

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

Detección y epidemiología de Salmonella spp. en aves silvestres en la Península Ibérica

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Bárbara Martín-Maldonado Jiménez

DIRECTORES

Dra. Clara Marín Orega

Dr. Luis Revuelta Rueda

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. Barbara Martín-Maldonado Jiménez,
estudiante en el Programa de Doctorado en Veterinaria,
de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

Detección y Epidemiología de Salmonella en aves silvestres de la Península Ibérica

y dirigida por: la Dra. Clara Marín Orenga y el Dr. Luis Revuelta Rueda

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 10 de septiembre de 2020

**BARBARA
MARTIN
MALDONADO**
Fdo.: **O JIMENEZ**

Firmado digitalmente por BARBARA MARTIN MALDONADO JIMENEZ
DN: Description=Qualified Certificate, C=ES, SN=BARBARA MARTIN MALDONADO JIMENEZ, E=bmmjimezvet@gmail.com, SERIALNUMBER=52657954Y, SN=MARTIN MALDONADO JIMENEZ, O=BARBARA, OID.1.3.6.1.4.1.17326.30.3=Q2871002H, T=COLEGIADO Nº 8237, OU=VETERINARIO, O=COLEGIO DE VETERINARIOS DE MADRID, C=ES
Razón: Veterinaria de GREFA
Ubicación:
Fecha: 2020-09-10 23:21:15
Foxit Reader Version: 9.3.0

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

La **Dra. Clara Marín Orenga**, profesora titular de la Facultad de Veterinaria de la Universidad CEU-Cardenal Herrera y el **Dr. Luis Revuelta Rueda**, Profesor Titular en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN

Que Doña **Bárbara Martín-Maldonado Jiménez**, Licenciada en Veterinaria, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado **“Detección y epidemiología de *Salmonella* spp. en aves silvestres de la Península Ibérica”**, que presenta como Tesis para alcanzar el grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid en formato de publicaciones, incluyendo los siguientes trabajos:

- Martín-Maldonado, B., Montoro-Dasi, L., Pérez-Gracia, M. T., Jordá, J., Vega, S., Marco-Jiménez, F., & Marin, C. (2019). Wild Bonelli's eagles (*Aquila fasciata*) as carrier of antimicrobial resistant *Salmonella* and *Campylobacter* in Eastern Spain. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 67, 101372.
- Martín-Maldonado, B., Moraleda Fernández, V., Mencía-Gutiérrez, A., Pastor Tiburón, N., López Márquez, I., Suárez Regalado, L., González, F., Revuelta, L., & Marin, C. Comparative study of preserved cloacal samples from Bonelli's eagle (*Aquila fasciata*) collected in places with difficult Access for *Salmonella* detection: freezing vs. refrigeration. Under review in *Current Microbiology*.
- Martín-Maldonado, B., Vega, S., Mencía-Gutiérrez, A., Lorenzo-Rebenaque, L., de Frutos, C., González, F., Revuelta, L. & Marin, C. (2020). Urban birds: An important source of antimicrobial resistant *Salmonella* strains in Central Spain. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 101519.

Para que conste a efectos oportunos, expiden y firman la presente en Madrid a 15 de Septiembre de 2020



Fdo. Dra. Clara Marín Orenga
Directora de tesis

REVUELTA
RUEDA LUIS -
DNI 05247051S

Firmado digitalmente por REVUELTA RUEDA
LUIS - DNI 05247051S
Nombre de reconocimiento (DN): cn=ES,
o=UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE
MADRID, ou=CERTIFICADO ELECTRONICO
DE EMPLEADO PUBLICO,
serialNumber=IDCES-05247051S,
sn=REVUELTA RUEDA, givenName=LUIS,
c=REVUELTA RUEDA LUIS - DNI 05247051S
Fecha: 2020.11.05 13:49:30 +0100'

Fdo. Dr. Luis Revuelta Rueda
Director y tutor de tesis



CEU | *Universidad
Cardenal Herrera*



**UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE**
MADRID

Esta tesis ha sido realizada dentro del marco de colaboración del Grupo de Estudio de la Medicina y Conservación de los Animales Silvestres (GEMAS), en el hospital de Fauna Salvaje del Grupo de Rehabilitación de la Fauna Salvaje y su Hábitat (GREFA), y dirigida por profesores titulares de las facultades de Veterinaria de las Universidades CEU-Cardenal Herrera y Complutense de Madrid. Asimismo, los estudios que en ella se recogen se encuentran financiados por diferentes proyectos de las tres entidades.



*“Solo el amor a la naturaleza, la pasión por la vida
y la certeza de que formamos parte de una comunidad total,
que va desde la más pequeña bacteria hasta el hombre,
nos darán fuerza para defender el único hogar que tenemos,
un pequeño planeta perdido en una remota galaxia
al que hemos dado en llamar Tierra.”*

Félix Rodríguez de la Fuente

Agradecimientos

Nunca pensé en lo fácil y a la vez difícil que sería redactar los agradecimientos. Fácil porque sólo debía transcribir lo que he sentido a lo largo de todos estos años por las personas que me han apoyado en los buenos y los malos momentos. Difícil porque es muy complicado sintetizarlo y no escribir una tesis entera sobre esos sentimientos sin dejar a nadie fuera...

En primer lugar, debo agradecer todo a mis directores de tesis, Clara Marín y Luis Revuelta, a sus ideas y sus consejos, que me han acompañado durante estos casi 5 años de montaña rusa. Cuando empecé no imaginaba cómo iban a ser estos años, creo que nadie puede imaginárselo. Al principio todo es emocionante, te apasiona lo que haces y lees, el trabajo del laboratorio, tus primeros resultados... hasta que llega la primera piedra y caes al suelo. Aprendes que investigar significa ser capaz de superar todas esas piedras, y que casi nunca salen las cosas como tú quieres. Ellos han conseguido enseñarme no sólo todos los conocimientos adquiridos a lo largo de esta tesis, sino a ser investigadora, a pensar en ese “¿y si...?”, y plantearme nuevos retos y estudios. Porque todos sus comentarios e insistencias me han empujado a ser mejor estudiante e investigadora. Especialmente gracias a Clara, por haberme acogido desde el minuto uno como una más de sus estudiantes, por haber estado para darme la mano en cada bache, pero sobre todo por haberme vuelto del revés cada texto que redactaba (resumen, artículo o tesis) dejando todo en rojo, porque de esta manera me ha enseñado a redactar en lenguaje científico correctamente y sin irme por las ramas como hago ahora. Gracias por ayudarme a tener paciencia con los experimentos, a no desistir cuando un resultado no cuadra y a buscarle la explicación a todo. En este punto también debo mencionar a Santiago Vega que, aunque no figura como director mío, ha estado a mi lado también apoyándome, dándome ideas y consejos, como un director más. Gracias por todo tu esfuerzo y por ser la persona que eres. Gracias a todos los estudiantes internos y doctorandos de la Facultad de Veterinaria de la UCH-CEU con los que he tenido el placer de aprender, y en especial a Sandra Sevilla, Laura Montoro y Laura Lorenzo por haberme ayudado tantas y tantas veces, todas y cada una de ellas con una sonrisa en la cara. Trabajar con vosotros ha sido una experiencia que nunca olvidaré y que espero poder repetir en el futuro.

Gracias a mi familia, de la que me siento especialmente orgullosa. A mi abuelo Mariano, que, aunque ya no está entre nosotros desde hace muchos años, sé que estaría orgulloso. Él respetaba a los “estudiosos”, como él decía, más que a nada. Ayudaba a todo el que podía con sus estudios porque, para él, el conocimiento y la investigación eran lo más importante en la sociedad. Es gracias a esa filosofía que he podido tener una educación maravillosa y llegar a donde he llegado. Él le inculcó a mi padre que la mejor herencia que se podía dejar a un hijo era una buena educación. Trabajó duro durante toda su vida para poder dar la mejor educación y

todas las oportunidades posibles a sus hijos y nietos, aunque no pudo ver cómo sus nietos cumplían sus sueños al conseguir los trabajos por los que tanto habían luchado. Gracias a ti, abuelo, estés donde estés, por todas tus lecciones. Gracias a mis padres, porque han estado a mi lado día y noche a lo largo de toda mi vida. Desde pequeña me enseñaron a cuidar y respetar a todas las criaturas del planeta, a ser buena persona, solidaria y altruista. A mi padre por obligarme a ver los documentales de Félix cuando era pequeña y no quería dormir la siesta. A mi madre por ponerme desde bien pequeña “La vida es así”, y por despertar en mí ese interés hacia la medicina. Ambos me han apoyado en todas mis locuras: cuando les dije que quería ser veterinaria, cuando les dije que quería dedicarme a fauna silvestre y cuando les dije que quería hacer un doctorado. Ninguna de las tres cosas ha sido fácil, y ha habido muchos momentos en lo que desearía haberlo dejado todo, pero ellos siempre han estado ahí, a mi lado, apoyando cada decisión, celebrando cada éxito y animándome en los peores momentos de la manera en que podían, aunque ni siquiera fueran conscientes de lo que hacían. Hace poco encontré, haciendo limpieza, un diploma de la Cumbre para la Tierra de 1992, de cuando apenas tenía 4 añitos. En él firmaba una promesa por la tierra: *“Prometo hacer todo cuanto esté a mi alcance para conseguir de la Tierra un lugar seguro y acogedor para la generaciones presentes y futuras de nuestra especie y de todas las especies que conviven en ella”*. Creo que, casi 30 años después, he conseguido mantenerme fiel a esa promesa y aportar mi pequeño granito de arena.

Gracias a mis compañeros de GREFA, mi segunda familia, mi *Ohana*, mi *ika’hale*. Fernando, Irene, Laura, Virginia, Aida, Natalia, Omar e Iris. Sin vosotros no sólo no habría sido logísticamente posible, sino que no habría conseguido las fuerzas necesarias para terminar esta maratón. Habéis conseguido intercalar los días de interminables revisiones veterinarias, los cabezazos contra la pared del laboratorio, y la locura provocada por tantas horas sentada al ordenador con litros de lágrimas y arrugas provocadas por carcajadas, momentos de compañerismo y unidad que en pocos sitios he podido observar, haciéndome sentir una privilegiada dentro de nuestro tan machacado sector. Gracias por esas escapadas frikis al campo para desconectar y por esas sesiones gratuitas de “consulta psicológica”. Gracias por enseñarme un universo de posibilidades y un mundo entero que descubrir. Y, sobre todo, gracias por demostrar al mundo que un equipo tullido puede llegar a ser el mejor equipo de trabajo. Debo hacer especial mención a Fernando González por darme tantas oportunidades: la de realizar un voluntariado en GREFA, formarme con ellos en medicina de la conservación, unirme al grupo GEMAS y realizar una tesis en GREFA, y finalmente pasar a formar parte del equipo veterinario, entre otras muchas que han ido surgiendo a lo largo de los más de 10 años que han pasado desde que le conocí. A lo largo de todos estos años se ha convertido, no sólo en mi jefe, sino en

un compañero y un modelo a seguir. Sé que no lo digo a menudo, pero me siento enormemente agradecida de haberos encontrado a todos, pero especialmente a ti, Fernando. Gracias a todos los voluntarios que han pasado por GREFA a lo largo de todos estos años: Nerea, Rocío, Gema, Alba, Alicia, Cristina, Elisa, Inês, Andrea, Jennifer, Pablo, y muchos otros, me habéis ayudado de formas que ni siquiera os podéis imaginar, consiguiéndome sacar siempre la mejor de las sonrisas y obligándome a centrarme en la tesis al incluirme en vuestro increíble grupo de estudio. Siempre tendréis un huequito en mi corazón.

Y por supuesto gracias a todos mis amigos, los de toda la vida, los que han aguantado mis interminables horas de estudio, mis enclaustramientos, mis “llego tarde” por enésima vez. ¡Gracias por demostrar que se puede tener vida social fuera de la veterinaria! Gracias por estar al pie del cañón a pesar de todo, por aguantar mis enfados con el universo, por compartir mis alegrías y mis locuras, y por empujarme a seguir hacia adelante y ser mejor persona. En especial, gracias a Clara por enseñarme que una sola persona no puede con todo, sólo somos humanos, y a veces necesitamos ayuda. Gracias por estar ahí siempre que he necesitado esa ayuda, hermanita.

Kuaka'a karibu, rafiki!

Siempre contigo, amigo.

Contenidos

Índice de figuras y tablas	23
Abreviaturas y acrónimos	29
Resumen / Abstract	35
1. Introducción	45
1.1. Género <i>Salmonella</i>	47
1.1.1. Características del género <i>Salmonella</i>	47
1.1.2. Taxonomía y nomenclatura	48
1.1.3. Caracterización de <i>Salmonella</i> spp.	49
1.1.4. Factores de virulencia	51
1.1.5. Salmonelosis	53
1.1.5.1. <i>Importancia de la salmonelosis en salud pública</i>	55
1.1.5.2. <i>Importancia de la salmonelosis en sanidad animal</i>	57
1.1.5.3. <i>Salmonella</i> spp. como agente zoonótico	59
1.1.6. Métodos de detección de <i>Salmonella</i> spp.	60
1.1.6.1. <i>Aislamiento mediante cultivo bacteriano</i>	61
1.1.6.2. <i>Perfil bioquímico</i>	65
1.1.6.3. <i>Serotipificación</i>	68
1.1.6.4. <i>Fagotipificación</i>	68
1.1.6.5. <i>Métodos de tipificación genotípica</i>	69
1.1.7. Programas de control y prevención de salmonelosis	69
1.2. Resistencias a antimicrobianos	71
1.2.1. Definición y desarrollo de resistencias a antimicrobianos	71
1.2.2. Problemática en salud pública	74
1.2.3. <i>Salmonella</i> resistente a antimicrobianos	77
1.2.4. Métodos de detección de resistencias a antimicrobianos	79
1.2.5. Planes de actuación contra el desarrollo de resistencias	84
1.3. Fauna silvestre	86
1.3.1. La fauna ibérica: biodiversidad y conservación	86
1.3.1.1. <i>Aves rapaces ibéricas: el águila de Bonelli</i>	88
1.3.1.2. <i>Aves silvestres urbanas</i>	93

1.3.2. Las aves silvestres como reservorio de patógenos	96
1.3.3. <i>Salmonella</i> en aves silvestres	99
1.4. Justificación de la tesis	101
2. Objetivos	103
3. Metodología	107
3.1. Estudio de <i>Salmonella</i> y las resistencias a antimicrobianos asociadas en una población de águila de Bonelli (<i>Aquila fasciata</i>) de la Comunidad Valenciana	109
3.1.1. Especie y área de estudio	109
3.1.2. Recogida de muestras cloacales y heces	109
3.1.3. Aislamiento y detección de <i>Salmonella</i>	111
3.1.4. Test de susceptibilidad a antimicrobianos	112
3.1.5. Análisis estadístico	113
3.2. Estudio comparativo de muestras cloacales conservadas de águila de Bonelli (<i>Aquila fasciata</i>) recogidas en lugares de difícil acceso para la detección de <i>Salmonella</i> spp.: congelación vs refrigeración	114
3.2.1. Especie y área de estudio	114
3.2.2. Recogida y conservación de muestras cloacales	115
3.2.3. Aislamiento e identificación de <i>Salmonella</i>	116
3.3. Estudios de <i>Salmonella</i> y las resistencias a antimicrobianos asociadas en cinco especies diferentes de aves silvestres ligadas a ambientes urbanos	117
3.3.1. Población de estudio y recogida de muestras	117
3.3.2. Aislamiento e identificación de <i>Salmonella</i>	118
3.3.3. Test de susceptibilidad a antimicrobianos	118
3.3.4. Análisis estadístico	119
4. Resultados	121
4.1. Estudio de <i>Salmonella</i> y las resistencias a antimicrobianos asociadas en una población de águila de Bonelli (<i>Aquila fasciata</i>) de la Comunidad Valenciana	123
4.1.1. Resumen	123
4.1.2. Referencias	123
4.1.3. Manuscrito original	125

4.2. Estudio comparativo de muestras cloacales conservadas de águila de Bonelli (<i>Aquila fasciata</i>) recogidas en lugares de difícil acceso para la detección de <i>Salmonella</i> spp.: congelación vs refrigeración	131
4.2.1. Resumen	131
4.2.2. Referencias	131
4.2.3. Manuscrito original (en revisión)	133
4.3. Estudios de <i>Salmonella</i> y las resistencias a antimicrobianos asociadas en cinco especies diferentes de aves silvestres ligadas a ambientes urbanos	147
4.3.1. Resumen	147
4.3.2. Referencias	147
4.3.3. Manuscrito original	149
5. Discusión general	155
6. Conclusiones / Conclusions	163
7. Referencias bibliográficas	167

Índice de figuras y tablas

Figura 1. Taxonomía del género <i>Salmonella</i> según Lignieres 1900. Fuente: elaboración propia.	48
Figura 2. Fuentes de infección de <i>Salmonella</i> más frecuentes en la Unión Europea en 2018. Fuente: gráfico modificado a partir de datos de EFSA, 2019.	56
Figura 3. Diagrama Sankey de la distribución de serovares de <i>Salmonella</i> más prevalentes en humanos y las fuentes de infección animal o alimentaria. Fuente: EFSA, 2018.	57
Figura 4. Prevalencias de <i>Salmonella</i> observadas en los diferentes tipos de producción aviar en la Unión Europea, desde 2007 hasta 2018. Fuente: EFSA, 2019.	58
Figura 5. Colonias compatibles con <i>Salmonella</i> en diferentes medios selectivos y diferenciales. De izquierda a derecha y de arriba a abajo: MacConkey, Desoxicolato, EMB, Hektoen, XLD, SS, Verde Brillante, XLT4® y ASAP®. Fuente: collage de elaboración propia montado con varias imágenes extraídas de diferentes proveedores.	63
Figura 6. Transformación genética. Fuente: adaptado de Tortora <i>et al.</i> (2007).	73
Figura 7. Transducción. Fuente: adaptado de Tortora <i>et al.</i> (2007).	73
Figura 8. Conjugación bacteriana. Fuente: adaptado de Tortora <i>et al.</i> (2007).	74
Figura 9. Cronograma que muestra el tiempo transcurrido entre el descubrimiento de diversos antimicrobianos y la detección de resistencias frente a ellos. Fuente: Plan Nacional de Resistencia frente a Antimicrobianos (PRAN).	75
Figura 10. Principales causas de muerte y estimaciones de número de bajas que causarán en 2050. Fuente: O'Neil, 2014.	76
Figura 11. Test de sensibilidad a antimicrobianos con el método de difusión disco-placa (izquierda) y con el método de difusión E-test (derecha). Fuentes: imagen propia y Biomérieux® España, respectivamente.	81
Figura 12. Test de susceptibilidad a antimicrobianos con el método de microtitulación en caldo Mueller-Hinton. Fuente: imagen propia.	82
Figura 13. Fotografía de cernícalo patirrojo (izquierda) y buitre orejudo (derecha). Fuente: imágenes de Tomás Belka y Yathin Sk, respectivamente.	89
Figura 14. Fotografía de águila imperial joven (izquierda) y alimoche (derecha). Fuente: Juan José Iglesias Lebrija (GREFA) y Sergio de la Fuente García (GREFA), respectivamente.	89

Figura 15. Fotografía de águila de Bonelli en vuelo (izquierda) y posada (derecha). Fuente: Sergio de la Fuente (GREFA).	90
Figura 16. Jaula de aclimatación o hacking con seis águilas de Bonelli ya liberadas. Fuente: proyecto Life Bonelli (GREFA).	93
Figura 17. Selección de aves urbanas incluidas en el desarrollo de esta tesis. De izquierda a derecha: cigüeña blanca, gaviota sombría, paloma torcaz, estornino negro y gorrión común. Fuente: dibujos extraídos de la Enciclopedia de Aves de España SEO/Birdlife, 2008.	94
Figura 18. Diagrama de flujo de microorganismos entre los diferentes sectores. Fuente: elaboración propia.	97
Figura 19. Mapa del área de estudio en el que se indican los nidos de águila de Bonelli de las provincias de Castellón, Valencia y Alicante incluidos en el estudio. En las imágenes que acompañan se puede ver todo el proceso desde el avistamiento del nido (Imagen A) hasta que el individuo es examinado por los veterinarios (Imagen E). El asterisco indica donde se encuentra el nido en cada imagen. Fuente: Martín-Maldonado <i>et al.</i> , 2019.	110
Figura 20. Recogida de hisopo cloacal en un pollo de águila de Bonelli. Fuente: Martín-Maldonado <i>et al.</i> , 2019.	111
Figura 21. Crecimiento compatible con <i>Salmonella</i> en MSRV, XLD y ASAP (de izquierda a derecha). Fuente: <i>collage</i> de elaboración propia con imágenes cedidas por la Dra. Clara Marín Orenga.	112
Figura 22. Test de susceptibilidad a antimicrobianos por difusión disco-placa de dos cepas bacterianas diferentes. Fuente: imagen propia.	113
Figura 23. Revisión veterinaria de las águilas criadas en cautividad. Fuente: imágenes de GREFA.	114
Figura 24. Diferencias entre un pollo/cría alimentado por un parental (izquierda) y un volantón (derecha) de águila de Bonelli. Fuente: proyecto Life Bonelli (GREFA).	115
Figura 25. Recogida de hisopos cloacales en cigüeña blanca y paloma torcaz. Fuente: imágenes de GREFA.	118

Tabla 1. Perfil bioquímico general del género <i>Salmonella</i> (Terragno <i>et al.</i> , 2003).	67
Tabla 2. Propiedades bioquímicas diferenciales de las subespecies de <i>Salmonella</i> spp. (Le Minor <i>et al.</i> , 1982:1986).	67
Tabla 3. Fórmula empleada para 500 mL de medio de transporte FBP con carbón activado.	116

Abreviaturas y acrónimos

°C: grados Celsius	ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ADN: ácido desoxirribonucleico	EMB: Eosin Methylene Blue
AMP: ampicilina	etc: etcétera
AMR: antimicrobial resistance	EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
API: Analytical Profile Index	FBP: Fructose-1,6-bisphosphatase supplement
a_w: actividad de agua	FDA: Food and Drug Administration
AZM: azitromicina	FOX: cefoxitina
BPW: buffered peptone water	GLM: General Linear Model
C: cloranfenicol	GM: gentamicina
CAZ: ceftazidime	GN: gentamicina
CDC: centre for disease control and prevention	GPS: Global Positioning System
CECAV: centro de calidad avícola de la Comunidad Valenciana	GREFA: Grupo de Rehabilitación de la Fauna Autóctona y su Hábitat
CHL: cloranfenicol	GSM: Global System for Mobile communications
CIA: critically important antimicrobials	H: antígeno flagelar
CIP: ciprofloxacino	H1: flagelinas de fase 1
CLSI: clinical laboratory standards institute	H2: flagelinas de fase 2
CMI: concentración mínima inhibitoria	ISO: International Organization for Standardization
COL: colistina	LCV: Laboratorio Central de Veterinaria
CS: citrato de Simmons	LPS: Lipopolisacárido
CTX: cefotaxime	Mck: MacConkey agar
ECDC: European Centre for Disease Control and Prevention	
EFSA: European Food Safety Agency	

MDR: Multi-drug resistant

MEM: meropenem

MENSURA: Mesa Española para la Normalización de la Susceptibilidad y Resistencia a Antimicrobianos

mL: mililitro

MLVA: Multiple Loci VNTR Analysis

MSRV: Modified Semisolid Rappaport Vasiliadis

mST: monofasic *Salmonella* Typhimurium

μL: microlitros

n: número de individuos, tamaño de muestra

NA: ácido nalidíxico

NCCLS: National Commitee for Clinical Laboratory Standards Suggest

O: antígeno somático

OIE: Oficina Internacional de Epizootías

OMS: Organización Mundial de la Salud

p: valor de probabilidad

PCR: Polymerase Chain Reaction

PDR: Pan-Drug Resistant

PFGE: Pulsed-Field Gel Electrophoresis

pH: power of hydrogen

PRAN: Plan Nacional frente a las Resistencias a Antimicrobianos

pSLT: virulence plasmid of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium

RAPD: Random Amplification of Polymorphic DNA

RCM: Medio Reforzado para Clostridios

ReLAVRA: Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

RL: sulfametoxazol

SIGRE: Sistema Integrado de Gestión y Recogida de Envases

SIM: Sulfito Indol Motilidad

spp: especie

SS: *Salmonella-Shigella* agar

STX: trimetoprim-sulfametoxazol

TCY: tetraciclina

TGC: tigeciclina

TM: trimetoprim

TSI: Triple Sugar Iron

UFC: Unidad Formadora de Colonias

UFCS: Union Française des Centres de Sauvegarde de la faune sauvage

UICN: Unión International para la Conservación de la Naturaleza

Vi: antígeno de superficie o de virulencia

vol/vol: volume to volume

VP: Voger-Proskauer

vs: *versus*

W: trimetoprim

XDR: Extreme-drug Resistant

XLD: Xilosa-lisina-deoxicolato

XLT4: Xilosa-lisina-tergitol

Resumen / Abstract

RESUMEN

Salmonella es el segundo patógeno de importancia en salud pública en número de casos, y el número uno en número de brotes, en la Unión Europea, solo por detrás de *Campylobacter*. A pesar de ser una bacteria comensal del intestino de numerosas especies homeotermas, puede llegar a causar cuadros clínicos de tipo gastrointestinal o, incluso, extraintestinal, como por ejemplo artritis reactivas o meningitis. Además, *Salmonella* es una enterobacteria de la que se han aislado cepas resistentes a diferentes antimicrobianos tanto en humanos como en animales, agravando los cuadros clínicos observados al no ser eficaz el tratamiento. En la actualidad, la resistencia a antimicrobianos representa el mayor reto al que se enfrenta la medicina occidental del siglo XXI, pues ocasiona fallo terapéutico en miles de casos y un gran número de muertes al año. En los últimos años, se ha publicado la detección de cepas de *Salmonella* resistente a diferentes antimicrobianos a partir de muestras obtenidas de fauna salvaje. Se ha demostrado la capacidad de la fauna silvestre como portadora asintomática de dicha bacteria, lo cual cobra especial importancia en el caso de las aves. A través del vuelo, son capaces de cubrir más territorio que los mamíferos, aún más en el caso de aves migratorias, teniendo una capacidad de diseminación de bacterias mucho mayor. Sin embargo, el mayor riesgo no es la diseminación de *Salmonella* por diferentes regiones, sino la de cepas portadoras de resistencias a antimicrobianos. Por tanto, resulta de vital importancia el estudio de *Salmonella* en las aves silvestres, incluyendo el perfil de resistencias a antimicrobianos presente en las cepas detectadas. En este contexto, entre los años 2015 y 2019, se llevaron a cabo tres estudios experimentales en diferentes poblaciones de aves silvestres.

