



Facultad de Veterinaria

Trabajo de
Fin de Grado

Estudio de la presencia de
Escherichia coli productoras de
BLEE en aves silvestres.

Alba Pescador Vázquez

Grado en Veterinaria
Año 2024

Modalidad del Trabajo: Experimental

Licencia

Excepto donde se haga constar explícitamente, esta obra pertenece a Alba Pescador Vázquez y está bajo una licencia de “Creative Commons Reconocimiento 4.0 Internacional”.



1. RESUMEN/ RESUMO/ ABSTRACT

RESUMEN

La lucha contra las resistencias bacterianas constituye uno de los grandes retos de la medicina del siglo XXI. *Escherichia coli* es una bacteria implicada en múltiples enfermedades que afectan tanto al ser humano como a los animales, y además, debido a su ubicuidad y alta plasticidad genética, es una de las bacterias en la que es más frecuente la aparición de cepas resistentes a antibióticos. En particular, la aparición de cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en *E. coli* es un riesgo emergente de pérdida de eficacia en el tratamiento terapéutico de las infecciones causadas por *E. coli*. La fauna silvestre puede actuar como reservorio de estas cepas resistentes y puede poner en riesgo la salud animal y pública. En este estudio analizamos 102 aves silvestres ingresadas en dos Centros de Recuperación de Fauna de dos zonas distintas de España, de las que tomamos muestras mediante hisopos cloacales con el objetivo de evaluar la presencia de *E. coli*, y en particular de cepas BLEE, en estas especies. Se detectó la presencia de *E. coli* en 75/102 de las muestras (73,5 %). En 7 de las 102 aves (6,9 %) se detectó la presencia de ocho cepas con fenotipo compatible con BLEE mediante siembra en medio TBX suplementado con antibiótico. Estas ocho cepas fueron sometidas a una PCR multiplex para identificar los genes de resistencia implicados en la producción de BLEE, detectando la presencia de bla_{CTX-M}, bla_{SHV} y bla_{TEM} en 6 de las cepas (5,9 % del total de aves), siendo el gen más frecuente bla_{CTX-M} (5/6 cepas). La presencia de varios genes de resistencia en la misma cepa también fue frecuente (4/6 cepas). Nuestros resultados confirman la circulación de cepas resistentes a antibióticos en aves silvestres. Serían necesarios estudios posteriores para poder definir más detalladamente el rol preciso de cada especie. La presencia de estas cepas podría constituir un riesgo epidemiológico tanto por los hábitos de ciertas especies (aves carroñeras o habituadas a vivir en ambiente humanizados) que pueden favorecer el contagio, como por sus migraciones, pudiendo dispersar distintos tipos de resistencias durante sus viajes. La detección de cepas resistentes en aves carroñeras sugiere la posibilidad de utilizarlas como indicadoras de contaminación ambiental.

Palabras clave: *E. coli*, BLEE, aves silvestres, resistencias antibióticas, betalactámicos

RESUMO

A loita contra a resistencia bacteriana constitúe un dos grandes retos da medicina do século XXI. *Escherichia coli* é unha bacteria implicada en múltiples enfermidades que afectan tanto a humanos como aos animais, e ademais, pola súa ubicuidade e alta plasticidade xenética, é unha das bacterias nas que é máis frecuente a aparición de cepas resistentes aos antibióticos. En particular, a aparición de cepas produtoras de betalactamasas de espectro estendido (BLEE) en *E. coli* é un risco emerxente de perda de eficacia no tratamento terapéutico das infeccións causadas por *E. coli*. A vida salvaxe pode actuar como reservorio para estas cepas resistentes e pode poñer en risco a saúde animal e pública. Neste estudo analizamos 102 aves silvestres ingresadas en dous Centros de Recuperación de Fauna Silvestre en dúas zonas diferentes de España, das que se tomaron mostras mediante hisopos cloacais co obxectivo de avaliar a presenza de *E. coli*, e en particular cepas de BLEE, nestas especies. A presenza de *E. coli* detectouse en 75/102 das mostras (73,5 %). En 7 das 102 aves (6,9 %) detectouse a presenza de oito cepas con fenotipo compatible con BLEE mediante a sementeira en medio TBX complementado con antibiótico. Estas oito cepas foron sometidas a unha PCR múltiple para identificar os xenes de resistencia implicados na produción de BLEE, detectando a presenza de bla_{CTX-M}, bla_{SHV} e bla_{TEM} en 6 das cepas (5,9% do total de aves), sendo as máis frecuentes. xene bla_{CTX-M} (5/6 cepas). Tamén foi frecuente a presenza de varios xenes de resistencia nunha mesma cepa (4/6 cepas). Os nosos resultados confirman a circulación de cepas resistentes aos antibióticos en aves silvestres. Serían necesarios máis estudos para definir con máis detalle o papel preciso de cada especie. A presenza destas cepas podería constituír un risco epidemiolóxico tanto polos hábitos de determinadas especies (aves carroñeras ou aves afeitas a vivir en ambientes humanizados) que poden favorecer o contaxio, como polas súas migracións, onde se poden dispersar diferentes tipos de resistencias durante as súas viaxes. A detección de cepas resistentes en aves carroñeras suxire a posibilidade de utilizalas como indicadores de contaminación ambiental.

Palabras chave: *E. coli*, BLEE, aves silvestres, resistencias antibióticas, betalactámicos

ABSTRACT

The fight against bacterial resistance constitutes one of the great challenges of 21st century medicine. *Escherichia coli* is a bacteria involved in multiple diseases that affect both humans and animals, and in addition, due to its ubiquity and high genetic plasticity, it is one of the bacteria in which the appearance of strains resistant to antibiotics is most common. In particular, the emergence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing strains in *E. coli* is an emerging risk of loss of efficacy in the therapeutic treatment of infections caused by *E. coli*. Wildlife can act as a reservoir for these resistant strains and can put animal and public health at risk. In this study we analyzed 102 wild birds admitted to two Wildlife Recovery Centers in two different areas of Spain, from which we took samples using cloacal swabs with the aim of evaluating the presence of *E. coli*, and in particular ESBL strains, in these species. The presence of *E. coli* was detected in 75/102 of the samples (73.5 %). In 7 of the 102 birds (6.9 %), the presence of eight strains with ESBL-compatible phenotype was detected by sowing in TBX medium supplemented with antibiotic. These eight strains were subjected to a multiplex PCR to identify the resistance genes involved in the production of ESBL, detecting the presence of bla_{CTX-M}, bla_{SHV} and bla_{TEM} in 6 of the strains (5.9% of the total birds), being the most frequent gene bla_{CTX-M} (5/6 strains). The presence of several resistance genes in the same strain was also frequent (4/6 strains). Our results confirm the circulation of antibiotic-resistant strains in wild birds. Further studies would be necessary to define in more detail the precise role of each species. The presence of these strains could constitute an epidemiological risk both due to the habits of certain species (scavenging birds or birds accustomed to living in humanized environments) that can favor contagion, and due to their migrations, where different types of resistance may be dispersed during their travels. The detection of resistant strains in scavenging birds suggests the possibility of using them as indicators of environmental contamination.

Key words: *E. coli*, ESBL, wild birds, antibiotic resistance, beta-lactams

2. ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. RESUMEN/RESUMO/ABSTRACT | 1 |
| 2. ÍNDICE | 4 |
| 3. ABREVIATURAS | 5 |
| 4. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS | 6 |
| 4.1 Características generales de las infecciones por <i>Escherichia coli</i> | 6 |
| 4.1.1 Etiología | 6 |
| 4.1.2 Importancia clínica de las infecciones por <i>E. coli</i> | 7 |
| 4.1.2.1 Importancia clínica de las infecciones por <i>E. coli</i> en humanos | 8 |
| 4.1.2.2 Importancia clínica de las infecciones por <i>E. coli</i> en animales | 9 |
| 4.2 <i>Escherichia coli</i> y las resistencias bacterianas a antibióticos | 10 |
| 4.2.1 Antibióticos y resistencias bacterianas | 10 |
| 4.2.2 Tipos y mecanismo de resistencias bacterianas | 11 |
| 4.2.3 Antibióticos beta-lactámicos | 12 |
| 4.2.3.1 Definición, mecanismo de acción y tipos de betalactámicos. | 12 |
| 4.2.3.2 Mecanismos de resistencias frente a betalactámicos | 13 |
| 4.2.3.3 Betalactamas de espectro extendido (BLEE) | 13 |
| 4.3 Aves silvestres y BLEE | 14 |
| 4.3.1 El papel de las aves silvestres en la transmisión de patógenos. | 14 |
| 4.3.2 Características de las poblaciones de aves silvestres en España | 15 |
| 4.3.3 Prevalencia de <i>Escherichia coli</i> en aves silvestres | 17 |
| 4.4 Objetivos | 18 |
| 5. MATERIAL Y MÉTODOS | 19 |
| 5.1 Origen de las muestras y características de las zonas de muestreo | 19 |
| 5.2 Toma de muestras y recogida de información epidemiológica | 20 |
| 5.3 Análisis de laboratorio | 23 |
| 5.3.1. Cultivo microbiológico | 23 |
| 5.3.2 Análisis molecular de genes de resistencia | 24 |
| 5.3.2.1 Extracción de ADN | 24 |
| 5.3.2.2 Amplificación con PCR multiplex | 24 |
| 5.3.2.3 Comprobación de la amplificación en gel de agarosa y lectura | 25 |
| 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 26 |
| 6.1 Muestras obtenida e información epidemiológica | 26 |
| 6.2 Presencia de <i>E. coli</i> en las aves muestreadas | 29 |
| 6.3 Presencia de BLEE en las aves muestreadas | 32 |
| 7. CONCLUSIONES | 38 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA | 39 |

3. ABREVIATURAS

| | |
|--|---|
| ADN: Ácido desoxirribonucleico | IBA: Áreas Importantes para la Conservación de las Aves y la Biodiversidad en España |
| AIEC: <i>E. coli</i> adherente invasiva | IPEC: <i>Intestinal pathogenic E. coli</i> |
| AMUS: Acción por el Mundo Salvaje | MAPAMA: Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente |
| APEC: <i>E. coli</i> patogénica aviar | MITECO: Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico |
| ATP: Adenosín Trifosfato | NMEC: <i>E. coli</i> asociada a meningitis neonatal |
| BLEE: Betalactamasa de espectro extendido | OXA: Oxacilinas |
| CRAS: Centro de Recuperación de Animales Silvestres | PBPs: <i>Penicillin-binding proteins</i> |
| CRF: Centros de Recuperación de Fauna | PCR: Reacción en cadena de la polimerasa |
| CTX: Cefotaxima | rpm: Revoluciones por minuto |
| CTX-M: <i>Cefotaximase from Munich</i> | SEO: Sociedad Española de Ornitología |
| DAEC: <i>E. coli</i> adherente difusa | SEPEC: <i>E. coli</i> asociada a septicemia |
| dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato | SHV: <i>Sulfhydryl variant</i> |
| EAEC: <i>E. coli</i> enteroagregativa | TAE: Tris-Acetato-EDTA |
| EHEC: <i>E. coli</i> enterohemorrágica | TBX: Triptona-Bilis-X-glucurónido |
| EPEC: <i>E. coli</i> enteropatógena | UPEC: <i>E. coli</i> uropatogénica |
| ETEC: <i>E. coli</i> enterotoxigénica | VNO: Virus del Nilo Occidental |
| ExPEC: <i>Extraintestinal pathogenic E. coli</i> | ZEPA: Zonas de Especial Conservación para las Aves |

4. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

4.1 Características generales de las infecciones por *Escherichia coli*

4.1.1 Etiología

Escherichia coli es una bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa, con forma de bacilo que forma parte de la familia *Enterobacteriaceae*. Esta bacteria se encuentra en multitud de especies animales donde forma parte de la microbiota del intestino de la mayor parte de los vertebrados de sangre caliente (Riley, 2020). Aunque la relación entre *E. coli* y su hospedador tradicionalmente se había definido como comensalismo, hoy en día se plantea considerarla de mutualismo (Martinson & Walk, 2020), ya que tanto el hospedador como la bacteria resultan beneficiados en la relación: la bacteria obtiene el alimento y el refugio que necesita pero, a cambio, participa en la síntesis de las vitaminas K (Suvarna *et al.*, 1998) y B12; consume el oxígeno que entra en el intestino, creando así un ambiente más favorable para el resto de bacterias anaerobias estrictas que componen la microbiota; y además, con su presencia excluye la posible colonización de otras bacterias patógenas del intestino (Blount, 2015), si bien es cierto que también existen cepas patógenas de la propia bacteria. Por su gran ubicuidad, la facilidad para trabajar con ella, y la rapidez con la que crece en diferentes medios, *E. coli* es una de las bacterias con las que más se ha trabajado en los laboratorios de microbiología en el siglo XX (Blount, 2015), y, por tanto, una de las especies más conocidas y mejor caracterizadas.

El genoma de *E. coli* se caracteriza por presentar una alta variabilidad, de forma que algunas cepas pueden llegar a compartir solo el 20 % de los genes (Riley, 2020). Por tanto, *E. coli* es un ejemplo de especie con pangenoma abierto, es decir, el número de genes totales de la especie no está fijado y puede aumentar a medida que se descubren nuevas cepas o individuos. De esta forma, podemos encontrarnos tres tipos de genes: por un lado, una parte del genoma que se denomina central o “core”, el conjunto de genes que aparecen en la totalidad de las cepas de *E. coli* secuenciadas; otros genes que, solamente se encuentran en una cepa, y que se denominan como genoma único; y por último, están los genes compartidos entre varias cepas pero que no se encuentran en todas, y que conforman el genoma prescindible. Esto otorga una alta plasticidad genética a la bacteria y gran capacidad para adquirir nuevos genes de su entorno, dando como resultado múltiples fenotipos con los que puede adaptarse a diferentes condiciones ambientales (Leimbach *et al.*, 2013).

Como resultado vamos a encontrar una gran variabilidad dentro de la especie. A nivel molecular podemos distinguir ocho grupos filogenéticos: A, B1, B2, C, D, E, F, G, y cinco clados de *Escherichia* (I a V). Los filogrupos se diferencian en las características fenotípicas y genotípicas, así como en los nichos ecológicos que ocupan, la patogenicidad o la probabilidad

de que acumulen genes de resistencia a antibióticos. Dentro del filogrupo B1 hay cepas que se encuentran en el ambiente y que están adaptadas a vivir en el suelo, el agua o las plantas (Lagerstrom & Hadly, 2023). Asimismo, algunas cepas pueden sobrevivir y crecer en el medio sin necesidad de un hospedador (Jang *et al.*, 2017).

El serotipo de las cepas se puede determinar a partir de los antígenos somáticos (O), capsulares (K) y flagelares (H). Tanto las cepas patógenas como las inoñas suelen presentar diversidad de serotipos, si bien algunos son más frecuentes. Por ejemplo, *E. coli* O157H7, causante de muchos brotes por intoxicaciones alimentarias en muchos países (Jang *et al.*, 2017).

4.1.2 Importancia clínica de las infecciones por *E. coli*

Escherichia coli puede causar enfermedad en una gran variedad de especies. Las cepas comensales pueden resultar patógenas en caso de inmunodepresión del hospedador o si atraviesan algunas barreras naturales (Blount, 2015). Sin embargo, existen otras cepas que tienen características específicas de virulencia y patogenicidad que les permite causar de forma primaria diferentes tipos de enfermedades en los seres humanos y en los animales. Estas cepas se incluyen dentro de patotipos en función de los factores de virulencia que presenten, del cuadro clínico que produzcan y de su filogenética.

Principalmente se diferencia entre patotipos intestinales (IPEC) y extraintestinales (ExPEC), con gran variedad de cuadros clínicos (Tabla 1). Los intestinales están representados en los filogrupos A, B1 y C (Lagerstrom & Hadly, 2023), y causan cuadros diarreicos. Los más importantes son: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* adherente invasiva (AIEC) y *E. coli* adherente difusa (DAEC) (Denamur *et al.*, 2020). Las cepas que conforman los patotipos extraintestinales forman parte de la microbiota intestinal, están representadas en los filogrupos B2, D y F (Lagerstrom & Hadly, 2023), y se caracterizan por tener ciertos factores de virulencia que las convierten en patógenas cuando se encuentran en otras partes del organismo. Las más habituales son *E. coli* uropatógena (UPEC), el patógeno más comúnmente asociado a las infecciones del tracto urinario no complicadas (Lüthje & Brauner, 2014), *E. coli* patógena aviar (APEC), responsable de la colibacilosis aviar, causa de grandes pérdidas económicas a nivel industrial por aumentar la mortalidad debido a la aparición de múltiples cuadros como septicemia, pericarditis o infecciones respiratorias (Rocha *et al.*, 2021), *E. coli* asociada a meningitis neonatal (NMEC), que llega a tener un 10 % de mortalidad y hasta un 30 % de morbilidad (Sarowska *et al.*, 2019), y *E. coli* asociada a septicemia (SEPEC), con una mortalidad estimada del 30 % (Biran & Ron, 2018).

