



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

**RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE
ENTEROBACTERALES AISLADOS DE
ANIMALES DE PRODUCCIÓN,
ANIMALES DE COMPAÑÍA Y
EFLUENTES EN CENTROS DE
PRODUCCIÓN A MEDIANA Y
PEQUEÑA ESCALA EN LA REGIÓN
DE LIMA**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN EPIDEMIOLOGÍA Y SALUD
PÚBLICA EN VETERINARIA**

CLARA MILAGROS MURGA TOVAR

LIMA – PERÚ

2025

ASESOR

Mg. Carlos Shiva Ramayoni

CO ASESOR

MSc. PhD Julio Benavides

JURADO DE TESIS

DRA. FRANCESCA SCHIAFFINO SALAZAR

PRESIDENTE

MG. ZARELA MARIESTHER CABALLERO FLORES DE LLONA

VOCAL

MG. LUIS ALFREDO NAKANDAKARI ARASHIRO

SECRETARIO

DEDICATORIA.

A Claire.

AGRADECIMIENTOS.

Gracias a Dios, por haber permitido que esto sea posible.

A mi familia por el apoyo incondicional y constante.

A mi asesor el Dr. Carlos Shiva por sus conocimientos, respaldo y apoyo brindado para la ejecución y desarrollo del presente proyecto de tesis.

A mis co asesores el Dr. Luis Jara y la Dra. Verónica Castro por la paciencia, asesoría, apoyo y conocimientos brindados durante todo este tiempo del desarrollo de la presente tesis.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO.

La tesis financiada por el CONCYTEC a través del programa PROCENCIA en el marco del concurso “Proyectos de Investigación Básica 2022-01”, según contrato

[PE501078124-2022]

DECLARACIÓN DE AUTOR			
FECHA	30	MARZO	2025
APELLIDOS Y NOMBRES DEL EGRESADO	CLARA MILAGROS MURGA TOVAR		
PROGRAMA DE POSGRADO	MAESTRÍA EN EPIDEMIOLOGÍA Y SALUD PÚBLICA EN VETERINARIA		
AÑO DE INICIO DE LOS ESTUDIOS	2021		
TITULO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN DE GRADO	Resistencia antimicrobiana de cepas de enterobacteriales aislados de animales de producción, animales de compañía y efluentes en Centros de Producción a Mediana y Pequeña Escala de La Región Lima		
MODALIDAD (marcar)	Tesis	X	
Declaración del Autor La presente Tesis es un Trabajo de Investigación de Grado original y no es el resultado de un trabajo en colaboración con otros, excepto cuando así está citado explícitamente en el texto. No ha sido ni enviado ni sometido a evaluación para la obtención de otro grado o diploma que no sea el presente.			
Teléfono de contacto (fijo / móvil)	986496320		
E-mail	Clara.murga@upch.pe		


 Firma del Egresado
 DNI 45803611|

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN
ABSTRACT

I. INTRODUCCIÓN	4
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	8
1.1. Planteamiento del Problema	8
1.2. Marco Teórico	9
1.3. Justificación	15
1.4. Objetivos	17
III. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1. Diseño del Estudio:	18
3.2. Lugar de Estudio.	18
3.3. Muestra	19
<i>Diseño de estudio</i>	19
<i>Población objetivo</i>	20
3.4. Tamaño de muestra	20
3.5. Criterios de inclusión	21
3.6. Criterio de exclusión	21
3.7. Operacionalización de variables	21
3.8. Procesamiento de muestras y técnicas	22
<i>Obtención de las muestras</i>	23
<i>Pruebas para la selección fenotípica</i>	27
<i>Selección de cepas para análisis molecular</i>	31
<i>Caracterización molecular</i>	31
<i>Extracción de ADN</i>	32
3.9. Análisis de resultados	36
3.10. Consideraciones éticas	36
IV. RESULTADOS	40
V. DISCUSIÓN	56
VI. CONCLUSIONES	63
VII. RECOMENDACIONES	65
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	66
IX. ANEXO	

LISTA DE CUADROS Y TABLAS

Cuadro 1. Operacionalización de variables

Cuadro 2: Cantidad de aislamientos de hospederos seleccionados para el procesamiento molecular

Tabla 1. Distribución de las muestras colectadas según hospedero y granja.

Tabla 2. Listado de las granjas de vaca con sus respectivas cepas de hospederos y fuente.

Tabla 3. Listado de las granjas de cerdos con sus respectivas cepas de hospederos y fuente del 1° muestreo.

Tabla 4. Listado de las granjas de cerdos con sus respectivas cepas de hospederos y fuente del 2° muestreo.

Tabla 5. Número de cepas aislada según especie bacteriana.

Tabla 6. Perfiles fenotípicos de resistencia antimicrobiana en *Escherichia coli* aisladas de fuentes animal y ambiental de granjas bovinas

Tabla 7. Perfiles fenotípicos de resistencia antimicrobiana en *Klebsiella* spp. aisladas de fuentes animal y ambiental de granjas bovinas

Tabla 8. Perfiles fenotípicos de resistencia antimicrobiana en *Escherichia coli* aisladas de fuentes animal y ambiental de granjas porcinas

Tabla 9. Perfiles fenotípicos de resistencia antimicrobiana en *Klebsiella* spp. aisladas de fuentes animal y ambiental de granjas porcinas

Tabla 10. Frecuencia de resistencia antimicrobiana en *Escherichia coli* aisladas de fuentes animal y ambiental de granjas bovinas

Tabla 11. Frecuencia de resistencia antimicrobiana en *Klebsiella* spp. aisladas de fuentes animal y ambiental de granjas bovinas

Tabla 12. Frecuencia de resistencia antimicrobiana en *Escherichia coli* aisladas de fuentes animal y ambiental de granjas porcinas

Tabla 13. Frecuencia de resistencia de resistencia antimicrobiana en *Klebsiella* spp. aisladas de fuentes animal y ambiental de granjas porcinas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa en donde se ubican las zonas de las granjas muestreadas (vacas-cerdos)

Figura 2: Aislamiento de bacterias de heces (vacas, cerdos y perros).

Figura 3: Aislamiento de bacterias de agua (potable y efluente).

ANEXO

Anexo 1: Concentración de los antibióticos usados por separado en el agar MacConkey.

Anexo 2: Relación de muestras totales obtenidas del muestreo en Huacho (Huaura) y San Bartolo (Lima)

Anexo 3: Protocolos de los Máster Mix empleados para los antibióticos de interés.

Anexo 4: Relación de primers usados en las pruebas de PCR.

Anexo 5: Relación de controles usados para las pruebas fenotípicas y moleculares.

Anexo 6: Descripción del flujograma de todo el proyecto RAM.

Anexo 7: Tipos de ordeño en las granjas de vacas muestreadas en Huaura.

Anexo 8: Toma de muestra de heces de Vacas en granjas de Huaura.

Anexo 9: Toma de muestra de heces de cerdos en granjas de Lima (San Bartolo).

Anexo 10: Toma de muestra de heces de perros en granjas de Lima (San Bartolo).

Anexo 11: Detección de las resistencias fenotípicas.

Anexo 12: Detección de genes mediante PCR

RESUMEN

El objetivo del estudio fue detectar *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. resistentes a betalactámicos, quinolonas, colistina y carbapenémicos en ganado bovino y porcino, perros y efluentes procedentes de una misma granja de centros de producción animal en Huaura y Lima. El método de muestreo fue probabilístico, se hizo la recolección de muestras de heces en 14 granjas de Huaura (153 vacas, 18 perros y 14 aguas) y 25 granjas de Lima (261 cerdos, 30 perros y 25 aguas).

El análisis fenotípico consistió en realizar la siembra en agar MacConkey suplementado de manera independiente con 4 antibióticos, las colonias fermentadoras de lactosa fueron sembradas en agar ESBL y posterior a ello se realizaron las respectivas pruebas bioquímicas (TSI y SIM), una vez identificadas fueron criopreservadas para la posterior realización de los antibiogramas correspondientes. En total se obtuvieron 124 aislados distribuidos en granjas de vacas se recuperaron 46 aislados provenientes de vacas, 8 de perros y 8 de agua, mientras que en granjas de cerdos (92 aislados de cerdos, 5 perros y 3 agua. Así mismo se evidenció un alto porcentaje de aislados de *Escherichia coli* (119/124) frente a *Klebsiella* spp. (5/124).

A partir de estos resultados se hizo una selección previa para la parte genotípica, en esta se pudo observar la presencia de genes asociados a resistencia de los genes BLEE en todos los aislados siendo el más frecuente el gen *blaCTX-M*, seguido del *blaTEM* y por último el gen *blaSHV*. Los hallazgos resaltan la necesidad de implementar medidas de vigilancia efectivas es decir un monitoreo eficiente por con ello lograr controlar y prevenir la transmisión de bacterias multirresistentes.

PALABRAS CLAVES: enterobacterias, resistencia, vacas, cerdos, *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp., *blaCTX-M*.

ABSTRACT

The objective of the study was to detect *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. resistant to β -lactams, quinolones, colistin, and carbapenems in cattle, pigs, dogs, and effluents from animal production farms in Huaura and Lima. A probabilistic sampling method was applied, and fecal samples were collected from 14 farms in Huaura (153 cattle, 18 dogs, and 14 water samples) and 25 farms in Lima (261 pigs, 30 dogs, and 25 water samples).

The phenotypic analysis consisted of inoculation on MacConkey agar independently supplemented with four antibiotics. Lactose-fermenting colonies were subsequently sub cultured on ESBL agar and subjected to confirmatory biochemical tests (TSI and SIM). Once identified, the isolates were cryopreserved for further antimicrobial susceptibility testing. In total, 124 isolates were recovered and distributed as follows: in cattle farms, 46 isolates were obtained from cows, 8 from dogs, and 8 from water; while in pig farms, 92 isolates were obtained from pigs, 5 from dogs, and 3 from water. Moreover, a high proportion of isolates corresponded to *Escherichia coli* (119/124) compared to *Klebsiella* spp. (5/124).

Based on these results, a preliminary selection was made for genotypic analysis. This revealed the presence of genes associated with ESBL resistance in all isolates, with the most frequent being *blaCTX-M*, followed by *blaTEM*, and finally *blaSHV*. These findings highlight the urgent need to implement effective surveillance measures, including efficient monitoring, in order to control and prevent the spread of multidrug-resistant bacteria.

KEYWORDS: Enterobacteriaceae, resistance, cattle, pigs, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp., *blaCTX-M*.

I. INTRODUCCIÓN

La sanidad animal, humana y ambiental, siempre han estado interrelacionadas y son interdependientes. Recientes estudios indican que las bacterias con resistencia antimicrobiana (RAM) pueden propagarse entre las poblaciones a través de los alimentos, agua, tierra, aire o por el contacto directo humano-animal (1,2). Debido a ello los organismos internacionales como la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA) y Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) vienen dirigiendo todos los esfuerzos desde el enfoque Una Salud, con ello se busca que todas las partes involucradas trabajen activamente en minimizar la aparición y propagación de estas bacterias con resistencia a los antimicrobianos (2–4).

El uso excesivo e inadecuado de antibióticos en animales de compañía y producción es uno de los factores principales que ha contribuido a la resistencia antimicrobiana. (5,6). Si bien en el pasado se utilizaban ampliamente como agentes promotores de crecimiento, en la actualidad su uso ha disminuido significativamente. No obstante, el uso de antibióticos en la prevención y tratamiento de enfermedades en animales aún es común, y en muchos casos se lleva a cabo de manera indiscriminada, sin supervisión veterinaria, y sin contar con regulación clara, tanto en la ganadería, acuicultura y agricultura (4,7–10). Ello contribuye a la aparición de resistencia a los antibióticos y representar un riesgo para la salud pública. Debido a que provoca que los tratamientos rutinarios sean ineficaces, generando un problema al tener que emplear tratamientos más costosos y complejos (11). Así mismo promueve la

selección y acumulación de genes de resistencia entre las poblaciones bacterianas, los cuales generan mecanismos de resistencia (12–14).

El desarrollo de los mecanismos de resistencia a los antibióticos en animales o humanos antes, durante o después de haber estado bajo tratamiento antibiótico, se da por dos mecanismos: mutaciones y transferencia horizontal. En el caso del mecanismo por mutaciones se da en bacterias individuales, y se debe a una sobreexpresión de enzimas, modificación de la permeabilidad de la membrana externa o por modificaciones del target del antibiótico. Por otro lado, el mecanismo de transferencia horizontal se da por plásmidos transposones o integrones, adquiriendo genes de resistencia por transformación, conjugación y transducción. (15–17).

Esta complejidad se ve agravada por el hecho de que una misma bacteria puede desarrollar múltiples mecanismos de resistencia frente a uno o varios antibióticos, al igual que un mismo antibiótico puede ser inactivado por diferentes mecanismos presentes en diversas especies bacterianas, todo ello complica el estudio de las resistencias de las bacterias a los distintos antimicrobianos (14,18).

Dentro de las familias de bacterias, los enterobacterales son un grupo grande y heterogéneo de bacilos Gram negativos, reciben tal nombre por la localización habitual en la microbiota saprofita del sistema gastrointestinal, tanto de animales como del hombre; del mismo modo están en aguas, suelo y ambiente. Entre los géneros de enterobacterales resistentes a antimicrobianos están: *Escherichia sp.*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Salmonella sp.*, *Proteus sp.*, *Shigella sp.*, entre otros. Siendo las de mayor frecuencia *Escherichia sp.*, *Klebsiella spp.* y *Salmonella*

spp.(19–21), las cuales han generado resistencia a β -lactámicos (incluidos carbapenémicos, y cefalosporinas de tercera generación), así mismo para quinolonas, entre otros. Esta frecuencia de enterobacterias resistentes se ha encontrado en diferentes fuentes muestreadas: humanas en Estados Unidos y Venezuela (18,19), animales: bovinos en Estados Unidos (22), Rumania (24)y Chile (25), cerdos en Perú(26,27), pollos en Colombia (28) y Perú(27) , mientras que en lo que respecta al ambiente: aguas residuales de plantas depuradoras de agua a pequeña escala en Polonia (29), medios acuáticos en Colombia(30–32).

Así mismo existe evidencia que detalla que el humano puede compartir genes de resistencia con cepas de animales de producción. Un estudio realizado en Latinoamérica, analizo comunidades bacterianas y los reservorios de genes de resistencia a antibióticos en muestras humanas y ambientales de dos comunidades de bajos ingresos, los resultados mostraron que los genes de resistencia fueron detectados en múltiples habitaad (humanos, aguas residuales y suelos contaminados, los genes encontrados fueron el *blaTEM*, *blaSHV*, *blaCTX-M* traspasando barreras debido a su asociación a elementos genéticos móviles (19). Estos guardan una convivencia estrecha en la gran mayoría de centros de producción de mediana y pequeña escala, los cuales a su vez se caracterizan por ser de las más prevalentes en América Latina y el Caribe, debido a aspectos regulatorios, socioeconómicos y culturales.

Es crucial reconocer la importancia de estas explotaciones ya que contribuyen significativamente a abordar el problema del hambre en la región, al ser responsables de una parte importante de la producción de alimentos necesarios para el mercado interno de los países de América Latina y el Caribe, contribuyendo en

la seguridad alimentaria y nutricional y logrando con ello contribuir al desarrollo nacional (33,34).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Planteamiento del Problema

La resistencia antimicrobiana se ha convertido en un problema de salud pública de gran importancia en los últimos años, debido a las consecuencias directas que genera, tales como tratamientos ineficaces y prolongados tanto para animales como para humanos. Además, esta problemática conlleva consecuencias indirectas, como pérdidas económicas por la disminución de la productividad debido a las enfermedades que ocasiona en humanos y animales. Por lo tanto, es esencial abordar esta problemática de manera efectiva para preservar la eficacia de los tratamientos antimicrobianos y garantizar la salud pública y el bienestar económico (3).

La resistencia antimicrobiana en animales está relacionada a prácticas de riesgo en la crianza y el desconocimiento que conllevan a un uso indebido de los antimicrobianos, situación que suele ser más frecuente en los sistemas de crianza de pequeña y mediana escala.

En un estudio basado en encuestas realizadas a los encargados de granjas de pequeña producción en la zona de Huaura, se menciona que el 59% de estos administraban los medicamentos, 21% suspendía el tratamiento al desaparecer los síntomas y el 48% no sabía que microorganismos son tratados con antibióticos (35). Estos sistemas de producción se caracterizan por contar con personal con escaso conocimiento de bioseguridad, del uso adecuado de antibióticos, así como contar con poca o nula asesoría de un profesional médico veterinario que genere un

tratamiento adecuado para cada enfermedad y poder así regular y concientizar el uso de antimicrobianos en los animales para consumo (36).

La importancia de enfocar la investigación en la detección de las bacterias *E. coli* y *Klebsiella* spp. radica en su amplia distribución en humanos, animales y ambiente, y la facilidad que tienen de actuar como reservorios y vehículos de diseminación de genes de resistencia por medio de plásmidos.(37)

1.2.Marco Teórico

Desde su aparición los antibióticos han sido importantes en la lucha contra las infecciones de la medicina humana, veterinaria y agricultura, reduciendo considerablemente la mortalidad a causa de infecciones bacterianas. Sin embargo, su uso inadecuado e indiscriminado ha generado efectos negativos, siendo el más grave el de la resistencia antimicrobiana (RAM). Ello se debe a los mecanismos de resistencia que han ido desarrollando los diferentes tipos de microorganismos bacterianos frente a los antibióticos, lo que les permite proliferar y prevalecer en comparación a las cepas que originalmente si eran susceptibles a estos(30,38,39).

La RAM se da por dos mecanismos: mutaciones y transferencia horizontal. En el caso del mecanismo por mutaciones se da en bacterias individuales, y se debe a una sobreexpresión de enzimas, modificación de la permeabilidad de la membrana externa de la bacteria o por modificaciones del sitio blanco del antibiótico. Por otro lado, el mecanismo de transferencia horizontal se da por plásmidos transposones o integrones, adquiriendo genes de resistencia por transformación, conjugación y

transducción. Estos mecanismos se dan naturalmente por la evolución de los microorganismos o por inducción debido al uso inadecuado y excesivo de antimicrobiano, en humanos y animales (15,16)

En los que respecta a los genes asociados a resistencias, tenemos: la resistencia de β -lactámicos, la cual se da por acción de las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), mediada por los genes *blaCTX-M*, *blaTEM*, *blaSHV*, los cuales se localizan en plásmidos facilitando la diseminación horizontal interespecie bacteriana(40). En el caso de la resistencia de colistina está vinculada con el gen plasmídico *mcr-1*, el cual modifica la estructura de los lipopolisacáridos, ello impide la acción del antibiótico, este tipo de resistencia ha generado una gran preocupación para la salud pública, debido a que es un antibiótico de último recurso (41).

