Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado
Facultad de Medicina Veterinaria
Unidad de Posgrado

Detección de *Escherichia coli* productora de Betalactamasas de Espectro Extendido en Primates No Humanos mantenidos en semicautiverio en las Islas Iquitos, Muyuy y Padre Isla, de la Cuenca Amazónica Peruana

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias con mención en Salud Animal

AUTOR

Jhonathan Arturo BAZALAR GONZALES

ASESOR

Dr. Abelardo Lenin MATURRANO HERNÁNDEZ

Lima, Perú

2024



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Bazalar J. Detección de Escherichia coli productora de Betalactamasas de Espectro Extendido en Primates No Humanos mantenidos en semicautiverio en las Islas Iquitos, Muyuy y Padre Isla, de la Cuenca Amazónica Peruana [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Unidad de Posgrado; 2024.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Jhonathan Arturo Bazalar Gonzales
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	45165351
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-3725-1634
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Abelardo Lenin Maturrano Hernández
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	15725076
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-8819-7335
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Juan José Siuce Moreno
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	42807429
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Nancy Victoria Carlos Erazo
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	41591557
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Nofre Sánchez Perea
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	06772234
Miembro del jurado 3	
Nombres y apellidos	Abelardo Lenin Maturrano Hernández

Tipo de documento	DNI

Número de documento de identidad	15725076
Datos de investigación	
Línea de investigación	A.1.3.1. Salud Pública B.4.1.5. Microbiología y parasitología veterinaria B.4.1.9. Patología clínica y biología molecular B.4.4.1. Medicina Veterinaria preventiva
Grupo de investigación	Biotecnología aplicada a la conservación, sanidad y producción animal – SANIGEN
Agencia de financiamiento	Perú. Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (CONCYTEC). Programa Nacional de Investigación Científica y Estudios Avanzados (PROCIENCIA). Contrato N°076-2021FONDECYT.
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Estación Biológica de la Isla Muyuy. Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura – Iquitos. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. País: Perú Departamento: Loreto Provincia: Maynas Distrito: Fernando Lores Latitud: -3.862375375031175 Longitud: -73.19190470198737 Edificio: Estación Biológica de Padre Isla. Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura – Iquitos. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. País: Perú Departamento: Loreto Provincia: Maynas Distrito: Belén Centro poblado: Padre Isla Latitud: -3.685636799243024 Longitud: -73.180904700296

	Edificio: Laboratorio de Microbiología. Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura – Iquitos. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. País: Perú Departamento: Loreto Provincia: Maynas Distrito: San Juan Bautista Calle: Av. Guardia Republicana 85 Latitud: -3.7715567900052167 Longitud: -73.27418384314748 Edificio: Laboratorio de Biología y Genética Molecular. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: San Borja Calle: Av. Circunvalación 2800 Latitud: -12.081202380563496 Longitud: -76.98825552784876
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Agosto 2022 – Agosto 2023
URL de disciplinas OCDE	Ciencia Veterinaria https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.03.01 Tecnología para la identificación y funcionamiento del ADN, proteínas y enzimas y como influencian la enfermedad https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.04.03 Salud Pública, Salud Ambiental https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.03.05

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS VETERINARIAS CON MENCIÓN EN SALUD ANIMAL

En la Sala de Posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, siendo las 10:00 horas del día martes 30 de julio del 2024, el Jurado Examinador de Tesis de Grado de Magíster, presidido por el Dr. Juan José Siuce Moreno y conformado por los siguientes miembros docentes: Mg. Nancy Victoria Carlos Erazo, Mg. Nofre Sánchez Perea y el Dr. Abelardo Lenin Maturrano Hernández (asesor), se dio inicio a la sustentación oral y pública de la Tesis titulada:

"Detección de *Escherichia coli* productora de Betalactamasas de Espectro Extendido en Primates No Humanos mantenidos en semicautiverio en las Islas Iquitos, Muyuy y Padre Isla, de la Cuenca Amazónica Peruana", presentado por el Bachiller en Medicina Veterinaria:

JHONATHAN ARTURO BAZALAR GONZALES

Quien sustentó la Tesis para obtener el Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias con mención en Salud Animal y absolvió satisfactoriamente las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado y practicada la votación obtuvo la calificación de: **EXCELENTE, (19) DIECINUEVE**_____

A continuación, el Jurado por intermedio de su Presidente recomendó a la Unidad de Posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria, proponga el otorgamiento del Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias con mención en Salud Animal, al Bachiller en Medicina Veterinaria Jhonathan Arturo Bazalar Gonzales.

Siendo las 12:00 horas del día martes 30 de julio de 2024, se dio por concluido el acto académico, suscribiéndose la presente Acta.

…… Dr. Juan José Siuce Moreno (P.A.D.E.) **Presidente**	..... Mg. Nancy Victoria Carlos Erazo **Miembro**
..... Mg. Nofre Sánchez Perea (P.A.T.C.) **Miembro**	…… Dr. Abelardo Lenin Maturrano Hernández (P.P.D.E) **Miembro Asesor**

……
Dr. César Miguel Gavidia Chucán (P.P.D.E.)
Director de la Unidad de Posgrado

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Vicerrectorado de Investigación y Posgrado

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Abelardo Lenin Maturrano Hernández en mi condición de asesor acreditado con la Resolución Directoral N°071-UPG-FMV-2022 de la tesis, cuyo título es "**Detección de *Escherichia coli* productora de Betalactamasas de Espectro Extendido en Primates No Humanos mantenidos en semicautiverio en las Islas Iquitos, Muyuy y Padre Isla, de la Cuenca Amazónica Peruana**", presentado por el bachiller Jhonathan Arturo Bazalar Gonzales para optar el grado académico de Magister en Ciencias Veterinarias con mención en Salud Animal, CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de 9% de similitud, nivel PERMITIDO para continuar con los trámites correspondientes y para su publicación en el repositorio institucional.

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del grado/ título/ especialidad correspondiente.

Firma del Asesor _____

DNI: 15725076

Nombres y apellidos del asesor: ABELARDO LENIN MATURRANO HERNANDEZ

Huella digital

Dedicatoria

A mis padres, Arturo y Luz, quienes continúan brindándome sus sabios consejos a través de los años.

A mi amada Jessica, por apoyarme incondicionalmente durante los años que cursé la maestría.

Al Dr. Raúl Rosadio, por continuar fortaleciendo mi espíritu investigador a través de SANIGEN.

A Dennis, Luis, Carmen, Thalía, Yenny y Ruby, amigos del laboratorio con quienes he aprendido a hacer ciencia.

A César, con quién compartí las aulas en el pregrado y tuve la grata sorpresa de volver a compartirlas en la maestría.

A quienes sigan investigando en busca de soluciones para combatir este importante problema de salud pública.

Agradecimientos

Al Dr. Lenin Maturrano, por brindarme nuevamente la oportunidad de realizar esta tesis de maestría bajo su asesoría, y a todo el equipo del Laboratorio de Biología y Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por apoyarme activamente con las actividades propias de esta investigación.

A la Dra. Nofre Sánchez, y a todo el personal del Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura-Iquitos, por apoyarme desinteresadamente con la colecta de las muestras que fueron empleadas en esta investigación.

Este estudio de investigación fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC), a través del programa PROCIENCIA, mediante el contrato N° 076-2021-FONDECYT.





ÍNDICE

Dedicatoria ii

Agradecimientos iii

RESUMEN viii

SUMMARY ix

LISTA DE CUADROS x

LISTA DE FIGURAS xi

LISTA DE ANEXOS xii

I. INTRODUCCIÓN 1

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 4

2.1. *Escherichia coli* (Escherich, 1885) 4

2.1.1. Taxonomía 4

2.1.2. Morfología 4

2.1.3. Clasificación 5

2.1.3.1. Serotipos 5

2.1.3.2. Patotipos 6

2.1.3.2.1. *E. coli* enteropatogénica (EPEC) 6

2.1.3.2.2. *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) 6

2.1.3.2.3. *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) 7

2.1.3.2.4. *E. coli* enteroagregativa (EAEC) 7

2.1.3.2.5. *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) 8

2.1.3.2.6. *E. coli* difusamente adherente (DAEC) 8

2.1.3.3. Filogrupos 8

2.1.3.4. Tipificación de Secuencias Multi-Locus (MLST) 9

2.1.4. Mecanismos de resistencia 12

2.1.4.1. Resistencia intrínseca 12

2.1.4.1.1. Reducción de la permeabilidad de la membrana externa 12

2.1.4.1.2. Reducción de la expresión de porinas 12

2.1.4.1.3. Sobreexpresión de bombas de eflujo 13

2.1.4.2. Resistencia extrínseca 13

2.1.4.2.1. Transferencia horizontal de genes 14

2.2. Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) 14

2.2.1. Clasificación de las BLEE 14

2.2.1.1. Familia TEM 15

2.2.1.2. Familia SHV 15

2.2.1.3. Familia OXA 16

2.2.1.4. Familia CTX-M 16

2.3. Vigilancia de la RAM en Primates No Humanos 17

2.3.1. Reportes en el Mundo 17

2.3.2. Reportes en América 18

2.3.3. Reportes en Perú 19

III. MATERIALES Y MÉTODOS 21

3.1. Lugar de estudio 21

3.2. Cálculo del tamaño de muestra 25

3.3. Consideraciones Éticas 26

3.4. Toma de muestras fecales de PNH 26

3.5. Análisis Microbiológico 27

3.5.1. Aislamiento e identificación de *E. coli* 27

3.5.2.1. Detección del perfil de resistencia 29

3.6. Análisis molecular 32

3.6.1. Extracción de ADN bacteriano 32

3.6.2. Cuantificación de ADN bacteriano 33

3.6.3. Secuenciamiento del genoma completo (WGS) 33

3.6.4. Análisis Bioinformático 34

3.7. Análisis de la Información 35

3.7.1. Cálculo de la frecuencia de animales positivos 35

3.7.2. Cálculo del intervalo de confianza 35

IV. RESULTADOS 37

4.1. Frecuencia de *E. coli* y *E. coli* productora de BLEE 37

4.2. Perfil de resistencia antimicrobiana 38

4.3. Caracterización genómica de las cepas de *E. coli* productora de BLEE 39

4.2.1. Identificación de ARGs 39

4.2.2. Contexto genético de los ARGs codificantes de BLEE 42

4.2.3. Análisis filogenómico 43

V. DISCUSION 47

5.1. Frecuencia de PNH portadores de *E. coli* productoras de BLEE 47

5.2. Identificación aislados de *E. coli* fenotipo BLEE, MDR y HMV 49

5.3. Identificación de ARGs codificantes de BLEE 51

5.4. Identificación del linaje pandémico de alto riesgo ST10 52

5.5. Diseminación de *E. coli* productora de CTX-M-15 y CTX-M-55 en América del Sur 53

5.6. Importancia de la vigilancia genómica de la RAM 55

VI. CONCLUSIONES 57

VII. RECOMENDACIONES 58

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 59

IX. ANEXOS 82

RESUMEN

Las enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) están en la lista de patógenos de prioridad crítica de la Organización Mundial de la Salud porque están asociadas con la resistencia a los antimicrobianos, un grave problema que afecta seriamente la salud pública mundial. Los primates no humanos (PNH) tienen un alto riesgo de adquirir estas bacterias debido al incremento de las actividades antropogénicas en sus entornos naturales. El objetivo de este estudio fue detectar *Escherichia coli* productora de BLEE en PNH mantenidos en semicautiverio en las islas Iquitos, Muyuy y Padre Isla, de la Cuenca Amazónica Peruana, mediante métodos microbiológicos, moleculares y genómicos. En agosto del 2022, se colectaron 69 muestras fecales de *Saguinus mystax*, *Saguinus labiatus* y *Saimiri boliviensis*, mediante muestreo aleatorio estratificado, y se enviaron al Laboratorio de Biología y Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para su análisis. Se identificaron 55 aislados de *E. coli* en total, mediante agar MacConkey, agar EMB y pruebas bioquímicas, y se evaluaron sus perfiles de resistencia mediante el método de Kirby-Bauer, de acuerdo con los lineamientos del CLSI. Los aislados sospechosos de BLEE se confirmaron mediante el método de Jarlier y se realizó la secuenciación de sus genomas completos, empleando la plataforma MiSeq de Illumina. El 5.45% (3/55) de los aislados expresaron fenotipo BLEE. Todos los aislados productores de BLEE fueron MDR y uno de ellos expresó fenotipo hipermucoviscoso. Además, se identificaron dos variantes del gen *bla*$_{\text{CTX-M}}$: *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ y *bla*$_{\text{CTX-M-55}}$, que codifican CTX-M-15 y CTX-M-55 respectivamente, y dos aislados fueron reconocidos como ST10, un linaje pandémico de alto riesgo. El análisis filogenómico demostró su estrecha relación con cepas humanas y de animales domésticos, resaltando el impacto negativo del hombre y de las actividades antropogénicas en la interfaz humano-animal-medio ambiente. Los resultados confirman que el 4.35% (3/69) de los PNH que habitan en esta región son portadores de *E. coli* productora de BLEE, y sugieren que podrían actuar como diseminadores en la Amazonía Peruana.

Palabras clave: *Escherichia coli* productora de BLEE, CTX-M-15, CTX-M-55, primates no humanos, Amazonía Peruana

SUMMARY

Extended spectrum betalactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* are on the critical priority pathogens list of the World Health Organization because they are associated with antimicrobial resistance, a serious problem that affects global public health. Non-human primates (NHP) are at high risk of acquiring these bacteria due to the increase in anthropogenic activities in their natural environments. This study aimed to detect ESBL-producing *Escherichia coli* in semi-captive NHP on Iquitos, Muyuy and Padre islands, in the Peruvian Amazon Basin, using microbiological, molecular and genomics methods. In August 2022, 69 fecal samples of *Saguinus mystax*, *Saguinus labiatus* and *Saimiri boliviensis* were collected, by stratified random sampling, and sent to the Laboratory of Biology and Molecular Genetics of the Faculty of Veterinary Medicine of the Universidad Nacional Mayor de San Marcos for your analysis. A total of 55 *E. coli* isolates were identified through MacConkey agar, EMB agar and biochemical tests, and their resistance profiles were evaluated using the Kirby-Bauer method, according to CLSI guidelines. The suspected ESBL isolates were confirmed using the Jarlier method and their whole genomes sequencing were performed using the Illumina MiSeq platform. The 5.45% (3/55) of the isolates expressed ESBL phenotype. All ESBL-producing isolates were MDR, and one of them expressed hypermucoviscous phenotype. In addition, were identified two variants of the $bla_{\text{CTX-M}}$ gene: $bla_{\text{CTX-M-15}}$ and $bla_{\text{CTX-M-55}}$, which encode CTX-M-15 and CTX-M-55 respectively, and two isolates were recognized as ST10, a high-risk pandemic lineage. Phylogenomic analysis demonstrated its close relationship with human and domestic animal strains, highlighting the negative impact of humans and anthropogenic activities at the human-animal-environment interface. The results confirm that 4.35% (3/69) of the NHP living in this region are carriers of ESBL-producing *E. coli* and could be spreaders in the Peruvian Amazon.

Keywords: ESBL-producing *Escherichia coli*, CTX-M-15, CTX-M-55, non-human primates, Peruvian Amazon

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Principales ST de linajes pandémicos de alto riesgo de *Escherichia coli* reportados en América del Sur 10

Cuadro 2. Frecuencia de *E. coli* y *E. coli* productoras de BLEE en PNH de las Islas Iquitos, Muyuy y Padre Isla (N=69)..... 37

Cuadro 3. Características de los genomas de los aislados de *E. coli* productora de BLEE de PNH de la Isla Muyuy y Padre Isla (N=3) 39

Cuadro 4. Características principales de los aislados de *E. coli* productora de BLEE de PNH de la Isla Muyuy y Padre Isla (N=3) 41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras morfológicas de *E. coli* (Basavaraju y Gunashree, 2023) 5

Figura 2 Árbol filogenético de *E. coli* construido a partir de SNPs (n=374 678) presentes en los genomas centrales (n=1 302) de 72 cepas del género *Escherichia*..... 9

Figura 3. Localización geográfica de los lugares de colecta de muestras de PNH..... 21

Figura 4. Mapa de la concesión de la Isla Iquitos (Tomado del GORE-Loreto)..... 22

Figura 5. Mapa de la concesión de la Isla Muyuy (Tomado del GORE-Loreto) 23

Figura 6. Mapa de la concesión de Padre Isla (Tomado del GORE-Loreto)..... 24

Figura 7. Placa Petri con cepa de *E. coli* sospechosa de BLEE..... 31

Figura 8. Placa Petri con aislado de *E. coli* fenotipo BLEE confirmado mediante el método de Jarlier 32

Figura 9. Perfil de resistencia de los aislados de *E. coli* de PNH (N=55) 38

Figura 10. Contexto genético de los ARGs codificantes de BLEE de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE de PNH de la Isla Muyuy y Padre Isla (N=3)..... 42

Figura 11. Árbol filogenético de *E. coli* ST10 productora de CTX-M-15 asociado a un mapa de presencia/ausencia de ARGs..... 43

Figura 12. Árbol filogenético del subclado de los aislados ECIM19 y ECPI13 asociado a un mapa de presencia/ausencia de ARGs..... 44

Figura 13. Árbol filogenético de las secuencias genómicas de las cepas ECIM19 y ECPI13 asociados a un mapa de calor de diferencia de SNPs..... 45

Figura 14. Árbol filogenético de la secuencia genómica de la cepa ECPI21 asociado a la presencia/ausencia de ARGs de la familia *bla*$_{\text{CTX-M}}$ 46

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Registro de muestras y aislados de PNH mantenidos en semicautiverio en las islas Iquitos, Muyuy y Padre Isla, de la región de Loreto, en el noreste de la Cuenca Amazónica Peruana (N=69) 83

Anexo 2. Registro de medida de los halos de inhibición de los aislados de *E. coli* de PNH mantenidos en semicautiverio en las Islas Iquitos, Muyuy y Padre Isla de la Cuenca Amazónica Peruana (N=55) 87

Anexo 3. Registro del perfil de resistencia de los aislados de *E. coli* de PNH mantenidos en semicautiverio en las Islas Iquitos, Muyuy y Padre Isla de la Cuenca Amazónica Peruana (N=55) 91

I. INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es un problema grave ocasionado por el uso inadecuado de los antibióticos en la medicina humana, medicina veterinaria y en la industria de la producción animal, que ha provocado una disminución en la eficacia y un incremento en los costos de los tratamientos de las enfermedades bacterianas afectando seriamente la salud pública mundial, sobre todo en los países de bajos y medianos ingresos, lo que podría ocasionar alrededor de 10 millones de muertes para el año 2050 si no se toman medidas urgentes para contrarrestar sus efectos (O'Neill, 2016). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha incluido a las enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), entre las que se incluyen a la *Escherichia coli* productora de BLEE, dentro de la lista de patógenos de prioridad crítica debido a que están asociadas con una elevada carga sanitaria, alta tasa de mortalidad, y el incremento de la RAM (WHO, 2017).

Las cepas de *E. coli* productora de BLEE poseen enzimas especializadas que les otorgan resistencia a un amplio espectro de antibióticos betalactámicos, entre los que se incluyen a las penicilinas, las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, y el aztreonam, pero son neutralizadas por la presencia de inhibidores de betalactamasas, como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. También muestran frecuentemente diferentes grados de resistencia a otras familias de antibióticos como los aminoglucósidos, las quinolonas y las sulfonamidas, y sus genes de resistencia a los antimicrobianos (ARGs, por sus siglas en inglés) pueden transmitirse fácilmente a través de plásmidos, mediante la transferencia horizontal de genes, lo que facilita su diseminación (Castanheira *et al*., 2021).

Más del 60% de las enfermedades infecciosas emergentes (EIE) son causadas por patógenos zoonóticos, y alrededor del 70% de estos patógenos provienen de la fauna silvestre (Jones *et al*., 2008). Se ha informado que los humanos y PNH pueden ser susceptibles a muchos patógenos en común debido a su estrecha relación filogenética, y que cerca del 25% de las EIE zoonóticas son causadas por patógenos de primates. Por lo tanto, la superposición geográfica entre las poblaciones humanas y de primates podría incrementar el riesgo de transmisión y diseminación de patógenos entre especies; sobre todo en regiones que presentan una alta biodiversidad de primates, como el África central y la Amazonía occidental (Pedersen y Davies, 2009).

Además, el 54% de las EIE son causadas por ritckettsias y bacterias resistentes a los antibióticos lo que resalta la importancia de la vigilancia de la RAM para la salud pública mundial (Jones *et al*., 2008). Adicionalmente, varios autores han reportado que algunas especies de primates pueden actuar como reservorios de patógenos bacterianos potencialmente zoonóticos, y que el incremento de las actividades antropogénicas en sus entornos naturales, debido al cambio del uso de la tierra, como la agricultura, ganadería, tala y minería, han aumentado la fragmentación de los bosques, afectando el estilo de vida de los PNH y favoreciendo la interacción entre los humanos y primates, lo que podría incrementar el riesgo de transmisión de bacterias resistentes y sus ARGs en la interfaz humano-animal-medio ambiente (Vásquez-Aguilar *et al*., 2020).

En el Perú, se han realizado varios estudios de vigilancia de la RAM en enterobacterias de muestras humanas. Sin embargo, los estudios de vigilancia en enterobacterias de PNH son escasos. A la fecha, solo hay dos estudios publicados; el primero reportó enterobacterias multidrogoresistentes (MDR) en primates mantenidos en semicautiverio en un centro de rescate de Loreto y San Martín, siendo *E. coli* la enterobacteria aislada con mayor frecuencia (Medina *et al*., 2017), y el segundo reportó enterobacterias productoras de BLEE en PNH en semicautiverio de dos centros de rescate en Loreto (Huillca, 2021), siendo también *E. coli* la enterobacteria más frecuente. Sin embargo, en ninguno de los dos estudios se identificaron los ARGs asociados a los perfiles de resistencia observados.

El uso de bacterias indicadoras representa una estrategia interesante para la monitorización de la RAM y sus ARGs, siendo *E. coli* la enterobacteria más empleada en

los estudios de vigilancia debido a la plasticidad de su genoma (Anjum *et al*., 2021). Experiencias previas en fauna silvestre proveen de respaldo suficiente para el uso de esta metodología (Weiss *et al*., 2018). En ese contexto, el presente estudio tuvo como objetivo detectar la presencia de *E. coli* productora de BLEE e identificar sus ARGs, mediante técnicas microbiológicas, moleculares y genómicas, a partir de muestras fecales de PNH mantenidos en condiciones de semicautiverio en los bosques tropicales que colindan con centros poblados urbano-rurales de las islas Iquitos, Muyuy y Padre Isla, de la región de Loreto, en el noreste de la Cuenca Amazónica Peruana, con la finalidad de contribuir con el conocimiento, la epidemiología y la dinámica de la RAM asociada a las BLEE en esta región de la Amazonía Peruana.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Escherichia coli* (Escherich, 1885)

2.1.1. Taxonomía

E. coli es una bacteria móvil, gramnegativa, no formadora de esporas y anaeróbica facultativa, que forma parte del microbioma del tracto intestinal del hombre y de los animales, entre los que se incluyen a los PNH (Clayton *et al*., 2014). Fue descubierta por el pediatra alemán Theodor Escherich en el año 1985, en las heces de niños con diarrea, y ha sido clasificada taxonómicamente, de acuerdo con sus características microbiológicas y moleculares, dentro del phylum Proteobacteria, clase Gammaproteobacteria, orden Enterobacterales, familia *Enterobacteriaceae* y género *Escherichia* (Basavaraju y Gunashree, 2023).

2.1.2. Morfología

Es un bacilo recto, con forma de bastón, alargado, cilíndrico y con los extremos redondeados (Figura 1), que mide entre uno y 1.5µm de ancho por dos a 6µm de largo aproximadamente (Brenner *et al*., 2005). Presenta una membrana externa compuesta por lipopolisacáridos (LPS), conformados por el lípido A, oligosacáridos centrales y un polisacárido único, denominado "antígeno O", que forma una barrera protectora contra agentes externos y al mismo tiempo ayudar a mantener la integridad celular (Liu *et al*., 2020). Esta estructura se encuentra separada de la membrana plasmática interna por medio del espacio periplásmico, que contiene una capa delgada de peptidoglicano, que proporciona resistencia estructural y rigidez a la bacteria (Nikaido, 2003).

Adicionalmente, presenta entre cinco y 10 flagelos, de 20nm de diámetro y hasta 200nm de longitud, y alrededor de 100 a 500 cilios, pilis o fimbrias, de 7nm de diámetro y de 0.2 a 20nm de longitud, que se encuentran distribuidos aleatoriamente sobre toda la superficie bacteriana y le confieren movilidad, aunque algunas cepas pueden permanecer inmóviles (Brenner *et al*., 2005). Además, pueden servir como puentes para la transmisión de plásmidos que portan ARGs, mediante el proceso de conjugación, lo que facilita su diseminación, incluso entre diferentes especies (Lerminiaux y Cameron, 2019).

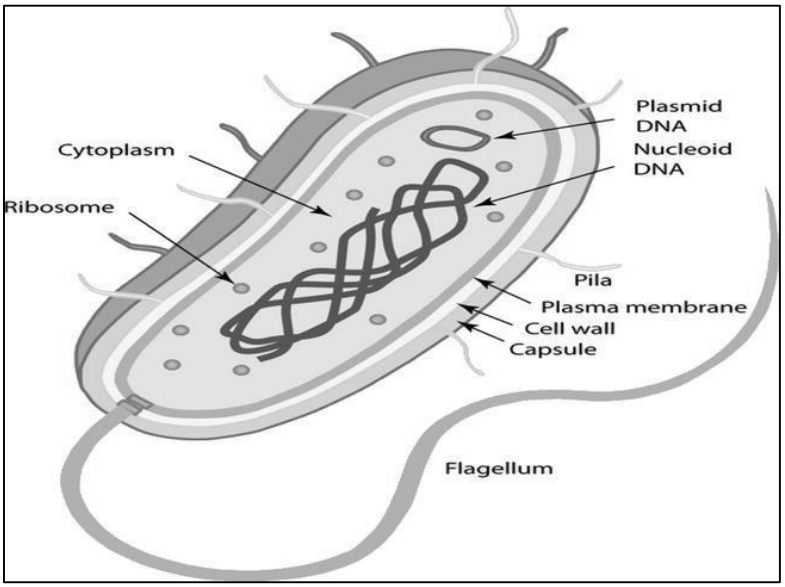

Figura 1. Estructuras morfológicas de *E. coli* (Basavaraju y Gunashree, 2023)

2.1.3. Clasificación

2.1.3.1. Serotipos

La clasificación de las cepas de *E. coli* mediante serotipificación está basada en la identificación del antígeno somático o de pared celular (antígeno O), antígeno flagelar (antígeno H) y, ocasionalmente, del antígeno capsular (antígeno K) (Basavaraju y Gunashree, 2023). Tradicionalmente, se han serotipificado utilizando anticuerpos contra 186 antígenos O y 53 antígenos H (Fratamico *et al*., 2016); sin embargo, en la actualidad se puede predecir el serotipo mediante bioinformática (Zhou *et al*., 2020). La variabilidad estructural del antígeno O proporciona la base principal para los esquemas de serotipado con fines taxonómicos y epidemiológicos (Liu *et al*., 2020). Hasta la fecha, se reconocen entre 150 a 200 serotipos de acuerdo con 186 tipos de antígenos O, 75 antígenos H y 103 antígenos K (Basavaraju y Gunashree, 2023).