Tabla 1: Diferentes patotipos, características y cuadros clínicos que provocan

| Patotipo | Características | Cuadro clínico |
|--------------------------------------|---|---|
| Patotipos intraintraestinales | | |
| EPEC | Lesiones de adhesión y borrado del epitelio intestinal | Diarreas en niños y adultos, sobre todo en países en desarrollo |
| EHEC | Productoras de verotoxinas y shigatoxinas | Colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico-hombre Enfermedad de los edemas-porcino |
| ETEC | Productoras de enterotoxinas LT y ST | Diarreas infantiles en países en desarrollo. Diarreas en animales de producción |
| EAEC | Se apilan en la superficie de los enterocitos | Diarrea aguda autolimitante |
| AIEC | Penetran en los enterocitos y los destruyen | Disentería en países en desarrollo Relacionadas con la enfermedad de Crohn Queratoconjuntivitis en cobayas de experimentación |
| DAEC | Patrón de adherencia difuso a los enterocitos | Diarreas en niños, infecciones tracto urinario en adultos |
| Patotipos extraintestinales | | |
| UPEC | Colonización del tracto urinario, replicación intracelular | Infecciones del tracto urinario |
| APEC | Adhesión e invasión celular, sobreviven dentro de los macrófagos, colonizan diferentes tejidos, replicación intracelular, persistencia en sangre... | Colibacilosis aviar: infecciones respiratorias, septicemia, poliserositis, coligranuloma, infección del saco vitelino, síndrome de la cabeza hinchada |
| NMEC | Mucha heterogeneidad fenotípica y genotípica | Meningitis neonatales |
| SEPEC | Sistemas de fijación al hierro y genes que incrementan su supervivencia en el suero | Cuadros septicémicos |

Elaborado a partir de: Gomes *et al.*, 2016; González, 2017; Biran & Ron, 2018; Sarowska *et al.*, 2019; Denamur *et al.*, 2020; Kathayat *et al.*, 2021; Pakbin *et al.*, 2021.

4.1.2.1 Importancia clínica de las infecciones por *E. coli* en humanos

Escherichia coli es un patógeno importante en el ser humano que además de producir los cuadros diarreicos, de meningitis neonatal, infecciones urinarias o septicemias debido a cepas patógenas, puede ocasionar grandes problemas si cepas que forman parte de la microbiota del

organismo son capaces de acceder a otros órganos. El principal reservorio de la bacteria para el ser humano es el propio tracto intestinal de la especie, pero existen también reservorios ambientales, como la basura o las aguas residuales. Estas pueden jugar un papel importante como fuente de infección para animales silvestres o domésticos, que pueden adquirir cepas patógenas y transmitir las a los humanos. La principal vía de transmisión es la oro-fecal, lo que conlleva que la mayor parte de las infecciones por *E. coli* en los seres humanos ocurran a partir del consumo de alimentos crudos o poco cocinados contaminados, como la carne, la leche no pasteurizada o vegetales mal lavados, que pueden estar contaminados con material fecal de animales u otros humanos. Además, la transmisión directa por contacto estrecho con otras personas o animales infectados también es posible. (Yang *et al.*, 2017; Sarowska *et al.*, 2019; Meena *et al.*, 2023).

En 2019 *E. coli* fue causa de 950.000 muertes en el mundo, de las cuales la mayoría se debieron a infecciones intraabdominales o peritonitis (290.000), seguidas de procesos septicémicos (242.000) y de infecciones respiratorias (181.000), lo que coloca a este agente bacteriano como el segundo causante de más muertes a nivel global, después de *Staphylococcus aureus*. En los últimos años, los principales brotes de *E. coli* en Europa han sido producidos por cepas EHEC (Allocati *et al.*, 2013). En España, los brotes de EHEC han afectado en su mayoría a niños menores de 5 años, sin producir muertes (Centro Nacional de Epidemiología, 2022). Aún así, las cepas diarréicas siguen siendo una de las principales causas de mortalidad infantil en países en desarrollo, debido a un menor acceso a agua potable y menores medidas higiénicas (Gomes *et al.*, 2016).

4.1.2.2 Importancia clínica de las infecciones por *E. coli* en animales

En el mundo animal *E. coli* también es el agente etiológico de importantes procesos clínicos, especialmente en animales de producción (Dubreuil *et al.*, 2016), donde las altas densidades de animales y el estrés pueden favorecer el desarrollo de la infección (Stafford & Gregory, 2008).

Es uno de los agentes que más frecuentemente causa diarreas en terneros, corderos y cerdos de pocos días de vida. Además, en la especie porcina y cunícola también es frecuente como causa de diarreas asociadas al destete o transporte (Dubreuil *et al.*, 2016; Oglesbee & Lord, 2020). En cambio, la diarrea colibacilar es menos frecuente en otras especies ganaderas como aves o caballos. El desarrollo de la enfermedad puede desembocar en la muerte de los animales debido a la deshidratación y al desequilibrio electrolítico, con la consiguiente pérdida de potencial productivo en las explotaciones. La gran mayoría de estos problemas están causados por patotipos ETEC, si bien es cierto múltiples factores como el mal encalostrado de los animales o

malas condiciones de estabulación contribuyen a la aparición de la enfermedad (Dubreuil *et al.*, 2016; Mohammed *et al.*, 2019).

Las consecuencias clínicas de *E. coli* no están limitadas a problemas exclusivamente entéricos. Esta bacteria es una de las principales etiologías de las mamitis del vacuno lechero (Fahim *et al.*, 2019), enfermedad de los edemas en cerdos (Casanova *et al.*, 2018) o problemas respiratorios o septicemias en avicultura (Kabir, 2010; Guabiraba & Schouler, 2015).

Para evitar todas estas infecciones son muy importantes las medidas de bioseguridad, entre las que se encuentra limitar el contacto del ganado con la fauna silvestre, y, en concreto, con las aves silvestres migratorias, ya que son un factor de riesgo importante a tener en cuenta al actuar como reservorio y diseminar distintas cepas durante sus migraciones (Fahim *et al.*, 2019).

En animales silvestres los estudios se centran en su papel como reservorio y potencial de riesgo para animales domésticos y humanos, ya que se ha demostrado que distintas especies, entre ellas las aves silvestres, son portadoras de las mismas cepas patógenas que nos afectan a nosotros (Borges *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2017; Sarowska *et al.*, 2019; Meena *et al.*, 2023).

4.2 *Escherichia coli* y las resistencias bacterianas a antibióticos

4.2.1 Antibióticos y resistencias bacterianas

La acción de los antibióticos en la clínica diaria durante el siglo XX supuso un gran avance para la medicina, que resultó en un gran aumento de la calidad de vida de las personas y de la esperanza de vida media en apenas 100 años. Desde entonces, han aparecido numerosas familias de antibióticos con diferentes mecanismos de acción (Tabla 2).

Tabla 2: Distintos grupos de antibióticos y su mecanismo de acción principal

| Mecanismo de acción | Grupos de antibióticos |
|--|--|
| Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana | Betalactámicos, glucopéptidos, bacitracina, oxazolidinonas y fosfonopéptidos |
| Alteración de la membrana plasmática | Polimixinas, lipopéptidos, ionóforos y formadores de poros |
| Alteración del metabolismo o la estructura de los ácidos nucleicos | Quinolonas, rifamicinas, nitroimidazoles y nitrofuranos |
| Inhibición de la síntesis proteica | Ácido fusídico, aminoglucósidos, anfenícoles, estreptograminas, lincosamidas, macrólidos, mupirocina, oxazolidinonas, tetraciclinas y glicilciclinas |
| Bloqueo de la síntesis de factores metabólicos | Sulfonamidas y diaminopirimidinas |

Tomado de Calvo & Martínez-Martínez, (2009).

Sin embargo, ya con el uso de los primeros antibióticos sintéticos se evidenció la capacidad de adaptación de las bacterias, que llevan millones de años conviviendo con sustancias antibióticas naturales y evolucionando con ellas (Hutchings *et al.*, 2019). La aparición de distintos tipos de resistencias se ha convertido en un gran problema a nivel global tanto en el campo de la medicina humana como en el de la medicina veterinaria, y en muchos países se ha empezado a legislar para limitar la prescripción de antibióticos y hacer un uso racional de ellos. Se estima que se producen unas 700.000 muertes al año en el mundo debido a infecciones por bacterias resistentes a antibióticos, y que esta cifra aumentará hasta las 10 millones de muertes al año en 2050 (Huemer *et al.*, 2020).

4.2.2 Tipos y mecanismo de resistencias bacterianas

Las bacterias pueden tener una resistencia a los antibióticos intrínseca, debido a la existencia de características estructurales o funcionales propias de la bacteria que impidan la acción de los fármacos. Estas resistencias naturales van a ser comunes a todas las cepas de una misma especie. No obstante, también pueden tener resistencias adquiridas que pueden desarrollar a través de mutaciones o de transferencia horizontal de genes. En este caso, las resistencias no son comunes a todas las cepas de una misma especie sino a ciertas cepas. Este tipo de resistencia lleva a que los tratamientos no sean útiles y supone un grave problema para el control de enfermedades infecciosas en animales y en el ser humano, debido a la creciente pérdida de opciones terapéuticas para controlar procesos infecciosos importantes.

Las mutaciones hacen que al entrar en contacto una cepa con un antibiótico sólo sobrevivan las bacterias con la mutación genética que las vuelve resistentes, ejerciendo una presión de selección que hace que cada vez sean más numerosas y que aparezcan nuevas cepas de bacterias resistentes (Munita & Arias, 2016).

Sin embargo, la forma más típica de adquisición de resistencias se realiza a través de transferencia horizontal de genes y es llevada a cabo mediante diferentes elementos genéticos móviles, ya sean cromosómicos como los integrones o los transposones (Poirel *et al.*, 2018), o extracromosómicos, como los plásmidos, moléculas de ADN autónomas con poder replicativo que coexisten dentro de la bacteria con los cromosomas. En particular, los plásmidos juegan un papel muy importante en la transmisión de genes que codifican resistencias, incluso entre especies bacterianas diferentes. El principal mecanismo para la transferencia de plásmidos de una bacteria a otra es la conjugación, en la que es necesaria el contacto célula-célula y la formación de un pili bacteriano; pero también existen otros mecanismos como la transducción, en la que los plásmidos son transportadas por partículas virales denominadas fagos; o a través

de vesículas especializadas en un proceso denominado vesiducción (Rodríguez-Beltrán *et al.*, 2021). Los mecanismos mediante los que se produce la resistencia a los antibióticos se pueden clasificar entre aquellos que consiguen disminuir la concentración de antibiótico intracelular (impidiendo que entre el fármaco o aumentando su eflujo), aquellos que modifican la diana del antibiótico impidiendo que actúe, y aquellos que directamente inactivan el antibiótico, ya sea debido a la modificación del fármaco o a su hidrólisis (Blair *et al.*, 2014; Huemer *et al.*, 2020).

4.2.3 Antibióticos beta-lactámicos

4.2.3.1 Definición, mecanismo de acción y tipos de betalactámicos.

El descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1929, supuso un antes y un después en la historia de la medicina. Desde entonces, muchos otros beta-lactámicos han sido desarrollados para luchar contra las enfermedades infecciosas (Tabla 3).

Tabla 3: Grupos de beta-lactámicos y principales antibióticos

| GRUPO | | ANTIBIÓTICOS |
|-------------------------|---|---|
| PENICILINAS | Penicilinas naturales | Bencilpenicilina/penicilina G, penicilina V |
| | Resistentes a penicilinasas | Metilina, nafcilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina |
| | Penicilinas de amplio espectro | Aminopenicilinas: ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, ticarcilina |
| | Combinaciones con inhibidor de betalactamasas | Ureidopenicilina: piperacilina, mezlocilina |
| | | Ampicilina/sulbactam |
| | | Amoxicilina/ácido clavulánico |
| | | Ticarcilina/ácido clavulánico |
| Piperacilina/tazobactam | | |
| CEFALOSPORINAS | 1ª generación | Cefalexina, cefalotina, cefazolina, cefapirina, |
| | 2ª generación | Cefaclor, cefuroxima, cefamandol |
| | 3ª generación | Cefixima, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, |
| | 4ª generación | Cefepima, cefpiroma |
| | 5ª generación | Ceftarolina |
| CEFAMICINAS | | Cefoxitina, cefotetan |
| CARBAPENEMAS | | Imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem |
| MONOBACTÁMICOS | | Aztreonam |

Tomado de Viso, (2017).

Hoy día, los beta-lactámicos siguen siendo la familia de antibióticos más usada en el mundo. Son eficaces, bien tolerados y tienen baja toxicidad, ya que actúan contra la pared celular de las bacterias que no está presente en las células eucariotas animales. Su mecanismo de acción consiste en la unión covalente e inhibición de las PBPs (*penicillin-binding proteins*), unas enzimas esenciales para la correcta formación de la pared celular en bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, de este modo al inhibir su acción impiden que las bacterias proliferen (Bush & Bradford, 2016).

4.2.3.2 Mecanismos de resistencias frente a betalactámicos

Existen diferentes formas de resistencia que utilizan las bacterias para evitar la acción de los betalactámicos. (Poole, 2004; Viso, 2017)

- Alteraciones en las PBPs: ocurre cuando aparece una mutación en los genes que codifican para la expresión de las PBPs, al encontrarse la diana de los betalactámicos alterada puede aparecer una ausencia o disminución de su efecto.
- Disminución en la permeabilidad: los betalactámicos entran en las bacterias a través de porinas, si estas aparecen alteradas o disminuye su número la entrada del antibiótico se va a ver afectada.
- Aumento del eflujo: normalmente es un proceso activo que consume ATP y aumenta la expulsión del fármaco desde dentro de la célula.
- Betalactamasas: uno de los mecanismos de resistencia más importantes y más comunes que tienen las bacterias, en especial las Gram negativa como *E. coli*, es la producción de betalactamasas, unas enzimas capaces de hidrolizar el grupo amida del anillo beta-lactámico de estos antibióticos (Bush & Bradford, 2016; Tooke *et al.*, 2019).

4.2.3.3 Betalactamas de espectro extendido (BLEE)

Dentro de las betalactamasas son especialmente importantes las de espectro extendido (BLEE), que confieren resistencia frente a penicilinas, aminopenicilinas, monobactámicos y cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación (Poirel *et al.*, 2018). Estas betalactamasas en la mayoría de los casos se encuentran codificadas en plásmidos y se transmiten entre bacterias por transferencia horizontal. En el caso de *E. coli* puede incluso adquirirlas de otras especies diferentes de bacterias dentro de la familia *Enterobacteriaceae* (Poirel *et al.*, 2018). Además, la alta presión de selección a la que ha sido sometida debido al uso indiscriminado de antibióticos en las últimas décadas unido a la gran plasticidad genética de esta bacteria, que le confiere una gran capacidad de adaptación, ha supuesto que aumente en gran medida la prevalencia de las cepas productoras de BLEE (Aslam *et al.*, 2021).

Las BLEE se pueden dividir en varias familias. Las primeras en describirse fueron las TEM, a principios de la década de 1960, denominadas así porque se aislaron por primera vez de un cultivo sanguíneo de una paciente griega llamada Temoneira (Castanheira *et al.*, 2021). Las oxacilinasas (OXA) betalactamasas también fueron de las primeras enzimas con estas características en describirse, con un sustrato mucho más heterogéneo que las ya descritas TEM pero con mucha más actividad contra la oxacilina y la meticilina (Evans & Amyes, 2014). Más tarde, en 1985, se aislaron las BLEE del grupo SHV (*sulphydryl variant*). Esta variante, junto con las TEM, fueron las más comúnmente encontradas hasta la década de los 2000, cuando empezó a crecer la prevalencia de las CTX-M (*cefotaximase from Munich*), una variedad descrita por primera vez en Alemania a finales de los 80, y que desde entonces se ha convertido en la familia de BLEE más encontrada en todo el mundo (Castanheira *et al.*, 2021).