Del mismo modo en el caso de los carbapenémicos, antibióticos empleados en infecciones graves; su resistencia se asocia a la producción de carbapenemasas como *KPC*, *NDM* y *OXA-48*. La cual actúa inactivando los carbapenémicos, reduciendo las opciones terapéuticas para ese tipo de infecciones(42). Por otro lado, en lo que respecta a la resistencia en quinolonas, se relacionan con mutaciones en los genes *gyrA* y *parC*, así como la presencia de genes plasmídicos como *qnrY*, los cuales protegen a las bacterias de la acción de los antibióticos(43–45).

La importancia de la RAM ha ido aumentando en los últimos años. En 2019 un Grupo de Coordinación Interinstitucional sobre Resistencia a los Antimicrobianos estimó que las enfermedades resistentes a los medicamentos son responsables de al

menos 700 000 muertes al año en todo el mundo, cifra que fácilmente podría aumentar a 10 millones de muertes anuales en todo el mundo para el 2050, si no se revierte la tendencia (17,39,46)

En el listado de patógenos bacterianos prioritarios de la OMS, se clasificaron a las bacterias RAM, en tres grupos, divididos según su importancia: crítica, alta y media, englobando en el primer grupo a los enterobacterales con resistencia a cefalosporinas de tercera generación y carbapenémicos. Esta clasificación se dio a partir de 8 criterios, entre los cuales resaltan: frecuencia de mortalidad, incidencia de casos, tendencia de la resistencia, transmisibilidad, previsibilidad en el ámbito sanitario y la comunidad, entre otros(2,46). Son diversos los países que han establecido normas para el uso racional o la restricción de ciertos antibióticos en la medicina humana y veterinaria. Sin embargo, las medidas implementadas aún no han sido suficientes para detener el problema. Debido a ello se sugiere poder actuar desde un enfoque de Una Salud, abordando el problema de una forma global. (3).

Según lo reportado en EE. UU, el 80% del uso de antibióticos en los animales se da en la alimentación. Asimismo, la Federación de Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) estima que el 74% de los antibióticos son usados como promotores del crecimiento animal, en lugar de tratar o prevenir alguna infección. Aún más grave, el 62 % de estos antibióticos usados en animales son fármacos de importancia en la terapéutica humana (47).

La RAM bajo el enfoque de Una salud, integra la sanidad humana, animal y ecológica, es decir un trabajo intersectorial realizando un plan de acción global contra este problema de salud pública (3) En la medicina veterinaria la resistencia es considera un efecto secundario a la administración indiscriminada en la producción animal tanto para el tratamiento de enfermedades como para la necesidad de maximizar la producción (5,48,49). En el caso de la producción pecuaria de ganado vacuno, la resistencia antimicrobiana es un problema que ha ido agravándose con el paso de los años debido a la frecuencia de infecciones intramamarias (mastitis) que requieren tratamientos frecuentes (21,25,35,50,51) .

Dentro de la gran mayoría de reporte de mastitis prevalecen más los casos subclínicos que clínicos, dentro de los patógenos comúnmente responsables de ello están las enterobacterias, teniendo mayor frecuencia *Echerichia coli* (*E.coli*) a diferencia de *Klebsiella* spp., ello se debe a que son bacterias ambientales, es decir se encuentran en el entorno de las vacas (camas húmedas, estiércol o agua contaminada), ello les facilita el ingreso a la glándula mamaria durante el ordeño, especialmente si las condiciones higiénicas son deficientes (52–56).

Por otro lado, en lo que respecta a la producción de cerdos, las infecciones gastrointestinales y respiratorias son comunes en el ciclo productivo lo que ha llevado a un uso significativo de antimicrobianos (26,35,57).

En el caso de las infecciones intestinales suelen ser comunes en sus diferentes etapas de crecimiento, siendo *E. coli* uno de los patógenos responsables de las

diarreas neonatales y postdestete, mientras que *Klebsiella* spp., se ha encontrado en cuadros secundarios o complejos(58).

Dentro de los factores que contribuyen al desarrollo de la resistencia antimicrobiana en animales en producción de mediana y pequeña escala, si bien son múltiples y complejos, existe una interrelación de estos con las prácticas ganaderas, políticas sanitarias y prácticas agrícolas. Los principales factores son: uso indiscriminado o innecesario de antibióticos, uso de dosis incorrectas, tratamientos incompletos y la automedicación de los animales, otro de los aspectos preocupantes es el incumplimiento de los periodos de retiro establecidos, lo que beneficiaría la presencia de residuos antimicrobianos en productos de origen animal. Todo ello no solo representa un riesgo para la salud animal, sino también generan un impacto directo en la salud pública, al facilitar la transferencia de bacterias resistentes a través de la cadena alimentaria, trayendo consigo que disminuya la eficacia de los tratamientos en humanos. (35,36).

En la actualidad son diversos los métodos de diagnóstico y detección de RAM, las más comunes son las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana tales como, el método Kirby-Bauer, el cual determina la sensibilidad de las bacterias a las diferentes familias de antibióticos y ha sido estandarizado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para garantizar resultados reproducibles y comparables entre los diversos tipos de laboratorio a nivel mundial. Asimismo, la implementación de las técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha facilitado la identificación de manera rápida y precisa de

genes de resistencia específicos, logrando así una mejor comprensión de la epidemiología de la RAM.

A razón de ello se han propuesto estrategias integradas como nuevas medidas de control, entre estas esta la reserva de antibióticos clave para el uso exclusivo humano, el uso prudente en la medicina veterinaria y la creación de organismos científicos para evaluar la sensibilidad bacteriana. Además, se enfatiza la necesidad de tratamientos basados en investigación científica y el desarrollo de programas de vigilancia sanitaria que incluyan estrategias de prevención y control más eficaces (49).

1.3. Justificación

En Perú, se han realizado investigaciones de la resistencia antimicrobiana enfocadas en humanos, animales o ambiente, con análisis de forma independiente para cada población (59,60), mientras que otros estudios en otros países hacen un abordaje integral de la situación en humanos, animales y ambiente bajo el enfoque Una Salud(34).

Por ejemplo, en Chile se evaluó la prevalencia de *Escherichia coli* productora de β -lactamasas de espectro extendido (ESBL-*E. coli*) portadoras de genes *blaCTX-M*, en ganado, perros y fauna silvestre que coexisten en granjas de pequeña escala en la zona central de Chile, bajo un enfoque One Health. Los resultados mostraron la elevada prevalencia de *E. coli* ESBL en los aislados de perros frente al total 24% (20/82), así mismo se encontró que estos aislados presentaban mayor diversidad de genes *blaCTX-M*. Estos hallazgos sugieren que los perros podrían actuar como reservorios y facilitadores de transmisión hacia el ganado y potencialmente también a los humanos encargados de granja. (61).

Otro estudio realizado en nuestro país muestreo 40 hogares rurales, y lograron recolectar 266 muestras (heces de niños, animales, agua de reservorio, agua de hogar y suelo). Evidenciándose los siguientes porcentajes de *E. coli* en las fuentes evaluadas: 92.8% en los aislados de agua de reservorio, 57.1% en agua de hogares, 43.3% del suelo, 45.3% en heces de niños. Mientras que de las heces de animales: 38.7% fueron *E. coli* y 37.7% resultaron resistentes a ≥ 1 antibiótico.

Si bien se ha reportado alta frecuencia de enterobacteriales como *E.coli* y *Klebsiella* spp. multirresistentes en infecciones animales, la mayoría de los estudios suelen enfocarse en poblaciones de animales de producción destinados a consumo humano. Sin embargo, no hay muchos estudios sobre resistencia en animales de compañía, especialmente de los perros residentes que interaccionan con otros animales dentro de una granja, ya sea con los de la misma producción o con los perros visitantes o de alrededores de la granja. Así mismo tampoco existen evidencia de la interacción de estos con los humanos encargados de granja. La interacción humano-animal con los animales de compañía, como los perros, suele ser más estrecha debido al rol que cumplen estos en los hogares, lo que se presume podría favorecer la circulación cruzada de bacterias resistentes entre distintos hospedadores.

En base a la clasificación de las bacterias según la OMS, se tomó en cuenta los de importancia crítica para la salud pública, siendo estos las enterobacterias con resistencia a cefalosporinas de tercera generación y carbapenémicos, de ello se basó nuestra elección para el presente estudio. (62,64). Así mismo la importancia de las zonas elegidas se debió a la localización de gran cantidad de ganaderos con producción de pequeña escala en dichas zonas.

La data obtenida brindará un mejor panorama de la RAM en centros de producción a pequeña y mediana escala desde un enfoque Una Salud en las regiones de Huaura y Lima, permitiendo de este modo poder establecer mejores estrategias para un adecuado monitoreo de la vigilancia de la RAM, logrando prevenir y reducir el efecto acumulativo de la RAM en los diferentes agentes y entornos en donde coexisten (49).

1.4.Objetivos

Objetivo general

- Detectar *E. coli* y *Klebsiella* spp. resistentes a los antibióticos β -lactámicos, quinolonas, colistina y carbapenémicos en ganado bovino y porcino, perros y efluentes procedentes de una misma granja de centros de producción animal de Huaura y Lima.

Objetivos específicos

- Aislar e identificar de *E. coli* y *Klebsiella* spp. resistentes a los antibióticos β -lactámicos, quinolonas, carbapenémicos y colistina.
- Determinar la resistencia fenotípica adquirida de las cepas aisladas para antibióticos β -lactámicos, quinolonas, carbapenémicos y colistina.
- Caracterizar los principales genes asociados a resistencia a antibióticos β -lactámicos, quinolonas, carbapenémicos y colistina, a través de la técnica de PCR.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.Diseño del Estudio:

El presente estudio fue observacional descriptivo de tipo transversal, es decir no se intervinieron ni se manipularon las variables, solo se describieron las características y frecuencias de la población evaluada. Todo ello en un periodo en específico.

3.2.Lugar de Estudio.

Se tuvo como marco muestral las provincias de Huaura y Lima en la región de Lima, Perú (Figura1). Por otro lado, el procesamiento de las muestras se realizó en los laboratorios de Nutrición e Inocuidad Alimentaria y Biología Molecular de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia (FAVEZ) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH).



Figura 1. Ubicación de los centros de producción de vacas y cerdos en Huaura y Lima.

3.3. Muestra

Diseño de estudio

Para el presente proyecto, las granjas de interés se seleccionaron por conveniencia (centros de producción a pequeña y mediana escala) a partir de las resistencias de las cepas humanas del proyecto madre (209879) las cuales debían tener un mecanismo de resistencia BLEE y otro mecanismo de resistencia (colistina, carbapenémicos, quinolonas). A partir de esta selección de humanos se recolecto

una muestra por animal (vaca, cerdo y perro) y el agua de la respectiva granja, de este modo se pudo detectar la presencia de *E.coli* o *Klebsiella* spp., así como las resistencias fenotípicas y genotípicas alguno de los antibióticos evaluados como betalactámicos, quinolonas, carbapenémicos o colistina. El total de granjas muestreadas fueron 14 de vacas y 25 de producción de cerdos.

Población objetivo

La población objetivo fueron los hospederos animales (vacas, cerdos, perros) y agua de centros de producción de pequeña y mediana escala, con similar tipo de crianza, manejo reproductivo y alimentación de Huaura y Lima – Lima.

3.4. Tamaño de muestra

Para estimar la prevalencia, con base en estudios anteriores de prevalencia *E.coli* BLEE en vacas se asumió 85.8% como prevalencia referencial en vacas(62,63) y 40.5% para cerdos (64) un error de 5%, un nivel de confianza de 90% y una población de entre 100 000 a 1 millón de animales en las zonas de muestreo; de este modo se calculó una colecta de al menos 260 porcinos y 132 bovinos. En el caso de los perros, se asumió una prevalencia de frecuencia de *E. coli* BLEE de 2.5% (65) un error de 5%, un nivel de confianza de 90% y una población de más de 100 000 perros; así, se calculó el muestreo de al menos 27 perros. El número de animales por granja difiere entre criadores de vacas y cerdos de la zona, siendo generalmente los productores de vacas los de menor número (media de 11 vacas/predio en la

región de Lima (26) Por lo tanto, se determinó muestrear 25 granjas por especie con un número mínimo de animales por predio de 10.

3.5. Criterios de inclusión

Muestras de heces de hospederos animales (vacas, cerdos y perros) y agua de granjas donde se aisló previamente cepas BLEE junto con otro mecanismo de resistencia de humanos. De estas muestras sólo se incluyeron aquellas de donde crecieron colonias en agar cefotaxima y ciprofloxacina.

3.6.Criterio de exclusión

Los animales y efluentes provenientes de los centros de producción que no aceptaron el consentimiento informado.

Muestras que no crecieron en ninguno de los agares con antibiótico

Cepas que en la bioquímica no fueron sospechosas a *E. coli* o *Klebsiella* spp.

3.7.Operacionalización de variables

Las variables evaluadas fueron tipo de bacteria (*E. coli* y *Klebsiella* spp.), resistencia fenotípica y genotípica (Cuadro 1).

3.8. Procesamiento de muestras y técnicas

Selección de Granjas de interés.

El muestreo del presente estudio se dio por conveniencia a partir de los resultados encontrados en las cepas de los humanos encargados de granja del estudio principal, a continuación, se detallará lo contemplado en el estudio principal y los objetivos del presente estudio.

El estudio principal contemplo:

- Granjas de mediana y pequeña producción de cerdos, vacas y aves de postura.
- Granjas no tecnificadas para el manejo, alimentación, crianza, recojo de huevos y leche (ordeños manuales, con pezoneras y salas pequeñas de ordeño).
- Muestrear al menos 10 animales en las granjas de producción de vacas, cerdos y 25 animales en el caso de aves de postura.
- Conocimiento y aprobación del consentimiento informado por las personas encargadas de granja para la toma de muestras de humano, perro, agua y animales de producción, así como la aplicación de encuestas a estos humanos encargados de granja.

El presente estudio contemplo:

- Granjas que presentaron cepas de humanos que tuvieron resistencia a betalactámicos y un mecanismo de resistencia adicional (ciprofloxacina, colistina o imipenem) en las zonas de Huaura y Lima.

- Muestras provenientes de granjas de vaca y cerdos, en las cuales se tomaron también muestras de perros y agua según el criterio de granjas con humanos que presentaron resistencia a los antibióticos de interés del estudio.

Obtención de las muestras

Se muestrearon vacas, cerdos, y perros (heces) que habitaban los centros de producción, del mismo modo se tomaron muestras de los efluentes de cada granja. Todo ello se realizó durante el periodo mayo - agosto del 2023. (otoño- invierno).

Las heces de los animales de producción se recolectaron del suelo inmediatamente después de que el animal haya defecado utilizando hisopos estériles para garantizar la menor contaminación posible. Una vez tomada la muestra, esta se colocó en un medio de transporte Stuart. En el caso de los perros, en algunos ejemplares fue necesario realizarles hisopado rectal. Para ello previamente se sumergía el hisopo en el medio Stuart, logrando con ello la lubricación antes de introducir en el recto.

Todos los hisopos fueron rotulados por zona, número de granja y especie.

En el caso de las muestras de agua se recolectaron en envases plásticos estériles de 500 ml previamente desinfectados y rotulados. Para este tipo de muestra solo se tomó una muestra de agua por granja, siendo muestreados los bebederos en el caso de las granjas de vacas mientras que en el caso de las granjas de cerdos se tomó de los desagües de cada corral. Se tuvo esa diferencia de efluentes por el tipo de producción por especie.

Para todas las recolecciones de muestras en cada zona/granja se utilizaron guantes, mascarillas y gorros descartables, así como también botas de jebe. Todos los materiales fueron cambiados entre cada granja visitada como medida de bioseguridad. Los bloques de hisopos y las botellas con muestras fueron previamente selladas con bolsas y se colocaron en cajas térmicas, manteniéndolas en temperatura ambiente para su traslado, el cual fue el mismo día hacia los laboratorios de FAVEZ. En los laboratorios, las muestras se refrigeraron entre 4 y 10 °C por máximo 24 horas para el respectivo procesamiento.

Se han trabajado con equipos que tienen calibraciones y mantenimiento anuales, los protocolos empleados estaban basados en protocolos previamente estandarizados por el CLSI y EUCAST. Las personas encargadas del procesamiento tenían el conocimiento y experiencia en el desarrollo de la parte fenotípica y genotípica.

No hubo pérdidas de ADN porque se trabajó con cepas criopreservadas previamente por el estudio principal y en el caso de las muestras por granja las cepas también fueron criopreservadas una vez que se logró su respectiva identificación.

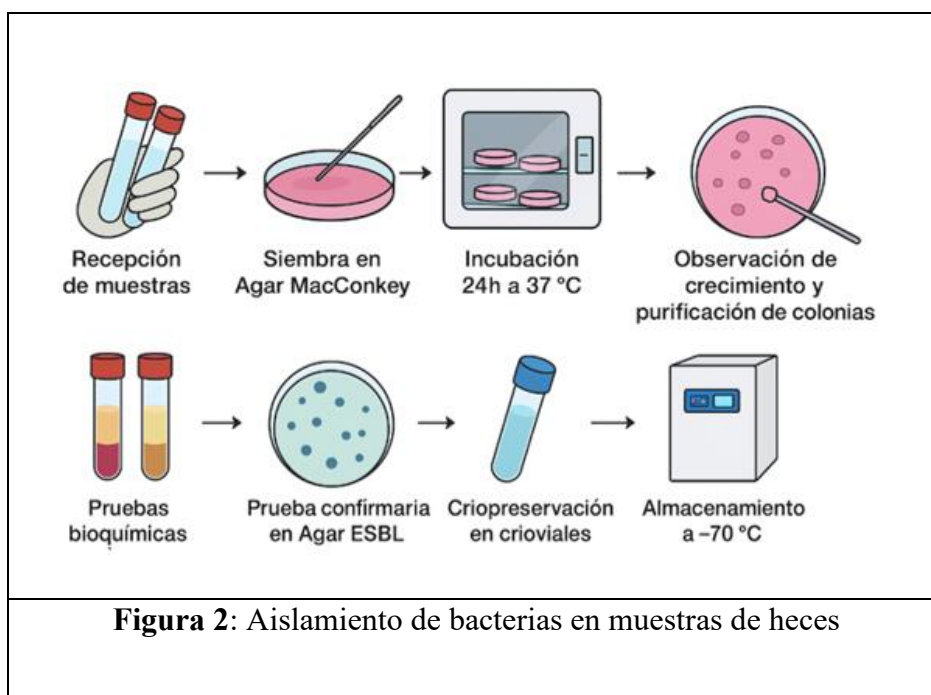
Aislamiento de E. coli y Klebsiella spp.