2.1.3.2. Patotipos

Las cepas de *E. coli* también pueden clasificarse de acuerdo con su patogenicidad en cepas comensales y patógenas, y éstas a su vez en cepas patógenas intestinales y extraintestinales (ExPEC) (Dobrindt, 2005). Las cepas patógenas intestinales pueden encontrarse formando parte del microbioma intestinal del hombre y de los animales (Meng *et al*., 2014), y son una de las principales causas de diarrea, que puede estar asociada o no con otros agentes patógenos, como los coronavirus, rotavirus y criptosporidios (Poirel *et al*., 2018).

2.1.3.2.1. *E. coli* enteropatogénica (EPEC)

Fue el primer patotipo descrito en humanos y una de las causas más importantes de diarrea infantil potencialmente mortal en países con bajos recursos (Suleiman *et al*., 2022). Se adhieren íntimamente a los enterocitos, formando una estructura denominada pedestales de adhesión, que están compuestos por filamentos de actina e intiminas, alterando la ultraestructura y el funcionamiento de las microvellosidades intestinales, provocando una disminución en la absorción de nutrientes e incrementando la pérdida de agua y electrolitos, lo que conlleva a diarrea persistente (Nataro y Kaper, 1998).

Su capacidad de inducir estas lesiones histopatológicas está codificada por genes de virulencia que están presentes en la isla de patogenicidad (PAI, siglas en inglés) denominada locus de borramiento de enterocitos (LEE, siglas en inglés) (McDaniel *et al*., 1995). Además, secreta un conjunto de proteínas conocidas como sistema de secreción de tipo III (SST3), que es esencial para su patogenicidad porque permiten la inyección de proteínas efectoras directamente en los enterocitos, manipulando la función de las células hospedadoras e interfiriendo con la señalización celular y la respuesta inmunitaria (Nataro y Kaper, 1998).

2.1.3.2.2. *E. coli* enterohemorrágica (EHEC)

Es un patógeno zoonótico, cuyo reservorio principal es el ganado bovino, aunque también se ha asociado al consumo de alimentos y agua potable contaminada, así como a la transmisión de persona a persona y a las visitas a granjas y zoológicos. Se caracteriza por la producción de la toxina Shiga (Stx) o verocitotoxina (VT), que induce la apoptosis

de las células epiteliales intestinales del colon, lo que resulta en colitis hemorrágica, necrosis y perforación intestinal, y se disemina a través del sistema circulatorio hasta el riñón, donde daña las células endoteliales renales y ocluye la microvasculatura, ocasionando nefritis que puede provocar daño renal y síndrome urémico hemolítico. También poseen PAI-LEE; sin embargo, hay otras características que se suman a su patogenicidad, como las propiedades de las fimbrias y los sistemas de captación y utilización de hierro para satisfacer las necesidades bacterianas durante la infección (Garcia *et al*., 2010).

2.1.3.2.3. *E. coli* enterotoxigénica (ETEC)

Es un patógeno común en países en desarrollo y está asociado a la diarrea del viajero en humanos, diarrea neonatal bovina, cuadros diarreicos en ovinos y caninos, y colibacilosis porcina (Yu *et al*., 2021). Se caracteriza por producir dos tipos de factores de virulencia: las adhesinas, que promueven la unión a receptores de enterocitos específicos, y las enterotoxinas, responsables de la secreción de líquidos. Las adhesinas mejor caracterizadas son: F4, F5, F6, F17 y F18 (Dubreuil *et al*., 2016).

Una vez que colonizan la mucosa intestinal, pueden producir uno o dos tipos de enterotoxinas: las enterotoxinas termolábiles (LT) y las enterotoxinas termoestables (ST). Los LT y ST activan las vías de señalización intracelular que aumentan la secreción de cloruro en las células epiteliales intestinales, y estimulan la síntesis de prostaglandinas y el sistema nervioso entérico provocando diarrea acuosa (Kaper *et al*., 2004).

2.1.3.2.4. *E. coli* enteroagregativa (EAEC)

Es un patotipo importante que está asociado a infecciones diarreicas agudas y persistentes, tanto en humanos como en animales, y ha sido responsable de numerosos brotes a nivel mundial (Vijay *et al*., 2015). Se caracterizan porque no secretan LT ni ST, y se adhieren entre si mediante estructuras fimbriales denominadas fimbrias de adherencia agregada en un patrón autoagregativo, a manera de ladrillos apilados. La colonización de la mucosa intestinal conduce a la secreción de enterotoxinas y citotoxinas, lo que a su vez induce un daño leve pero significativo de la mucosa, particularmente del colon (Kaper *et al*., 2004).

2.1.3.2.5. *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)

Están estrechamente relacionada con *Shigella* spp. Utiliza SST3 para secretar múltiples proteínas que intervienen en la reorganización del citoesqueleto, la lisis celular y las vías de señalización. Las proteínas secretadas por este sistema inducen la polimerización de la actina y la invasión celular, lo que permite que las bacterias entren en las células del hospedero, provocando colitis inflamatoria invasiva y, ocasionalmente, disentería, pero en la mayoría de los casos provoca diarrea acuosa (Kaper *et al*., 2004).

2.1.3.2.6. *E. coli* difusamente adherente (DAEC)

Se define por su patrón de adherencia difusa a las células HEp-2, mediante adhesinas: Afa, F1845 y Dr, que utilizan al factor acelerador de la descomposición humana (DAF) como receptor. Además, puede conducir a la activación de cascadas de transducción de señales asociada con la unión de Dr. y la expresión de MicA en las células epiteliales intestinales, contribuyendo a los efectos proinflamatorios. Adicionalmente, induce la reducción de enzimas asociadas al borde en cepillo, independientemente de la vía DAF, lo que indica la presencia de otros factores de virulencia (Kaper *et al*., 2004) y poseen varios sistemas de eliminación de hierro, toxinas, adhesinas y factores de resistencia al complemento o de evasión del sistema inmunológico que sugieren nuevas vías de patogénesis (Meza-Segura *et al*., 2020).

2.1.3.3. Filogrupos

La clasificación filogenética de *E. coli* se basa en la relación evolutiva que existe entre las cepas previamente reportadas en base a su genoma. Varios estudios han reportado una diversidad de secuencias genómicas de *E. coli*, y han informado que algunas de estas cepas poseen genes codificantes de factores de virulencia que están presentes en dos o más patotipos (Garcia y Fox, 2021). Debido a esta alta complejidad estructural, actualmente se acepta que existen ocho filogrupos (Denamur *et al*., 2021): A, B1, B2, C, D, E, F y G, y se postula un nuevo grupo filogenético, denominado grupo H, y los clados I, III y IV (Figura 2). Sin embargo, un estudio reciente ha propuesto hasta 14 filogrupos (Abram *et al*., 2021).

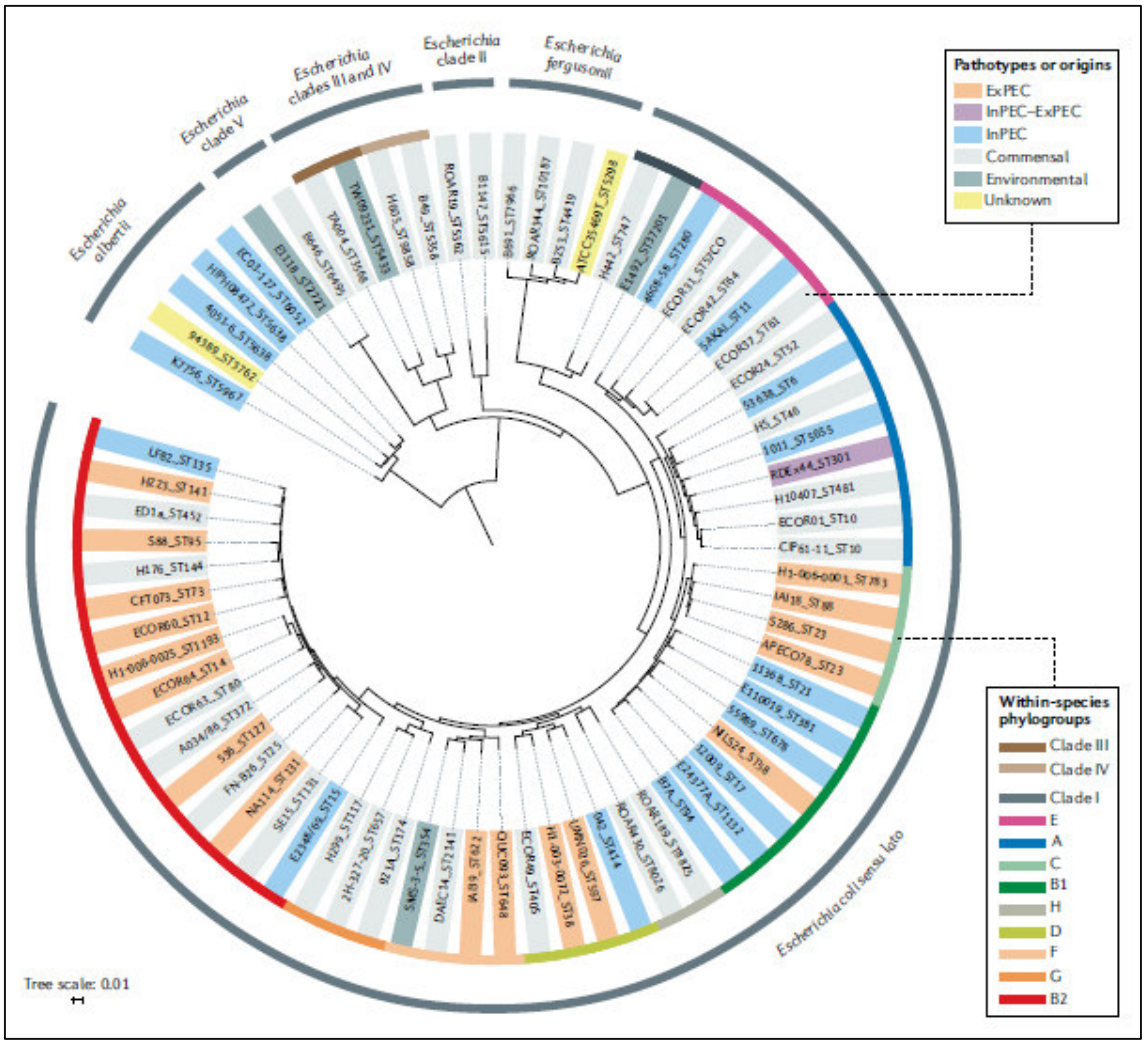

Figura 2: Árbol filogenético de *E. coli* construido a partir de SNPs (n=374 678) presentes en los genomas centrales (n=1 302) de 72 cepas del género *Escherichia* Grupo A: línea azul, grupo B1: línea verde oscuro, grupo B2: línea roja, grupo C: línea verde claro, grupo D: línea verde limón, grupo E: línea lila, grupo F: línea beige, grupo G: línea anaranjada, grupo H: línea gris claro, clado I: línea gris oscuro, clado III: línea marrón oscuro, clado IV: línea marrón claro (Denamur *et al*., 2021).

2.1.3.4. Tipificación de Secuencias Multi-Locus (MLST)

La tipificación de secuencias multi-locus (MLST), proporciona un nuevo enfoque basado en la secuencia de nucleótidos que emplea técnicas de secuenciación de alto rendimiento y análisis bioinformático para caracterizar cepas patógenas virulentas o resistentes a los antibióticos a nivel mundial (Enright y Spratt, 1999). La caracterización de patógenos se ha convertido en una herramienta fundamental de la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas, generando la información necesaria para

identificar, rastrear e intervenir los brotes de enfermedades (Urwin y Maiden, 2003). Actualmente se han caracterizado varios linajes pandémicos de alto riesgo de *E. coli*, como ST10, ST131, ST155, ST167 y ST648 (Cuadro 1), que son de preocupación mundial debido a que portan varios ARGs y son capaces de colonizar diferentes hospederos (Bastidas-Caldes *et al*., 2022; Lincopan *et al*., 2023).

Cuadro 1. Principales ST de linajes pandémicos de alto riesgo de *Escherichia coli* reportados en América del Sur

ST	País	Hospedero	Referencia
ST10	Argentina	Pollos	Dominguez *et al*. (2019)
	Bolivia	Humanos	Calderon-Toledo *et al*. (2023)
	Brasil	Humanos	Maluta *et al*. (2014)
		Pollos	
		Pingüinos	Fuga *et al*. (2022)
		Bovinos	Orsi *et al*. (2023)
		Palomas	Sano *et al*. (2023)
		Ratas	
		Ratones	
	Chile	Humanos	Hernandez *et al*. (2013)
		Gaviotas	
	Colombia	Humanos	Rojas *et al*. (2016)
		Pollos	Castellanos *et al*. (2017)
	Uruguay	Humanos	Bado *et al*. (2016)
		Bovinos	Umpiérrez *et al*. (2017)
	Ecuador	Humanos	Zurita *et al*. (2019)
		Perros Pollos	Salinas *et al*. (2021)
	Perú	Humanos	Murray *et al*. (2021)
		Llamas	Cardenas-Arias *et al*. (2024)
ST131	Argentina	Humanos	Sennati *et al*. (2012)
		Porcinos	Faccone *et al*. (2019)
	Bolivia	Humanos	Bartoloni *et al*. (2016)

	Brasil	Humanos	Peirano *et al*. (2011)
		Pollos	Maluta *et al*. (2014)
		Gaviotas	Ewbank *et al*. (2022)
		Pavos	Fuga *et al*. (2022)
	Chile	Gaviotas	Hernández *et al*. (2013)
	Colombia	Humanos	Ruiz *et al*. (2011)
	Ecuador	Humanos	Chiluisa-Guacho *et al*. (2018)
	Uruguay	Humanos	Vignoli *et al*. (2016)
	Perú	Humanos	Alcedo *et al*. (2022)
		Porcinos	Espinoza *et al*. (2023)
ST155	Argentina	Pollos	Dominguez *et al*. (2019)
	Bolivia	Humanos	Calderon-Toledo *et al*. (2023)
	Brasil	Humanos Pollos	Maluta *et al*. (2014)
	Chile	Humanos Gaviotas	Hernandez *et al*. (2013)
	Ecuador	Humanos Perros Pollos	Salinas *et al*. (2021)
	Perú	Humanos	Murray *et al*. (2021)
ST167	Brasil	Humanos	Santos Tufic-Garutti *et al*. (2022)
	Chile	Gaviotas	Hernandez *et al*. (2013)
	Ecuador	Humanos	Zurita *et al*. (2019)
	Perú	Murciélagos	Benavides *et al*. (2022)
		Cerdos	Alvarez *et al*. (2023)
ST648	Brasil	Humanos Pollos	Maluta *et al*. (2014)
		Bovinos	Fuga *et al*. (2022)
		Gatos	
	Ecuador	Humanos	Zurita *et al*. (2019)
	Perú	Murciélagos	Benavides *et al*. (2022)

2.1.4. Mecanismos de resistencia

Existen cuatro mecanismos de resistencia a los antimicrobianos que pueden emplear las bacterias. Estos mecanismos son limitar la absorción de los antimicrobianos, modificar el objetivo del fármaco, activar la salida de los antimicrobianos o inactivar los antimicrobianos mediante degradación enzimática; y pueden ser de naturaleza intrínseca, cuando son codificados por ARGs que se encuentran dentro del cromosoma bacteriano, o extrínseca, cuando son codificados por elementos genéticos móviles (Reygaert, 2017).

2.1.4.1. Resistencia intrínseca

Está conformada por los mecanismos de resistencia naturales o inherentes que están presentes en todas las cepas, tanto comensales como patógenas, independientemente de la exposición previa a la presión selectiva de los antibióticos, y que no están relacionados con la transferencia horizontal de genes (Cox y Wright, 2013). Los principales mecanismos de resistencia intrínseca en *E. coli* se basan en la reducción de la permeabilidad de la membrana externa, la reducción de la expresión de porinas y la sobreexpresión de las bombas de eflujo (Nikaido, 2003).

2.1.4.1.1. Reducción de la permeabilidad de la membrana externa

Las características estructurales y funcionales que posee la membrana externa de las bacterias gramnegativas, como *E. coli*, favorecen los mecanismos de resistencia intrínseca (Delcour, 2009). La membrana externa es una bicapa lipídica, asimétrica y altamente hidrofóbica, que está compuesta por LPS, fosfolípidos y proteínas, lo que proporciona una barrera natural contra ciertos tipos de moléculas, entre los que se incluyen a algunos grupos de antibióticos hidrofílicos como la familia de los betalactámicos (Impey *et al*., 2020).

2.1.4.1.2. Reducción de la expresión de porinas

Las porinas son proteínas triméricas con forma de barril, que tienen un canal central y que atraviesan la membrana bacteriana, permitiendo el paso de compuestos hidrofílicos (Nikaido, 2003). *E. coli* posee tres tipos de porinas principales: PhoE, que permite el paso de aniones, y OmpF y OmpC, que permiten el paso de cationes. Además,

OmpF es permeable a solutos ligeramente más grandes que OmpC. Algunas moléculas de antibióticos hidrofílicos pequeños, como los betalactámicos, las tetraciclinas, el cloranfenicol y las fluoroquinolonas, utilizan las porinas para acceder al interior de la célula, por lo que una disminución en la expresión de las porinas puede incrementar los niveles de resistencia intrínseca a estos antibióticos hidrofílicos (Galdiero *et al*., 2012). Se ha demostrado que las cepas que presentan mutaciones en el gen *ompF*, que reducen la luz del poro, pueden ser más resistentes a las cefalosporinas como la cefepima (Simonet *et al*., 2000).

2.1.4.1.3. Sobreexpresión de bombas de eflujo

Las bombas de eflujo son proteínas de membrana encargadas de transportar de forma activa los metabolitos y compuestos tóxicos del interior al exterior de la célula. Por medio de este mecanismo, las cepas de *E. coli* pueden expulsar antibióticos, reduciendo su concentración. Este tipo de resistencia es inespecífica y puede afectar a varias familias de antibióticos (Krishnamoorthy *et al*., 2017). LmrA y AcrAB-TolC son bombas de eflujo de múltiples fármacos que desempeñan un papel importante en el fenotipo MDR, incluidos la resistencia a las tetraciclinas, el cloranfenicol, la ampicilina, el ácido nalidíxico y la rifampicina (Smith *et al*., 2024).

2.1.4.2. Resistencia extrínseca

En general, *E. coli* es intrínsecamente susceptible a la mayoría de los antibióticos; sin embargo, tiene una gran capacidad para acumular ARGs que pueden conferirle resistencia extrínseca o adquirida (Poirel *et al*., 2018). Estos mecanismos de resistencia adquirida están codificados por plásmidos, integrones y transposones que portan ARGs, y que pueden trasmitirse entre cepas a través de la transferencia horizontal de genes (Lerminiaux y Cameron, 2019). La conjugación es el proceso de transferencia horizontal de genes más empleado que contribuye a la adaptación bacteriana a diversos entornos y, a largo plazo, a la evolución bacteriana (Thomas *et al*., 2005). También se considera como resistencia adquirida a las mutaciones en el cromosoma bacteriano, que confieren el desarrollo de resistencia como resultado (Vignoli y Seija, 2006).

2.1.4.2.1. Transferencia horizontal de genes

E. coli tiene una gran capacidad para adquirir ARGs a través de la transferencia horizontal de genes (Lerminiaux y Cameron, 2019). Los mecanismos de RAM más preocupantes se dan por la expresión de ARGs codificantes de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), que le confieren resistencia a un amplio espectro de antibióticos betalactámicos, entre los que se incluyen a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, y los monobactámicos; carbapenemasas, que le otorgan resistencia a los carbapenémicos; 16S rRNA metilasas, que le brindan resistencia a los aminoglucósidos; genes de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos (PMQR, siglas en inglés), que le otorgan resistencia a las fluoroquinolonas; y los genes de la familia *mcr*, que le dan resistencia a las polimixinas (Poirel *et al*., 2018).

2.2. Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE)

Las BLEE son un grupo de enzimas hidrolasas que otorgan resistencia a un amplio espectro de antibióticos betalactámicos, incluyendo a las penicilinas y aminopenicilinas (como la ampicilina y la amoxicilina), las cefalosporinas de tercera generación (como la cefotaxima, ceftazidima y ceftriaxona), las cefalosporinas de cuarta generación (como la cefepima), y los monobactámicos (como el aztreonam), pero que son neutralizadas por los inhibidores de las betalactamasas (como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) (Castanheira *et al*., 2021).

En los últimos años, se han reportado varios ARGs codificantes de BLEE en cepas de *E. coli* aisladas a partir de muestras humanas, animales y ambientales (Bastidas-Caldes *et al*., 2022). Estos ARGs están asociados a secuencias de inserción (como IS Ecp1, IS CR1, IS 26 e IS 10), transposones (como Tn 2) e integrones (Schink *et al*., 2013). La mayoría están localizados en plásmidos, mientras que rara vez se ha descrito la presencia de ARGs codificantes de BLEE en el ADN cromosómico (Guenther *et al.*, 2017).

2.2.1. Clasificación de las BLEE

Las BLEE se clasifican según su estructura molecular dentro de la clase A (Ambler, 1980) y según su función dentro del grupo 2be (Bush y Jacoby, 2010). Aunque tienen propiedades bioquímicas comunes, con respecto a la hidrólisis de antibióticos

betalactámicos de amplio espectro y la neutralización por inhibidores de las betalactamasas, los ARGs que codifican estas enzimas son de naturaleza diversa y se pueden agrupar en varias familias (Sawa *et al*., 2020):

2.2.1.1. Familia TEM

Son variantes de las betalactamasas TEM-1 y TEM-2, reportadas en la década de 1960. La primera variante que expresó fenotipo BLEE fue TEM-3, reportada en 1989. Actualmente se han descrito más de 200 variantes de enzimas tipo TEM codificadas por genes de la familia *bla*$_{\text{TEM}}$ (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#tem), aunque no todas presentan fenotipo BLEE (Castanheira *et al*., 2021).

Se ha observado que la mayoría de las enzimas tipo TEM con presentan fenotipo BLEE poseen una sustitución de glicina por serina en la posición 238, y de ácido glutámico por lisina en la posición 240 de la nomenclatura de Ambler. Estas sustituciones expanden el sitio activo de la enzima, mejorando la unión y acomodación de las cefalosporinas, y ampliando el espectro de sustrato para incluir a cefotaxima, ceftazidima y aztreonam (Liakopoulos *et al*., 2016).

2.2.1.2. Familia SHV

Las BLEE de tipo SHV, son enzimas codificadas por variantes del gen *bla*$_{\text{SHV}}$, y se encuentran con mayor frecuencia en aislados de *K. pneumoniae*. La variante SHV-2 fue la primera BLEE de esta familia y se encontró en una cepa de *K. ozaenae* aislada en Alemania en 1985. A la fecha, se han detectado 199 variantes de SHV (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#shv), aunque no todas poseen fenotipo BLEE (Castanheira *et al*., 2021).

La mayoría de las BLEE de tipo SHV también presentan mutaciones de glicina 238 por serina y de ácido glutámico 240 por lisina (Liakopoulos *et al*., 2016). SHV-5 y SHV-12 han sido las variantes más comunes encontradas en Enterobacterales a nivel mundial (Castanheira *et al*., 2021).

2.2.1.3. Familia OXA

Está formado por un grupo amplio de enzimas con actividad oxacilinasa codificadas por variantes de los genes *bla*$_{\text{OXA}}$, que muestra variabilidad en los perfiles de sustrato y secuencias de aminoácidos. Se clasifican como enzimas clase D según la clasificación de Ambler y en el grupo funcional 2de según la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros. Las variantes de OXA con fenotipo BLEE hidrolizan cefalosporinas de tercera y cuarta generación, cefemas y monobactamas, pero son resistentes a la neutralización por los inhibidores de las betalactamasas (Castanheira *et al*., 2021).

Aunque se ha propuesto considerar dentro del grupo de las BLEE a cualquier enzima que pueda hidrolizar cefalosporinas de tercera y cuarta generación, la inhibición por ácido clavulánico es un requisito para su designación dentro de este grupo. Por tal motivo, varios investigadores no consideran a las oxacilinasas como BLEE. Actualmente, se han reportado alrededor de 27 oxacilinasas que presentan fenotipo BLEE (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#oxa). La mayoría derivan de la variante OXA-2 y OXA-10 y se detectan en aislados de *Pateurella aeruginosa* (Castanheira *et al*., 2021).

2.2.1.4. Familia CTX-M

Las betalactamasas de tipo CTX-M son enzimas cefotaximasas codificadas por genes *bla*$_{\text{CTX-M}}$. Se reportaron por primera vez en Munich, Alemania, a finales de la década de 1980 y emergieron de manera concomitante en varios lugares. Actualmente son consideradas como la familia de BLEE más común, con más de 250 variantes (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#ctx-m), reemplazando a las BLEE tipo TEM y SHV. La mayoría se pueden agrupar en cinco grupos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25. Las primeras variantes CTX-M hidrolizaban eficientemente cefotaxima y ceftriaxona, y tenían actividad limitada contra la ceftazidima; sin embargo, más tarde se describieron variantes con actividad hidrolítica mejorada contra ceftazidima, como CTX-M-15 (Castanheira *et al*., 2021).

2.3. Vigilancia de la RAM en Primates No Humanos

Varios autores han reportado que algunas especies de PNH pueden actuar como reservorios de bacterias resistentes a los antibióticos, y que la fragmentación de los bosques debido al crecimiento demográfico y al incremento de las actividades antropogénicas en los entornos de los primates, así como el cambio en el estilo de vida de los primates silvestres a condiciones de cautiverio y semicautiverio pueden incrementar la interacción entre humanos y PNH, y el riesgo de transmisión de patógenos bacterianos y de sus ARGs (Rolland *et al*., 1985; Goldberg, 2008).

2.3.1. Reportes en el Mundo

En África, un estudio realizado en babuinos amarillos (*Papio cynocephalus*) silvestres que habitan en el Parque Nacional Amboseli, en Kenia, reportó por primera vez que los PNH que estaban en contacto frecuente con desechos humanos tenían una mayor proporción de enterobacterias resistentes a los antibióticos, en comparación con aquellos que vivían sin contacto humano, y demostró que los ARGs podían transferirse de manera horizontal, mediante plásmidos, sugiriendo que estos animales podrían constituir una fuente de bacterias resistentes en sus entornos naturales (Rolland *et al*., 1985).

Posteriormente, un estudio comparativo, realizado también en Kenia, detectó que el 17.7% (11/62) y 14.5% (9/62) de los aislados de *E. coli* de babuinos olivos (*Papio anubis*) silvestres y cautivos respectivamente eran productoras de BLEE, concluyendo que estos primates son reservorios de *E. coli* productora de BLEE, y sugiriendo que podrían desempeñar el rol de diseminadores potenciales a otros animales, incluyendo a los humanos (Kariuki *et al*., 2018).