Una de las características bioquímicas más importantes de las BLEE se refiere a su susceptibilidad frente a los inhibidores de las betalactamasas como el ácido clavulánico, el sulbactam o el tazobactam. Esto se ha aprovechado en la clínica diaria en la lucha contra este tipo de resistencias al combinar un antibiótico beta-lactámico con un inhibidor de las betalactamasas, ampliando así el espectro de acción conseguido. En cambio, las OXA no cumplen con esta característica, por lo que su inclusión en el grupo de las BLEE ha sido discutida (Castanheira *et al.*, 2021).

4.3 Aves silvestres y BLEE

4.3.1 El papel de las aves silvestres en la transmisión de patógenos.

Las aves silvestres son sumamente relevantes desde el punto de vista de la Salud Pública. Intervienen directamente en el ciclo epidemiológico de enfermedades zoonóticas importantes como el Virus del Nilo Occidental (VNO); son portadoras asintomáticas de prácticamente todas las combinaciones antigénicas del virus de la influenza aviar, con el consiguiente riesgo de que ocurra reorganización genética con cepas humanas que aumente la virulencia de este virus en nuestra especie; y, además, también pueden contaminarse con enteropatógenos como *E. coli* al alimentarse en aguas residuales y propagar estos patógenos a los seres humanos y/o animales de producción o viceversa, pueden infectarse en las granjas y extender los patógenos a través de sus rutas migratorias (Viso, 2017).

La distinta biología y ecología de las diferentes especies de aves va a influenciar en la manera en que pueden afectar a la transmisión de patógenos a los seres humanos u otras especies domésticas. En el caso de las aves migratorias, sus amplios desplazamientos les permiten dispersar patógenos y vectores artrópodos, lo que puede ocasionar la aparición de nuevos focos endémicos de enfermedad a largas distancias (Viso, 2017). La migración de las aves permite el

mayor aprovechamiento posible de los recursos durante todo el año. Es un comportamiento que muchas aves presentan, se estima que la mitad de las 9.000 especies del mundo (Tellería, 2004), y en su transcurso pueden recorrer hasta 80.000 km anuales, como es el caso del charrán ártico (*Sterna paradisaea*) que en su migración viaja desde un polo a otro (Egevang *et al.*, 2010).

Las especies ligadas al mundo rural y al ganado, como las galliformes silvestres, palomas, córvidos o estorninos, tienen especial relevancia desde el punto de vista de la bioseguridad ganadera (MAPAMA, 2024), ya que pueden transmitir patógenos a las especies domésticas, sin embargo también pueden adquirirlos y propagarlos al resto de la comunidad silvestre (Kuiken & Cromie, 2022). Las rapaces por su parte, debido a su dieta, basada en la depredación de otras especies animales, pueden actuar como bioacumuladores de patógenos al alimentarse de individuos portadores o infectados, incluso algunas enfermedades como el VNO pueden transmitirse de esta manera (Vidaña *et al.*, 2020). Al igual que pasa con el resto de carnívoros, su situación en lo alto de la cadena trófica las convierten en buenas indicadoras del estatus sanitario del ecosistema al que pertenecen (MAPAMA, 2024). En particular, las aves carroñeras, como los buitres, se consideran un buen indicador de contaminación con antibióticos del medio y de transmisión de fuentes antropogénicas de resistencias debido a que muchas veces se alimentan de cadáveres de ganadería extensiva que es tratada con antibióticos (Suarez-Pérez *et al.*, 2021).

4.3.2 Características de las poblaciones de aves silvestres en España

España es un país de gran importancia ornitológica con más de 600 especies de aves diferentes de un total de cerca de 10.000 especies diferentes en todo el mundo según la Sociedad Española de Ornitología (SEO)/BirdLife, (2022). Algunas de las cuales son exclusivas de la península ibérica. Además, constituye un enclave muy importante dentro del Paleártico Occidental para la avifauna migratoria europea por su situación meridional y su gran extensión con gran diversidad de ambientes. Por otra parte, debido a su situación, sirve de puente entre el continente europeo y el africano por lo que es una importante zona de paso migratorio.

La estructura de las poblaciones de aves silvestres es compleja y diversa dada la amplia variedad de factores que la modulan y de especies con diferentes estrategias biológicas, así como aves residentes o migratorias con distintos patrones temporales. De este modo, España recibe aves migratorias en invierno (invernantes) y en primavera y verano (estivales o reproductoras). En términos generales, se considera que el 63 % de las especies son reproductoras y autóctonas, el 15 % son aves migrantes, el 14 % representan a especies exóticas y, además, existe un 8 % de especies que se consideran raras y que no se reproducirían o lo harían de forma ocasional (SEO/BirdLife, 2022).

La distribución de todas estas especies aviarias es heterogénea a través de la geografía española. Las condiciones climáticas propias de cada zona, así como las características geográficas, la disponibilidad tanto de hábitats adecuados como de alimento y el impacto de las actividades humanas van a condicionar el tipo de aves que encontramos. En la Figura 1 podemos ver distintas zonas con distinto número de especies reproductoras, las áreas con mayor número parecen concentrarse a lo largo de las cuencas de ríos importantes como el Ebro, el Tago o el Guadalquivir, mientras que en otras zonas, como las islas, disminuyen las especies que se reproducen allí.

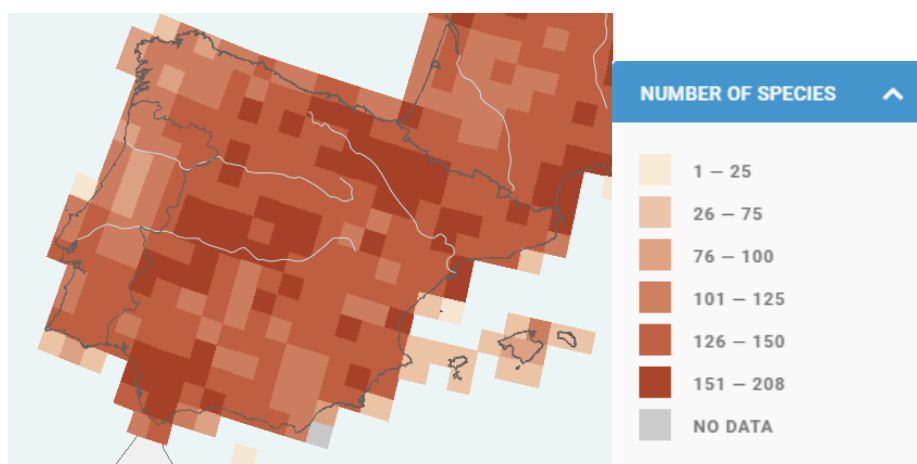


Figura 1: Mapa de biodiversidad de aves reproductoras en la península ibérica.

Tomado de *European Bird Census Council (EBCC)*, (2022).

Para proteger y asegurar a largo plazo las especies y los distintos tipos de hábitat de Europa surge en 1992 la Red Natura 2000, como una red ecológica europea de áreas de conservación de diversidad. En este marco, se crean las Zonas de Especial Conservación para las Aves (ZEPA). Estas son fracciones del territorio necesarias para preservar, mantener o restablecer una diversidad y una superficie suficiente de hábitat para todas las especies de aves incluidas en el Anexo I de la Directiva 2009/147/CE del parlamento europeo y del consejo relativa a la conservación de las aves silvestres (MAPAMA, 2021). La organización SEO/BirdLife define las Áreas Importantes para la Conservación de las Aves y la Biodiversidad en España (IBA) como aquellas zonas en las que se encuentran presentes regularmente una parte significativa de la población de una o varias especies de aves consideradas prioritarias. En España se han identificado 469 IBA (SEO/BirdLife, 2011) y el Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) identifica 662 ZEPA (MITECO, s. f.) (Figura 2). Muchas de ellas coinciden con zonas de alta biodiversidad de aves reproductoras (Figura 1), como es el caso de la comunidad autónoma de Extremadura.

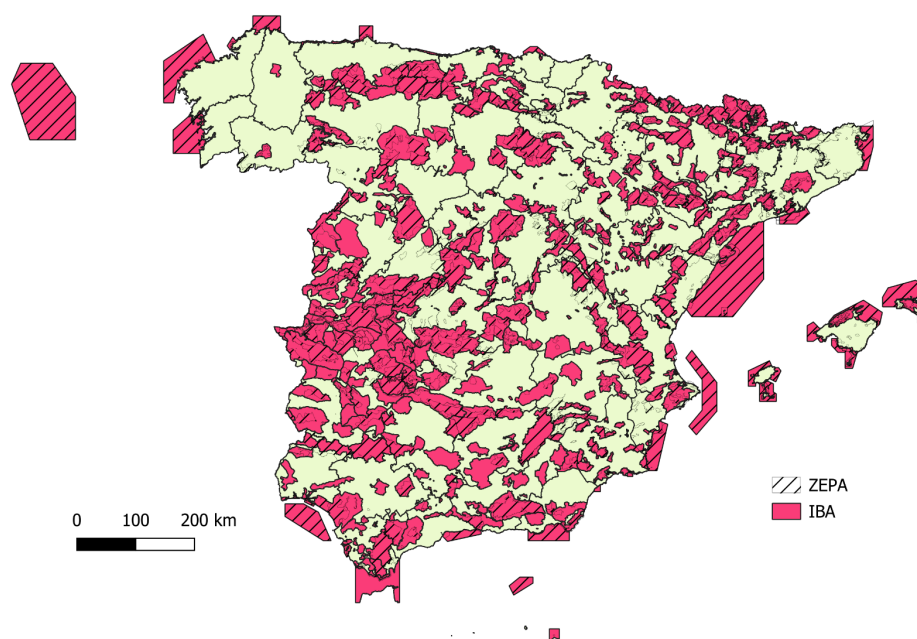


Figura 2: Mapa representativo de zonas ZEPA e IBA en España.

Elaboración propia a partir de: SEO/Birdlife, 2011; MAPAMA, 2021.

4.3.3 Prevalencia de *Escherichia coli* en aves silvestres

Escherichia coli puede encontrarse fácilmente en muestras cloacales en aves silvestres al formar parte de la microbiota normal de estos animales, aunque las prevalencias entre especies pueden diferir: en Canadá Parker *et al.* (2016) describieron una prevalencia total de 68 % que variaba desde 44,8 % para zorzal pechirrojo (*Turdus migratorius*) hasta un 92 % para el cuervo americano (*Corvus brachyrhynchos*); en Europa también se han descrito estas diferencias entre especies, Guenther *et al.* (2012) en un estudio enfocado en las aves rapaces obtuvieron desde un 69,2 % de prevalencia en los milanos negros (*Milvus migrans*) muestreados, hasta un 22 % en los busardos ratoneros (*Buteo buteo*), con una prevalencia total encontrada de 38 %. También aparecen diferencias en las prevalencias de *E. coli* obtenidas en función del origen de las muestras, Gargiulo *et al.* (2018) encontraron una baja prevalencia en muestras de mucosa intestinal de cadáveres de aves rapaces (6,8 %) frente a 54,5 % en hisopos cloacales de aves vivas (Giacopello *et al.*, 2016)

Por otra parte, la primera cita de resistencias bacterianas a antibióticos en fauna salvaje se registró con cepas de *E. coli* en palomas en 1975 (Sato *et al.*, 1978), y desde la primera descripción de *E. coli* productora de BLEE en animales de vida salvaje, en 2006 en aves de un centro de recuperación de fauna en Portugal (Costa *et al.*, 2006), se han encontrado resistencias de tipo BLEE en aves salvajes en todos los continentes excepto en la Antártida (Bonnedahl & Järhult, 2014; Nešporová *et al.*, 2020). Incluso han aparecido en zonas remotas con poca

influencia del ser humano prevalencias comparables a aquellas encontradas en zonas más humanizadas (10,8 % de las aves muestreadas en una zona remota de Mongolia frente a 13,8 % en zona humanizada de Alemania) (Guenther *et al.*, 2012).

Las cepas de *E. coli* productoras de BLEE que afectan a aves silvestres pueden ser las mismas que afectan a los seres humanos. Por ejemplo, en Francia se encontraron en gaviotas patiamarillas (*Larus michahellis*) las mismas cepas bacterianas productoras de la BLEE CTX-M-1 que es la más presente en la clínica humana en el país (Bonnedahl *et al.*, 2009). Teniendo esto en cuenta adquiere especial relevancia el papel de las migraciones de las aves, ya que cepas resistentes pueden diseminarse a zonas más aisladas donde no parece haber influencia del ser humano, o a otras zonas humanizadas y transmitiendo así nuevas cepas para los habitantes de lugares lejanos. Esto se vio reflejado en un estudio en Chile (Hernández *et al.*, 2013); en él se observó que los seres humanos y las gaviotas de Franklin (*Leucophaeus pipixcan*) comparten la misma secuencia de los genes que codifican para la producción de BLEE en *E. coli*, con una prevalencia de más del doble en las gaviotas. Además, esta secuencia era la misma que aparecía en humanos en la zona de Canadá donde las mismas gaviotas anidan tras migrar, lo que sugiere, aparte de una transmisión interespecie, una dispersión del mismo mecanismo de resistencia a través de la migración de las gaviotas.

En España, las BLEE más extendidas en la clínica de humanos son las CTX-M-1 (Pérez *et al.*, 2019) y la SHV-12 (Díaz *et al.*, 2010), también son las más encontradas en aves silvestres (Alcalá *et al.*, 2015; Oteo *et al.*, 2018). Al ser España un país con una gran diversidad de aves silvestres que acoge a un gran número de especies migradoras, es especialmente importante hacer una vigilancia de la presencia de genes codificantes de BLEE en las aves, tanto para prevenir que lleguen nuevas cepas que puedan suponer un riesgo de salud pública, como para controlar el nivel de dispersión de resistencia a estos antibióticos en el medio ambiente.

4.4 Objetivos

Debido a la ya mencionada importancia de las resistencias a antibióticos, en especial de las BLEE en *E. coli* por las razones ya expuestas, y al importante papel que desempeñan las aves silvestres; en este estudio hemos definido los siguientes objetivos:

1. Evaluar la presencia de *E. coli* en distintas especies de aves silvestres.
2. Evaluar la presencia de *E. coli* productoras de BLEE en distintas especies de aves silvestres.
3. Estudiar qué genes implicados en la producción de BLEE están presentes en las cepas de *E. coli* detectadas en aves silvestres.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Origen de las muestras y características de las zonas de muestreo

Las muestras de aves analizadas en este estudio se tomaron de aves remitidas a dos centros de recuperación de fauna silvestre. Estos centros atienden y rehabilitan a ejemplares heridos, enfermos o debilitados de la fauna silvestre, con el fin de que puedan ser devueltos en las mejores condiciones a su hábitat natural. Las aves son encontradas por particulares o directamente por los agentes medioambientales de cada comunidad autónoma que son los encargados de recogerlas y trasladarlas. La casi totalidad de las causas de ingresos son provocadas directa o indirectamente por el ser humano, siendo las más frecuentes electrocuciones, disparos, atropellos o intoxicaciones (Molina, 2013; SEO/BirdLife, 2023).

Debido a la amplia variabilidad de especies y situaciones epidemiológicas, se seleccionaron dos zonas de muestreo distintas que abarcan el área de trabajo de dos centros de recuperación de fauna silvestre: Acción por el Mundo Salvaje (AMUS, Villafranca de los Barros, Badajoz), que recibe toda la fauna silvestre recogida en la provincia de Badajoz, con una extensión de 21.766 km² (Zona 1); y el Centro de Recuperación de Animales Silvestres (C.R.A.S) de Burgos (Albillos, Burgos), que recoge ejemplares procedentes de las provincias de Burgos, Palencia y Soria, cubriendo una extensión de 32.650 km² (Zona 2).

Las zonas de muestreo presentan diferencias climáticas y geográficas que influyen en la densidad, distribución y tipo de especies que predominan en cada una de ellas.