El objetivo del primer estudio experimental fue determinar la presencia de *Salmonella* y de las resistencias a antimicrobianos asociadas a ella en individuos jóvenes de águila de Bonelli nacidos en libertad en la Comunidad Valenciana. Como objetivo secundario se estableció la definición del tipo de muestra más adecuado para la detección de *Salmonella* en estas circunstancias. Para ello se recogieron hisopos cloacales de cada individuo, los cuales se conservaron en medio Cary Blair, al mismo tiempo que heces frescas de cada nido. La detección de *Salmonella* se realizó siguiendo la norma ISO 6579:2002 (Anexo D), y las cepas obtenidas fueron serotipadas en el Laboratorio Nacional de Referencia para Salmonelosis Animal (LCV, Algete), mediante aglutinación antigénica con antiseros específicos siguiendo el esquema Le Minor-White-Kauffman. Finalmente, se realizó un test de susceptibilidad a antimicrobianos a todas las cepas aisladas, mediante el test de difusión disco-placa o test de Kirby-Bauer, siguiendo las recomendaciones del Comité Europeo de Análisis de Susceptibilidad a Antimicrobianos (EUCAST). Los resultados mostraron una prevalencia de *Salmonella* de 35,5% de los individuos

de águila de Bonelli incluidos en el estudio, mientras que la positividad en nidos fue del 60,7%, lo que indica que la mejor muestra para la detección de *Salmonella* son las heces frescas. La prevalencia obtenida fue muy superior a la observada en otras regiones de España en la misma especie, si bien dichos estudios se basaron en muestras de individuos adultos y no en pollos. Este puede ser un factor a tener en cuenta, pues la microbiota intestinal sufre diversas modificaciones a lo largo del desarrollo del individuo hasta estabilizarse. Por otro lado, el ambiente en el que se crían los pollos puede favorecer la infección y reinfección a partir de alimento contaminado o heces de hermanos o padres infectados que se van acumulando en el nido. Los serotipos más aislados fueron Enteritidis, Typhimurium y Houston (14,3% cada uno), siendo los dos primeros serotipos zoonóticos de gran relevancia en avicultura y salud pública. Este hecho, recalca la importancia que pueden llegar a tener las aves silvestres como diseminadoras de *Salmonella* por el medio ambiente, pudiendo contaminar cultivos, granjas e incluso zonas urbanas. También se detectaron en menor medida *S. Cerro*, *S. Manhattan*, *S. Carnac* y *S. Tomegbe*. Finalmente, el análisis de susceptibilidad a antimicrobianos determinó un 36,8% de las cepas resistentes a ampicilina y una única cepa resistente además a tigeciclina, ambos antimicrobianos ampliamente utilizados en producción porcina en los últimos años. Estos hallazgos sugieren una posible relación entre la producción animal y el medio ambiente, de manera que bacterias que hayan adquirido resistencias a antimicrobianos en granjas, puedan ser diseminadas por el medio natural hasta llegar a la fauna silvestre.

El segundo estudio experimental tuvo como objetivo estudiar la viabilidad de *Salmonella* en muestras cloacales recogidas en individuos silvestres de difícil acceso, usando de nuevo como modelo el águila de Bonelli, y comparando el empleo de medio FBP enriquecido con carbón activo en congelación frente al uso de medio Cary Blair en refrigeración. En esta ocasión, se recogieron muestras de individuos volantes nacidos en libertad en Andalucía y de individuos volantes nacidos en cautividad en centros de recuperación de fauna silvestre. Se recogieron dos hisopos cloacales de cada individuo ($n=63$), uno se conservó en medio Cary Blair en refrigeración, mientras que el segundo en medio nutritivo FBP enriquecido con carbón activado en congelación. Las muestras fueron analizadas a las 72 horas de su recogida, en el caso de los hisopos conservados en Cary Blair, y a los tres meses en el caso del medio FBP. De nuevo, la detección de *Salmonella* se realizó en ambos casos siguiendo la norma ISO 6579:2002 (Anexo D). No se detectó *Salmonella* en ninguna de las muestras de águila de Bonelli procesadas, independientemente del método de preservación. Por tanto, tanto el medio FBP en congelación como el medio Cary Blair en refrigeración durante más de 72 horas resultaron ineficaces en la detección de *Salmonella* en águila de Bonelli.

Por último, el objetivo del tercer estudio experimental fue investigar la presencia de *Salmonella* y las resistencias a antimicrobianos asociadas a ella en individuos de cinco especies diferentes de aves urbanas. A fin de poder abarcar diferentes nichos ecológicos y comportamientos se seleccionaron las siguientes especies: cigüeña blanca, gaviota sombría, paloma torcaz, estornino negro y gorrión común. Todas las aves incluidas en este estudio fueron animales ingresados en el hospital de fauna salvaje de GREFA por diferentes motivos. En todos ellos, se recogieron hisopos cloacales durante su primera revisión en el hospital (n=300) y siempre previo a la administración de cualquier tratamiento, que fueron conservados en medio Cary Blair en refrigeración hasta su procesado en el laboratorio de GREFA en las primeras 24 horas. La detección de *Salmonella* se realizó siguiendo la norma ISO 6579-1:2017 (Anexo D), y el serotipado de las cepas obtenidas se realizó en el Laboratorio Nacional de Referencia para Salmonelosis Animal (LCV, Algete), mediante aglutinación antigénica con antisueros específicos siguiendo el esquema Le Minor-White-Kauffman. En este estudio, el test de susceptibilidad a antimicrobianos de las cepas aisladas de aves urbanas se realizó mediante microdilución en caldo Mueller-Hinton, siguiendo las recomendaciones de la Decisión Europea 2013/652/EU. Los resultados mostraron una prevalencia global de *Salmonella* de 12,3%, siendo la especie con mayor tasa de infección la cigüeña blanca (59,5%), y el gorrión común y el estornino negro las especies con menor prevalencia (5,4% y 2,7%, respectivamente). Los resultados obtenidos se corresponden con los publicados por otros autores. Además, se observó una relación estadísticamente significativa entre la detección de *Salmonella* y el ambiente en el que se recogieron las aves, habiendo una diferencia significativa en el grupo que provenía de vertederos ($p=0,031$). Los serotipos más detectados fueron de nuevo Enteritidis (43,2%) y Typhimurium (16,2%), seguidos de su variante monofásica o mST (13,5%) y otros seis serotipos previamente descrito en fauna silvestre por diferentes autores. El test de susceptibilidad a antimicrobianos reveló un 40,5% de cepas resistentes a algún antimicrobiano, de las cuales el 86,7% fueron consideradas multirresistentes. Los antimicrobianos con mayor tasa de resistencia fueron con diferencia ciprofloxacino (36,4%) y el ácido nalidíxico (36,4%), seguido de la colistina (27,3%) entre otros. De nuevo, se observó una estrecha relación entre el ambiente del que provenían las aves y la presencia de AMR, existiendo una mayor tasa de AMR en el grupo que provenía de vertederos ($p<0,05$). De esta manera se pone de manifiesto la diseminación de las resistencias a antimicrobianos en la fauna urbana frente a un amplio número de antimicrobianos de diferentes familias, mostrando además su potencial como agentes diseminadores en el medio ambiente.

En conclusión, los resultados obtenidos en los diferentes estudios que forman esta tesis doctoral muestran el importante papel como portadores asintomáticos, y por tanto diseminadores, de *Salmonella* spp. que juegan tanto el águila de Bonelli como las aves urbanas. La presencia de resistencias a antimicrobianos en las cepas aisladas a lo largo de estos trabajos es ligeramente mayor en aves urbanas que en el águila de Bonelli, siendo en ambos casos un porcentaje moderado-alto. Esta proporción de bacterias resistentes en fauna silvestre destaca la importancia del control del uso de antimicrobianos y la gestión de sus residuos a fin de ralentizar el desarrollo de resistencias.

ABSTRACT

Salmonella is one of the most important foodborne pathogens in the European Union. It causes the highest number of outbreaks, and is the second pathogen with the greatest number of cases, only behind *Campylobacter*. Despite being a commensal bacterium of the intestine of numerous homoeothermic species, it can cause gastrointestinal or even extra-intestinal clinical signs, like reactive arthritis or meningitis. Furthermore, *Salmonella* resistant strains have already been isolated in both humans and animals to many different antimicrobials. This condition can affect the effectiveness of treatment, aggravating clinical presentations. Currently, antimicrobial resistance represents the greatest challenge for 21st-century medicine, as it causes treatment failure in thousands of cases and a large number of deaths per year. During last years, numerous resistant *Salmonella* strains to different antimicrobials has been detected from samples obtained from wildlife and environment. The ability of wildlife as an asymptomatic carrier of this bacterium has been demonstrated, which is especially important in the case of birds. Through flight, they are capable of covering more territory than mammals, even more in the case of migratory birds. In this context, birds could have a higher capacity for spread bacteria and antimicrobial resistance, as *Salmonella* resistant strains. Therefore, the study of *Salmonella* epidemiology in wild birds is of vital importance, including the antimicrobial resistance pattern present in detected strains. In this context, three different studies were carried in different wild bird populations between 2015 and 2019.

The aim of the first study was to study the presence of *Salmonella* and antimicrobial resistances in free-borne nestlings of Bonelli's eagle from the Valencia Region (n=45). As secondary objective, the determination of the most effective type of sample for the detection of *Salmonella* (feces or cloacal swab) was established. From each animal a cloacal swab preserved in Cary Blair medium, and fresh feces from each nest were collected and analyzed. The detection of *Salmonella* was carried out following the ISO 6579: 2002 recommendations (Annex D), and the obtained strains were serotyped at the National Reference Laboratory for Animal Salmonellosis (LCV, Algete), by antigenic agglutination with specific antisera following the Le Minor-White-Kauffman scheme the serotyping. Finally, antimicrobial susceptibility tests were performed for all the isolated strains by disk diffusion or Kirby-Bauer method, and according to European Committee for Antimicrobial Susceptibility Test (EUCAST) guidelines. Prevalence of *Salmonella* in Bonelli's eagle nestlings was 35.5%, while the positivity in nests was 60.7%, which is much higher than that observed in other regions of Spain in the same species, although these studies were based on samples from adults and not on nestlings. This may be a factor to take into account since the intestinal microbiota undergoes some modifications throughout the

development of the individual until it stabilizes. Moreover, the environment in which the chickens are raised may favor infection and reinfection from contaminated food or feces from infected siblings or parents accumulated in the nest. The most isolated serotypes were Enteritidis, Typhimurium and Houston (14.3%, each one). The two first serotypes are considered important zoonotic pathogens in poultry and public health. This fact underscores the importance that wild birds can have as disseminators of *Salmonella* in the environment, contaminating crops, farms and even urban areas. In a lower proportion, *S. Cerro*, *S. Manhattan*, *S. Carnac* and *S. Tomegbe* were also isolated. Finally, the antimicrobial susceptibility analysis determined 36.8% of the strains resistant to ampicillin, and a single strain also resistant to tigecycline. Both antimicrobials were widely employed in swine production. This fact suggests a relation between livestock and environment: bacteria with resistance acquired in farms can be disseminated through the environment and wildlife.

For the second experimental study, the aim was to study the viability of *Salmonella* in cloacal samples collected from wild Bonelli's eagles from remote areas, comparing two different preservation methods: freezing charcoal FBP medium vs. refrigerated Cary Blair medium. Free-borne nestling from Andalousia and captive-borne nestlings from wildlife rescue centers were sampled. Two cloacal swabs were obtained from each nestling (n=63): one was preserved in Cary Blair medium at 4°C during 72 hours, and the other in FBP medium enriched with activated carbon at -20°C during three months. *Salmonella* detection was performed according to the ISO 6579: 2002 recommendations (Annex D). *Salmonella* was not detected in any of the processed Bonelli's eagle samples, regardless of the preservation method employed. Thus, charcoal FBP at freezing temperatures and refrigerated Cary Blair for 72 hours resulted ineffective in *Salmonella* survival in swabs from Bonelli's eagle.

Finally, in the third experimental design the aim was to study the epidemiology of *Salmonella* and the antimicrobial resistance pattern of the isolated strains from individuals of five different species of urban birds were included. In order to be able to cover different ecological niches and behaviors, the species selected were: white stork, lesser black-backed gull, common wood pigeon, common starling and house sparrow. All the birds included in this study were animals admitted to the GREFA wildlife hospital for different reasons as natural diseases, traumas or orphan nestlings. From all of them, a cloacal swab was collected during their first examination in the hospital and prior to the administration of any treatment (n=300). Swabs were stored refrigerated in Cary Blair medium until processed at GREFA's laboratory within 24 hours from the collection. The detection of *Salmonella* was carried out following the ISO 6579-1: 2017 standards (Annex D), isolated strains were serotyped at the National Reference Laboratory for

Animal Salmonellosis (LCV, Algete), by antigenic agglutination with specific antisera following the Le Minor-White-Kauffman scheme the serotyping. The antimicrobial susceptibility test was performed by microdilution in Mueller-Hinton broth, according to the 2013/652/EU Decision. Results showed a global prevalence of *Salmonella* of 12.3% in urban birds. The species with the highest infection rate was the white stork (59.5%, 22/37), in contrast to house sparrows and common starling, which had the lower rates (5.4% and 2.7%, respectively). The results obtained agree to those published by other authors. In addition, a statistically significant relationship was observed between the detection of *Salmonella* and the environment in which the birds were collected, with a significant difference in the group that came from landfills ($p=0.031$). The serotypes most detected were again Enteritidis (43.2%) and Typhimurium (16.2%), followed by monophasic variant or mST (13.5%) and six more serotypes previously reported in wildlife by other authors. The antimicrobial susceptibility test revealed 40.5% of strains resistant to some antimicrobial, of which 86.7% were considered multi-resistant. The antimicrobials with the highest rate of resistance were by far ciprofloxacin (36.4%) and nalidixic acid (36.4%), followed by colistin (27.3%) among others. Again, a close relationship was observed between the environment from which the birds came and the presence of AMR, with a higher rate of AMR in the group that came from landfills ($p < 0.05$). These results highlight the spread of antimicrobial resistance in urban birds to a large number of antimicrobials from different families, and the potential role of these birds as carriers and disseminators on the environment.

In conclusion, Bonelli's eagle and urban birds play an important role as asymptomatic carriers, and therefore disseminators, of *Salmonella* spp. The presence of antimicrobial resistance in the strains isolated throughout these studies is slightly higher in urban birds than in the Bonelli's eagle, with a moderate-high percentage in both cases. This proportion of resistant bacteria in wildlife stands out the importance of antimicrobial control and residues management in order to slow down the antimicrobial resistance development.

1. *Introducción*

1.1. Género *Salmonella*

1.1.1. Características del género *Salmonella*

Se trata de una enterobacteria de distribución mundial que forma parte de la microbiota intestinal de la mayoría de animales homeotermos y algunos poiquilotermos, sean domésticos o silvestres, debido a la gran capacidad de adaptación que presentan. La mayoría de los animales son, por tanto, portadores asintomáticos, excretando la bacteria a través de las heces y siendo la transmisión vía fecal-oral (CDC, 2017).

Las bacterias pertenecientes a este género son bacilos pleomórficos gram-negativos, catalasa positivos, oxidasa negativos, no fermentadores de lactosa y no formadores de esporas. Además, la mayoría poseen flagelos peritricos que les confieren cierta movilidad, con excepción de algunas variantes inmóviles. Poseen un metabolismo fermentativo y oxidativo, fermentando de esta manera la glucosa, el manitol y el sorbitol con producción de ácido y gas, a excepción de *Salmonella* Typhi y otras serovariedades que sólo producen ácido y sulfuro de hidrógeno (Terragno *et al.*, 2003; Stanchi *et al.*, 2007). Son anaerobios facultativos, de forma que en condiciones de anaerobiosis utilizan los carbohidratos del medio como fuente de carbono, mientras que en presencia de oxígeno pueden nutrirse de ácidos orgánicos y aminoácidos además de los carbohidratos (Biberstein y Chung Zee, 1994).

La media de supervivencia de *Salmonella* es alta en ambientes asociados a sustratos orgánicos, sobreviviendo incluso a la refrigeración y la congelación. Su capacidad de multiplicación no se ve alterada en rangos de temperatura entre los 7°C y los 49°C, sin embargo, se inactiva a temperaturas fuera de ese rango y/o pH (*power of hydrogen*) inferior a 5.0. También son capaces de tolerar altas concentraciones de sal, aunque no son capaces de multiplicarse en concentraciones superiores a 3-4% de cloruro sódico (Jawetz *et al.*, 2014).

Se ha descrito una alta supervivencia de estas bacterias en agua, llegando a sobrevivir durante varios meses. El valor óptimo de actividad de agua (a_w) para su multiplicación es 0.995, aunque también presenta una gran resistencia a la baja a_w por lo que puede sobrevivir en ambientes secos hasta varias semanas. Incluso se ha descrito la supervivencia de *Salmonella* en agua congelada durante periodos prolongados (Jawetz *et al.*, 2014). Asimismo, puede permanecer viable durante meses en productos ricos en proteínas y grasas, como por ejemplo el chocolate. También toleran elevadas concentraciones de ácidos biliares y su crecimiento *in vitro* no se ve inhibido por la presencia de colorantes como el azul de metileno, el cristal violeta o el verde brillante, lo que confiere cierta ventaja a la hora de preparar medios de cultivo selectivos y

diferenciales. Sin embargo, se trata de un microorganismo sensible a los típicos tratamientos térmicos utilizados a la hora de cocinar, lo que ayuda en el control y prevención de la salmonelosis. Además, los desinfectantes comunes como fenoles, iodados y clorados resultan eficaces frente a las bacterias de este género (Jawetz *et al.*, 2014).

1.1.2. Taxonomía y nomenclatura

Salmonella spp. se incluye dentro de la familia Enterobacteriaceae, colonizando de forma natural el tracto intestinal de los animales homeotermos, la cual a su vez pertenece al orden Enterobacteriales (Figura 1).

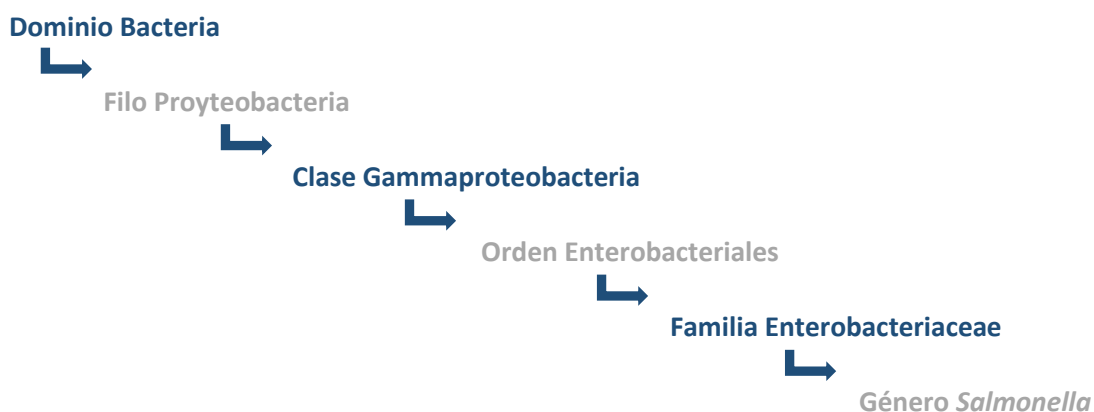


Figura 1. Taxonomía del género *Salmonella* según Lignieres 1900. Fuente: elaboración propia.

Las bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae son comensales que habitan de manera regular el intestino de numerosas especies de mamíferos, aves, reptiles, e incluso anfibios. Por lo general, suelen comportarse como bacterias apatógenas, como por ejemplo *Hafnia*. Sin embargo, pueden llegar a ser patógenas oportunistas e incluso patógenos de gran importancia en salud pública, como son algunas especies de *Salmonella* y *Campylobacter*. Como patógenos oportunistas son capaces de provocar gran variedad de signos clínicos en animales y humanos, la mayoría de carácter gastrointestinal, interfiriendo en el desarrollo de la patología numerosos factores (especie bacteriana, estado inmunitario y edad del huésped, vía de transmisión, etc.). Los patógenos más importantes de esta familia poseen una estructura antigénica compleja y son capaces de producir diferentes factores de virulencia y toxinas, por lo que pueden causar tanto lesiones entéricas como sistémicas (Muñoz *et al.*, 2000).

En la actualidad, el género *Salmonella* comprende dos especies, *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*, agrupando esta última la mayoría de las bacterias del género que colonizan el intestino de los animales homeotermos. A su vez, *S. enterica* se divide en seis subespecies (o subgrupos fenotípicamente diferentes), los cuales se designan bien por su nombre bien por un número romano: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI) (Grimont y Weill, 2007). En 1989, la hasta entonces denominada subespecie *bongori* o subgrupo V pasó a ser una especie en sí misma (Reeves *et al.*, 1989).

A lo largo de las últimas décadas, las diferentes subespecies de *Salmonella* han sido aisladas de multitud de especies animales, así como de diferentes ambientes (Terragno *et al.*, 2003; Grimont y Weill, 2007):

- ✓ *Salmonella enterica*:
 - Aislada principalmente de humanos y animales homeotermos: *S. enterica* subsp. *enterica*.
 - Aislada principalmente de animales poiquilotermos y del ambiente: *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* y *S. enterica* subsp. *indica*.
- ✓ *Salmonella bongori*: aunque no constituye un patógeno para los humanos, se ha aislado en animales homeotermos, observando relación con ciertas patologías.

Dentro de cada subespecie encontramos diferentes serotipos o serovares de *Salmonella* que pueden clasificarse desde un punto de vista epidemiológico en función de su rango de adaptación a una o más especies hospedadoras (Kingsley y Bäumler, 2000). Según esto, existen serotipos adaptados a un único hospedador, como por ejemplo *Salmonella Gallinarum* en aves, serotipos adaptadas que en ocasiones pueden aislarse en otros hospedadores, como *Salmonella Cholerasuis* que se asocia a suidosis, y serotipos no adaptados a hospedadores específicos, como por ejemplo *Salmonella Typhimurium* (Uzzau *et al.*, 2000). Por tanto, ciertos serotipos de *Salmonella* pueden considerarse zoonóticos al ser capaces de saltar de una especie hospedadora a otra.

1.1.3. Caracterización de *Salmonella* spp.

La clasificación de *Salmonella* en serotipos se realiza a partir de la combinación de antígenos superficiales somáticos (O) o flagelares (H), los cuales se identifican mediante técnicas de

microaglutinación con sueros específicos. Eventualmente también se puede determinar un antígeno de superficie conocido como antígeno de virulencia (Vi), presente en algunos serotipos de *Salmonella* (Typhi, Paratyphi C, etc.), y relacionado con la capacidad de invasión de la bacteria (Popoff y Le Minor, 1997; Jawetz *et al.*, 2014). La clasificación de los serotipos de *Salmonella* según la estructura antigénica se basa en el esquema Kauffmann-White, ya que fue White quien realizó la primera clasificación en 1926, la cual modificó Kauffmann en 1941. Recientemente Grimont y Weill (2007) propusieron nombrar el esquema como Le Minor-Kauffmann-White, pues de todos los serotipos descritos de *Salmonella*, más de 1300 fueron descritos por Le Minor.

Los **antígenos somáticos (O)** son polisacáridos termoestables, tipo-específicos, que se localizan en la pared celular de la bacteria, incluidos en el lipopolisacárido (LPS). Se dividen en antígenos mayores, que definen el serogrupo y son compartidos por todas las bacterias del mismo, y antígenos menores, cuyo valor discriminativo es menor ya que son compartidos por salmonelas de diferentes serogrupos (Stanchi *et al.*, 2007). El esquema Le Minor-Kauffmann-White divide al género *Salmonella* en 67 serogrupos, a los cuales se les asignó inicialmente una letra de la A a la Z. Sin embargo, actualmente se designa cada grupo antígenos según las características del antígeno somático mayor, manteniendo las letras de forma provisional y entre paréntesis, por ejemplo, O:4 (B) (Grimont y Weill, 2007). Cabe destacar la existencia de algunas cepas, comúnmente denominadas “rugosas”, que carecen del polisacárido O por un defecto en su síntesis, por lo que no se pueden serotipar.

Al contrario que los anteriores, los **antígenos flagelares (H)** son proteicos y termolábiles, y forman parte de las flagelinas de los flagelos. La gran mayoría de las serovariedades tienen dos fases en su antígeno flagelar (H1 y H2), diferenciables por medio de aglutinación en tubo de ensayo, aunque algunas llamadas monofásicas, poseen una única fase flagelar. Las flagelinas de fase 1 o H1 son específicas y características del serotipo, y se denominan con letras minúsculas que van de la *a* a la *z*. Las flagelinas de fase 2 o H2 no son específicas, por lo que son comunes a diferentes serotipos, y se denominan con la letra *z* seguida de subíndices. Por último, los aislados monofásicos pueden pertenecer a serovariedades que de manera natural carece de ambas fases flagelares, o bien a consecuencia de una inactivación o falta de expresión del gen que codifica la fase ausente (Andino y Hanning, 2015).

Por último, el **antígeno de superficie o de virulencia (Vi)** es también termolábil, y protege a la bacteria proporcionándole una resistencia antifagocítica. Se trata de un polisacárido compuesto de ácido N-acetilglucosaminurónico que ayuda a prevenir la fagocitosis y protege a la bacteria

de las reacciones oxidativas que producen los fagocitos. Así, las serovariedades que presentan este antígeno son más infecciosas y virulentas que las que no (Pachón, 2009).

Aplicando todo lo anterior, la fórmula antigénica de una *Salmonella* se expresa como:

Antígeno somático O: Antígeno flagelar H1: Antígeno flagelar H2

Por ejemplo, la fórmula de *S. Typhimurium* es 1,4,5,12:i:1,2. No obstante, todas las serovariedades de *S. enterica* subsp. *enterica* conservan su denominación original, la cual suele hacer referencia a la región geográfica en la que aislaron por primera vez (*S. Dublin* o *S. Ohio*). Las serovariedades de las demás subespecies y de *S. bongori* aisladas después de 1966 deben designarse con su fórmula antigénica correspondiente. Por otro lado, la escritura de los serotipos en los textos debe ir precedida de la palabra “serotipo” o “ser.” siempre que se mencione por primera vez, y debe realizarse con la inicial en mayúscula y sin cursiva. Por ejemplo: *Salmonella* serotipo Typhimurium o *Salmonella* ser. Typhimurium (Grimont y Weill, 2007).

En la actualidad se han descrito más de 2500 serotipos de *Salmonella* mediante dicho esquema (Dekker y Frank, 2015). Más del 50% de los serotipos descritos pertenecen a *S. enterica* subsp. *enterica*.

1.1.4. Factores de virulencia

La virulencia de *Salmonella* se relaciona con la capacidad que presenta para invadir las células hospedadoras, replicarse en su interior y resistir a los mecanismos de defensa típicos (digestión por fagocitos y destrucción por la acción del complemento). Además del antígeno de superficie (Vi) ya explicado anteriormente, se han descrito diferentes factores de virulencia en el género *Salmonella* (Pachón, 2009).

El primero es la **capacidad de adherencia** a las células epiteliales del intestino o a su matriz extracelular (Wilson *et al.*, 2019). La adherencia se realiza a través de adhesinas, cuya estructura les permite reconocer los receptores de los enterocitos, así como activar los linfocitos B y neutrófilos favoreciendo la proliferación celular y secreción de citocinas. Dentro de la amplia variedad de adhesinas que existen, las enterobacterias suelen presentar: fimbria, fibrilla, flagelo, lipopolisacárido y cápsula.

- ✓ Las fimbrias y los pelos o *pili* presentan una estructura similar a los flagelos, pero no confieren motilidad.