Recientemente, un estudio realizado en monos verdes (*Chlorocebus sabaeus*), babuinos de Guinea (*Papio papio*) y chimpancés (*Pan troglodytes verus*) silvestres, en Senegal, reportó 65% (47/72) de enterobacterales resistentes a colistina y 29% (21/72) resistentes a cefalosporinas de tercera generación; además, identificó un transposón que portaba el gen $bla_{\text{CTX-M-15}}$, que fue transferido con éxito a un fago de *E. coli* ST10, concluyendo que estos PNH constituyen un reservorio de ARGs para clones internacionales de alto riesgo (Abdallah *et al*., 2022).

En Asia, un estudio realizado en primates mantenidos en cautiverio en seis zoológicos de China detectó 32% (65/206) de aislados de *E. coli* productora de BLEE mediante PCR, siendo el 15% (31/206) positivos a *bla* $_{\text{CTX-M-15}}$, 11% (23/206) a *bla* $_{\text{CTX-M-3}}$ y 1% (2/206) a *bla* $_{\text{CTX- M-14}}$ (Wang *et al*., 2012). Posteriormente, otro estudio realizado en 50 especies de primates cautivos de 13 zoológicos de China reportó 47.94% (477/995) de *E. coli* MDR con alta resistencia a tetraciclinas, betalactámicos y sulfonamidas, y 22 ARGs (Zhu *et al*., 2021). Ambos estudios concluyeron que los primates en cautiverio pueden ser reservorios de bacterias MDR y productoras de BLEE, y sus heces pueden ser vehículos de transmisión para los ARGs.

2.3.2. Reportes en América

En América se han realizado algunos estudios fenotípicos de vigilancia de la RAM en PNH silvestres y en cautiverio. En Ecuador, un estudio realizado mediante la técnica de difusión en disco de Kirby-Bauer reportó aislados de *E. coli* resistentes a ampicilina (53.84%), oxitetraciclina (38.46%), y sulfametoxazol/trimetoprima (23.08%), y con sensibilidad intermedia a cefuroxima (100%) y ciprofloxacina (53.85%) en monos capuchinos blancos (*Cebus yuracus*) de vida libre que habitan en la región del Napo, sugiriendo una posible transmisión debido a la interacción con los humanos y sus desechos (León *et al*., 2020).

En Colombia, un estudio empleando la misma técnica reportó hasta 100% de resistencia a vancomicina, clindamicina, eritromicina y penicilina G; 76.92% a tetraciclina, y 30.76% a estreptomicina y cloranfenicol en aislados de *Salmonella* spp. obtenidos a partir de muestras fecales de 10 especímenes de mono aullador (*Alouatta seniculus*), mono ardilla (*Saimiri sciureus*), mono choro (*Lagothrix lagotricha*), machín blanco (*Cebus albifrons*) y machín negro (*Cebus apella*) mantenidos en cautiverio, sugiriendo continuar con la vigilancia de la RAM en otras especies de fauna silvestre (Calderón *et al*., 2013).

En Brasil reportaron resistencia a tetraciclina en 28.5% (26/91), cloranfenicol en 15.4% (14/91) y meticilina en 13.2% (12/91), en aislados de *Staphylococcus* spp. de monos ardillas (*Saimiri* spp.) criados en cautiverio (Donato *et al*., 2017). Paralelamente, Zaniolo *et al*. (2020) reportaron 72.72% de resistencia a amoxicilina y 57.57% a

ampicilina en enterobacterias de monos capuchinos negros (*Sapajus nigritus*) de vida libre, aunque no lograron determinar ninguna muestra positiva a BLEE. Posteriormente, los mismos autores reportaron 82.36% de resistencia a cefotaxima y 81.81% a penicilina en aislados de bacterias grampositivas obtenidos de los mismos especímenes, aunque no lograron determinar la presencia del gen *mec*A (Zaniolo *et al*., 2022). Todos los estudios consideraron la posibilidad de transmisión entre especies debido a la interacción entre primates y humanos.

En EE.UU., un estudio de frecuencia realizado mediante encuestas aplicadas a quince veterinarios, siete instituciones de investigación biomédica y cuatro laboratorios que trabajan con PNH, reportó *Shigella flexneri* resistente a eritromicina (87.5%), doxiciclina (73.7%) y tetraciclina (38.3%); *Yersinia enterocolitica* resistente a ampicilina (100%) y cefazolina (93.6%); y *Campylobacter jejuni* resistente a meticilina (99.5 %) y cefalotina (97.5 %) (Kim *et al*, 2017). Y recientemente, un estudio realizado en orangutanes (*Pongo* spp.) que viven en cautiverio en un zoológico de Wisconsin, informó de una cepa de *E. coli* ST6448/B1 productora de CTX-M-55 (Smith *et al*., 2024).

2.3.3. Reportes en Perú

El Perú tiene una abundante biodiversidad de mamíferos silvestres, entre los que se incluyen a los PNH (Pacheco *et al*., 2021). Actualmente se han reportado 55 taxones de primates, incluyendo todas las especies y subespecies, clasificados en cinco familias: Aotidae, Atelidae, Callitrichidae, Cebidae y Pitheciidae (Shanee *et al*., 2023). Un tercio de ellos están categorizados como amenazados por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, siglas en inglés) (Shanee *et al*., 2023); sin embargo, los estudios de vigilancia de la RAM en estos primates son escasos.

Hasta la fecha solo se han publicado dos estudios fenotípicos; el primero fue realizado en el 2017 y reportó la presencia de enterobacterias MDR resistentes a cefalotina (46.2%), amoxicilina con ácido clavulánico (31.1%), tobramicina (30.2%) y tetraciclina (24.5%) en una especie de mono tocón (*Callicebus oenanthe*), dos especies de monos arañas (*Ateles belzebuth* y *Ateles chamek*) y dos especies de monos choros (*Lagothrix cana* y *Lagothrix lagothricha*) mantenidos en semicautiverio en un centro de

rescate de Loreto y San Martín, siendo *E. coli* la enterobacteria que se aisló con mayor frecuencia (Medina *et al*., 2017).

El segundo estudio fue publicado recientemente y reportó 35.7% de enterobacterias productoras de BLEE: 25% de *E. coli*, 7.1% de *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* y 3.5% de infecciones mixtas, en especímenes de huapo colorado (*Cacajau calvus*), mono araña (*Ateles belzebuth*), mono choro (*Lagothrix lagothricha*), mono tocón (*Callicebus oenanthe*) y huapo negro (*Pithecia* sp.) mantenidos en semicautiverio en dos centros de rescate en Maynas, Loreto (Huillca, 2021). Sin embargo, en ninguno de los dos estudios se identificaron los ARGs asociados a los perfiles fenotípicos de resistencia observados.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de estudio

El estudio se llevó a cabo en el noreste de la Amazonía Peruana (Figura 3a), dentro de la región de Loreto (Figura 3b), en los bosques tropicales de la concesión de las islas Iquitos, Muyuy y Padre Isla, de la Cuenca Amazónica Peruana (Figura 3c), otorgada a la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM) por el Gobierno Regional de Loreto, mediante resolución ejecutiva directoral N° 006-2016-GRL-GGR-ARA-DEFFS-DER, como área de manejo evaluativo y extractivo.

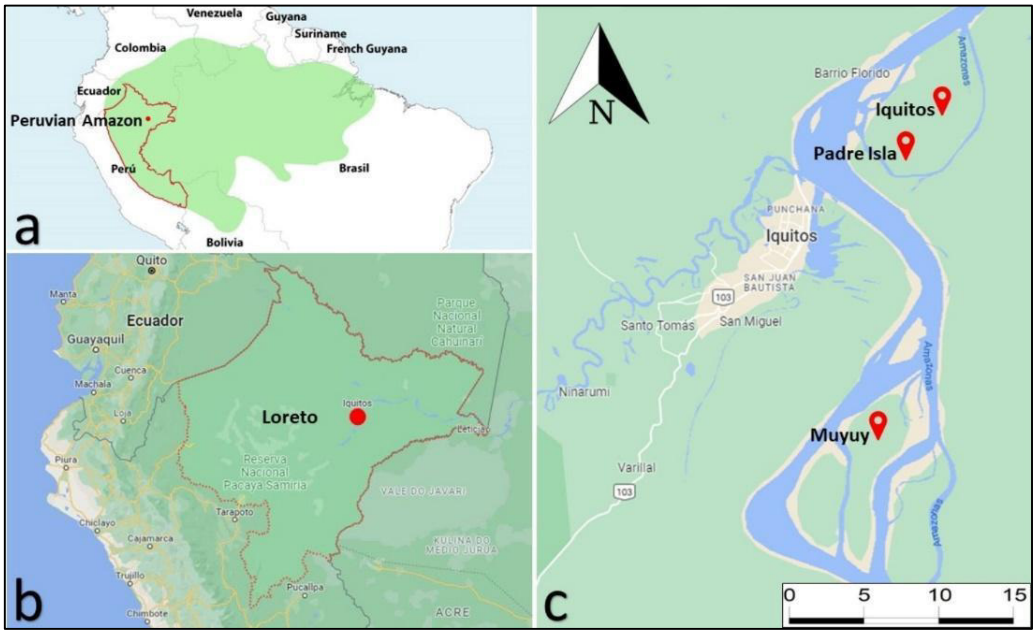

Figura 3: Localización geográfica de los lugares de colecta de muestras de PNH (a) El punto rojo indica la localización del lugar de estudio dentro de la Amazonía Peruana **(b)** El Punto rojo indica la localización dentro de la Región Loreto **(c)** Los puntos rojos indican la localización de las Islas Iquitos, Muyuy y Padre Isla (Elaborado con R v.2.3).

La concesión se encuentra bajo la administración del Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura-Iquitos (IVITA-Iquitos), que pertenece a la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM (FMV-UNMSM). El periodo de estudio estuvo comprendido entre los meses de agosto del 2022 y agosto del 2023.

3.1.1. Isla Iquitos

Se encuentra ubicado entre las coordenadas 18S 703095 9591767, aproximadamente a 15 km al noreste de la ciudad de Iquitos, en el distrito de Belén, provincia de Maynas, región Loreto. Cuenta con una superficie total aproximada de 52.74 km^2 (Figura 4), conformado principalmente por bosque de tipo no inundable, y presenta ocho caseríos: Caro Cocha, Isla de Iquitos, Padre Cocha, Progreso, San Pedro, Santa Cruz, Santa María (Zona I y Zona II) y Santa Zulema. En esta isla se han reportado monos ardilla (*Saimiri boliviensis*) durante las expediciones iniciales de los investigadores del Proyecto Peruano de Primatología (PPP) (Soini, 1990).

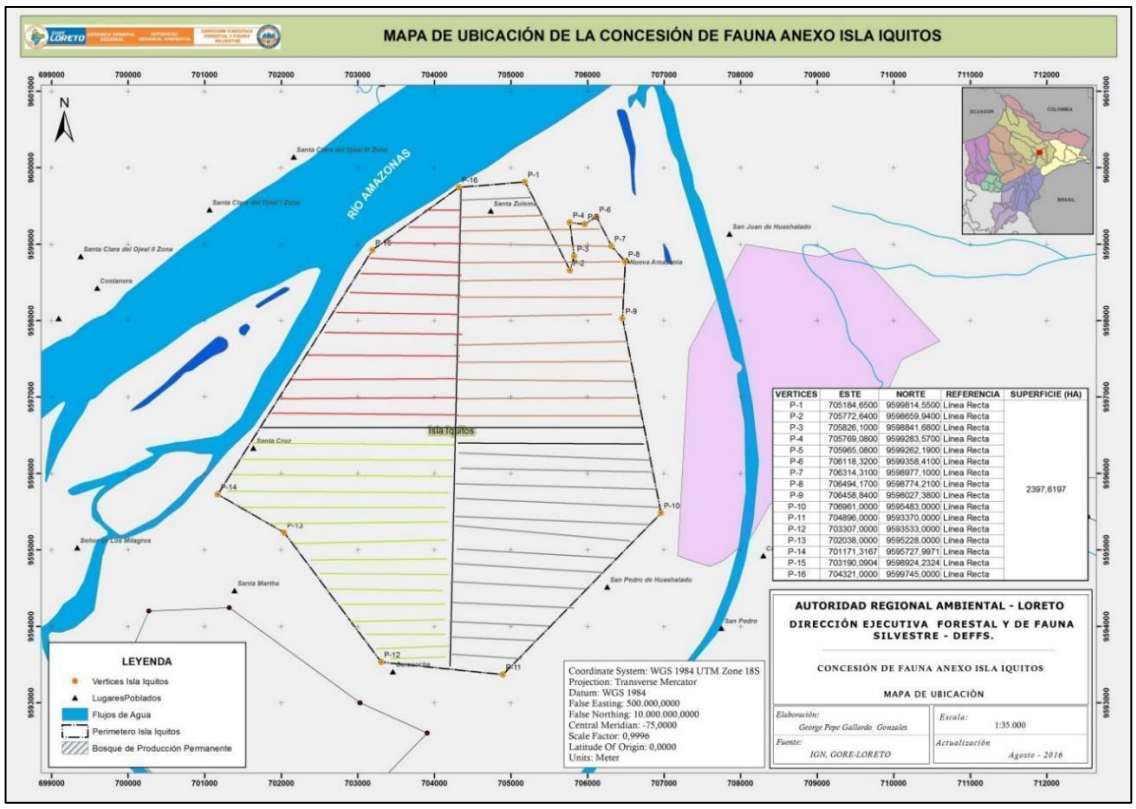

Figura 4: Mapa de la concesión de la Isla Iquitos (Tomado del GORE-Loreto)

3.1.2. Isla Muyuy

Se encuentra entre las coordenadas 18S 703612 9576684, a 18 km al suroeste de la ciudad de Iquitos, en el distrito de Fernando Lores, provincia de Maynas, departamento de Loreto. Tiene una superficie aproximada de 44km^2 (Figura 5), conformado en su totalidad por bosque de tipo inundable estacional o bajial, y presenta ocho caseríos: Nueva Amazonía, Pihuicho Isla, Palestina, Timareo, Timareo 1ra. Zona, Timareo 2da. Zona, Timareo 3ra. Zona y Santa Ana de Muyuy. En esta isla se encuentran especímenes de pichico pecho anaranjado (*Saguinus labiatus*), especie alóctona introducida en 1988 por investigadores del PPP (Ique y Aquino, 2015).

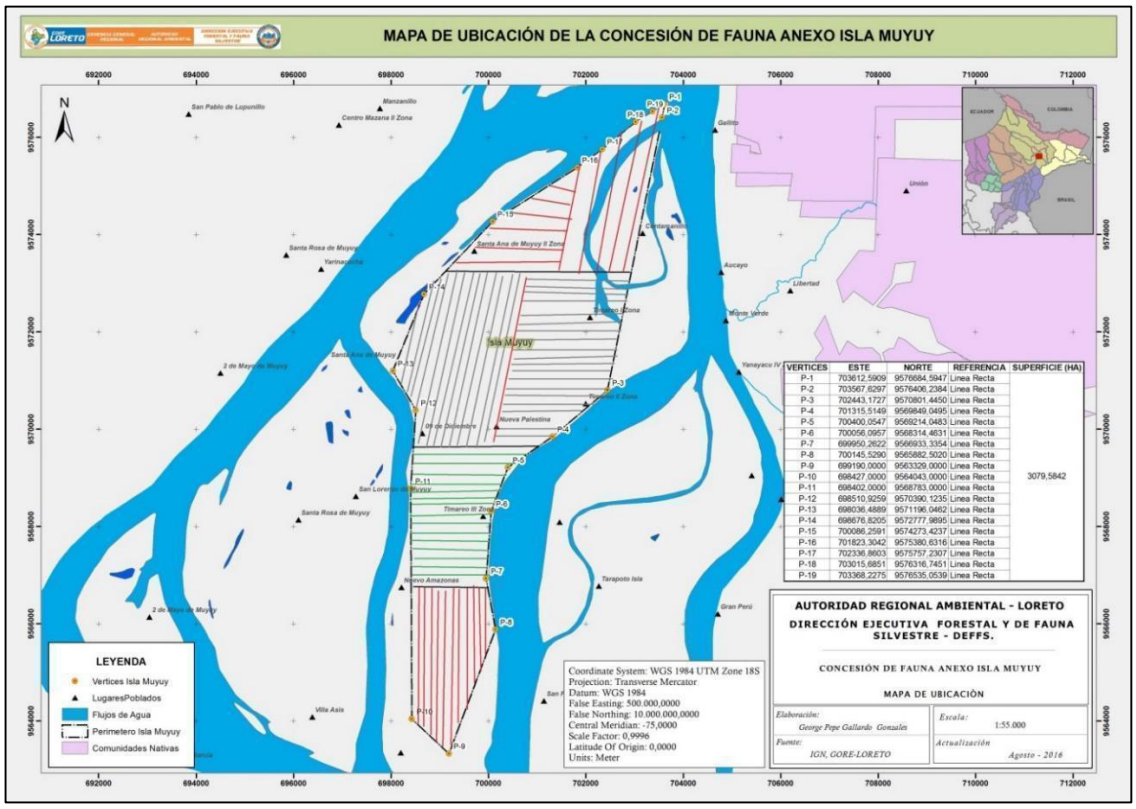

Figura 5: Mapa de la concesión de la Isla Muyuy (Tomado del GORE-Loreto)

3.1.3. Padre Isla

Se encuentra entre las coordenadas 18S 705184 9599814, a 8.5 km al noreste de la ciudad de Iquitos, en el distrito de Belén, provincia de Maynas, departamento de Loreto. Cuenta con una superficie total de 15 km^2 (Figura 6), conformado por bajiales, y presenta dos caseríos: Dos de Mayo y Padre Isla. En esta isla se encuentra especímenes de pichico barba blanca (*Saguinus mystax*), que fueron introducidos entre 1977 y 1980 por los mismos investigadores (Ique y Aquino, 2015).

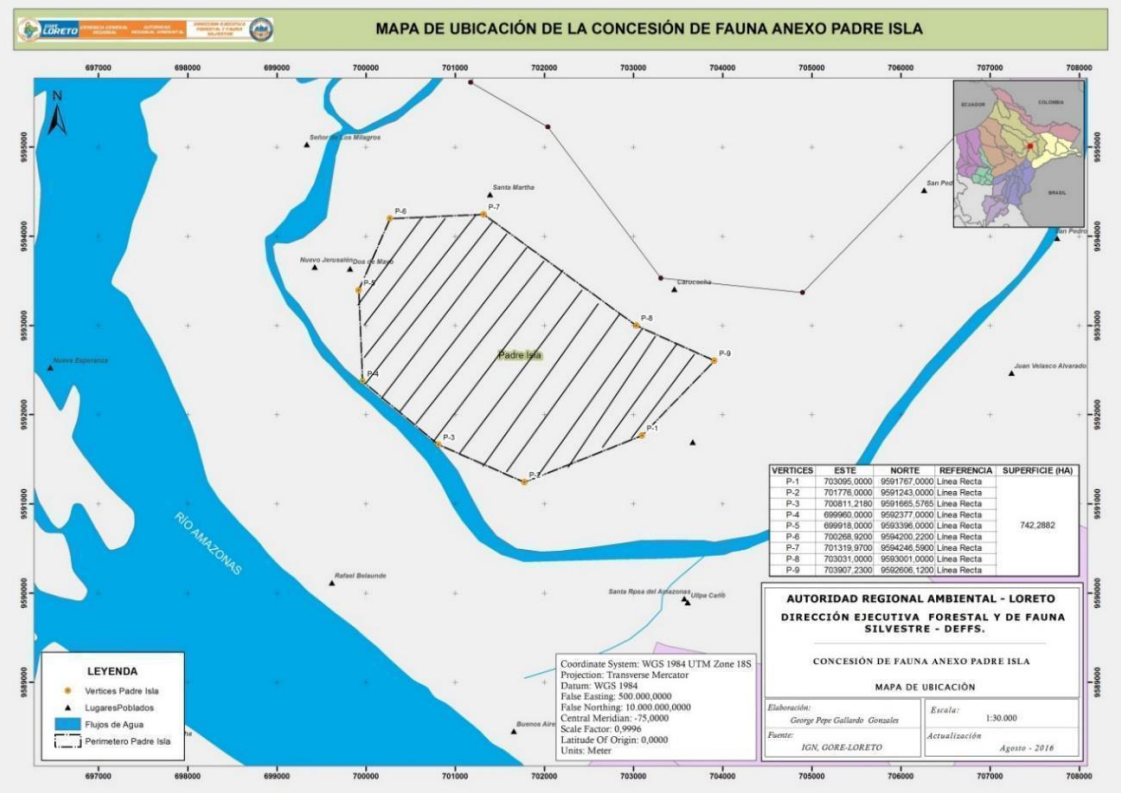

Figura 6: Mapa de la concesión de Padre Isla (Tomado del GORE-Loreto)

3.2. Cálculo del tamaño de muestra

Para determinar el tamaño de la muestra se empleó la fórmula para poblaciones finitas descrita por Daniel y Cross (2018), a través del entorno estadístico R v.2.3 mediante el software RStudio (R core team, 2023).

$$n = \frac{Z^2.N.p.q}{d^2(N-1) + Z^2.p.q}$$

Donde:

$n =$ número de muestra.

$Z =$ valor del intervalo de confianza.

$N =$ población.

$p =$ prevalencia histórica o referencial.

$q =$ diferencia de proporción con respecto a p.

$d =$ error absoluto permitido.

La población total de PNH se determinó mediante la suma de los promedios de los últimos 10 censos anuales realizados en cada isla a través del método de transecto lineal, durante el periodo comprendido desde el año 2007 al 2016 (C. Ique, datos no publicados). No se tomó en cuenta el periodo comprendido desde el 2017 al 2021 debido a que no se obtuvieron los registros de censos realizados durante esos años.

La prevalencia referencial estimada fue del 25%, en concordancia con el reporte publicado por Huillca *et al.* (2021). El nivel de confianza empleado fue 90% ($Z_{\alpha/2}$= 1.645) y el error absoluto permitido fue 10%, obteniendo un tamaño de 50 especímenes de PNH para el área total del estudio.

Debido a que la proporción de la población de PNH es diferente en cada isla, se procedió a realizar un muestreo aleatorio estratificado para obtener la proporción de muestra de cada una de las islas, empleando la siguiente fórmula:

$$n_1 = \frac{N_1}{N} n$$

Donde:

n_1 = número de muestra del estrato.

N_1 = población del estrato.

n = número de muestra total.

N = población total.

Finalmente se obtuvo como tamaño de muestra, al menos 17 especímenes de monos ardillas (*Saimiri boliviensis*) para la Isla Iquitos, 13 pichicos pecho anaranjado (*Saguinus labiatus*) para la Isla Muyuy y 20 pichicos barba blanca (*Saguinus mystax*) para Padre Isla, logrando obtener y analizar en el estudio una muestra de 25, 21 y 23 PNH para la Isla Iquitos, Muyuy y Padre Isla respectivamente, previa autorización del Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre (SERFOR).

3.3. Consideraciones Éticas

El estudio contó con la autorización con fines de investigación científica de fauna silvestre fuera de áreas naturales protegidas otorgada por el SERFOR, mediante RD N° D000031-2022-MIDAGRI-SERFOR-DGGSPFFS-DGSPFS, y con la aprobación del Comité de Ética y Bienestar Animal de la FMV-UNMSM, mediante Constancia de Autorización Ética Nº 2022-10.

3.4. Toma de muestras fecales de PNH

Se empleó el protocolo de toma de muestras no invasivo descrito por Rolland *et al*. (1985), con algunas modificaciones. El personal del IVITA-Iquitos fue capacitado para seguir a los monos en el bosque y recolectar heces frescas, asegurándose de recoger una muestra por cada espécimen empleado en este estudio (Abdallah *et al*., 2022). El personal que participó en la toma de muestras empleó equipo de protección personal (mascarillas KN95, guantes descartables y mamelucos) durante todo el proceso.

Con la ayuda de una cuchara de plástico descartable previamente desinfectada con etanol al 70% (Hersil, Perú), se colectó de cinco a 10g de heces frescas recientemente excretadas, teniendo cuidado de no colectar la parte que hizo contacto directo con el suelo u otras superficies para minimizar el riesgo de contaminación de la muestra, tal como se describió anteriormente (Goldberg *et al*., 2008). Solo se tomaron muestras fecales que no fueran diarreicas ni pastosas de animales adultos.

Cada muestra se colocó de manera individual dentro de un frasco estéril sin medio de transporte (Samplix®, Muestreo y Análisis S.A.C., Perú), se rotuló con el código asignado al espécimen, y se almacenó en un "cooler" (Basa, Perú) con geles refrigerantes en su interior (Gelpack Tippic, Perú) a temperatura de refrigeración controlada (4°C) hasta su envío posterior (Abdallah *et al*., 2022).

Todas las muestras se embalaron y se enviaron dentro de las primeras 24 horas por vía aérea al Laboratorio de Biología y Genética Molecular de la FMV-UNMSM para realizar los análisis microbiológicos y moleculares, siguiendo el sistema de triple empaque, de acuerdo con los lineamientos recomendados por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA) para el traslado de muestras biológicas potencialmente peligrosas (OMSA, 2018).

3.5. Análisis Microbiológico

3.5.1. Aislamiento e identificación de *E. coli*

Las muestras fueron analizadas inmediatamente después de su recepción en el laboratorio empleando el protocolo descrito por Clayton *et al*. (2014) y Medina *et al*. (2017), con algunas modificaciones. Cada muestra se diluyó en un tubo estéril de 2mL (Eppendorf, Alemania) con solución fisiológica isotónica de Cloruro de Sodio (NaCl 0.9%) (B. Braun, Perú), hasta una proporción de 1:1, y se homogeneizó suavemente mediante un vórtex (Labnet, USA).

Con la ayuda de un ansa de siembra calibrada, se inoculó una parte de la dilución en una placa Petri con agar Mac Conkey (Sigma-Aldrich, Alemania), mediante la técnica de agotamiento por estrías, y se incubó a una temperatura de 37°C, durante un periodo de 18 a 24 horas y en condiciones de aerobiosis empleando una incubadora de laboratorio

(Incucell®55, MMM Group, Alemania) (Clayton *et al*., 2014). Al día siguiente, se identificaron y se seleccionaron entre una y cuatro colonias aisladas por muestra de acuerdo con sus características morfológicas: lactosa positivas, medianas, circulares o en forma de dona, de bordes regulares y rodeadas de una zona de precipitación de bilis de color rosáceo (Koneman y Allen, 2008).

Las colonias seleccionadas se resembraron en una placa Petri con agar Eosina-Azul de Metileno (EMB) (Merk, Alemania) mediante el mismo método, y se incubaron bajo las mismas condiciones (Clayton *et al*., 2014). Al día siguiente, se observaron las características morfológicas de las colonias y aquellas que eran redondas, medianas, con centro de color negro, y que presentaron una coloración verde metálica al ser observadas a trasluz se consideraron compatibles con *E. coli* (Koneman y Allen, 2008).

Finalmente, se realizó la confirmación de la especie mediante el uso de pruebas bioquímicas. Las colonias compatibles con *E. coli* se inocularon en los medios Citrato de Simons, Triple Azúcar-Hierro (TSI), Lisina-Hierro (LIA), Urea, Sulfuro-Indol-Motilidad (SIM) y en caldo Rojo de Metilo-Voges Proskauer (RM-VP), y se incubaron a 37°C durante 18 a 24 horas y en condiciones de aerobiosis (Medina *et al*., 2017).