Cada muestra de heces fue sembrada por agotamiento en el medio MacConkey con cada antibiótico independientemente, es decir fue sembrada en un juego de cuatro placas, cada una con el antibiótico de interés en la investigación (imipenem, ciprofloxacina, cefotaxima, o colistina) a diferentes concentraciones. (Anexo 1).

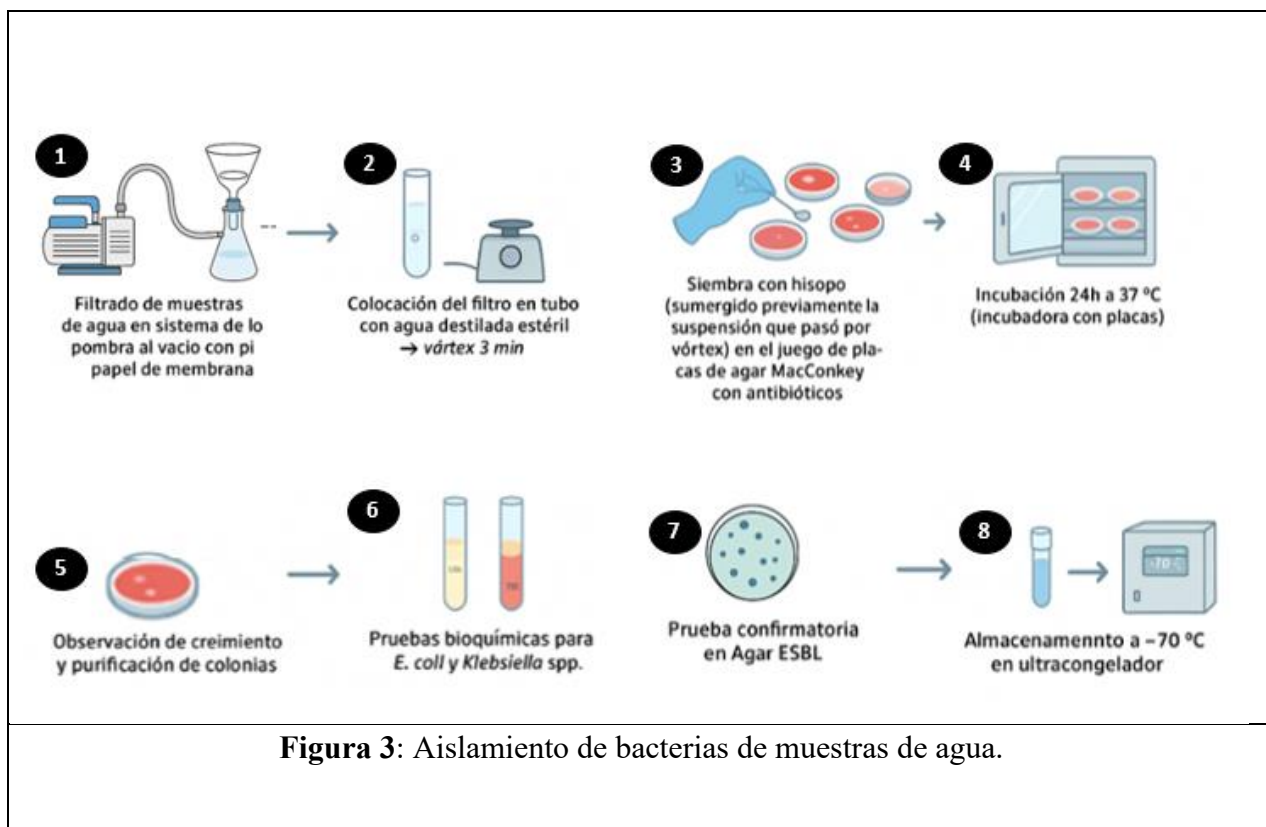
Una vez sembradas en el medio MacConkey con cada uno de los cuatro antibióticos de interés, se incubaron a 37°C por 24 horas, cumplido el tiempo se corroboró el crecimiento de las colonias y se volvió a hacer una resiembra por agotamiento de una o dos colonias aisladas (dependiendo de las características de la colonia), de este modo se aseguró colonias puras.

Estas colonias debían tener características compatibles con *E. coli* y *Klebsiella* spp.: colonias de tamaño mediano, circular, convexas, bordes redondeados y lactosa positivas (*E. coli*) y/o colonias grandes, planoconvexas, mucoides, brillantes, de forma irregular o redondeadas, con bordes ondulados y también lactosa positiva (*Klebsiella* spp.).

Luego de ello dichas colonias puras fueron sembradas en el agar cromogénico e incubadas a 37°C por 24 horas, cumplido el tiempo se corroboró el crecimiento y el color de las colonias dependiendo de ello se observaron colonias sospechosas de *E. coli* (rosadas) o *Klebsiella* spp. (azul verdoso). En base a ello se confirmó la identificación con pruebas bioquímicas TSI (Triple Sugar Iron Agar) y SIM (Sulfide Indole Motility), en este último se observó motilidad, indol y sulfuro de hidrógeno (H₂S). (Figura 2) Adicionalmente, para confirmar las cepas sospechosas de *K. pneumoniae* estas fueron sembradas en el agar cromogénico (HiCrome ESBL agar base, Himedia®, India) e incubadas por 24 hrs a 44.5°C.8. (66)



En el caso de las muestras de agua, estas se filtraron utilizando un sistema de bomba de vacío (Manifold BioVc 300, Rocker, Taiwan), el cual requería de un filtro de papel de membrana (0.45 μm de poro) para retener el sedimento del total de volumen de agua filtrado. Luego de ello se colocó dicha membrana cortada en trozos pequeños en un tubo con 3 ml de agua destilada estéril, se homogenizó con ayuda de un vórtex y finalmente se empleó dicha suspensión en la siembra directa para los cuatros agares MacConkey con las concentraciones de antibiótico anteriormente descritas. Posteriormente las placas fueron incubadas a 37°C por 24 horas (Mates and Schaffer 1989). (Figura 3)



Todas las cepas aisladas a partir de heces y agua fueron criopreservadas a -70°C en 0.8 ml de caldo cerebro corazón (BHI) y 0.2 ml de glicerol.

Pruebas para la selección fenotípica

De todas las colonias que crecieron en agares independientes con colistina, imipenem, cefotaxima y ciprofloxacina, solo se seleccionaron aquellas que crecieron en cefotaxima y ciprofloxacina, las cepas crecidas en los agares de colistina e imipenem también fueron aisladas y criopreservadas, pero no se incluyeron en el estudio. Se priorizo el análisis de las cepas resistentes a cefotaxima y ciprofloxacina debido a su elevada relevancia clínica y epidemiológica por sus mecanismos de resistencia.

A estas colonias se les evaluó la susceptibilidad a antimicrobianos como ciprofloxacina, betalactámicos, meropenem y colistina, con las respectivas concentraciones empleadas (Anexo 1). A partir de la positividad de los aislados al mecanismo de resistencia BLEE y otro tipo de mecanismo de resistencia (quinolonas, carbapenemasas o colistina), fueron seleccionadas para la parte molecular. (Anexo 6).

Para cada una de las pruebas de selección fenotípica se procedió a la reactivación de cada una de las cepas crecidas en agar MacConckey con cefotaxima y ciprofloxacina independientemente, las cuales se encontraban criopreservadas a -70°C.

Para ello se realizó pequeños piquetes al criovial y se realizó la siembra por agotamiento en agar BHI y se incubó a 37°C por 24 h. en aerobiosis. Es necesario mencionar que a cada una de las cepas se les realizó los 4 antibiogramas independiente de sus resultados de resistencia fenotípica.

Una vez corroborado el crecimiento se realizó el método de Kirby Bauer, el cual consistía en tomar de 3 -5 colonias puras (dependiendo de la consistencia de la colonia) para la dilución en agua destilada estéril para lograr una suspensión. Terminada la homogenización se midió la concentración en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 625 nanómetros, buscando una absorbancia entre 0.08-0.12, equivalente a una concentración de 0.5 de la escala de MacFarland. Lograda esa concentración se introdujo un hisopo dentro de la suspensión y se sembró en agar Müeller-Hinton en tres direcciones garantizando que no se deje ningún espacio vacío.

Se dejó secar (3- 5 min) y posterior a ello se colocaron los discos de antibióticos a una distancia de 2.5 - 3 cm. Dependiendo de la prueba de antibiograma que se iba a realizar se usaron diferentes discos de antibióticos.

Método para determinar la resistencia a quinolonas y carbapenémicos

Para la determinación de resistencia a quinolonas se emplearon los controles: La cepa *K. pneumoniae* NCTC13439 (control positivo) y la cepa *E.coli* ATCC 25922 (control negativo) (Anexo 5y 6). Así mismo los discos de antibióticos empleados fueron ciprofloxacina (5ug) y ácido nalidíxico (30ug) a una distancia equidistante de 2.5 - 3 cm, adicional a ese disco se agregó también el disco de meropenem y se dejó incubando a 37°C por 24 horas. Posterior a ello se procedió a medir los halos de difusión de cada disco, según los puntos corte del CLSI, el cual establece que si el disco de ciprofloxacina presenta un halo ≥ 26 mm, será susceptible; si tuviese 22-25 mm sería intermedio y resistente de contar con un halo ≤ 21 mm. Por otro lado, en el caso del disco de ácido nalidíxico, este se consideró susceptible si contaba con un halo ≥ 19 mm, intermedio de tener de 14 a 18 mm y resistente de ser ≤ 13 mm.

De ese modo se otorgó la clasificación final a la cepa, de cumplirse la razón de: ciprofloxacina (sensible) y ácido nalidíxico (resistente) o ciprofloxacina (intermedio) y ácido nalidíxico (resistente), la cepa era susceptible a quinolonas, mientras que si la cepa era resistente a ciprofloxacina y ácido nalidíxico se sospechaba de resistencia a quinolonas. (67)

Por otro lado, en el caso de la prueba de detección cepas sospechosas de resistencia a carbapenemasas, los controles empleados fueron: la cepa *K. pneumoniae* ATCC

BAA- 1705 (control positivo) y la cepa *E.coli* ATCC 25922 (control negativo) (Anexo 5 y 6). Se usó un disco de meropenem (10ug) de igual manera para interpretar se usó la guía del EUCAST: si el halo del disco era ≥ 28 mm sería clasificado como susceptible, de tener =25- 27 mm sospechoso y productora de carbapenemasas si la cepa era menor o igual a 24mm. (68)

Método de Colistina – Agar Spot

Para este tipo de prueba se usaron los controles fueron: la cepa *E.coli* CDC AR-0346 (control positivo) y la cepa *E.coli* ATCC 25922 (control negativo) (Anexo 5 y 6).

La prueba se basa en el principio de inhibición del crecimiento bacteriano en presencia de colistina aplicada directamente sobre el medio de cultivo. Para ello se utilizó una placa que contenía agar Müller-Hinton (MH) y colistín-sulfato (3 ug/ml).

Se realizó una dilución de la cepa en 3 ml de agua destilada, una vez alcanzada la turbidez deseada (0.5 escala McFarland), se colocó una gota de esta suspensión en el agar colistina, posteriormente se incubó a 37 °C por 24 horas. La lectura consistió en observar el crecimiento bacteriano justo alrededor o sobre la gota, de ser así era resistente mientras que si no había crecimiento se consideraba sensible.

Prueba de disco combinado para la detección de BLEE

En la prueba de sinergia con ácido clavulánico, se emplean los discos de ceftazidima (30 ug), cefotaxima (30 ug) y sus combinaciones con ácido clavulánico (30/10 ug), y se colocan todos equidistantes entre 2-3 cm, y a menos de a menos de 1.5 mm del borde de la placa, luego se incuba a 37°C por 24 horas. Al finalizar el periodo de incubación se midieron los halos pertenecientes a cada disco, tanto para las muestras como para los controles usados.

El resultado se determinó por la diferencia entre los discos (>5 mm), considerándose a la cepa como BLEE(69). Los controles empleados fueron la cepa *k. pneumoniae* 700603 (control positivo) y la cepa *E.coli* ATCC 25922 (control negativo) (Anexo5 y 6).

Selección de cepas para análisis molecular

Según los resultados fenotípicos obtenidos, se procedió a seleccionar a todas aquellas cepas que presentaron positividad a cualquiera de los mecanismos de resistencia BLEE, colistina, quinolonas o carbapenemasas

Caracterización molecular

Las pruebas moleculares fueron diseñadas para detectar la presencia de genes de resistencia para colistina y las familias de antibióticos (quinolonas, betalactámicos y carbapenémicos) mediante técnicas de PCR multiplex, incluyendo genes que codifican BLEE (ej: *tem*, *shv*, *ctx-m* (70), carbapenemasas (ej: *bla KPC*, *bla NDM*,

blaVIM, *bla IMP* y *bla OXA48* (71), quinolonas (ej: *qnrS* (72), y el gen *mcr-1* para colistina (73)

Los controles positivos se usaron tanto para el screening fenotípico como molecular (Anexo 5 y 6).

Extracción de ADN

La extracción del ADN fue realizada mediante la técnica de choque térmico. Previo a esto, se recuperaron las colonias de *E. coli* y *Klebsiella* spp. previamente criopreservadas a -70°C, siendo resembradas en agar Müeller Hinton e incubadas a 37°C por 24 hrs. Una vez obtenidas colonias puras se realizó la extracción de ADN, para ello se utilizó un método modificado de choque térmico (74). Este consistió en tomar de 2 a 3 colonias puras de una misma cepa con asas de siembra descartables, se inocularon en microtubos con 500 ul de agua grado molecular, luego pasaron por vórtex de 10 a 20 segundos (o hasta que la colonia se disolviera), posteriormente se las colocó en baño maría a 96°C por 10 minutos, cumplido el tiempo pasaba a congelación -20°C por 10 minutos, esto se repitió tres veces, como siguiente paso se centrifugó a 15000 rpm por 3 minutos. Finalmente se extrajo el sobrenadante en un microtubo limpio de 1.5ml. Las muestras de DNA se mantuvieron en congelación a -20 °C hasta el momento de su uso.

Prueba PCR para detección de genes de resistencia a carbapenemasas

Se realizó mediante un protocolo de PCR Multiplex que incluía primers específicos para los genes *bla IMP*, *bla KPC*, *bla VIM*, *bla NDM*, *bla OXA-48*. Los reactivos utilizados fueron el Kit Invitrogen Platinum taq DNA polymerase REF: 10966-030; Invitrogen 10 mM dNTP Mix REF: 18427-013; Invitrogen 100bp DNA Ladder REF: 15628019; Invitrogen Custom Primers. Así mismo los controles empleados se detallan en el Anexo 5. Las concentraciones y volúmenes del Master Mix se detallan en el Anexo 3.

La programación en el termociclador (PTC 100TM, Bio-Rad Laboratories Inc., California) fue con las siguientes condiciones: temperatura inicial a 94 °C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, luego un anillamiento a 60°C por 30 segundos, seguido de una extensión a 72°C por 45 segundos y para ultimo la fase final una temperatura de 72°C por 5 minutos. Una vez obtenidos los amplicones, se realizó la electroforesis en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0.5ug/ml) en un buffer TAE 1X. 10 µl de cada producto fue mezclado con 2 µl del buffer de carga 6X loading dye (Sigma-Aldrich, Missouri, EE. UU.) y colocado en cada uno de los pocillos del gel. Se utilizó un marcador comercial de tamaño molecular de 100 pares de bases (Invitrogen 100bp DNA ladder). El gel de agarosa con los productos fue sometido a 90 V, 120mA por 60 - 75minutos.(75)

Para el caso de las carbapenemasas fueron cinco los genes finalmente evaluados: *VIM* (261 bp), *IMP* (404 bp), *NDM* (512 bp), *OXA-48* (775 bp), *KPC* (916bp).

Prueba PCR para detección del gen *mcr1* de resistencia a colistina.

Se realizó un protocolo de PCR convencional para la detección del gen *mcr-I*, que incluyó primers específicos. Las concentraciones y volúmenes del “master mix” se detallan en el Anexo 3.

La programación en el termociclador (PTC 100TM, Bio-Rad Laboratories Inc., California) fue con las siguientes condiciones: temperatura inicial a 94 °C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, anillamiento a 56°C por 30 segundos, seguido de una extensión a 72°C por 30 segundos y por último la fase final a 72°C por minutos. Una vez obtenidos los productos post-PCR amplificados, estos fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0.5 ug/ml) en un buffer TAE 1X. 10 µl de cada producto fue mezclado con 2 µl del buffer de carga 6X loading dye (Sigma-Aldrich, Missouri, EE. UU.) y colocado en cada uno de los pocillos del gel. Se utilizó un marcador comercial de tamaño molecular de 100 pares de bases (Invitrogen 100bp DNA ladder). El gel de agarosa con los productos fue sometido a 80 V, 400 mA por 30 minutos (76).

El gen evaluado de resistencia a colistina fue el *mcr-I* con un tamaño de 309 bp.

Prueba PCR para detección del gen *qnrS* de la resistencia de ciprofloxacina.

Consistió en un protocolo de PCR que incluía el primer específico para el gen *qnrS*.