- ✓ La presencia de flagelo y/o cápsula viene definido por la serovariedad de *Salmonella*, de manera que únicamente presentan cápsula los serovares Typhi, Paratyphi y Dublin. En cuanto al flagelo, todas las serovariedades son mótils a excepción de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*.

La producción de adhesinas codificadas por el plásmido de virulencia (*pSLT*: virulence plasmid *Salmonella* Typhimurium) permiten la unión de la bacteria a las microvellosidades del enterocito mediante la presencia de fimbrias agregativas conocidas como *curli*, así como la unión de la bacteria a las placas de Peyer a través de fimbrias polares largas (Wilson *et al.*, 2019). Además, en algunas serovariedades de *Salmonella* (por ejemplo, Typhimurium) se ha descrito la formación de pseudópodos en el enterocito hospedador, lo que favorece la entrada de la bacteria en vesículas endocíticas.

La **producción de toxinas** constituye otro factor de virulencia a tener en cuenta. *Salmonella* es capaz de producir diferentes tipos de toxinas (Ochoa y Rodríguez, 2005):

- ✓ Enterotoxinas: moléculas liberadas al intestino que dan lugar a síntomas gastrointestinales como diarrea y cólico. Se expresan pocas horas después de la adherencia de la bacteria con el enterocito, y está presente en numerosos serovares.
- ✓ Endotoxinas: forman parte de la membrana externa de la bacteria, estando su actividad muy ligada al LPS. Favorecen la respuesta inflamatoria local que daña el epitelio intestinal y ofrecen una resistencia a la bacteria frente a la acción del complemento al impedir que éste se una a la membrana externa de la bacteria.
- ✓ Citotoxinas: se asocian con la superficie celular, inhibiendo la síntesis proteica de la célula hospedadora, y facilitando de esta manera la adherencia de la bacteria a los enterocitos. Su acción provoca la muerte celular y su desprendimiento de la mucosa intestinal, lo que se traduce en un flujo de iones y líquido hacia la luz intestinal que origina la diarrea. Se considera que la producción de estas toxinas es dependiente de la fase de crecimiento bacteriano, observando una mayor producción en la fase logarítmica que en la estacionaria.

Por otro lado, *Salmonella* es capaz de liberar diversas **citocinas pro-inflamatorias** que inducen la migración de neutrófilos y macrófagos produciendo inflamación a nivel intestinal. Dicha inflamación reduce la permeabilidad vascular, que junto con la pérdida de la integridad del epitelio intestinal incrementa la salida de líquidos y electrolitos al lumen intestinal potenciando

la diarrea. Además, la acción de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa de *Salmonella* neutralizan los radicales libres producidos por los fagocitos (Wilson *et al.*, 2019).

Finalmente, la **capacidad de supervivencia en ambientes ácidos** es otro factor de virulencia, pues permite a la bacteria atravesar los jugos estomacales para llegar al intestino, donde se realiza la infección (Wilson *et al.*, 2019).

1.1.5. Salmonelosis

Los reservorios de *Salmonella* incluyen tanto animales domésticos, como de producción y silvestres. Se han descrito casos de salmonelosis relacionados con el contacto con ganado porcino, vacuno, aves silvestres y de corral, roedores, reptiles, perros y gatos. La mayoría de los animales son portadores asintomáticos que excretan *Salmonella* de forma intermitente a través de las heces (Barrow y Methner, 2013).

La transmisión se produce vía fecal-oral, y puede ser directa o indirecta al ingerir alimentos o agua contaminada. En humanos, la salmonelosis está principalmente asociada al consumo de alimentos contaminados de origen animal (ovoproductos, carne de ave y leche), crudos o mal cocinados, aunque también se ha descrito asociada al consumo de hortalizas y frutas contaminadas por estiércol y al contacto con mascotas u otros animales (Cruz, 2016). También se ha descrito la transmisión vertical transovárica, considerándose la principal vía de contaminación de *Salmonella* en producción de huevos al ser la más difícil de combatir.

Tras la ingestión de la bacteria, se produce la invasión del tejido linfoide intestinal (placas de Peyer y tonsilas cecales en aves), proliferando en la capa mucosa de las células epiteliales del intestino. Posteriormente, *Salmonella* invade los enterocitos adhiriéndose a la superficie de los mismos mediante fimbrias y produciendo una alteración en su superficie conocida como *ruffling* como respuesta al contacto, lo que permite la entrada de la bacteria en el interior del enterocito. Se considera que *Salmonella* puede invadir diferentes líneas celulares, para lo cual es capaz de estimular diferentes vías de transducción de señales para invadir las células hospedadoras (Ochoa y Rodríguez, 2005).

Se trata de una infección intracelular facultativa, que puede llevarse a cabo dentro de células no fagocíticas y, en ocasiones, en las vacuolas con bajo pH de los macrófagos. Una vez la infección llega a la lámina propia del intestino, se produce una reacción inflamatoria, seguida de una trombosis y finalmente ulceración de la misma (Barrow y Methner, 2013). Todo ello origina una secreción de fluido intestinal y, por tanto, un cuadro de diarrea.

Las serovariedades no tifoideas afectan al íleon y, en menor medida, al colon, causando leves ulceraciones en la mucosa y ocasionado un cuadro clínico gastrointestinal con sintomatología leve y autolimitante, de 4-7 días de duración. La lesión más observada es una enterocolitis con contenido intestinal sanguinolento, acompañado de un aumento en el tamaño de los ganglios mesentéricos. Los síntomas más comunes son: fiebre alta, dolor abdominal, diarrea muy acuosa que puede ser sanguinolenta, náuseas e incluso vómitos (Dekker y Frank, 2015).

Sin embargo, en algunos casos, ocurre una fase extraintestinal con diseminación de la bacteria a ganglios linfáticos mesentéricos y sangre, pudiendo alcanzar el resto de órganos (bazo, hígado, ovario, etc.). En estos casos, el cuadro clínico puede agravarse con un proceso septicémico agudo que dará lugar a la presencia de abscesos intrabdominales, colecistitis, infecciones de tracto urinario, abortos, artritis, necrosis de extremidades, enfermedad respiratoria, etc. En cualquiera de los casos, los síntomas no son patognomónicos (Dekker y Frank, 2015).

Finalmente, en los casos de mayor gravedad se puede observar síndrome de Reiter, espondilitis anquilosante, osteomielitis y meningitis, principalmente en individuos inmunocompromidos, ancianos y niños. Se estima que el 5% de los casos de salmonelosis tiene complicaciones graves como la artritis reactiva, o daños neurológicos y neuromusculares, mientras que en 1% de los casos la infección provoca la muerte (Ajene *et al.*, 2013).

Tanto durante el proceso, como tras desaparecer los síntomas, los individuos con salmonelosis excretan la bacteria en las heces hasta 5 semanas después de la remisión de signos clínicos. Sin embargo, en algunos casos la excreción de *Salmonella* puede prolongarse hasta varios meses, pasando a ser portadores asintomáticos. El estado de portador crónico es más frecuente en animales que en humanos (Dekker y Frank, 2015).

Los serovares de mayor repercusión clínica son los que pertenecen a la subespecie *S. enterica enterica*, los cuales pueden afectar a multitud de animales de sangre caliente, incluyendo aves, reptiles y mamíferos. A este grupo pertenecen los dos serovares zoonóticos más importantes en salud pública y responsables de la mayoría de brotes de salmonelosis a nivel mundial: *Salmonella* Enteritidis, principalmente asociado a ovoproductos y carne de aves de corral, y *Salmonella* Typhimurium, relacionado con el ganado porcino, bovino, ovino y aves de corral (WHO, 2002; EFSA, 2019).

1.1.5.1. Importancia de la salmonelosis en salud pública

La salmonelosis presenta una distribución mundial, aunque de manera muy general las serovariedades tifoideas (Typhi y Paratyphi) afectan más a países en vías de desarrollo que las no tifoideas, siendo además específico de los humanos. La región más afectada por la fiebre tifoidea es el sureste asiático, siendo la India el país con mayor porcentaje de casos declarados (cerca de 500 casos cada 100.000 habitantes al año) (Marchello *et al.*, 2019). Se estima que a nivel mundial se producen al año unos 26 millones de casos provocados por *S. Typhi* y cerca de 5 millones por *S. Paratyphi*, causando un total de 215.000 muertes anuales. Su transmisión está ligada al consumo de alimentos contaminados con materia fecal de personas infectadas, y por tanto, a unas prácticas higiénico-sanitarias pobres (CDC, 2017).

Por el contrario, las serovariedades no tifoideas de *Salmonella* son menos específicas, teniendo un amplio rango de hospedadores, por lo que la fuente de infección pueden ser alimentos o agua contaminados con materia fecal procedente de personas, animales de abasto, mascotas, etc. Se ha observado una tendencia estacional, declarando un mayor número de caso durante los meses de verano. Se estima que a nivel global se producen cerca de 153 millones de casos anuales, con una media de 57.000 muertes al año (CDC, 2017). Desde 2008 se ha observado una importante disminución en el número de casos en la Unión Europea, la cual se estancó en 2013. Esta disminución se debe a los sistemas de vigilancia, control y prevención de los estados miembros. Sin embargo, a día de hoy, sigue siendo la segunda zoonosis más notificada en la Unión Europea, superada únicamente por la campylobacteriosis. El número de casos declarados de salmonelosis en humanos varía entre los diferentes países miembros de la Unión Europea, debido, entre otros factores, a las diferencias en los sistemas de monitorización, la recogida sistemática de muestras y el procesado de las mismas, la carga ganadera y el estado sanitario de la misma (EFSA, 2019).

En 2018, en la Unión Europea se confirmaron 91.857 casos de salmonelosis en humanos, lo que supone una incidencia de 20,1 casos por cada 100.000 habitantes, un 2% superior al año anterior, manteniendo la tendencia al alza de los últimos años. De todos los casos declarados, el 43,2% fueron hospitalizados, registrando una tasa de mortalidad del 0,19%. En cuanto al origen de estas infecciones, el 65,1% de estos casos fueron considerados domésticos, al no estar relacionados con viajes fuera de la Unión Europea. Dentro de las infecciones de origen alimentario, la salmonelosis supuso el 30,7% de los casos, siendo la principal fuente de infección los huevos y derivados de los mismos (Figura 2) (EFSA, 2019).

En España se declararon más de 8.700 casos, un 7,3% menos que los declarados en 2017. Sin embargo, si revisamos con detalle los informes de años anteriores, en España se observa una importante tendencia al alza desde 2014 hasta 2017, la cual se ha relacionado con una mejora en las medidas de vigilancia de *Salmonella* (EFSA, 2019). Al igual que en años anteriores, el mayor número de casos de salmonelosis se han registrado en niños menores de 14 años (51%). Además, se ha observado una tendencia marcadamente estacional en los brotes de salmonelosis, con picos en los meses de verano, relacionado con los cambios en los hábitos de alimentación en el periodo de vacaciones (EFSA, 2019; ECDC, 2019).

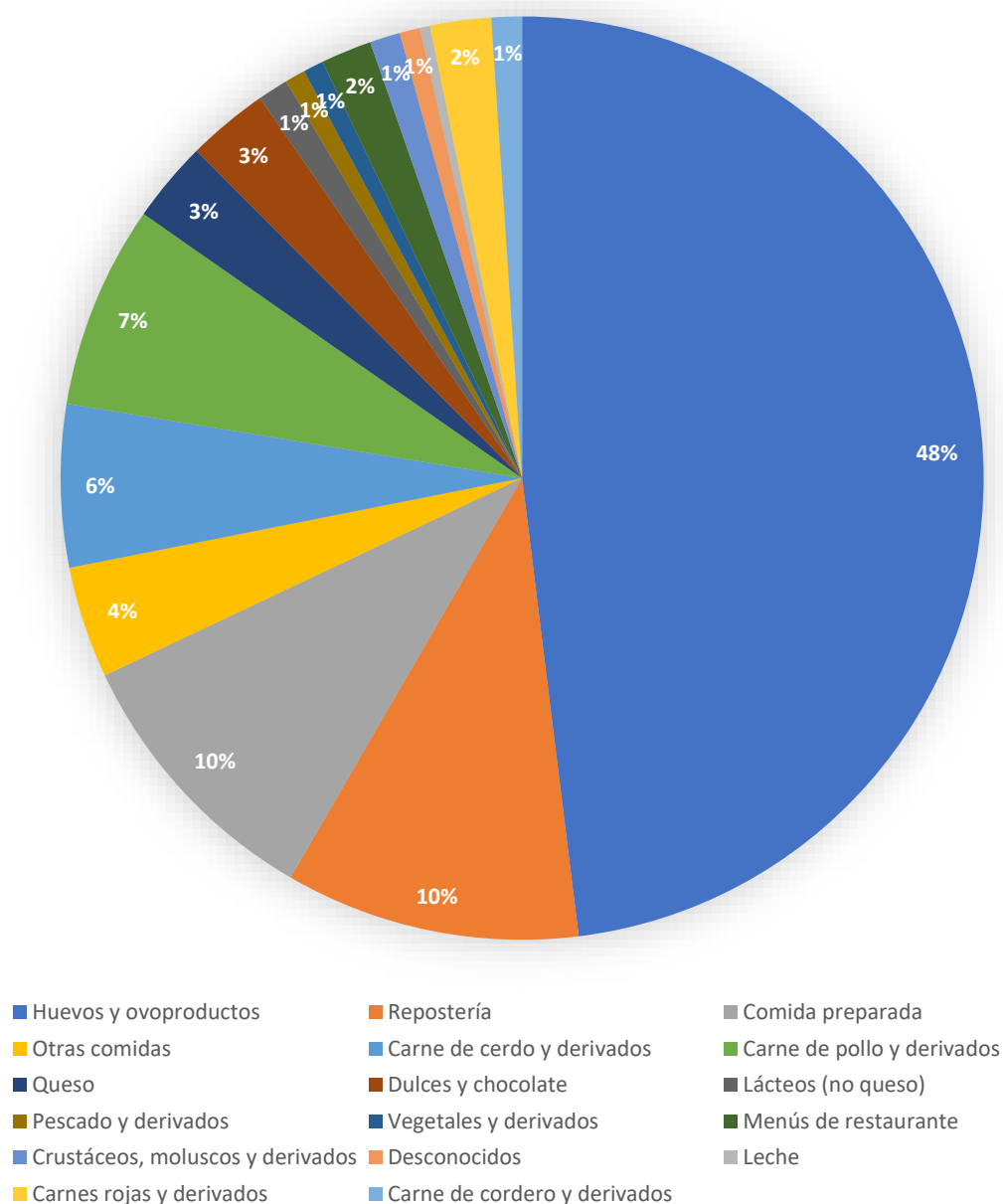


Figura 2. Fuentes de infección de *Salmonella* más frecuentes en la Unión Europea en 2018. Fuente: gráfico modificado a partir de datos de EFSA, 2019.

Los serotipos más aislados en los últimos años han sido Enteritidis (60,9%), Typhimurium (13,8%), Typhimurium monofásica o mST (4,7%), Infantis (2,3%) y Derby (0,8%). La frecuencia de aislamiento de los diferentes serovares depende en gran medida de la fuente de infección, observando grandes diferencias entre el origen de los alimentos (Figura 3) (EFSA, 2019).

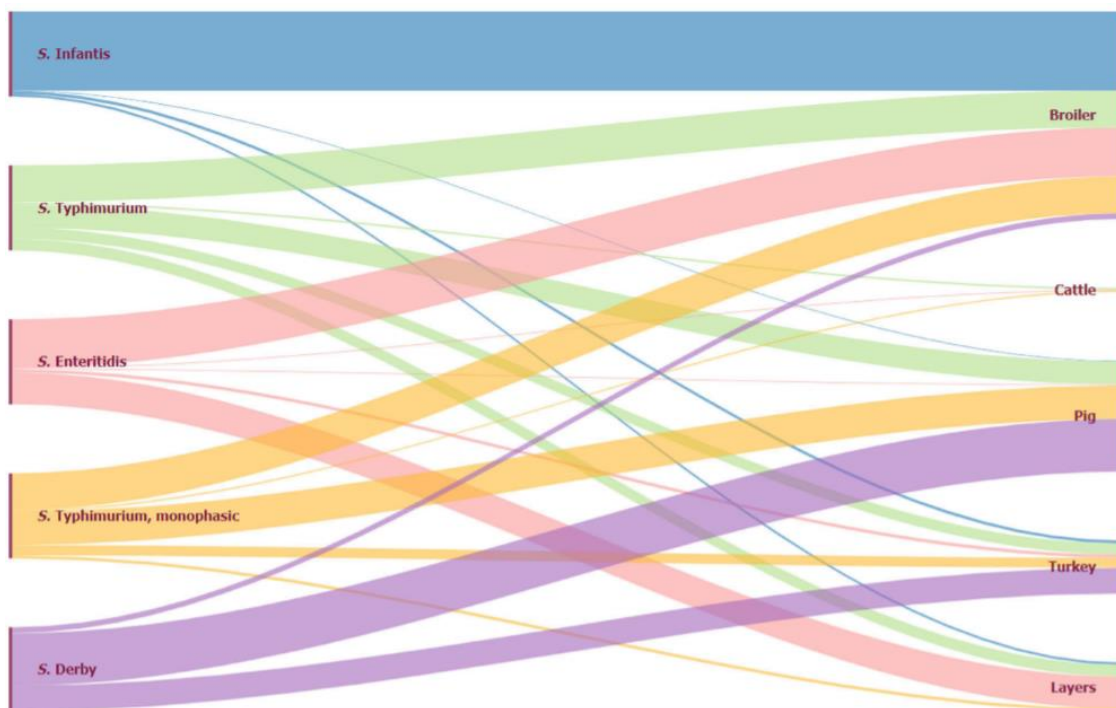


Figura 3. Diagrama Sankey de la distribución de serovares de *Salmonella* más prevalentes en humanos y las fuentes de infección animal o alimentaria. Fuente: EFSA, 2018.

1.1.5.2. Importancia de la salmonelosis en sanidad animal

Siguiendo las recomendaciones de vigilancia de patógenos zoonóticos de la Agencia de Seguridad Alimentaria Europea (*European Food Safety Authority*, EFSA), en 2018 se recogieron muestras de más de 920.000 animales en 27 países miembros de la UE. La mayor prevalencia de *Salmonella* se observó en producción de porcino y de aves. De los 92.089 suidos testados, el 41,26% resultaron positivos a *Salmonella* spp., siendo el serotipo más aislado S. Derby, seguido de S. Typhimurium. En avicultura, en cambio, se observaron importantes diferencias en la prevalencia de *Salmonella*, y de los diferentes serotipos, según el tipo de producción, observando la mayor prevalencia en granjas de engorde de pavo (EFSA, 2019).

Debido a la alta prevalencia del patógeno, se trata de una enfermedad que anualmente tiene un elevado coste socio-económico, aumentando drásticamente cuando tenemos en cuenta los costes derivados de la producción animal. Aunque es una infección que generalmente causa

cuadros clínicos leves a moderados, y con poca relevancia epidemiológica, sí provoca graves consecuencias para la producción, principalmente porcina y aviar. La EFSA estima que los gastos derivados de la implementación de programas de control y vacunación, así como los gastos y pérdidas generados por los brotes de salmonelosis en producción animal pueden llegar a suponer en conjunto hasta 3.000 millones de euros anuales en la Unión Europea (USDA, 2014; EFSA, 2019).

A pesar de que en el año 2016 se observó un incremento en los casos reportados, la tendencia en los últimos diez años ha sido a la baja, observando una disminución muy acusada entre 2008 y 2014, probablemente debida a la implantación de programas de control de la salmonelosis, coordinados entre todos los estados miembros, y dirigidos principalmente a la producción avícola (Figura 4). De esta manera, en avicultura se observó un descenso de la prevalencia de salmonelosis de 0,96% en 2007 a 0,29% en 2015. Sin embargo, al comparar los resultados obtenidos en 2018 con los de 2017, se observa un ligero incremento en la prevalencia en gallinas reproductoras y broiler, así como en cría y engorde de pavo, donde el porcentaje de positivos ha aumentado considerablemente (EFSA, 2019).



Figura 4. Prevalencias de *Salmonella* observadas en los diferentes tipos de producción aviar en la Unión Europea, desde 2007 hasta 2018. Fuente: EFSA, 2019.

Por otro lado, en avicultura se fijaron los objetivos de prevalencias para los cinco serovares de mayor importancia en gallinas reproductoras, y con mayor repercusión en salud pública, a través del Reglamento CE 1003/2005 (BOE, 2005). Según los datos recogidos en el último informe de la EFSA, los serovares de *Salmonella* de mayor importancia en producción aviar son: Enteritidis, Typhimurium (incluyendo mST), Virchow, Infantis y Hadar. En 2018, el serotipo más reportado en gallinas ponedoras fue Enteritidis, mientras que en broiler fue Infantis. En cambio, en producción de pavos el serotipo más aislado fue un serotipo muy similar a Typhimurium, y a mST, que aún no ha sido definido (EFSA, 2019).

1.1.5.3. *Salmonella* spp. como agente zoonótico

Como ya se ha comentado, las bacterias del género *Salmonella* tienen un amplio rango de hospedadores, afectando a numerosas especies animales, así como al ser humano. Además de las especies de abasto ya mencionadas anteriormente (aves, suidos y bóvidos), *Salmonella* puede colonizar de igual manera el intestino de nuestras mascotas, convirtiéndolas en portadoras. Se trata por tanto de una bacteria con un importante carácter zoonótico, generalmente observado en serovariedades no tifoideas (WHO, 2018).

Aunque la transmisión de la bacteria sigue siempre una vía feco-oral, la fuente de infección puede ser muy variable, pudiendo ser una infección directa o indirecta a través de alimentos, agua u objetos contaminados. La salmonelosis, al igual que en el resto de animales, puede ser clínica, cursando con síntomas clásicos gastrointestinales, o subclínica. En la forma subclínica, las bacterias se encuentran de forma latente en el organismo y pueden ser excretadas con las heces de manera intermitente o persistente (Acha y Szyfres, 2003).

A lo largo de los años se han descrito numerosos brotes de salmonelosis, en personas, asociados al contacto con mascotas y otros animales (Corrente *et al.*, 2017; Robertson *et al.*, 2018; Rukambile *et al.*, 2019). Este hecho es de gran importancia principalmente por dos razones. La primera de ellas es el contacto frecuente que tienen las personas con sus mascotas a través de las caricias y juegos, además del hecho de compartir el hogar con ellos, lo que aumenta las probabilidades de transmisión de la bacteria. La segunda razón es el riesgo de adquirir una bacteria resistente a antibióticos, y es que la administración de antibióticos a nuestras mascotas favorece el desarrollo de cepas resistentes, las cuales pueden ser transmitidas a sus dueños (Simpson *et al.*, 2018). Por suerte, los estudios realizados sobre *Salmonella* en perros y gatos muestran una baja prevalencia de la bacteria en estas mascotas, lo que sugiere una baja tasa de transmisión hacia sus dueños y otros animales (Lowden *et al.*, 2015; Reimschuessel *et al.*, 2017).

No obstante, en los últimos años ha aumentado la tenencia de especies exóticas como mascotas. Especies como los conejos, hurones, erizos, cobayas y petauros pueden también ser portadores de *Salmonella* y transmitir la bacteria a sus dueños (Woodward *et al.*, 1997; Pignon y Mayer, 2011; Robertson *et al.*, 2018). Uno de los grupos de mascotas más asociados a brotes de salmonelosis es el de los reptiles. *Salmonella* también forma parte de la microbiota intestinal de estos animales, y puede excretarse de manera continuada o intermitente, dependiendo de varios factores como por ejemplo el estrés de la cautividad o el manejo. Ya en 1963, Hersey y Mason describieron un caso de salmonelosis asociado al contacto con tortugas (Hersey y Mason, 1963). Sin embargo, el aumento en la tenencia de reptiles como mascotas en los últimos años ha provocado un incremento exponencial en los casos de salmonelosis asociada a estas especies, principalmente en niños (Gambino-Shirley *et al.*, 2018). De la misma manera, las aves como mascotas representan también un riesgo en la transmisión de *Salmonella*, tanto a través del contacto, como a través de productos como egagrópilas, heces, y cualquier objeto susceptible de contaminarse (Grimes, 1987; Boseret *et al.*, 2013).

1.1.6. Métodos de detección de *Salmonella* spp.

Ante la sospecha de salmonelosis, las muestras recogidas para la detección del microorganismo pueden ser varias en función del cuadro clínico que presente el individuo. Generalmente, el diagnóstico se realiza a partir de una muestra de heces, aunque también se puede realizar a partir de tejidos, hisopados, sangre, alimentos contaminados, agua contaminada, etc. El aislamiento de *Salmonella* spp. a partir de otros órganos y sangre se considera una confirmación de septicemia (Quinn *et al.*, 2002).

Es importante tener en cuenta que la excreción de *Salmonella* en las heces no es constante, sino que se realiza de manera intermitente, sobre todo en fases subclínicas de la enfermedad. Por tanto, un resultado negativo no significa que el individuo no porte la bacteria. A fin de aumentar las posibilidades de un diagnóstico positivo, se recomienda en la medida de lo posible la recogida seriada de muestras fecales de, al menos, 3 días consecutivos (Ishola, 2009).

Con el avance de las tecnologías, en la actualidad existen múltiples opciones para el diagnóstico de salmonelosis. El método ideal debe tener una alta sensibilidad y especificidad, siendo al mismo tiempo sencillo, repetible, rápido y económico. Desafortunadamente, ningún método cumple con todos los criterios. De manera tradicional, se recurre al aislamiento mediante cultivo bacteriano seguido de la confirmación mediante pruebas bioquímicas, sin embargo, pueden observarse alteraciones en los medios de cultivo, así como en algunas pruebas bioquímicas, ya

sean provocados por la cepa bacteriana, o por el estado de los reactivos. Por esta razón es aconsejable apoyarse también en métodos serológicos (ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) y moleculares (PCR: *Polymerase Chain Reaction*), que ofrecen la capacidad de detectar pequeñas cantidades de *Salmonella*, aunque económicamente son más costosos (Ward *et al.*, 2005).

1.1.6.1. Aislamiento mediante cultivo bacteriano

Existe una gran variedad de medios de cultivo en los que se puede aislar *Salmonella*: medios de enriquecimiento con sustancias inhibitoras para microorganismos competitivos, medios de enriquecimiento y de cultivo generales, y medios de cultivo selectivos. El aislamiento mediante cultivo bacteriano se divide, generalmente, en tres etapas sucesivas: enriquecimiento no selectivo, enriquecimiento selectivo y siembra en placa con medios sólidos selectivos y diferenciales (Merk, 1994).