Las colonias citrato-negativo, ureasa-negativo, rojo de metilo-positivo, fermentadora de glucosa, lactosa y sacarosa, lisina decarboxilasa positivo, sulfuro de hidrógeno negativo, indol y motilidad positivo fueron confirmadas como *E. coli* (Koneman y Allen, 2008). Los resultados obtenidos se registraron en una base de datos de Excel (Microsoft, USA) para ser analizados posteriormente (Anexo 1).

Adicionalmente, las colonias de *E. coli* que presentaron apariencia mucoide fueron sometidas a la prueba de la cuerda. Esta prueba consistió en inocular las cepas de apariencia mucoide en agar sangre (Merck, Alemania) con 5% de sangre de oveja, e incubarlas a 37°C en condiciones de aerobiosis durante la noche. Al día siguiente, con la ayuda de un ansa estéril se tomó una parte de la colonia aislada y se levantó suavemente para medir la distancia que generaba el filamento mucoide. Si la medida era mayor a 5mm se consideró como fenotipo hipermucoviscoso (HMV) (Fang *et al*., 2004).

3.5.2. Análisis fenotípico del perfil de resistencia

3.5.2.1. Detección del perfil de resistencia

Se determinó la sensibilidad antimicrobiana mediante el método de difusión en disco de Kirby-Bauer (Hudzicki, 2009), empleando discos de papel filtro de 6mm de diámetro impregnados con antibióticos (Oxoid™, Thermo Fisher Scientific, Reino Unido) frente a seis familias de antibióticos: tetraciclinas, aminoglucósidos, quinolonas, alcoholamidas, sulfonamidas y nitrofuranos, como se describió anteriormente (Zhu *et al*., 2021). Los resultados se interpretaron de acuerdo con los puntos de corte descritos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para determinar la susceptbilidad antimicrobiana de enterobacterales (CLSI, 2021).

En un tubo estéril de 2mL con NaCl 0.9% (B. Braun, Perú) se diluyó de tres a cinco colonias por muestra, hasta alcanzar una turbidez 0.5 en la escala estándar de McFarland. Empleando un hisopo estéril previamente embebido en la dilución, se inoculó en una placa de Agar Müller-Hinton (MH) (Oxoid; Thermo Fisher Scientific, Reino Unido), sembrándolo de manera uniforme a fin de obtener un crecimiento bacteriano a manera de césped (Hudzicki, 2009).

Sobre esta se colocaron los discos de antibióticos: Oxitetraciclina 30µg (OT), Trimetoprim/Sulfametoxazol 1.25/23.75µg (STX), Levofloxacino 5µg (LEV), Cloranfenicol 30µg (C), Gentamicina 10µg (CN) y Nitrofurantoína 300µg (F)., y se incubaron a 37°C durante 18h y en condiciones de aerobiosis en una incubadora de laboratorio (Hudzicki, 2009).

Finalmente se midieron los halos de inhibición y se registraron en una base de datos de Excel (Microsoft, USA) para ser analizados posteriormente. Si se observaron colonias dentro de los halos de inhibición, se resembró el aislado para confirmar que estaba puro y se repitió la prueba. No se tomaron en cuenta las colonias dentro de la zona de inhibición luego de confirmar que el aislado estaba puro, porque se consideraron mutantes resistentes al antibiótico empleado (CLSI, 2021).

3.5.2.2. Detección de *E. coli* productora de BLEE

El fenotipo BLEE de los aislados de *E. coli* fue determinado utilizando el método de difusión en disco de Kirby-Bauer (Hudzicki, 2009), y el método de Jarlier (Jarlier *et al*., 1988). Se emplearon discos de 6mm de diámetro impregnados con antibióticos betalactámicos específicos indicados para la detección de cepas productoras de BLEE, de acuerdo con los lineamientos del CLSI (CLSI, 2021).

3.5.2.2.1. Método de Kirby-Bauer

En un tubo estéril de 2mL de NaCl 0.9% (B. Braun, Perú) se diluyó de tres a cinco colonias por muestra, hasta 0.5 en la escala de McFarland. En una placa de Agar MH (Millipore, Thermo Fisher Scientific, Reino Unido), se sembró con un hisopo estéril previamente embebido, tal como se describió anteriormente, y sobre esta se colocaron cuatro discos de antibióticos (Oxoid™, Thermo Fisher Scientific, Reino Unido): Ceftazidima 30µg (CAZ), Ceftriaxona 30µg (CRO), Cefotaxima 30µg (CTX) y Aztreonam 30µg (ATM), empleados para la detección de BLEE (Jarlier *et al*., 1988).

Se incubó en las mismas condiciones y posteriormente se midieron los halos de inhibición y se registraron en una base de datos de Excel (Microsoft, USA) para ser analizados. Aquellos aislados de *E. coli* cuyos resultados evidenciaron un halo de inhibición con un diámetro menor o igual a 22mm para CAZ, 25mm para CRO, 27mm para CTX o 27mm para ATM, se consideraron como aislados sospechosos de BLEE, de acuerdo con los lineamientos del CLSI (Figura 7).

Si se observaron colonias dentro de los halos de inhibición, se resembró el aislado para confirmar que estaba puro y se repitió la prueba. No se tomaron en cuenta las colonias dentro de la zona de inhibición luego de confirmar que el aislado estaba puro, porque se consideraron mutantes resistentes al antibiótico empleado (CLSI, 2021).



Figura 7. Placa Petri con cepa de *E. coli* sospechosa de BLEE. Se observa una disminución de los halos de inhibición alrededor de los discos de antibióticos de ceftazidima (CAZ), cefotaxima (CTX), ceftriaxona (CRO) y aztreonam (ATM). Las colonias que se observan dentro de los halos de inhibición representan mutantes resistentes del aislado.

3.5.2.2.2. Método de Jarlier

Todos los aislados de *E. coli* que expresaron fenotipo BLEE fueron confirmados mediante el método de Jarlier (Jarlier *et al*., 1988). De manera breve, el aislado sospechoso de BLEE previamente mediante el método anterior, se diluyó en NaCl 0.9% estéril hasta una turbidez de 0.5 en la escala de Mc. Farland. Con la ayuda de un hisopo estéril previamente embebido en la dilución, se sembró en una placa Petri con Agar MH mediante la técnica descrita anteriormente.

Sobre esta se colocaron los discos de CAZ, CRO, CTX y ATM, a 25mm de un disco central de amoxicilina/ácido clavulánico 20/10µg (AMC), se incubó en las mismas condiciones, y posteriormente se interpretó el resultado de acuerdo con la forma del halo de inhibición alrededor del disco de AMC.

Si se observó un halo de inhibición distorsionado con forma de pez, corcho de champagne o huevo cocido, se tomó como evidencia del sinergismo entre el disco de antibiótico betalactámico probado y el ácido clavulánico, y de esta manera se confirmó la producción de BLEE (Figura 8).

Si se observaron colonias dentro de los halos de inhibición, se resembró el aislado para confirmar que estaba puro y se repitió la prueba. No se tomaron en cuenta las colonias dentro de la zona de inhibición luego de confirmar que el aislado estaba puro, porque se consideraron mutantes resistentes al antibiótico empleado (CLSI, 2021).

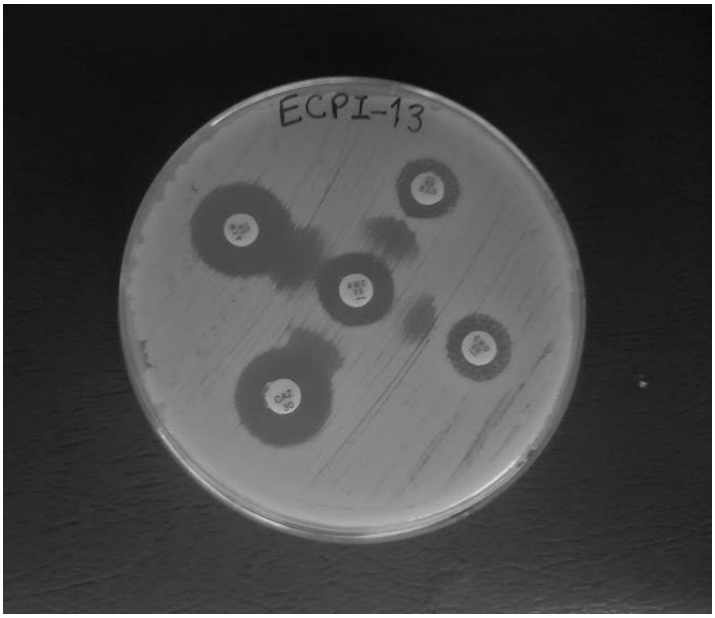

Figura 8. Placa Petri con aislado de *E. coli* fenotipo BLEE confirmado mediante el método de Jarlier. Se puede observar claramente el halo de inhibición distorsionado alrededor del disco de antibiótico de amoxicilina/ácido clavulánico (AMC) y los discos de ceftazidima (CAZ), ceftriaxona (CRO), cefotaxima (CTX) y aztreonam (ATM). Las colonias que se observan dentro de los halos de inhibición representan mutantes resistentes del aislado frente a la misma familia de antibiótico.

3.6. Análisis molecular

3.6.1. Extracción de ADN bacteriano

Se realizó la extracción del ADN bacteriano mediante un kit comercial basado en el método de columnas (Invitrogen™ PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, Thermo Fisher Scientific, USA) y de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Previamente, las cepas con fenotipo BLEE se inocularon en un tubo de 2mL estéril con 1mL de caldo Luria-Bertani (LB) y se incubaron a 37°C durante 18 horas.

Luego, se centrifugaron en una microcentrífuga (Hettich Mikro20, Hettich Lab, Alemania) a 10000 RPM durante 5 minutos a temperatura ambiente, se descartó el

sobrenadante, se agregó 180µL del *buffer* de digestión (PureLink® Genomic Digestion Buffer) y 20µL de proteinasa K (suplementado con el kit).

Seguidamente, se homogeneizó utilizando un vórtex, y se incubó en un bloque de calor (AccuBlock™ Digital Dry Bath, Labnet International, USA) a 55°C durante cuatro horas. Se agregó 20µL de RNAsa A, 200µL de *buffer* de lisis y unión (Lisis/binding Buffer) y 200µL de etanol absoluto grado molecular, se homogeneizó mediante vórtex y se transfirió la mezcla a la columna.

Se centrifugó a 10000 RPM por un minuto, se trasladó la columna a un nuevo tubo colector y se realizó el primer lavado con 500µL del *buffer* de lavado 1. Se centrifugó bajo las mismas condiciones y se realizó el segundo lavado con 500 µL del *buffer* de lavado 2. Se centrifugó a 13000 RPM durante 3 minutos y se añadió 50µL del *buffer* de elusión. Finalmente se centrifugó a 13000 RPM por 2 minutos y se almacenó en una congeladora (Biobase, China) a -20°C hasta su procesamiento posterior.

3.6.2. Cuantificación de ADN bacteriano

El ADN extraído se cuantificó mediante el fluorómetro Qubit (Invitrogen™ Qubit™ 3 Fluorometer, Thermo Fisher Scientific, USA), empleado un kit comercial basado en el método de fluorimetría, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Previamente, se preparó la solución de trabajo para los estándares y las muestras calculando 199 µL de buffer Qubit dsDNA HS más 1µL del colorante (tubo azul, dye) por muestra (volumen total es de 200 µL). En tubos Qubit o Axigen se dispensaron 190µL de la solución por cada uno de los estándares, y 199 µL de la solución por cada una de las muestras. Finalmente se realizó la lectura en el Qubit.

3.6.3. Secuenciamiento del genoma completo (WGS)

Se empleó la plataforma Miseq de Illumina (MiSeq™ System, Illumina, USA) (Ravi *et al*., 2018). Para ello, una vez obtenido el ADN bacteriano de los aislados de *E. coli* productoras de BLEE, se procedió a la preparación de las librerías usando el kit Illumina Nextera® XT DNA Sample Preparation Kit, de acuerdo con el protocolo de secuenciamiento descrito por el fabricante, el cual consiste en realizar la fragmentación

del ADN, ligación con adaptadores y oligos (códigos de barra para diferenciar cada muestra), seguido de purificación usando *beads* magnéticos.

La pureza y concentración del ADN fueron cuantificados mediante el fluorómetro Qubit® 3.0 (Invitrogen™ Qubit™ 3 Fluorometer, Life technologies, Thermo Fisher Scientific, USA). Una vez purificada las librerías de ADN bacteriano, se colocaron en un cartucho de secuenciamiento MiSeq Reagent Kit v3 (600 ciclos) con lecturas de 2 x 250 pb de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y colocado en la plataforma Illumina Miseq (Illumina, San Diego, CA, USA).

3.6.4. Análisis Bioinformático

Los archivos de salida (*outputs*) obtenidos, fueron evaluados mediante el programa FastQC (Babraham Institute, Bioinformatics) (Andrews, 2010); para garantizar la calidad de los datos, los *reads* y bases de mala calidad fueron removidos usando el programa Trimmomatic (Bolger *et al*., 2014). Posteriormente, los *reads* limpios se enviaron a la base de datos de la plataforma *Enterobase* para su ensamblaje y análisis.

El tipo de secuencia multilocus (MLST) (Maiden *et al*., 1998), el tipo de Clermont (Beghain *et al*., 2018), el agrupamiento jerárquico de agrupaciones MLST del genoma central (HierCC) (Zhou *et al*., 2021) y las estadísticas de serotipos se recuperaron de la plataforma *Enterobase* (Zhou *et al*., 2020).

Los ARGs se identificaron empleando la base de datos AMRFinderPlus (Feldgarden *et al*., 2021) dentro del proceso abriTAMR versión 1.0.14, aplicando un límite de identidad del 90% y un límite de cobertura del 90% (Sherry *et al*., 2023). Además, se generaron cifras de comparación de grupos de genes utilizando Clinker versión 0.0.27 (Gilchrist y Chooi, 2021).

El análisis filogenómico de los genomas obtenidos en este estudio y de las secuencias genéticamente relacionadas depositadas en Enterobase se realizó según el esquema HierCC HC50 y MLST. La alineación del núcleo se realizó con Snippy versión 4.6.0.1 (Seemann, 2015). Se empleó Gubbins para detectar y eliminar regiones recombinantes (Croucher *et al*., 2015).

La reconstrucción filogenética de máxima probabilidad se llevó a cabo utilizando IQ–TREE versión 2.0 con el modelo GTR + G + I y 1000 réplicas de arranque (Minh *et al*., 2020). El árbol resultante se visualizó utilizando el paquete ggtree (Yu *et al*., 2017) en el entorno R versión 4.3 (R Core Team, 2023). Además, la distancia de SNPs por pares entre genomas, derivada de la alineación del genoma central de recombinación libre, se calculó utilizando SNP–dists versión 0.6 (https://github.com/tseemann/snp-dists).

3.7.Análisis de la Información

3.7.1. Cálculo de la frecuencia de animales positivos

La frecuencia de animales portadores de cepas de *E. coli* y *E. coli* productora de BLEE, así como su perfil de resistencia, se determinaron en base a la fórmula descrita por Daniel y Cros (2013), mediante el lenguaje de programación R v4.2.0, a través del programa RStudio v2022.02.2-485:

$$\boldsymbol{P = \frac{N°\ positivos\ x\ 100}{n}}$$

Donde:

$\boldsymbol{P}$ = Frecuencia de animales positivos

$\boldsymbol{n}$ = Tamaño muestral

3.7.2. Cálculo del intervalo de confianza

El intervalo de confianza al 90% de cada frecuencia observada se determinó en base a la fórmula descrita por Daniel y Cros (2013), empleando la función "prop.test" del lenguaje de programación R v4.2.0 a través del programa RStudio v2022.02.2-485:

$$\boldsymbol{IC = P \pm \sqrt[z]{pq/n}}$$

Donde:

$\boldsymbol{P}$ = Frecuencia de animales positivos

$\boldsymbol{q}$ = 1 – p

$\boldsymbol{z}$ = Valor de z para el nivel de confianza (90%)

$\boldsymbol{n}$ = Tamaño muestral

IV. RESULTADOS

4.1. Frecuencia de *E. coli* y *E. coli* productora de BLEE

Se colectaron 69 muestras fecales de PNH mantenidos en semicautiverio en las islas Iquitos, Muyuy y Padre Isla, de la Cuenca Amazónica Peruana. El 50.72% (35/69) de estos primates fueron portadores de *E. coli*, y el 4.35% (3/69) fueron portadores de *E. coli* productora de BLEE. Solo se detectó *E. coli* productora de BLEE en los PNH de las islas Muyuy y Padre Isla. En el Cuadro 2 se detalla la frecuencia de *E. coli* y *E. coli* productora BLEE de acuerdo con la especie del hospedero.

Cuadro 2. Frecuencia de *E. coli* y *E. coli* productoras de BLEE en PNH de las Islas Iquitos, Muyuy y Padre Isla (N=69)

	E. coli		***E. coli* productora de BLEE**	
Hospedero	**Positivo[4]**	**IC90%**	**Positivo**	**IC90%**
Saimiri boliviensis[1]	52.00 (13/25)	34.38 – 69.19	0 (0/25)	0.00 – 13.09
Saguinus labiatus[2]	33.33 (7/21)	17.36 – 53.61	4.76 (1/21)	0.33 – 22.02
Saguinus mystax[3]	65.22 (15/23)	45.95 – 80.88	8.69 (2/23)	1.87 – 25.89
Total	50.72 (35/69)	40.29 – 61.10	4.35 (3/69)	1.34 – 11.35

[1] Especímenes procedentes de la Isla Iquitos. [2] Especímenes procedentes de la Isla Muyuy. [3] Especímenes procedentes de Padre Isla. [4] La fracción entre paréntesis representa el número de animales infectados sobre el número de muestra del estrato.

4.2. Perfil de resistencia antimicrobiana

Se obtuvieron 55 aislados de *E. coli* a partir de las 69 muestras fecales de los PNH empleados en este estudio. El 5.45% (3/55) de los aislados fueron *E. coli* productora de BLEE. Un aislado (ECIM19), se obtuvo de un espécimen de *S. labiatus* procedente de la Isla Muyuy, y dos aislados (ECPI13 y ECPI21), de dos especímenes de *S. mystax* de Padre Isla. Todos los aislados que expresaron fenotipo BLEE fueron MDR, siendo el 100% (3/3) resistentes a oxitetraciclina, levofloxacina y trimetoprim/sulfametoxazol, y el 66.67% (2/3) a gentamicina y cloranfenicol. Además, el 33.33% (1/3) presentaron sensibilidad intermedia a gentamicina (figura 9).

También, se evaluó el perfil de resistencia de todos los aislados de *E. coli* frente seis familias de antibióticos, siendo el 56.36% (31/55) resistentes a oxitetraciclina, 45.45% (25/55) a trimetoprim/sulfametoxazol, 38.18% (21/55) a levofloxacino, 12.73% (7/55) a cloranfenicol, 9.09% (5/55) a cefotaxima, 7.27% (4/55) a gentamicina y ceftriaxona, 3.64% (2/55) a ceftazidima y 1.82% (1/55) a aztreonam. Además, el 5.45% (3/55) presentó sensibilidad intermedia a gentamicina, ceftazidima y aztreonam, 3.64% (2/55) a cloranfenicol y 1.82% (1/55) a levofloxacino y ceftriaxona (figura 9).

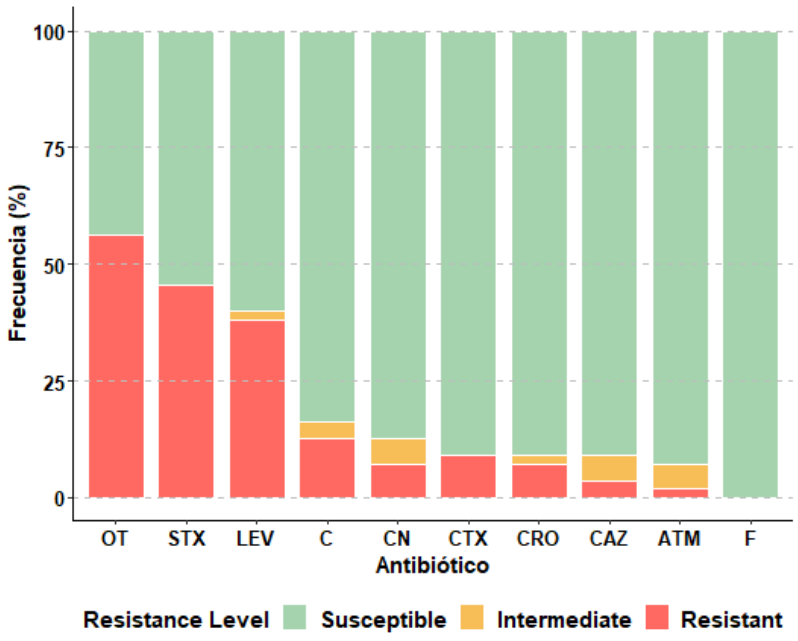

Figura 9. Perfil de resistencia de los aislados de *E. coli* de PNH (N=55) OT: Oxitetraciclina, STX: Trimetoprima/sulfametoxazol, LEV: Levofloxacino, C: cloranfenicol, CN: gentamicina, CTX: cefotaxima, CRO: ceftriaxona, CAZ: ceftazidima, ATM: aztreonam, F: nitrofurantoina.

4.3. Caracterización genómica de las cepas de *E. coli* productora de BLEE

Se realizó la secuenciación del genoma completo del aislado ECIM19 de *S. labiatus*, y de los aislados ECPI13 y ECPI21 de *S. mystax*. Las secuencias genómicas se depositaron en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI, USA) y están disponibles con el código de BioProyecto: PRJNA992559 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA992559/). El cuadro 3 describe las características principales de los genomas de los aislados ECIM19, ECPI13 y ECPI21.

Cuadro 3. Características de los genomas de los aislados de *E. coli* productora de BLEE de PNH de la Isla Muyuy y Padre Isla (N=3)

Cepa	Hospedero	Tamaño del genoma (pb)	Cobertura	N50[3]	%CG[4]
ECIM19	*Saguinus labiatus*[1]	4 796 816	121.9	130 967	50.78
ECPI13	*Saguinus mystax*[2]	4 785 694	119.1	172 736	50.8
ECPI21	*Saguinus mystax*[2]	5 043 680	129.9	104 770	50.73

[1] Espécimen procedente de la Isla Iquitos. [2] Espécimen procedente de la Isla Muyuy. [3] Estadístico N50. [4] Porcentaje de guanina y citocina

4.2.1. Identificación de ARGs

Se identificaron dos variantes de ARGs que están asociados con la producción de BLEE de tipo CTX-M. Los ARGs pertenecían a la familia *bla* $_{\text{CTX-M}}$: *bla* $_{\text{CTX-M-15}}$ y *bla* $_{\text{CTX-M-55}}$, que codifican las enzimas CTX-M-15 y CTX-M-55 respectivamente, y pertenecen al grupo CTX-M-1 (Yang *et al*., 2023). Los aislados ECIM19 y ECPI13, de *S. labiatus* y *S. mystax* respectivamente, fueron portadores de la variante *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$; mientras que el aislado ECPI21 de *S. mystax* portaba la variante *bla* $_{\text{CTX-M-55}}$. Además, se identificaron otros ARGs que estaban relacionados con sus perfiles fenotípicos MDR (Cuadro 4).

La secuencia genómica del aislado ECIM19 de *S. labiatus* portaba nueve ARGs adicionales: *dfr*A5, que confiere resistencia a trimetoprima; dos variantes *gyr*A, *par*C,

*par*E y *qnr*S1, que proporcionan resistencia a las quinolonas; *tet*(A), que brinda resistencia a las tetraciclinas; y *sul*2, que aportan resistencia a las sulfonamidas (Cuadro 4).

La secuencia genómica del aislado EPCI13 de *S. mystax* presentó 11 ARGs adicionales: *aph*(3")-Ib y *aph*(6)-Id, que confieren resistencia a los aminoglucósidos; $bla_{\text{TEM–1}}$, que proporcionan resistencia a los betalactámicos; *dfr*A5, que brinda resistencia a trimetoprima; dos variantes de *gyr*A, *par*C, *par*E y *qnr*S1, que aportan resistencia a las quinolonas; *tet*(A), que provee resistencia a las tetraciclinas; y *sul*2, que confiere resistencia a las sulfonamidas (Cuadro 4).

La secuencia genómica del aislado ECPI21 de *S. mystax* presentó 18 ARGs adicionales: *aph*(3')-IIa, *aph*(3")-Ib, *aph*(6)-Id y *aad*A1, que proporcionan resistencia a los aminoglucósidos; $bla_{\text{TEM-1}}$ y *ble*, que brindan resistencia a los betalactámicos; *cat*A1, que aporta resistencia al cloranfenicol; *dfr*A1, que provee resistencia a trimetoprima; *fos*A3, que confiere resistencia a la fosfomicina; *flo*R, que proporciona resistencia a florfenicol; dos variantes *gyr*A y *par*C, que brindan resistencia a las quinolonas, *sul*2 y *sul*3, que proveen resistencia a las sulfonamidas; y *tet*(A) y *tet*(B), que confieren resistencia a las tetraciclinas (Cuadro 4).

Cuadro 4. Características principales de los aislados de *E. coli* productora de BLEE de PNH de la Isla Muyuy y Padre Isla (N=3)

Cepa	Hospedero	Fenotipo	Perfil de resistencia	ARGs	MLST	Complejo ST	Esquema HierCC HC50	Serotipo	Filotipo (Clermont)
ECIM19	*Saguinus labiatus*[1]	BLEE, MDR	CTX, CRO, OT, SXT, LEV	*bla* $_{\text{CTX-M-15}}$, *bla* $_{\text{TEM-1}}$, *dfr*A5, *gyr*A_D87N, *gyr*A_S83L, *par*C_S80I, *par*E_L416F, *qnr*S1, *sul*2, *tet*(A)	ST10	ST10	37	O9:H9	A
ECPI13	*Saguinus mystax*[2]	BLEE, MDR	CTX, CRO, OT, SXT, LEV, CN	*aph*(3'')-Ib, *aph*(6)-Id, *bla* $_{\text{CTX-M-15}}$, *bla* $_{\text{TEM-1}}$, *dfr*A5, *gyr*A_D87N, *gyr*A_S83L, *par*C_S80I, *par*E_L416F, *qnr*S1, *sul*2, *tet*(A)	ST10	ST10	37	O9:H9	A
ECPI21	*Saguinus mystax*[2]	BLEE, MDR, HMV	CAZ, CTX, CRO, OT, SXT, LEV, CN, C	*aph*(3')-IIa, *aph*(3'')-Ib, *aph*(6)-Id, *aad*A1, *bla*$_{\text{CTX-M-55}}$, *bla*$_{\text{TEM-1}}$, *ble*, *cat*A1, *dfr*A1, *fos*A3, *flo*R, *gyr*A_D87N, *gyr*A_S83L, *par*C_A108V, *par*C_S80I, *sul*2, *sul*3, *tet*(A), *tet*(B)	ST12254	ST10	29176	O89:H4	A

[1] Especímenes procedentes de la Isla Iquitos. [2] Especímenes procedentes de la Isla Muyuy.