La Zona 1 presenta un clima mediterráneo en el que los veranos son calurosos con una temperatura media de 26°C y los inviernos suaves con una media de 6°C, con precipitaciones moderadas concentradas sobre todo en otoño y primavera (Fernández *et al.*, 2011). Se encuentra en la comunidad autónoma de Extremadura que presenta una gran diversidad de paisajes y una gran riqueza de avifauna, como demuestra que sea la comunidad autónoma de España con más Zonas de Especial Protección para las Aves (ZEPA) (71). De estas, 33 se encuentran en Badajoz, ocupando unas 596.264 Ha (datos de la Junta de Extremadura). Muchas de ellas incluyen zonas húmedas, debido a la gran cantidad de embalses y pantanos de la provincia, donde es fácil encontrar anátidas, garzas, limícolas, espátulas, gaviotas, cormoranes y otras muchas especies aviarias. También son importantes los campos de cultivo de cereal y las zonas de dehesa donde podemos encontrar aves típicas de zonas abiertas como la avutarda euroasiática (*Otis tarda*), el sisón común (*Tetrax tetrax*), alcaraván común (*Burhinus oedicephalus*), el aguilucho cenizo (*Circus pygargus*) o el cernícalo primilla (*Falco naumanni*), pero también otras de zonas arbustivas y forestales como el rabilargo ibérico (*Cyanopica cooki*), el abejaruco europeo

(*Merops apiaster*), la carraca europea (*Coracias garrulus*), el cuco común (*Cuculus canorus*), el mochuelo europeo (*Athene noctua*), la abubilla común (*Upupa epops*) o la cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*) y negra (*Ciconia nigra*). En toda la provincia son abundantes las aves rapaces de las que aparecen gran variedad como el águila real ibérica (*Aquila chrysaetos*), el águila imperial (*Aquila adalberti*), el alimoche común (*Neophron percnopterus*), el buitre leonado (*Gyps fulvus*) o el buitre negro (*Aegyptius monachus*), el águila perdicera (*Aquila fasciata*), el cernícalo vulgar (*Falco tinnunculus*), el búho real (*Bubo bubo*), el águila calzada (*Hieraaetus pennatus*), la culebrera europea (*Circaetus gallicus*), el milano negro (*Milvus migrans*), el milano real (*Milvus milvus*) o el busardo ratonero (*Buteo buteo*). Extremadura es, además, la comunidad autónoma donde inverna el grueso de la población de grulla común (*Grus grus*) europea.

En cambio, la Zona 2 presenta un clima oceánico-continental, en el que los inviernos son largos y pueden alcanzarse hasta 12 °C bajo cero, y los veranos son cortos y calurosos. Abarca tres provincias, Burgos, Palencia y Soria, con una densidad de población de 24,91; 19,76; y 8,6 hab/km² respectivamente, y en las que encontramos un total de 23 zonas ZEPA. Los paisajes que encontramos van desde la alta montaña hasta las llanuras cerealistas de la meseta, por lo que podemos encontrar tanto aves asociadas a medios agrícolas como escribanos, gorriones, alondras, perdiz roja (*Alectoris rufa*), cernícalo vulgar (*F. tinnunculus*), o mochuelo europeo (*A. noctua*), a medios forestales como pico picapinos (*Dendrocopos major*), arrendajo euroasiático (*Garrulus glandarius*), oropéndola europea (*Oriolus oriolus*), rabilargo ibérico (*C. cooki*) o cuco común (*Cuculus canorus*), como adaptados a vivir entre riscos montañosos como el águila real ibérica (*A. chrysaetos*), el buitre leonado (*G. fulvus*), la chova piquigualda (*Pyrrhocorax graculus*) o el roquero rojo (*Monticola saxatilis*).

5.2 Toma de muestras y recogida de información epidemiológica

La recogida de muestras se realizó a principios de 2023 y se dividió en dos fases. En la primera fase se recogieron muestras de la Zona 1 durante cinco semanas desde febrero a marzo de 2023, y la segunda se llevó a cabo posteriormente en la Zona 2 durante cuatro semanas del mes de abril de 2023. En total se muestrearon 102 aves: 71 de la Zona 1 y 31 de la Zona 2. Las entradas de aves en los centros de recuperación pueden ser tanto de animales vivos como de cadáveres para ser practicada la necropsia. Al llegar al centro a cada animal se le asigna un número de entrada y es evaluado por los veterinarios encargados.

Se tomaron muestras de las aves que ingresaron en el centro durante el período de recogida de muestras (vivas o muertas), así como de aves que ya estaban presentes en el centro al inicio del estudio. En el primer caso, se recogieron las muestras a la recepción de cada ave, durante el

reconocimiento veterinario, y en el segundo, en momentos en los que necesitaron ser manejadas por el personal del centro, con el objetivo de evitar estrés innecesario, como por ejemplo durante la realización de curas, muestreos rutinarios de influenza aviar, traslados a otros centros, o en liberaciones.

La toma de muestras se realizó mediante hisopo cloacal de animales vivos, o bien durante las necropsias realizadas durante el período de recogida de muestras. Los hisopos se guardaron en medio Amies (Deltalab, Barcelona, España) y se mantuvieron en refrigeración hasta su envío al laboratorio. Con el objetivo de reducir la cantidad de envíos, las muestras se remitieron al laboratorio semanalmente, todos los lunes, enviando a la vez todas las muestras recolectadas durante la semana. Las muestras se transportaron en neveras equipadas con acumuladores de frío. Una vez en el laboratorio se procesaron en menos de 48 horas.

Con cada muestra se registró el centro; el número de historia asignado; la fecha de ingreso del animal y de recogida de la muestra; el municipio donde el ave fue recogida; la especie; el sexo; la edad; la causa del ingreso; si se trataba de un animal vivo o de un cadáver; si había recibido algún tratamiento antibiótico en el mes anterior a la recogida de la muestra; y si presentaba signos de enfermedad.

Para determinar el sexo se atendió a características externas relacionadas por ejemplo con el tamaño corporal o el diseño del plumaje (Ollé & Trabalon, 2019; Blasco-Zumeta & Heinz, 2023). Sin embargo, en algunos ejemplares vivos no fue posible determinar el sexo de esta forma ya que ciertas especies de aves (como el buitre leonado o la cigüeña blanca), no presentan dimorfismo sexual aparente, y se registró como “indeterminado”. No obstante, en algunos ejemplares de las especies sin dimorfismo sexual se pudo registrar el sexo ya que fueron sometidos a análisis genético para determinar el sexo por interés del centro.

En cuanto a la edad, se usaron métodos de datación basados en las mudas del plumaje y las características de cada especie para determinar el año calendario en el que se encontraban las aves (Ollé & Trabalon, 2019; Blasco-Zumeta & Heinz, 2023). Cuando se habla de "año calendario" en la medición de la edad de las aves silvestres, se refiere al conteo de años completos según el calendario humano convencional, es decir, se considera que el primer año de vida de un ave comienza desde su nacimiento y continúa hasta el final del primer año calendario completo. Este enfoque de medición de la edad se utiliza comúnmente en estudios científicos y observaciones de aves, ya que facilita la comparación y el seguimiento de las edades de las aves en diferentes momentos y lugares. En consecuencia, los individuos se clasificaron en “0-1 años”: pollos nacidos esa misma primavera o para las aves en su segundo año calendario, “1-2 años”: aves en su tercer año calendario, y “2 años o más” para el resto, ya que en muchas especies a partir del tercer año calendario se alcanza el plumaje de adulto, lo que dificulta la

datación exacta de la edad. Para las aves en las que no fue posible establecer una edad se anotó como “indeterminado”.

Sin embargo, es importante tener en cuenta que la madurez del animal puede variar según su ciclo de vida y desarrollo de la especie, por ello también se clasificó entre “pollos”, “juveniles”, y “adultos”, teniendo en cuenta que diferentes especies alcanzan la madurez y el plumaje de adulto en diferentes momentos (Tabla 4).

Tabla 4: Año calendario en el que cada especie muestreada presenta el plumaje y las características físicas del adulto.

| FAMILIA | ESPECIE | EDAD ADULTA |
|---------------------|---|--------------------|
| <i>Accipitridae</i> | Gavilán común (<i>Accipiter nisus</i>), Aguilucho pálido (<i>Circus cyaneus</i>), Aguilucho lagunero (<i>Circus aeruginosus</i>) | 3º año calendario |
| | Milano real (<i>Milvus milvus</i>), Milano negro (<i>Milvus migrans</i>), Busardo ratonero (<i>Buteo buteo</i>), Aguilucho cenizo (<i>Circus pygargus</i>) | 4º año calendario |
| | Buitre leonado (<i>Gyps fulvus</i>), Buitre negro (<i>Aegypius monachus</i>), Alimoche común (<i>Neophron percnopterus</i>) | 5º año calendario |
| | Águila real (<i>Aquila chrysaetos</i>), Águila imperial ibérica (<i>Aquila adalberti</i>) | 6º año calendario |
| <i>Falconidae</i> | Cernícalo vulgar (<i>Falco tinnunculus</i>), Cernícalo primilla (<i>Falco naumanni</i>), Esmerejón (<i>Falco columbarius</i>) | 3º año calendario |
| <i>Strigidae</i> | Búho chico (<i>Asio otus</i>) | 3º año calendario |
| | Búho real (<i>Bubo bubo</i>), Cárabo común (<i>Strix aluco</i>) | 5º año calendario |
| <i>Ardeidae</i> | Garza real (<i>Ardea cinerea</i>), Garcilla bueyera (<i>Bubulcus ibis</i>) | 3º año calendario |
| <i>Gruidae</i> | Grulla común (<i>Grus grus</i>) | 3º año calendario |
| <i>Ciconiidae</i> | Cigüeña blanca (<i>Ciconia ciconia</i>) | 3º año calendario |
| <i>Laridae</i> | Gaviota sombría (<i>Larus fuscus</i>) | 4º año calendario |
| <i>Cuculidae</i> | Críalo europeo (<i>Clamator glandarius</i>) | 3º año calendario |
| <i>Fringillidae</i> | Jilguero europeo (<i>Carduelis carduelis</i>) | 3º año calendario |

Elaboración propia a partir de Ollé & Trabalon, (2019); Blasco-Zumeta & Heinz, (2023).

5.3 Análisis de laboratorio

5.3.1. Cultivo microbiológico

Para identificar la presencia de *E. coli* e identificar las muestras portadoras de cepas productoras de BLEE cada hisopo se sembró en dos placas con medio de cultivo Triptona-Bilis-X-glucurónico (TBX) (Labbox, Barcelona). En una de las placas el medio se suplementó con cefotaxima diluida a una concentración de 2 mg/ml (TBX/CTX).

El TBX es un medio enriquecido que contiene extracto de soja, tripticasa y otros nutrientes que favorecen el crecimiento bacteriano. Es un medio selectivo, ya que permite el crecimiento de enterobacterias e inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas, y diferencial para *E. coli* ya que contiene un compuesto cromogénico (5-bromo-4-cloro-3-indolol- β -D-glucurónico) que reacciona con la enzima β -D glucuronidasa que produce *E. coli* haciendo que las colonias de esta bacteria puedan ser diferenciadas por su color azul-verdoso, mientras que otras coliformes no presentan color (Figura 3).

Por otro lado, la adición de cefotaxima, antibiótico de la familia de los betalactámicos (cefalosporina de tercera generación), solo permite el crecimiento de las colonias de *E. coli* resistentes a este tipo de antibióticos y se utiliza como *screening* marcador de la presencia de resistencias tipo BLEE (World Health Organization, 2021).

De esta manera, el medio TBX nos permite hacer un *screening* visual de la presencia de *E. coli* en las muestras, y el medio TBX/CTX nos permite identificar si los *E. coli* presentes en la muestra son resistentes a CTX. Una vez inoculadas, las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C y se leyeron y se registraron los crecimientos.

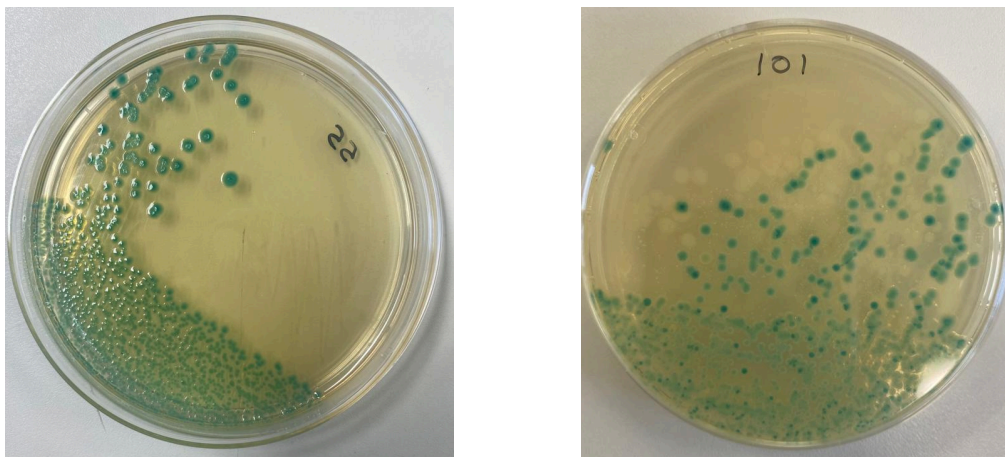


Figura 3: Cultivo de muestras en TBX/CTX con crecimiento de *E. coli* resistentes a cefotaxima (azules) y otras colonias (blancas). Fotografías propias.

Las colonias que crecieron en TBX/CTX compatibles con *E. coli* se seleccionaron, se sembraron en agar sangre (VWR, Radnor, Pensilvania, EE.UU.) y se incubaron también 24h a 37°C para obtener cultivos puros de colonias resistentes a cefotaxima. Cuando en el medio TBX/CTX se detectaron colonias compatibles con *E. coli* que presentaron un aspecto morfológico diferente (textura, tamaño..) se aisló una colonia de cada tipo.

5.3.2 Análisis molecular de genes de resistencia

5.3.2.1 Extracción de ADN

Los cultivos puros de *E. coli* resistentes a cefotaxima se utilizaron para analizar la presencia de genes de resistencia a beta-lactámicos. En primer lugar se realizó la extracción de ADN siguiendo la metodología recomendada por Nakai *et al.*, (2016). Se tomó una estría de cada cultivo puro y se mezcló en un tubo Eppendorf con 200 µl de tris-EDTA estéril, que se colocó en un agitador (BenchMixer™, Benchmark Scientific, Edison, Nueva Jersey, EE. UU.) durante un minuto a máxima velocidad. Después, las muestras se incubaron durante 15 minutos a 100 °C en agitación a 300 rpm (Eppendorf ThermoMixer C, Hamburgo, Alemania). Las muestras se mantuvieron 15 minutos en una gradilla con hielo para, posteriormente, ser centrifugadas durante cinco minutos a 13.000 rpm y así obtener el ADN en el sobrenadante, del que se pasaron 100 µl a un tubo Eppendorf limpio.

5.3.2.2 Amplificación con PCR multiplex

Con el ADN extraído se hizo una PCR multiplex para buscar los genes: bla_{SHV}, bla_{TEM}, bla_{CTX-M} y bla_{OXA}. Las secuencias de los primers utilizados y el tamaño del amplicón esperado se muestran en la Tabla 5. Para la realización de la PCR, la *master mix* se compuso mezclando: 2 µl del ADN extraído; 1 µl de Cl₂Mg 50mM; 2,5 µl de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) 2 mM; 1 µl de los cebadores para cada gen (0,5 µl del Forward y 0,5 µl del Reverse) a 10µlM (4 µl de cebadores en total) (TIB Molbiol, Berlín, Alemania); 0,2 µl de Taq Polimerasa 5 U/µl con 2,5 µl de su tampón correspondiente (Nzytech, Lisboa, Portugal); y, por último, se completó añadiendo 12,8 µl de agua para hacer un volumen total de 25 µl de mix.

El protocolo térmico de la PCR que se utilizó constituyó de los siguientes pasos:

- Fase inicial de desnaturalización de 15 min a 95°C
- Repetición de 35 ciclos consistentes en:
 - Una fase de desnaturalización del ADN durante 30 s a 94°C.
 - Fase de emparejamiento a 62°C durante 90 s.
 - Fase de elongación a 72°C durante 1 min.

- Para terminar la elongación de todos los productos que estuvieran incompletos la PCR se mantuvo al final a 72°C durante 10 min.

Tabla 5: Primers utilizados en la amplificación por PCR multiplex.

| Primer | Forward | Reverse | pb* | Referencia |
|----------------------------|---|----------------------------------|------------|----------------------------------|
| bla _{SHV} | CTT TAT CGG CCC TCA CTCAA | AGG TGC TCA TCA TGG GAA AG | 237 | (Fang <i>et al.</i> , 2004) |
| bla _{TEM} | CGC CGC ATA CAC TAT TCT CAG AAT GA | TCC AGA TTT AT | 445 | (Monstein <i>et al.</i> , 2007) |
| bla _{CTX-M} ** | AGT AAR GTK ATG GC TGG GTR AAR TAR | GTS ACC AGA AYC AGC GG | 596 | (Boyd <i>et al.</i> , 2004) |
| bla _{OXA} | TCA ACT TCG C | ATG GTG ATC | 813 | (Ouellette <i>et al.</i> , 1987) |

Elaboración propia. *Pares de bases. **En la secuencia de bla_{CTX-M} la R corresponde a una purina, la Y a una pirimidina y la S corresponde a una guanina o una citosina (Boyd *et al.*, 2004).