1. Pre-enriquecimiento no selectivo. El objetivo es la recuperación de las bacterias con daño subletal por las diferentes condiciones de tratamientos industriales y/o de almacenamiento, aumentando la calidad de la muestra. Para ello se emplean diferentes medios: agua de peptona, caldo lactosado, caldo nutritivo, etc. El más utilizado es el agua de peptona tamponada o BPW (*Buffered Peptone Water*) (Stanchi *et al.*, 2007).
2. Enriquecimiento selectivo. Este segundo enriquecimiento tiene como finalidad inhibir el crecimiento de la microbiota acompañante, aumentando así la concentración de *Salmonella*. Existen diferentes opciones:
 - ✓ **Caldo selenito**: se trata de un caldo compuesto por agua de peptona como aporte nutritivo para el desarrollo bacteriano, lactosa como hidrato de carbono fermentable y selenito, cuya acción inhibe el crecimiento de bacterias intestinales a excepción de *Salmonella*, *Proteus* y *Pseudomonas* (Merk, 1994).
 - ✓ **Caldo tetrionato**: inhibe el desarrollo de coliformes y otras bacterias acompañantes, favoreciendo el de bacterias reductoras de tetrionato, como son *Salmonella* y *Proteus*. Además, contiene sales biliares que inhiben gran cantidad de microorganismos presentes en la microbiota intestinal (Palumbo y Alford, 1970).
 - ✓ **Caldo Rappaport-Vassiliadis**: presenta una baja concentración de verde malaquita, cloruro magnésico y harina de soja, lo que favorece la recuperación de *Salmonella*.

Además, la reducción del pH a 5,2 incrementa la selectividad, siendo un caldo con un rendimiento cercano al 100%, especialmente cuando se incubaba a 41-43°C (Van Schothorst *et al.*, 1987). Existe además una modificación semi-sólida en placa (MSRV: Modified Semi-solid Rappaport Vassiliadis) que permite visualizar la expansión mediante desplazamiento de *Salmonella* por la placa tras su incubación.

3. Medios de cultivo selectivos y diferenciales (Figura 5).

- ✓ **Medios de cultivo selectivos.** Presentan en su fórmula sustancias inhibitoras como antibióticos, colorantes, sales biliares, etc., que permiten seleccionar el crecimiento de ciertos microorganismos. Los más empleados permiten la rápida detección de bacterias no fermentadoras de lactosa, y contienen sales biliares como agentes inhibidores.
 - **Agar MacConkey (McK):** las sales biliares y el cristal violeta inhiben la proliferación de bacterias gram-positivas. Presenta además un indicador rojo que permite observar la degradación de la lactosa al ser fermentada. Así, las colonias lactosa-positivas son rosadas con un halo turbio, mientras que las lactosa-negativas, como *Salmonella*, son incoloras (Stanchi *et al.*, 2007).
 - **Agar desoxicolato:** el desoxicolato sódico inhibe el crecimiento de coliformes y gram-positivos. Las colonias de *Salmonella* son pequeñas, incoloras, elevadas y opacas, presentando en algunos casos un precipitado negro en el centro (Stanchi *et al.*, 2007).
 - **Agar eosina azul de metileno (EMB: eosin methylene blue):** permite el crecimiento de enterobacterias patógenas. En su fórmula presenta lactosa y sacarosa, lo que permite diferenciar las bacterias en base a su capacidad para fermentarlos, y por el aspecto y color de sus colonias. Los colorantes empleados inhiben a su vez el crecimiento de gram-positivos. Las colonias de *Salmonella* se observan incoloras o de color ámbar (Bonnie, 2001).

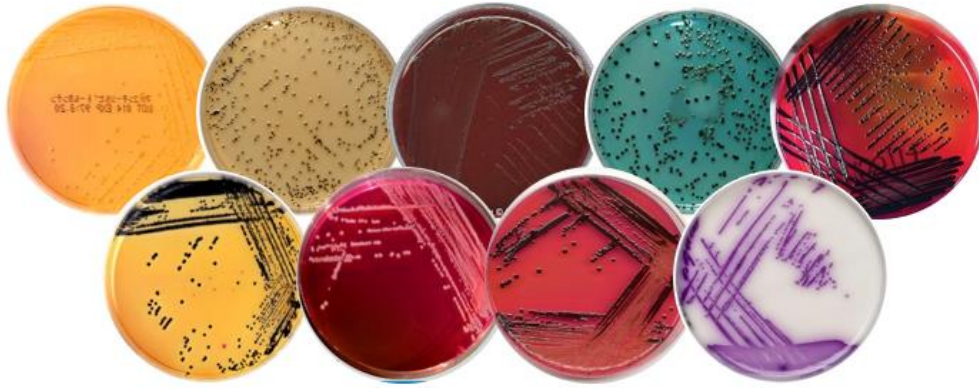


Figura 5. Colonias compatibles con *Salmonella* en diferentes medios selectivos y diferenciales. De izquierda a derecha y de arriba a abajo: MacConkey, Desoxicolato, EMB, Hektoen, XLD, SS, Verde Brillante, XLT4® y ASAP®. Fuente: collage de elaboración propia montado con varias imágenes extraídas de diferentes proveedores.

- ✓ **Medios de cultivo diferenciales:** permiten clasificar bioquímicamente las bacterias por su actividad metabólica. El crecimiento de la bacteria en el medio produce una variación del pH del medio o alguna actividad enzimática, modificando el aspecto del medio y/o de la colonia (Figura 5). Los más empleados son:
 - **Agar Hektoen entérico:** tiene sales biliares que producen un efecto supresor de la microbiota acompañante, aunque ejercen poca inhibición en *Salmonella* y *Shigella*. Presenta dos indicadores, el azul de bromotimol y la fucsina ácida, de manera que las colonias se distinguen macroscópicamente en base a la capacidad de fermentar lactosa. Las colonias de *Salmonella* producen ácido sulfhídrico que da un color negro con un halo transparente alrededor dando la imagen de “ojo de pescado” (Murray y Shea, 2004).
 - **Agar xilosa-lisina-deoxicolato (XLD):** el desoxicolato inhibe las bacterias coliformes, permitiendo el crecimiento de *Proteus*, que puede llegar a confundirse con las colonias de *Salmonella*. Al contrario que *Shigella*, *Salmonella* fermenta la xilosa y descarboxila la lisina, generando ácido sulfhídrico (Hurtado, 2001). Este proceso provoca un cambio de color del medio que pasa a ser amarillo. Además, las colonias de *Salmonella* presentan una precipitación de sulfuro de hierro que le da un color negro (Murray y Shea, 2004).
 - **Agar *Salmonella-Shigella*® (SS):** contiene sales biliares y verde brillante que inhiben el desarrollo de bacterias gram-positivas, coliformes y *Proteus*. Además,

presenta tiosulfato de sodio, de manera que *Salmonella* produce ácido sulfhídrico formando colonias translúcidas con el centro negro (Murray and Shea, 2004).

- **Verde brillante:** se trata de un medio altamente selectivo para enterobacterias patógenas, a excepción de *S. Typhi* y *S. Paratyphi*. Presenta rojo de fenol como indicador de pH, de manera que al haber producción de ácido a partir de la fermentación de azúcares el medio vira a amarillo. Las colonias de *Salmonella* se observan de color rosa, blanco o transparente sobre un fondo rojo (Murray y Shea, 2004).
- **Agar xilosa-lisina-tergitol (XLT4):** se trata de un medio altamente selectivo que permite la diferenciación de *Salmonella* en base a la fermentación de la xilosa, lactosa y sucrosa, además de la descarboxilación de lisina y producción de sulfuro de hidrógeno. Las colonias de *Salmonella* productoras de H₂S son amarillas con el centro negro, sin embargo, a medida que pasa el tiempo, las colonias se recubren por completo de pigmento negro y pueden tomar una tonalidad rosada hacia la periferia. Las colonias de *Salmonella* que no producen H₂S son de color rosado amarillento (Pachón, 2009).
- **Agar ASAP® o BD CHROMagar *Salmonella*®:** se trata de un medio cromogénico altamente selectivo que permite la diferenciación de las colonias de *Salmonella* en base a la actividad de la enzima C8-esterasa en el metabolismo de los azúcares. Las colonias de *Salmonella* se observan de color rosa-púrpura, mientras que las colonias de otros géneros son de color verde-azulado o incluso transparentes (Gaillot *et al.*, 1999).

A fin de estandarizar los estudios realizados en *Salmonella*, en 2003 la Organización Internacional de Normalización (ISO: *International Organization for Standardization*) publicó una norma ISO en la que se recomiendan los pasos a seguir para el aislamiento de la bacteria en el laboratorio. Posteriormente, se han ido haciendo revisiones del documento, así como pequeñas modificaciones. Actualmente la norma vigente para la detección de *Salmonella* es la ISO 6579-1:2017 en la que se detallan los pasos a seguir, que de manera resumida son los siguientes:

1. Pre-enriquecimiento de la muestra en agua de peptona tamponada durante 18±2 horas a una temperatura entre 34 y 38°C.

2. Enriquecimiento en agar MSRV, en el que se inoculan 100 µL en tres gotas equidistantes. Las placas son incubadas durante 24-48 horas a 41,5±1°C.
3. Aislamiento en dos medios selectivos de cultivo en placa: las colonias sospechosas de ser *Salmonella* serán sembradas en aislamiento en dos medios selectivos en simultáneo. Uno de los medios será el agar XLD, mientras que el segundo medio puede variar (ASAP, CHROMagar, XLT4...).
4. Siembra en masa de una única colonia compatible con *Salmonella* en un medio de cultivo nutritivo general.
5. Confirmación de *Salmonella* mediante pruebas bioquímicas.
6. Serotipificación de las cepas de *Salmonella* obtenidas.

1.1.6.2. Perfil bioquímico

Para obtener una confirmación final del diagnóstico de *Salmonella*, las colonias sospechosas observadas en los cultivos diferenciales deben someterse a diferentes pruebas bioquímicas, seleccionadas en base a su capacidad discriminativa. Generalmente, dichas pruebas se realizan en una serie de medios específicos que permiten una clara visualización de los resultados (Pachón, 2009).

Existe una gran variedad de pruebas bioquímicas disponibles: producción de indol, rojo de metilo, triple azúcar hierro o TSI (*Triple Sugar Iron*), el citrato de Simons (CS), sulfito indol motilidad (SIM), hidrólisis de urea, desaminación de fenilalanina, descarboxilación de lisina, arginina y ornitina, hidrólisis de gelatina, utilización de malonato, Voges-Proskauer (VP), fermentación de glucosa con producción de ácido y gas, fermentación de lactosa, sacarosa, manitos, dulcitol, salicina, adonitol, inositol, sorbitol, arabinosa, rafinosa, maltosa, xilosa, trehalosa, celobiosa, eritritol, hidrólisis de esculina, fermentación de melibiosa, de arabitol, de glicerol, utilización de acetato, lipasa, ADNasa, transformación nitrato-nitrito, oxidasa y fermentación de manosa (Pachón, 2009).

A continuación, se explican las pruebas más empleadas en la confirmación de *Salmonella*:

- ✓ **Triple azúcar hierro (TSI):** esta prueba se basa en la fermentación de azúcares y producción de ácido sulfhídrico y gas. Se trata de un agar que contiene altas concentraciones de sacarosa y lactosa y una baja concentración de glucosa, además de rojo de fenol como indicador de pH. La confirmación de *Salmonella* se produce cuando

la reacción es alcalina/ácido con producción de H_2S , el cual precipita en el fondo del tubo con las sales de hierro dando un color negro (K/A H_2S^{++}) (Instituto Nacional de Salud, 2003).

- ✓ **Citrato de Simons (CS):** el medio utilizado para esta prueba contiene fosfato sódico de amonio, fosfato monopotasio, sulfato magnésico, citrato de sodio y azul de bromotimol como indicador de pH. La prueba se basa en la capacidad de los microorganismos para usar el citrato de sodio como fuente de carbono. De ser así, al extraer el nitrógeno del fosfato de amonio que contiene el medio, éste se alcaliniza virando de verde a azul, como ocurre en el caso de *Salmonella* (Farmer, 2003).
- ✓ **Producción de indol:** el indol es uno de los componentes de la degradación metabólica del aminoácido triptófano. Las bacterias capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano producen indol, ácido pirúvico y amoníaco, dando lugar a la formación de un complejo rojo. *Salmonella* no tiene la capacidad de formar indol, por lo que no se produce ninguna reacción en el medio (MacFaddin, 2003).
- ✓ **Sulfito indol motilidad (SIM):** esta prueba se realiza en un medio semisólido en el que se evalúan en simultáneo la capacidad de producción de indol, de H_2S y la motilidad de los microorganismos. Las bacterias móviles provocan una turbidez homogénea del medio. La mayoría de las serovariedades de *Salmonella* son mótils a excepción de *S. Gallinarum* (MacFaddin, 2003).
- ✓ **Hidrólisis de urea:** mediante la enzima ureasa, los microorganismos transforman la urea liberando moléculas de amoníaco al medio, el cual se alcaliniza cambiando el color gracias al indicador de pH. *Salmonella* no tiene capacidad de hidrolizar la urea, por lo que no se observa reacción ninguna. Esta prueba es vital en la diferenciación de *Salmonella* y *Proteus* (MacFaddin, 2003).

Existen técnicas automatizadas y kits comerciales de identificación de microorganismos que se basan en la realización de determinadas pruebas bioquímicas en simultáneo, como por ejemplo las tiras API 20E (*Analytical Profile Index*), las cuales en 24 horas dan el resultado. Otros sistemas más avanzados pueden dar el resultado en apenas 18 horas o menos, como el Vitek (BioMerieux®).

El perfil bioquímico de *Salmonella* es estable para la mayoría de las serovariedades, observando los siguientes resultados en las pruebas bioquímicas (Tabla1) (Terragno *et al.*, 2003).

Tabla 1. Perfil bioquímico general del género *Salmonella* (Terragno *et al.*, 2003).

Prueba	Resultado	Prueba	Resultado	Prueba	Resultado
Oxidasa	-	Ureasa	-	SIM	+
Catalasa	+	VP	-	LOD	+
Sacarosa	-	Rojo de metilo	+	Producción H ₂ S	+
Indol	-	CS	+	TSI	K/A H ₂ S ⁺⁺

VP: Voges-Proskauer; CS: Citrato de Simmons; SIM: sulfito indol motilidad; LOD: lisina-ornitina-decarboxilasa; TSI: triple azúcar hierro (triple sugar iron); +: 90% o más de resultados positivos, -: 90% o más de resultados negativos

Sin embargo, existen ciertas diferencias bioquímicas entre diferentes subespecies que se muestran en la Tabla 2 (Le Minor *et al.*, 1982:1986).

Tabla 2. Propiedades bioquímicas diferenciales de las subespecies de *Salmonella* spp. (Le Minor *et al.*, 1982:1986).

PRUEBAS BIOQUÍMICAS	<i>Salmonella enterica</i>						<i>Salmonella bongori</i> (V)
	subsp. enterica (I)	subsp. salamae (II)	subsp. arizonae (IIIa)	subsp. diarizonae (IIIb)	subsp. houtenae (IV)	subsp. indica (VI)	
Dulcitol	+	+	-	-	-	D	+
ONPG	-	-	+	+	-	D	+
Malonato	-	+	+	+	-	-	-
Gelatinasa	-	+	+	+	+	+	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	-	+
KCN	-	-	-	-	+	-	+
L(+)-tartrato	+	-	-	-	-	-	-
Mucato	+	+	+	-(70%)	-	+	+
Salicina	-	-	-	-	+	-	-
Lactosa	-	-	-(75%)	+(75%)	-	D	-

+: 90% o más de resultados positivos, -: 90% o más de resultados negativos, D: diferentes reacciones

1.1.6.3. Serotipificación

El género *Salmonella* contiene más de 2500 serotipos diferentes, entre los cuales encontramos serotipos específicos de hospedador y serotipos no específicos, serotipos zoonóticos y serotipos comensales, oportunistas y patógenos. Es por esta razón, por la que es de vital importancia la serotipificación de las cepas obtenidas de *Salmonella*. A través de ella se obtiene información crucial para la realización de estudios epidemiológicos sobre los brotes de salmonelosis, sobre todo de cara a establecer las vías de transmisión y posibles fuentes de infección (Terragno *et al.*, 2003).

Los serotipos de *Salmonella* se clasifican en base a las diferencias en sus antígenos somáticos (O), flagelares (H) y de virulencia (Vi). Estos antígenos generalmente se identifican mediante el uso de anticuerpos monovalentes y polivalentes, disponibles comercialmente, en pruebas de aglutinación en lámina. Primero se identifican los antígenos O, usando antisueros contra los grupos del O1 al O67, para después probar el antisuero Vi y por último usar los antisueros contra los antígenos H (Jawetz *et al.*, 2014).

La identificación de los serotipos sobre la combinación antigénica está dada en el “Esquema Le Minor-Kauffmann-White”, el cual está publicado por el Centro Colaborador de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de Referencia e Investigación de *Salmonella* del Instituto Pasteur en París (Grimont y Weill, 2007).

1.1.6.4. Fagotipificación

Esta técnica se basa en la capacidad de los virus (fagos) para infectar a las bacterias y destruirlas, produciendo zonas de lisis visibles a simple vista sobre placas de agar en las que ha habido un crecimiento previo de dicha bacteria. Se trata de un virus con una alta especificidad, de manera que cada fago es capaz de infectar únicamente a una determinada cepa de una determinada bacteria o a cepas muy similares incluidas en un mismo grupo o fagogrupo (Pedraza *et al.*, 2014).

En el caso de *Salmonella*, esta técnica se ha utilizado para tipificar las cepas, siendo el fagotipo o lisotipo de gran valor en el estudio epidemiológico de este género bacteriano, pues se ha descrito un alto grado de correlación entre el fagotipo y el origen epidémico (Rabsch *et al.*, 2002). Por ello, se utiliza en los laboratorios de referencia como marcador epidemiológico secundario. Además, determinados fagotipos se han asociado a determinadas características, como por ejemplo, la multirresistencia a antimicrobianos o la capacidad invasiva de la cepa.

Hasta el momento, se han descrito esquemas de fagotipificación para algunas serovariedades de *Salmonella*: Typhi, Paratyphi A y B, Typhimurium y Enteritidis. Además, se han desarrollado esquemas para otros serotipos de importancia clínica y epidemiológica como Newport o Virchow, entre otros (Petrow *et al.*, 1974; Chambers *et al.*, 1987).

Pese a facilitar una información de gran interés epidemiológico, se trata de una técnica muy laboriosa que requiere una amplia fagoteca cuyo acceso se encuentra muy limitado. Además, multitud de mecanismos pueden producir cambios en el fagotipo y no todas las cepas pueden ser caracterizadas.

1.1.6.5. Métodos de tipificación genotípica

La serotipificación y fagotipificación son métodos fenotípicos que proporcionan una información epidemiológica de gran relevancia, sin embargo, en ocasiones se necesitan métodos que permitan diferencias cepas fenotípicamente idénticas o muy similares. En estos casos, se usan métodos de tipificación genotípica, los cuales tienen un poder de discriminación mayor y son relativamente reproducibles. Dentro de los métodos descritos, los más utilizados son: perfil plasmídico, patrones de restricción cromosómica mediante electroforesis de campo constante (RFLP: *Restiction Fragment Length Polymorphism*) o en campo pulsado (PFGE: *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*), revelado de fragmentos específicos mediante hibridación con sondas genéricas (por ejemplo: ribotipado) y métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como son la amplificación aleatoria de ácido desoxirribonucleico (ADN) polimórfico (RAPD: *Random Amplification of Polymorphic DNA*) o la detección de polimorfismos en secuencias repetidas en tándem (MLVA: *Multiple Loci VNTR analysis*). Un estudio realizado en 2009 por la EFSA muestra que la PFGE es la técnica más utilizada para la tipificación molecular de *Salmonella* en los laboratorios de referencia (EFSA, 2009).

1.1.7. Programas de control y prevención de salmonelosis

Existen numerosos programas de control nacionales e internacionales de *Salmonella* con vistas a proteger al consumidor. En la Unión Europea está vigente la Directiva de Zoonosis 2003/99/EC sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos, así como el Reglamento CE 2160/2003 sobre el control de *Salmonella* y otros agentes zoonóticos específicos transmitidos por los alimentos (European Community, 2003; BOE, 2003). Ambos establecen la adopción de medidas eficaces para la detección y control de la presencia de *Salmonella* en todas las etapas

de la producción de alimentos, a fin de disminuir su prevalencia y, por tanto, el riesgo que supone para la salud pública.

En consecuencia, en 2007 arrancó en España el primer Programa Nacional de Control de la *Salmonella* en gallinas reproductoras tanto en explotaciones avícolas de puesta como de carne regido por el Reglamento CE 1168/2006. En la actualidad, la vigilancia de *Salmonella* se establece a través de varios sistemas: el sistema de brotes, el sistema de información microbiológica y el laboratorio nacional de referencia de *Salmonella* y *Shigella*. Los dos primeros son sistemas básicos de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, gestionada por el Centro Nacional de Epidemiología (BOE, 2006).

En casos leves o moderados de salmonelosis, el tratamiento antimicrobiano está desaconsejado para evitar el desarrollo de resistencias a antimicrobianos y multiplicación de las cepas resistentes. En casos graves, el tratamiento de elección es sintomático, centrado en la reposición de fluidos y electrolitos para paliar el estado de deshidratación. En caso de riesgo de septicemia o en grupos de riesgo (lactantes, ancianos y pacientes inmunodeprimidos) es necesaria la antibioterapia, la cual debe basarse en un antibiograma previo. Los antibióticos de elección son las penicilinas y las fluoroquinolonas, mientras que en casos de cepas resistentes se han utilizado tetraciclinas y sulfamidas con éxito (EFSA, 2019).

La prevención en la transmisión e infección por esta bacteria se basa en múltiples medidas de control a lo largo de toda la cadena alimentaria, desde la producción agrícola hasta la manipulación y elaboración final de alimentos en establecimientos comerciales y hogares. Las principales medidas de control son (WHO, 2018):

- La educación en higiene alimentaria para manipuladores de alimentos, haciendo especial hincapié en el correcto lavado de manos antes, durante y después de la manipulación, así como en la refrigeración adecuada de los alimentos.
- La exclusión de personas enfermas en la manipulación de alimentos y del cuidado de pacientes hospitalizados.
- El establecimiento de programas de control de *Salmonella*: control de alimentos, limpieza y desinfección de útiles y superficies, control de vectores y otras medidas sanitarias e higiénicas.

Por otro lado, para evitar la transmisión de *Salmonella* a partir de mascotas infectadas o portadoras, se recomienda respetar las medidas básicas de higiene y supervisar el contacto entre niños y mascotas (Simón-Viván *et al.*, 2012).

1.2. Resistencias a antimicrobianos

1.2.1. Definición y desarrollo de resistencias

La resistencia a antimicrobianos (AMR: *antimicrobial resistance*) se define como la capacidad de una determinada cepa bacteriana para sobrevivir o incluso multiplicarse en presencia de una concentración dada de un antimicrobiano. Se trata por tanto de un proceso evolutivo en las bacterias a fin de sobrevivir ante un medio ambiente hostil (Oteo-Iglesias, 2016).

Los mecanismos de resistencia frente a antimicrobianos de las bacterias son fundamentalmente tres (Oteo-Iglesias, 2016):

- ✓ Inactivación del antimicrobiano mediante la producción de enzimas, como por ejemplo las betalactamasas.
- ✓ Modificaciones bacterianas que impiden la acción del antimicrobiano sobre la estructura diana, como por ejemplo mutaciones en la pared celular que impiden el acceso del antimicrobiano a la bacteria o en el sistema de transporte. Incluso pueden producirse modificaciones que provoquen la expulsión activa de la molécula.
- ✓ Alteración por parte de la bacteria de su estructura diana, impidiendo la acción de la molécula antimicrobiana.

Una misma bacteria puede desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o varios antimicrobianos, del mismo modo que un antimicrobiano puede ser inactivado por diferentes mecanismos de diferentes especies bacterianas (Daza, 1998).

Por otro lado, existen dos tipos de resistencias: la natural o intrínseca y la adquirida. La **resistencia intrínseca** es una propiedad específica de esa especie bacteriana que le ofrece ventajas competitivas respecto a las demás especies bacterianas. Generalmente se debe a la ausencia de la estructura diana sobre la que actúan los antimicrobianos, como por ejemplo la falta de pared en el *Mycoplasma* en relación a los betalactámicos. Se trata de una propiedad anterior a la exposición al antimicrobiano. Así lo demuestran algunas bacterias encontradas en fósiles glaciares de las regiones árticas de Canadá de más de 2000 años de edad (Hart, 1998). Hay que tener en cuenta, además, que existen microorganismos productores de moléculas antimicrobianas, por ejemplo, *Bacillus polymyxa* que produce la polimixina B. Dichas especies son por definición resistentes a las moléculas antimicrobianas que producen.

La **resistencia adquirida**, en cambio, surge a partir de mutaciones en el material genético de las bacterias a nivel individual, lo que constituye un serio problema para la medicina occidental. Este tipo de resistencia puede adquirirse a través de diferentes vías (Oteo-Iglesias, 2016):

- ✓ **Mutación cromosómica:** generalmente se origina a partir del contacto de la bacteria con el antimicrobiano en cuestión.
- ✓ **Transmisión vertical:** el material genético que codifica la resistencia es transmitido de generación en generación mediante la división celular mitótica.
- ✓ **Transmisión horizontal:** el material genético que codifica la resistencia se transfiere a otras bacterias cercanas, que pueden ser de la misma especie o no, a través de plásmidos, transposones o integrones.
 - **Plásmidos:** son moléculas genéticas extracromosomales de pequeño tamaño, que tienen replicación independiente del cromosoma, por lo que también se les llama replicones. Existen diferentes tipos de plásmidos, como los integrativos, que pueden integrarse en el cromosoma bacteriano, o los conjugativos, que codifican *pili* cuya función es la transferencia de los plásmidos de unas bacterias a otras.
 - **Transposones:** son grupos de genes capaces de moverse de manera autosuficiente dentro del genoma de una célula. Existen transposones simples o de inserción, que únicamente contienen los genes necesarios para la propia transposición, y compuestos, que además de dichos genes contienen genes específicos como los de resistencia a antimicrobianos. Estos transposones además pueden provocar mutaciones al moverse de un lugar a otro en el cromosoma o entre dos cromosomas diferentes, por lo que también reciben el nombre de “genes saltarines” (Sánchez *et al.*, 2012).
 - **Integrones:** son una familia de elementos genéticos potencialmente móviles, capaces de integrar y expresar genes de resistencia a los antibióticos. No son capaces de realizar autotransposición, pero suelen asociarse a secuencias de inserción, transposones o plásmidos conjugativos que sirven de vehículos (González *et al.*, 2004).

Mediante recombinación genética, un fragmento de ADN exógeno puede integrarse en el genoma de una célula receptora. Así es como las bacterias pueden incorporar en su genoma genes de resistencia a antimicrobianos sin siquiera haber estado en contacto

con éstos. Existen tres mecanismos a través de los cuales puede producirse (Tran y Jacoby, 2002; Tortora *et al.*, 2007):

- a. **Transformación genética:** el ADN libre se incorpora a la célula receptora y si ésta es “competente” se producirá un cambio genético. Sin embargo, muy pocas cepas bacterianas son competentes por lo que es el mecanismo menos común de transferencia de resistencias (Figura 6).

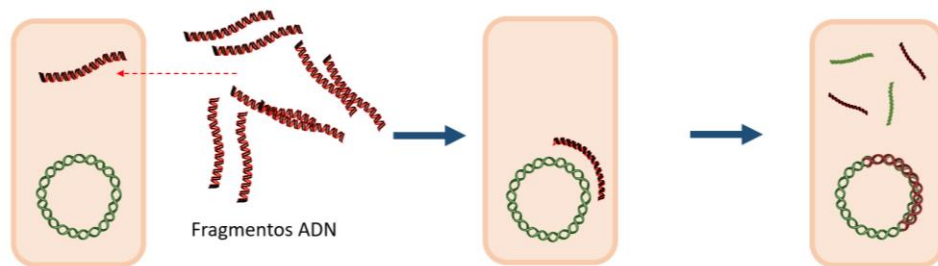


Figura 6. Transformación genética. Fuente: adaptado de Tortora *et al.* (2007).