4.2.2. Contexto genético de los ARGs codificantes de BLEE

Los aislados ECIM19 y ECPI13, de *Saguinus labiatus* y *Saguinus mystax* respectivamente, fueron portadores de la variante *bla* $_{\text{CTX-M-15}}$ y se asociaron con la secuencia de inserción *ISEcp1* y la transposasa *tnpA* (Figura 10A). Por otro lado, la cepa ECPI21, aislada de *S. mystax*, fue portadora de *bla* $_{\text{CTX-M-55}}$ que estuvo asociado al gen *bla* $_{\text{TEM-1}}$. Lamentablemente, debido a las limitaciones en la metodología de secuenciación de lectura corta, no pudimos explorar la presencia de elementos genéticos móviles que rodean la variante *bla* $_{\text{CTX-M-55}}$ (Figura 10B).

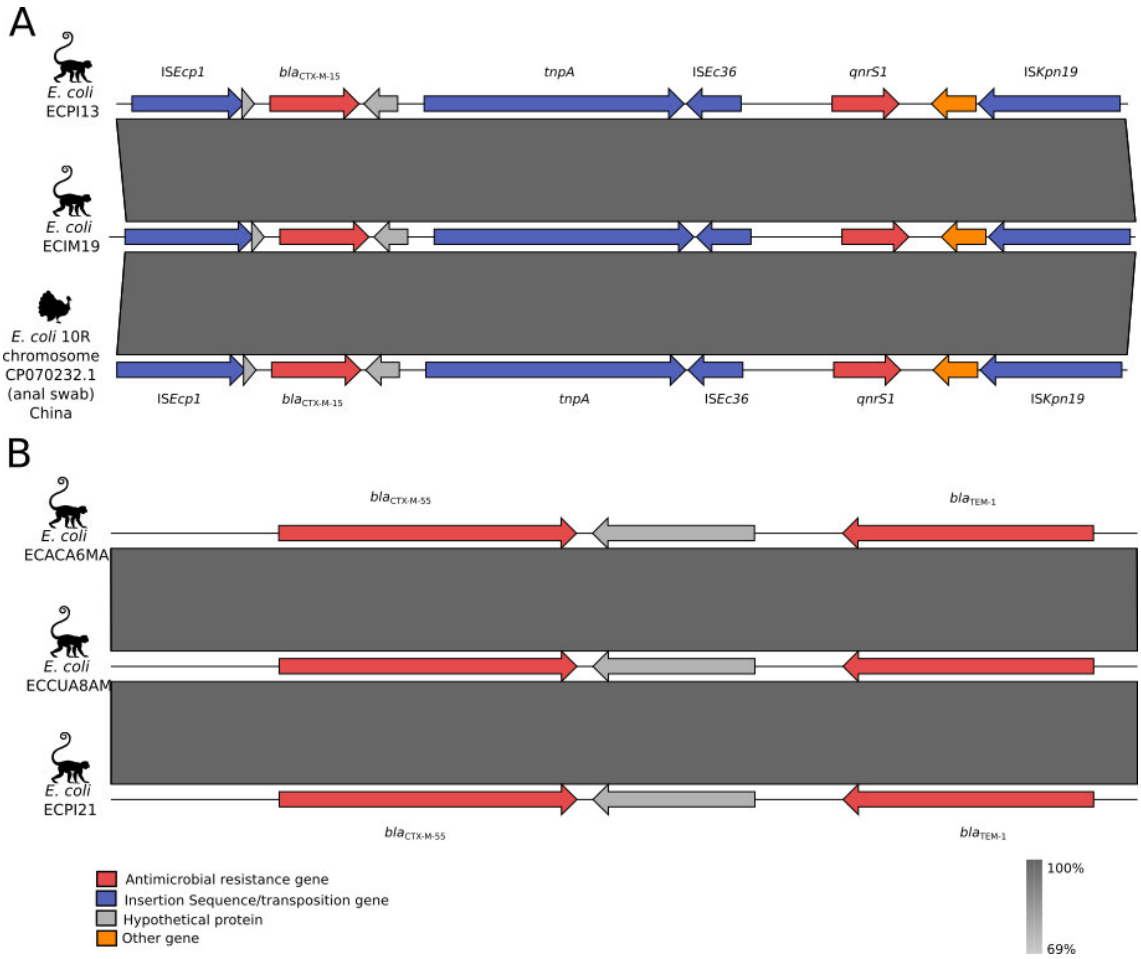

Figura 10. Contexto genético de los ARGs codificantes de BLEE de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE de PNH de la Isla Muyuy y Padre Isla (N=3) **A.** Contexto genético de los aislados ECIM19 y ECPI13, de *S. labiatus* y *S. mystax* respectivamente; las flechas de color rojo representan a ARGs, las flechas de color azul a secuencias de inserción, las flechas de color gris a proteínas hipotéticas y las flechas anaranjadas a otros genes. **B.** Contexto genético de la cepa ECPI21, aislada de *S. mystax*; las flechas de color rojo representan a ARGs y las flechas de color gris a proteínas hipotéticas.

4.2.3. Análisis filogenómico

El análisis filogenómico de los genomas de los aislados ECIM19 y ECPI13, de *S. labiatus* y *S. mystax* respectivamente, con las cepas del grupo HC50_37 (N=99) reveló una distancia de SNPs que oscila entre 0 y 519 SNPs. El 50.59% (58/99) de las cepas de este grupo albergaban ARGs de la familia *bla*$_{\text{CTX-M}}$, lo que indica la presencia de un sublinaje de alto riesgo de *E. coli* productora de CTX-M con una amplia distribución geográfica y de hospederos (Figura 11).

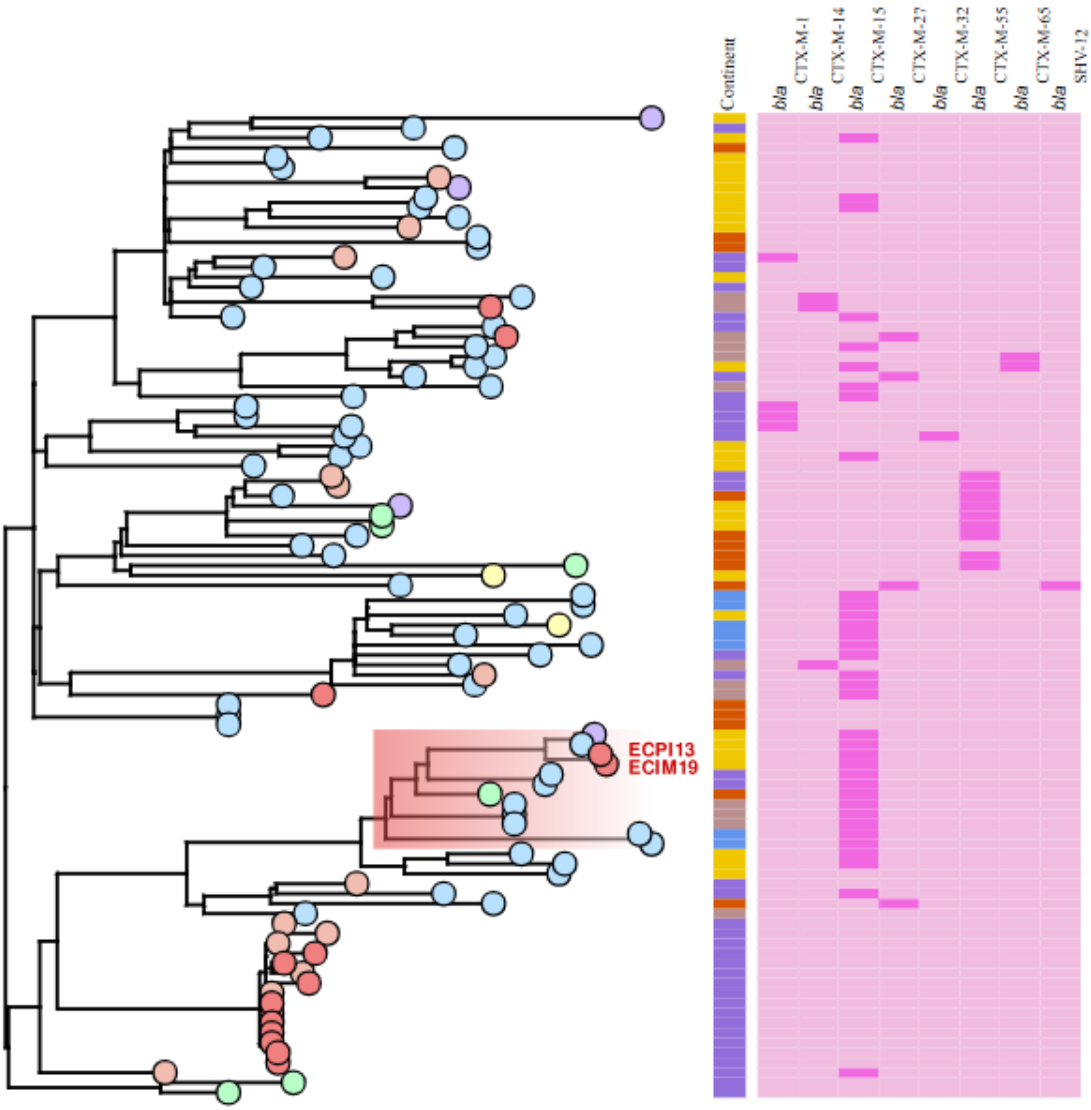

Figura 11. Árbol filogenético de *E. coli* ST10 productora de CTX-M-15 asociado a un mapa de presencia/ausencia de ARGs. El recuadro amarillo indica las cepas aisladas en América, el recuadro morado oscuro indica la presencia del ARG y el recuadro morado claro la ausencia de ARG. El círculo celeste corresponde a cepas humanas, el círculo morado a ganado, el círculo amarillo a pollos, circulo rojo a animales silvestres y circulo verde al medioambiente.

Todos los genomas del subclado resaltado en rojo, que incluye a los genomas de los aislados ECIM19 y ECPI13, contenían el gen *bla* $_{\text{CTX-M-15}}$ y otros ARGs como *qnrS*1 , *sul*2 y *tet*(A). Estos hallazgos proporcionan evidencia sólida de que una cepa clonal de *E. coli* productora de CTM-M-15 está diseminada ampliamente entre diferentes hospederos, incluyendo humanos y PNH, en lugares geográficamente separados de Sudamérica. La figura 12 muestra el árbol filogenético de las secuencias genómicas de estas cepas asociada a la presencia o ausencia de ARGs.

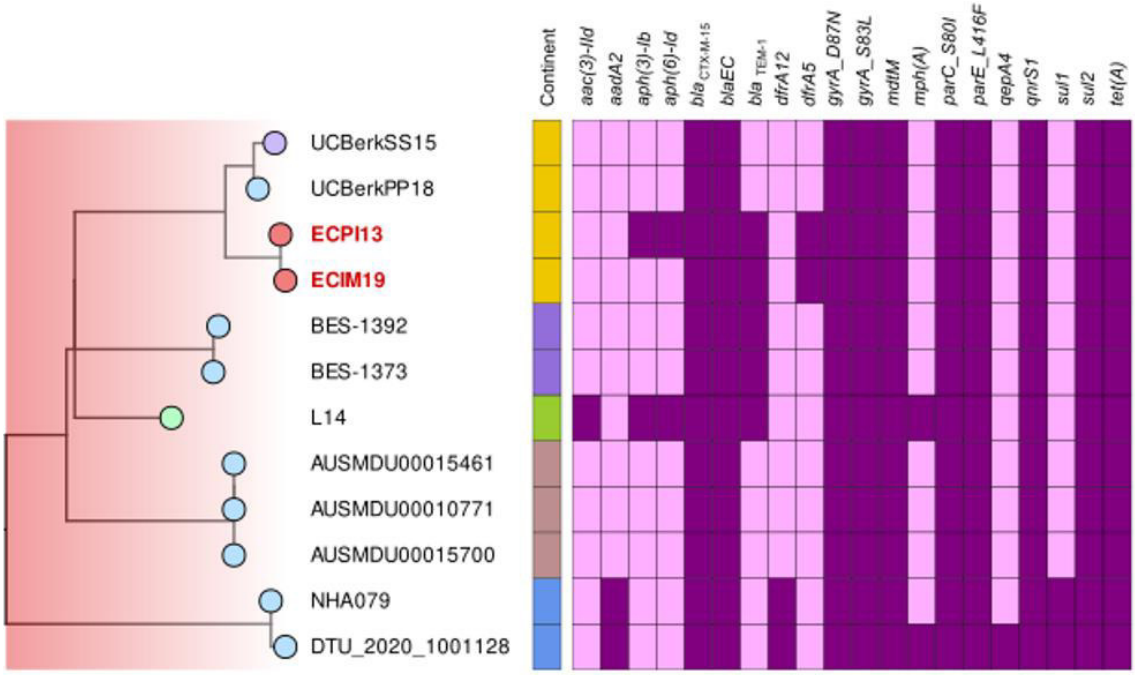

Figura 12. Árbol filogenético del subclado de los aislados ECIM19 y ECPI13 asociado a un mapa de presencia/ausencia de ARGs. El recuadro amarillo corresponde a las cepas aisladas en América. El recuadro morado oscuro corresponde a la presencia del ARG y el recuadro morado claro a la ausencia del ARG. El círculo celeste corresponde a cepas humanas, el círculo morado a ganado, el círculo rojo a animales silvestres y circulo verde al medioambiente.

Además, el análisis de SNPs reveló que las secuencias genómicas de los aislados ECIM19 y ECPI13 fueron notablemente similares, presentando tan solo un SNP de diferencia con respecto a su genoma central. Las secuencias genómicas de estos aislados también fueron muy similares a las secuencias genómicas de un aislado de humano y un aislado de perro reportados previamente en Quito, Ecuador (Amato *et al*., 2023), presentando un promedio de 16 y 19 SNPs de diferencia respectivamente. La figura 14 muestra el árbol filogenético de estas secuencias genómicas asociado a un mapa de calor de diferencia de SNPs (números en el mapa de calor), así como a los años que fueron reportados (números laterales).

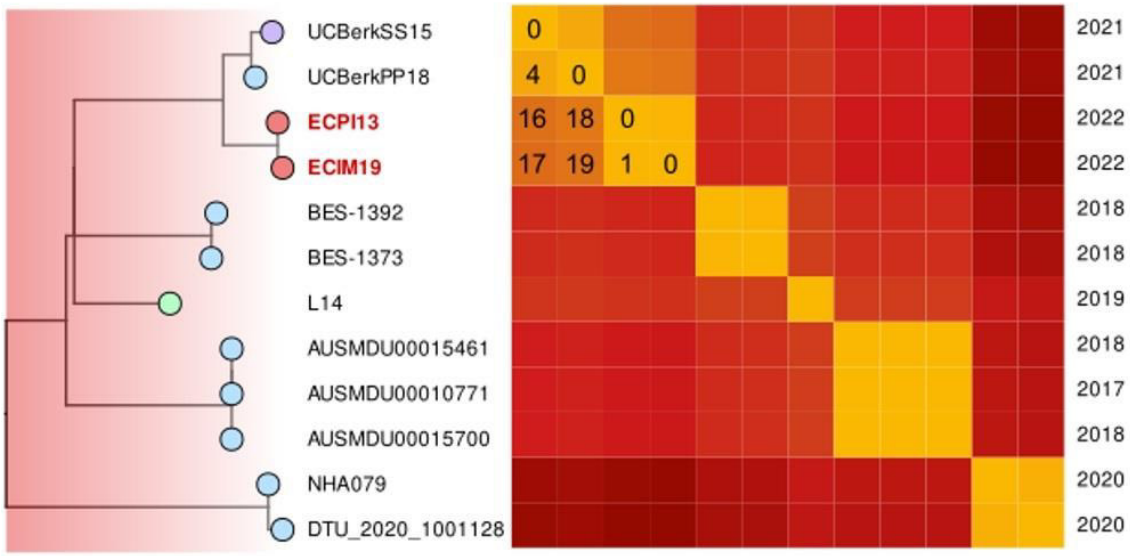

Figura 13. Árbol filogenético de las secuencias genómicas de las cepas ECIM19 y ECPI13 asociados a un mapa de calor de diferencia de SNPs. Los números dentro de los recuadros del mapa de calor representan el número de diferencia de SNPs, los recuadros amarillos representan una menor diferencia de SNPs y se van tornando rojos a medida que aumenta la diferencia de SNPs; los números laterales representan el año en que se reportó la cepa, de acuerdo con la información obtenida de la base de datos en la plataforma *Enterobase*. UCBerkSS15 y UCBerkPP18 representan las cepas de humano y perro respectivamente, reportadas en Quito, Ecuador, por Amato *et al*. (2023).

Por otro lado, el análisis filogenómico de la secuencia genómica de la cepa ECPI21, aislada de *S. mystax* de Padre Isla, reveló que se encontraba estrechamente relacionada con las secuencias genómicas de dos cepas aisladas de un perro y un cerdo en Quito, Ecuador, con una distancia de 94 y 96 SNPs respectivamente. Además, las cepas ecuatorianas también eran portadoras del gen *bla*$_{\text{CTX-M-55}}$. La figura 13 muestra el árbol filogenético de esta cepa asociada a la presencia o ausencia de los genes de la familia *bla*$_{\text{CTX-M}}$.

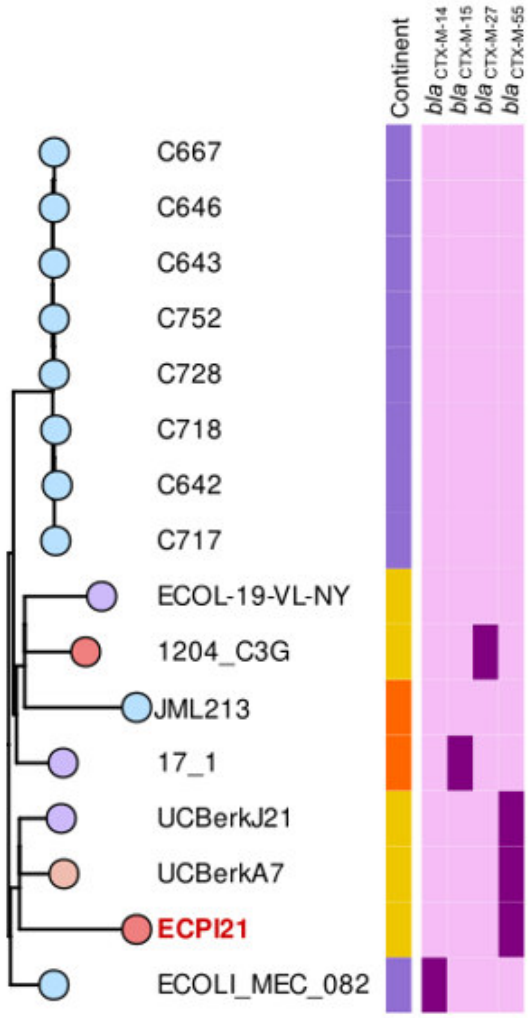

Figura 14. Árbol filogenético de la secuencia genómica de la cepa ECPI21 asociado a la presencia/ausencia de ARGs de la familia *bla*$_{\text{CTX-M}}$. El recuadro amarillo corresponde a las cepas aisladas en América. El recuadro morado corresponde a la presencia del ARG y el recuadro rosado a la ausencia del ARG. UCBerkSS15 y UCBerkPP18 representan las cepas de un perro y un cerdo reportadas previamente en Quito, Ecuador por Amato *et al*. (2023).

V. DISCUSION

5.1. Frecuencia de PNH portadores de *E. coli* productoras de BLEE

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que el 4.35% (3/69) de los PNH que viven en condiciones de semicautiverio en esta región de la Cuenca Amazónica Peruana son portadores de *E. coli* productora de BLEE. Sin embargo, solo se pudo demostrar su presencia en los primates que viven en los bosques tropicales que colindan con los centros poblados urbano-rurales de las islas Muyuy y Padre Isla. No obstante, aunque no se pudo confirmar que los primates de la Isla Iquitos también son portadores, no se descarta esta posibilidad.

Una posible causa que podría explicar este evento es el sesgo de muestreo debido a las características de la metodología empleada en la toma de muestra y al comportamiento evasivo que pueden presentar los primates cuando entran en contacto con el hombre en los bosques perturbados por una fuerte presencia de actividades antropogénicas y conflictos con el hombre (LaBarge *et al*., 2020), lo que puede haber ocasionado que se tomen muestras fecales de especímenes que no eran portadores, a pesar del esfuerzo por obtener una muestra representativa en cada una de las islas.

La vigilancia de patógenos en las poblaciones de animales silvestres implica detectar la presencia del agente patógeno y monitorizar su diseminación mediante el empleo de muestras probabilísticas; sin embargo, aunque a menudo se emplean técnicas de muestreos probabilísticos y distribuciones aleatorias como en este estudio, frecuentemente se colectan muestras de animales que se encuentran fácilmente disponibles (Nusser *et al*., 2008).

Otra posible causa podría ser la selección de aislados sensibles en el momento inicial del procesamiento de las muestras fecales, debido a que los medios de cultivos que se emplearon en este estudio no fueron suplementados con cefalosporinas de tercera generación. No obstante, existe evidencia de que el uso de medios de cultivo suplementados con antibióticos, como Agar MC con ceftriaxona, durante la etapa inicial del procesamiento de las muestras fecales que son empleadas en la vigilancia de la RAM, pueden favorecer el crecimiento de aislados resistentes e incrementar las posibilidades de obtener con éxito aislados productores de BLEE (Sano *et al*., 2023).

Cabe resaltar que, todas las muestras fecales se obtuvieron de primates que aparentemente no presentaron signos clínicos de enfermedad diarreica, lo que sugiere que estaban sanos en el momento de la toma de muestra y que podrían estar actuando como reservorios potenciales de cepas de *E. coli* productoras de BLEE (Kariuki *et al*., 2018). Un estudio previo realizado en PNH mantenidos en semicautiverio, en dos centros de rescate de fauna silvestre de la región de Loreto, detectó mediante métodos fenotípicos que al menos el 25% (7/28) de los primates eran portadores de aislados de *E. coli* productoras de BLEE, concluyendo que los PNH en semicautiverio en Loreto son reservorios de enterobacterias productoras de BLEE (Huillca, 2021).

Los hallazgos obtenidos en este estudio son menores en comparación con los hallazgos del estudio de Huillca (2021). Una causa que podría explicar esta diferencia es que los primates empleados en el estudio de Huillca (2021) provienen de centros de rescate que tienen áreas más reducidas en comparación con el área de la concesión de las islas del IVITA-Iquitos. Esto puede aumentar la densidad poblacional de PNH y promover la interacción entre ellos, a pesar de estar en semicautiverio, así como con turistas locales y extranjeros que visitan estos centros, lo que incrementa el riesgo de transmisión de patógenos (Moreno-Madriñan y Kontowicz, 2023).

Por otro lado, los PNH podrían estar actuando como diseminadores de *E. coli* productoras de BLEE en los bosques no perturbados dentro de la Amazonía Peruana. Estudios previos han demostrado que los primates son reservorios de bacterias resistentes (Rolland *et al*., 1985) y pueden actuar como diseminadores potenciales entre las poblaciones de primates que cohabitan con los humanos y las poblaciones naturales (Kariuki *et al*., 2018). Además, pueden desplazarse diariamente durante largas distancias

en búsqueda de nuevas fuentes de alimento (Garber, 1989) e interactuar con otras especies de primates simpátricos (Crandlemire-Sacco, 1988; Falótico *et al*., 2021) y mamíferos silvestres en sus entornos naturales (Fernández *et al*., 2017).

Adicionalmente, la mayoría de los callitrícidos, como *S. mystax* y *S. labiatus*, pueden vivir en bosques tropicales secundarios, adaptarse a bosques fragmentados, y persistir cerca de asentamientos humanos (Rylands, 1996), lo que puede promover el riesgo de contacto directo e indirecto con los humanos, mediante la caza de estas especies para ser utilizados como mascotas o carne de monte (Shanee *et al*., 2017), o a través del contacto accidental con sus heces (Heymann *et al*., 2022), y favorecer la trasmisión de bacterias resistentes a los antibióticos y sus ARGs dentro de la interfaz humano-animal-medio ambiente.

5.2. Identificación aislados de *E. coli* fenotipo BLEE, MDR y HMV

El 9.09% (5/55) de las cepas de *E. coli* aisladas en este estudio fueron detectadas como cepas sospechosas de BLEE, mediante el método de Kirby-Bauer. Sin embargo, solo el 5.45% (3/55) fueron confirmadas como cepas productoras de BLEE, mediante el método de Jarlier (Jarlier *et al*., 1988). Anteriormente, el estudio de Huillca (2021) confirmó, mediante el método de discos combinados, una frecuencia del 4.39% (9/205) de todos los aislados de *E. coli* que fueron detectadas previamente como productoras de BLEE mediante agar cromogénico. Por otro lado, un estudio realizado en humanos comparó cuatro pruebas fenotípicas empleadas como métodos confirmatorios para identificar cepas productoras de BLEE concluyendo que las pruebas confirmatorias son necesarias para descartar la presencia de falsos positivos (Lezameta *et al*., 2010).

Los falsos positivos que se observan en las pruebas fenotípicas de detección de BLEE pueden deberse a la expresión de genes que codifican betalactamasas resistentes a los inhibidores, como es el caso de los *AmpC*, que confieren resistencia frente a las penicilinas, cefalosporinas de tercera y cuarta generación, e inclusive, frente a carbapenémicos (Husna *et al*., 2023). Esto podría explicar por qué las cepas ECJ19M y ECJ31A, aisladas de dos ejemplares de *Saimiri boliviensis* de la isla Iquitos, que eran sospechosas de ser productoras de BLEE, fueron descartadas en la prueba confirmatoria cuando fueron desafiadas con el disco de AMC (Anexo 2).

Además, todas las cepas productoras de BLEE que fueron detectadas en este estudio (ECIM19, ECPI13 y ECPI21) expresaron fenotipo MDR, mostrando alta resistencia contra oxitetraciclina (56.36%), trimetoprima/sulfametoxazol (45.45%) y levofloxacino (38.18%). En 2017, un estudio realizado en PNH de un centro de rescate de fauna silvestre en Loreto y San Martin reportó la presencia de enterobacterias MDR que mostraron resistencia contra cefalotina (46.2%), amoxicilina/ácido clavulánico (31.1%), tobramicina (30.2%) y tetraciclina (24.5%), siendo *E. coli* la enterobacteria más frecuente (Medina *et al*., 2017). Aunque los perfiles de resistencia de las cepas de este estudio son diferentes al de las cepas del estudio de Medina *et al*. (2017), sugieren que las cepas MDR podrían estar diseminándose entre las poblaciones de PNH mantenidas en semicautiverio y probablemente dentro de sus entornos naturales.

Adicionalmente, la cepa ECPI21, aislada de *S. mystax* de Padre Isla, expresó el fenotipo HMV. Este fenotipo es poco común en *E. coli,* pero se ha observado frecuentemente en cepas hipervirulentas de *Klebsiella pneumoniae* (Walker y Miller, 2020). En humanos, ha sido reportado en infecciones graves asociadas con pielonefritis enfisematosa crónica (Bottone, 2010) y abscesos renales recurrentes (Benham *et al*., 2013) causados por *E. coli* uropatógena (UPEC). En PNH, recientemente se reportó el primer caso de infección por *Klebsiella pneumoniae* hipervirulenta ST23 serotipo K1 en un espécimen de mono aullador (*Alouatta clamitans*). El hecho de que el animal de este estudio provenga de la vida libre plantea la posibilidad de que esta cepa esté circulando en las poblaciones silvestres de PNH (Anzai *et al*., 2017).