5.3.2.3 Comprobación de la amplificación en gel de agarosa y lectura

Para visualizar el resultado de la PCR, los productos de la PCR se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa. El gel se preparó disolviendo la agarosa (Nzytech, Lisboa, Portugal) al 1 % en 60 ml de Tris-Acetato-EDTA (TAE) y se añadieron 3 µl de colorante RedSafe (iNtRON Biotechnology, Seongnam-si, Corea del Sur) para permitir la visualización de los fragmentos en el analizador de imágenes.

Para cargar las muestras en el gel se mezclaron primero 10 µl del ADN amplificado con 2 µl de tampón de carga 6× NZYDNA loading dye (Nzytech, Lisboa, Portugal) en una placa de microtitulación. A continuación, se sumergió el gel de agarosa en solución TAE dentro de una cuba de electroforesis (Bio-rad, California, EE.UU.) y se añadieron los 12 µl de muestra con el tampón de carga a los pocillos correspondientes del gel, reservando el primer pocillo del gel para añadir 5 µl de un marcador o *ladder* de peso molecular (NZYDNA Ladder V, Nzytech, Lisboa, Portugal). La electroforesis se realizó con una tensión de 100 V y 400 mA durante 1 h para obtener la migración del ADN en función de su peso molecular.

Una vez concluida se utilizó el analizador de imagen GelDoc Go Imaging System (Bio-Rad, California, EE.UU.) y el software QuantityOne (Bio-Rad, California, EE.UU.) para visualizar los resultados.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Muestras obtenida e información epidemiológica

Se muestrearon un total de 102 aves, de las cuáles 75 (73,5 %) estaban vivas en el momento de la recogida de la muestra. 27 de estas 75 fueron muestreadas en el momento de ingreso en el centro y 48 ya se encontraban allí, con estancias que variaban desde un día hasta un año y siete meses. El resto, 27/102 (26,5 %), eran cadáveres tanto frescos como descongelados. En relación con la zona de muestreo, 71 aves fueron muestreadas en la Zona 1 (69,6 %) y 31 en la Zona 2 (30,4 %). No obstante, en la Zona 1, ocho muestras pertenecen a aves que habían sido trasladadas previamente desde el Centro de Recuperación de Fauna Silvestre “Los Hornos”, en Cáceres, fuera de la zona de muestreo inicial, que iba a limitarse a la provincia de Badajoz, y se decidió mantenerlas en el estudio para comprobar si eran portadoras de resistencias frente de tipo BLEE. La distribución espacial de las aves se muestra en la Figura 4. Las provincias en las que se localizan los centros presentan una mayor densidad de aves capturadas. Aún así, se consiguió abarcar todas las provincias de las zonas de muestreo: 63 aves procedentes de la provincia de Badajoz, 25 de Burgos, tres de Palencia, y tres en la de Soria.

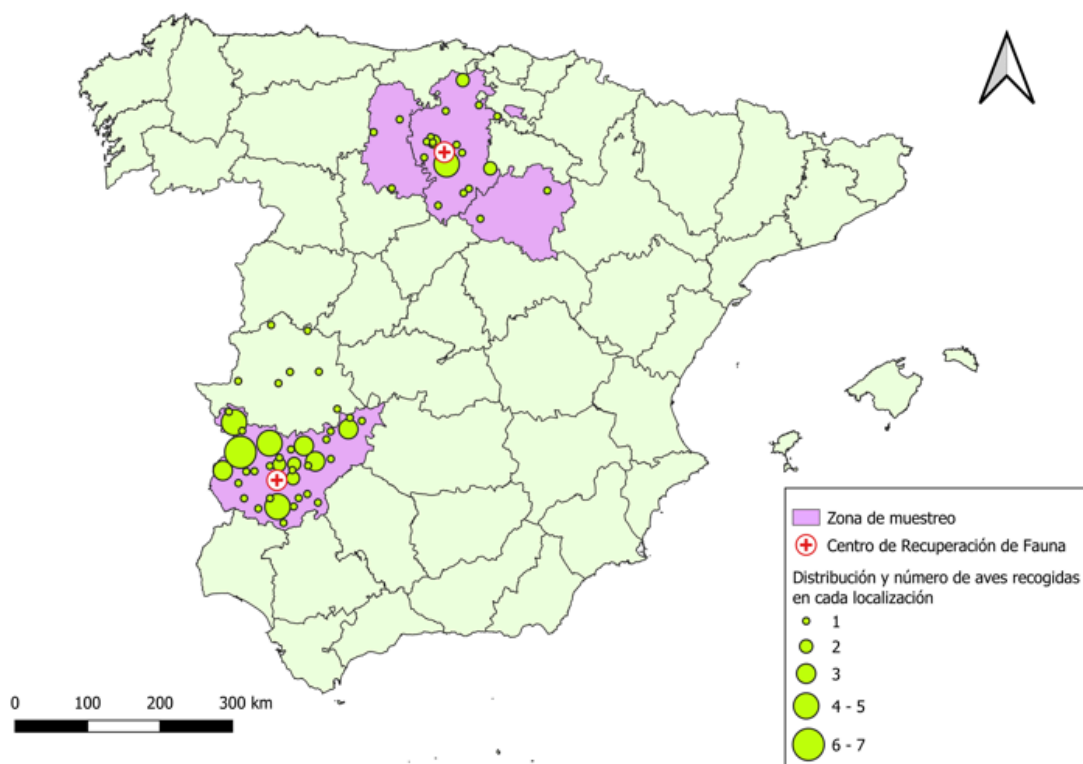


Figura 4: Distribución y número de aves recogidas.

Las muestras obtenidas en este trabajo proceden de una amplia variedad de especies y familias. En total se tomaron muestras de nueve familias de aves y 25 especies. Las proporciones fueron heterogéneas, las familia *Accipitridae* (60,8 %) y *Ciconiidae* (21,5 %) estuvieron representadas en una proporción notablemente mayor (Figura 5), y dentro de ellas, el buitre leonado (47 %) y la cigüeña blanca (100 %), respectivamente. La sobrerrepresentación de estas especies es consecuente con su alta población en España; ambas especies cuentan con una población grande con tendencia creciente en nuestro país y están presentes de manera habitual en las zonas muestreadas (SEO/BirdLife, 2022). Este hecho observado en el presente estudio concuerda con otros estudios similares realizados en España, en los que estas dos especies también son las más muestreadas (Alcalá *et al.*, 2015). Si bien es cierto que el porcentaje de aves muestreadas de la familia *Accipitridae* es mayor en la Zona 2 (87 %) que en la Zona 1 (50,7 %) y el de las cigüeñas blancas en la Zona 1 (28,2 %) mayor que en la Zona 2 (6,5 %).

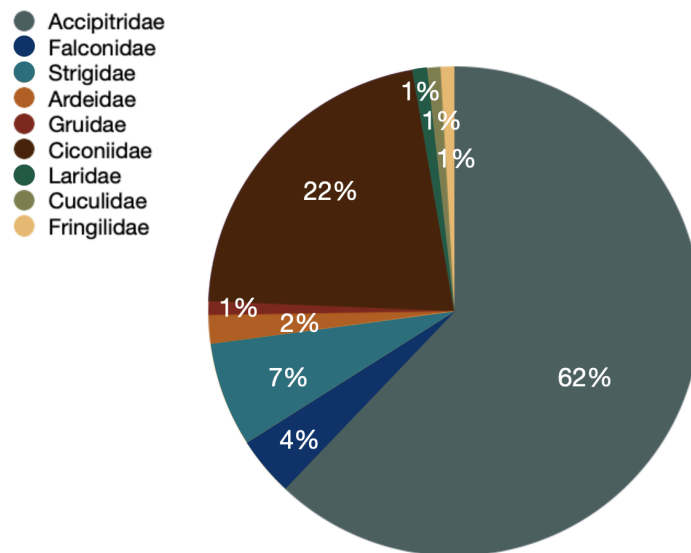


Figura 5: Familias muestreadas.

Los animales que ingresaron en los Centros de Recuperación de Fauna (CRF) no mostraron signos de enfermedad, a excepción de dos aves afectadas de panoftalmítis. Al contrario, la causa más frecuente de ingreso (34 %; 35/102) estuvo relacionada con alguna intervención humana (disparos, electrocuciones, posibles intoxicaciones, atropellos, cautividad, o colisiones con eólicos y vallas cinegéticas); aunque una proporción muy similar de las aves (28,4 %; 29/102) ingresaron debido a diferentes traumatismos de origen desconocido (Figura 6). Hay que tener en cuenta que una parte de estos también podrían estar relacionados con el ser humano. Los ingresos por debilidad se concentraron principalmente en los buitres leonados (20/22) y fueron una de sus principales causas de ingreso (20/30). En esta especie es frecuente que se produzcan

este tipo de problemas debido a la incapacidad de encontrar comida durante los primeros vuelos juveniles (López *et al.*, 2001) lo que suele ocurrir en los últimos meses del verano y primeros del otoño, pero en AMUS estos ejemplares, que ingresaron en general entre julio y octubre de 2022, seguían en sus instalaciones ya que más adelante fueron trasladados a Chipre y Cerdeña dentro de un programa de reintroducción de la especie. Esto puede influir en que la proporción de animales ingresados por debilidad en este estudio sea considerable. Las causas de ingreso observadas en este trabajo son coherentes con la información bibliográfica previa, ya que se ha descrito reiteradamente que el factor humano es una de las causas más frecuentes de ingreso en los CRF (Molina, 2013; SEO/BirdLife, 2023).

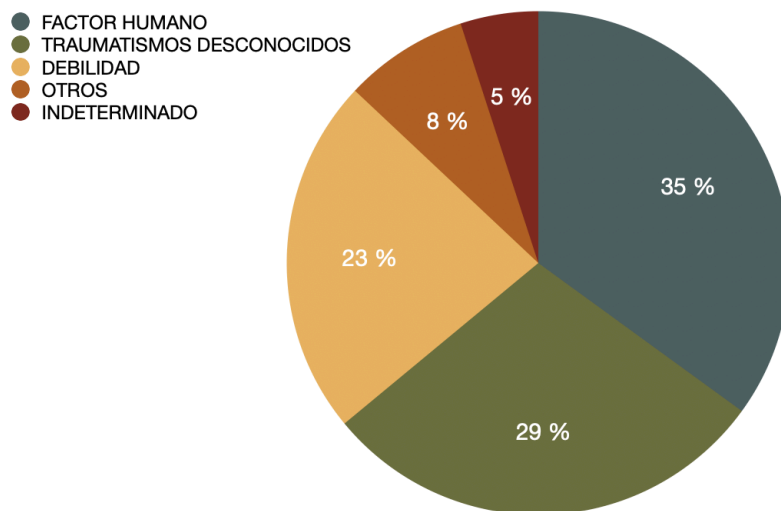


Figura 6: Causas de ingreso.

El sexaje se pudo realizar en 71/102 de las aves muestreadas, con un número aproximadamente igual de machos que de hembras (Tabla 6). Respecto a la edad, la mayoría de las aves muestreadas fueron adultos de 2 o más años y solo fue muestreado un pollo, lo que se puede explicar por la época del año en la que se realizaron los muestreos (febrero en la Zona 1 y abril en la Zona 2), teniendo en cuenta que en la Zona 2, al estar más al norte, la primavera comienza más tarde y con ella la época de cría. El resto de los individuos de “0 a 1 años”, por tanto, se encontraban en su segundo año calendario. No parece haber mayor predisposición de los juveniles por ingresar en los CRF al ser la n muy parecida a la de los adultos.

Tabla 6: Número de aves muestreadas en función de las categorías “Sexo”, “Edad” y “Madurez”

| | | | | |
|----------------|------------------|-----------------|--------------------|----------|
| Sexo | Macho: 36 | Hembra: 35 | Indet*: 31 | |
| Edad | “0 a 1 años”: 37 | “1 a 2 años”: 9 | “2 años o más”: 50 | Indet: 6 |
| Madurez | Pollo: 1 | Juvenil: 45 | Adulto: 50 | Indet: 6 |

*Indet: indeterminado

6.2 Presencia de *E. coli* en las aves muestreadas

Los estudios que consideran la prevalencia de *E. coli* en especies de aves silvestres son escasos, en parte porque fundamentalmente se centran en la detección de subpoblaciones concretas (cepas multirresistentes, patotipos específicos, etc.). No obstante, definir estas prevalencias es importante y un paso previo necesario para poder cuantificar correctamente el riesgo relativo que pueden tener como portadores o reservorios de cepas multirresistentes. En nuestro estudio hemos encontrado una prevalencia de *E. coli* en aves silvestres del 73,5 % (75/102). De los 75 aislamientos positivos obtenidos, 58 procedieron de la Zona 1, con una prevalencia del 81,7 %, y 17 provenían de la Zona 2, en la que aparece una prevalencia de 54,8 %. Es posible que la mayor prevalencia obtenida en la Zona 1 se deba a una mayor frecuencia a la hora de compartir instalaciones entre aves de la misma especie que haya facilitado la transmisión de la bacteria. De todas maneras son prevalencias altas que concuerdan con lo esperado de una bacteria comensal del intestino de las aves y es similar a lo encontrado en otros estudios en diferentes lugares del mundo. Por ejemplo, Parker *et al.* (2016), en el que aparecía una prevalencia del 68 %, Prandi *et al.* (2023) con un 63,4 % o Konicek *et al.* (2016) con un 79,2 %.

Las comparaciones entre estudios deben ser hechas con cautela ya que el diseño de los mismos y las especies incluidas pueden variar ampliamente y esto podría afectar a los resultados encontrados. Debe considerarse que la mayor parte de los estudios suelen tener un número bajo de ejemplares muestreados de cada especie, esto se debe a la dificultad de conseguir muestras de animales que viven en un ambiente silvestre y, al igual que en este estudio, la toma de muestras suele estar condicionada por su presencia en los centros de recuperación. Esto también puede explicar por qué en 11 de las 25 especies muestreadas apareció una prevalencia de *E. coli* del 0 % (Figura 7), ya que se trata de especies con una representación muy escasa de uno o dos ejemplares. Por este motivo hemos limitado la comparación de porcentajes a aquellas especies que presentaron un número mínimo de ejemplares.

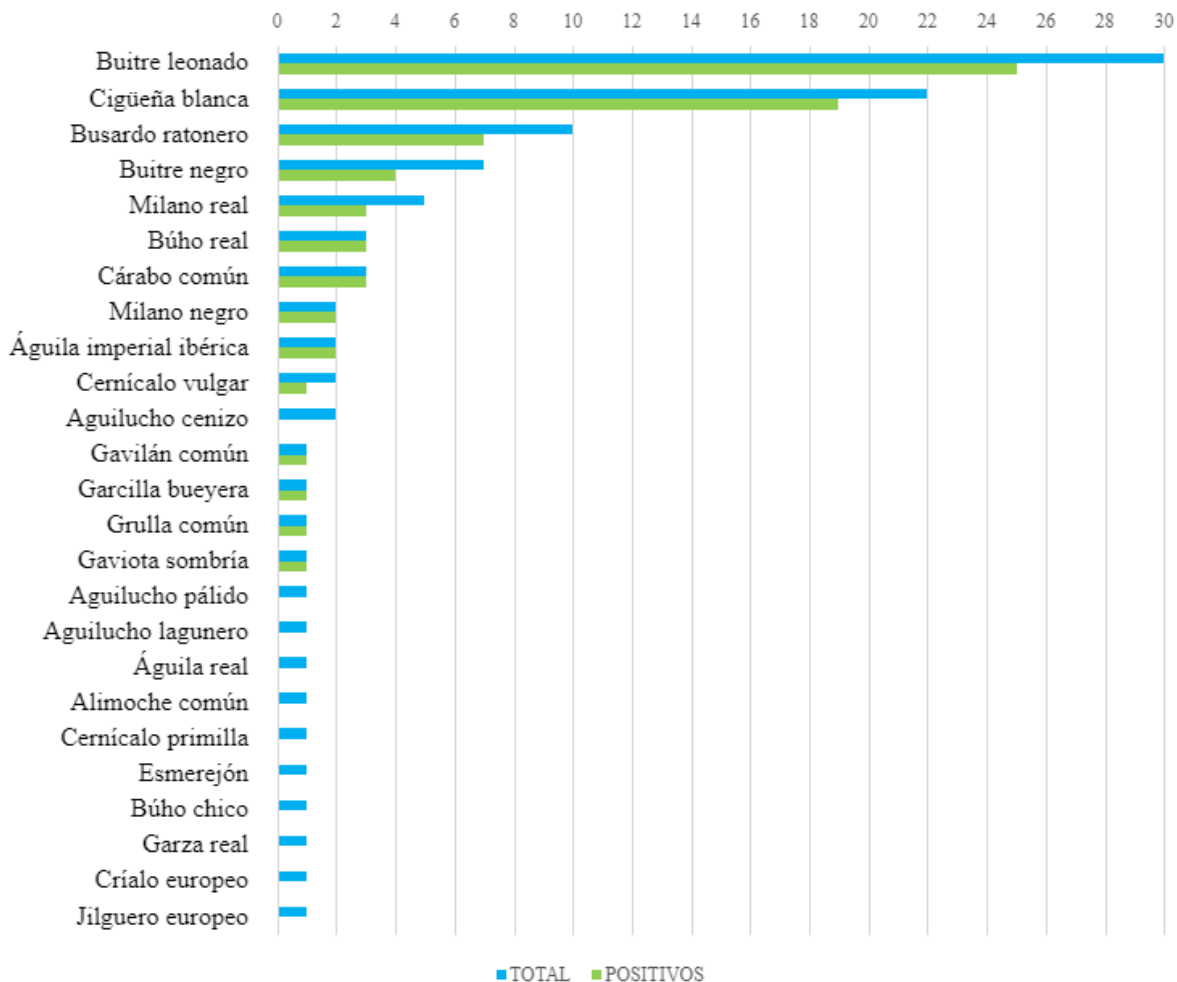


Figura 7: Frecuencia de aislamiento de *E. coli* por especie.