- b. **Transducción:** el ADN es transferido de una célula a otra utilizando un virus bacteriófago como vehículo. El bacteriófago tiene la capacidad de incorporar su ácido nucleico al de la bacteria, replicándose conjuntamente bajo el nombre de profago. Cuando el fago provoca la lisis de la bacteria, las partículas de ADN bacteriano incorporado al genoma viral pueden pasar a la siguiente bacteria que sea infectada por ese fago (Figura 7).

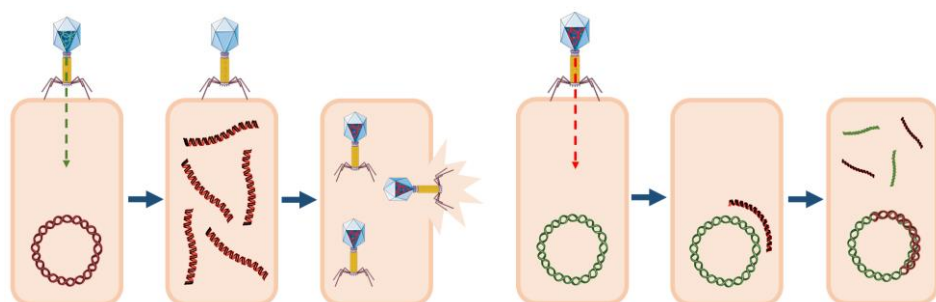


Figura 7. Transducción. Fuente: adaptado de Tortora *et al.* (2007).

- c. **Conjugación:** es una transferencia de material genético de célula a célula por contacto directo, mediante puentes de unión. El material transferido puede ser un plásmido, un transposón o un integrón. Se trata del mecanismo más efectivo en la transmisión de resistencias (Figura 8).

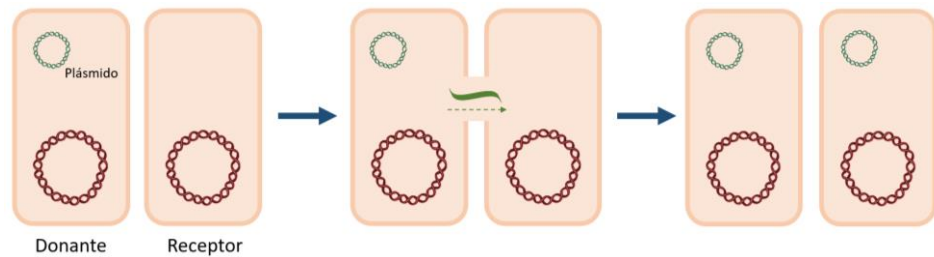


Figura 8. Conjugación bacteriana. Fuente: adaptado de Tortora *et al.* (2007).

1.2.2. Problemática y salud pública

La resistencia a antimicrobianos es un proceso inevitable de la evolución bacteriana causado por el consumo de antibióticos. Desde el descubrimiento de la penicilina en 1928 por el doctor Alexander Fleming, el uso de los antibióticos se ha extendido por todo el mundo siendo uno de los pilares fundamentales de la medicina occidental (Bennet y Chung, 2001). A lo largo del siglo XIX se han aislado diferentes moléculas antimicrobianas con multitud de mecanismos de acción, que se han ido clasificado en diferentes familias en base a su origen, el cual podía ser natural (a partir de un hongo o una bacteria) o sintético. Así, los antimicrobianos se han utilizado en el tratamiento tanto de personas como de animales desde su descubrimiento. Aunque hoy en día ya está totalmente prohibido en Europa la administración de antibióticos de forma profiláctica, durante muchos años los antibióticos se utilizaron en dosis subterapéutica en explotaciones de producción animal como promotores del crecimiento. La administración de estos antibióticos de forma profiláctica, dificultaba la infección de los animales por microorganismos patógenos y elevaba los parámetros productivos de los mismos. Sin embargo, esta práctica se prohibió en el año 2006, ya que de la misma manera que se aumentaban los parámetros productivos de los animales, también se provocaba un aumento paulatino de las resistencias a los antimicrobianos utilizados (Ovejero, 2017) (Figura 9).

El desarrollo de nuevas moléculas antimicrobianas se ha ralentizado drásticamente en los últimos años, mientras que las resistencias han aumentado exponencialmente en cuanto a (Muñoz, 2017):

- ✓ La velocidad a la que diseminan las resistencias por multiplicación bacteriana y por mecanismos de transferencia a otras bacterias. Por ejemplo, el porcentaje de cepas de *E. coli* resistente a cefalosporinas de tercera generación pasó de estar en 10-25% en 2011 a estar en 25-50% en tan sólo cinco años.

- ✓ El número de antibióticos a los que es resistente una cepa bacteriana, o lo que es lo mismo el desarrollo de multirresistencias. Cuando una bacteria es resistente a un antibiótico tiene mayor probabilidad de adquirir otras resistencias, convirtiéndose en multirresistente. En 2016, el porcentaje de cepas multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae* se encontraba en 25-50%.
- ✓ La velocidad de desarrollo de nuevos mecanismos de resistencia a antimicrobianos, como por ejemplo el gen NDM-1 que codifica resistencia a beta-lactámicos, incluyendo el carbapenem.
- ✓ Aparición de resistencias a antibióticos de última generación y de último recurso. Por ejemplo, el porcentaje de cepas de *Acinetobacter* spp. resistente a carbapenemes en 2016 era superior al 50%.

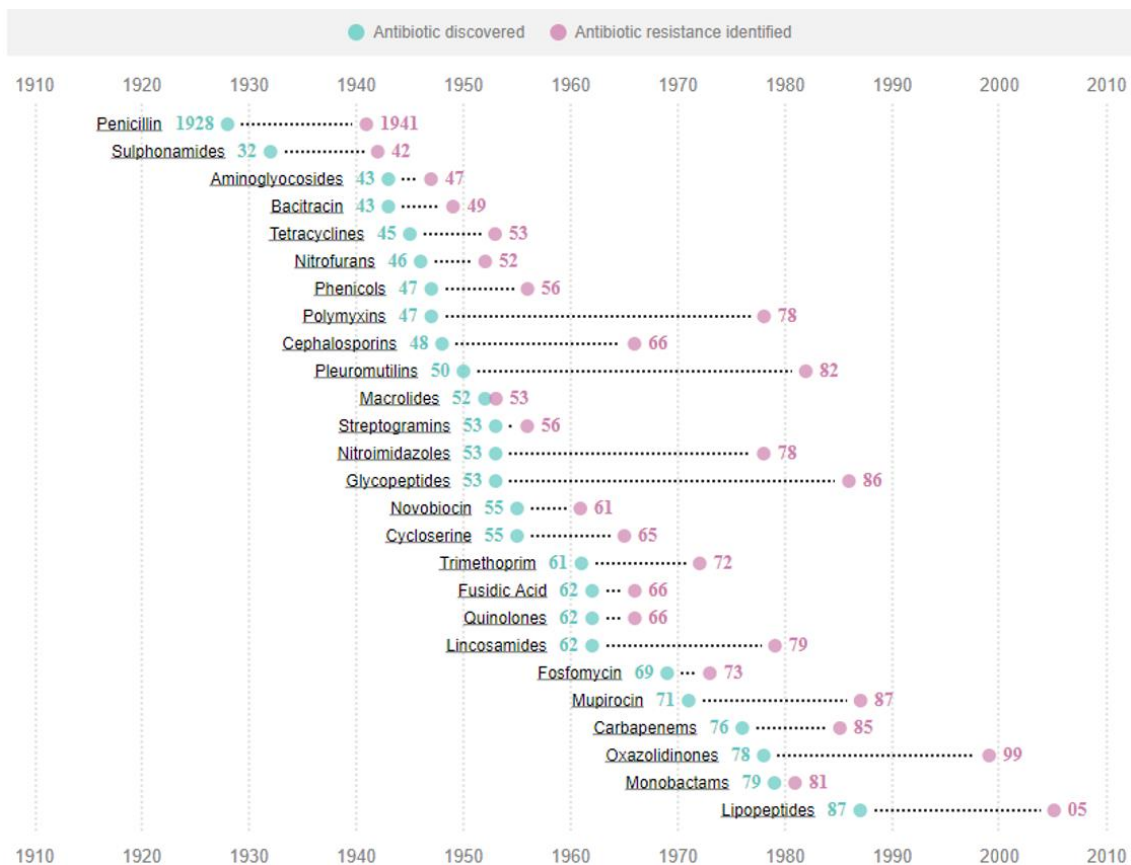


Figura 9. Cronograma que muestra el tiempo transcurrido entre el descubrimiento de diversos antimicrobianos y la detección de resistencias frente a ellos. Fuente: Plan Nacional de Resistencia frente a Antimicrobianos (PRAN).

A día de hoy, se trata de un fenómeno creciente con graves implicaciones socio-económicas, lo que lo convierte en un problema de salud pública prioritario en todo el mundo. Se calcula que las resistencias a antimicrobianos son causa directa o indirecta de cerca de 700.000 muertes al año en todo el mundo, de las cuales cerca de 37.000 se producen en Europa según las últimas publicaciones del Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC: *European Centre of Disease Prevention and Control*). En cuanto al coste económico que implica, teniendo en cuenta tanto los gastos directos (aislamiento de patógenos, detección de resistencias, fallos terapéuticos, etc.) como los indirectos (pérdidas en producción animal, investigación y desarrollo, etc.) superan anualmente los 7.000 millones de dólares gasto anual (Armbruster y Roberts, 2018). En 2014 Jim O’Neill, economista británico, realizó una estimación sobre la magnitud del problema de las resistencias y sus repercusiones socio-económicas en el futuro. Sus resultados muestran que en el año 2050 cerca de 10 millones de muertes anuales serán a causa de las resistencias, superando con creces las muertes producidas por el cáncer (O’Neill, 2014) (Figura 10).

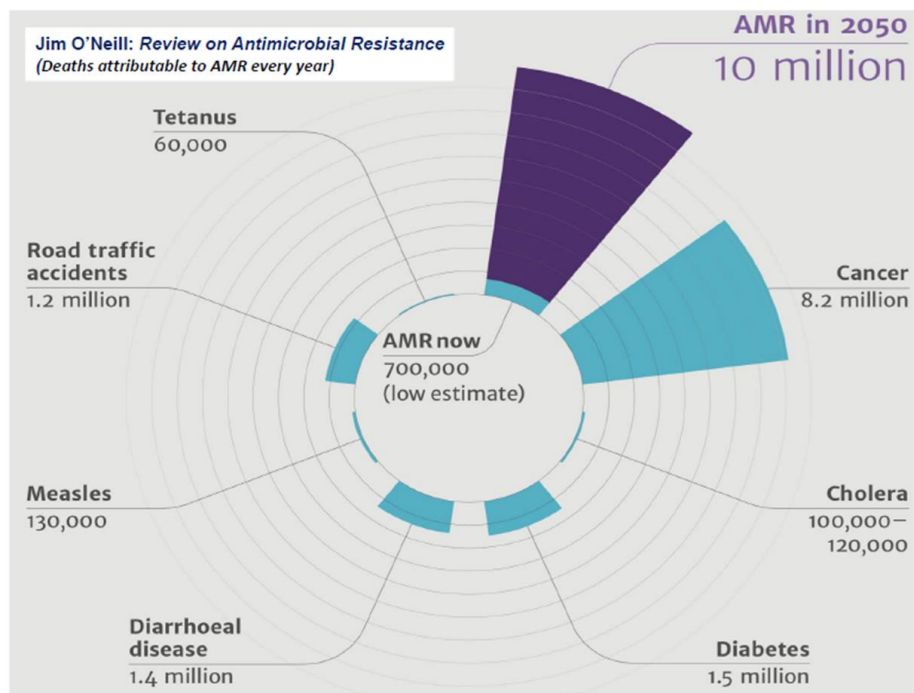


Figura 10. Principales causas de muerte y estimaciones de número de bajas que causarán en 2050. Fuente: O’Neil, 2014.

Por otro lado, el problema de la resistencia, y en particular la multirresistencia entre los bacilos gram-negativos, es especialmente preocupante, ya que se ha descrito la detección de resistencias a la práctica totalidad de los antibióticos, limitando de esta manera las opciones terapéuticas de las infecciones que producen. Ante esta situación, ha sido necesaria la recuperación de antiguos antibióticos que aún mantienen cierta actividad frente a estos microorganismos como es la colistina (Ruiz-Garbajosa y Cantón, 2016). La colistina es una polimixina aislada a partir del organismo *Paenibacillus polymyxa*, la cual ha sido ampliamente utilizada en veterinaria como profilaxis/metafilaxis y promotor de crecimiento, mientras que su uso en humanos ha estado muy restringido debido a la neuro- y nefrotoxicidad que produce (Rebelo *et al.*, 2018). Por ello se considera un antibiótico de último recurso frente a enterobacterias multirresistentes, y en la actualidad su uso en veterinaria está restringido a fin de evitar el desarrollo de resistencias frente a colistina. Sin embargo, diversos estudios muestran la existencia de cepas resistentes a colistina a través del gen *mcr-1*, el cual además es transferible aumentando drásticamente el riesgo para la diseminación de dicha resistencia y limitando aún más las opciones terapéuticas (Ruiz-Garbajosa y Cantón, 2016).

1.2.3. *Salmonella* resistente a antimicrobianos

A mitad de los años 60 empezaron a detectarse con cierta frecuencia cepas de *S. Typhimurium* resistentes a antimicrobianos, y particularmente multirresistentes a cuatro o más antimicrobianos. Desde la década de los 90 se ha descrito en numerosos países una alta tasa de cepas de *Salmonella* multirresistentes a diferentes antimicrobianos (Jurado-Tarifa, 2016). Por esta razón se ha establecido una categoría de antimicrobianos conocida como “Antimicrobianos Críticamente Importantes” (CIA: *Critically Important Antimicrobials*), constituida por ciprofloxacina y cefotaxime, aquellos de elección frente a salmonelosis graves en adultos y niños, respectivamente. También incluye la tigeciclina, antimicrobiano de segunda línea para el tratamiento de esta patología, y la colistina, la cual representa el último recurso en medicina humana para los casos más graves de salmonelosis (EFSA y ECDC, 2019).

En 2017, el 21,3% de las cepas de *Salmonella* aisladas de muestras de humanos resultaron ser resistentes al menos a un antimicrobiano, de las cuales el 28,6% fueron multirresistentes. El serovar mST resultó tener la mayor tasa de multirresistencia (81,4%). Los antimicrobianos más afectados fueron las sulfonamidas (32,8%), tetraciclinas (30,2%) y ampicilina (27,5%), seguidos de las fluoroquinolonas (13%). Por otro lado, la resistencia frente a cefalosporinas de tercera generación apenas llega al 2%. En un 0,9% de las cepas se observó una combinación de

resistencia frente a ciprofloxacina y cefotaxime. Finalmente, se detectó también un 4,7% de resistencia frente a colistina, dentro de la cual el 88,9% de las cepas pertenecían a los serotipos Enteritidis y Dublin, los cuales han resultado ser los que presentan mayor tolerancia intrínseca a la colistina (EFSA y ECDC, 2019). Ambos serotipos presentan la misma fórmula de antígeno O, por lo que se cree que dicha tolerancia a la colistina se debe al LPS (Agerso *et al.*, 2012). Por tanto, existe una clara influencia del serovar en el desarrollo o adquisición de resistencias en el caso de *Salmonella*.

También se han aislado cepas resistentes de *Salmonella* en producción animal, observando hasta un 51,3% de multirresistencia en porcino y un 29,5% en vacuno de la Unión Europea en 2017. En producción porcina se ha descrito una alta resistencia frente a tetraciclina, sulfametoxazol y ampicilina en las cepas de *Salmonella*, hasta un 76% en algunos estados miembro, seguidos de trimetoprim (20,7%), cloranfenicol (14,6%), ácido nalidíxico (10,3%) y ciprofloxacino (6,3%). Apenas se observó resistencia frente a gentamicina, azitromicina, meropenem, tigeciclina, observando resistencia frente a este último antibiótico únicamente en cuatro de los estados miembros. La resistencia observada frente a tigeciclina en producción porcina se ha asociado al serovar Typhimurium principalmente, y casi siempre en combinación con resistencia frente a otros antimicrobianos (ampicilina, sulfametoxazol, trimetoprim y tetraciclina). El porcentaje de resistencia frente a colistina obtenido fue inferior al 2%, no estando asociado a un serotipo concreto. En cuanto a las cefalosporinas de tercera generación, únicamente se observó resistencia en España e Italia en una proporción muy baja, detectando, además, cepas con resistencia combinada frente a cefotaxime y ciprofloxacino. Al igual que en humanos, los serotipos con mayor tasa de multirresistencia fueron mST (78%) y Typhimurium (62,2%). En España, cerca del 90% de las cepas de *Salmonella* aisladas en producción porcina en 2017 presentaron resistencia frente al menos a un antimicrobiano. Sin embargo, en comparación con años anteriores, la tendencia es a la baja (EFSA y ECDC, 2019).

Aunque en menor proporción, las resistencias encontradas en las cepas aisladas de ganado vacuno siguen la misma tendencia frente a ampicilina, sulfametoxazol, tetraciclina, trimetoprim, cloranfenicol, ácido nalidíxico y ciprofloxacino. La resistencia obtenida frente a colistina fue de cerca del 14% en ganado vacuno, estando asociada en todos los casos al serotipo Dublin. En este caso, no se detectaron resistencias frente a cefalosporinas de tercera generación, meropenem o tigeciclina, y el único país que detectó resistencia frente a colistina en ganado vacuno fue Dinamarca (EFSA y ECDC, 2019).

En cuanto a la producción avícola, los últimos datos publicados en la Unión Europea pertenecen a muestras recogidas y procesadas durante el año 2016. Ese año se detectó un alto porcentaje de resistencia frente a fluoroquinolonas (63,1%), sulfametoxazol (55,6%) y tetraciclina (46,1%) en carne de broiler, seguidos de ampicilina (19,7%) y trimetoprim (14,8%). Tanto en gallinas ponedoras como en pavo se observó la misma tendencia, sin embargo, los porcentajes resultaron moderadamente más bajos. Apenas se detectaron resistencias frente a cefalosporinas de tercera generación, excepto en Portugal, país en el que se obtuvo un 39,4% de resistencia frente a este grupo de antimicrobianos. El porcentaje de resistencia combinada frente a ciprofloxacino y cefotaxime en dicho país fue del 33,3%, mientras que en el resto de la Unión Europea fue de únicamente el 2,2%. La tasa de resistencia frente a tigeciclina fue de 1,9% en broiler y 0,2% en gallina ponedora, existiendo una fuerte asociación al serotipo Infantis, el más aislado en avicultura ese año. La resistencia a colistina observada fue similar a la de tigeciclina, existiendo una fuerte asociación en este caso a los serovares Dublin y Enteritidis, los cuales ya se ha mencionado presentan una cierta tolerancia intrínseca frente a este antimicrobiano. En general, la tasa de multirresistencia fue del 50,3% de las cepas resistentes aisladas. Concretamente, más del 70% de las cepas de *S. Infantis* mostraron multirresistencia, cuando casi la totalidad de las cepas aisladas de ese serovar presentaban resistencia al menos a un antimicrobiano (94,4%). En cambio, *S. Enteritidis* apenas mostró un 10,6% de multirresistencia en broiler, y un 33,1% en gallina ponedora. A pesar de ello, *S. Enteritidis* fue el serovar con mayor tasa de resistencia frente a colistina (EFSA y ECDC, 2018).

1.2.4. Métodos de detección de resistencias a antimicrobianos

Existen diferentes test de susceptibilidad a antimicrobianos. Los más utilizados hasta ahora han sido aquellos de tipo fenotípico, basados en el cultivo bacteriológico. Para ello, siempre se debe tener un cultivo monoclonal previamente aislado en medio sólido de la bacteria a estudiar, a partir del cual se realiza una suspensión bacteriana estandarizada (inóculo). A fin de que la técnica sea válida, el inóculo debe contener una concentración determinada de unidades formadoras de colonias o UFC (10^4 UFC). Sin embargo, una suspensión con 10^4 UFC apenas produce turbidez, por lo que se prepara una suspensión de 10^8 UFC, que produce una turbidez de 0.5 MacFarland, y finalmente se diluye 1:10 para obtener el inóculo final (Cantón *et al.*, 2000).

Para la correcta realización del test se ha estandarizado el protocolo a nivel internacional, de manera que se puedan comparar los resultados entre diferentes laboratorios. El resultado depende del medio de cultivo elegido, su pH y composición, la concentración de antimicrobiano

utilizada, la temperatura y atmósfera de incubación, la velocidad de crecimiento bacteriano, el tamaño del inóculo, etc. (Pasteran *et al.*, 2003). A fin de minimizar todas las posibles variaciones, se utiliza por norma general el medio de cultivo Mueller-Hinton, ya que se encuentra estandarizado para la gran mayoría de bacterias y tiene una serie de cualidades que lo convierte en el medio de elección (Malbrán, 2012):

- ✓ La reproductibilidad de los resultados de sensibilidad a antimicrobianos entre distintos lotes es muy alta.
- ✓ Apenas presenta inhibidores para la acción de ciertos antimicrobianos, como las sulfonamidas o las tetraciclinas.
- ✓ Permite un buen crecimiento de la mayoría de bacterias.
- ✓ Existe gran cantidad de información y datos sobre este medio en test de sensibilidad.

En general podemos hablar de dos grandes grupos de test de susceptibilidad a antimicrobianos: los métodos por difusión y los métodos por dilución. Cada uno de ellos tiene su protocolo estandarizado. A continuación, se describen de manera resumida:

- ✓ Difusión disco-placa: sobre una placa de agar Mueller-Hinton, con ayuda de un hisopo estéril, se extiende el inóculo de la bacteria a estudiar por toda la superficie. A continuación, se depositan una serie de discos de papel secante, cada uno de ellos impregnado en un antimicrobiano concreto. Al entrar en contacto el disco con el agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar, actuando sobre la bacteria. Tras 24 horas de incubación a 37°C se observa el efecto de los antimicrobianos sobre la bacteria inoculada. Gracias a las guías desarrolladas por el CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*), se puede determinar si la bacteria es resistente o sensible a cada antimicrobiano en función del diámetro del halo de inhibición obtenido (Figura 11). Se trata de un método rápido, sencillo y barato, de gran utilidad en la clínica diaria, estandarizado por Kirby-Bauer. Sin embargo, al no ser cuantitativo, no es muy útil para estudios epidemiológicos (Hudzicki, 2009; Bayot y Bragg, 2019).



Figura 11. Test de sensibilidad a antimicrobianos con el método de difusión disco-placa (izquierda) y con el método de difusión E-test (derecha). Fuentes: imagen propia y Biomérieux® España, respectivamente.

- Epsilon-test o E-test: se trata de una variante del método anterior que permite la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), siendo por tanto un método cuantitativo. El protocolo es similar, pero en lugar de utilizar discos de papel secante impregnados en antimicrobiano, se utilizan unas tiras de plástico no poroso que presentan un gradiente predefinido de antimicrobiano, el cual equivale a unas 15 diluciones. Tras 24 horas de incubación a 37°C, la CMI será el valor obtenido en el punto de intersección entre el halo de inhibición y la tira (Figura 11) (García, 2011).
- ✓ Macrodilución en placas/tubos: cada tubo se añade una cantidad estándar de caldo Mueller-Hinton con una concentración específica de antimicrobiano, el cual se ha añadido previamente, y sobre el agar ya solidificado se inocula el agente. Tras 24 horas de incubación a 37°C se observa el crecimiento o la ausencia del mismo de la bacteria en cada uno de los tubos. De esta manera se obtiene la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada antimicrobiano para esa cepa bacteriana. A fin de comprobar si la cepa es resistente o sensible al antibiótico, existe una serie de guías desarrolladas por el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos (EUCAST: *European Commitee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) en las que se indican los puntos de corte para cada especie bacteriana y antimicrobiano (Cantón *et al.*, 2000; Bayot y Bragg, 2019).
 - Macrodilución en caldo: la técnica es muy similar, pero como medio de cultivo se utiliza caldo Mueller-Hinton en lugar de agar.
 - Microtitulación en pocillos: se trata de una variante del método anterior. La técnica es similar, sin embargo, se realiza en placas de microtitulación de 96

pocillos. En cada uno debe quedar un volumen final de 100 μ L de caldo Mueller-Hinton e inóculo (Figura 12). Éste es uno de los métodos más empleados en la actualidad, y las placas pueden prepararse en el laboratorio o comprarse paneles comerciales que ya contienen las diluciones de antimicrobiano en cada pocillo (Cantón *et al.*, 2000; Bayot y Bragg, 2019).

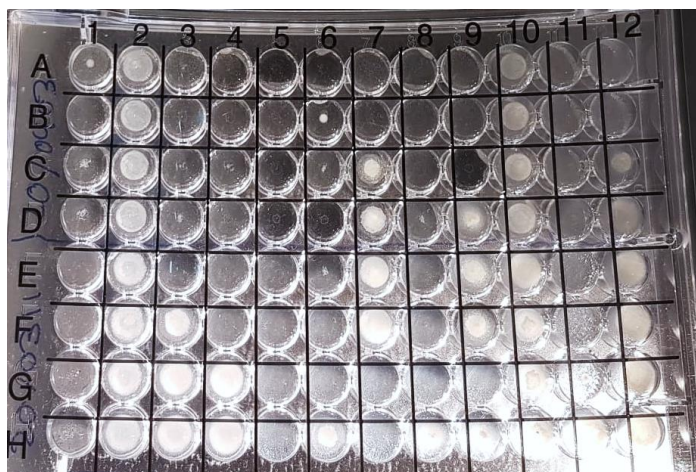


Figura 12. Test de susceptibilidad a antimicrobianos con el método de microtitulación en caldo Mueller-Hinton. Fuente: imagen propia.

La elección de los antimicrobianos que incluiremos en el test de sensibilidad depende del objetivo, así como de la situación en cuanto a desarrollo de resistencias en el espacio y tiempo. Existen una serie de recomendaciones de múltiples organismos nacionales, como el grupo MENSURA (Mesa Española para la Normalización de la Susceptibilidad y Resistencia a Antimicrobianos) y el PRAN (Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos) e internacionales, como el NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards Suggest*), la FDA (*Food and Drug Administration*), o la EFSA. De manera general se incluye al menos un antimicrobiano de cada familia, además de los antimicrobianos clave en el control de la especie o género bacteriano de estudio. Los antimicrobianos incluidos deben resultar de utilidad para el estudio tanto clínico como epidemiológico de la bacteria. Por tanto, hay que tener en cuenta la eficacia clínica, prevalencia de resistencia, coste, indicaciones de los organismos internacionales, y las recomendaciones de consenso para antimicrobianos de primera elección y alternativos (Pasteran *et al.*, 2003).