Por otro lado, recientemente, un estudio de análisis genómico de una cepa de ExPEC HMV, asociada a un cuadro de bacteriemia recurrente, demostró que estaba estrechamente relacionadas con las cepas de *E. coli* patógena aviar (APEC), lo que plantea la hipótesis de un probable origen zoonótico (Neumann *et al*., 2022). Por lo tanto, la coexistencia de los fenotipos BLEE, MDR y HMV en esta cepa debería ser de preocupación importante para la salud pública debido al potencial incremento de la virulencia y la resistencia a los antibióticos.

5.3. Identificación de ARGs codificantes de BLEE

El análisis de las secuencias genómicas de los tres aislados de *E. coli* productora de BLEE reportados en este estudio confirmó la presencia de dos variantes de ARGs asociados a la producción de BLEE que pertenecen a la familia *bla* $_{\text{CTX-M}}$: *bla* $_{\text{CTX-M-15}}$ y *bla* $_{\text{CTX-M-55}}$, que codifican las enzimas CTX-M-15 y CTX-M-55 respectivamente, y que pertenecen al grupo de las CTX-M-1 (Castanheira *et al*., 2021). Esto resulta preocupante porque las cepas productoras de BLEE de la familia CTX-M se han diseminado rápidamente a nivel mundial (Bevan *et al*., 2017), siendo CTX-M-14, CTX-M-15 y CTX-M-55 las variantes más comunes (Yu *et al*., 2024); y se han asociado con infecciones hospitalarias y comunitarias (Pallecchi *et al*., 2004; Xia *et al*., 2014). Además, han sido reportadas en diferentes animales domésticos (Benavides *et al*., 2018; Bojesen *et al*., 2022) y silvestres, entre los que se incluyen a los PNH (Wang *et al*., 2012; Bachiri *et al*., 2017; Abdallah *et al*., 2022). Sin embargo, este es el primer reporte documentado de *E. coli* productora de CTX-M-15 y CTX-M-55 en primates de la Amazonía Peruana y de América del Sur.

La variante *bla* $_{\text{CTX-M-15}}$, que fue identificada en las cepas ECIM19 y ECPI13, aisladas de *S. labiatus* de la isla Muyuy y *S. mystax* de Padre Isla respectivamente, y que representa el 66.67% (2/3) de las cepas productoras de BLEE aisladas en este estudio, fue reportada por primera vez en el Perú y en Sudamérica en cepas comensales de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de niños de las localidades amazónicas de Yurimaguas y Moyobamba, en las regiones de Loreto y San Martín respectivamente (Pallecchi *et al*., 2004) y también se ha detectado en cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de animales domésticos (bovinos, porcinos) y vampiros comunes (*Desmodus rotundus*) de diferentes localidades de Lima (Benavides *et al*., 2018).

Por otro lado, la variante *bla* $_{\text{CTX-M-55}}$, que fue identificada en la cepa ECPI21 aislada de *S. mystax* de Padre Isla, y que representa el 33.33% (1/3) de las cepas de *E. coli* productora de BLEE aisladas en este estudio, también ha sido reportada previamente en cepas de *E. coli* productora de BLEE aisladas de perros provenientes de hogares rurales de Cajamarca (Medina-Pizzali *et al*., 2022), y en *E. coli* MDR portadoras del gen *mcr*-1 aisladas de cerdos de granjas tecnificadas de diferentes localidades de Lima (Luna *et al*., 2023).

5.4. Identificación del linaje pandémico de alto riesgo ST10

El análisis MLST de las cepas ECIM19 y ECPI13 reveló que ambas son clones que de la secuencia tipo 10 (ST10), un linaje pandémico de alto riesgo que en la actualidad se ha diseminado rápidamente entre humanos, animales domésticos y silvestres (Bastidas-Caldes *et al*., 2022), y en entornos contaminados por actividades antropogénicas en diferentes regiones de América del Sur (Lincopan *et al*., 2023), y que está asociado tanto a cepas comensales como patógenas MDR y productoras de BLEE (Díaz-Jiménez *et al*., 2020). Además, este es el primer reporte documentado de *E. coli* ST10 en primates de la Amazonía Peruana y de América del Sur.

En humanos, las cepas de *E. coli* ST10 se han asociado a ExPEC (Manges, 2019) MDR y productoras de CTX-M-15 provenientes de entornos hospitalarios y comunitarios de diferentes países, como España (Oteo *et al*., 2009), Nigeria (Aibinu *et al*., 2012), Egipto (Fam *et al*., 2011) y Países Bajos (Louka *et al*., 2021). También ha sido reportado en entornos contaminados por actividades antropogénicas relacionadas con la industria avícola y ganadera. Estudios recientes han reportado cepas de *E. coli* ST10 que portan el gen *mcr*-1, que confiere resistencia a la colistina, en aguas residuales provenientes de establos lecheros en Pakistan (Ali *et al*., 2021) y alrededores de granjas de patos en China (Liu *et al*., 2023).

En los animales domésticos, se ha reportado en cepas patógenas intestinales productoras de CTX-M-14 asociadas con cuadros de diarrea neonatal bovina en China (He *et al*., 2021), en cepas APEC asociadas con alta mortalidad en pollos de engorde de una granja en Dinamarca (Bojesen *et al*., 2022), y en cepas comensales MDR aisladas de cerdos procedentes de cinco granjas tecnificadas en Lima (Luna *et al*., 2023).

Por otro lado, en los animales silvestres, ha sido reportado en cepas productoras de CTX-M-15 aisladas de aves migratorias (Mohsin *et al*., 2017). Esto resulta preocupante debido a que estas especies podrían actuar como diseminadores de estos clones de alto riesgo. Un estudio reciente informó que las cepas aisladas de cuadros de diarrea neonatal reportados en China y de gaviotas australianas (*Chroicocephalus* spp.) están estrechamente relacionadas (He *et al*., 2021).

5.5. Diseminación de *E. coli* productora de CTX-M-15 y CTX-M-55 en América del Sur

El análisis de SNPs demostró una notable similitud entre los genomas de las cepas ECIM19 y ECPI13, presentando tan solo un SNP de diferencia en su genoma central, a pesar de haber sido aisladas de dos especies de primates diferentes que viven en islas que están ubicadas a más de 26.5km de distancia aproximadamente, lo que sugiere que existe una fuente común de transmisión. Además, estas secuencias genómicas también estaban estrechamente relacionadas con las secuencias dos cepas de *E. coli* productora de BLEE aislada de un niño y un perro en Quito, Ecuador (Amato *et al*., 2023), presentando tan solo 17 y 19 SNPs de distancia respectivamente, lo que refuerza la hipótesis de que las cepas productoras de BLEE halladas en los PNH que habitan en las islas de esta región de la Amazonía peruana provienen de la misma fuente de transmisión. Por otro lado, el análisis de SNPs de la cepa ECPI21 mostró que era muy similar a las secuencias de dos cepas ecuatorianas aisladas de un perro y un cerdo, con una distancia de SNPs de 94 y 96 SNPs respectivamente.

A nivel de la región de Loreto, tres estudios en humanos realizados en hospitales reportaron la presencia de aislados de *E. coli* productoras de BLEE provenientes de infecciones hospitalarias y comunitarias. El primer estudio, realizado en el Hospital Regional de Loreto, reportó que el 5.95% (178/2990) de los aislados obtenidos de muestras de sangre y orina fueron positivos a BLEE, de los cuales el 54.49% (97/178) fueron cepas de *E. coli* (Asayag, 2018). Al año siguiente, otro estudio realizado en el mismo hospital reportó que el 42.8% (129/301) de los cultivos de enterobacterias fueron positivos a BLEE (Sangama y Pereyra, 2018). Paralelamente, en el Hospital III de EsSalud-Iquitos, se reportó que el 37.73% (383/1015) de los cultivos bacterianos fueron positivos a BLEE, el 80% (308/383) de estos correspondieron a enterobacterias, de las cuales, el 66.88% (206/308) fueron cepas de *E. coli* (Manuyama, 2018).

Estos hallazgos sugieren que es probable que en esta región de la Amazonía Peruana se estén dando las condiciones adecuadas para que se produzca la transmisión comunitaria de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE entre humanos, y probablemente también se esté diseminando a los PNH. Lamentablemente, no se puede afirmar con certeza la direccionalidad de esta transmisión debido a que no se encuentran disponibles las

secuencias genómicas de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de humanos en la región de Loreto por otros autores, lo que dificulta los análisis filogenómicos con las cepas aisladas de PNH en este estudio. No obstante, la notable similitud que tienen los genomas de las cepas ECIM19 y ECPI13 con los genomas de las cepas aisladas en Quito, Ecuador, respaldan la hipótesis de una probable expansión clonal de cepas de *E. coli* ST10 productora de CTX-M-15 entre las poblaciones de PNH mantenidos en semicautiverio en esta región de la selva amazónica peruana y otros hospederos, incluyendo a los humanos y animales domésticos, en diferentes regiones de América del Sur (Bastidas-Caldes *et al*., 2022; Lincopan *et al*., 2023).

Aunque la fuente de esta expansión clonal sigue siendo desconocida, la explicación más plausible es la transmisión desde los humanos hacia los PNH. En humanos, existe evidencia de que la transmisión de la RAM está asociada con el movimiento de las poblaciones humanas, incluyendo los viajes internacionales (Abd El Ghany *et al*., 2020). Por otro lado, el crecimiento demográfico ocasiona el incremento de las actividades antropogénicas en los entornos naturales de los primates, lo que puede incrementar la interacción entre ambos hospederos aumentando la probabilidad de transmisión de bacterias potencialmente patógenas y sus ARGs (Swift *et al*., 2019).

La fragmentación de los bosques también puede favorecer el intercambio de patógenos entre humanos y PNH (Shanee *et al*., 2023). Un estudio prospectivo realizado en Uganda demostró que los aislados de *E. coli* de humanos que vivían cerca de bosques fragmentados eran 75% más similares a los aislados de los PNH que habitaban en esos bosques fragmentados que al de los aislados de los PNH de bosques no perturbados (Goldberg *et al*., 2008).

Además, el cambio del estilo de vida de los PNH silvestres a condiciones de cautiverio y semicautiverio también puede favorecer el intercambio de bacterias resistentes. Un estudio realizado mediante secuenciación del gen 16S rRNA en dos especies de primates concluyó que la condición de cautiverio hace que los primates pierdan su microbiota nativa y son colonizados por géneros dominantes del microbioma humano moderno (Clayton *et al*., 2016). Por otro lado, un estudio realizado en babuinos demostró que el resistoma de los microbiomas intestinales de babuinos mantenidos en

cautiverio fueron más similares a los microbiomas humanos, que a los de los babuinos silvestres (Tsukayama *et al*., 2018).

Otra probable causa podría estar relacionada con la presencia de especies sinantrópicas, como las aves y roedores, que podrían adquirir enterobacterias resistentes a antibióticos, como la *E. coli* productora de BLEE, en los entornos urbano-rurales, y volverse portadores. Un estudio reciente realizado en Brasil demostró que las palomas (*Columba livia*) y roedores (*Rattus rattus*, *Ratus norvegicus* y *Mus musculus*) que frecuentan entornos urbanos son portadores de cepas de *E. coli* ST10 MDR y productora de CTX-M-15 (Sano *et al*., 2023). Eventualmente, podrían volverse diseminadores de estas cepas al ingresar a los bosques cercanos.

Como alternativa, existe evidencia cada vez mayor de que la fragmentación de los bosques donde habitan PNH debido a las actividades antropogénicas pueden contaminar con bacterias resistentes a los antimicrobianos los ecosistemas terrestres y acuáticos de la Amazonía (Freitas *et al*., 2019; Lemos *et al*., 2021). Estos ecosistemas contaminados podrían servir como fuentes de bacterias resistentes que podrían colonizar las especies silvestres que habitan en estos ambientes, como los PNH.

5.6. Importancia de la vigilancia genómica de la RAM

Este es el primer estudio documentado que ha identificado la presencia de cepas de *E. coli* productora de BLEE, mediante el uso de técnicas microbiológicas y moleculares a la vez, en PNH que viven en condiciones de semicautiverio en los bosques tropicales que colindan con centros los poblados urbano-rurales en el noreste de la Amazonía Peruana. A diferencia de los estudios de Medina *et al*. (2017) y Huillca (2021), la implementación de las técnicas moleculares ha permitido realizar la caracterización de las cepas de *E. coli* MDR y productora de BLEE que están presentes en estos primates, y determinar la relación filogenética que tienen con las cepas aisladas de humanos y animales domésticos que fueron reportadas previamente en Quito, Ecuador (Amato *et al*., 2023), destacando la importancia de implementar las técnicas moleculares en los estudios de vigilancia activa de la RAM (Baker *et al*., 2023).

La estrecha relación filogenética de las cepas ECIM19 y ECPI13 con las cepas reportadas previamente en Quito (Amato *et al*., 2023), demuestran el impacto negativo

del hombre y de las actividades antropogénicas en la fauna silvestre amazónica, así como en sus entornos naturales (Domínguez *et al*., 2021). Esta situación resalta la necesidad de implementar con urgencia nuevos lineamientos para realizar la vigilancia genómica activa de la RAM en la fauna silvestre amazónica y en sus entornos naturales desde un enfoque "One Health" (Djordjevic *et al*., 2024), con la finalidad de monitorizar la dinámica de la RAM en los ecosistemas amazónicos, así como contribuir al conocimiento de la epidemiología de la RAM, y adoptar medidas que busquen minimizar el riesgo de transmisión de estas bacterias resistentes y sus ARGs en la interfaz humano-animal-medio ambiente en la Amazonía Peruana.

Finalmente, la transmisión de bacterias resistentes, tanto comensales como patógenas, y la diseminación de sus ARGs dentro de la interfaz humano-animal-medio ambiente pueden reducir la capacidad para prevenir y tratar las infecciones bacterianas (Larsson y Flach, 2022). Por lo tanto, resulta fundamental comprender los mecanismos moleculares que emplean estas bacterias para reconocer los patrones de la RAM y mejorar el uso de los medicamentos actuales, así como para diseñar nuevos compuestos antimicrobianos menos susceptibles al desarrollo de la resistencia y emplear nuevas estrategias para combatir la RAM (Darby *et al*., 2023).

VI. CONCLUSIONES

- El 4.35% (3/69) de los PNH que viven en condiciones de semicautiverio en esta región son portadores de *E. coli* productoras de BLEE.

- El 5.45% (3/55) de los aislados de *E. coli* de los PNH que viven en semicautiverio en esta región expresaron fenotipo BLEE y MDR.

- El 66.67% (2/3) de los aislados de *E. coli* productora de BLEE de PNH viven en semicautiverio en esta región son *E. coli* ST10 productora de CTX-M-15.

- El 33.33% (1/3) de los aislados de *E. coli* productora de BLEE de PNH viven en semicautiverio en esta región son *E. coli* productora de CTX-M-55.

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar el análisis filogenómico de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE de humanos que viven en esta región, y compararlas con las cepas productoras de BLEE de los PNH de este estudio para esclarecer si están relacionadas filogenéticamente.

- Continuar con la vigilancia genómica de la RAM en otras especies de animales simpátricos domésticos y silvestres, para comprender la dinámica de las enterobacterias productoras de BLEE en esta región.

- Evaluar los entornos en donde habitan estos PNH en busca de enterobacterias productoras de BLEE y analizarlos desde un enfoque One Health.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ***Abd El Ghany M, Fouz N, Hill-Cawthorne GA. 2020.*** Human Movement and Transmission of Antimicrobial-Resistant Bacteria. In: [place unknown]; p. 311–344.

2. ***Abdallah R, Kuete Yimagou E, Hadjadj L, Mediannikov O, Ibrahim A, Davoust B, Barciela A, Hernandez-Aguilar RA, Diatta G, Sokhna C, Raoult D, Rolain J-M, Baron SA. 2022.*** Population Diversity of Antibiotic Resistant Enterobacterales in Samples From Wildlife Origin in Senegal: Identification of a Multidrug Resistance Transposon Carrying *bla*$_{\text{CTX–M–15}}$ in *Escherichia coli*. Front Microbiol. 13. doi: 10.3389/fmicb.2022.838392. PMID: 35369484; PMCID: PMC8971907.

3. ***Abram K, Udaondo Z, Bleker C, Wanchai V, Wassenaar TM, Robeson MS, Ussery DW. 2021.*** Mash-based analyses of *Escherichia coli* genomes reveal 14 distinct phylogroups. Commun Biol. 4(1): 117. doi: 10.1038/s42003-020-01626-5.

4. ***Aibinu I, Odugbemi T, Koenig W, Ghebremedhin B. 2012.*** Sequence Type ST131 and ST10 Complex (ST617) predominant among CTX-M-15-producing *Escherichia coli* isolates from Nigeria* *This study has been partially presented during the 51st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) in Chicago, IL, September 2011. Clinical Microbiology and Infection. 18(3): E49–E51. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03730.x.

5. ***Alcedo K, Ruiz J, Ochoa TJ, Riveros M. 2022.*** High Prevalence of *bla* $_{\text{CTX-M}}$ in Fecal Commensal *Escherichia coli* from Healthy Children. Infect Chemother. 54(1): 59. doi: 10.3947/ic.2021.0102.

6. ***Ali A, Fontana H, Sano E, Li R, Humayon M, Rahman S, Lincopan N, Mohsin M. 2021.*** Genomic features of a high-risk *mcr*-1.1-positive *Escherichia coli* ST10 isolated from cattle farm environment. Environmental Science and Pollution Research. 28(38): 54147–54152. doi: 10.1007/s11356-021-15437-6.

7. ***Alvarez L, Carhuaricra D, Palomino-Farfan J, Calle S, Maturrano L, Siuce J. 2023.*** Genomic Profiling of Multidrug-Resistant Swine *Escherichia coli* and Clonal Relationship to Human Isolates in Peru. Antibiotics. 12(12): 1748. doi: 10.3390/antibiotics12121748.

8. ***Amato HK, Loayza F, Salinas L, Paredes D, Garcia D, Sarzosa S, Saraiva-Garcia C, Johnson TJ, Pickering AJ, Riley LW, Trueba G, Graham J. 2023.*** Risk factors for extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *E. coli* carriage among children in a food animal-producing region of Ecuador: A repeated measures observational study. PLoS Med. 20(10): e1004299. doi: 10.1371/journal.pmed.1004299.

9. ***Ambler R. 1980.*** The structure of β-lactamases. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, Biological Sciences. 289(1036): 321–331. doi: 10.1098/rstb.1980.0049.

10. ***Andrews S. 2010.*** FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data [Internet]. [23 mar 2023]. Disponible en: http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/

11. ***Anjum MF, Schmitt H, Börjesson S, Berendonk TU, WAWES network. 2021.*** The potential of using *E. coli* as an indicator for the surveillance of antimicrobial resistance (AMR) in the environment. Curr Opin Microbiol. 64: 152–158. doi: 10.1016/j.mib.2021.09.011.

12. ***Asayag L. 2018.*** Prevalencia de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en el Hospital Regional de Loreto en el año 2016. Tesis de Médico Cirujano. [Internet] [23 mar 2023]. Iquitos: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; [12 mar 2024]. Disponible en: http://repositorio.unapiquitos.edu.pe/handle/20.500.12737/5511

13. ***Bachiri T, Bakour S, Ladjouzi R, Thongpan L, Rolain JM, Touati A. 2017.*** High rates of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in wild boars and Barbary macaques in Algeria. J Glob Antimicrob Resist. 8: 35–40. doi: 10.1016/j.jgar.2016.10.005.

14. ***Bado I, Gutiérrez C, García-Fulgueiras V, Cordeiro NF, Araújo Pirez L, Seija V, Bazet C, Rieppi G, Vignoli R. 2016.*** CTX-M-15 in combination with aac(6′)-Ib -cr is the most prevalent mechanism of resistance both in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* , including *K. pneumoniae* ST258, in an ICU in Uruguay. J Glob Antimicrob Resist. 6: 5–9. doi: 10.1016/j.jgar.2016.02.001.

15. ***Baker KS, Jauneikaite E, Nunn JG, Midega JT, Atun R, Holt KE, Walia K, Howden BP, Tate H, Okeke IN, Carattoli A, Yang L, Hopkins KL, Muloi DM, Wheeler NE, Aanensen DM, Mason LCE, Rodgus J, Hendriksen RS, Essack SY, Egyir B, Halpin AL, MacCannell DR, Campos J, Srikantiah P, Feasey NA, Peacock SJ, SEDRIC Genomics Surveillance Working Group. 2023.*** Evidence review and recommendations for the implementation of genomics for antimicrobial resistance surveillance: reports from an international expert group. Lancet Microbe. 4(12): e1035–e1039. doi: 10.1016/S2666-5247(23)00281-1.

16. ***Bartoloni A, Sennati S, Di Maggio T, Mantella A, Riccobono E, Strohmeyer M, Revollo C, Villagran AL, Pallecchi L, Rossolini GM. 2016.*** Antimicrobial susceptibility and emerging resistance determinants (*bla* CTX-M , *rmt*B , *fos*A3) in clinical isolates from urinary tract infections in the Bolivian Chaco. International Journal of Infectious Diseases. 43: 1–6. doi: 10.1016/j.ijid.2015.12.008.

17. ***Basavaraju M, Gunashree BS. 2023.*** *Escherichia coli* : An Overview of Main Characteristics. In: *Escherichia coli* - Old and New Insights. [place unknown]: IntechOpen.

18. ***Bastidas-Caldes C, Romero-Alvarez D, Valdez-Vélez V, Morales RD, Montalvo-Hernández A, Gomes-Dias C, Calvopiña M. 2022.*** Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing *Escherichia coli* in South America: A Systematic Review with a One Health Perspective. Infect Drug Resist. Volume 15: 5759–5779. doi: 10.2147/IDR.S371845.

19. ***Beghain J, Bridier-Nahmias A, Le Nagard H, Denamur E, Clermont O. 2018.*** ClermonTyping: an easy-to-use and accurate in silico method for *Escherichia* genus strain phylotyping. Microb Genom. 4(7). doi: 10.1099/mgen.0.000192.

20. ***Benavides JA, Godreuil S, Opazo-Capurro A, Mahamat OO, Falcon N, Oravcova K, Streicker DG, Shiva C. 2022.*** Long-term maintenance of multidrug-resistant *Escherichia coli* carried by vampire bats and shared with livestock in Peru. Science of The Total Environment. 810: 152045. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.152045.

21. ***Benavides JA, Shiva C, Virhuez M, Tello C, Appelgren A, Vendrell J, Solassol J, Godreuil S, Streicker DG. 2018.*** Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in common vampire bats *Desmodus rotundus* and livestock in Peru. Zoonoses Public Health. 65(4): 454–458. doi: 10.1111/zph.12456.

22. ***Benham A, Davis J, Puzio C, Blakey G, Slobodov G. 2013.*** Renal abscess yields elusive hypermucoviscous phenotype of, uropathogenic *Escherichia coli*: a case report. J Okla State Med Assoc [Internet] [23 mar 2023]. 106(11): 435–8. doi:

23. ***Bevan ER, Jones AM, Hawkey PM. 2017.*** Global epidemiology of CTX-M β-lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 72(8): 2145–2155. doi: 10.1093/jac/dkx146.

24. ***Bojesen AM, Ahmed U, Skaarup H, Espinosa-Gongora C. 2022.*** Recurring outbreaks by the same *Escherichia coli* ST10 clone in a broiler unit during 18 months. Vet Res. 53(1): 2. doi: 10.1186/s13567-021-01017-6.

25. ***Bolger AM, Lohse M, Usadel B. 2014.*** Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics. 30(15): 2114–2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170.

26. ***Bottone EJ. 2010.*** Hypermucoviscous Phenotype Expressed by an Isolate of Uropathogenic *Escherichia coli*: an Overlooked and Underappreciated Virulence Factor. Clin Microbiol Newsl. 32(11): 81–85. doi: 10.1016/j.clinmicnews.2010.05.001.

27. ***Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT. 2005.*** Genus I. *Escherichia*. En: Bergey's manual of systematic bacteriology Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria [Internet] [23 mar 2023]. Vol. 2. Second Edition. Springer; p. 607–624.

28. ***Bush K, Jacoby GA. 2010.*** Updated Functional Classification of β-Lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 54(3): 969–976. doi: 10.1128/AAC.01009-09.

29. ***Calderon Toledo C, von Mentzer A, Agramont J, Thorell K, Zhou Y, Szabó M, Colque P, Kuhn I, Gutiérrez-Cortez S, Joffré E. 2023.*** Circulation of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) isolates expressing CS23 from the environment to clinical settings. mSystems. 8(5). doi: 10.1128/msystems.00141-23.

30. ***Cardenas-Arias AR, Sano E, Cardoso B, Fuga B, Sellera FP, Esposito F, Aravena-Ramírez V, Carhuaricra D, Duran C, Luna LR, Maturrano AL, Lincopan N. 2024.*** Genomic data of global clones of CTX-M-65-producing *Escherichia coli* ST10 from South American llamas inhabiting the Andean Highlands of Peru. J Glob Antimicrob Resist. 36: 135–138. doi: 10.1016/j.jgar.2023.11.011.

31. ***Castanheira M, Simner PJ, Bradford PA. 2021.*** Extended-spectrum β -lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. JAC Antimicrob Resist. 3(3). doi: 10.1093/jacamr/dlab092.

32. ***Castellanos LR, Donado-Godoy P, León M, Clavijo V, Arevalo A, Bernal JF, Timmerman AJ, Mevius DJ, Wagenaar JA, Hordijk J. 2017.*** High Heterogeneity of *Escherichia coli* Sequence Types Harbouring ESBL/AmpC Genes on IncI1 Plasmids in the Colombian Poultry Chain. PLoS One. 12(1): e0170777. doi: 10.1371/journal.pone.0170777.

33. ***Chiluisa-Guacho C, Escobar-Perez J, Dutra-Asensi M. 2018.*** First Detection of the CTXM-15 Producing *Escherichia coli* O25-ST131 Pandemic Clone in Ecuador. Pathogens. 7(2): 42. doi: 10.3390/pathogens7020042.

34. ***Clayton JB, Danzeisen JL, Trent AM, Murphy T, Johnson TJ. 2014.*** Longitudinal Characterization of *Escherichia coli* in Healthy Captive Non-Human Primates. Front Vet Sci. 1. doi: 10.3389/fvets.2014.00024.

35. ***Clayton JB, Vangay P, Huang H, Ward T, Hillmann BM, Al-Ghalith GA, Travis DA, Long HT, Van Tuan B, Van Minh V, Cabana F, Nadler T, Toddes B, Murphy T, Glander KE, Johnson TJ, Knights D. 2016.*** Captivity humanizes the primate microbiome. Proceedings of the National Academy of Sciences. 113(37): 10376–10381. doi: 10.1073/pnas.1521835113.

36. ***CLSI. 2021.*** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing 31st edition CLSI supplement M100. [Internet]; [13 may 2022]. Disponible en: https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/

37. ***Cox G, Wright GD. 2013.*** Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. International Journal of Medical Microbiology. 303(6–7): 287–292. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.02.009.

38. ***Crandlemire-Sacco J. 1988.*** An ecological comparison of two sympatric primates: *Saguinus fuscicollis* and *Callicebus moloch* of Amazonian Peru. Primates. 29(4): 465–475. doi: 10.1007/BF02381134.