De esta manera, las especies con una representación de 10 o más individuos: buitre leonado, cigüeña blanca y busardo ratonero; muestran prevalencias muy altas (70 % - 86,4 %) (Figura 8). En el caso de los buitres leonados, la prevalencia hallada en nuestro estudio es de 83,3 %, en línea con lo descrito por Sevilla *et al.* (2020) en España para la misma especie (86,5 %). En cambio, en Francia se han descrito prevalencias menores de un 51 % (Haenni *et al.*, 2023), estas diferencias pueden deberse tanto a la variación geográfica, como a distintos tipos de dieta, ya que el estudio de Francia se centraba únicamente en buitres que se alimentaban de cadáveres producto de la ganadería extensiva. También hay que tener en cuenta que gran parte de los buitres muestreados en la Zona 1 convivían en las mismas instalaciones por lo que es lógico que se transmitieran la bacteria entre ellos. De forma similar, respecto a las cigüeñas blancas, nuestros resultados (86,4 %) también concuerdan con lo anteriormente descrito en España (Martín-Maldonado *et al.* (2022) 95 %), así como los obtenidos en busardos ratoneros (70 %) con lo hallado por Radhouani *et al.* (2012) (85,7 %).

Sería interesante para estudios futuros que se incluyeran más número de muestras por especie a fin de caracterizar más correctamente la prevalencia de *E. coli* en otras especies diferentes.

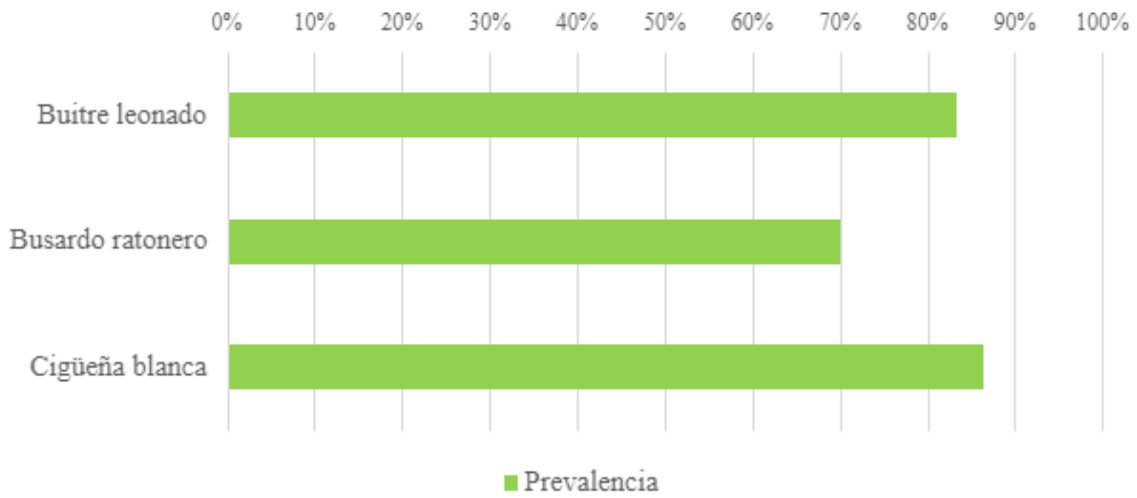


Figura 8: Prevalencia de *E. coli* en las especies más representadas.

Las diferencias en la prevalencia de *E. coli* en cuanto al sexo, los grupos de edad y la procedencia de las muestras se pueden consultar en la Tabla 7. Encontramos una prevalencia general mayor en hembras que en machos, que también se cumple para la mayoría de las especies individuales en los que tenemos muestreados e identificados individuos de ambos sexos (buitres leonados, busardos ratoneros y milanos reales). En el resto la prevalencia está igualada entre sexos, aunque es cierto que el bajo número de individuos muestreados por especie puede ser una limitación a la hora de interpretar estos resultados. Esta es una variable que no hemos encontrado analizada en otros estudios, por lo que podría ser la primera vez que se describiera. Dada la mayor tendencia a portar *E. coli* vista en hembras sería interesante realizar otros estudios que profundizaran en los motivos de dicha disparidad, que podrían ser desde cuestiones genéticas a diferencias en las interacciones sociales y de comportamiento.

En cuanto a la edad, no se observó una tendencia clara, pero resultó parecida y relativamente alta en todos los casos (Tabla 7). Otros estudios parecen indicar que los ejemplares más jóvenes tienen prevalencias menores, como es el caso del realizado por Guenther *et al.* (2012) que muestrearon pollos aún en el nido y encontraron un 38 % y 40,7 % en dos áreas distintas. También Zurfluh *et al.* (2019) describen prevalencias menores (53,7 %) en un estudio en el que el 83,4 % de las aves muestreadas eran pollos/juveniles. Esto se puede explicar por la mayor probabilidad de adquirir la bacteria con un mayor tiempo de vida. En nuestro estudio sólo se incluyó un pollo, el resto de la categoría de las aves más jóvenes (“0 a 1 año”) corresponden con aves de segundo año calendario; además, la gran mayoría de los positivos de esta categoría

(20/30) corresponden a buitres leonados que compartían las instalaciones, lo que ha podido influir en elevar esta prevalencia.

Por último, contrasta con otros estudios nuestro gran número de aislamientos de colonias de *E. coli* procedentes de muestras recogidas en cadáveres; Yapicier *et al.* (2022) encontraron una prevalencia de 62,2 % en muestras de heces y de mucosa intestinal de cadáveres y Gargiulo *et al.* (2018) únicamente un 6,8 % en muestras de mucosa intestinal también en aves muertas. Los procesos de descomposición podrían modificar el ambiente intestinal favoreciendo la proliferación de la bacteria y, por tanto, su probabilidad de detección.

Tabla 7: Frecuencia y prevalencia de *E. coli* en función de “Sexo”, “Edad” y “Procedencia”

| Variable | Sexo | | Edad | | | Procedencia | |
|--------------------|--------|--------|------------|------------|--------------|-------------|-----------|
| | Macho | Hembra | 0 a 1 años | 1 a 2 años | 2 años o más | Vivos | Cadáveres |
| Categoría | | | | | | | |
| Positivos/N | 24/36 | 31/35 | 30/37 | 8/9 | 34/50 | 51/75 | 24/27 |
| Porcentaje | 66,7 % | 88,6 % | 81,1 % | 88,9 % | 68 % | 68 % | 88,9 % |

Dado que las aves fueron recogidas en centros de recuperación, los animales podían haber sido sometidos a tratamientos antibióticos y esto podría alterar la capacidad de detección de *E. coli*. No obstante, solamente tres aves habían recibido tratamiento antibiótico en el mes previo a la recogida de las muestras. En todas ellas se administró amoxicilina, en un caso combinada con tobramicina, lo que no impidió que en las tres muestras hubiese crecimiento de *E. coli* en medio TBX. Por lo que podemos concluir que la administración de antibióticos no influyó de manera negativa a la hora de la recogida de las muestras.

6.3 Presencia de BLEE en las aves muestreadas

En cuanto a la presencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEE, se aislaron ocho colonias compatibles con crecimiento en medio TBX/CTX de siete aves diferentes, ya que en un ave se aislaron dos colonias que morfológicamente eran distintas (textura, tamaño, etc.), siendo ambas compatibles con *E. coli*. En seis de esas colonias, procedentes de seis aves diferentes, se detectaron genes codificantes de resistencias tipo BLEE, lo que supone un 5,9 % del total de las 102 aves y un 8 % de las aves portadoras de *E. coli* (6/75). Las cifras a nivel global en aves salvajes varían desde tan solo un 1,7 % de prevalencia en pollos en Suiza (Zurfluh *et al.*, 2019), o 3,3 % en Grecia (Athanasakopoulou *et al.*, 2022), hasta un 13,2 % en Italia (Prandi *et al.*, 2023), 13 % en Brasil (De Jesus *et al.*, 2019) o 26,9 % encontrada en Portugal en aves rapaces (Pinto *et al.*, 2010). En España, la prevalencia encontrada en otros estudios es superior a la

nuestra. Alcalá *et al.* (2015) encontraron una prevalencia del 14 % y Oteo *et al.* (2018) del 8,7 %, los dos en la comunidad autónoma de Madrid. Ambos recogieron sus muestras en centros de recuperación de fauna al igual que nosotros y, como en nuestro estudio, no seleccionaron ninguna especie o familia de aves en concreto.

Las aves en las cuales encontramos las cepas productoras de BLEE fueron una cigüeña blanca, una gaviota sombría, un búho real, dos buitres negros y un buitre leonado (Figura 9). Destaca que en todos los casos se trata de aves con hábitos fuertemente ligados a entornos humanizados, que llegan incluso a alimentarse de forma regular en vertederos, o bien de aves rapaces. Los hábitos de las primeras podrían haber facilitado la transmisión de estas cepas resistentes desde los humanos a las aves. Si bien es cierto que en nuestro estudio, a pesar de que las cigüeñas blancas (familia *Ciconiidae*) fueron una de las especies con mayor número de muestras, la prevalencia de BLEE fue muy baja (Tabla 8) en comparación con otros resultados que han llegado a describir un 44,4 % de prevalencia en esta especie (Alcalá *et al.*, 2015), lo que pone de manifiesto la gran diferencia que se puede encontrar entre distintas zonas geográficas.

También por estas razones la familia de las gaviotas (*Laridae*) ha sido sugerida como posible centinela para evaluar la contaminación del medio con cepas de *E. coli* resistentes a antibióticos (Stedt *et al.*, 2014), y en España un 63,2 % de las *E. coli* aisladas en gaviotas procedentes del centro de España presentaban algún fenotipo resistente (Martín-Maldonado *et al.*, 2022). Nuestro estudio solo incluye una gaviota, pero que la única muestreada sea portadora de una cepa productora de BLEE puede concordar con elevadas prevalencias en esta especie en nuestro país. Esto es compatible con los resultados obtenidos por Vergara *et al.*, (2017) en Barcelona donde describieron una prevalencia de BLEE en gaviotas de 54,5 %, muy por encima de lo encontrado en otros puntos de Europa: 19 % (Veldman *et al.*, 2013); 9,4 % (Bonnedahl *et al.*, 2009). Ya se había descrito un gradiente creciente de norte a sur de Europa en la frecuencia de aparición de cepas resistentes en gaviotas, así como pasa en seres humanos y animales de producción (Stedt *et al.*, 2014), quizás debido a un mayor uso de los antibióticos (Cars *et al.*, 2001).

Las aves rapaces son otro grupo de aves que también se han sugerido como posibles especies indicadoras de contaminación del medio con cepas resistentes a antibióticos debido a su posición en lo alto de la cadena trófica. No obstante, en nuestro estudio, si analizamos únicamente las rapaces muestreadas (familias *Accipitridae*, *Strigidae* y *Falconidae*), encontramos que solamente en 4/74 aves se detectó la presencia de cepas BLEE (5,4 %); una cifra muy inferior al 26,4 % encontrada en Portugal por Pinto *et al.* (2010). En otros estudios también se indicaron la presencia de prevalencias bajas, aunque ligeramente superiores: 13,8 %

en Alemania y 10,8 % en Mongolia descritos por Guenther *et al.* (2012). En nuestro país, Alcalá *et al.* (2015) encontraron un 10,8 % de BLEE en 74 rapaces muestreadas en la comunidad autónoma de Madrid. La mayor prevalencia observada por estos autores puede deberse a una densidad de población muy superior a nuestras zonas de estudio, que favorezcan una mayor frecuencia de contacto con aves silvestres y la contaminación de las aves con cepas resistentes. Estas densidades pueden ser más bajas en áreas con ganaderías más extensivas, lo que puede favorecer prevalencias menores de cepas resistentes. Esto es relevante ya que los cadáveres provenientes de la ganadería son una fuente importante de alimento para rapaces carroñeras como los buitres, que no solo aprovechan los cadáveres de la ganadería extensiva sino que muchas veces son alimentados en puntos de alimentación suplementarios conocidos como muladares con cadáveres provenientes de la ganadería intensiva.

Hay que destacar que todas las colonias aisladas en medio TBX/CTX, es decir, con fenotipo resistente a cefotaxima, de la Zona 2 corresponden con buitres negros y leonados que ingresaron a la vez debido a una sospecha de intoxicación, así que podrían ser individuos que se moviesen normalmente juntos en busca de alimento y que se alimentaran de las mismas carcasas, lo que llevaría a una posible misma fuente de contaminación, o a una transmisión entre los individuos.

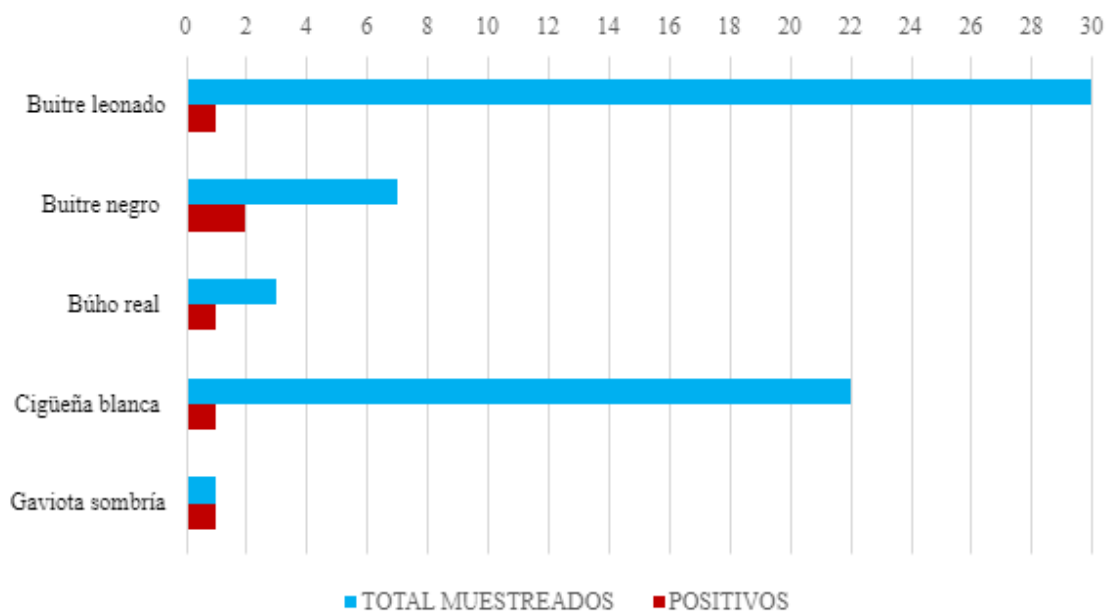


Figura 9: Frecuencia encontrada de BLEE por especie.