Los resultados obtenidos nos indicarán la categoría de la cepa bacteriana para cada antibiótico, existiendo tres opciones: sensible, resistente y de sensibilidad intermedia. La categoría de sensibilidad intermedia se aplica cuando una cepa tiene una sensibilidad disminuida frente a un antimicrobiano, pero un tratamiento a dosis altas puede resultar exitoso. Sin embargo, debe

valorarse la toxicidad del antimicrobiano en el organismo antes de pautar una dosis más alta. Por otro lado, dentro de la categoría de resistente, las cepas bacterianas pueden ser (Jiménez *et al.*, 2019):

- ✓ **Resistente:** simplemente muestra resistencia a un antimicrobiano, o a varios antimicrobianos de una única familia.
- ✓ **Multirresistente (MDR):** cuando es resistente a varios antimicrobianos. Aunque no se ha estandarizado esta definición, por lo general se aplica a dos situaciones, según el criterio elegido. Numerosos autores definen una cepa multirresistente como una cepa resistente al menos a un antimicrobiano de dos familias diferentes (López-Pueyo *et al.*, 2011; Alvarado y Xavier, 2016). Sin embargo, el ECDC, el Centro de Control y Prevención de Enfermedades Estadounidense (CDC: *Center for Disease Control and Prevention*) y la Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia a Antimicrobianos (ReLAVRA) son más restrictivos considerando una cepa multirresistente como aquella resistente al menos a un antimicrobiano de tres familias diferentes (Magiorakos *et al.*, 2012; Jiménez Pearson *et al.*, 2019). Además, algunos autores consideran que una cepa resistente al menos a un antimicrobiano clave debe considerarse multirresistente a fin de tener en cuenta su importancia epidemiológica en salud pública (Siegel *et al.*, 2007).
- ✓ **Extremadamente resistente (XDR):** el aislamiento bacteriano es resistente a todas las familias de antimicrobianos excepto a una o dos de ellas. Se clasifican en una categoría diferente a las multirresistentes debido a la alta probabilidad que tienen de ser resistentes a todos los antimicrobianos (Magiorakos *et al.*, 2012).
- ✓ **Panresistente (PDR):** se trata de una cepa bacteriana que es resistente a todos los antimicrobianos aprobados y comercializados para el tratamiento frente a esa bacteria.

Por otro lado, en la actualidad se han desarrollado técnicas moleculares, como la PCR, mediante las cuales se puede analizar directamente la presencia de los diferentes genes que codifican resistencias a antimicrobianos en una determinada muestra sin necesidad de aislar previamente el patógeno. Por ello, es posible obtener resultados en menos tiempo que con los métodos fenotípicos, y por tanto establecer lo antes posible un tratamiento eficaz lo que puede derivar en una mayor probabilidad de éxito, acortando los plazos de recuperación del paciente (Felsenstein *et al.*, 2016). Sin embargo, un resultado negativo en la detección de genes de resistencia no implica que dicha bacteria no sea resistente mediante otros mecanismos, por lo que se pueden dar falsos negativos. Además, pese a la rapidez con la que se obtienen resultados, los métodos fenotípicos siguen siendo los más empleados debido a su bajo coste y sencillez en

la metodología. Aun así, la información que proporcionan y la rapidez del método molecular es de gran interés, por lo que puede considerarse el perfecto complemento a los métodos fenotípicos tradicionales (Bard y Lee, 2018).

1.2.5. Planes de actuación contra el desarrollo de resistencias

Prohibir el uso de un antimicrobiano no garantiza la disminución de las resistencias frente a él, debido a la alta permanencia de los genes de resistencia en el ambiente. Por tanto, es necesaria una intervención más amplia. En vista del aumento exponencial de la resistencia a antimicrobianos, así como del escaso número de nuevos antimicrobianos en desarrollo, la detección temprana y la monitorización de bacterias multirresistentes se convierte en una herramienta fundamental (Fernandes y Martens, 2017). Por otro lado, una vez aparecida una población bacteriana resistente a un antibiótico, ésta permanecerá en el ambiente diseminando la resistencia a mayor velocidad cuantos más antibióticos haya en el ambiente. Por tanto, resulta de vital importancia la vigilancia en el medio ambiente de genes de resistencia, así como de residuos de antibióticos.

Para combatir el problema de la diseminación de resistencias ya existentes y frenar el desarrollo de nuevas, es necesario un abordaje multidisciplinar, así como medidas institucionales dirigidas a reducir dicha diseminación. Una de las principales medidas a tomar es la mejora en la detección de microorganismos multirresistentes, junto con el uso clínico racional de los antimicrobianos basado en el programa PRAN y similares. Dichas medidas deben realizarse conjuntamente en salud pública y sanidad animal para obtener el mejor resultado posible (Ruiz-Garbajosa y Cantón, 2016).

En 2017, la Comisión Europea adoptó un nuevo plan de acción contra las resistencias a antimicrobianos basado en la premisa de *One Health* (EFSA y ECDC, 2019). Por ello, se ha organizado un enfoque multidisciplinar en el que colaboran diferentes instituciones nacionales e internacionales dedicadas a la salud pública, sanidad animal e higiene y control de los alimentos. Dicho plan pretende mejorar los métodos de detección y monitorización coordinando los diferentes planes de cada estado miembro, y ampliar los conocimientos sobre el desarrollo y la diseminación de las resistencias, promoviendo para ello la investigación, a fin de mejorar el diagnóstico clínico. Uno de los objetivos principales es reducir el consumo de antimicrobianos, tanto en humanos, como en animales, fomentando la estrategia vacunal en detrimento de la antibioterapia, y la mejora en los programas de higiene y bioseguridad. Además, este plan incluye una serie de acciones dirigidas a la sensibilización de la población,

como promover el uso prudente de los antimicrobianos, disminuyendo paulatinamente su consumo en la comunidad, y la correcta gestión de residuos de los antimicrobianos, por ejemplo, a través del punto SIGRE (Sistema Integrado de Gestión y Recogida de Envases) (EFSA y ECDC, 2019). A fin de garantizar un uso prudente de los antimicrobianos y maximizar de esa manera su eficacia, evitando el desarrollo de nuevas resistencias, se recomienda realizar un diagnóstico preciso y un test de sensibilidad de los microorganismos implicados antes de pautar un tratamiento. Además, en la elección del antimicrobiano se deberá tener en cuenta la categorización de los antimicrobianos (European Medicines Agency, 2020):

- ✓ **Categoría A:** antibióticos no aprobados para su uso en medicina veterinaria en la Unión Europea. Incluyen: carbapenemes, cefalosporinas de última generación, glicopépticos y gliciliclinas.
- ✓ **Categoría B:** son aquellos que deben ser utilizados como segunda elección en veterinaria y/o último recurso por ser críticamente importantes para la salud humana, ya que son la única terapia para tratar patologías graves. No deben utilizarse como primera elección a menos que su uso esté justificado. Incluye: cefalosporinas de tercera y cuarta generación, fluoroquinolonas, etc.
- ✓ **Categoría C:** incluye antimicrobianos para los cuales hay una alternativa en medicina humana en la Unión Europea, pero sólo existen unas pocas alternativas aprobadas para determinadas patologías en medicina veterinaria. Estos antimicrobianos sólo deben usarse cuando los de la categoría D no son efectivos.
- ✓ **Categoría D:** son aquellos que se usan de manera regular en veterinaria, siendo los de primera elección, pero que son críticamente importantes para la salud humana, lo que significa que el desarrollo y diseminación de resistencias frente a estos antimicrobianos representa un riesgo para la salud pública. No deben usarse como profilaxis/metafilaxis, ni para mejorar el rendimiento de la producción animal.

Finalmente, se están investigando nuevas estrategias terapéuticas frente a las bacterias como el uso de enzibióticos, péptidos antimicrobianos, nanopartículas, bacteriófagos o inhibidores de la formación de biofilms.

1.3. Fauna silvestre

1.3.1. La fauna ibérica: biodiversidad y conservación

La península Ibérica es una de las regiones con mayor biodiversidad de Europa, en gran parte debido a la posición geográfica que ocupa, así como a su orografía, que facilita la presencia de multitud de biotopos diferentes en las que albergar cientos de especies animales distintas. Sin tener en cuenta los invertebrados, la fauna ibérica cuenta cerca de 900 especies de animales, dentro de las cuales la clase más grande y representativa es la de las aves (Linaza y Viejo, 2007). La avifauna ibérica es una de las más ricas en Europa, contando con más de 500 especies descritas. Además, las condiciones climáticas, así como la diversidad en ecosistemas hacen de la península Ibérica una región ideal como corredor de migraciones. Así, anualmente se observa el paso de miles de aves que utilizan el territorio como lugar de paso y abastecimiento entre su región de cría, al norte de Europa, y su zona de invernada, en África (Liminana *et al.*, 2012). También se han descrito especies del norte de Europa que eligen la península Ibérica como zona de invernada, como por ejemplo el milano real (*Milvus milvus*) o la grulla común (*Grus grus*) (Larsson, 2016; Maciorowski *et al.*, 2019). Además, el aumento de las temperaturas relacionado con el cambio climático ha favorecido que poblaciones de varias especies que tradicionalmente realizaban migraciones dejen de hacerlas, o en algunos casos realicen migraciones más cortas, como en el caso de la cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*). En los últimos años se han descrito poblaciones residentes durante todo el invierno en la zona central de la península Ibérica, donde además consiguen fácilmente alimento en ciudades y vertederos (Arizaga *et al.*, 2018).

Por otro lado, el incremento de la población urbana y el abandono rural han impulsado el desarrollo urbano y la producción ganadera y agrícola intensiva, provocando una fragmentación, destrucción o pérdida de hábitats naturales, así como un aumento de la contaminación ambiental, que afectan sin duda alguna a la biodiversidad animal (Smith *et al.*, 2009). Además, el equilibrio de los ecosistemas puede verse alterado por la competencia interespecífica, ya sea por causas naturales, como por ejemplo en la relación depredador-presa, o por la introducción de especies por el hombre, por ejemplo, con las translocaciones de individuos para alcanzar densidades deseadas o la liberación de especies alóctonas con potencial invasor. Por otro lado, los agentes patógenos han regulado de manera tradicional las poblaciones silvestres mediante presión selectiva (Sommer, 2005). Sin embargo, la desaparición de ciertos microorganismos puede ser perjudicial para el mantenimiento del ecosistema (OIE y IUCN, 2014). Todo ello mantenido a lo largo del último siglo, ha favorecido una disminución en las poblaciones de determinadas especies que ahora se encuentran amenazadas, como por ejemplo la lechuza

común (*Tyto alba*) o el linco ibérico (*Lynx pardinus*) (Martínez y Zuberogoitia, 2004; Cabezas-Díaz *et al.*, 2009).

Este declive en la biodiversidad ibérica se ha visto potenciado además por el desarrollo de poblaciones estables de especies invasoras. La mayoría de estas especies han sido introducidas por el ser humano por diversas razones: comercio de especies exóticas como mascotas, producción de especies para alimentación o producción de animales con fines peleteros. El aumento de temperaturas durante el invierno, hacen que la península Ibérica resulte ser un buen refugio para muchas de estas especies, las cuales establecen poblaciones residentes en nuestros ecosistemas, desplazando la fauna ibérica (Gallardo *et al.*, 2017). Uno de los ejemplos más llamativos en este aspecto es el del visón europeo (*Mustela lutreola*), mustélido en peligro crítico de extinción según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), cuyo nicho ecológico lo está ocupando desde hace algunos años el visón americano (*Neovison vison*). Esta especie resulta tener una mayor tasa de reproducción, además de un comportamiento más oportunista, adaptándose bien a diferentes ecosistemas y desplazando a la especie autóctona hasta casi llevarla a su extinción (Pödra y Gómez, 2018). Pero no se trata de un caso aislado; el galápago de Florida (*Trachemys scripta*), el cangrejo americano (*Procambarus clarkii*), la cotorra argentina (*Myiopsitta monachus*), la rana toro (*Lithobates catesbeianus*) o el mapache (*Procyon lotor*) son algunos de los casos más destacados de nuestra geografía en los últimos años (BOE, 2019a).

Afortunadamente, en la actualidad, son muchos los programas de conservación que se están llevando a cabo en la península Ibérica con diferentes objetivos: reducir el impacto ecológico de la actividad humana, restaurar los ecosistemas, reforzar las poblaciones de algunas especies en peligro, cría en cautividad de otras en estado crítico, etc. Todos estos programas han propiciado además la investigación en todas estas especies, nichos y biotopos, publicando en los últimos años gran cantidad de información recopilada en el transcurso de estos proyectos (Life Bonelli, 2013; Aquila a-Life, 2018). Sin embargo, pese a todos los esfuerzos, la conservación de la biodiversidad se presenta como un reto multifactorial que sólo puede lograrse mediante el estudio de todos los factores implicados y el uso de todas las herramientas posibles, como confirma la corriente actual de investigación “*One Health*” o lo que en castellano se traduciría como “Una Única Salud”. La forma más eficaz y rápida de obtener resultados en una investigación es abordarla desde todos los puntos de vista posibles, para lo que hace falta un equipo de trabajo multidisciplinar y en la mayoría de los casos la colaboración entre diferentes instituciones de todo el mundo. Muchas de las publicaciones editadas recientemente tienen estos enfoques multidisciplinares, relacionando la biología de la especie con la ecología,

medicina veterinaria, epidemiología de agentes infecciosos, salud pública o incluso con factores socio-económicos (Zinsstag *et al.*, 2011; Zaragoza *et al.*, 2019).

Probablemente la acción más importante en la defensa de la biodiversidad es la concienciación de la población. Durante décadas, numerosas instituciones han apostado por la educación ambiental como arma principal en la lucha por el medio ambiente, a través de programas educativos en colegios y universidades, documentales televisados o publicaciones en periódicos y revistas. Sin embargo, hasta hace pocos años, el acceso a esta información era muy variable en función de la región o la educación de la población. El desarrollo de nuevas tecnologías, como los simuladores y la realidad virtual, y la aparición de las redes sociales han causado un gran impacto en las nuevas generaciones, llegando a más público en muy poco tiempo. El resultado de todo ello se traduce en una creciente preocupación por el medio ambiente y el cambio climático (Carmichael y Brulle, 2017).

1.3.1.1. Aves rapaces ibéricas: el águila de Bonelli

Las aves rapaces son uno de los principales grupos de la avifauna ibérica, siendo esta región la que posee la mayor biodiversidad de rapaces de Europa (González, 2010). De manera general las rapaces son aves carnívoras, la mayoría predadoras y altamente especializadas para la caza. Su tamaño varía según la especie, pero todas ellas se caracterizan por tener unas fuertes garras con las que sujetar la presa y un pico ganchudo adaptado al tipo de alimentación, del que también existe una gran variedad, en función del género y la especie de la que se trate. La mayoría de las especies tienen un fuerte carácter territorial, mientras que algunas forman comunidades. Su época de celo se extiende desde principios de enero hasta marzo, siendo la época de reproducción y cría desde marzo hasta julio, según las condiciones climáticas. Sin embargo, en los últimos años, el aumento de las temperaturas ha provocado que poco a poco se vayan adelantando las épocas de celo y cría, así como el retraso en la migración de las especies que la realizan. Por otro lado, esta misma situación ha provocado la llegada de nuevas especies de aves rapaces desde África, como son el cernícalo patirrojo (*Falco vespertinus*) y el buitre orejudo (*Torgos tracheliotos*), que se han empezado a asentar en el sur de la península (González, 2010) (Figura13).



Figura 13. Fotografía de cernícalo patirrojo (izquierda) y buitre orejado (derecha). Fuente: imágenes de Tomás Belka y Yathin Sk, respectivamente.

En la actualidad, se encuentran catalogadas 35 especies de aves rapaces diferentes en el Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial y el Catálogo Español de Especies Amenazadas (BOE, 2019b). Se dividen en tres grandes órdenes: Strigiformes, donde se incluyen las rapaces nocturnas, Accipitriformes y Falconiformes, donde se incluyen las rapaces diurnas. Dentro de las especies más amenazadas encontramos el águila imperial (*Aquila adalberti*), el quebrantahuesos (*Gypaetus barbatus*), el milano real (*Milvus milvus*), y el alimoche canario o guirre (*Neophron percnopterus majorensis*) (Figura 14). Además, en las últimas décadas se ha observado un grave declive de las poblaciones de varias especies como por ejemplo la lechuza común (*Tyto alba*) o el águila de Bonelli (*Aquila fasciata*) (SEO BirdLife, 2008).



Figura 14. Fotografía de águila imperial joven (izquierda) y alimoche (derecha). Fuente: Juan José Iglesias Lebrija (GREFA) y Sergio de la Fuente García (GREFA), respectivamente.

El águila de Bonelli, tradicionalmente llamada águila perdicera, es una rapaz accipitriforme que se extiende por la cuenca mediterránea y el sudeste asiático. Se considera un águila de tamaño medio, midiendo unos 70 cm de longitud y 150-170 cm de envergadura de media, y con un peso entre 1,6 y 2,2 kg. Su plumaje es marrón, con las zonas ventrales blancas con moteado marrón (Figura 15) (SEO BirdLife, 2008).



Figura 15. Fotografía de águila de Bonelli en vuelo (izquierda) y posada (derecha). Fuente: Sergio de la Fuente (GREFA).

Habita en zonas muy variables, aunque tiene preferencia por zonas rocosas y cortados, donde realizan sus nidos a gran altura. La puesta generalmente consta de dos huevos, y los pollos son cuidados por ambos progenitores, alimentándose solos a partir de los 45-50 días con las presas que les proporcionan los padres. A partir de los 60 días el plumón ha desaparecido y el plumaje definitivo ya se ha desarrollado por completo, pasando a ser volantones. Pocos días después comienzan a realizar sus primeros vuelos cortos (SEO BirdLife, 2008). Aunque los individuos jóvenes realizan dispersiones que van desde decenas hasta miles de kilómetros, una vez establecido su territorio, los adultos se mantienen en el mismo mientras haya abundancia de alimento (Cadahía *et al.*, 2005). Esta etapa de dispersión se realiza durante los tres o cuatro primeros años de vida, hasta llegar a la madurez sexual, momento en el cual se asientan en un territorio para construir su nido, el cual suele localizarse en roquedos y acantilados (Pavón *et al.*, 2009). Si la disponibilidad de alimento y las condiciones ambientales para la reproducción son favorables, ocupan este territorio durante toda su vida, evitando el contacto con otras parejas

reproductoras de su misma especie, por lo que se consideran animales residentes y territoriales. A pesar de poder realizar pequeños movimientos de pocos kilómetros de distancia, el territorio del águila de Bonelli puede llegar a medir cerca de 80 km² de territorio de media (Conde de Dios, 2018). Además, se trata de un ave cuya relación con la actividad humana es casi nula, ocupando regiones poco habitadas y/o alejadas de los núcleos urbanos (Ontiveros, 2016). Su alimentación se basa tradicionalmente en conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*) y perdiz roja (*Alectoris rufa*), sin embargo, la disminución paulatina de las poblaciones de estas presas por diferentes motivos ha provocado su adaptación complementando la dieta con diferentes especies de columbiformes (Moleón *et al.*, 2012).

Por este y otros factores, las poblaciones mediterráneas de águila de Bonelli han sufrido un fuerte descenso en los últimos años, por lo que se considera una especie amenazada en esta región. En la península Ibérica, el águila de Bonelli apenas se observa en la meseta norte, encontrando las poblaciones más estables en Andalucía y Comunidad Valenciana. Entre los factores causantes de esta regresión se encuentran la escasez de alimento, la fragmentación y desaparición del hábitat y el efecto de ciertas actividades humanas, como la escalada, el furtivismo, etc. Una de sus principales causas de mortalidad es la electrocución en torres las torres de electricidad. Como la mayoría de las aves, el águila de Bonelli tiene tendencia a posarse en los puntos altos de estas torres, y además también en los puntos inferiores de las crucetas, lo que las hace especialmente vulnerables a la electrocución (Hernández-Matías *et al.*, 2015). Por otro lado, también se ha observado la alta prevalencia del parásito *Trichomonas* en pollos de águila de Bonelli de campo (Gómez *et al.*, 2018). La transmisión de este parásito se ha relacionado con la ingesta de palomas portadoras, dando lugar a unas lesiones necróticas en cavidad oral y esófago que progresan afectando musculatura y hueso adyacentes. Con un diagnóstico temprano y el tratamiento adecuado, la patología tiene buen pronóstico, sin embargo, en aves de vida libre el pronóstico depende completamente de la capacidad del sistema inmune del individuo, siendo generalmente mortal (Gómez *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2019).

En la actualidad, son varios los programas de conservación y reintroducción de esta especie, destacando dos de ellos, destacando el Life Bonelli (2013-2017), el Life ConRaSi (2015-2018) y el Aquila a-Life (2018-2022). La mayoría son proyectos internacionales, en los que intervienen España, Francia e Italia, y sus principales acciones consisten en la corrección de tendidos, la cría en cautividad de individuos para reintroducirlos en zonas despobladas y el seguimiento de las parejas reproductoras de vida libre junto con el chequeo veterinario y marcaje de los pollos que anualmente nacen (Lebrija *et al.*, 2012). La cría en cautividad se realiza en diferentes centros de

España, como GREFA (Grupo de Rehabilitación de la Fauna Autóctona y su Hábitat), y Francia (UFCS: *Union Française des Centres de Sauvegarde de la faune sauvage*), con ejemplares irrecuperables que se mantienen en cautividad para su reproducción, siendo un método muy delicado y complejo con el que anualmente se obtienen unos 5 o 6 individuos en total. La ventaja que presenta frente a la cría en libertad es el control que se tiene en el momento de la incubación del huevo, de la eclosión y durante los primeros días del pollo, el cual es el periodo más crítico. Una vez superados los primeros días de vida, si todo va bien, el animal es introducido en el nido con sus padres, los cuales terminan de criarlo, alimentarlo y educarlo, hasta el momento de trasladarle (Aquila a-Life, 2018). Otra acción de suma importancia que se realiza en estos proyectos es la extracción de un número variable de pollos de águila de Bonelli de poblaciones más estables, como por ejemplo la de Andalucía, en función de las tendencias poblacionales observadas en la última temporada entre otros factores. Dichos pollos son trasladados en regiones menos pobladas, como por ejemplo Navarra, La Rioja o las Islas Baleares. El número de ejemplares trasladados varía en función de la tasa de reproducción de cada año y de las tendencias poblacionales. Finalmente, cada año se liberan tanto los individuos criados en cautividad como los trasladados mediante la técnica de *hacking*, es decir, introduciéndolos en una jaula grande ubicada en la región en la que se van a liberar, en la que permanecen hasta desarrollar por completo el plumaje con el fin de aclimatarse a las nuevas condiciones ambientales (Figura 16). Una vez desarrollado el plumaje por completo, la jaula se abre, para liberar las águilas, mientras se sigue aportando comida dentro de la jaula abierta para facilitar que los individuos se establezcan en el área (Aquila a-Life, 2018).

Gracias a estas acciones, entre 2013 y 2017 se liberaron más de 80 águilas de Bonelli jóvenes, algunas criadas en cautividad y otras trasladadas de poblaciones estables, principalmente en la zona centro-norte de la península e Islas Baleares, reforzando de esta manera las poblaciones de estas regiones (Iglesias *et al.*, 2017). Además, desde 2013, se está realizando el seguimiento de cerca de 150 ejemplares de vida libre a los que se suman cada año más de 30 pollos marcados en el campo y los nacidos en cautividad dentro del programa Aquila a-Life a fin de estudiar la tasa de mortalidad juvenil y adulta, y sus causas (Aquila a-Life, 2018).



Figura 16. Jaula de aclimatación o hacking con seis águilas de Bonelli ya liberadas. Fuente: proyecto Life Bonelli (GREFA).

1.3.1.2. Aves silvestres urbanas

El aumento de la actividad humana con el paso de los años ha repercutido en la fauna silvestre. Mientras que muchas especies de animales han sido desplazadas, algunas se han adaptado a esta actividad, coexistiendo hoy en día en ciudades y núcleos urbanos donde encuentran recursos ilimitados para realizar sus actividades (Miranda, 2017). El incremento exponencial de la producción de residuos en los últimos años supone para estos animales una gran ventaja en la búsqueda de alimento y materiales para la construcción de sus nidos. Hoy en día, es sencillo encontrar carnes, pescados, frutas, vegetales y otros alimentos en cualquier vertedero o planta de residuos, así como en los contenedores que se encuentran distribuidos por las ciudades, atrayendo el interés de multitud de animales (Gilbert *et al.*, 2016). Sin embargo, la alimentación a base de residuos puede ocasionar patologías nutricionales (déficits de vitaminas), intoxicaciones (botulismo, salmonelosis, colibacilosis) y la bioacumulación de metales pesados y otras sustancias como plaguicidas o residuos farmacológicos (Plaza y Lambertucci, 2018). Al almacenamiento de los residuos durante largos periodos de tiempo en zonas descubiertas y de fácil acceso para la fauna silvestre hay que sumarle la incorrecta gestión de residuos medicamentosos por parte de la población, favoreciendo el desarrollo de resistencias a

antimicrobianos en las bacterias presentes en el suelo y residuos, y convirtiéndose así en una fuente importante de cepas bacterianas multirresistentes para la fauna urbana (Camacho *et al.*, 2016).

Esta fauna urbana está compuesta por animales de todas las clases, desde murciélagos, roedores y lagartijas, hasta jabalíes y mapaches. Pero la clase más abundante en nuestro país es, sin duda, la de las aves. Cigüeñas, gaviotas, ánades, palomas, tórtolas, urracas, estorninos, mirlos y gorriones, son algunas de las especies más frecuentes en zonas urbanas, todas ellas con diferentes nichos y tipos de alimentación (Imagen 17). Sin embargo, en los últimos años se ha observado una regresión y/o desplazamiento en las poblaciones de algunas de estas especies, como por ejemplo en el gorrión (*Passer domesticus*). A pesar de ser un ave ampliamente distribuida y muy relacionada con ambientes urbanos, en los que encuentran gran cantidad de recursos y alimento, en los últimos las poblaciones en las grandes ciudades han disminuido drásticamente en parte debido a la introducción de especies invasoras como la cotorra argentina. Aunque se han estudiado otros factores que influyen en la dinámica de esta especie, como por ejemplo el efecto de la radiación electromagnética asociada a las antenas de telefonía, la contaminación ambiental, o el almacenamiento subterráneo de las basuras (Balmori y Hallberg, 2007; Bernat-Ponce *et al.*, 2018:2019). Estos elementos afectan de igual manera a otras especies como son las palomas torcaes y las tórtolas turcas, además de multitud de especies paseriformes. Además, las enfermedades infecciosas también actúan como factor negativo en las poblaciones de estas especies, como por ejemplo el aumento de la prevalencia de *Trichomonas gallinae* en palomas torcaes (*Columba palumbus*) y tórtolas turcas (*Streptopelia decaocto*), que causa gran mortalidad en las poblaciones de estas y otras aves, o la alta prevalencia descrita de manera general en paseriformes de *Salmonella* (Mather *et al.*, 2016; Marx *et al.*, 2017).



Figura 17. Selección de aves urbanas incluidas en el desarrollo de esta tesis. De izquierda a derecha: cigüeña blanca, gaviota sombría, paloma torcaz, estornino negro y gorrión común. Fuente: dibujos extraídos de la Enciclopedia de Aves de España SEO/Birdlife, 2008.