Las concentraciones y volúmenes del “master mix” se detallan en el anexo 3. La programación en el termociclador (PTC 100TM, Bio-Rad Laboratories Inc., California) fue con las siguientes condiciones: temperatura inicial a 94 °C por 2

minutos, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, luego un anillamiento a 62°C por 30 segundos, extensión 72°C por 30 segundos y por último en la fase final a 72°C por 5 minutos. Una vez obtenidos los productos post-PCR amplificados, estos fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0.5ug/ml), en un buffer TAE 1X. 10 µl de cada producto fue mezclado con 2 µl del buffer de carga 6X loading dye (Sigma-Aldrich, Missouri, EE. UU.) y colocado en cada uno de los pocillos del gel. Se utilizó un marcador comercial de tamaño molecular de 100 pares de bases (Invitrogen 100bp DNA ladder). El gel de agarosa con los productos fue sometido a 80 V, 400mA por 30 minutos (77)

El gen de *qnrS* tenía un tamaño de 428 bp.

Prueba PCR para detección de genes de resistencia para BLEE

Consistió en un protocolo de PCR convencional para los genes *blaCTX-M*, *blaSHV* y *blaTEM*, cada protocolo incluyó primers específicos para el gen por evaluar.

Las concentraciones y volúmenes del “master mix” se detallan en el Anexo 3. Se usó la misma programación para todos los genes (CTX-M, SHV, TEM y en el termociclador (PTC 100TM, Bio-Rad Laboratories Inc., California) fue con las siguientes condiciones: temperatura inicial a 94 °C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, anillamiento a 54°C por 30 segundos, luego la extensión a 72°C por 60 segundos y por último la fase final a 72°C por 5 minutos. Una vez obtenidos los productos post-PCR amplificados, estos fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0.5 ug/ml), en un buffer TAE 1X. 10 µl de cada producto fue mezclado con 2 µl del buffer de carga

6X loading dye (Sigma-Aldrich, Missouri, EE. UU.) y colocado en cada uno de los pocillos del gel. Se utilizó un marcador comercial de tamaño molecular de 100 pares de bases (Invitrogen 100bp DNA ladder). El gel de agarosa con los productos fue sometido a 80 V, 400mA por 30 minutos (78,79).

Los controles positivos para los genes codificantes de BLEE tenían un determinado peso cada uno por ejemplo para el gen *CTX-M* (556 bp), *SHV* (885bp) y *TEM* (1250bp).

3.9. Análisis de resultados

El análisis de datos se realizó utilizando estadística descriptiva (tablas de frecuencias: absoluta, relativa), según lugar, tipo de producción, tipo de bacteria, (*E. coli* o *Klebsiella* spp.), tipo de resistencias de los hospederos.

3.10. Consideraciones éticas

El protocolo del proyecto madre fue sometido a evaluación y aprobación por el Comité Institucional de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, se aprobó mediante la constancia 591-49-222 CIEI. Así mismo el protocolo del presente proyecto se aprobó mediante la constancia 050-12-22 CEIA.

Cuadro 1: Operacionalización de variables

Definición conceptual	Definición operacional	Valores posibles	Criterios de medición	Fuente
Género de bacteria	Identificación realizada en el laboratorio	<i>E. coli</i>	Categórica dicotómica	Presencia o ausencia mediante pruebas bioquímicas
Género de bacteria	Identificación realizada en el laboratorio	<i>Klebsiella</i> spp.	Categórica dicotómica	Presencia o ausencia mediante pruebas bioquímicas
Resistencia fenotípica a quinolonas	Confirmación realizada en laboratorio	presenta mecanismo de resistencia no presenta mecanismo de resistencia	Categórica dicotómica	Mediante los resultados de la prueba de difusión en disco
Resistencia fenotípica a carbapenemasas	Confirmación realizada en laboratorio	presenta carbapenemasas no presenta carbapenemasas	Categórica dicotómica	Mediante los resultados de la prueba de difusión en disco

Resistencia fenotípica a colistina	Confirmación realizada en laboratorio	Resistente Sensible	Categórica dicotómica	Mediante los resultados de crecimiento en la prueba de Spot on
Resistencia fenotípica BLEE	Confirmación realizada en laboratorio	Resistente Sensible	Categórica dicotómica	Mediante la prueba de doble disco
Genes de resistencia para quinolonas	Genes de resistencia de <i>E. coli</i> o <i>Klebsiella</i> spp.	Presencia Ausencia	Categórica dicotómica	Amplificación del gen <i>qnrS</i> mediante PCR convencional
Genes de resistencia para carbapenemasas	Genes de resistencia de <i>E. coli</i> o <i>Klebsiella</i> spp.	Presencia Ausencia	Categórica dicotómica	Amplificación de genes compatibles con VIM, <i>IMP</i> , <i>KPC</i> , <i>NDM</i> y <i>OXA-48</i> mediante PCR convencional
Genes de resistencia para colistina	Genes de resistencia de <i>E. coli</i> o <i>Klebsiella</i> spp.	Presencia Ausencia	Categórica dicotómica	Amplificación del gen <i>mcr-1</i> mediante PCR convencional

Genes de resistencia para BLEE	Genes de resistencia de <i>E. coli</i> o <i>Klebsiella</i> spp.	Presencia Ausencia	Categórica dicotómica	Amplificación de los genes <i>CTX-M</i> , <i>TEM</i> , <i>SHV</i> mediante PCR convencional
Zona de muestreo	Provincia	Huaura Lima	Categórica dicotómica	Según las granjas en donde se encontraban cepas de humanos con resistencia a BLEE y a otro mecanismo de resistencia (colistina, carbapenémicos, quinolonas)
Fuente de muestras	Origen de la muestra	Perro Cerdos Vacas Agua	Categórica polidicotómica	Características según el animal y tipo de agua. En el caso de las vacas se tomaron las muestras de agua de los bebederos, mientras que en las granjas de cerdos se recolectó del drenaje de cada corral.

IV. RESULTADOS

En la Tabla 1 se puede observar la distribución de la cantidad total de muestras (animales y agua) colectadas según hospedero y granja.

Tabla 1: Distribución de las muestras colectadas según hospedero y granja

Zonas	Granjas	Animales de producción	Perros	Agua
Huaura	14	153 (vacas)	18	15
Lima	25	261 (cerdos)	30	25
Total	39	414	48	40

En la Tabla 2 se puede observar el número de hospederos y cepas por granjas y la identificación de cada una de estas en las granjas de vacas en la zona de Huaura.

Se puede apreciar que fueron solo 12 las granjas seleccionadas, todas tuvieron muestras de vacas, solo 7 tuvieron muestras de perros y 8 muestras de agua.

También se puede ver que las granjas 4 y 5 tienen cepas de vacas con doble identificación. Así mismo se aprecia la elevada frecuencia de *E. coli* frente a *Klebsiella* spp. en la mayoría de las muestras. Así mismo se identificó 6 cepas de 3 vacas, 2 por cada una, las cuales crecieron en agar MacConkey con cefotaxima y ciprofloxacina, pero con identificaciones diferentes (*E. coli* o *Klebsiella* spp.)

Finalmente, la cantidad de muestras de vacas fueron 45, en el caso de los perros 9 y por último 8 fueron las muestras de agua. También se observa que las granjas que tuvieron mayor cantidad de cepas fueron la 5, 9 y 10.

Tabla 2: Listado de las granjas de vaca con sus respectivas cepas de hospederos y fuente

	Granja	Hospederos	n hospedero				Total
				<i>E.coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella</i> spp.	
Huacho = Huaura n granjas=12	1	Vacas	3	6	0	0	6
		Perros	1	1	0	0	1
		Agua	0	0	0	0	0
	2	Vacas	3	3	0	0	3
		Perros	2	4	0	0	4
		Agua	1	0	0	1	1
	3	Vacas	4	3	0	1	4
		Perros	0	0	0	0	0
		Agua	0	0	0	0	0
	4	Vacas	4	3	4	0	7
		Perros	0	0	0	0	0
		Agua	1	1	0	1	2
	5	Vacas	5	5	2	0	7
		Perros	1	2	0	0	2
		Agua	0	0	0	0	0

6	Vacas	3	4	0	0	4
	Perros	1	1	0	0	1
	Agua	1	1	0	0	1
7	Vacas	3	3	0	0	3
	Perros	1	1	0	0	1
	Agua	1	0	1	0	1
8	Vacas	3	3	0	1	4
	Perros	0	0	0	0	0
	Agua	1	2	0	0	2
9	Vacas	6	6	0	1	7
	Perros	1	2	0	0	2
	Agua	0	0	0	0	0
10	Vacas	5	8	0	0	8
	Perros	2	4	0	0	4
	Agua	1	2	0	0	2
11	Vacas	3	3	0	0	3
	Perros	0	0	0	0	0
	Agua	1	3	0	0	3
13	Vacas	3	3	0	0	3
	Perros	0	0	0	0	0
	Agua	1	1	0	0	1
Total		62	75	7	5	87

En la Tabla 3 se puede observar el número de hospederos y cepas por granjas y la identificación de cada una de estas, en el primer muestreo de las granjas de cerdos en la zona Lima.

Las granjas seleccionadas de este primer muestreo fueron 12, todas tuvieron muestras de cerdos, 3 tuvieron muestras de perros y 2 muestras de agua, también se aprecia el predominio de *E. coli* frente a *Klebsiella* spp. en casi más del 95% de las muestras. Así mismo se apreció dos cepas de un cerdo que creció en agar MacConkey con cefotaxima y ciprofloxacina, pero tuvieron identificaciones diferentes siendo una de ellas *E. coli* y la otra *Klebsiella* spp.

Tabla 3: Listado de las granjas de cerdos con sus respectivas cepas de hospederos y fuente del 1° muestreo.

San Bartolo- Lima	Granja	Hospederos	n hospedero	<i>E.coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella spp.</i>	Total
n granjas=12	1	Cerdos	8	9	0	0	9
		Perros	0	0	0	0	0
		Agua	0	0	0	0	0
	2	Cerdos	4	4	0	0	4
		Perros	0	0	0	0	0
		Agua	0	0	0	0	0
	3	Cerdos	1	0	0	1	1
		Perros	0	0	0	0	0
		Agua	0	0	0	0	0
	4	Cerdos	3	3	0	1	4
		Perros	0	0	0	0	0
		Agua	0	0	0	0	0
	5	Cerdos	2	3	0	0	3
		Perros	1	1	0	0	1
		Agua	0	0	0	0	0
	6	Cerdos	6	6	0	0	6
		Perros	0	0	0	0	0
		Agua	0	0	0	0	0
	8	Cerdos	7	9	0	0	9
		Perros	1	1	0	0	1
		Agua	1	1	1	0	2
	9	Cerdos	5	7	0	0	7
		Perros	0	0	0	0	0
		Agua	0	0	0	0	0
	10	Cerdos	5	6	0	0	6
		Perros	0	0	0	0	0
		Agua	0	0	0	0	0
	11	Cerdos	3	3	0	0	3
		Perros	1	1	0	0	1
		Agua	1	1	0	0	1
	12	Cerdos	5	5	0	0	5
		Perros	0	0	0	0	0
		Agua	0	0	0	0	0
	13	Cerdos	6	7	0	0	7
		Perros	0	0	0	0	0
		Agua	0	0	0	0	0
Total			60	67	1	2	70

En la Tabla 4 se puede observar el número de hospederos y cepas por granjas y la identificación de cada una de estas, en el segundo muestreo de las granjas de cerdos en la zona de Lima.

Las granjas seleccionadas de este primer muestreo fueron 10, solo 8 tuvieron muestras de cerdos, 2 muestras de perros y 1 muestra de agua, también se aprecia el predominio de *E. coli* frente a *Klebsiella* spp. en casi más del 95% de las muestras.

Tabla 4: Listado de las granjas de cerdos con sus respectivas cepas de hospederos y fuente del 2° muestreo.

San Bartolo- Lima n granjas=10	Granja	Hospederos	n hospedero				Total
				<i>E.coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella spp.</i>	
1	Cerdos		4	5	0	1	6
		Perros	0	0	0	0	0
		Agua	0	0	0	0	0
	2	Cerdos	4	6	0	0	6
		Perros	0	0	0	0	0
		Agua	0	0	0	0	0
	3	Cerdos	6	7	0	1	8
		Perros	1	2	0	0	2
		Agua	0	0	0	0	0
4	Cerdos		7	9	0	0	9
		Perros	0	0	0	0	0
		Agua	0	0	0	0	0
	5	Cerdos	0	0	0	0	0
		Perros	0	0	0	0	0
		Agua	0	0	0	0	0
	6	Cerdos	0	0	0	0	0
		Perros	0	0	0	0	0
		Agua	1	2	0	0	2
7	Cerdos		4	5	0	0	5
		Perros	0	0	0	0	0
		Agua	0	0	0	0	0

8	Cerdos	6	8	0	0	8
	Perros	0	0	0	0	0
	Agua	0	0	0	0	0
10	Cerdos	1	1	0	0	1
	Perros	0	0	0	0	0
	Agua	0	0	0	0	0
11	Cerdos	5	5	0	0	5
	Perros	1	2	0	0	2
	Agua	0	0	0	0	0
Total		40	52	0	2	54

En la Tabla 5 se puede observar que fueron dos zonas las muestreadas siendo Huaura la zona de producción de vacas lecheras y Lima de producción cerdos. Se obtuvieron 87 aislados de las granjas de vacas y 124 de las granjas de cerdos.

De todos los 60 aislados de vacas el 85% (51/60) fueron *E.coli* y el 15% (9/60) *Klebsiella* spp., en el caso de los 112 aislados de cerdos se vio un predominio *E.coli* con 96.4% (108/112) y 4.03% (4/112) fueron *Klebsiella* spp., también se observó que en las granjas de vacas las cepas aisladas de agua tuvieron un 76.92% de frecuencia de *E.coli* y 23.07% a *Klebsiella* spp. En el caso de las granjas de cerdos 80% de cepas aisladas de agua tuvieron 80% de *E.coli* y 20% a *Klebsiella* spp.. Por último, en el caso de los aislados de perros de granjas de vacas, el 100% (14/14) fue *E. coli*, mientras que, en las granjas de cerdos, 80% (4/5) fueron *E. coli* y 20% (1/5) *Klebsiella* spp.

Tabla 5. Número de cepas aisladas según especie bacteriana.

Lugar	Hospedero	n hospederos	<i>E.coli</i>	<i>Klebsiella spp.</i>	Total
			N %	N%	N%
Huaura	Vacas	45	51 (85)	9 (15)	60(100)
n granjas=12	Perros	9	14 (100)	0	14(100)
	Agua	8	10 (76.92)	3 (23.07)	13(100)
	Total	62	75	12	87
Lima	Cerdos	92	108 (96.4)	4 (3.57)	112(100)
n granjas=21	Perros	5	7	0	7(100)
	Agua	3	4 (80)	1 (20)	5(100)
	Total	100	119 (95.96)	5 (4.03)	124 (100)

En la Tabla 6 se muestra el perfil de resistencia fenotípica obtenida según fuente animal y ambiental de las granjas de vacas para *E.Coli*.

Dentro del perfil de resistencia más frecuente de las cepas totales de las granjas de vacas encontramos principalmente dos tipos de perfiles, siendo la mayor resistencia la de quinolonas con BLEE con un 26.7% (20/75) con respecto del total. De este porcentaje, los provenientes de vacas fueron los más representativos con 8 aislados de los 20.

El segundo tipo de perfil más frecuente fue colistina con BLEE con un 25.33% (19/75) del total. De estos aislados, los provenientes de vacas fueron los más numerosos con 13 aislados de 19.

Otra combinación frecuente fue la de resistencia a quinolonas, colistina y BLEE con 17.33%

(13/75) del total de aislados. De estos aislados 8 provienen de vacas y 5 de agua.

Finalmente se tuvo 1 cepa con cuatro resistencias proveniente de una vaca.

Tabla 6: Perfiles fenotípicos de resistencia antimicrobiana en *Escherichia coli* aisladas de fuentes animal y ambiental de granjas de vacas.

Perfil fenotípico de resistencia más frecuente	<i>Escherichia coli</i>			
	Aislados de perros n (%)	Aislados de vacas n (%)	Aislados de agua n (%)	Total de aislados n (%)
Quinolonas	1 (6.67)	7 (14.00)	-	8 (10.67)
Colistina	-	2 (4.00)	-	2 (2.67)
quinolonas + BLEE	9 (60.00)	8 (16.00)	3 (30.00)	20 (26.67)
quinolonas + colistina	-	2 (4.00)	-	2 (2.67)
colistina + BLEE	4 (26.67)	13 (26.00)	2 (20.00)	19 (25.33)
carbapenemasas+ BLEE	1 (6.67)	8 (16.00)	-	9 (12.00)
quinolonas + colistina + BLEE	-	8 (16.00)	5 (50.00)	13 (17.33)
carbapenemasas + colistina + BLEE	-	1 (2.00)	-	1 (1.33)
quinolonas + carbapenemasas + colistina +BLEE	-	1 (2.00)	-	1 (1.33)
Total	15 (100.00)	50 (100.00)	10 (100.00)	75 (100.00)

En la Tabla 7 se muestra el perfil de resistencia fenotípica obtenida según fuente animal y ambiental de las granjas de vacas para *Klebsiella* spp.

El perfil de resistencia más frecuente fue de quinolonas con BLEE con 40% (2/5) del total de aislados. De estos 2 son de vacas. Del mismo modo se observa que las dobles y triples resistencias de colistina tuvieron una frecuencia del 20% (1/5). Otro perfil predominante fue el de quinolonas, colistina y BLEE con un 20% (1/5), el cual correspondía a un aislado de agua.

Tabla 7: Perfiles fenotípicos de resistencia antimicrobiana en *Klebsiella* spp. aisladas de fuentes animal y ambiental de granjas de vacas.

Perfil fenotípico de resistencia más frecuente	<i>Klebsiella</i> spp.		
	Aislados de vacas n (%)	Aislados de agua n (%)	Total de aislados n (%)
quinolonas+ BLEE	2 (66.67)	-	2 (40.00)
colistina + BLEE	-	1 (50.00)	1 (20.00)
quinolonas + colistina+ BLEE	1 (33.33)	-	1 (20.00)
quinolonas+ carbapenemasas + colistina+ BLEE	-	1 (50.00)	1 (20.00)
Total	3 (100.00)	2 (100.00)	5 (100.00)

En la Tabla 8 se muestra el perfil de resistencia fenotípica obtenida según fuente animal y ambiental de las granjas de cerdos para *Escherichia coli*.