Tabla 8: Prevalencias de *E. coli* y BLEE por familias de aves

| Familia | n | Prevalencia <i>E. coli</i> | Prevalencia BLEE |
|---------------------|----------|-----------------------------------|-------------------------|
| <i>Accipitridae</i> | 63 | 71,4 % | 4,8 % |
| <i>Ardeidae</i> | 2 | 50 % | - |
| <i>Ciconiidae</i> | 22 | 86,4 % | 4,5 % |
| <i>Cuculidae</i> | 1 | 0 % | - |
| <i>Falconidae</i> | 4 | 50% | - |
| <i>Fringillidae</i> | 1 | 0 % | - |
| <i>Gruidae</i> | 1 | 100 % | - |
| <i>Laridae</i> | 1 | 100 % | 100 % |
| <i>Strigidae</i> | 7 | 85,7 % | 14,3 % |

Las ocho cepas en las que se detectaron fenotipos compatibles con la presencia de BLEE fueron analizadas mediante PCR para identificar los genes responsables de la resistencia. La PCR puso de manifiesto la presencia de tres genes diferentes en el conjunto de las muestras analizadas:

bla_{SHV} (1), bla_{CTX-M} (5) y bla_{TEM} (4) (Tabla 9).

Nuestros resultados indican una mayor prevalencia de CTX-M en aves silvestres, en concordancia con la mayoría de estudios a nivel mundial, en los que las CTX-M son también las más encontradas en aves silvestres (Pinto *et al.*, 2010; Veldman *et al.*, 2013; Oteo *et al.*, 2018; De Jesus *et al.*, 2019; Athanasakopoulou *et al.*, 2022), pero también en humanos (Karanika *et al.*, 2016). En España, las CTX-M en humanos también son las BLEE predominantes (Pérez *et al.*, 2019), pero la prevalencia de la familia SHV aumenta con respecto a otros países. En concreto el gen bla_{SHV-12} es el más encontrado dentro de esta familia (Díaz *et al.*, 2010). En nuestro estudio no hemos secuenciado las colonias resistentes encontradas, así que no podemos afirmar que sea este el gen que se encuentra circulando, pero su presencia será relevante ya que se ha descrito como causa importante de infecciones extra-hospitalarias en la comunidad (Díaz *et al.*, 2010). Una mayor frecuencia de aparición de esta familia de BLEE en el ámbito de la medicina humana en nuestro país puede ser la causa de que en algunos estudios con aves silvestres este gen haya sido el más frecuente (Alcalá *et al.*, 2015; Vergara *et al.*, 2017).

No obstante, la presentación combinada de varios genes fue la situación más frecuente. La asociación descrita entre bla_{TEM} con bla_{SHV} o bla_{CTX-M} ya ha sido descrita en otros estudios, apareciendo de esta manera más frecuentemente que en solitario (Alcalá *et al.*, 2015; Vergara *et al.*, 2017), de la misma manera que ocurre en este estudio.

Tabla 9: Datos epidemiológicos asociados a las colonias de *E. coli* aisladas en medio TBX/CTX y resultado de PCR multiplex para genes codificantes de BLEE

| Zona | Muestra | Especie | Genes implicados | Sexo | Edad | Origen |
|------|---------|-----------------|---|---------------|-----------------|----------|
| 1 | 8 | Cigüeña blanca | bla _{SHV} y bla _{TEM} | Indeterminado | 2 o + (Adulto) | Ave viva |
| | 9 | Búho real | bla _{CTX-M} | Indeterminado | 1 a 2 (Juvenil) | Ave viva |
| | 55 | Gaviota sombría | bla _{CTX-M} y bla _{TEM} | Macho | 2 o + (Adulto) | Ave viva |
| 2 | 100 | Buitre leonado | bla _{CTX-M} | Hembra | 2 o + (Adulto) | Cadáver |
| | 101A | Buitre negro | negativo | Indeterminado | 1 a 2 (Juvenil) | Ave viva |
| | 101B | | bla _{CTX-M} y bla _{TEM} | | | |
| | 102 | Buitre negro | negativo | Macho | 1 a 2 (Juvenil) | Cadáver |
| | 103 | Buitre negro | bla _{CTX-M} y bla _{TEM} | Hembra | 1 a 2 (Juvenil) | Cadáver |

En dos de las ocho colonias compatibles obtenidas no fue posible identificar ninguno de los genes analizados en la PCR. Esto puede ser debido a la existencia de otros tipos de betalactamasas como son las AmpC para las cuáles la PCR utilizada no tiene capacidad de discriminación.

Los resultados de nuestro estudio contribuyen a mejorar el conocimiento epidemiológico previo de la presencia de cepas de *E. coli* BLEE en las aves silvestres. La variedad geográfica en el muestreo y de especies analizadas nos proporciona una imagen preliminar general de la situación de este problema en las aves silvestres. Una de las principales limitaciones, típica de

este tipo de estudios, es el bajo número de muestras para ciertas especies de aves silvestres debido a las dificultades para la recolección de los ejemplares. Nuestros resultados pueden ayudar a la hora de identificar aquellas especies con mayores prevalencias para realizar caracterizaciones posteriores a mayor escala. Aunque las prevalencias han sido generalmente bajas, nuestros resultados ponen en evidencia la circulación de estas cepas y la existencia de diferentes genes de resistencia presentes en las aves silvestres. Las especies con presencia de cepas resistentes identificadas en este estudio (cigüeña blanca, gaviota sombría, búho real, buitre leonado y buitre negro) fueron especies cuyas características tróficas pueden favorecer el contacto con estas cepas, y está en consonancia con su posible rol como reservorios o indicadoras de presencia ambiental de cepas multirresistentes (Stedt *et al.*, 2014; Viso, 2017; Suarez-Pérez *et al.*, 2021). Asimismo, las aves también pueden jugar un papel como diseminadoras geográficas de *E. coli* multirresistentes, de forma similar a como ocurre con otras enfermedades, aunque serían necesarios más estudios para caracterizar epidemiológicamente este hecho con más detalle. El análisis molecular de las cepas BLEE detectadas confirmó la presencia de varios genes de resistencia, también encontrados en otros estudios en aves silvestre. No obstante, a pesar de haber utilizado un diseño de PCR típico para este tipo de estudios, algunas cepas no pudieron caracterizarse correctamente, lo que sugiere la existencia de otros genes responsables de resistencias circulantes y unas relaciones epidemiológicas más complejas. Son necesarios más estudios que permitan caracterizar en más detalle la diversidad molecular de los elementos de resistencia de los *E. coli* circulantes en aves silvestres.

7. CONCLUSIONES

1. Nuestros resultados confirman una alta prevalencia de *E. coli* en los hisopos cloacales de aves silvestres.
2. En las zonas analizadas se detectan cepas de *E. coli* productoras de BLEE en diferentes aves silvestres.
3. Las aves rapaces, en especial las carroñeras, o las aves ligadas a entornos humanizados presentan cepas de *E. coli* productoras de BLEE con mayor frecuencia. Esto añade más evidencia a su posible papel como indicadoras de contaminación ambiental y agentes de propagación de cepas resistentes, que deberían ser evaluados en futuros estudios.
4. Se encontró una alta diversidad de genes implicados en resistencias de tipo BLEE. La familia de BLEE CTX-M es la más frecuentemente encontrada, al igual que ocurre en medicina humana o en animales domésticos, lo que sugiere que las aves silvestres pueden actuar como reservorio de las mismas cepas que nos afectan a nosotros.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Alcalá, L., Alonso, C. A., Simón, C., González-Esteban, C., Orós, J., Rezusta, A., Ortega, C., & Torres, C. (2015). Wild birds, frequent carriers of Extended-Spectrum B-Lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* of CTX-M and SHV-12 types. *Microbial Ecology*, *72*(4), 861-869. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0718-0>
- Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M., & Di Ilio, C. (2013). *Escherichia coli* in Europe: an overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *10*(12), 6235-6254. <https://doi.org/10.3390/ijerph10126235>
- Aslam, B., Khurshid, M., Arshad, M., Muzammil, S., Rasool, M., Yasmeen, N., Shah, T., Chaudhry, T. H., Rasool, M. H., Shahid, A., Xia, X., & Baloch, Z. (2021). Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.771510>
- Athanasakopoulou, Z., Diezel, C., Braun, S. D., Sofia, M., Γιαννακόπουλος, A., Monecke, S., Gary, D., Krähmer, D., Chatzopoulos, D., Touloudi, A., Birtsas, P., Palli, M., Georgakopoulos, G., Spyrou, V., Petinaki, E., Ehricht, R., & Billinis, C. (2022). Occurrence and characteristics of ESBL- and carbapenemase- producing *Escherichia coli* from wild and feral birds in Greece. *Microorganisms*, *10*(6), 1217. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061217>
- Biran, D., & Ron, E. Z. (2018). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. En *Current Topics in Microbiology and Immunology* (pp. 149-161). https://doi.org/10.1007/82_2018_108
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2014). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(1), 42-51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
- Blasco-Zumeta, J., & Heinz, G.-M. (2023). Atlas de identificación de las aves continentales de la península ibérica (2.ª ed.). *Tundra*.
- Blount, Z. D. (2015). The unexhausted potential of *E. coli*. *eLife*, *4*. <https://doi.org/10.7554/elife.05826>
- Bonnedahl, J., Drobni, M., Gauthier-Clerc, M., Hernández, J., Granholm, S., Kayser, Y., Melhus, Å., Kahlmeter, G., Waldenström, J., Johansson, A., & Olsén, B. (2009). Dissemination of *Escherichia coli* with CTX-M type ESBL between humans and Yellow-Legged gulls in the south of France. *PLOS ONE*, *4*(6), e5958. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005958>
- Bonnedahl, J., & Järhult, J. D. (2014). Antibiotic resistance in wild birds. *Upsala Journal of Medical Sciences*, *119*(2), 113-116. <https://doi.org/10.3109/03009734.2014.905663>

- Borges, C. A., Cardozo, M. V., Beraldo, L. G., De Oliveira, É. A., Maluta, R. P., Barboza, K., Werther, K., & De Ávila, F. A. (2017). Wild birds and urban pigeons as reservoirs for diarrheagenic *Escherichia coli* with zoonotic potential. *Journal of Microbiology*, 55(5), 344-348. <https://doi.org/10.1007/s12275-017-6523-3>
- Boyd, D. A., Tyler, S., Christianson, S., McGeer, A., Muller, M. P., Willey, B. M., Bryce, E., Gardam, M., Nordmann, P., & Mulvey, M. R. (2004). Complete nucleotide sequence of a 92-Kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 Extended-Spectrum Beta-Lactamase involved in an outbreak in Long-Term-Care facilities in Toronto, Canada. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(10), 3758-3764. <https://doi.org/10.1128/aac.48.10.3758-3764.2004>
- Bush, K., & Bradford, P. A. (2016). B-Lactams and B-Lactamase inhibitors: an overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(8), a025247. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025247>
- Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(1), 44-52. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.001>
- Cars, O., Mölstad, S., & Melander, A. (2001). Variation in antibiotic use in the European Union. *The Lancet*, 357(9271), 1851-1853. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(00\)04972-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(00)04972-2)
- Casanova, N. A., Redondo, L. M., Dailoff, G. C., Arenas, D., & Fernández-Miyakawa, M. E. (2018). Overview of the role of shiga toxins in porcine edema disease pathogenesis. *Toxicon*, 148, 149-154. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.04.019>
- Castanheira, M., Simner, P. J., & Bradford, P. A. (2021). Extended-spectrum B-lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. *JAC-antimicrobial resistance*, 3(3). <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlab092>
- Centro Nacional de Epidemiología. (2022). Informe epidemiológico sobre la situación de la infección por cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga o Vero en España. https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/archivos%20A-Z/VTEC/Informe_VTEC_2022_final.pdf
- Costa, D., Poeta, P., Sáenz, Y., Vinué, L., Rojo-Bezares, B., Jouini, A., Zarazaga, M., Rodrigues, J., & Torres, C. (2006). Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum -lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(6), 1311-1312. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl415>
- De Jesus, A. A. B., Freitas, A. C. C., De Souza, J. C., Martins, N., Botelho, L. A. B., Girão, V. B. C., Teixeira, L. M., Riley, L. W., & Moreira, B. M. (2019). High-Level

- Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolates from wild birds in a large urban environment. *Microbial Drug Resistance*, 25(2), 167-172. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0180>
- Denamur, E., Clermont, O., Bonacorsi, S., & Gordon, D. M. (2020). The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 19(1), 37-54. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0416-x>
- Díaz, M. Á., Hernández-Bello, J. R., Rodríguez-Baño, J., Martínez-Martínez, L., Calvo, J., Blanco, J., & Pascual, Á. (2010). Diversity of *Escherichia coli* strains producing Extended-Spectrum B-Lactamases in Spain: second nationwide study. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(8), 2840-2845. <https://doi.org/10.1128/jcm.02147-09>
- Dubreuil, J. D., Isaacson, R. E., & Schifferli, D. M. (2016). Animal enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Ecosal plus*, 7(1). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0006-2016>
- EBCC. (2022). European Breeding Bird Atlas 2 website. *European Bird Census Council*. Recuperado 19 de diciembre de 2023, de <https://ebba2.info/maps/>
- Egevang, C., Stenhouse, I. J., Phillips, R. A., Petersen, A., Fox, J. W., & Silk, J. R. D. (2010). Tracking of Arctic terns *Sterna paradisaea* reveals longest animal migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(5), 2078-2081. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909493107>
- Evans, B. A., & Amyes, S. G. B. (2014). OXA B-Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(2), 241-263. <https://doi.org/10.1128/cmr.00117-13>
- Fahim, K. M., Ismael, E., Khalefa, H. S., Farag, H., & Hamza, D. (2019). Isolation and characterization of *E. coli* strains causing intramammary infections from dairy animals and wild birds. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 7(1), 61-70. <https://doi.org/10.1080/23144599.2019.1691378>
- Fang, H., Lundberg, C., Olsson-Liljequist, B., Hedin, G., Lindbäck, E., Rosenberg, Å., & Struwe, J. (2004). Molecular Epidemiological analysis of *Escherichia coli* isolates producing Extended-Spectrum B-Lactamases for identification of nosocomial outbreaks in Stockholm, Sweden. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(12), 5917-5920. <https://doi.org/10.1128/jcm.42.12.5917-5920.2004>
- Fernández, J., Curt, M. D., Agüado, P. L., Esteban, B., Sánchez, J., Checa, M., Mosquera, F., & Romero, L. (2011). Caracterización de las comarcas agrarias de España. Tomo 9. Provincia de Badajoz. Recuperado 29 de octubre de 2023, de https://www.miteco.gob.es/content/dam/miteco/es/ministerio/servicios/publicaciones/Badajoz.%20Primeras%20p%C3%A1ginas_tcm30-101362.pdf

- Gargiulo, A. R., Fioretti, A., Russo, T. P., Varriale, L., Rampa, L., Paone, S., De Luca Bossa, L. M., Raia, P., & Dipineto, L. (2018). Occurrence of enteropathogenic bacteria in birds of prey in Italy. *Letters in Applied Microbiology*, *66*(3), 202-206. <https://doi.org/10.1111/lam.12836>
- Giacopello, C., Foti, M., Mascetti, A., Grosso, F., Ricciardi, D., Fisichella, V., & F. L. P. (2016). Antimicrobial resistance patterns of enterobacteriaceae in European wild bird species admitted in a wildlife rescue centre. *PubMed*, *52*(2), 139-144. <https://doi.org/10.12834/vetit.327.1374.2>
- Gomes, T. A. T., Elias, W. P., Scaletsky, I. C. A., Guth, B. E. C., Rodrigues, J. F., Piazza, R. M. F., De Souza Ferreira, L. C., & Martinez, M. B. (2016). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, *47*, 3-30. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015>
- Guabiraba, R., & Schouler, C. (2015). Avian Colibacillosis: Still many black holes. *FEMS Microbiology Letters*, *362*(15), fnv118. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv118>
- Guenther, S., Aschenbrenner, K., Stamm, I., Bethe, A., Semmler, T., Stubbe, A., Stubbe, M., Batsajkhan, N., Glupczynski, Y., Wieler, L. H., & Ewers, C. (2012). Comparable high rates of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* in birds of prey from Germany and Mongolia. *PLOS ONE*, *7*(12), e53039. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053039>
- Haenni, M., Du Fraysseix, L., François, P., Drapeau, A., Bralet, T., Madec, J., Boulinier, T., & Duriez, O. (2023). Occurrence of ESBL- and AMPC-Producing *E. coli* in French griffon vultures feeding on extensive livestock carcasses. *Antibiotics*, *12*(7), 1160. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12071160>
- Hernández, J., Johansson, A., Stedt, J., Bengtsson, S., Porczak, A., Granholm, S., González-Acuña, D., Olsén, B., Bonnedahl, J., & Drobni, M. (2013). Characterization and comparison of Extended-Spectrum B-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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076150>
- Huemer, M., Shambat, S. M., Brugger, S. D., & Zinkernagel, A. S. (2020). Antibiotic Resistance and Persistence—Implications for human health and treatment perspectives. *EMBO Reports*, *21*(12). <https://doi.org/10.15252/embr.202051034>
- Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, *51*, 72-80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>
- Jang, J., Hur, H., Sadowsky, M. J., Byappanahalli, M. N., Yan, T., & Ishii, S. (2017). Environmental *Escherichia coli*: Ecology and Public health implications-A review. *Journal of Applied Microbiology*, *123*(3), 570-581. <https://doi.org/10.1111/jam.13468>