En el lado opuesto encontramos especies como las cigüeñas, gaviotas y estorninos, cuyas poblaciones urbanas han ido en aumento en los últimos años, expandiéndose a regiones en las que antes apenas se avistaban. Pese al gran declive que tuvieron en la década de los 70, las poblaciones de cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*) en la península Ibérica se han ido recuperando poco a poco, siendo una de las aves más emblemáticas de muchos pueblos. Una de las principales causas de esta recuperación ha sido la adaptación de esta especie a la alimentación presente en vertederos (Gilbert *et al.*, 2016). Tal ha sido el impacto que, aun siendo un ave tradicionalmente migratoria, se ha observado como cada vez son más los individuos que realizan migraciones cortas de norte a sur de la península o incluso deciden no migrar, estableciéndose poblaciones residentes cerca de núcleos urbanos, como sucede en la meseta central (Wilcove y Wilkeski, 2008). De manera similar, se han establecido poblaciones residentes en la Comunidad de Madrid de gaviotas, principalmente gaviota sombría (*Larus fuscus*) y reidora (*Chroicocephalus ridibundus*). Mayoritariamente, las gaviotas son aves que ocupan las zonas costeras, aprovechando el excedente de la pesca y lonjas como recurso alimentario y migrando en invierno a zonas más cálidas como el sur de la península Ibérica. Durante décadas han utilizado determinados puntos del centro peninsular como zonas de parada y reabastecimiento. Sin embargo, el aumento de la población humana en estas zonas y el consiguiente incremento de residuos, han favorecido el establecimiento de grupos residentes de gaviotas que se mueven entre los principales embalses de la comunidad y los vertederos y mercados de abasto, donde disponen de recursos alimentarios ilimitados durante todo el año (Galván *et al.*, 2003). Por tanto, en la actualidad existen individuos tanto de cigüeña blanca, como de gaviota sombría y reidora, que pueden ser residentes o migratorios. En cualquier caso, es importante destacar que tanto el requerimiento energético de la migración como una alimentación basada en residuos urbanos afecta negativamente al sistema inmune, aumentando la susceptibilidad de los individuos a la infección por diversos patógenos (Arriero *et al.*, 2015; Plaza y Lambertucci, 2018).

En resumen, el empleo de residuos como recurso alimentario por parte de las aves urbanas, pueden favorecer la transmisión de patógenos como por ejemplo *Salmonella*. Además, es importante destacar que, dentro de su territorio, estas especies realizan ciertos desplazamientos en busca de alimento o mejores zonas donde anidar, lo que las convierte en un puente entre la ciudad y el mundo rural y, por ello, en potenciales agentes diseminadores.

1.3.2. Las aves silvestres como reservorio de patógenos

Al igual que los animales de abasto, o las mascotas, la fauna silvestre se encuentra expuesta a millones de microorganismos, los cuales pueden causar enfermedad en función de diferentes factores. No obstante, en base a la ley de selección natural expuesta por Charles Darwin en su obra “El origen de las especies”, la fauna silvestre tiende a desarrollar cierta resistencia a las enfermedades endémicas de la región en la que habitan, lo que les transforma en portadores asintomáticos e incluso en reservorios de determinadas enfermedades (Darwin, 1859; Bengis *et al.*, 2002). El concepto de reservorio se refiere a una especie capaz de mantener un agente infeccioso en un área determinada, en ausencia de contaminación cruzada de otros animales domésticos o silvestres. Por otro lado, un portador asintomático es una especie capaz de infectarse y excretar el patógeno sin desarrollar signos clínicos evidentes. Así, los individuos de una especie que sea reservorio pueden ser o no portadores asintomáticos al infectarse (Prieto, 2014). En este sentido, la fauna silvestre puede actuar como portadores asintomáticos de numerosos patógenos, los cuales pueden diseminarse por el medio ambiente y transmitir a animales domésticos y humanos por diferentes vías.

Por lo general, el contacto entre fauna silvestre y ganado se reduce mediante el empleo de barreras físicas como el vallado en las explotaciones intensivas. Sin embargo, no es necesario un contacto directo para la transmisión de agentes infecciosos, ya que muchos de ellos tienen una alta persistencia en el medio, lo que hace posible la transmisión indirecta a través de fómites contaminados, y, muchos de ellos, pueden diseminarse a través de aguas contaminadas, punto en el que las aguas de escorrentía juegan un papel importante. Además, no hay que olvidar que muchas enfermedades infecciosas se transmiten a través de vectores, los cuales pueden ser especies muy diversas de mosquitos, garrapatas o incluso otras aves. Otros factores que influyen en la transmisión de enfermedades son las deficiencias nutricionales, el estrés, alteraciones en el comportamiento o las fluctuaciones en el clima, así como la densidad de población de especies animales y de los vectores. Por ejemplo, los períodos con alta tasa de lluvias favorecen el desarrollo de los vectores, aumentando la incidencia de enfermedades mediadas por vector (Bengis *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2008).

Un estudio publicado en 2008 sugiere que el 75% de los patógenos zoonóticos emergentes tienen su principal origen en la fauna silvestre (Jones *et al.*, 2008). En este sentido, la fauna silvestre sirve como indicador precoz en la vigilancia de enfermedades infecciosas emergentes. Un ejemplo de ello fue la detección de *West Nile* en brotes de mortalidad masiva en cóvidos previos a los brotes acontecidos en caballos o humanos en nuestro país (Sánchez-Vizcaíno *et al.*,

2014). Sin embargo, diversos estudios demuestran que la diseminación de patógenos entre animales silvestres y domésticos es multidireccional, encontrando multitud de ejemplos de transmisión de agentes infecciosos de ganado a fauna silvestre, como es el caso de la tuberculosis o la brucelosis (Bengis *et al.*, 2002; Palmer *et al.*, 2012). Por ello, resulta de gran interés el estudio de las enfermedades infecciosas en la fauna silvestre, más aún, teniendo en cuenta la estrecha relación que existe entre el medio ambiente, las zonas rurales y las grandes ciudades. De los patógenos emergentes que pueden afectar al hombre, cerca del 60% son zoonóticos, afectando también a los animales, ya sean domésticos o silvestres (Jones *et al.*, 2008). El concepto “*One Health*” o “Una Única Salud” hace referencia a esta relación, poniendo de manifiesto su importancia a la hora de considerar una única medicina que afecta tanto a personas como a animales y a ecosistemas (Figura 18). Entre estos componentes existe una red de conexiones dinámicas que permite el intercambio de patógenos en todas las direcciones, aumentando además la probabilidad de emergencia de nuevos patógenos (Rhyan y Spraker, 2007). A raíz de ello, se han creado grupos de investigación multidisciplinarios que incluyan médicos, veterinarios, biólogos, epidemiólogos, ingenieros forestales y ecólogos, entre otros profesionales de la rama sanitaria, para poder obtener una visión global de los posibles problemas sanitarios, y poder dar una alerta temprana de las enfermedades más prioritarias, tanto por su impacto en la fauna silvestre como en la salud pública y sanidad animal.



Figura 18. Diagrama de flujo de microorganismos entre los diferentes sectores. Fuente: elaboración propia.

En 2013, la Oficina Internacional de Epizootías (OIE) lanzó una plataforma online (WAHIS-Wild) en la que poder consultar la información relativa a diferentes enfermedades infecciosas presentes o no en diferentes países del mundo. Por desgracia, a día de hoy aún son pocos los países que tienen establecido un buen sistema de vigilancia de estas enfermedades en la fauna silvestre, por lo que los datos mostrados en la plataforma están incompletos. Por tanto, surge la necesidad de impulsar la vigilancia y control de enfermedades en la fauna silvestre, tanto a nivel nacional como internacional, así como la colaboración y el intercambio de información entre profesionales de los diferentes grupos de trabajo e instituciones (Prieto, 2014).

Sin embargo, el estudio de las enfermedades que puedan afectar a la fauna silvestre tiene numerosas limitaciones tanto científicas como políticas (Becker *et al.*, 2019). Por lo general, estos estudios requieren una serie de permisos legales y procedimientos burocráticos, así como la colaboración de varias instituciones y autoridades. Además, la bibliografía de base en medicina de fauna silvestre es relativamente escasa si comparamos con la que existe en animales domésticos y humanos. Incluso la obtención de un censo de una determinada especie o de una estimación de la densidad de poblaciones puede llegar a ser realmente complicado. Esta falta de datos a la hora de diseñar un estudio de investigación obliga a los científicos a extrapolar dichos datos de unas especies a otras, lo que puede traducirse en un sesgo de los resultados y conclusiones que se obtengan. Por último, la mayoría de especies son difíciles de capturar y manejar, lo que dificulta una correcta recogida de muestras y el establecimiento de un protocolo completo, sistemático y rutinario. Además, son animales fácilmente estresables, y el estrés provocado por el manejo puede causar ciertas alteraciones en los parámetros hematológicos y bioquímicos dificultando aún más los estudios y falseando los resultados obtenidos (Jones *et al.*, 2008).

En este aspecto, el mantenimiento de especies amenazadas en núcleos zoológicos, como por ejemplo centros de cría en cautividad de especies amenazadas o de educación ambiental, así como zoológicos, parece ser una gran ventaja, ofreciendo un acceso mucho más sencillo a toda esa información. No obstante, a la hora de realizar estudios sobre ciertas patologías, es importante recordar que el mantenimiento en cautividad de un animal va a influir en numerosos factores, como, por ejemplo, la dieta, el comportamiento o el nivel de estrés (Giambelluca *et al.*, 2017). A pesar de ello, en la actualidad la mayoría de sistemas de vigilancia de fauna silvestre en España se encuentran ligados a la detección de patógenos en animales ingresados o criados en centros de recuperación y otros núcleos zoológicos, animales marcados en el campo, presas de caza y/o cadáveres localizados en el medio natural.

1.3.3. *Salmonella* en aves silvestres

Como ya se ha comentado, las aves pueden portar de manera natural *Salmonella* en el intestino, siendo portadores de la misma y, por tanto, origen de numerosos brotes de salmonelosis. De igual manera se ha confirmado la presencia de *Salmonella* en el tracto intestinal de las aves silvestres, las cuales, por lo general, portan la bacteria de forma asintomática. En los últimos años, se han realizado estudios en diferentes regiones del mundo y diferentes especies de aves, observando diferentes prevalencias de la bacteria. En la península Ibérica se han publicado algunos artículos en los que se muestra la prevalencia de *Salmonella* en diferentes aves silvestres, principalmente aves rapaces. En la mayoría de ellos, *Salmonella* se ha detectado en bajas proporciones en los individuos de águila de Bonelli examinados, aunque la mayoría de estos estudios eran multi-especie y contaban con un número bajo de individuos de cada una de ellas (Reche *et al.*, 2003; Millán *et al.*, 2004; Molina-López *et al.*, 2015; Jurado-Tarifa *et al.*, 2016). No obstante, los estudios dirigidos a especies diana muestran prevalencias mayores, como la observada en buitre leonado (*Gyps fulvus*) que supera el 52% (Marin *et al.*, 2014). En las aves urbanas, la prevalencia también varía en función de la especie, la época del año, las condiciones climáticas, etc. Los estudios publicados muestran una tasa de *Salmonella* entre 0% y 50%, siendo las aves más afectadas los passeriformes, las gaviotas y las cigüeñas (Ramos *et al.*, 2010; Mather *et al.*, 2016).

Es importante tener en cuenta que la excreción de *Salmonella* generalmente es intermitente, por lo que lo ideal para realizar estudios de prevalencia es la recogida seriada de heces lo más frescas posible (Ivanek *et al.*, 2012). No obstante, el acceso y manejo de estos individuos es realmente complicado, por lo que la mayoría de estudios se pueden clasificar en dos tipos: estudios de campo, en los que se recogen heces del nido o hisopo cloacal del individuo, y estudios en centros de recuperación (Millán *et al.*, 2004; Marin *et al.*, 2014; Krawiec *et al.*, 2015). Dentro de este segundo grupo, en función del funcionamiento del centro y de los objetivos, podemos encontrar estudios en los que se recogen heces durante tres días, heces del primer día o hisopo cloacal en el momento del ingreso. Por tanto, según la metodología empleada se puede considerar que la prevalencia de *Salmonella* pudiera estar subestimada.

A fin de obtener la mayor información posible y encontrar las relaciones existentes entre los diferentes factores, es imprescindible el estudio de las serovariedades implicadas, teniendo en cuenta que no todas ellas tienen carácter zoonótico demostrado. En general los serotipos más aislados en los estudios realizados en fauna silvestre en la península Ibérica son Typhimurium y Enteritidis, ambos con fuerte carácter zoonótico, aunque también se han aislado en menor

proporción serotipos como Infantis, Indiana, Houston o Cerro, entre otros (Molina-Lopez *et al.*, 2011:2015; Marin *et al.*, 2014:2018).

Por tanto, es importante tener en cuenta la gran capacidad de diseminación de *Salmonella* de estas aves de vida libre por todo el territorio que ocupan, así como a través de las rutas de migración en caso de ser aves migratorias. De esta manera pueden contaminar granjas de producción animal, tierras de cultivo, parques, etc. En un estudio realizado en 2018, en Australia, se detectó que el 81% de las cepas de *Salmonella* aisladas en gatos compartían serotipo con las aisladas en aves silvestres, infectándose éstos a través de la caza (Simpson *et al.*, 2018).

Por otro lado, aunque poco se sabe del rol de la fauna silvestre en la epidemiología de las resistencias a antimicrobianos, las aves silvestres deben ser consideradas y estudiadas en profundidad en este aspecto, dada la capacidad de diseminación de microorganismos que presentan (Palmgren, 2002). Numerosas publicaciones recientes ponen en evidencia el aumento en la detección de resistencias a antimicrobianos en enterobacterias aisladas en fauna silvestre en todo el mundo, hallándose cepas multirresistentes de *Salmonella* en milano real, buitre leonado, águila real (*Aquila chrysaetos*), ratonero (*Buteo buteo*), cernícalo vulgar (*Falco tinnunculus*), lechuza (*Tyto alba*), autillo (*Asio otus*) y mochuelo (*Athene noctua*). Fuera del grupo de las rapaces, también se han detectado cepas multirresistentes en abubilla (*Upupa epops*), gaviota plateada (*Chroicocephalus novaehollandiae*), gaviota reidora, paloma bravía (*Columba livia f. domestica*), cuervo (*Corvus corax*), y cornejas (*Corvus frugilegus*). En cambio, un estudio realizado en 2015 por Mather *et al.* (2016), en Reino Unido, no detectó ninguna resistencia a antimicrobianos en las cepas de *Salmonella* aisladas de paseriformes, lo que coincide con los resultados publicados posteriormente por Troxler *et al.* (2017). En líneas generales, los antimicrobianos con mayor tasa de resistencia son la ampicilina, amoxicilina, tetraciclinas y sulfonamidas, observando una sensibilidad mayor frente a quinolonas y cefalosporinas de tercera y cuarta generación, aunque también se han detectado resistencias frente a estos antibióticos (Molina-López *et al.*, 2011:2015; Botti *et al.*, 2013; Janecko *et al.*, 2015; Blanco, 2015; Dolejska *et al.*, 2016; Troxler *et al.*, 2017). Finalmente, también se han notificado cepas de *Salmonella* resistente a colistina y aisladas de fauna silvestre, entre otros, en buitre leonado y abubilla (Molina-López *et al.*, 2015).

1.4. Justificación de la tesis

El género *Salmonella* comprende más de 2.500 serotipos diferentes los cuales pueden llegar a causar enfermedad en el ser humano, siendo además muchos de ellos zoonóticos. Se trata de la segunda zoonosis de origen alimentario más diagnosticada en la Unión Europea, teniendo además un alto impacto socio-económico (EFSA, 2019). Es capaz de colonizar el intestino de numerosas especies de animales homeotermos, suponiendo por tanto un riesgo también para los animales, especialmente las aves y los cerdos de producción, donde de manera rutinaria se realizan controles sanitarios en busca de *Salmonella* y otras bacterias. La puesta en marcha de medidas como ésta ha conseguido que año tras año se observe una tendencia a la baja en el número de casos declarados en la Unión Europea (EFSA, 2019).

Por otro lado, las resistencias a antimicrobianos se han convertido en una grave amenaza para la salud pública en los últimos años, y se estima que se convertirán en la primera causa de muerte a nivel mundial en apenas 30 años (O'Neil, 2014). La rápida expansión de estas resistencias a través de múltiples vías se ha visto facilitada por el uso indiscriminado de los antibióticos y la globalización del siglo XXI, entre otros factores (Muñoz, 2017). En la actualidad, numerosos estudios confirman la detección de cepas bacterianas multirresistentes, e incluso panresistentes, que ponen en grave peligro la salud humana, llegando en muchos casos a la muerte de las personas afectadas (Rossolini *et al.*, 2007; Lim *et al.*, 2016). Por tanto, su estudio se ha convertido en una de las principales prioridades en investigación sanitaria, siendo de gran relevancia los estudios de vigilancia realizados en personas y animales, incluyendo los animales de producción (EFSA and ECDC, 2019).

Numerosos estudios confirman el papel de la fauna silvestre como portador asintomático y agente diseminador de diferentes especies bacterianas, entre las cuales se encuentra *Salmonella*, así como de cepas resistentes a antimicrobianos (Palmgren, 2002; Jurado-Tarifa, 2016; Troxler *et al.*, 2017). La urbanización de los ecosistemas y el aumento del ecoturismo han propiciado en las últimas décadas una mayor interacción entre el ser humano, el medio ambiente y la fauna silvestre, siendo posible un intercambio eficaz de microorganismos y resistencias a antimicrobianos entre ambos sectores. Sin embargo, apenas existen publicaciones sobre estos temas en fauna silvestre, estando la mayoría de ellos asociados a casos clínicos o centros de recuperación (Millán *et al.*, 2004; Molina-López *et al.*, 2011:2015). Los ecosistemas pueden definirse como un fuerte indicador del estatus sanitario de una región, por lo que, en consecuencia, debe ser estudiado en profundidad a fin de obtener un sistema de alerta temprana en multitud de campos, como puede ser la epidemiología de *Salmonella* o la

diseminación de resistencias a antimicrobianos (Zhao *et al.*, 2019). No obstante, es importante tener en cuenta todas las limitaciones que pueden aparecer durante el diseño y la ejecución de un estudio en fauna silvestre, incluyendo el manejo de los animales y la demora en el procesado de las muestras (Becker *et al.*, 2019). Por tanto, es necesario un sistema que permita un mayor margen de tiempo desde la recogida de las muestras hasta su análisis en el laboratorio.

En este sentido, esta tesis pretende arrojar un poco de luz sobre la presencia de *Salmonella* y resistencias a antimicrobianos en aves rapaces, no vinculadas a la actividad humana, tomando como modelo al águila de Bonelli, y aves urbanas, cuya interacción con las personas es prácticamente constante.

2. Objetivos

El objetivo general de esta tesis es conocer la epidemiología de *Salmonella* en diferentes especies de aves de la fauna silvestre ibérica, así como la detección de resistencias a antimicrobianos que ésta pueda portar.

Para ello, se han desarrollado los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar la presencia de *Salmonella* y de las AMR asociadas a ella en individuos jóvenes de águila de Bonelli nacidos en libertad en la Comunidad Valenciana, y definir el tipo de muestra más adecuado para la detección de *Salmonella*.
2. Estudiar la viabilidad de *Salmonella* en muestras cloacales recogidas en individuos silvestres de difícil acceso, usando como modelo el águila de Bonelli, y comparando el empleo de medio FBP enriquecido con carbón activo en congelación frente al uso de medio Cary Blair en refrigeración.
3. Investigar la presencia de *Salmonella* y las AMR asociadas a ella individuos de cinco especies diferentes de aves urbanas.

A fin de completar todos los objetivos establecidos, se han desarrollado tres estudios experimentales diferentes:

1. Estudio de *Salmonella* y las resistencias a antimicrobianos asociadas en una población de águila de Bonelli (*Aquila fasciata*) de la Comunidad Valenciana.
2. Estudio comparativo de muestras cloacales conservadas de águila de Bonelli recogidas en lugares de difícil acceso: congelación vs refrigeración.
3. Estudio de *Salmonella* y las resistencias a antimicrobianos asociadas en cinco especies diferentes de aves silvestres ligadas a ambientes urbanos.

3. Metodología

3.1. Estudio de *Salmonella* y las resistencias a antimicrobianos asociadas en aves rapaces autóctonas de la península Ibérica, utilizando como modelo el águila de Bonelli o águila perdicera (*Aquila fasciata*)

A fin de mejorar los programas de conservación de la especie, la Consejería de Medio Ambiente de la Generalitat Valenciana otorgó los permisos necesarios para la recogida de muestras. Todos los animales fueron manejados siguiendo las directrices de la directiva europea 2010/63/EU sobre bienestar animal (European Union, 2010).

3.1.1. Especie y área de estudio

Durante las temporadas de cría de 2015 y 2016 se recogieron muestras de águila de Bonelli nacidas y criadas en diferentes nidos, todos ellos localizados en la Comunidad Valenciana, aprovechando el anillamiento de los pollos que realiza el ministerio anualmente. El periodo de recogida de muestras fue de marzo a mayo, ambos meses inclusive, de ambos años. Todos los animales incluidos en el estudio fueron pollos criados en libertas de águila de Bonelli y revisados en su correspondiente nido (durante el estudio, cada nido fue revisado únicamente una vez). De cada uno de ellos se anotó la información referente a la edad, sexo, número de pollos por nido y localización del nido. La edad se determinó en base al desarrollo de las plumas, así como al cálculo aproximado de edad en días basado en el seguimiento observacional que realizan los Agentes Forestales sobre los nidos. El sexo se determinó mediante análisis genético enviando una muestra de sangre al Laboratorio Central de Veterinaria (LCV) (Ministerio de Agricultura y Medio Ambiente, Algete, Madrid) (Griffiths *et al.*, 1998).

3.1.2. Recogida de muestras cloacales y heces

Para recoger las muestras fue necesaria la colaboración de un equipo coordinado de Agentes Forestales escaladores dada la altura a la que se encontraban. Al llegar al nido introducían las crías en las mochilas correspondientes para bajarlos a tierra firme, donde el equipo veterinario realizó un examen completo del estado del animal antes de recoger las muestras y colocar las anillas pertinentes (Figura 19).

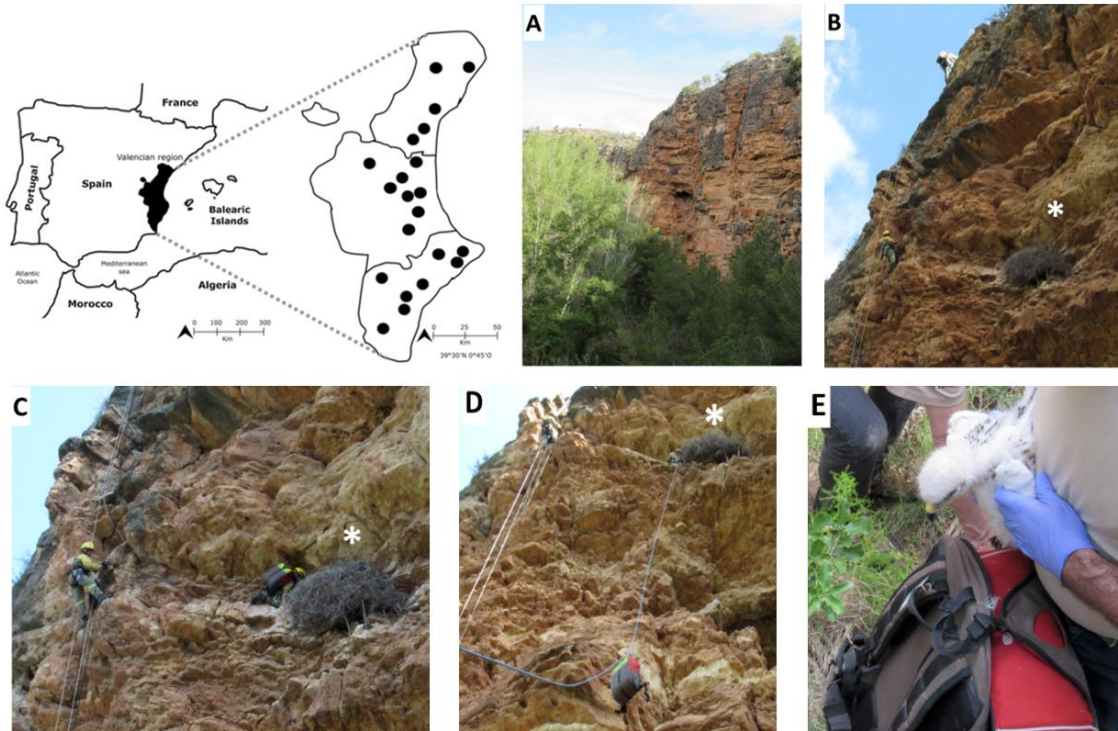


Figura 19. Mapa del área de estudio en el que se indican los nidos de águila de Bonelli de las provincias de Castellón, Valencia y Alicante incluidos en el estudio. En las imágenes que acompañan se puede ver todo el proceso desde el avistamiento del nido (Imagen A) hasta que el individuo es examinado por los veterinarios (Imagen E). El asterisco indica donde se encuentra el nido en cada imagen. Fuente: Martín-Maldonado *et al.*, 2019.

De cada uno de los individuos incluidos en este estudio se recogió un hisopo cloacal, introducido aproximadamente 1 cm en la cloaca, el cual fue conservado en medio de transporte Cary-Blair (DELTALAB, Barcelona) (Figura 20). Además, se recogió una muestra de heces del nido, lo más frescas posible, siempre que fue posible. Todas las muestras fueron transportadas en refrigeración en cajas isotermas al laboratorio, donde se procesaron en las siguientes 24 horas.



Figura 20. Recogida de hisopo cloacal en un pollo de águila de Bonelli. Fuente: Martín-Maldonado et al., 2019.

3.1.3. Aislamiento e identificación de *Salmonella*

En el laboratorio, el aislamiento de *Salmonella* se realizó siguiendo las recomendaciones de la norma ISO 6579:2002 (Anexo D). Primero se pre-enriqueció la muestra introduciendo el hisopo o una muestra de las heces en un tubo con agua de peptona tamponada al 2,5% (Scharlau, Barcelona), en una proporción 1:10 vol/vol. Dicho tubo se incubó a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 18 ± 2 horas. Pasado ese tiempo, de cada muestra pre-enriquecida, se inocularon $100\ \mu\text{L}$ en tres gotas equidistantes en una placa de MSR/V (Difco, Valencia), el cual se incubó a $41,5\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24-48 horas. De las placas que presentaron crecimiento compatible con *Salmonella*, se recogió una muestra que se inoculó en dos medios de agar específicos para la detección de *Salmonella*: XLD (Liofilchem, Valencia) y ASAP (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France). Ambas placas fueron incubadas de nuevo a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24-48 horas, y de las placas positivas se recogió una única colonia compatible con *Salmonella* al azar que fue sembrada en un medio nutritivo general e incubada a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas (Figura 21). A partir del crecimiento obtenido se realizó un test bioquímico para confirmar el género *Salmonella* mediante el uso de tiras API-20E (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France), y se recogió un criovial que fue conservado a -80°C con el que poder trabajar posteriormente. En la figura 21 se pueden observar los crecimientos compatibles con *Salmonella* en los diferentes medios empleados.