39. ***Croucher NJ, Page AJ, Connor TR, Delaney AJ, Keane JA, Bentley SD, Parkhill J, Harris SR. 2015.*** Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins. Nucleic Acids Res. 43(3): e15–e15. doi: 10.1093/nar/gku1196.

40. ***Darby EM, Trampari E, Siasat P, Gaya MS, Alav I, Webber MA, Blair JMA. 2023.*** Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. Nat Rev Microbiol. 21(5): 280–295. doi: 10.1038/s41579-022-00820-y.

41. ***Daniel y Cross. 2013.*** Determination of Sample Size for Estimating Proportions. En: Biostatistics: a foundation for analysis in the health sciences, 10th edition. Ed. Wiley. p. 171 – 172.

42. ***Delcour AH. 2009.*** Outer membrane permeability and antibiotic resistance. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics. 1794(5): 808–816. doi: 10.1016/j.bbapap.2008.11.005.

43. ***Denamur E, Clermont O, Bonacorsi S, Gordon D. 2021.*** The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. 19(1): 37–54. doi: 10.1038/s41579-020-0416-x.

44. ***Díaz-Jiménez D, García-Meniño I, Herrera A, García V, López-Beceiro AM, Alonso MP, Blanco J, Mora A. 2020.*** Genomic Characterization of *Escherichia coli* Isolates Belonging to a New Hybrid aEPEC/ExPEC Pathotype O153:H10-A-ST10 eae-beta1 Occurred in Meat, Poultry, Wildlife and Human Diarrheagenic Samples. Antibiotics. 9(4): 192. doi: 10.3390/antibiotics9040192.

45. ***Djordjevic SP, Jarocki VM, Seemann T, Cummins ML, Watt AE, Drigo B, Wyrsch ER, Reid CJ, Donner E, Howden BP. 2024.*** Genomic surveillance for antimicrobial resistance — a One Health perspective. Nat Rev Genet. 25(2): 142–157. doi: 10.1038/s41576-023-00649-y.

46. ***Dobrindt U. 2005.*** (Patho-)Genomics of *Escherichia coli.* International Journal of Medical Microbiology. 295(6–7): 357–371. doi: 10.1016/j.ijmm.2005.07.009.

47. ***Domínguez DC, Chacón LM, Wallace D. 2021.*** Anthropogenic Activities and the Problem of Antibiotic Resistance in Latin America: A Water Issue. Water (Basel). 13(19): 2693. doi: 10.3390/w13192693.

48. ***Dominguez JE, Faccone D, Tijet N, Gomez S, Corso A, Fernández-Miyakawa ME, Melano RG. 2019.*** Characterization of *Escherichia coli* Carrying mcr-1-Plasmids Recovered From Food Animals From Argentina. Front Cell Infect Microbiol. 9. doi: 10.3389/fcimb.2019.00041.

49. ***Donato ACJ, Penna B, Consalter A, Carvalho DD, Lilenbaum W, Ferreira AMR. 2017.*** Antibiotic resistance in *Staphylococcus* sp. isolated from the vaginal environment of squirrel monkeys (*Saimiri* spp. *)* bred ex situ. J Med Primatol. 46(3): 75–78. doi: 10.1111/jmp.12258.

50. ***Dubreuil JD, Isaacson RE, Schifferli DM. 2016.*** Animal Enterotoxigenic *Escherichia coli*. EcoSal Plus. 7(1). doi: 10.1128/ecosalplus.esp-0006-2016.

51. ***Enright MC, Spratt BG***. 1999. Multilocus sequence typing. Trends Microbiol. 7(12): 482–487. doi: 10.1016/S0966-842X(99)01609-1.

52. ***Espinoza LL, Huamán DC, Cueva CR, Gonzales CD, León YI, Espejo TS, Monge GM, Alcántara RR, Hernández LM. 2023.*** Genomic analysis of multidrug-resistant *Escherichia coli* strains carrying the mcr-1 gene recovered from pigs in Lima-Peru. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 99: 102019. doi: 10.1016/j.cimid.2023.102019.

53. ***Ewbank AC, Fuentes-Castillo D, Sacristán C, Cardoso B, Esposito F, Fuga B, de Macedo EC, Lincopan N, Catão-Dias JL. 2022.*** Extended-spectrum β-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* survey in wild seabirds at a pristine atoll in the southern Atlantic Ocean, Brazil: First report of the O25b-ST131 clone harboring $bla_{\text{CTX-M-8}}$. Science of The Total Environment. 806: 150539. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.150539.

54. ***Faccone D, Moredo FA, Giacoboni GI, Albornoz E, Alarcón L, Nievas VF, Corso A. 2019.*** Multidrug-resistant *Escherichia coli* harbouring mcr-1 and

bla$_{CTX-M}$ genes isolated from swine in Argentina. J Glob Antimicrob Resist. 18: 160–162. doi: 10.1016/j.jgar.2019.03.011.

55. ***Falótico T, Mendonça-Furtado O, Fogaça MD, Tokuda M, Ottoni EB, Verderane MP. 2021.*** Wild robust capuchin monkey interactions with sympatric primates. Primates. 62(4): 659–666. doi: 10.1007/s10329-021-00913-x.

56. ***Fam N, Leflon-Guibout V, Fouad S, Aboul-Fadl L, Marcon E, Desouky D, El-Defrawy I, Abou-Aitta A, Klena J, Nicolas-Chanoine M-H. 2011.*** CTX-M-15-Producing *Escherichia coli* Clinical Isolates in Cairo (Egypt), Including Isolates of Clonal Complex ST10 and Clones ST131, ST73, and ST405 in Both Community and Hospital Settings. Microbial Drug Resistance. 17(1): 67–73. doi: 10.1089/mdr.2010.0063.

57. ***Fang CT, Chuang YP, Shun CT, Chang SC, Wang JT. 2004.*** A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. The Journal of experimental medicine, 199(5), 697–705. https://doi.org/10.1084/jem.20030857

58. ***Feldgarden M, Brover V, Gonzalez-Escalona N, Frye JG, Haendiges J, Haft DH, Hoffmann M, Pettengill JB, Prasad AB, Tillman GE, et al. 2021.*** AMRFinderPlus and the Reference Gene Catalog facilitate examination of the genomic links among antimicrobial resistance, stress response, and virulence. Sci Rep. 11(1): 12728. doi: 10.1038/s41598-021-91456-0.

59. ***Fernández VA, Pavé R, Peker SM, Pérez-Rueda MA. 2017.*** Interspecific interactions between wild black and gold howlermonkeys (Alouatta caraya) and other mammals in northeastern Argentina. Acta Ethol. 20(1): 17–26. doi: 10.1007/s10211-016-0243-2.

60. ***Fratamico PM, DebRoy C, Liu Y, Needleman DS, Baranzoni GM, Feng P. 2016.*** Advances in Molecular Serotyping and Subtyping of *Escherichia coli*†. Front Microbiol. 7. doi: 10.3389/fmicb.2016.00644.

61. ***Freitas DY, Araújo S, Folador ARC, Ramos RTJ, Azevedo JSN, Tacão M, Silva A, Henriques I, Baraúna RA. 2019.*** Extended Spectrum Beta-Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria Recovered From an Amazonian Lake Near the City of Belém, Brazil. Front Microbiol. 10. doi: 10.3389/fmicb.2019.00364.

62. ***Fuga B, Sellera FP, Cerdeira L, Esposito F, Cardoso B, Fontana H, Moura Q, Cardenas-Arias A, Sano E, Ribas RM, Carvalho AC, Tognim MCB, Quaresma AJPG, Santana AP, Reis JN, Pilonetto M, Vespero EC, Bonelli RR, Cerqueira AMF, Sincero TCM, Lincopan M. 2022.*** WHO Critical Priority *Escherichia coli* as One Health Challenge for a Post-Pandemic Scenario: Genomic Surveillance and Analysis of Current Trends in Brazil. Microbiol Spectr. 10(2). doi: 10.1128/spectrum.01256-21.

63. ***Galdiero S, Falanga A, Cantisani M, Tarallo R, Elena Della Pepa M, D'Oriano V, Galdiero M. 2012.*** Microbe-Host Interactions: Structure and Role of Gram-Negative Bacterial Porins. Curr Protein Pept Sci. 13(8): 843–854. doi: 10.2174/138920312804871120.

64. ***Garber PA. 1989.*** Role of spatial memory in primate foraging patterns: *Saguinus mystax* and *Saguinus fuscicollis*. Am J Primatol. 19(4): 203–216. doi: 10.1002/ajp.1350190403.

65. ***Garcia A, Fox JG, Besser TE. 2010.*** Zoonotic Enterohemorrhagic *Escherichia coli*: A One Health Perspective. ILAR J. 51(3): 221–232. doi: 10.1093/ilar.51.3.221.

66. ***Gilchrist CLM, Chooi Y-H. 2021.*** clinker & clustermap.js: automatic generation of gene cluster comparison figures. Bioinformatics. 37(16): 2473–2475. doi: 10.1093/bioinformatics/btab007.

67. ***Goldberg TL, Gillespie TR, Rwego IB, Estoff EL, Chapman CA. 2008.*** Forest Fragmentation as Cause of Bacterial Transmission among Nonhuman Primates, Humans, and Livestock, Uganda. Emerg Infect Dis. 14(9): 1375–1382. doi: 10.3201/eid1409.071196.

68. ***He W-Y, Zhang X-X, Gao G-L, Gao M-Y, Zhong F-G, Lv L-C, Cai Z-P, Si X-F, Yang J, Liu J-H. 2021.*** Clonal spread of *Escherichia coli* O101:H9-ST10 and O101:H9-ST167 strains carrying *fosA3* and *bla*$_{\text{CTX-M-14}}$ among diarrheal calves in a Chinese farm, with Australian *Chroicocephalus* as the possible origin of *E. coli* O101:H9-ST10. Zool Res. 42(4): 461–468. doi: 10.24272/j.issn.2095-8137.2021.153.

69. ***Hernandez J, Johansson A, Stedt J, Bengtsson S, Porczak A, Granholm S, González-Acuña D, Olsen B, Bonnedahl J, Drobni M. 2013.*** Characterization and Comparison of Extended-Spectrum β-Lactamase (ESBL) Resistance Genotypes and Population Structure of *Escherichia coli* Isolated from Franklin's Gulls (*Leucophaeus pipixcan*) and Humans in Chile. PLoS One. 8(9): e76150. doi: 10.1371/journal.pone.0076150.

70. ***Heymann EW, Fuzessy L, Culot L. 2022.*** Small but Nice–Seed Dispersal by Tamarins Compared to Large Neotropical Primates. Diversity (Basel). 14(12): 1033. doi: 10.3390/d14121033.

71. ***Hudzicki J. 2009.*** Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. American society for microbiology, 15(1), 1-23.

72. ***Huillca S. 2021.*** Detección de enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido en primates no humanos de dos centros de rescate en Maynas, Loreto, Perú. Tesis de Médico Veterinario [Internet] [23 mar 2023]. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia; [12 mar 2024]. Disponible en: https://hdl.handle.net/20.500.12866/10150

73. ***Husna A, Rahman MdM, Badruzzaman ATM, Sikder MH, Islam MR, Rahman MdT, Alam J, Ashour HM. 2023.*** Extended-Spectrum β-Lactamases (ESBL): Challenges and Opportunities. Biomedicines. 11(11): 2937. doi: 10.3390/biomedicines11112937.

74. ***Impey RE, Hawkins DA, Sutton JM, Soares da Costa TP. 2020.*** Overcoming Intrinsic and Acquired Resistance Mechanisms Associated with the Cell Wall of

Gram-Negative Bacteria. Antibiotics. 9(9): 623. doi: 10.3390/antibiotics9090623.

75. ***Ique C, Aquino R***. 2015. Abundancia de primates y de otros animales de caza con énfasis en Saguinus mystax y Saguinus labiatus en Padre Isla e Isla Muyuy, Loreto, Perú. Ciencia Amazónica (Iquitos). 5(1): 70. doi: 10.22386/ca.v5i1.92.

76. ***Jarlier V, Nicolas M-H, Fournier G, Philippon A. 1988.*** Extended Broad-Spectrum -Lactamases Conferring Transferable Resistance to Newer -Lactam Agents in Enterobacteriaceae: Hospital Prevalence and Susceptibility Patterns. Clinical Infectious Diseases. 10(4): 867–878. doi: 10.1093/clinids/10.4.867.

77. ***Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, Daszak P. 2008.*** Global trends in emerging infectious diseases. Nature. 451(7181): 990–993. doi: 10.1038/nature06536.

78. ***Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. 2004.*** Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. 2(2): 123–140. doi: 10.1038/nrmicro818.

79. ***Kariuki WK, Nyerere KA, Samuel K, Apondi OJ. 2018.*** Antimicrobial Susceptibility Patterns of Escherichia coli Isolated from Olive Baboon (Papio anubis) Gut. American Journal of Infectious Diseases, 6(2), 38-45. doi: 10.12691/ajidm-6-2-1

80. ***Krishnamoorthy G, Leus I V., Weeks JW, Wolloscheck D, Rybenkov V V., Zgurskaya HI. 2017.*** Synergy between Active Efflux and Outer Membrane Diffusion Defines Rules of Antibiotic Permeation into Gram-Negative Bacteria. mBio. 8(5). doi: 10.1128/mBio.01172-17.

81. ***Koneman E, Allen S. 2008.*** *Enterobacteriaciae*. En: Microbiological diagnosis: Text and color atlas. 7th Ed. p. 171-242.

82. ***LaBarge LR, Hill RA, Berman CM, Margulis SW, Allan AT. 2020.*** Anthropogenic influences on primate antipredator behavior and implications for research and conservation. *American Journal of Primatology*, *82*(2), e23087. doi: 10.1002/ajp.23087

83. ***Lemos LN, Pedrinho A, Vasconcelos ATR de, Tsai SM, Mendes LW. 2021.*** Amazon deforestation enriches antibiotic resistance genes. Soil Biol Biochem. 153: 108110. doi: 10.1016/j.soilbio.2020.108110.

84. ***Lerminiaux NA, Cameron ADS. 2019.*** Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. Can J Microbiol. 65(1): 34–44. doi: 10.1139/cjm-2018-0275.

85. ***Lezameta L, Gonzáles-Escalante E, Tamariz JH. 2010.*** Comparación de cuatro métodos fenotípicos para la detección de beta-lactamasas de espectro extendido. Rev Peru Med Exp Salud Publica [Internet] [23 mar 2023]. 27(3).

86. ***Liakopoulos A, Mevius D, Ceccarelli D. 2016.*** A Review of SHV Extended-Spectrum β-Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous. Front Microbiol. 2016 Sep 5;7:1374. doi: 10.3389/fmicb.2016.01374. PMID: 27656166; PMCID: PMC5011133.

87. ***Lincopan N, Fuentes-Castillo D, Espinoza-Muñoz M, Gonzales-Zubiate F, Gonzales-Escalante E, Maturrano L, Vignoli R, Di Conza J, Gutkind G. 2023.*** WHO Critical Priority *Escherichia coli* in Latin America: A One Health Challenge for a Post-Pandemic World. In: Trending Topics in *Escherichia coli* Research. Cham: Springer International Publishing; p. 1–32.

88. ***Liu B, Furevi A, Perepelov A V, Guo X, Cao H, Wang Q, Reeves PR, Knirel YA, Wang L, Widmalm G. 2020.*** Structure and genetics of *Escherichia coli* O antigens. FEMS Microbiol Rev. 44(6): 655–683. doi: 10.1093/femsre/fuz028.

89. ***Liu K-D, Jin W-J, Li R-B, Zhang R-M, Sun J, Liu Y-H, Wang M-G, Liao X-P. 2023.*** Prevalence and molecular characteristics of *mcr*-1-positive *Escherichia coli* isolated from duck farms and the surrounding environments in coastal China. Microbiol Res. 270: 127348. doi: 10.1016/j.micres.2023.127348.

90. ***Louka C, Ravensbergen SJ, Ott A, Zhou X, García-Cobos S, Friedrich AW, Pournaras S, Rosema S, Rossen JW, Stienstra Y, Bathoorn E. 2021.*** Predominance of CTX-M-15-producing ST131 strains among ESBL-producing

Escherichia coli isolated from asylum seekers in the Netherlands. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 76(1): 70–76. doi: 10.1093/jac/dkaa395.

91. ***Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. 1998.*** Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proceedings of the National Academy of Sciences. 95(6): 3140–3145. doi: 10.1073/pnas.95.6.3140.

92. ***Maluta RP, Logue CM, Casas MRT, Meng T, Guastalli EAL, Rojas TCG, Montelli AC, Sadatsune T, de Carvalho Ramos M, Nolan LK, da Silveira WD. 2014.*** Overlapped Sequence Types (STs) and Serogroups of Avian Pathogenic (APEC) and Human Extra-Intestinal Pathogenic (ExPEC) *Escherichia coli* Isolated in Brazil. PLoS One. 9(8): e105016. doi: 10.1371/journal.pone.0105016.

93. ***Manges AR. 2019.*** *Escherichia coli* causing bloodstream and other extraintestinal infections: tracking the next pandemic. Lancet Infect Dis. 19(12): 1269–1270. doi: 10.1016/S1473-3099(19)30538-9.

94. ***Manuyama K. 2018.*** Prevalencia de Betalactamasas de Espectro extendido en enterobacterias, en los urocultivos procesados en adultos del Hospital III Iquitos EsSalud de enero 2015 a diciembre 2015. Tesis de Licenciado en Tecnología Médica en la especialidad de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica. Iquitos: Universidad Científica del Perú. [Internet] [25 mar 2023]. Iquitos: Universidad Científica del Perú; [12 mar 2024]. Disponible en: http://repositorio.ucp.edu.pe/handle/UCP/458

95. ***McDaniel TK, Jarvis KG, Donnenberg MS, Kaper JB. 1995.*** A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. Proceedings of the National Academy of Sciences. 92(5): 1664–1668. doi: 10.1073/pnas.92.5.1664.

96. ***Medina C, Morales S, Navarrete M. 2017.*** Antibiotic resistance of enterobacteria isolated from monkeys (*Ateles*, *Callicebus* and *Lagothrix*) in

semi-captivity in a Rescue Centre, Peru. Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru. 28(2): 418–425. doi: 10.15381/rivep.v28.i2.13073.

97. ***Medina-Pizzali ML, Venkatesh A, Riveros M, Cuicapuza D, Salmon-Mulanovich G, Mäusezahl D, Hartinger SM. 2022.*** Whole-Genome Characterisation of ESBL-Producing *E. coli* Isolated from Drinking Water and Dog Faeces from Rural Andean Households in Peru. Antibiotics. 11(5): 692. doi: 10.3390/antibiotics11050692.

98. ***Meng J, LeJeune JT, Zhao T, Doyle MP. 2014.*** Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: Food Microbiol. Washington, DC, USA: ASM Press; p. 287–309.

99. ***Meza-Segura M, Zaidi MB, Vera-Ponce de León A, Moran-Garcia N, Martinez-Romero E, Nataro JP, Estrada-Garcia T. 2020.*** New Insights Into DAEC and EAEC Pathogenesis and Phylogeny. Front Cell Infect Microbiol. 10. doi: 10.3389/fcimb.2020.572951.

100. ***Minh BQ, Schmidt HA, Chernomor O, Schrempf D, Woodhams MD, von Haeseler A, Lanfear R. 2020.*** IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. Mol Biol Evol. 37(5): 1530–1534. doi: 10.1093/molbev/msaa015.

101. ***Mohsin M, Raza S, Schaufler K, Roschanski N, Sarwar F, Semmler T, Schierack P, Guenther S. 2017.*** High Prevalence of CTX-M-15-Type ESBL-Producing E. coli from Migratory Avian Species in Pakistan. Front Microbiol. 8. doi: 10.3389/fmicb.2017.02476.

102. ***Moreno-Madriñan MJ, Kontowicz E. 2023.*** Stocking Density and Homogeneity, Considerations on Pandemic Potential. Zoonotic Diseases, 3(2), 85-92. doi: 10.3390/zoonoticdis3020008

103. ***Murray M, Salvatierra G, Dávila-Barclay A, Ayzanoa B, Castillo-Vilcahuaman C, Huang M, Pajuelo MJ, Lescano AG, Cabrera L, Calderón M, Berg D, Gilman R, Tsukayama P. 2021.*** Market Chickens as a Source of

Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* in a Peri-Urban Community in Lima, Peru. Front Microbiol. 12. doi: 10.3389/fmicb.2021.635871.

104. ***Nataro JP, Kaper JB. 1998.*** Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 11(1): 142–201. doi: 10.1128/CMR.11.1.142.

105. ***Neumann B, Lippmann N, Wendt S, Karlas T, Lübbert C, Werner G, Pfeifer Y, Schuster CF. 2022.*** Recurrent bacteremia with a hypermucoviscous *Escherichia coli* isolated from a patient with perihilar cholangiocarcinoma: insights from a comprehensive genome-based analysis. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 21(1): 28. doi: 10.1186/s12941-022-00521-7.

106. ***Nikaido H. 2003.*** Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 67(4): 593–656. doi: 10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003.

107. ***Nusser SM, Clark WR, Otis DL, Huang L. 2008.*** Sampling considerations for disease surveillance in wildlife populations. The Journal of Wildlife Management, 72(1), 52-60. doi: 10.2193/2007-317

108. ***[OMSA]. Organización Mundial de Sanidad Animal. 2018.*** Capítulo 1.1.3.: Transporte de material biológico. En: Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres, duodécima edición 2023. Disponible online en: https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-manual-terrestre/

109. ***O'Neill J. 2016.*** Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations the review on antimicrobial resistance chaired by Jim O'Neill [Internet]. Londres; [13 apr 2023]. Disponible en: https://amr-review.org/

110. ***Orsi H, Guimarães FF, Leite DS, Guerra ST, Joaquim SF, Pantoja JCF, Hernandes RT, Lucheis SB, Ribeiro MG, Langoni H, Rall VLM. 2023.*** Characterization of mammary pathogenic *Escherichia coli* reveals the diversity of *Escherichia coli* isolates associated with bovine clinical mastitis in Brazil. J Dairy Sci. 106(2): 1403–1413. doi: 10.3168/jds.2022-22126.

111. ***Oteo J, Diestra K, Juan C, Bautista V, Novais Â, Pérez-Vázquez M, Moyá B, Miró E, Coque TM, Oliver A, Cantón R, Navarro F, Campos J, Spanish Network in Infectious Pathology Project (REIPI). 2009.*** Extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* in Spain belong to a large variety of multilocus sequence typing types, including ST10 complex/A, ST23 complex/A and ST131/B2. Int J Antimicrob Agents. 34(2): 173–176. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.03.006.

112. ***Pallecchi L, Malossi M, Mantella A, Gotuzzo E, Trigoso C, Bartoloni A, Paradisi F, Kronvall G, Rossolini GM. 2004.*** Detection of CTX-M-Type β-Lactamase Genes in Fecal *Escherichia coli* Isolates from Healthy Children in Bolivia and Peru. Antimicrob Agents Chemother. 48(12): 4556–4561. doi: 10.1128/AAC.48.12.4556-4561.2004.

113. ***Pedersen AB, Davies TJ. 2009.*** Cross-species pathogen transmission and disease emergence in primates. Ecohealth. 6(4):496-508. doi: 10.1007/s10393-010-0284-3. Epub 2010 Mar 16. PMID: 20232229; PMCID: PMC7087625.

114. ***Peirano G, Asensi MD, Pitondo-Silva A, Pitout JDD. 2011.*** Molecular characteristics of extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* from Rio de Janeiro, Brazil. Clinical Microbiology and Infection. 17(7): 1039–1043. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03440.x.

115. ***Poirel L, Madec J-Y, Lupo A, Schink A-K, Kieffer N, Nordmann P, Schwarz S. 2018.*** Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. Microbiol Spectr. 6(4). doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017.

116. ***R Core Team. 2023.*** R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria [Internet]. [23 mar 2023]. Disponible en: https://www.R-project.org/

117. ***Ravi RK, Walton K, Khosroheidari M. 2018.*** MiSeq: A Next Generation Sequencing Platform for Genomic Analysis. Methods Mol Biol. 2018;1706:223-232. doi: 10.1007/978-1-4939-7471-9_12. PMID: 29423801.

118. ***Reygaert WC. 2017.*** Antimicrobial Mechanisms of *Escherichia coli* En: *Escherichia coli* - Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications. doi: 10.5772/63146

119. ***Rojas LJ, Wright MS, De La Cadena E, Motoa G, Hujer KM, Villegas M V., Adams MD, Bonomo RA. 2016.*** Initial Assessment of the Molecular Epidemiology of *bla* $_{\text{NDM-1}}$ in Colombia. Antimicrob Agents Chemother. 60(7): 4346–4350. doi: 10.1128/AAC.03072-15.

120. ***Rolland RM, Hausfater G, Marshall B, Levy SB. 1985.*** Antibiotic-resistant bacteria in wild primates: increased prevalence in baboons feeding on human refuse. Appl Environ Microbiol. 49(4): 791–794. doi: 10.1128/aem.49.4.791-794.1985.

121. ***Ruiz SJ, Montealegre MC, Ruiz-Garbajosa P, Correa A, Briceño DF, Martinez E, Rosso F, Muñoz M, Quinn JP, Cantón R, Villegas MV. 2011.*** First Characterization of CTX-M-15-Producing *Escherichia coli* ST131 and ST405 Clones Causing Community-Onset Infections in South America. J Clin Microbiol. 49(5): 1993–1996. doi: 10.1128/JCM.00045-11.

122. ***Rylands AB. 1996.*** Habitat and the evolution of social and reproductive behavior in callitrichidae. Am J Primatol. 38(1): 5–18. doi: 10.1002/(SICI)1098-2345(1996)38:1<5::AID-AJP2>3.0.CO;2-2.

123. ***Salinas L, Loayza F, Cárdenas P, Saraiva C, Johnson TJ, Amato H, Graham JP, Trueba G. 2021.*** Environmental Spread of Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) Producing *Escherichia coli* and ESBL Genes among Children and Domestic Animals in Ecuador. Environ Health Perspect. 129(2). doi: 10.1289/EHP7729.

124. ***Sangama F, Pereyra R. 2018.*** Prevalencia de ***Asayag L. 2018.*** Prevalencia de β-lactamasas de espectro extendido en enterobacterias aisladas en el Servicio de Microbiología del Hospital Regional de Loreto desde enero a junio del 2017. Tesis de Licenciado en Tecnología Médica en la especialidad de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica. [Internet] [25 mar 2023]. Iquitos: Universidad

Científica del Perú; [12 mar 2024]. Disponible en: http://repositorio.ucp.edu.pe/handle/UCP/428

125. ***Sano E, Esposito F, Fontana H, Fuga B, Cardenas-Arias A, Moura Q, Cardoso B, Costa GCV, Bosqueiro TCM, Sinhorini JA, de Masi E, Aires CC, Lincopan N. 2023.*** One health clones of multidrug-resistant *Escherichia coli* carried by synanthropic animals in Brazil. One Health. 16: 100476. doi: 10.1016/j.onehlt.2022.100476.

126. ***Santos Tufic-Garutti S dos, de Araújo Longo LG, Fontana H, Garutti LHG, de Carvalho Girão VB, Fuga B, Lincopan N, de Pinho Rodrigues KM, Moreira BM. 2022.*** OXA-181 carbapenemase carried on an IncX3 plasmid in high-risk *Escherichia coli* ST167 isolated from a traveler returning from Sub-Saharan Africa to Brazil. Diagn Microbiol Infect Dis. 102(1): 115570. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2021.115570.