El perfil de resistencia más frecuente fue quinolonas con BLEE con 64.71% (77/119) del total de aislados. De estos 69 aislados corresponde a cerdos, 6 aislados a perros y 2 aislados a efluentes. El segundo perfil fenotípico de resistencia más frecuente fue colistina con BLEE con 13.45% (16/119) del total de aislados. De los cuales todos correspondieron a cerdos. Finalmente, del perfil fenotípico de resistencia a tres antibióticos simultáneamente se obtuvieron un total de 18 aislados. Siendo el más representativo la combinación de quinolonas, colistina y BLEE con 14 aislados.

Tabla 8: Perfiles fenotípicos de resistencia antimicrobiana en *Escherichia coli* aisladas de fuentes animal y ambiental de granjas de cerdos

Perfil fenotípico de resistencia más frecuente	<i>Escherichia coli</i>			
	Aislados de perros n (%)	Aislados de cerdos n (%)	Aislados de agua n (%)	Total de aislados n (%)
quinolonas	-	2 (1.85)	-	2 (1.68)
quinolonas + BLEE	6 (85.71)	69 (63.89)	2 (50.00)	77 (64.71)
quinolonas + colistina	-	3 (2.78)	-	3 (2.52)
quinolonas + colistina + BLEE	1 (14.29)	11 (10.19)	2 (50.00)	14 (11.76)
quinolonas + carbapenemasas+ BLEE	-	3 (2.78)	-	3 (2.52)
quinolonas + carbapenemasas+ colistina	-	1 (0.93)	-	1 (0.84)
quinolonas + carbapenemasas + colistina+ BLEE	-	2 (1.85)	-	2 (1.68)
colistina + BLEE	-	16 (14.81)	-	16 (13.45)
Carbapenemasas	-	1 (0.93)	-	1 (0.84)
Total	7 (100.00)	108 (100.00)	4 (100.00)	119 (100.00)

En la Tabla 9 se muestra el perfil de resistencia fenotípica obtenida según fuente animal y ambiental de las granjas de porcinos para *Klebsiella* spp.

En lo que respecta al género *Klebsiella* spp, se tuvo un predominio de la doble resistencia de quinolonas con BLEE en dos aislados de cerdo. Por otra parte, se observó un aislado con doble resistencia de tipo colistina con betalactámicos en un aislado de cerdo. (Tabla 9).

Tabla 9: Perfiles fenotípicos de resistencia antimicrobiana en *Klebsiella* spp. aisladas de fuentes animal y ambiental de granjas de cerdos.

Perfil fenotípico de resistencia más frecuente	<i>Klebsiella</i> spp.	
	Aislados de cerdos n (%)	Total de aislados n (%)
quinolonas	1 (25.00)	1 (25.00)
quinolona + BLEE	2 (50.00)	2 (50.00)
colistina + BLEE	1 (25.00)	1 (25.00)
Total	4 (100.00)	4 (100.00)

Resultados de las pruebas moleculares (PCR)

Culminada la parte fenotípica fueron seleccionadas las cepas con positividad al mecanismo de resistencia BLEE y otro mecanismo de resistencia como: colistina, quinolonas o carbapenemasas, para con ello lograr detectar los principales genes asociados a dichos mecanismo de resistencia fenotípico de las cepas aisladas. A partir de lo mencionado anteriormente se seleccionaron 60 cepas de vacas, 14 de perros y 13 cepas de efluentes, por otro lado, para el caso de granjas porcinas, se seleccionaron 112 cepas de cerdos, 7 de perros y 5 de efluentes (Cuadro 2).

Cuadro 2: Cantidad de aislamientos de hospederos seleccionados para el procesamiento molecular

Zonas	Especie	Animales de producción	Perros	Agua (efluentes)
Huaura	Vacas	60	14	13
Lima	Cerdos	112	7	5
Total		172	21	18

En la Tabla 10 se aprecia la frecuencia de genes de resistencia antimicrobiana en *E. coli* aisladas de fuentes animal y ambiental de granjas de vacas, se puede observar que de las 47 cepas aisladas con identificación de *E. coli* de las granjas bovinas, se observó que el gen *qnrS*, fue el más frecuentemente detectado con 23.40% (11/47), dividiéndose en seis los aislados de vacas, tres de perros y dos de efluentes. También se logró observar que el gen *blaCTX-M* tuvo una frecuencia de 14.9% (7/47) teniendo una distribución entre los aislados de vacas, perros y efluentes. Los de doble resistencia tuvieron frecuencia alta: entro los que destacan la distribución de *blaCTX-M + qnrS* 14.89% (7/47) y *blaCTX-M + blaTEM + qnrS* (12.77%) (6/47), observados principalmente en cepas de vacas y agua.

Tabla 10. Frecuencia de genes de resistencia antimicrobiana en *E. coli* aisladas de fuentes animal y ambiental de granjas de vacas.

Perfil genético de resistencia más frecuente	<i>Escherichia coli</i>				
	Grupo de antibiótico de la resistencia encontrada	Aislados de perros n(%)	Aislados de vacas n(%)	Aislados de agua n(%)	Total de aislados n (%)
<i>qnrS</i>	Quinolona	3 (30.00)	6 (20.69)	2 (25.00)	11 (23.40)
<i>blaTEM</i>	Betalactamico	2 (20.00)	4 (13.79)	-	6 (12.77)
<i>blaCTXM</i>	Betalactamico	2 (20.00)	3 (10.34)	2 (25.00)	7 (14.89)
<i>blaCTXM+qnrS</i>	Betalactamico+ Quinolona	2 (20.00)	3 (10.34)	2 (25.00)	7 (14.89)
<i>blaCTXM+blaTEM</i>	Betalactamicos	-	4 (13.79)	-	4 (8.51)
<i>blaTEM+qnrS</i>	Betalactamico+ Quinolona	1 (10.00)	2 (6.90)	-	3 (6.38)
<i>blaCTXM+SHV</i>	Betalactamicos	-	1 (3.45)	-	1 (2.13)
<i>blaCTXM+blaTEM+qnrS</i>	Betalactamico+ Quinolona	-	5 (17.24)	1 (12.50)	6 (12.77)
<i>blaCTXM+blaSHV+blaTEM</i>	Betalactamicos	-	1 (3.45)	1 (12.50)	2 (4.26)
Total		10 (100)	29 (100)	8 (100)	47 (100)

En la Tabla 11 se muestra la frecuencia de genes de resistencia antimicrobiana en *Klebsiella* spp. aisladas de fuentes animal y ambiental de granjas de vacas, se puede apreciar que del total de 2 aislados de vacas con identificación de *Klebsiella* spp., uno de ellos tuvo una doble resistencia de los genes *blaTEM*+ *qnrS* y el otro aislado tuvo una triple combinación de resistencias de los genes BLEE: *blaCTX-M* + *blaSHV*, mientras que del único aislado de agua se encontró una combinación de resistencia dos los genes *blaCTX-M* + *blaTEM*+ *blaSHV*.

Tabla 11. Frecuencia de genes de resistencia antimicrobiana en *Klebsiella* spp. aisladas de fuentes animal y ambiental de granjas de vacas.

Perfil genético de resistencia más frecuente	<i>Klebsiella</i> spp.			
	Grupo de antibiótico de la resistencia encontrada	Aislados de vacas n(%)	Aislados de agua n(%)	Total de aislados n (%)
<i>blaTEM</i> + <i>qnrS</i>	Betalactamico+ Quinolona	1 (50.00)	-	1 (33.33)
<i>blaCTX-M</i> + <i>blaSHV</i>	Betalactamicos	-	1 (100.00)	1 (33.33)
<i>blaCTX-M</i> + <i>blaTEM</i> + <i>blaSHV</i> .	Betalactamicos	1 (50.00)	-	1 (33.33)
Total		2 (100.00)	1 (100.00)	3 (100.00)

En la Tabla 12 se muestra la frecuencia de genes de resistencia antimicrobiana en *E. coli* aisladas de fuentes animal y ambiental de granjas de cerdos, de un total de 94 cepas aisladas de *E. coli*, se puede observar la frecuencia del gen *blaCTX-M* en los aislados de cerdos con 66.27% (55/83), por el contrario, la frecuencia en perros y agua fue mínima con 3% (3/7) y 2% (2/4) respectivamente. Así mismo del total de aislados de fuentes (vaca, perro y agua) la frecuencia del *blaCTX-M* fue 63.16% (60/95).

El porcentaje de dos genes fue un 21.05% (20/95) del total de aislados, destacando la combinación *blaCTX-M* + *blaTEM*, las cuales se identificaron en aislamientos de cerdos, perros y efluentes. Asimismo, se observó en una frecuencia menor los perfiles de tres resistencias *blaCTX-M* + *blaTEM* + *qnrS* con un 4.21% (4/95) del total de aislados, detectado en cerdos y agua.

Tabla 12. Frecuencia de genes de resistencia antimicrobiana en *E. coli* aisladas de fuentes animal y ambiental de granjas de cerdos.

Perfil genético de resistencia más frecuente	<i>Escherichia coli</i>				
	Grupo de antibiótico de la resistencia encontrada	Aislados de perros n(%)	Aislados de cerdos n(%)	Aislados de agua n(%)	Total de aislados n (%)
<i>blaCTX-M</i>	Betalactamico	3 (42.86)	55 (66.27)	2 (50.00)	60 (63.83)
<i>qnrS</i>	Quinolona	1 (14.29)	5 (6.02)	-	6 (6.38)
<i>blaTEM</i>	Betalactamico	-	4 (4.82)	-	4 (4.26)
<i>blaCTX-M</i> + <i>blaTEM</i> ,	Betalactamicos	3 (42.86)	8 (9.64)	1 (25.00)	12 (12.77)
<i>blaCTX-M</i> + <i>qnrS</i>	Betalactamico+ Quinolona	-	8 (9.64)	-	8 (8.51)
<i>blaCTX-M</i> + <i>blaTEM</i> + <i>qnrS</i>	Betalactamico+ Quinolona	-	3 (3.61)	-	3 (3.19)
<i>blaCTX-M</i> + <i>blaTEM</i> + <i>blaSHV</i>	Betalactamicos	-	-	1 (25.00)	1 (1.06)
Total		7 (100.00)	83 (100.00)	4 (100.00)	94 (100.00)

En la Tabla 13 se muestra la frecuencia de genes de resistencia antimicrobiana en *Klebsiella* spp. aisladas de fuentes animal y ambiental de granjas de cerdos, se aprecia el predominio de los genes BLEE, teniendo un asilado de cerdos para el gen *blaCTXM* y el *blaTEM* respectivamente. Asimismo, se observa un aislado de cerdos con triple resistencia de los genes *blaCTX-M* + *blaSHV* + *blaTEM*.

Tabla 13. Frecuencia de genes de resistencia antimicrobiana en *Klebsiella* spp. aisladas de fuentes animal y ambiental de granjas de cerdos

Perfil genético de resistencia más frecuente	<i>Klebsiella</i> spp.		
	Grupo de antibiótico de la resistencia encontrada	Aislados de cerdos n(%)	Total de aislados n (%)
<i>blaCTXM</i>	Betalactamico	1 (33.33)	1 (33.33)
<i>blaTEM</i>	Betalactamico	1 (33.33)	1 (33.33)
<i>blaCTXM+blaSHV+blaTEM</i>	Betalactamicos	1 (33.33)	1 (33.33)
Total		3 (100.00)	3 (100.00)

V. DISCUSIÓN

En los últimos años, la RAM se ha convertido en uno de los desafíos más complejo y urgentes para la salud pública. Ello se debe principalmente al incremento del número de géneros bacterianos resistentes, la diversidad de mecanismos de resistencia y los reservorios tanto biológicos como ambientales afectados. Debido a ello se ve necesario que las investigaciones tengan un enfoque de Una Salud, para de este modo poder lograr un monitoreo adecuado de la RAM en animales, humanos y ambiente (3,80,81). Debido a ello el presente estudio se dio a partir de un enfoque Una salud y se evaluaron granjas de vacas y cerdos, así como las muestras de perros y agua de cada granja muestreada.

Dentro de los aislados totales de vacas se encontró una frecuencia de *E. coli* BLEE del 78% (39/50). Resultados similares fueron los encontrados en Ecuador y Argentina, con prevalencias del 51% al 85.8% (51,82). Ello podría deberse al uso indiscriminado e inadecuado de antibióticos, malas prácticas de manejo, deficiente higiene en el ordeño, etc. (54,56,83,84). Comúnmente se recomienda el uso de un método genotípico para la detección de resistencia por su especificidad y sensibilidad en comparación con los métodos fenotípicos, sin embargo, el uso complementario de ambos brinda una visión más completa y confiable de los perfiles de resistencia (85,86). Tomando ello en cuenta se realizó la evaluación genotípica mediante PCR de todas las resistencias fenotípicas encontradas previamente (BLEE, quinolonas, carbapenemasas y colistina).

Es así como se observó a nivel genotípico que de todos los aislados *E. coli* BLEE de vacas hubo una mayor frecuencia del gen *blaCTX-M* con 58.7% (17/29), seguido el *blaTEM* con 55.2% (16/29) y finalmente el gen *bla SHV* con 6.89% (2/29). Dato similar fue observado en un estudio en vacas en china en donde la frecuencia del *blaCTX-M* fue 71.8% (28/39), seguido el *blaTEM* con 74.4% (29/39) y finalmente el gen *bla SHV* con 2.6% (1/39), también se encontró la frecuencia de los genes *blaCTX-M* y *blaTEM* con 51.28% (20/39) (87), mientras que en el presente estudio se observó una frecuencia del 13.79% (4/29) de esa frecuencia de dobles genes. A nivel mundial son diferentes los estudios, que han reportado la prevalencia de la resistencia de enterobacterias a BLEE, siendo los genes *blaCTX-M*, *blaTEM* y *blaSHV*, los más frecuentes detectados, ello podría atribuirse a que residen en plásmidos, lo que facilita la transferencia horizontal a otras bacterias (2,3,88). La circulación de este tipo de genes en diferentes tipos de poblaciones animales requiere un enfoque integrado de Una Salud para lograr comprender, predecir y prevenir mejor su diseminación.(61)

Dentro de los aislados *E.coli* productoras de BLEE de perros pertenecientes a granjas de vacas se pudo observar la frecuencia del gen *blaCTX-M* y su unión con el gen *blaTEM* del 42.9% (3/7) en ambos casos. Datos similares fueron reportados en un estudio realizado en Brasil en perros y sus dueños, en donde se observó el predominio de la resistencia a *blaCTX-M* 33.3% (4/12), seguido del *blaTEM* con 25% (3/12) y aún más preocupante la elevada frecuencia de la doble resistencia *blaCTX-M* + *blaTEM* con 33.3% (4/12) y la triple resistencia *blaCTX-M*+ *blaTEM* + *blaSHV* con 8.3% (1/12). Ello confirma la circulación de genes BLEE en los

animales de producción y domésticos de la granja así como también en viviendas, hecho preocupante para la salud pública. (61,89)

En el caso de todos los aislados *E.coli* BLEE de agua, se observó el predominio el gen *blaCTX-M* con 50% (2/4) y frecuencia de doble resistencia con *blaTEM* y de triple resistencia con *blaTEM* y *blaSHV* siendo del 25% (1/4) en ambos casos respectivamente. En un estudio realizado en Indonesia se observó el predominio del gen *blaTEM* con 77.2% (17/22), del gen *blaCTX-M* con 4.5% (1/22) y de la doble resistencia del *blaCTX-M + blaTEM* y *blaTEM + blaSHV* siendo ambas del 9% (2/22). Las frecuencias observadas muestran que el agua de granjas constituye un reservorio crítico de genes de resistencia a los antibióticos, en particular *blaTEM*, ello puede deberse a la deficiente gestión de las aguas residuales y medidas de bioseguridad. La circulación de este tipo de genes en diferentes tipos de poblaciones animales y ambientales requiere un enfoque integrado de Una Salud para lograr comprender, predecir y prevenir mejor su diseminación.(61,90)

En el caso de las cepas aisladas de cerdos, se detectó una frecuencia de *E. coli* BLEE del 93.5% (101/108), a diferencia de este resultado en un estudio realizado en china se observó una prevalencia del 43.23%(198/458)(92,93). Estos resultados podrían relacionarse al uso en tratamiento de infecciones respiratorias, reproductivas o gastrointestinales que suelen cursar dichas especies en sus diferentes etapas de crecimiento o por su uso como aditivos (93)

A nivel molecular en los aislados de cerdos, se pudo observar la frecuencia de genes BLEE, destacando el gen *blaCTX-M* con 89.2% (74/83) a diferencia del *blaTEM* con 13.3% (11/83). Ello también fue reportado en el estudio realizado por Marrero-Moreno et. al. (2017), en él se observó una alta frecuencia del gen *blaCTX-M* del 88.2% (15/17) y *blaTEM* 29.41% (5/17). (94). Otro estudio en Ladvia reportó una prevalencia diferente de los genes BLEE siendo el de mayor frecuencia el *blaTEM* con 94%, seguido del *blaCTX-M* con 86% y finalmente el *blaSHV* con 48%. (95). Otro estudio en Corea del Sur evaluó la prevalencia de los tipos de BLEE/AmpC en las diferentes etapas de la producción porcina y reportó que el gen más frecuente encontrado en las diversas etapas de producción fue *blaCTX-M* (96). La propagación mediada por plásmidos epidémicos podría explicar la distribución coordinada de TEM y CTX-M en poblaciones porcinas. (97).

Un panorama similar fue el observado en los aislados de perros y agua de granjas de cerdos, en los cuales también se observó el predominio de la resistencia mediada por genes BLEE (*blaCTX-M*, *blaTEM* y las combinaciones de estos), lo que podría confirmar la circulación de genes BLEE en los animales de producción y domésticos (61).

Para el género *Klebsiella* spp., entre las resistencias observadas de los aislados de vacas y cerdos, se observó el predominio de los genes *blaCTX-M*, *blaTEM* y *blaSHV*, así como la resistencia a quinolonas, evidenciando así la circulación activa de genes involucrados en la producción de enzimas betalactamasas de espectro

extendido, hecho preocupante, dada la relevancia clínica del *blaCTX-M* en infecciones humanas.