- Kabir, S. M. L. (2010). Avian colibacillosis and salmonellosis: A closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(1), 89-114. <https://doi.org/10.3390/ijerph7010089>
- Karanika, S., Karantanos, T., Arvanitis, M., Grigoras, C., & Mylonakis, E. (2016). Fecal colonization with Extended-spectrum Beta-lactamase–Producing Enterobacteriaceae and risk factors among Healthy Individuals: A Systematic review and Metaanalysis. *Clinical Infectious Diseases*, 63(3), 310-318. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw283>
- Kathayat, D., Lokesh, D., Ranjit, S., & Rajashekara, G. (2021). Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC): An overview of virulence and pathogenesis factors, zoonotic potential, and control strategies. *Pathogens*, 10(4), 467. <https://doi.org/10.3390/pathogens10040467>
- Konicek, C., Vodrážka, P., Barták, P., Knotek, Z., Heß, C., Račka, K., Heß, M., & Troxler, S. (2016). Detection of zoonotic pathogens in wild birds in the cross-border region of Austria-Czech Republic. *Journal of Wildlife Diseases*, 52(4), 850. <https://doi.org/10.7589/2016-02-038>
- Kuiken, T., & Cromie, R. (2022). Protect wildlife from livestock diseases. *Science*, 378(6615), 5. <https://doi.org/10.1126/science.adf0956>
- Lagerstrom, K. M., & Hadly, E. A. (2023). Under-appreciated phylogroup diversity of *Escherichia coli* within and between animals at the Urban-Wildland interface. *Applied and Environmental Microbiology*, 89(6). <https://doi.org/10.1128/aem.00142-23>
- Leimbach, A., Hacker, J., & Dobrindt, U. (2013). *E. Coli* as an All-Rounder: The thin line between commensalism and pathogenicity. *Current Topics in Microbiology and Immunology* (pp. 3-32). https://doi.org/10.1007/82_2012_303
- López, J. R. G., Martín, J. M., Armario, J. M. M., & Domingo, J. M. R. (2001). Análisis de las causas de entrada de buitres leonados (*Gyps fulvus*), cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*) y milano negro (*Milvus migrans*) En el Centro de Recuperación de Animales Salvajes del Zoológico de Jerez de la Frontera (Cádiz). *Revista de la Sociedad Gaditana de Historia Natural: RSGHN*, 2, 83-93. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7342241>
- Lüthje, P., & Brauner, A. (2014). Virulence factors of uropathogenic *E. coli* and their interaction with the host. En *Advances in Microbial Physiology* (pp. 337-372). <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2014.08.006>
- MAPAMA. (2021). *Zona de especial protección para las Aves (ZEPA)*. <https://sig.mapama.gob.es/Docs/PDFServicios/ZEPA.pdf>

- MAPAMA. (2024). *Plan nacional de vigilancia sanitaria en fauna silvestre*.
https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/pvfs_tcm30-437517.pdf
- Martín-Maldonado, B., Rodríguez-Alcázar, P., Fernández-Novo, A., González, F., Pastor, N., López, I., Suárez, L., Moraleda, V., & Aranaz, A. (2022). Urban birds as antimicrobial resistance sentinels: White storks showed higher Multidrug-Resistant *Escherichia coli* levels than seagulls in central Spain. *Animals*, *12*(19), 2714. <https://doi.org/10.3390/ani12192714>
- Martinson, J. N. V., & Walk, S. T. (2020). *Escherichia coli* residency in the gut of healthy human adults. *Ecosal plus*, *9*(1). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0003-2020>
- Meena, P. R., Priyanka, P., & Singh, A. P. (2023). Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (EXPEC) reservoirs, and Antibiotics Resistance Trends: A One-health surveillance for risk analysis from «Farm-to-fork». *PubMed*, *76*(1). <https://doi.org/10.1093/lambio/ovac016>
- MITECO. (s. f.). La Red Natura 2000 en España. Recuperado 18 de noviembre de 2023, de https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/temas/espacios-protegidos/red-natura-2000/rn_espana.html#:~:text=La%20Red%20est%C3%A1%20formada%20actualmente,m%C3%A1s%20de%20222.000%20km2.
- Mohammed, S. A. E., Marouf, S., Erfana, A. M., El-Jakee, J., Hessain, A. M., Dawoud, T. M., Kabli, S. A., & Moussa, I. M. (2019). Risk factors associated with *E. coli* causing neonatal calf diarrhea. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *26*(5), 1084-1088. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.07.008>
- Molina, R. (2013). Morbilidad y mortalidad de rapaces ingresadas en el Centre de Recuperació de Fauna de Torreferrusa: análisis de los factores de riesgo durante el período 1995-2007 [Tesis doctoral]. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Monstein, H., Balkhed, Å. Ö., Nilsson, M., Nilsson, M., Dornbusch, K., & Nilsson, L. (2007). Multiplex PCR amplification assay for the detection of BLASHV, BLATEM and BLACTX-M genes in enterobacteriaceae. *APMIS*, *115*(12), 1400-1408. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.00722.x>
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology spectrum*, *4*(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.vmbf-0016-2015>
- Nakai, H., Hagihara, M., Kato, H., Hirai, J., Nishiyama, N., Koizumi, Y., Sakanashi, D., Suematsu, H., & Yamagishi, Y. (2016). Prevalence and risk factors of infections caused by extended-spectrum B-lactamase (ESBL)-producing enterobacteriaceae. *Journal of Infection and Chemotherapy*, *22*(5), 319-326. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2016.02.004>
- Nešporová, K., Wyršch, E. R., Valček, A., Bitar, I., Chaw, K., Harris, P. N. A., Hrabák, J., Literák, I., Djordjevic, S. P., & Dolejská, M. (2020). *Escherichia coli* sequence type 457 is

- an emerging Extended-Spectrum-B-Lactam-Resistant lineage with reservoirs in wildlife and Food-Producing animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 65(1). <https://doi.org/10.1128/aac.01118-20>
- Oglesbee, B. L., & Lord, B. (2020). Gastrointestinal diseases of rabbits. En *Elsevier eBooks* (pp. 174-187). <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-48435-0.00014-9>
- Ollé, À. & Trabalon, F. (2019). Aves rapaces de Europa. *Omega*.
- Oteo, J., Mencía, A., Bautista, V., Pastor, N., Lara, N., González-González, F., García-Peña, F. J., & Campos, J. (2018). Colonization with Enterobacteriaceae-Producing ESBLs, AMPCs, and OXA-48 in wild avian species, Spain 2015–2016. *Microbial Drug Resistance*, 24(7), 932-938. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0004>
- Ouellette, M., Bissonnette, L., & Roy, P. H. (1987). Precise insertion of antibiotic resistance determinants into TN21-like transposons: nucleotide sequence of the OXA-1 beta-lactamase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(21), 7378-7382. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.21.7378>
- Pakbin, B., Brück, W. M., & Rossen, J. W. A. (2021). Virulence factors of enteric pathogenic *Escherichia coli*: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18), 9922. <https://doi.org/10.3390/ijms22189922>
- Parker, D. L., Sniatynski, M., Mandrusiak, D., & Rubin, J. E. (2016). Extended-spectrum B-lactamase producing *Escherichia coli* isolated from wild birds in Saskatoon, Canada. *Letters in Applied Microbiology*, 63(1), 11-15. <https://doi.org/10.1111/lam.12589>
- Pérez, C. D., López-Fresneña, N., Carlavilla, A. L. R., García, M., Ruíz-Garbajosa, P., Andrés, J. M. A., Maechler, F., Gastmeier, P., Bonten, M. J. M., & Cantón, R. (2019). Local prevalence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae intestinal carriers at admission and co-expression of ESBL and OXA-48 carbapenemase in *Klebsiella pneumoniae*: a prevalence survey in a Spanish university hospital. *BMJ Open*, 9(3), e024879. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2018-024879>
- Pérez-Tris, J., & Santos, T. (2004). El estudio de la migración de aves en España: Trayectoria histórica y perspectivas de futuro. *Ardeola*, 51, 71-89.
- Pinto, L., Radhouani, H., Coelho, C., Da Costa, P. M., Simões, R. R., Brandão, R., Torres, C., Igrejas, G., & Poeta, P. (2010). Genetic detection of Extended-Spectrum B-Lactamase-Containing *Escherichia coli* isolates from birds of prey from Serra da Estrela Natural Reserve in Portugal. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(12), 4118-4120. <https://doi.org/10.1128/aem.02761-09>

- Poirel, L., Madec, J., Lupo, A., Schink, A., Kieffer, N., Nordmann, P., & Schwarz, Š. (2018). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology spectrum*, 6(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0026-2017>
- Poole, K. (2004). Resistance to Beta-Lactam antibiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(17). <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4060-9>
- Prandi, I., Bellato, A., Nebbia, P., Stella, M. C., Ala, U., Degerfeld, M. M., Quaranta, G., & Robino, P. (2023). Antibiotic resistant *Escherichia coli* in wild birds hospitalised in a wildlife rescue centre. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*, 93, 101945. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2023.101945>
- Radhouani, H., Poeta, P., Gonçalves, A., Pacheco, R., Sargo, R., & Igrejas, G. (2012). Wild birds as biological indicators of environmental pollution: antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* and enterococci isolated from common buzzards (*Buteo buteo*). *Journal of Medical Microbiology*, 61(6), 837-843. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.038364-0>
- Riley, L. W. (2020). Distinguishing pathovars from non pathovars: *Escherichia coli*. *Microbiology spectrum*, 8(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ame-0014-2020>
- Rocha, D., De Oliveira Salle, F., Borges, K. A., Furian, T. Q., Nascimento, V. P. D., De Souza Moraes, H. L., & Salle, C. T. P. (2021). Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) and uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC): characterization and comparison. *Journal of Infection in Developing Countries*, 15(07), 962-971. <https://doi.org/10.3855/jidc.14217>
- Rodríguez-Beltrán, J., DelaFuente, J., León-Sampedro, R., MacLean, R. C., & Millán, Á. S. (2021). Beyond Horizontal Gene transfer: The role of plasmids in bacterial evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 19(6), 347-359. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00497-1>
- Sarowska, J., Futoma-Kołoch, B., Jama-Kmiecik, A., Frej-Mądrzak, M., Książczyk, M., Bugla-Płoskońska, G., & Choroszy-Król, I. (2019). Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. *Gut Pathogens*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13099-019-0290-0>
- Sato, G., Oka, C., Asagi, M., & Ishiguro, N. (1978). Detection of conjugative R plasmids conferring chloramphenicol resistance in *Escherichia coli* isolated from domestic and feral pigeons and crows. *PubMed*, 241(4), 407-417. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/366994>
- SEO/BirdLife. (2011). Las áreas importantes para la conservación de las aves en España. https://seo.org/wp-content/uploads/2013/07/Manual-IBA-completo-Internet-1_B.pdf
- SEO/BirdLife. (2022). III Atlas de aves en época de reproducción en España. SEO/Birdlife. <https://atlasaves.seo.org/>
- SEO/BirdLife. (2023). Informe sobre las causas de mortalidad no natural de avifauna en España. <https://doi.org/10.31170/0092>

- Sevilla, E., Marín, C., Delgado-Blas, J. F., González-Zorn, B., Vega, S., Kuijper, E. J., Bolea, R., & Jaime, R. C. M. (2020). Wild griffon vultures (*Gyps fulvus*) fed at supplementary feeding stations: potential carriers of pig pathogens and pig-derived antimicrobial resistance? *Transboundary and Emerging Diseases*, 67(3), 1295-1305. <https://doi.org/10.1111/tbed.13470>
- Stafford, K. J., & Gregory, N. G. (2008). Implications of intensification of pastoral animal production on animal welfare. *New Zealand Veterinary Journal*, 56(6), 274-280. <https://doi.org/10.1080/00480169.2008.36847>
- Stedt, J., Bonnedahl, J., Hernández, J., McMahon, B. J., Hasan, B., Olsén, B., Drobni, M., & Waldenström, J. (2014). Antibiotic resistance patterns in *Escherichia coli* from gulls in nine European countries. *Infection ecology & epidemiology*, 4(1), 21565. <https://doi.org/10.3402/iee.v4.21565>
- Suarez-Pérez, A., Corbera, J. A., González-Martín, M., & Tejedor-Junco, M. T. (2021). Multidrug-Resistant phenotypes of *Escherichia coli* isolates in wild canarian Egyptian vultures (*Neophron percnopterus majorensis*). *Animals*, 11(6), 1692. <https://doi.org/10.3390/ani11061692>
- Suvarna, K., Stevenson, D., Meganathan, R., & Hudspeth, M. E. S. (1998). Menaquinone (Vitamin K₂) Biosynthesis: Localization and characterization of the *MENA* gene from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 180(10), 2782-2787. <https://doi.org/10.1128/jb.180.10.2782-2787.1998>
- Tellería, J. L. (2004). Migración de aves en el Paleártico occidental: aspectos ecológicos y evolutivos. En *La Ornitología hoy. Homenaje al profesor Francisco Bernis Madrazo* (pp. 109-125). Editorial Complutense de Madrid.
- Tooke, C., Hinchliffe, P., Bragginton, E. C., Colenso, C. K., Hirvonen, V. H. A., Takebayashi, Y., & Spencer, J. (2019). B-Lactamases and B-Lactamase inhibitors in the 21st century. *Journal of Molecular Biology*, 431(18), 3472-3500. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002>
- Veldman, K., Van Tulden, P., Kant, A., Testerink, J., & Mevius, D. (2013). Characteristics of Cefotaxime-Resistant *Escherichia coli* from wild birds in the Netherlands. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(24), 7556-7561. <https://doi.org/10.1128/aem.01880-13>
- Vergara, A., Pitart, C., Montalvo, T., Roca, I., Sabaté, S., Hurtado, J. C., Planell, R., Marco, F., Ramírez, B. U., Peracho, V., Simon, M., & Vila, J. (2017). Prevalence of Extended-Spectrum-B-Lactamase- and/or Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* isolated from Yellow-Legged Gulls from Barcelona, Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(2). <https://doi.org/10.1128/aac.02071-16>

- Vidaña, B., Busquets, N., Napp, S., Pérez-Ramírez, E., Jiménez-Clavero, M. Á., & Johnson, N. (2020). The role of Birds of Prey in West Nile virus epidemiology. *Vaccines*, 8(3), 550. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030550>
- Viso, S. (2017). Estudio de la fauna silvestre como reservorio de cepas de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y del grupo clonal pandémico ST131 en el noroeste de España [Tesis doctoral]. Universidade de Santiago de Compostela.
- World Health Organization. (2021). WHO integrated global surveillance on ESBL-producing *E. coli* using a “One health” approach: implementation and opportunities.
- Yang, S., Lin, C., Aljuffali, I. A., & Fang, J. (2017). Current pathogenic *Escherichia coli* foodborne outbreak cases and therapy development. *Archives of Microbiology*, 199(6), 811-825. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1393-y>
- Yapicier, O. Ş., Kandır, E. H., & Öztürk, D. (2022). Antimicrobial resistance of *E. coli* and *Salmonella* isolated from wild birds in a rehabilitation center in Turkey. *PubMed*, 77(1), 257-267. <https://doi.org/10.22092/ari.2021.356322.1823>
- Zurfluh, K., Albin, S., Mattmann, P., Kindle, P., Nüesch-Inderbinen, M., Stephan, R., & Vogler, B. R. (2019). Antimicrobial resistant and extended-spectrum B-lactamase producing *Escherichia coli* in common wild bird species in Switzerland. *MicrobiologyOpen*, 8(11). <https://doi.org/10.1002/mbo3.845>