127. ***Sawa T, Kooguchi K, Moriyama K. 2020.*** Molecular diversity of extended-spectrum β-lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. J Intensive Care. 8(1): 13. doi: 10.1186/s40560-020-0429-6.

128. ***Seemann T. 2015.*** Snippy: fast bacterial variant calling from NGS reads [Internet]. [23 mar 2023]. Disponible en: https://github.com/tseemann/snippy

129. ***Sennati S, Santella G, Di Conza J, Pallecchi L, Pino M, Ghiglione B, Rossolini GM, Radice M, Gutkind G. 2012.*** Changing Epidemiology of Extended-Spectrum β-Lactamases in Argentina: Emergence of CTX-M-15. Antimicrob Agents Chemother. 56(11): 6003–6005. doi: 10.1128/AAC.00745-12.

130. ***Shanee N, Mendoza AP, Shanee S. 2017.*** Diagnostic overview of the illegal trade in primates and law enforcement in Peru. Am J Primatol. 79(11). doi: 10.1002/ajp.22516.

131. ***Shanee S, Fernández-Hidalgo L, Allgas N, Vero V, Bello-Santa Cruz R, Bowler M, Erkenswick Watsa M, García Mendoza G, García-Olaechea A, Hurtado C, Vega Z, Marsh L, Boonratana R, Mendoza P. 2023.*** Threat

Analysis of Forest Fragmentation and Degradation for Peruvian Primates. Diversity (Basel). 15(2): 276. doi: 10.3390/d15020276.

132. ***Sherry NL, Horan KA, Ballard SA, Gonçalves da Silva A, Gorrie CL, Schultz MB, Stevens K, Valcanis M, Sait ML, Stinear TP, Howden BP, Seemann T. 2023.*** An ISO-certified genomics workflow for identification and surveillance of antimicrobial resistance. Nat Commun. 14(1): 60. doi: 10.1038/s41467-022-35713-4.

133. ***Simonet V, Malléa M, Pagès J-M. 2000.*** Substitutions in the Eyelet Region Disrupt Cefepime Diffusion through the *Escherichia coli* OmpF Channel. Antimicrob Agents Chemother. 44(2): 311–315. doi: 10.1128/AAC.44.2.311-315.2000.

134. ***Smith BL, Fernando S, King MD. 2024.*** *Escherichia coli* resistance mechanism AcrAB-TolC efflux pump interactions with commonly used antibiotics: a molecular dynamics study. Sci Rep. 14(1): 2742. doi: 10.1038/s41598-024-52536-z.

135. ***Smith CM, Anacker M, Bevis DL, Dutton NAM, Powell D, McLaughlin RW. 2024.*** Isolation of a CTX-M-55 (ESBL)-Producing *Escherichia coli* Strain of the Global ST6448 Clone from a Captive Orangutan in the USA. Curr Microbiol. 17;81(7):177. doi: 10.1007/s00284-024-03693-x. PMID: 38758473.

136. ***Soini P. 1990.*** Resultados de una investigación preliminar de la fauna de la isla Iquitos e islas adyacentes. En: La primatología en el Perú. Vol. I. Lima; p. 413-441.

137. ***Suleiman K, Kolo I, Mohammed SSD, Magaji YG. 2022.*** Bacterial diarrhea among infants in developing countries: An overview of diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC). Gadau Journal of Pure and Allied Sciences. 1(1): 73–81. doi: 10.54117/gjpas.v1i1.10.

138. ***Swift BMC, Bennett M, Waller K, Dodd C, Murray A, Gomes RL, Humphreys B, Hobman JL, Jones MA, Whitlock SE, Mitchell L, Lennon R, Arnold KE.***

2019. Anthropogenic environmental drivers of antimicrobial resistance in wildlife. Science of The Total Environment. 649: 12–20. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.08.180.

139. ***Tsukayama P, Boolchandani M, Patel S, Pehrsson EC, Gibson MK, Chiou KL, Jolly CJ, Rogers J, Phillips-Conroy JE, Dantas G. 2018.*** Characterization of Wild and Captive Baboon Gut Microbiota and Their Antibiotic Resistomes. mSystems. 3(3). doi: 10.1128/mSystems.00016-18.

140. ***Umpiérrez A, Bado I, Oliver M, Acquistapace S, Etcheverría A, Padola NL, Vignoli R, Zunino P. 2017.*** Zoonotic Potential and Antibiotic Resistance of *Escherichia coli* in Neonatal Calves in Uruguay. Microbes Environ. 32(3): 275–282. doi: 10.1264/jsme2.ME17046.

141. ***Urwin R, Maiden MCJ. 2003.*** Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. Trends Microbiol. 11(10): 479–487. doi: 10.1016/j.tim.2003.08.006.

142. ***Vásquez-Aguilar AA, Toledo-Manuel FO, Barbachano-Guerrero A, Hernández-Rodríguez D. 2020.*** Detection of Antimicrobial Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolated from Black Howler Monkeys (*Alouatta pigra*) and Domestic Animals in Fragmented Rain-Forest Areas in Tabasco, Mexico. J Wildl Dis. 56(4). doi: 10.7589/2019-10-243.

143. ***Vignoli R, García-Fulgueiras V, Cordeiro NF, Bado I, Seija V, Aguerrebere P, Laguna G, Araújo L, Bazet C, Gutkind G, Chabalgoity J. 2016.*** Extended-spectrum β-lactamases, transferable quinolone resistance, and virulotyping in extra-intestinal *E. coli* in Uruguay. The Journal of Infection in Developing Countries. 10(01): 43–52. doi: 10.3855/jidc.6918.

144. ***Vijay D, Dhaka P, Vergis J, Negi M, Mohan V, Kumar M, Doijad S, Poharkar K, Kumar A, Malik SS, Barbuddhe SB, Rawool DB. 2015.*** Characterization and biofilm forming ability of diarrhoeagenic enteroaggregative *Escherichia coli* isolates recovered from human infants and young animals. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 38: 21–31. doi: 10.1016/j.cimid.2014.11.004.

145. ***Walker KA, Miller VL. 2020.*** The intersection of capsule gene expression, hypermucoviscosity and hypervirulence in *Klebsiella pneumoniae*. Curr Opin Microbiol. 54: 95–102. doi: 10.1016/j.mib.2020.01.006.

146. ***Wang Y, He T, Han J, Wang J, Foley SL, Yang G, Wan S, Shen J, Wu C. 2012.*** Prevalence of ESBLs and PMQR genes in fecal *Escherichia coli* isolated from the non-human primates in six zoos in China. Vet Microbiol. 159(1–2): 53–59. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.03.009.

147. ***Weiss D, Wallace RM, Rwego IB, Gillespie TR, Chapman CA, Singer RS, Goldberg TL. 2018.*** Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* and Class 1 Integrons in Humans, Domestic Animals, and Wild Primates in Rural Uganda. Appl Environ Microbiol. 84(21). doi: 10.1128/AEM.01632-18.

148. ***WHO. 2017.*** WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed [Internet]. [24 mar 2023]. Available from: https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed

149. ***Xia S, Fan X, Huang Z, Xia L, Xiao M, Chen R, Xu Y, Zhuo C. 2014.*** Dominance of CTX-M-Type Extended-Spectrum β-Lactamase (ESBL)-Producing *Escherichia coli* Isolated from Patients with Community-Onset and Hospital-Onset Infection in China. PLoS One. 9(7): e100707. doi: 10.1371/journal.pone.0100707.

150. ***Yang JT, Zhang LJ, Lu Y, Zhang RM, Jiang HX. 2023.*** Genomic Insights into Global *bla*$_{\text{CTX-M-55}}$-Positive *Escherichia coli* Epidemiology and Transmission Characteristics. Microbiology spectrum, 11(4), e0108923. doi: 10.1128/spectrum.01089-23

151. ***Yu D, Banting G, Neumann NF. 2021.*** A review of the taxonomy, genetics, and biology of the genus *Escherichia* and the type species *Escherichia coli*. Can J Microbiol. 67(8): 553–571. doi: 10.1139/cjm-2020-0508.

152. ***Yu G, Smith DK, Zhu H, Guan Y, Lam TT. 2017.*** ggtree: an r package for visualization and annotation of phylogenetic trees with their covariates and other associated data. Methods Ecol Evol. 8(1): 28–36. doi: 10.1111/2041-210X.12628.

153. ***Yu K, Huang Z, Xiao Y, Gao H, Bai X, Wang D. 2024.*** Global spread characteristics of CTX-M-type extended-spectrum β-lactamases: A genomic epidemiology analysis. Drug Resistance Updates. 73: 101036. doi: 10.1016/j.drup.2023.101036.

154. ***Zhou Z, Alikhan N-F, Mohamed K, Fan Y, Achtman M. 2020.*** The EnteroBase user's guide, with case studies on *Salmonella* transmissions, *Yersinia pestis* phylogeny, and *Escherichia* core genomic diversity. Genome Res. 30(1): 138–152. doi: 10.1101/gr.251678.119.

155. ***Zhou Z, Charlesworth J, Achtman M. 2021.*** HierCC: a multi-level clustering scheme for population assignments based on core genome MLST. Bioinformatics. 37(20): 3645–3646. doi: 10.1093/bioinformatics/btab234.

156. ***Zhu Z, Jiang S, Qi M, Liu H, Zhang S, Liu H, Zhou Z, Wang L, Wang C, Luo Y, Ren Z, Ma X, Cao S, Shen L, Wang Y, Fu H, Geng Y, He C, Gu X, Xie Y, Peng G, Zhong Z. 2021.*** Prevalence and characterization of antibiotic resistance genes and integrons in *Escherichia coli* isolates from captive non-human primates of 13 zoos in China. Sci Total Environ. Dec 1;798:149268. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.149268. Epub 2021 Jul 24. PMID: 34333432.

157. ***Zurita J, Solís MB, Ortega-Paredes D, Barba P, Paz y Miño A, Sevillano G. 2019.*** High prevalence of B2-ST131 clonal group among extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from bloodstream infections in Quito, Ecuador. J Glob Antimicrob Resist. 19: 216–221. doi: 10.1016/j.jgar.2019.04.019.

IX. ANEXOS

Anexo 1. Registro de muestras y cepas de PNH mantenidos en semicautiverio en las islas Iquitos, Muyuy y Padre Isla, de la región de Loreto, en el noreste de la Cuenca Amazónica Peruana (N=69)

Código	**Hospedero**	**Procedencia**	***E. coli***	***E. coli* productora de BLEE**
II-2	*Saimiri boliviensis*	Isla Iquitos	-	-
II-3	*Saimiri boliviensis*	Isla Iquitos	-	-
II-4	*Saimiri boliviensis*	Isla Iquitos	-	-
II-5	*Saimiri boliviensis*	Isla Iquitos	+	-
II-6	*Saimiri boliviensis*	Isla Iquitos	+	-
II-12	*Saimiri boliviensis*	Isla Iquitos	+	-
II-13	*Saimiri boliviensis*	Isla Iquitos	+	-
II-14	*Saimiri boliviensis*	Isla Iquitos	+	-
II-16	*Saimiri boliviensis*	Isla Iquitos	-	-
II-17	*Saimiri boliviensis*	Isla Iquitos	-	-
II-19	*Saimiri boliviensis*	Isla Iquitos	-	-
II-20	*Saimiri boliviensis*	Isla Iquitos	-	-
II-22	*Saimiri boliviensis*	Isla Iquitos	-	-
II-23	*Saimiri boliviensis*	Isla Iquitos	-	-
II-24	*Saimiri boliviensis*	Isla Iquitos	+ (2 aislados)	-
II-31	*Saimiri boliviensis*	Isla Iquitos	-	-
II-32	*Saimiri boliviensis*	Isla Iquitos	+	-

II-38	*Saimiri boliviensis*	Isla Iquitos	-	-
C-49	*Saimiri boliviensis*	Isla Iquitos	-	-
E-27	*Saimiri boliviensis*	Isla Iquitos	+ (2 aislados)	-
J-5	*Saimiri boliviensis*	Isla Iquitos	+	-
J-11	*Saimiri boliviensis*	Isla Iquitos	+	-
J-19	*Saimiri boliviensis*	Isla Iquitos	+ (4 aislados)	-
J-31	*Saimiri boliviensis*	Isla Iquitos	+ (2 aislados)	-
J-33	*Saimiri boliviensis*	Isla Iquitos	+	-
J-34	*Saimiri boliviensis*	Isla Iquitos	-	-
IM-1	*Saguinus labiatus*	Isla Muyuy	-	-
IM-2	*Saguinus labiatus*	Isla Muyuy	+	-
IM-3	*Saguinus labiatus*	Isla Muyuy	-	-
IM-4	*Saguinus labiatus*	Isla Muyuy	-	-
IM-5	*Saguinus labiatus*	Isla Muyuy	+	-
IM-6	*Saguinus labiatus*	Isla Muyuy	+	-
IM-7	*Saguinus labiatus*	Isla Muyuy	-	-
IM-8	*Saguinus labiatus*	Isla Muyuy	-	-
IM-9	*Saguinus labiatus*	Isla Muyuy	-	-
IM-10	*Saguinus labiatus*	Isla Muyuy	-	-
IM-12	*Saguinus labiatus*	Isla Muyuy	-	-

IM-13	*Saguinus labiatus*	Isla Muyuy	-	-
IM-14	*Saguinus labiatus*	Isla Muyuy	+ (2 aislados)	-
IM-15	*Saguinus labiatus*	Isla Muyuy	-	-
IM-16	*Saguinus labiatus*	Isla Muyuy	-	-
IM-17	*Saguinus labiatus*	Isla Muyuy	-	-
IM-18	*Saguinus labiatus*	Isla Muyuy	-	-
IM-19	*Saguinus labiatus*	Isla Muyuy	+ (3 aislados)	+
IM-23	*Saguinus labiatus*	Isla Muyuy	-	-
IM-26	*Saguinus labiatus*	Isla Muyuy	-	-
IM-27	*Saguinus labiatus*	Isla Muyuy	+	-
PI-1	*Saguinus mystax*	Padre Isla	+	-
PI-2	*Saguinus mystax*	Padre Isla	+	-
PI-3	*Saguinus mystax*	Padre Isla	+ (2 aislados)	-
PI-4	*Saguinus mystax*	Padre Isla	+ (2 aislados)	-
PI-5	*Saguinus mystax*	Padre Isla	+	-
PI-7	*Saguinus mystax*	Padre Isla	+	-
PI-8	*Saguinus mystax*	Padre Isla	+ (2 aislados)	-
PI-9	*Saguinus mystax*	Padre Isla	-	-
PI-10	*Saguinus mystax*	Padre Isla	+ (3 aislados)	-
PI-11	*Saguinus mystax*	Padre Isla	+	-

PI-12	*Saguinus mystax*	Padre Isla	+ (2 aislados)	-
PI-13	*Saguinus mystax*	Padre Isla	+	+
PI-14	*Saguinus mystax*	Padre Isla	-	-
PI-16	*Saguinus mystax*	Padre Isla	+ (4 aislados)	-
PI-17	*Saguinus mystax*	Padre Isla	-	-
PI-18	*Saguinus mystax*	Padre Isla	-	-
PI-19	*Saguinus mystax*	Padre Isla	-	-
PI-20	*Saguinus mystax*	Padre Isla	+ (2 aislados)	-
PI-21	*Saguinus mystax*	Padre Isla	+ (2 aislados)	+
PI-28	*Saguinus mystax*	Padre Isla	-	-
PI-30	*Saguinus mystax*	Padre Isla	-	-
PI	*Saguinus mystax*	Padre Isla	+	-

Anexo 2. Registro de medida de los halos de inhibición de los aislados de *E. coli* de PNH mantenidos en semicautiverio en las Islas Iquitos, Muyuy y Padre Isla de la Cuenca Amazónica Peruana (N=55)

Código	Hospedero	ATM	CAZ	CTX	CRO	AMC	OT	F	LEV	CN	STX	C
ECII5	*Saimiri boliviensis*	34	30	34	34		24	22	28	20	6	26
ECII6	*Saimiri boliviensis*	34	30	34	36		22	28	14	18	6	22
ECII12	*Saimiri boliviensis*	36	30	34	36		22	24	32	22	30	30
ECII13	*Saimiri boliviensis*	34	28	34	36		6	23	11	17	6	15
ECII14	*Saimiri boliviensis*	38	32	34	38		6	24	28	20	30	26
ECII24	*Saimiri boliviensis*	37	30	36	36		24	25	24	24	30	30
ECII24MUC	*Saimiri boliviensis*	30	26	30	30		6	24	22	20	30	26
ECII32	*Saimiri boliviensis*	32	26	31	32		21	24	10	17	6	24
ECE27MUCA	*Saimiri boliviensis*	28	28	28	28		6	24	14	18	6	6
ECE27MUCB	*Saimiri boliviensis*	30	24	30	30		6	22	12	24	6	6
ECJ5	*Saimiri boliviensis*	32	28	34	32		24	26	32	26	34	24
ECY11	*Saimiri boliviensis*	30	26	30	30		22	22	16	26	6	20
ECJ19A	*Saimiri boliviensis*	30	28	30	32		6	26	26	26	30	26
ECJ19B	*Saimiri boliviensis*	32	28	30	32		6	22	20	20	26	30

ECJ19C	*Saimiri boliviensis*	32	26	28	32		6	24	22	20	30	26
ECJ19MUC	*Saimiri boliviensis*	16	18	10	10	-	6	24	12	26	6	6
ECJ31A	*Saimiri boliviensis*	22	14	22	20	-	6	24	8	14	26	26
ECJ31B	*Saimiri boliviensis*	32	26	32	34		6	22	10	26	6	16
ECJ33	*Saimiri boliviensis*	30	26	32	30		6	24	30	26	6	26
ECIM2	*Saguinus labiatus*	36	31	32	33		28	32	36	20	34	28
ECIM3	*Saguinus labiatus*	34	26	32	28		22	24	36	20	26	30
ECIM5	*Saguinus labiatus*	33	30	33	30		24	26	36	20	30	28
ECIM6	*Saguinus labiatus*	30	28	30	34		22	24	28	20	6	20
ECIM14	*Saguinus labiatus*	30	25	30	28		6	22	21	13	6	22
ECIM14MUC	*Saguinus labiatus*	33	26	30	30		6	20	22	18	28	24
ECIM19	*Saguinus labiatus*	20	18	10	10	+	6	24	6	18	6	20
ECIM19A	*Saguinus labiatus*	34	22	33	33		6	24	30	18	30	26
ECIM19B	*Saguinus labiatus*	33	28	32	31		6	25	24	14	30	21
ECIM27	*Saguinus labiatus*	33	25	32	32		6	22	10	18	6	12
ECPI1	*Saguinus mystax*	34	26	30	30		22	20	28	18	26	24
ECPI2	*Saguinus mystax*	36	26	30	34		21	25	30	20	28	24

ECPI3	*Saguinus mystax*	28	22	32	32		22	20	30	20	30	28
ECPI3MUC	*Saguinus mystax*	38	32	38	38		30	26	32	24	26	34
ECPI4A	*Saguinus mystax*	36	30	36	36		28	22	32	20	30	30
ECPI4B	*Saguinus mystax*	30	32	38	35		24	22	36	22	30	28
ECPI5	*Saguinus mystax*	36	30	38	36		24	24	36	24	30	30
ECPI7	*Saguinus mystax*	32	28	34	32		6	22	10	18	6	30
ECPI8	*Saguinus mystax*	30	30	35	36		6	24	22	6	6	6
ECPI8MUC	*Saguinus mystax*	30	30	35	36		6	22	30	24	32	30
ECPI10A	*Saguinus mystax*	34	27	36	36		6	24	12	24	30	28
ECPI10B	*Saguinus mystax*	38	32	38	36		6	24	30	26	18	30
ECPI10MUC	*Saguinus mystax*	32	30	36	34		6	24	10	24	6	32
ECPI11	*Saguinus mystax*	36	30	32	36		24	24	32	24	30	30
ECPI12A	*Saguinus mystax*	36	32	36	38		24	22	30	24	28	30
ECPI12B	*Saguinus mystax*	34	24	34	34		22	18	32	22	30	26
ECPI13	*Saguinus mystax*	18	18	14	14	+	6	22	6	6	6	30
ECPI16	*Saguinus mystax*	34	30	38	36		22	24	24	22	28	30
ECPI16A	*Saguinus mystax*	28	28	28	28		6	22	16	18	6	22

ECPI16B	*Saguinus mystax*	28	28	28	30		6	22	12	18	6	22
ECPI16MUC	*Saguinus mystax*	30	28	30	30		6	24	10	24	6	28
ECPI20A	*Saguinus mystax*	34	30	34	34		24	24	6	24	6	28
ECPI20B	*Saguinus mystax*	34	32	38	36		22	28	22	22	30	28
ECPI21	*Saguinus mystax*	38	30	36	40		6	22	32	6	6	30
ECPI21MUC	*Saguinus mystax*	18	16	12	12	+	6	28	10	6	6	6
ECPI	*Saguinus mystax*	32	22	32	31		6	20	6	20	6	10

ATM: Aztreonam 30µg; CAZ: Ceftazidima 30µg; CTX: Cefotaxima 30µg; CRO: Ceftriaxona 30µg; AMC: Amoxicilina/Ácido Clavulánico 30µg/30µg; OT: Oxitetraciclina 30µg; F: Nitrofurantoína 30µg; LEV: Levofloxacino 30µg; CN: Gentamicina 30µg; STX: Trimetoprim/Sulfametoxazol 30µg/30µg; CT: Colistina 30µg; C: Cloranfenicol 30µg. +: Positivo al método de Jarlier empleando AMC; -: Negativo al método de Jarlier empleando AMC.

Anexo 3. Registro del perfil de resistencia de los aislados de *E. coli* de PNH mantenidos en semicautiverio en las Islas Iquitos, Muyuy y Padre Isla de la Cuenca Amazónica Peruana (N=55)

Código	Hospedero	ATM	CAZ	CTX	CRO	AMC	OT	F	LEV	CN	STX	C
ECII5	*Saimiri boliviensis*	S	S	S	S	-	S	S	S	S	R	S
ECII6	*Saimiri boliviensis*	S	S	S	S	-	S	S	R	S	R	S
ECII12	*Saimiri boliviensis*	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S	S
ECII13	*Saimiri boliviensis*	S	S	S	S	-	R	S	R	S	R	I
ECII14	*Saimiri boliviensis*	S	S	S	S	-	R	S	S	S	S	S
ECII24	*Saimiri boliviensis*	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S	S
ECII24(M)	*Saimiri boliviensis*	S	S	S	S	-	R	S	S	S	S	S
ECII32	*Saimiri boliviensis*	S	S	S	S	-	S	S	R	S	R	S
ECE27A(M)	*Saimiri boliviensis*	S	S	S	S	-	R	S	R	S	R	R
ECE27B(M)	*Saimiri boliviensis*	S	S	S	S	-	R	S	R	S	R	R
ECJ5	*Saimiri boliviensis*	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S	S
ECY11	*Saimiri boliviensis*	S	S	S	S	-	S	S	R	S	R	S
ECJ19A	*Saimiri boliviensis*	S	S	S	S	-	R	S	S	S	S	S
ECJ19B	*Saimiri boliviensis*	S	S	S	S	-	R	S	I	S	S	S

ECJ19C	*Saimiri boliviensis*	S	S	S	S	-	R	S	S	S	S	S
ECJ19(M)	*Saimiri boliviensis*	R	I	R	R	-	R	S	R	S	R	R
ECJ31A	*Saimiri boliviensis*	S	R	R	I	-	R	S	R	I	S	S
ECJ31B	*Saimiri boliviensis*	S	S	S	S	-	R	S	R	S	R	I
ECJ33	*Saimiri boliviensis*	S	S	S	S	-	R	S	S	S	R	S
ECIM2	*Saguinus labiatus*	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S	S
ECIM3	*Saguinus labiatus*	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S	S
ECIM5	*Saguinus labiatus*	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S	S
ECIM6	*Saguinus labiatus*	S	S	S	S	-	S	S	S	S	R	S
ECIM14	*Saguinus labiatus*	S	S	S	S	-	R	S	S	I	R	S
ECIM14(M)	*Saguinus labiatus*	S	S	S	S	-	R	S	S	S	S	S
ECIM19	*Saguinus labiatus*	I	I	R	R	+	R	S	R	S	R	S
ECIM19A	*Saguinus labiatus*	S	S	S	S	-	R	S	S	S	S	S
ECIM19B	*Saguinus labiatus*	S	S	S	S	-	R	S	S	I	S	S
ECIM27	*Saguinus labiatus*	S	S	S	S	-	R	S	R	S	R	R
ECPI1	*Saguinus mystax*	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S	S
ECPI2	*Saguinus mystax*	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S	S

ECPI3	*Saguinus mystax*	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S	S
ECPI3(M)	*Saguinus mystax*	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S	S
ECPI4A	*Saguinus mystax*	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S	S
ECPI4B	*Saguinus mystax*	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S	S
ECPI5	*Saguinus mystax*	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S	S
ECPI7	*Saguinus mystax*	S	S	S	S	-	R	S	R	S	R	S
ECPI8	*Saguinus mystax*	S	S	S	S	-	R	S	S	R	R	R
ECPI8(M)	*Saguinus mystax*	S	S	S	S	-	R	S	S	S	S	S
ECPI10A	*Saguinus mystax*	S	S	S	S	-	R	S	R	S	S	S
ECPI10B	*Saguinus mystax*	S	S	S	S	-	R	S	S	S	S	S
ECPI10(M)	*Saguinus mystax*	S	S	S	S	-	R	S	R	S	R	S
ECPI11	*Saguinus mystax*	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S	S
ECPI12A	*Saguinus mystax*	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S	S
ECPI12B	*Saguinus mystax*	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S	S
ECPI13	*Saguinus mystax*	I	I	R	R	+	R	S	R	R	R	S
ECPI16	*Saguinus mystax*	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S	S
ECPI16A	*Saguinus mystax*	S	S	S	S	-	R	S	R	S	R	S

ECPI16B	*Saguinus mystax*	S	S	S	S	-	R	S	R	S	R	S
ECPI16(M)	*Saguinus mystax*	S	S	S	S	-	R	S	R	S	R	S
ECPI20A	*Saguinus mystax*	S	S	S	S	-	S	S	R	S	R	S
ECPI20B	*Saguinus mystax*	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S	S
ECPI21	*Saguinus mystax*	S	S	S	S	-	R	S	S	R	R	S
ECPI21(M)	*Saguinus mystax*	I	R	R	R	+	R	S	R	R	R	R
ECPI	*Saguinus mystax*	S	S	S	S	-	R	S	R	S	R	R

S: Sensible: I: Intermedio; R: Resistente; ATM: Aztreonam 30µg; CAZ: Ceftazidima 30µg; CTX: Cefotaxima 30µg; CRO: Ceftriaxona 30µg; AMC: Amoxicilina/Ácido Clavulánico 30µg/30µg; OT: Oxitetraciclina 30µg; F: Nitrofurantoína 30µg; LEV: Levofloxacino 30µg; CN: Gentamicina 30µg; STX: Trimetoprim/Sulfametoxazol 30µg/30µg; CT: Colistina 30µg; C: Cloranfenicol 30µg. +: Positivo al método de Jarlier empleando AMC; -: Negativo al método de Jarlier empleando AMC. (MUC): mucoide