Así mismo, la detección de genes BLEE y *qnrS*, encontrada en el presente estudio enfatiza la necesidad de establecer medidas integrales del control de uso de antimicrobiano, vigilancia genómica y manejo medioambiental en los sistemas de producción de pequeñas y mediana escala con un enfoque una salud.(98)

Es relevante mencionar que ninguno de los aislados del presente estudio fue positivo a genes que confieren resistencia a los carbapenémicos: *blaKPC*, *blaVIM*, *blaIMP*, *NDM* y *blaOXA-48*, ni para el gen *mcr-1* de resistencia a colistina, lo cual es un hallazgo positivo dentro de todo el panorama observado, ya que sugeriría el cumplimiento de la normativa establecida por parte de los ganaderos. (99)

Finalmente, los hallazgos del presente estudio evidencian la presencia de enterobacterias resistentes con potencial diseminador de genes de resistencia en granjas de vacas y cerdos, representando ello un riesgo para la salud pública. Esta amenaza puede manifestarse tanto en las personas que trabajan directamente en estos sistemas productivos como a través del consumo de productos derivados de estas explotaciones.

Si bien los resultados encontrados nos brindan un panorama de las granjas muestreadas, es necesario mencionar que el estudio tuvo diferentes limitantes entre estas estarían el hecho de haber sido un estudio no aleatorio ya que se tomó de referencia los resultados de las resistencias de las cepas humanas del proyecto principal, así mismo hubiera sido ideal que se dé un estudio por conglomerados pero ello implicaba mayor número de muestras por granja y estas solo contaban entre 10 a 15 animales de producción como máximo, así mismo implicaba más etapas de selección, así como mayor cantidad de personal y presupuesto adicional, debido a ello se priorizó un diseño más simple lo que permitió generar evidencia inicial del contexto local para futuras investigaciones.

Otro punto importante de mencionar es el muestreo en perros, el cual presento varias dificultades ya que algunas granjas no contaban con perros, eran agresivos o no se encontraban en la granja en ese momento.

En lo que respecta a las resistencias de las cepas, si bien a nivel fenotípico fueron varios los mecanismos de resistencia encontrados no todos pudieron ser corroborados genotípicamente, esto puede deberse porque la estandarización solo se enfocó en los genes de resistencia más reportados y relevantes según literatura como los *bla TEM*, *blaCTX-M*, *qnrS*, *mcr-1*, etc. En este caso también nuestras limitantes fueron los recursos, tiempo y personal debido a ello no se pudo abarcar otros mecanismos. A pesar de ello, priorizamos lo más importante desde el punto de vista clínico y epidemiológico, y creemos que el trabajo sirve como base para futuras investigaciones.

Como punto final nuestro estudio de investigación priorizo la detección de mecanismos de resistencia a betalactámicos, carbapenémicos, colistina y

quinolonas debido a su relevancia clínica y epidemiológica. Estas familias de antibióticos son ampliamente usadas tanto en medicina humana como veterinaria y representan una preocupación global por la diseminación de resistencia críticas como las betalactamasas de espectro extendido, carbapenemasas o los determinantes plasmídicos de resistencia a colistina. Por esta razón nos centramos en estos grupos, ya que tienen mayor impacto en la salud pública.

Sin embargo, es importante promover futuras investigaciones que incluyan otras familias de antibióticos, como aminoglucósidos, tetraciclinas, macrólidos, etc., que también tienen un papel importante en clínica y producción animal. Ello permitirá tener una visión más amplia del resistoma local y comprender mejor las dinámicas de diseminación de genes de resistencia en distintos nichos ecológicos.

VI. CONCLUSIONES

- Se comprobó que la especie *E. coli* tuvo una frecuencia del 91.9% del total de cepas aisladas, frente a 8.06% de cepas identificadas con el género *Klebsiella spp.*, siendo más el número de aislados de cerdos que de vacas lecheras.
- En gran frecuencia a nivel fenotípico en granjas porcinas y bovinas predominó el mecanismo de resistencia BLEE y las combinaciones con quinolonas, siendo los aislados de cerdos y vacas los de mayor cantidad a diferencia de sus perros y agua.
- Si bien a nivel fenotípico se encontraron resistencias a betalactámicos, quinolonas, colistina y carbapenémicos a nivel genotípico solo predominó la resistencia a betalactamasas de espectro extendido, ello podría deberse a que solo se enfocó la estandarización en los genes de mayor importancia en la salud pública.
- A nivel genotípico los genes BLEE más frecuentemente detectados fueron *blaCTX-M*, *blaTEM* y *blaSHV* en los aislados de las granjas de vacas y cerdos.
- De los aislados con identificación *Klebsiella spp.*, los genes de resistencia más frecuente fueron *blaCTX-M* y *blaSHV*.
- En ninguno de los aislados de las granjas de vacas ni cerdos se identificó genes asociados a resistencia a carbapenémicos como *blaKPC*, *blaVIM*, *blaNDM*, *blaIMP*, *blaOXA48*. Asimismo, no se detectó ninguna resistencia del gen *mcr-1*, relacionado con resistencia a colistina.

- Se evidenció que los genes circulantes de mayor frecuencia fueron los de resistencia a betalactamasas: *blaCTX-M*, *blaTEM* y *blaSHV*.

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar estandarización de los otros genes relacionados a las resistencias encontradas.
- Realizar secuenciamiento de los aislados que muestren 2 o más resistencias comprobadas genotípicamente.
- Realizar la identificación de mecanismo de resistencia de otras familias de antibióticos importantes para la salud pública.
- Diseñar encuestas detalladas a los encargados de granjas para poder determinar los principales factores de riesgo de la presencia de cepas resistentes.
- Promover el uso racional de antimicrobianos mediante charlas de concientización con los ganaderos de las zonas sobre buenas prácticas de manejo, así mismo de la correcta bioseguridad, higiene, manejo de residuos y calidad del agua en granjas de pequeña y mediana escala.
- Diseñar programas del uso adecuado de antimicrobianos, con la capacitación continua a profesionales de salud: médicos humanos, veterinarios, zootecnistas y las personas encargadas de granjas (ganaderos, trabajadores).
- Concientizar al pequeño productor del rol del médico veterinario en todo tipo de producciones.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Dirigentes y expertos mundiales piden que se actúe para proteger el medio ambiente de la contaminación por antimicrobianos [Internet]. [citado 24 de octubre de 2025]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/02-03-2022-world-leaders-and-experts-call-for-action-to-protect-the-environment-from-antimicrobial-pollution>
2. Resistencia Antimicrobiana en Producción Animal - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud [Internet]. [citado 1 de junio de 2025]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/panaftosa/resistencia-antimicrobiana-produccion-animal>
3. Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos [Internet]. [citado 24 de octubre de 2025]. Disponible en: <https://www.who.int/es/publications/i/item/9789241509763>
4. Directrices de la OMS sobre el uso de antimicrobianos de importancia médica en animales destinados a la producción de alimentos - Yahoo Search Tus resultados [Internet]. [citado 27 de octubre de 2025]. Disponible en: <https://pe.search.yahoo.com/search?fr=mcafee&type=E211PE885G0&p=Directrices+de+la+OMS+sobre+el+uso+de+antimicrobianos+de+importancia+m%C3%A9dica+en+animales+destinados+a+la+producci%C3%B3n+de+alimentos>
5. Gatica Eguiguren M de los A, Rojas H. Gestión sanitaria y resistencia a los antimicrobianos en animales de producción. Rev Peru Med Exp Salud Pública. marzo de 2018;35:118-25.
6. buenas prácticas en el uso de antimicrobianos en animales pequeños. plan nacional contra la resistencia a los antimicrobianos. - Yahoo Search Tus resultados [Internet]. [citado 27 de octubre de 2025]. Disponible en: <https://pe.search.yahoo.com/search?fr=mcafee&type=E211PE885G0&p=buena+pr%C3%A1cticas+en+el+uso+de+antimicrobianos+en+animales+peque%C3%B1os.+plan+nacional+contra+la+resistencia+a+los+antimicrobianos.>
7. Quesada A, Reginatto GA, Ruiz Español A, Colantonio LD, Burrone MS. Resistencia antimicrobiana de Salmonella spp aislada de alimentos de origen animal para consumo humano. Rev Peru Med Exp Salud Publica. enero de 2016;33(1):32-44.
8. Yu Z, Wang Y, Chen Y, Huang M, Wang Y, Shen Z, et al. Antimicrobial resistance of bacterial pathogens isolated from canine urinary tract infections. Vet Microbiol. febrero de 2020;241:108540.
9. Peña YP, Hernández ME, Castillo VL. Resistencia antimicrobiana en Salmonella y E. coli aisladas de alimentos: revisión de la literatura. Panor Cuba Salud. 2011;6(1):30-8.

10. Cubillas E, León D, Falcón N, Cubillas E, León D, Falcón N. Aspectos culturales en el manejo de enfermedades de bovinos en un distrito amazónico del Perú. *Rev Investig Vet Perú* [Internet]. marzo de 2021 [citado 24 de octubre de 2025];32(2). Disponible en:
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1609-91172021000200032&lng=es&nrm=iso&tlng=es
11. Cosgrove SE. The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: mortality, length of hospital stay, and health care costs. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 15 de enero de 2006;42 Suppl 2:S82-89.
12. Fernández Sánchez R. Estudio epidemiológico sobre resistencias antimicrobianas en el diagnóstico laboratorio de animales de compañía. 2018. 44 p.
13. (PDF) Resistencia bacteriana en pequeños animales, potencial riesgo para la salud humana-Bacterial resistance in small animals, risk potential for human health. ResearchGate [Internet]. 26 de octubre de 2025 [citado 27 de octubre de 2025]; Disponible en:
[https://www.researchgate.net/publication/326328683_Resistencia_bacteriana_e_n_pequenos_animales_potencial_riesgo_para_la_salud_humana-Bacterial_resistance_in_small_animals_risk_potential_for_human_health](https://www.researchgate.net/publication/326328683_Resistencia_bacteriana_en_pequenos_animales_potencial_riesgo_para_la_salud_humana-Bacterial_resistance_in_small_animals_risk_potential_for_human_health)
14. Gestal MC, Villacís JE, Alulema MJ, Chico P. De la granja a la mesa. Implicaciones del uso de antibióticos en la crianza de animales para la resistencia microbiana y la salud. *Rev Cuba Aliment Nutr*. 1 de junio de 2014;24(1):11-11.
15. Moreno M C, González E R, Beltrán C. Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. *Rev Otorrinolaringol Cir Cabeza Cuello*. agosto de 2009;69(2):185-92.
16. Treviño NP, Molina NB. Antibióticos: mecanismos de acción y resistencia bacteriana. 2022 [citado 24 de octubre de 2025]; Disponible en:
<http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/136280>
17. Centrón DD. Genética Bacteriana y Mecanismos de la Transferencia Horizontal Genética.
18. Daza Pérez RM. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Inf Ter Sist Nac Salud*. 1998;22(3):57-67.
19. Pehrsson EC, Tsukayama P, Patel S, Mejía-Bautista M, Sosa-Soto G, Navarrete KM, et al. Interconnected microbiomes and resistomes in low-income human habitats. *Nature*. mayo de 2016;533(7602):212-6.

20. Martínez Ovejero C. Mecanismos emergentes de resistencia a antibióticos en enterobacterias de origen humano, animal y ambiental [Internet] [<http://purl.org/dc/dcmitype/Text>]. Universidad Complutense de Madrid; 2017 [citado 24 de octubre de 2025]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=128848>
21. Rodríguez Pérez R, Muñoz Ganoza E. Frecuencia y susceptibilidad antimicrobiana de bacterias causantes de mastitis en bovinos de un establo de Trujillo, Perú. *Rev Investig Vet Perú*. octubre de 2017;28(4):994-1001.
22. Beier RC, Franz E, Bono JL, Mandrell RE, Fratamico PM, Callaway TR, et al. Disinfectant and Antimicrobial Susceptibility Profiles of the Big Six Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains from Food Animals and Humans. *J Food Prot*. agosto de 2016;79(8):1355-70.
23. Sandrea-Toledo L, Paz-Montes A, Piña-Reyes E, Perozo-Mena A. Enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido aisladas de hemocultivos en un Hospital Universitario de Venezuela. *Kasmera*. junio de 2007;35(1):15-25.
24. Pascu C, Herman V, Iancu I, Costinar L. Etiology of Mastitis and Antimicrobial Resistance in Dairy Cattle Farms in the Western Part of Romania. *Antibiot Basel Switz*. 3 de enero de 2022;11(1):57.
25. Martín BS, Bravo V, Borie C. Evaluación de la resistencia antimicrobiana en ganado bovino en Chile, utilizando *E. coli* como bacteria indicadora. *Arch Med Vet*. 2005;37(2):117-23.
26. Toledo E. Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* obtenidas de muestras de heces de cerdos destinados a Consumo Humano. 2016;
27. Ruiz-Roldán L, Martínez-Puchol S, Gomes C, Palma N, Riveros M, Ocampo K, et al. Presencia de Enterobacteriaceae y *Escherichia coli* multirresistente a antimicrobianos en carne adquirida en mercados tradicionales en Lima. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. julio de 2018;35(3):425-32.
28. Donado-Godoy P, Byrne BA, León M, Castellanos R, Vanegas C, Coral A, et al. Prevalence, resistance patterns, and risk factors for antimicrobial resistance in bacteria from retail chicken meat in Colombia. *J Food Prot*. abril de 2015;78(4):751-9.
29. Osińska A, Korzeniewska E, Harnisz M, Felis E, Bajkacz S, Jachimowicz P, et al. Small-scale wastewater treatment plants as a source of the dissemination of antibiotic resistance genes in the aquatic environment. *J Hazard Mater*. 5 de enero de 2020;381:121221.
30. Vista de Resistencia antibiótica: el rol del hombre, los animales y el medio ambiente sobre la salud humana. [Internet]. [citado 27 de octubre de 2025].

Disponible en:

<https://rcientificas.uninorte.edu.co/index.php/salud/article/view/12022/214421445140>

31. Biyela PT, Lin J, Bezuidenhout CC. The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes. *Water Sci Technol J Int Assoc Water Pollut Res.* 2004;50(1):45-50.
32. Ojer-Usoz E, González D, García-Jalón I, Vitas AI. High dissemination of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in effluents from wastewater treatment plants. *Water Res.* 1 de junio de 2014;56:37-47.
33. FAORegionalOffice-LatinAmerica-RLC [Internet]. [citado 24 de octubre de 2025]. Ganadería sostenible en América Latina y el Caribe. Disponible en: <https://www.fao.org/americas/regional-initiatives/top-pages/sustainable-livestock-farming-in-latin-america-and-the-caribbean/ganader%C3%ADa-sostenible-en-am%C3%A9rica-latina-y-el-caribe/es>
34. Murray M, Salvatierra G, Dávila-Barclay A, Ayzanoa B, Castillo-Vilcahuaman C, Huang M, et al. Market Chickens as a Source of Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* in a Peri-Urban Community in Lima, Peru. *Front Microbiol.* 2021;12:635871.
35. Benavides JA, Streicker DG, Gonzales MS, Rojas-Paniagua E, Shiva C. Knowledge and use of antibiotics among low-income small-scale farmers of Peru. *Prev Vet Med.* abril de 2021;189:105287.
36. Dávalos-Almeyda M, Guerrero A, Medina G, Dávila-Barclay A, Salvatierra G, Calderón M, et al. Antibiotic Use and Resistance Knowledge Assessment of Personnel on Chicken Farms with High Levels of Antimicrobial Resistance: A Cross-Sectional Survey in Ica, Peru. *Antibiot Basel Switz.* 1 de febrero de 2022;11(2):190.
37. Rousham EK, Unicomb L, Islam MA. Human, animal and environmental contributors to antibiotic resistance in low-resource settings: integrating behavioural, epidemiological and One Health approaches. *Proc Biol Sci.* 11 de abril de 2018;285(1876):20180332.
38. Gavín Magallón D, Ortega Rodríguez C. Uso de antibióticos en producción animal: Implicaciones en la aparición de resistencias y aproximación a los riesgos para la salud pública. Zaragoza: Universidad de Zaragoza; 2013.
39. Camacho Silvas LA. Resistencia bacteriana, una crisis actual. *Rev Esp Salud Pública.* 97:e202302013.
40. Bevan ER, Jones AM, Hawkey PM. Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *J Antimicrob Chemother.* 1 de agosto de 2017;72(8):2145-55.

41. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol.* 2014;5:643.
42. Aslam B, Rasool M, Muzammil S, Siddique AB, Nawaz Z, Shafique M, et al. Carbapenem Resistance: Mechanisms and Drivers of Global Menace. En: *Pathogenic Bacteria* [Internet]. IntechOpen; 2020 [citado 23 de junio de 2025]. Disponible en: <https://www.intechopen.com/chapters/70581>
43. Quiñones Pérez D. Resistencia antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque «Una salud». *Rev Cubana Med Trop.* diciembre de 2017;69(3):1-17.
44. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr.* 8 de abril de 2016;4(2):10.1128/microbiolspec.vmbf-0016-2015.
45. González-Carballo GC, García-Marín C. Mecanismos de resistencia a la colistina, la nitrofurantoina y la fosfomicina en Enterobacterias. *Acta Médica Costarric.* 1 de agosto de 2023;65(2):1-10.
46. WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance [Internet]. [citado 24 de octubre de 2025]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>
47. Marston HD, Dixon DM, Knisely JM, Palmore TN, Fauci AS. Antimicrobial Resistance. *JAMA.* 20 de septiembre de 2016;316(11):1193-204.
48. Millanao B A, Barrientos H M, Gómez C C, Tomova A, Buschmann A, Dölz H, et al. Uso inadecuado y excesivo de antibióticos: Salud pública y salmonicultura en Chile. *Rev Médica Chile.* enero de 2011;139(1):107-18.
49. Ramon Pardo P, Sati H, Galas M. Enfoque de Una Salud en las acciones para enfrentar la resistencia a los antimicrobianos desde una óptica latinoamericana. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 5 de abril de 2018;35(1):103.
50. Cedeño CB. ETIOLOGÍA DE LA MASTITIS BOVINA.
51. Calvopiña Montenegro PC, De Janon González DS, Medina Santana JL, Vargas-Estrella J, Ron-Garrido L, Proaño-Pérez F, et al. Presencia y resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* BLEE en muestras fecales de bovinos productores de leche al norte de Ecuador. *Siembra.* 1 de julio de 2024;11(2):e6542.
52. CONtexto Ganadero [Internet]. [citado 27 de octubre de 2025]. Mastitis bovina por microorganismos emergentes y multirresistentes a antibióticos. Disponible en: <https://www.contextoganadero.com/ganaderia-sostenible/mastitis-bovina-por-microorganismos-emergentes-y-multirresistentes-antibioticos>

53. Ramírez Sánchez M. Prevalencia y factores predisponentes a mastitis subclínica en establos lecheros de la provincia de Trujillo. CEDAMAZ. 2015;5(1):3.
54. Sánchez Herencia D, Mamani-Mango GD, Sánchez Herencia D, Mamani-Mango GD. Mastitis subclínica bovina y factores de riesgo ambientales en pequeños productores de ganado lechero criado en alta montaña. Rev Investig Vet Perú [Internet]. enero de 2022 [citado 24 de octubre de 2025];33(1). Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1609-91172022000100021&lng=es&nrm=iso&tlng=es
55. Ñique L, Alexandre P. Resistencia antibiótica de bacterias causantes de mastitis subclínica bovina en el distrito de Huanchaco de la provincia de Trujillo, 2023. 2025 [citado 24 de octubre de 2025]; Disponible en: <https://repositorio.upao.edu.pe/item/1e6093ab-ba36-4848-8258-d37a17927986>
56. Chávez Rosero K, Condolo Ortiz L, Vinuesa Veloz P, Tiama Paucar N, Chávez Rosero K, Condolo Ortiz L, et al. Patrones de resistencia a los antibióticos en bacterias aisladas de mastitis subclínicas. Rev Investig Vet Perú [Internet]. enero de 2025 [citado 24 de octubre de 2025];36(1). Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1609-91172025000100020&lng=es&nrm=iso&tlng=es
57. Monterroso M, Salvatierra R G, Sedano S A, Calle E S. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia antimicrobiana de Escherichia coli aisladas de infecciones entéricas de porcinos provenientes de granjas de producción tecnificada. Rev Investig Vet Perú. enero de 2019;30(1):455-64.
58. Fairbrother JM, Nadeau E, Gyles CL. Escherichia coli in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. Anim Health Res Rev. junio de 2005;6(1):17-39.
59. Sacsquispe-Contreras R, Bailón-Calderón H. Identificación de genes de resistencia a carbapenémicos en enterobacterias de hospitales de Perú, 2013-2017. Rev Peru Med Exp Salud Publica. abril de 2018;35(2):259-64.
60. Ríos C A, Morales-Cauti S, Vilca L M, Carhuallanqui P A, Ramos D D. Determinación del perfil de resistencia antibiótica de Salmonella enterica aislada de cerdos faenados en un matadero de Lima, Perú. Rev Investig Vet Perú. enero de 2019;30(1):438-45.
61. Benavides JA, Salgado-Caxito M, Opazo-Capurro A, González Muñoz P, Piñeiro A, Otto Medina M, et al. ESBL-Producing Escherichia coli Carrying CTX-M Genes Circulating among Livestock, Dogs, and Wild Mammals in Small-Scale Farms of Central Chile. Antibiotics. 30 de abril de 2021;10(5):510.
62. Dagatti A. Prevalencia de portación rectal de escherichia coli productora de beta-lactamasas de espectro extendido en bovinos de tambos de Córdoba. 1

de diciembre de 2023 [citado 7 de junio de 2025]; Disponible en:
<http://hdl.handle.net/11086/550171>

63. (PDF) Detección de enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas en carne molida de supermercados de un distrito de Lima, Perú. ResearchGate [Internet]. 6 de agosto de 2025 [citado 27 de octubre de 2025]; Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/335408110_Deteccion_de_enterobacterias_productoras_de_beta-lactamasas_de_espectro_extendido_BLEE_aisladas_en_carne_molida_de_supermercados_de_un_distrito_de_Lima_Peru
64. Santos Valdivia AM. Detección de genes de resistencia antimicrobiana de Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en *Escherichia coli* aisladas de cerdos sin diarrea en Lima, Perú. 2024.
65. Núñez-Samudio V, Pimentel-Peralta G, De La Cruz A, Landires I. Genetic Diversity and New Sequence Types of *Escherichia coli* Coharboring β -Lactamases and PMQR Genes Isolated from Domestic Dogs in Central Panama. *Genes*. 26 de diciembre de 2022;14(1):73.
66. Cheesbrough M. District Laboratory Practice in Tropical Countries [Internet]. 2.^a ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2006 [citado 24 de octubre de 2025]. Disponible en:
<https://www.cambridge.org/core/books/district-laboratory-practice-in-tropical-countries/6F6FE267756B004A4826209C692BD5B3>
67. M100 | Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing [Internet]. [citado 24 de octubre de 2025]. Disponible en:
<https://clsi.org/shop/standards/m100/>
68. eucast: Resistance mechanisms [Internet]. [citado 27 de octubre de 2025]. Disponible en: https://www.eucast.org/resistance_mechanisms
69. Lezameta L, Gonzáles-Escalante E, Tamariz JH. Comparación de cuatro métodos fenotípicos para la detección de beta-lactamasas de espectro extendido. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. julio de 2010;27(3):345-51.
70. Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*. marzo de 2010;65(3):490-5.
71. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. mayo de 2011;70(1):119-23.
72. Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, Soussy CJ, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-

- producing enterobacterial isolates. *J Antimicrob Chemother.* agosto de 2007;60(2):394-7.
73. Rebelo AR, Bortolaia V, Kjeldgaard JS, Pedersen SK, Leekitcharoenphon P, Hansen IM, et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* febrero de 2018;23(6):17-00672.
 74. Dimitrakopoulou ME, Stavrou V, Kotsalou C, Vantarakis A. Boiling Extraction Method VS Commercial Kits for Bacterial DNA Isolation from Food Samples. *J Food Sci Nutr Res.* 21 de diciembre de 2020;3(4):311-9.
 75. Protocolo de PCR múltiple para la detección de los genes *blaKPC*, *blaOXA-48-like*, *blaVIM*, *blaIMP* y *blaNDM* en bacilos gram negativos - Yahoo Search Tus resultados [Internet]. [citado 29 de octubre de 2025]. Disponible en:
<https://pe.search.yahoo.com/search?fr=mcafee&type=E211PE885G0&p=Protocolo+de+PCR+m%C3%BAltiple+para+la+detecci%C3%B3n+de+los+genes+blaKPC%2C+blaOXA-48-like+%2C+blaVIM%2C+blaIMP+y+blaNDM+en+bacilos+gran+negativos>
 76. Protocolo de PCR para la detección del gen *mcr-1* en aislamientos de bacilos gram-negativos - Yahoo Search Tus resultados [Internet]. [citado 29 de octubre de 2025]. Disponible en:
<https://pe.search.yahoo.com/search?fr=mcafee&type=E211PE885G0&p=.+Protocolo+de+PCR+para+la+detecci%C3%B3n+del+gen+mcr-1+en+aislamientos+de+bacilos+gram-negativos>
 77. Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, Soussy CJ, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J Antimicrob Chemother.* 1 de agosto de 2007;60(2):394-7.
 78. Jouini A, Vinué L, Slama KB, Sáenz Y, Klibi N, Hammami S, et al. Characterization of CTX-M and SHV extended-spectrum beta-lactamases and associated resistance genes in *Escherichia coli* strains of food samples in Tunisia. *J Antimicrob Chemother.* noviembre de 2007;60(5):1137-41.
 79. Granda A, Riveros M, Martínez-Puchol S, Ocampo K, Laureano-Adame L, Corujo A, et al. Presence of Extended-Spectrum β -lactamase, CTX-M-65 in *Salmonella enterica* serovar Infantis Isolated from Children with Diarrhea in Lima, Peru. *J Pediatr Infect Dis.* 2019;14(4):194-200.
 80. Monitoring global progress on addressing antimicrobial resistance [Internet]. [citado 29 de octubre de 2025]. Disponible en:
<https://www.who.int/publications/i/item/monitoring-global-progress-on-addressing-antimicrobial-resistance>

81. Global action plan on antimicrobial resistance [Internet]. [citado 29 de octubre de 2025]. Disponible en:
<https://www.who.int/publications/i/item/9789241509763>
82. Dagatti A. Prevalencia de portación rectal de *Escherichia coli* productora de beta-lactamasas de espectro extendido en bovinos de tambos de Córdoba. 1 de diciembre de 2023 [citado 29 de octubre de 2025]; Disponible en:
<http://hdl.handle.net/11086/550171>
83. Wall BA, Mateus A, Marshall L, Pfeiffer D, Lubroth J, Ormel HJ, et al. Drivers, dynamics and epidemiology of antimicrobial resistance in animal production. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2016.
84. Kamaruzzaman EA, Abdul Aziz S, Bitrus AA, Zakaria Z, Hassan L. Occurrence and Characteristics of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* from Dairy Cattle, Milk, and Farm Environments in Peninsular Malaysia. *Pathogens*. diciembre de 2020;9(12):1007.
85. Ellington MJ, Ekelund O, Aarestrup FM, Canton R, Doumith M, Giske C, et al. The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee. *Clin Microbiol Infect*. enero de 2017;23(1):2-22.
86. van Belkum A, Dunne WM. Next-generation antimicrobial susceptibility testing. *J Clin Microbiol*. julio de 2013;51(7):2018-24.
87. Kerluku M, Jankuloski D, Manovska MR, Prodanov M, Dimzoska BS, Dodovski A, et al. β -Lactamase Genes (*bla*CTX-M, *bla*SHV, *bla*TEM, *bla*OXA1 and *bla*OXA2) and Phylogenetic Groups in ESBL Producing Commensal *Escherichia coli* Isolated from Faecal Samples from Dairy Farm in the Municipality of Debar. *Maced Vet Rev*. 7 de marzo de 2023;46(1):89-97.
88. Ramatla T, Mafokwane T, Lekota K, Monyama M, Khasapane G, Serage N, et al. “One Health” perspective on prevalence of co-existing extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: a comprehensive systematic review and meta-analysis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. diciembre de 2023;22(1):1-17.
89. Carvalho AC, Barbosa AV, Arais LR, Ribeiro PF, Carneiro VC, Cerqueira AMF. Resistance patterns, ESBL genes, and genetic relatedness of *Escherichia coli* from dogs and owners. *Braz J Microbiol Publ Braz Soc Microbiol*. 2016;47(1):150-8.
90. Aini Eka Puji Dameanti FN, Yanestria SM, Effendi MH, Plumeriastuti H, Tyasningsih W, Ugbo EN, et al. Genotyping of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from wastewater of dairy farms in East Java, Indonesia. *Vet World*. enero de 2025;18(1):162-71.

91. Aini Eka Puji Dameanti FN, Yanestria SM, Effendi MH, Plumeriastuti H, Tyasningsih W, Ugbo EN, et al. Genotyping of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from wastewater of dairy farms in East Java, Indonesia. *Vet World*. enero de 2025;18(1):162-71.
92. Valdivia S, Melissa A. Detección de genes de resistencia antimicrobiana de Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en *Escherichia coli* aisladas de cerdos sin diarrea en Lima, Perú [Internet]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2024 [citado 7 de junio de 2025]. Disponible en: <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/item/8e8d31f1-9895-45b8-9ef4-c41f37e432e6>
93. Xu G, An W, Wang H, Zhang X. Prevalence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase genes in *Escherichia coli* isolated from piglets with post-weaning diarrhea in Heilongjiang province, China. *Front Microbiol*. 8 de octubre de 2015;6:1103.
94. Marrero-Moreno CM, Mora-Llanes M, Hernández-Fillor RE, Báez-Arias M, García-Morey T, Espinosa-Castaño I. Identificación de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEEs) en instalaciones porcinas de la provincia Matanzas. *Rev Salud Anim*. diciembre de 2017;39(3):00-00.
95. Gāliņa D, Balins A, Valdovska A. The Prevalence and Characterization of Fecal Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolated from Pigs on Farms of Different Sizes in Latvia. *Antibiotics*. 11 de septiembre de 2021;10(9):1099.
96. Lee S, An JU, Guk JH, Song H, Yi S, Kim WH, et al. Prevalence, Characteristics and Clonal Distribution of Extended-Spectrum β -Lactamase- and AmpC β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Following the Swine Production Stages, and Potential Risks to Humans. *Front Microbiol*. 2021;12:710747.
97. Rodrigues C, Machado E, Peixe L, Novais A. IncI1/ST3 and IncN/ST1 plasmids drive the spread of blaTEM-52 and blaCTX-M-1/-32 in diverse *Escherichia coli* clones from different piggeries. *J Antimicrob Chemother*. octubre de 2013;68(10):2245-8.
98. Ortega-Paredes D, de Janon S, Villavicencio F, Ruales KJ, De La Torre K, Villacís JE, et al. Broiler Farms and Carcasses Are an Important Reservoir of Multi-Drug Resistant *Escherichia coli* in Ecuador. *Front Vet Sci* [Internet]. 25 de noviembre de 2020 [citado 7 de junio de 2025];7. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/veterinary-science/articles/10.3389/fvets.2020.547843/full>
99. Critically Important Antimicrobials for Human Medicine [Internet]. [citado 29 de octubre de 2025]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241595742>

100. Instituto Nacional de enfermedades infecciosas. Protocolo de PCR múltiple para la detección de los genes blaKPC, blaOXA-48-like , blaVIM, blaIMP y blaNDM en bacilos gran negativos. Ministerio de Salud de Argentina. - Yahoo Search Tus resultados [Internet]. [citado 24 de octubre de 2025]. Disponible en:
<https://pe.search.yahoo.com/search?fr=mcafee&type=E211PE885G0&p=Instituto+Nacional+de+enfermedades+infecciosas.+Protocolo+de+PCR+m%C3%BAltiple+para+la+detecci%C3%B3n+de+los+genes+blaKPC%2C+blaOXA-48-like+%2C+blaVIM%2C+blaIMP+y+blaNDM+en+bacilos+gran+negativos.+Ministerio+de+Salud+de+Argentina>.

IX. ANEXO

Anexo 1: Concentración de los antibióticos usados por separado en el agar MacConkey.

Resistencia	Antibiótico por litro de Agar Mac Conkey	Referencia
Betalactámicos (β- lactámicos)	Cefotaxima 4 mg/L	Benavides et al. 2021; CLSI 2018
Carbapenémicos	Imipenem 4ug/ml	Benavides et al. 2021; CLSI 2018
Quinolona	Ciprofloxacina 0.05mg/L	Benavides et al. 2021
Colistina	Colistina 2mg/L	Chandler et al. 2020

Anexo 2: Relación de muestras totales obtenidas del muestreo en Huaura y Lima

	n animal producción	Perros	Agua
Vacas	153	18	15
Cerdos	261	30	25
Total	414	48	40

Anexo 3 : Protocolos de los Master Mix empleados para los antibióticos de interés.

1) Genes carbapenémicos *VIM*, *IMP*, *KPC*, *NDM*, *OXA-48*

CARBAPENÉMICOS			
INSUMOS PARA EL MASTER MIX	MASTER MIX PARA VIM, IMP, NDM, KPC, OXA-48		
	Nº de reacciones x		
	[] inicial	[] final	1
Agua grado molecular			4.5
8Buffer	10 x	1	1
MgCl ₂	50 mM	2	0.4
dNTP mix	10 mM	0.2	0.2
Primer VIM- F	10 uM	0.2	0.2
Primer VIM-R	10 uM	0.2	0.2
Primer IMP-F	10 uM	0.4	0.4
Primer IMP-R	10 uM	0.4	0.4
Primer KPC-F	10 uM	0.4	0.4
Primer KPC-R	10 uM	0.4	0.4
Primer NDM-F	10 uM	0.2	0.2
Primer NDM-R	10 uM	0.2	0.2
Primer OXA48-F	10 uM	0.2	0.2
Primer OXA48-R	10 uM	0.2	0.2
Taq polimerasa	5 U/uL	0.4	0.1
SUBTOTAL			9
ADN templado (cepa a estudiar) máx 10% del mix			1
TOTAL			10

2) Gen *mcr-1*

COLISTINA			
INSUMOS PARA EL MASTER MIX		MASTER MIX PARA MCR-1	
		Nº de reacciones x	
		volumen inicial	
	[]inicial	[]final	1
Agua grado molecular			7
Buffer	10 x	1	1
MgCl2	50 mM	1.5	0.3
dNTP mix	10 mM	0.2	0.2
Primer mcr-1- F	10 uM	0.2	0.2
Primer mcr-1-R	10 uM	0.2	0.2
Taq polimerasa	50 U/ul	0.5	0.1
Volumen mix			9
ADN templado (cepa a estudiar) máx 10% del mix			1
Volumen final			10

3) Gen *qnrS*

CIPROFLOXACINA			
INSUMOS PARA EL MASTER MIX		MASTER MIX PARA qnrs, qnra, qnrB	
		Nº de reacciones x	
		1	
	[]inicial	[]final	
Agua grado molecular			6.2
Buffer	10	1	1
MgCl2	50	1.5	0.3
dNTP mix	10	0.2	0.2
Primer qnrA- F	10	0.2	0.2
Primer qnrA-R	10	0.2	0.2
Primer qnrB-F	10	0.2	0.2
Primer qnrB-R	10	0.2	0.2
Primer qnrS-F	10	0.2	0.2
Primer qnrS-R	10	0.2	0.2
Taq polimerasa	5		0.1
SUBTOTAL			9
ADN templado (cepa a estudiar) máx 10% del mix			1
TOTAL			10

4) Gen BLEE (*CTX-M*)

BLEE-CTX-M			
INSUMOS PARA EL MASTER MIX			MASTER MIX PARA CTX-M
			Nº de reacciones x
	[]inicial	[]final	1
Agua grado molecular			7
Buffer	10 x	1	1
MgCl ₂	50 mM	1.5	0.3
dNTP mix	10 mM	0.2	0.2
Primer CTX-M- F	10 uM	0.2	0.2
Primer CTX-M- R	10 uM	0.2	0.2
Taq polimerasa	5 U/ul	0.4	0.1
Volumen mix			9
ADN templado (cepa a estudiar) máx 10% del mix			1
Volumen final			10

5) Gen BLEE (*SHV*)

BLEE-SHV			
INSUMOS PARA EL MASTER MIX			MASTER MIX PARA SHV
			Nº de reacciones x
	[]inicial	[]final	1
Agua grado molecular			7
Buffer	10 x	1	1
MgCl ₂	50 mM	1.5	0.3
dNTP mix	10 mM	0.2	0.2
Primer SHV- F	10 uM	0.2	0.2
Primer SHV- R	10 uM	0.2	0.2
Taq polimerasa	5 U/uL		0.1
Volumen mix			9
ADN templado (cepa a estudiar) máx 10% del mix			1
Volumen final			10

6) Gen BLEE (*TEM*)

TEM			MASTER MIX PARA TEM
INSUMOS PARA EL MASTER MIX			Nº de reacciones x
	[]inicial	[]final	1
Agua grado molecular			7
Buffer	10 x	1	1
MgCl ₂	50 mM	1.5	0.3
dNTP mix	10 mM	0.2	0.2
Primer TEM- F	10 uM	0.2	0.2
Primer TEM- R	10 uM	0.2	0.2
Taq polimerasa	5 U/uL	0.4	0.1
Volumen mix			9
ADN templado (cepa a estudiar) máx 10% del mix			1
Volumen final			10

Anexo 4: Relación de primers usados en las pruebas de PCR.

