli*

Gen	Frecuencia	Porcentaje
tet(A)	45	7.45
APH(6)-Id	34	5.63
QnrB5	34	5.63
APH(3'')-Ib	32	5.30
ANT(3'')-IIa	31	5.13
sul2	31	5.13
sul3	24	3.97
floR	22	3.64
sul1	22	3.64
APH(3')-Ia	21	3.48
qacH	21	3.48
aadA17	17	2.81
aadA2	16	2.65
aadA3	15	2.48
tet(B)	14	2.32
dfrA12	13	2.15
mphA	13	2.15
CTX-M-55	11	1.82
FosA3	11	1.82
cmlA1	11	1.82
TEM-176	10	1.66
APH(3')-IIa	8	1.32
aadA5	8	1.32
dfrA17	8	1.32
dfrA14	7	1.16
TEM-208	6	0.99
dfrA1	6	0.99
dfrA8	6	0.99
FosA6	5	0.83
SAT-2	5	0.83
catI	5	0.83
linG	5	0.83

ErmB	4	0.66
TEM-198	4	0.66
TEM-206	4	0.66
tetM	4	0.66
AAC(3)-IIId	3	0.50
AAC(3)-VIa	3	0.50
MCR-1.1	3	0.50
QnrS1	3	0.50
TEM-141	3	0.50
TEM-214	3	0.50
aadA	3	0.50
lnuG	3	0.50
ANT(2")-Ia	2	0.33
CTX-M-65	2	0.33
KpnH	2	0.33
QnrB19	2	0.33
TEM-166	2	0.33
TEM-209	2	0.33
TEM-70	2	0.33
TEM-95	2	0.33
dfrA5	2	0.33
dfrA7	2	0.33
AAC(3)-IV	1	0.17
APH(4)-Ia	1	0.17
APH(6)-Ic	1	0.17
BRP(MBL)	1	0.17
CMY-59	1	0.17
CMY-60	1	0.17
CTX-M-2	1	0.17
KPC-3	1	0.17
OKP-A-11	1	0.17
OXA-1	1	0.17
QepA4	1	0.17
SHV-187	1	0.17
SHV-66	1	0.17
TEM-104	1	0.17
TEM-105	1	0.17
TEM-148	1	0.17

TEM-186	1	0.17
TEM-207	1	0.17
TEM-215	1	0.17
TEM-33	1	0.17
TEM-54	1	0.17
TEM-76	1	0.17
TEM-90	1	0.17
aadA13	1	0.17
aadA15	1	0.17
pp-flo	1	0.17
tet(C)	1	0.17
Total		604
		100

Capítulo 2. Enterobacterias ambientales obtenidas de aguas residuales comunitarios e intrahospitalarios en dos regiones del Perú

Tabla 1. Lugares de muestreo de hospitales y no hospitales en Lima e Iquitos

Tipo	Departamento	Latitud	Longitud
No hospital	Iquitos	-3.76	-73.25
No hospital	Iquitos	-3.74	-73.25
No hospital	Iquitos	-3.76	-73.25
No hospital	Lima	-12.24	-76.93
Hospital	Lima	-12.06	-77.05
Hospital	Iquitos	-3.76	-73.25
Hospital	Lima	-12.02	-77.06
Hospital	Lima	-12.05	-77.04
Hospital	Iquitos	-3.73	-73.25
Hospital	Iquitos	-3.73	-73.25
No hospital	Iquitos	-3.75	-73.28
No hospital	Iquitos	-3.74	-73.26
No hospital	Iquitos	-3.76	-73.28
No hospital	Iquitos	-3.77	-73.26

Tabla 2. Genes de resistencia antimicrobiana identificados en los genomas de *Escherichia coli*

Gen	Frecuencia	Porcentaje
emrB	58	18.41
tet(A)	24	7.62
QnrB5	19	6.03
APH(3')-Ia	15	4.76
sul2	13	4.13
aadA5	11	3.49
dfrA17	11	3.49
floR	11	3.49
sul3	11	3.49
tet(B)	11	3.49
APH(3'')-Ib	9	2.86
APH(6)-Id	9	2.86
AAC(3)-IIId	8	2.54
TEM-176	8	2.54
AAC(6')-Ib-cr	7	2.22
dfrA1	7	2.22
sul1	7	2.22
CTX-M-15	6	1.9
TEM-1	6	1.9
catB3	6	1.9
FosA3	5	1.59
MCR-1	5	1.59
arr-3	5	1.59
dfrA14	5	1.59
mphA	5	1.59
CTX-M-55	4	1.27
dfrA8	4	1.27
APH(3')-IIa	3	0.95
FosA7	3	0.95
QnrS1	3	0.95

cmlA1	3	0.95
dfrA12	3	0.95
CMY-59	2	0.63
CTX-M-3	1	0.32
FosA6	1	0.32
LAP-2	1	0.32
OXA-1	1	0.32
QnrB19	1	0.32
aadA2	1	0.32
aadA3	1	0.32
catI	1	0.32
<hr/>		
Total	315	100

Tabla 3. Genes de resistencia antimicrobiana identificados en los genomas de *Klebsiella* sp.

Gen	Frecuencia	Porcentaje
AAC(6')-Ib-cr	4	7.27
oqxA	4	7.27
FosA5	3	5.45
KPC-1	3	5.45
QnrB5	3	5.45
oqxB	3	5.45
APH(3'')-Ib	2	3.64
APH(3')-Ia	2	3.64
APH(6)-Id	2	3.64
CTX-M-15	2	3.64
OXA-1	2	3.64
OXY-1-4	2	3.64
arr-3	2	3.64
catB3	2	3.64
sul1	2	3.64
sul2	2	3.64
AAC(3)-IIe	1	1.82
FosA6	1	1.82
FosA7	1	1.82
GES-11	1	1.82
LEN-2	1	1.82
OKP-B-5	1	1.82
QnrS1	1	1.82
QnrVC1	1	1.82
SHV-187	1	1.82
aadA2	1	1.82
catI	1	1.82
dfrA15	1	1.82
dfrA21	1	1.82
mphA	1	1.82
tet(D)	1	1.82
Total	55	100