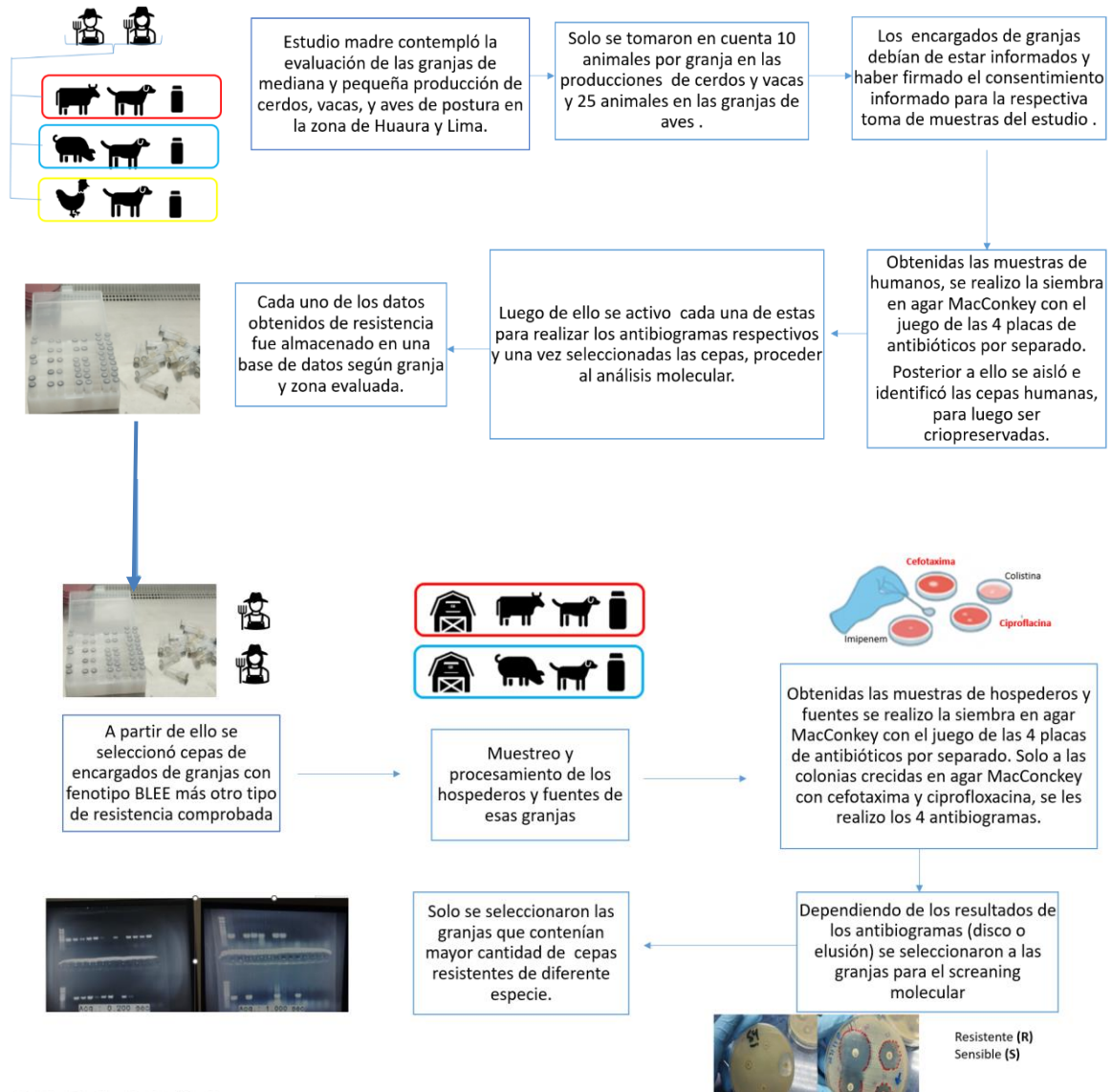
Enteropatógeno	Secuencias (5' – 3')	Resistencia	Referencia Bibliográfica
<i>E. coli</i>	F: GGY GTT TWT GTT CAT ACW TCK TTY GA R: GGY ARC CAA ACC ACT ASG TTA TCT	Carbapenemasas	(100)
<i>K. pneumoniae</i>	F: ATG CGT GTA TTA GCC TTA TCG G R: TGA GCA CTT CTT TTG TGA TG	Carbapenemasas	
<i>E. cloacae</i>	F: CGA TGT GCA GTA CCA GTA A R: TTA GTG ACC AGA ATC AGC GG	β - lactamasas	(78,79)
<i>E. coli</i>	F: AGC ACA CTT CCT ATC TCG AC R: GGC GTA GTG CTC AGT GTC	Carbapenemasas	
<i>K. pneumoniae</i>	F: AGT GGT GAG TAT CCG ACA G R: ATG AAA GTG CGT GGA GAC	Carbapenemasas	
	F: GCA AGT TCA TTG AAC AGG GT R: TCT AAA CCG TCG AGT TCG GCG	Quinolonas	(77)
<i>E.coli</i>	control de suceptibilidad	Ninguna	

	F: ACA CAA TAC ATA TCA ACT TCG C R: AGT GTG TTT AGA ATG GTG ATC	Carbapenemasas	
<i>K. pneumoniae</i> <i>subsp.</i> <i>pneumoniae</i>	F: CAC TCA AGG ATG TAT TGT G R: TTA GCG TTG CCA GTG CTC G	β - lactamasas	
	F: CGGACATCCATGTGATATGG R: TTGCCTATGTACAGCTAATCC	Carbapenemasas	
	F: CAC TCA AGG ATG TAT TGT G R: TTA GCG TTG CCA GTG CTC G	β - lactamasas	
<i>K. pneumoniae</i>	F: ATT CTT GAA GAC GAA AGG GC R: ACG CTC AGT GGA ACG AAA AC	β - lactamasas	
<i>E.coli</i>	F: CGG TCA GTC CGT TTG TTC R: CTT GGT CGG TCT GTA GGG	Colistina	(76)

Anexo 5. Relación de controles usados para las pruebas fenotípicas y moleculares.

Código	Gen	Resistencia	Marca	País
NCTC 13476	IMP	Carbapenémicos	Microbiologics ®	EE. UU
NCTC 13442	<i>OXA-48</i>	Carbapenémicos	Microbiologics ®	EE. UU
ATCC 13464	<i>CTX-M-15</i> ESBL	β- lactamasas	Microbiologics ®	EE. UU
ATCC BAA- 2452	<i>NDM-1</i>	Carbapenémicos	Microbiologics ®	EE. UU
NCTC 13439	<i>VIM</i>	Carbapenémicos	Microbiologics ®	EE. UU
	<i>qnrS</i>	Fluorquinolonas	Microbiologics ®	EE. UU
ATCC 25922	Susceptibilidad	Ninguna	Microbiologics ®	EE. UU
ATCC 700603	<i>OXA-2</i>	Carbapenémicos	Microbiologics ®	EE. UU
	<i>KPC-2</i>	Carbapenémicos	Microbiologics ®	EE. UU
ATCC BAA- 1705	<i>SHV</i>	β- lactamasas	Microbiologics ®	EE. UU
	<i>TEM</i>	β- lactamasas	Microbiologics ®	EE. UU
CDC AR- 0346	<i>mcr-1</i>	Colistina	Microbiologics ®	EE. UU

Anexo 6. Descripción del flujograma del estudio principal y el presente estudio



Anexo 7: Tipos de ordeño en las granjas de vacas muestreadas en Huaura.

Manual



Pezioneras



Sala de ordeño



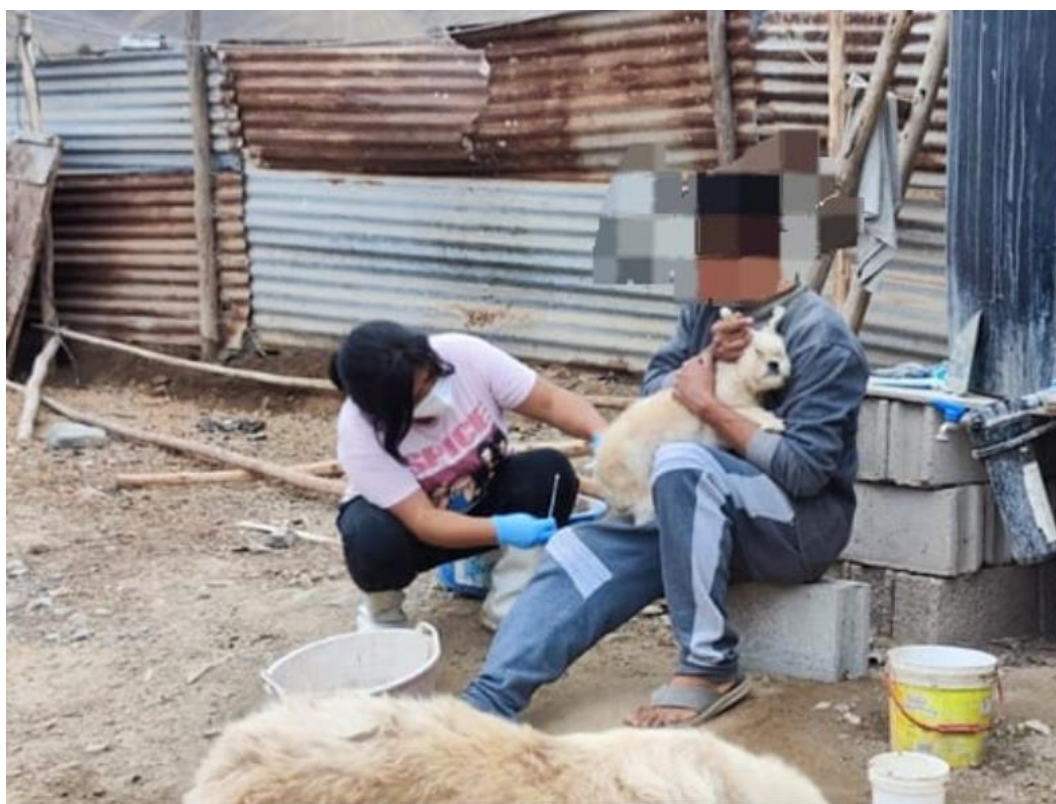
Anexo 8: Toma de muestra de heces de Vacas en granjas de Huaaura.



Anexo 9: Toma de muestra de heces de cerdos en granjas de Lima (San Bartolo).

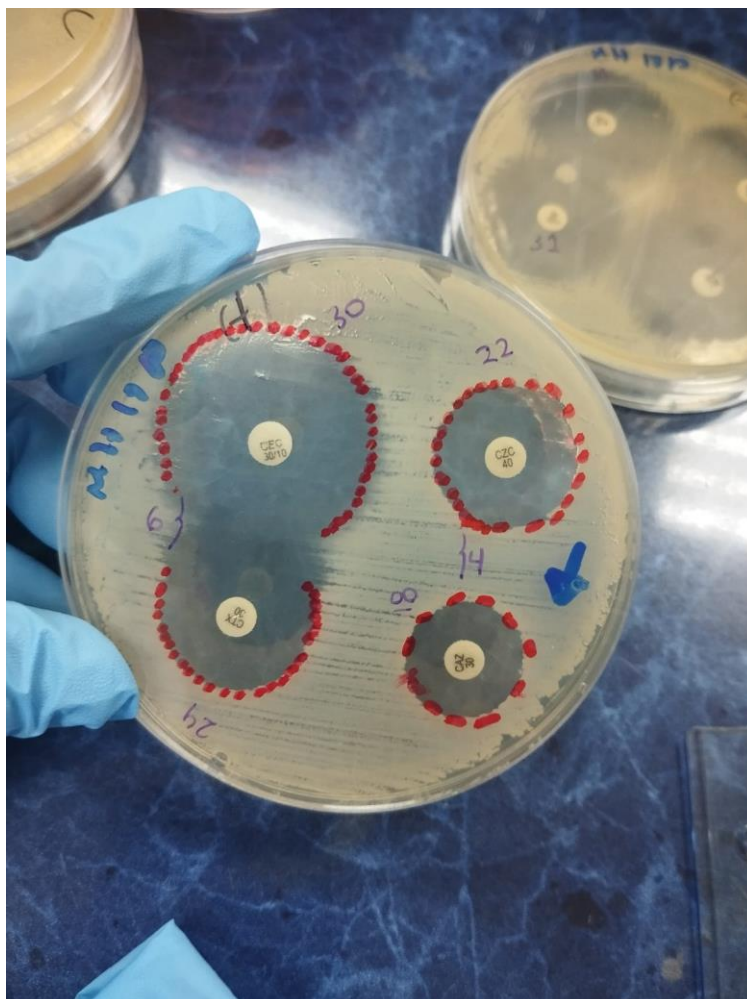


Anexo 10: Toma de muestra de heces de perros en granjas de Lima (San Bartolo).

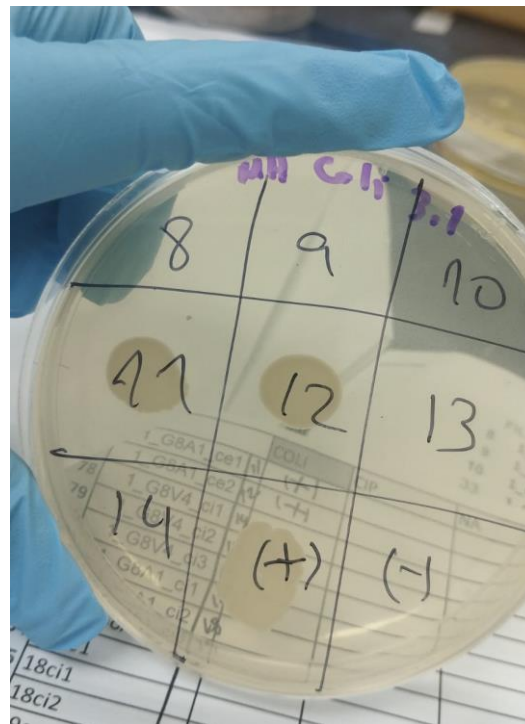


Anexo 11: Detección de las resistencias fenotípicas.

BLEE



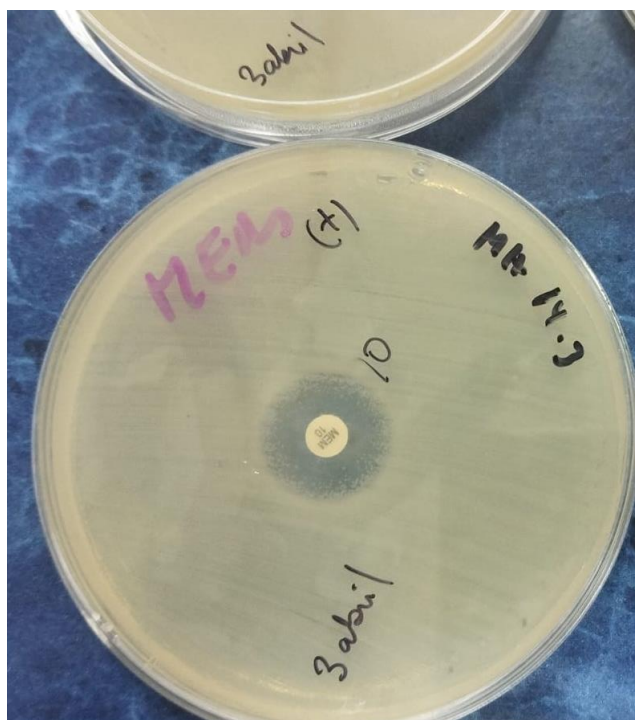
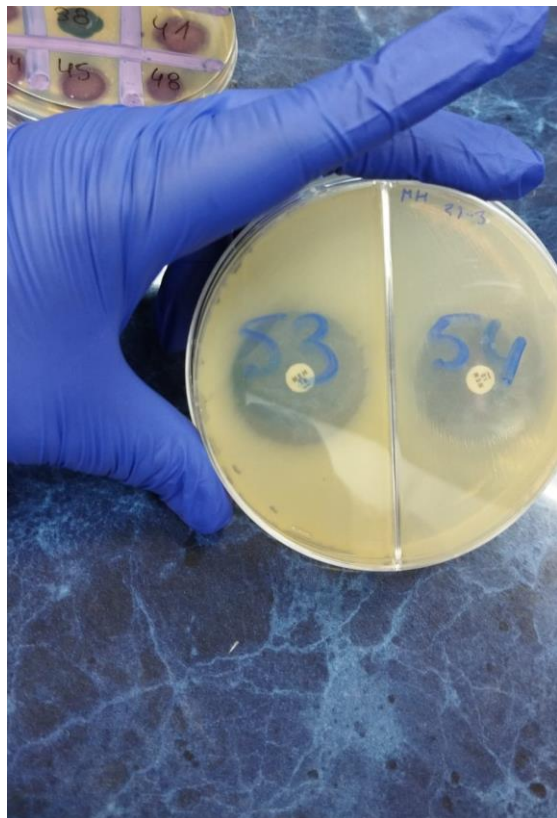
Colistina



Quinolonas



Carbapenémicos



Anexo 12: Detección de genes mediante PCR

BLEE: gen *blaCTX-M*. (556pb)



Quinolonas : gen *qnr-S* (428 pb)