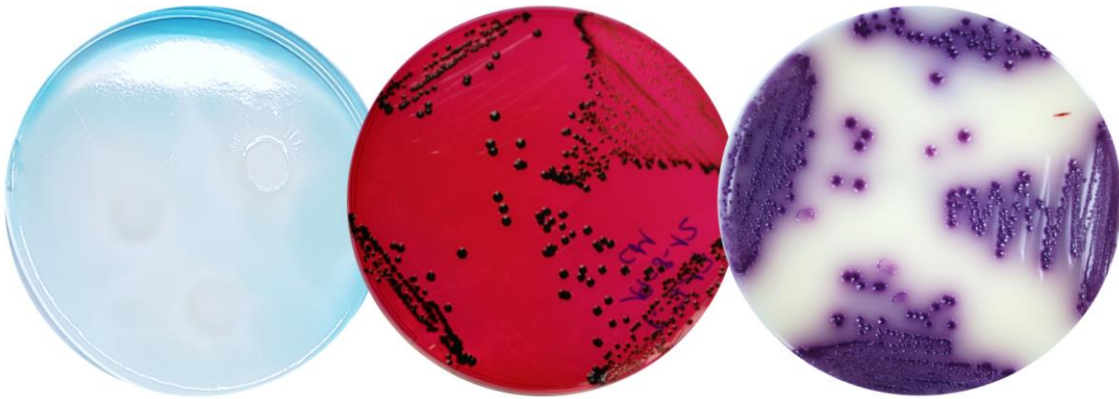


Figura 21. Crecimiento compatible con *Salmonella* en MSR, XLD y ASAP (de izquierda a derecha). Fuente: collage de elaboración propia con imágenes cedidas por la Dra. Clara Marín Orenga.

El serotipado de cada una de las cepas aisladas fue realizado en el Centro de Calidad Avícola de la Comunidad Valenciana (CECAV) mediante el uso de antisueros específicos y siguiendo el esquema de Le Minor-Kauffmann-White (Grimont y Weill, 2007).

3.1.4. Test de susceptibilidad a antimicrobianos

También se realizó un test de susceptibilidad a antimicrobianos de cada una de las cepas aisladas, siguiendo las recomendaciones del Comité Europeo de Test de Susceptibilidad a Antimicrobianos (EUCAST: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) (Matuschek *et al.*, 2014). Se procesó una cepa de *Salmonella* de cada nido o pollo positivo a *Salmonella*, empleando la técnica de difusión disco-placa basado en el método Kirby-Bauer (Matuschek *et al.*, 2014) y siguiendo las recomendaciones en cuanto concentraciones de antimicrobianos dadas por EUCAST. Cada cepa de *Salmonella* fue sembrada por toda la superficie de una placa de Mueller-Hinton sobre la que se colocaron los discos impregnados con los diferentes antimicrobianos, la cual fue incubada a 37°C durante 24 horas (Figura 22). La elección de antimicrobianos se basó en la decisión europea 2013/653 (European Union, 2013), incluyendo dos quinolonas: ciprofloxacino (CIP, 5µg) y ácido nalidíxico (NA, 30µg); tres beta-lactámicos: ampicilina (AMP, 10µg), cefotaxime (CTX, 30µg) y ceftazidime (CAZ, 30µg); un fenicol: cloranfenicol (C, 5µg); una sulfonamida: trimetoprim-sulfametoxazol (SXT, 1,25/23,75µg); una polimixina: colistina (COL, 10µg); un macrólido: azitromicina (AZM, 15µg); una glicilglicina: tigeciclina (TGC, 15µg); un aminoglucósido: gentamicina (GN, 10µg); y una pirimidina: trimetoprim (TM, 5µg). Se consideró una cepa multirresistente (MDR) cuando

presentaba resistencia frente a dos o más familias diferentes de antimicrobianos. La fuente utilizada para la interpretación de los resultados fue: http://www.eucast.org/clinincal_breakpoint/.

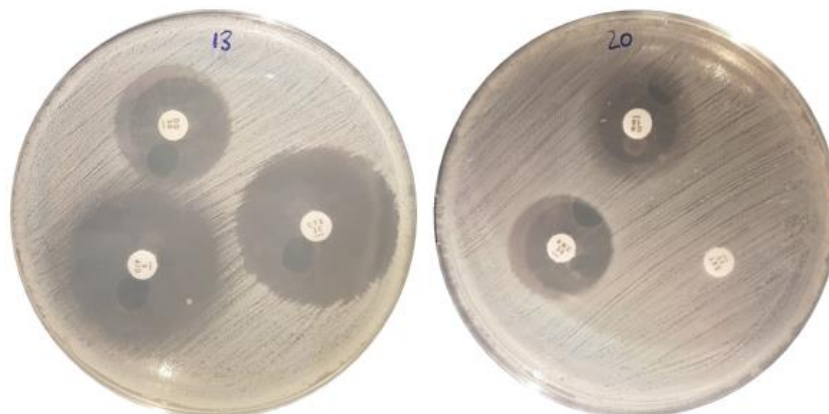


Figura 22. Test de susceptibilidad a antimicrobianos por difusión disco-placa de dos cepas bacterianas diferentes. Fuente: imagen propia.

3.1.5. Análisis estadístico

Se analizó la relación entre la presencia de la bacteria y la diana de muestreo (pollo o nido), para lo cual se realizó un modelo lineal generalizado (GLM: *General Linear Model*). También se estudió la relación entre la presencia de bacteria y el tipo de muestra analizada (hisopo cloacal o heces), sexo (hembra o macho), edad (35-40, 41-45 o >45 días) y la provincia (Castellón, Valencia o Alicante). Para estos análisis se definió una distribución binomial y se utilizó una función de enlace probit. Se asignaron datos binomiales a cada muestra de manera que 1 representaba una muestra positiva a *Salmonella*, mientras que 0 representaba una negativa. Además, se estudió la posible relación entre la presencia de la bacteria en la muestra y el número de pollos en cada nido, usando de nuevo un GLM. Para ello se consideró la presencia de *Salmonella* como la variable respuesta y el número de pollos (1 o más de 1) como la variable fija. Para todos los análisis, un valor de p inferior a 0,05 fue considerado como indicador de diferencias estadísticamente significativas en la variable estudiada. Los análisis fueron realizados con una aplicación de software comercial (paquete software SPSS 21.0, SPSS Inc, Chicago, IL, 2002).

3.2. Estudio comparativo de muestras cloacales conservadas de águila de Bonelli (*Aquila fasciata*) recogidas en lugares de difícil acceso para la detección de *Salmonella* spp.: congelación vs refrigeración

3.2.1. Especie y área de estudio

Durante las temporadas de cría de 2017 y 2018, se recogieron muestras de águila de Bonelli nacidas y criadas en diferentes nidos localizados en Andalucía, así como de las criadas en cautividad dentro de los proyectos Life Bonelli y Aquila a-Life. En el caso de las nacidas en libertad, el acceso a los nidos fue coordinado entre los veterinarios del Grupo de Rehabilitación de la Fauna Autóctona y su Hábitat (GREFA) y varios equipos de agentes forestales escaladores de la región, dentro de las acciones incluidas en los proyectos Life Bonelli (2017) y Aquila a-Life (2018). Una vez llegados al nido, los escaladores descendieron los pollos introduciéndolos en mochilas para poder realizar un examen veterinario completo a cada uno de ellos, recoger las muestras necesarias y marcar cada pollo con las anillas pertinentes y un emisor GPS o GSM. Entre las muestras recogidas, se incluyeron muestras de sangre para análisis completos, a fin de confirmar el estatus sanitario de cada individuo, además de las muestras necesarias para la realización de este estudio. El estudio fue llevado a cabo en colaboración con la Junta de Andalucía y siguiendo siempre las recomendaciones sobre bienestar animal de la directiva europea 2010/63/EU (Unión Europea 2010). En el caso de las águilas nacidas en cautividad, se esperó a que tuvieran una edad aproximada a los 45 días, momento en el que alcanzan el tamaño adulto, para aprovechar el manejo y realizar una revisión veterinaria completa, recoger la muestra necesaria para nuestro estudio y colocar el emisor GPS o GSM junto con las anillas (Figura 23).



Figura 23. Revisión veterinaria de las águilas criadas en cautividad. Fuente: imágenes de GREFA.

Además de las muestras indicadas anteriormente, de cada individuo se anotó la edad, sexo, número de pollos por nido y localización del nido. La edad se determinó en base al desarrollo de las plumas, así como al cálculo aproximado de edad en días basado en el seguimiento observacional que realizan los agentes forestales sobre los nidos, y se definieron dos categorías diferentes (Figura 24):

- ✓ Pollo/Cría (0-55 días): el cuerpo está completamente cubierto por plumón que poco a poco se desprende, a la vez que se desarrollan las plumas de vuelo. En esta etapa el individuo es alimentado por los padres.
- ✓ Volantón (55-65 días): apenas queda plumón en la cabeza, y las plumas de vuelo están prácticamente desarrolladas en su totalidad. El individuo se alimenta por su cuenta de las presas que son facilitadas por los padres. Al final de esta etapa comienzan a realizar vuelos cortos cerca del nido.



Figura 24. Diferencias entre un pollo/cría alimentado por un parental (izquierda) y un volantón (derecha) de águila de Bonelli. Fuente: proyecto Life Bonelli (GREFA).

3.2.2. Recogida y conservación de muestras cloacales

Para la detección de *Salmonella* se recogieron dos hisopos cloacales de cada uno de los individuos incluidos en este estudio (libertad y cautividad), que se introdujeron en la cloaca aproximadamente 1 cm. Una vez recogidas las muestras se conservaron siguiendo dos protocolos de conservación. Por un lado, se conservaron en un medio FBP enriquecido con carbón activo, desde su recogida hasta su análisis tres meses después (Gorman y Adley, 2004) (Tabla 3).

Por otro, las muestras recogidas se conservaron en un medio de transporte Cary Blair (DELTALAB, Barcelona) en refrigeración desde su recogida hasta su procesado en el laboratorio. En este caso, las muestras se procesaron a su llegada al laboratorio, en un máximo de 72 horas desde su recogida.

Tabla 3. Fórmula empleada para 500 ml de medio de transporte FBP con carbón activado

	Referencia comercial	Cantidad
Caldo nutriente nº2	Oxoid® CM67	12,50 g
Agar bacteriológico	Difco® 214010	0,60 g
Glicerol	Panreac	75 mL
Extracto de levadura	Difco® 212750	0,5 g
Carbón activado	Oxoid®	2,5 g
Suplemento crecimiento para <i>Campylobacter</i>	Oxoid® SR 0084	2 mL
Agua destilada	-	425 mL

g: gramos; mL: mililitros

3.2.3. Aislamiento e identificación de *Salmonella*

En el caso de las muestras congeladas, estas se descongelaron previamente a su siembra dejándolas en refrigeración 5 horas antes de su análisis. Posteriormente, se homogenizaron y el aislamiento de la bacteria se realizó siguiendo las indicaciones de la norma ISO 6579:2002 (Anexo D), descrita anteriormente. La misma norma se utilizó para el análisis de las muestras conservadas en refrigeración.

3.3. Estudio de *Salmonella* y las resistencias a antimicrobianos asociadas en aves urbanas de la Comunidad de Madrid

3.3.1. Población de estudio y recogida de muestras

Para lograr el objetivo de este estudio se recogieron muestras de cinco especies diferentes de aves urbanas de la Comunidad de Madrid durante su primer examen tras su ingreso en el hospital de fauna silvestre de GREFA, siguiendo siempre las normas sobre bienestar animal descritas en el Real Decreto 53/2013 (BOE, 2013). Las especies incluidas en el estudio fueron: cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*), gaviota sombría (*Larus fuscus*), paloma torcaz (*Columba palumbus*), estornino negro (*Sturnus unicolor*) y gorrión común (*Passer domesticus*). La recogida de muestras se realizó entre junio de 2018 y enero de 2019. El ingreso de los individuos en el hospital fue debido a diferentes causas: caída del nido, traumatismos y otras causas como botulismo, en el caso de las gaviotas, impactación de molleja por ingesta de cuerpos extraños, en el caso de las cigüeñas, o quedar atrapados en edificios. Todos los animales fueron identificados y clasificados por edad en jóvenes (incluyendo pollos y volantones) o adultos. Además, se recogió información sobre el ambiente en el que se encontraban antes de llegar al hospital, existiendo dos principales ambientes: rural y urbano. En el caso de las gaviotas, el ambiente urbano estaba siempre asociado a la alimentación en vertederos. En las cigüeñas se consideraron los vertederos como un tercer tipo de ambiente.

Tras el registro de toda la información, se realizó un examen veterinario completo de cada animal, anotando todos los signos clínicos observados en caso de haberlos. Cuando fue necesario se realizaron pruebas de diagnóstico complementarias como hematologías, bioquímicas, radiografía y ecografía. Por último, antes de administrar ningún fármaco, se recogió un hisopo cloacal, el cual se conservó en medio Cary Blair a 4°C hasta su procesado en el laboratorio de GREFA (Figura 25).



Figura 25. Recogida de hisopos cloacales en cigüeña blanca y paloma torcaz. Fuente: imágenes de GREFA.

3.3.2. Aislamiento e identificación de *Salmonella*

Todas las muestras fueron analizadas de acuerdo con la norma ISO 6579-1:2017 (Anexo D), la cual se detalla en el apartado de “Metodología”. Las cepas de *Salmonella* fueron enviadas al Laboratorio Nacional de Referencia para Salmonelosis Animal (LCV, Algete), donde se determinó el serotipo de cada una de ellas mediante aglutinación antigénica con antisueros específicos siguiendo el esquema Le Minor-White-Kauffman (Grimont y Weill, 2007).

3.3.3. Test de susceptibilidad a antimicrobianos

Por último, se realizó un test de susceptibilidad a antimicrobianos a todas las cepas aisladas en el Laboratorio Nacional de Referencia para Salmonelosis Animal (Laboratorio Central de Veterinaria, Algete), utilizando el método de microdilución en caldo Mueller-Hinton y siguiendo las recomendaciones de la norma ISO 20776-1:2006 para determinar la CMI. De acuerdo con la decisión europea 2013/652/EU (European Union, 2013), se analizó la susceptibilidad a un total de 14 antimicrobianos de diferentes familias, incluyendo dos quinolonas: ciprofloxacino (CIP) y ácido nalidíxico (NA); cuatro beta-lactámicos: ampicilina (AMP), cefoxitina (FOX), ceftazidime (CAZ) y meropenem (MEM); un fenicol: cloranfenicol (CHL); una sulfonamida: sulfametoxazol (RL); una polimixina: colistina (COL); un macrólido: azitromicina (AZM); una glicilciclina: tigeciclina (TGC); un aminoglucósido: gentamicina (GN); una pirimidina: trimetoprim (W); y una

tetraciclina; tetraciclina (TCY). Los resultados obtenidos clasificaron cada una de las cepas en sensible, intermedia y resistente a cada uno de los antimicrobianos incluidos en el test, en base a los puntos de corte epidemiológicos recomendados por EUCAST (Leclercq *et al.*, 2013). Al no tener punto de corte definido, los resultados de azitromicina y sulfametoxazol no pudieron ser interpretados. Se consideró una cepa multirresistente en caso de mostrar resistencia al menos a un antimicrobiano de dos o más familias diferentes.

3.3.4. Análisis estadístico

Todos los resultados fueron analizados estadísticamente con una aplicación de software comercial (SPSS 21.0 software package; SPSS Inc., Chicago, IL, 2002). Se realizó un modelo lineal generalizado (GLM) para estudiar la relación entre la presencia de *Salmonella* y las características de los individuos incluidos en el estudio (especie animal, edad, patología primaria y ambiente). También se realizó un test de chi-cuadrado para estudiar la relación entre *Salmonella* y las resistencias halladas. Finalmente se realizó un último test de chi-cuadrado para estudiar la relación entre los serovares aislados y el origen de las aves urbanas. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuando el valor p fue igual o inferior a 0.05 ($p \leq 0.05$).

4. Resultados

4.1. Estudio de *Salmonella* y las resistencias a antimicrobianos asociadas en aves rapaces autóctonas de la península Ibérica, utilizando como modelo el águila de Bonelli o águila perdicera (*Aquila fasciata*)

4.1.1. Resumen

Numerosos estudios confirman la implicación de las aves silvestres en la diseminación de enterobacterias patógenas en el medio ambiente. El objetivo de este estudio fue estudiar la presencia de *Salmonella* en volantones de águila de Bonelli nacidos en libertad en la Comunidad Valenciana, y detectar las resistencias a antimicrobianos que las cepas aisladas pudieran portar. Además, se comparó la eficacia de dos muestras diferentes para la detección de *Salmonella* mediante cultivo bacteriano: heces frescas recogidas del nido frente a hisopos cloacales recogidos de cada volantón. En total se analizaron 28 nidos y 45 volantones. En los nidos, la prevalencia de *Salmonella* fue de $61 \pm 9,2\%$, mientras que en los volantones la prevalencia de la bacteria fue de $36 \pm 7,1\%$. Entre todas las cepas aisladas se identificaron ocho serovares diferentes, siendo los más frecuentes *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Houston* y *S. Cerro*. En cuanto a las resistencias a antimicrobianos, el 36,8% de las cepas mostraron un fenotipo resistente a ampicilina, y un 5,3% frente a tigeciclina. En conclusión, este estudio demuestra el papel de los volantones de águila de Bonelli como portadores asintomáticos de *Salmonella* resistente. Además, confirma que la detección de *Salmonella* mediante cultivo es más eficaz a partir de muestras de heces frescas.

4.1.2. Referencias

Artículo científico:

Referencia bibliográfica: Martín-Maldonado, B., Montoro-Dasi, L., Pérez-Gracia, M. T., Jordá, J., Vega, S., Marco-Jiménez, F., & Marin, C. (2019). Wild Bonelli's eagles (*Aquila fasciata*) as carrier of antimicrobial resistant *Salmonella* and *Campylobacter* in Eastern Spain. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 67, 101372.

Índice de Impacto de la revista: 1.573 en JCR en 2019 en Veterinary Science

Posición de la revista: Q2 en JCR en 2019 en Veterinary Science

Proceedings:

- Martín-Maldonado B.; Montoro-Dasí, L.; Jordá, J.; Vega, S.; Revuelta, L; Marin, C. "Detección de resistencias a antimicrobianos en *Salmonella* en una población de águila de Bonelli". XIII Congreso de Investigación para Estudiantes Pregraduados de Ciencias de la Salud y XVII Congreso de Ciencias Veterinarias y Biomédicas (Abril, 2018), Madrid. Comunicación oral.
- Montoro-Dasí L.; Martín-Maldonado, B.; Pérez-Gracia, M.T.; Marin, C. "¿Es posible que las águilas perdiceras sean fuente de diseminación de *Salmonella* en el medio ambiente?". 15th Congreso Internacional de Estudiantes (Abril, 2018), Valencia. Comunicación oral.



Contents lists available at ScienceDirect

Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cimid

Wild Bonelli's eagles (*Aquila fasciata*) as carrier of antimicrobial resistant *Salmonella* and *Campylobacter* in Eastern Spain

Bárbara Martín-Maldonado^{a,b}, Laura Montoro-Dasi^{c,d}, María Teresa Pérez-Gracia^c, Jaume Jordá^c, Santiago Vega^{a,c}, Francisco Marco-Jiménez^{d,1}, Clara Marin^{a,c,*}

^a GEMAS (Study Group on Wildlife Medicine and Conservation), Spain

^b Hospital Veterinario de Fauna Silvestre de GREFA. Majadahonda, Madrid, Spain

^c Instituto de Ciencias Biomédicas. Universidad Cardenal Herrera-CEU, CEU Universities, C/Tirant Lo Blanc 7, 46115, Alfara del Patriarca, Valencia, Spain

^d Instituto de Ciencia y Tecnología Animal, Universitat Politècnica de València, 46022, Valencia, Spain



ARTICLE INFO

Keywords:

Salmonella
Campylobacter
Wild birds
Eagle
Multiresistant strains
Cloacal swabs

ABSTRACT

Wild birds have repeatedly been found to be involved in the dissemination of enteric bacterial pathogens in the environment. The aim of this study was to determine the occurrence of *Salmonella* and *Campylobacter* as well as the antimicrobial resistance in wild Bonelli's eagles nestlings in Eastern Spain. In addition, we compared the efficiency of two sampling methods (fresh faecal samples from nest and cloacal swabs from nestlings) for detection of both bacteria. A total of 28 nests with 45 nestlings were analysed. In the nest, *Salmonella* occurrence was $61 \pm 9.2\%$, while *Campylobacter* occurrence was $11 \pm 5.8\%$ ($p < 0.05$). In the nestlings, *Salmonella* occurrence was $36 \pm 7.1\%$, while *Campylobacter* occurrence was $11 \pm 4.7\%$ ($p < 0.05$). Eight *Salmonella* serovars were identified, and the most frequently isolated were *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Houston*, and *S. Cerro*. Only one *Campylobacter* species was identified (*C. jejuni*). Regarding antimicrobial resistance, the *Salmonella* strains isolated were found to be most frequently resistant to ampicillin and to tigecycline; however, the sole *Campylobacter* strain recovered was multidrug resistant. In conclusion, this study demonstrated that wild Bonelli's eagles nestlings are greater carriers of *Salmonella* than of *Campylobacter*. Both *Salmonella* and *Campylobacter* isolates exhibited antimicrobial resistance. In addition, faecal samples from nests were most reliable for *Salmonella* detection, while cloacal swab from nestlings were most reliable for *Campylobacter* detection.

1. Introduction

Wild birds have been highlighted as carriers of several microorganisms and involved in their dissemination in the environment [1]. A large number of *Salmonella* spp. have been isolated from wild birds, sometimes in birds with signs, but quite often in birds without signs of disease [2]. Hence, the occurrence of *Salmonella* and *Campylobacter* in wild bird reservoirs has been well documented [1,3–9]. Thus, *Salmonella enterica* serotypes Enteritidis, Typhimurium, monophasic Typhimurium 1,4,[5],12:i:-, Newport, Derby and Arizonae among others have been recorded in psittacines, passerines, charadriiformes, pigeons, and raptors [1,6,10–14]. In addition, *Campylobacter jejuni*, *lari* and *coli* have been recorded in ducks, finches, seabirds, passerines and raptors [11,13,15,16]. Both genera of bacteria could be asymptomatic in wild birds [17,18], but for *Salmonella* when there is immunosuppression, clinical signs can vary from gastrointestinal and nonspecific signs [3] to

septicaemia, embryonic and neonatal death [19]. Outbreaks can affect large proportions of populations [20,21], that could have potential implications for conservation. Also note that several authors have indicated that less obvious infections with host adapted strains seem to have consequences on the birds' reproductive success [22–24]. Moreover, *Salmonella* and *Campylobacter* are zoonotic pathogens, with special importance in public health due to the severity of symptoms and the large host range they can affect [25–27]. Due to their migratory patterns, wild birds are could be an important source of direct or indirect contamination of raw plant food material or livestock farms [28,29].

The Bonelli's eagle (*Aquila fasciata*) is widespread a raptor, with a range extending from the Iberian Peninsula, representing 65% of Europe population. Bonelli's eagles are large birds of prey that feed on small mammals, birds and reptiles. This species have a marked decline in number since the early 1980, and is included in Annex I of the Birds Directive (79/409/CEE), considered "vulnerable" in Spain (Royal

* Corresponding author at: Facultad de Veterinaria. Universidad CEU-Cardenal Herrera, C/ Tirant Lo Blanc 7, 46115, Alfara del Patriarca, Valencia, Spain.

E-mail address: clara.marin@uchceu.es (C. Marin).

¹ These authors contributed equally.

<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.101372>

Received 2 May 2019; Received in revised form 6 October 2019; Accepted 8 October 2019
0147-9571/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Decree 439/90).

The Bonelli's eagle is considered a top avian predator in the food-chain of Mediterranean ecosystems [30–32]. This species feeds mostly on European wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and red-legged partridge (*Alectoris rufa*) playing a major dietary role [33]. However in the last decades they have suffered considerable privation of these prey species, due to game hunting and infectious diseases [33]. This condition has forced Bonelli's eagles to feed on other species like pigeons, which could carry multiresistant microorganisms, and this could lead to treatment failures in wildlife rescue centres [31].

Till now, only one study has assessed the occurrence of *Salmonella* in Bonelli's eagles [34], but to our best knowledge the occurrence of *Campylobacter* spp. has not been evaluated in this species. In this context, the aims of this study were (i) to determine the occurrence of *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. in wild Bonelli's eagles nestlings in Eastern Spain, (ii) to determine the best sample type for detection of *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. and (iii) to analyse the occurrence of antimicrobial resistance.

2. Materials and methods

All animals were handled according to Directive 2010/63/EU EEC for animal experiments. The Department of Infrastructure, Planning and Environment of the Valencian Regional Government granted permission to take samples, in order to improve conservation projects for endangered raptors.

2.1. Study species and study area

Sample collection was carried out during the breeding season in all Bonelli's nests registered in the Valencian Region (Eastern Spain), concomitantly with the ringing programme implemented by the Regional Ministry (Fig. 1). The sampling period was from March to May of 2015 and 2016. All animals tested for this study were wild-bred nestlings of Bonelli's eagles, tested in their corresponding nest (during this study each nest was tested only once). The age of each nestling was determined by its feather development and by the lay and incubation records, and the sex was determined by DNA analysis (Spanish Animal

Health Reference Laboratory, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Algete, Madrid) [6,35].

2.2. Collection of faecal samples

To take the samples it was necessary to descend the cliff to reach the nest (Fig. 2). If present, a pooled faecal dropping (5–10gr) was taken from the nest. In addition, two cloacal samples were collected from each nestling (Fig. 2), one for *Salmonella* spp. and another for *Campylobacter* spp. detection, using sterile cotton swabs (Cary-Blair sterile transport swabs, DELTALAB, Barcelona Spain). The swab was inserted approximately 1 cm into the cloaca to obtain the sample, and then kept in Cary-Blair transport medium. All samples were transported on ice and processed at the laboratory within 24 h after collection.

2.3. *Salmonella* isolation and identification

The detection procedure was performed according to European official method ISO 6579:2002 [36]. First, the samples were pre-enriched in buffered peptone water 2.5% (BPW, Scharlau, Barcelona, Spain), in 1:10 vol/vol proportion, and incubated at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 18 ± 2 h. The pre-enriched samples were then transferred onto a semi-solid agar medium, Rappaport Vasiliadis (MSRV, Difco, Valencia, Spain), and incubated at $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24–48 hours. For the positive plates, the colonies obtained were inoculated onto two specific agar plates for *Salmonella* spp. detection: Xylose-Lysine-Deoxycholate (XLD, Liofilchem, Valencia, Spain) and a selective chromogenic medium for detection of C8-esterase activity (ASAP, bioMérieux, Marcy l'Étoile, France). These agar plates were incubated at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24–48 hours. After incubation, suspected colonies were collected and inoculated into a pre-dried nutrient agar plate, then incubated at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24 h. Finally, biochemical test was performed to confirm *Salmonella* spp. (API-20, bioMérieux, Marcy l'Étoile, France). *Salmonella* strains isolated were serotyped at the Centre of Poultry Quality and Food Nutrition of the Valencia Region (CECAV), using the Kauffman-White-Le Minor technique [37].

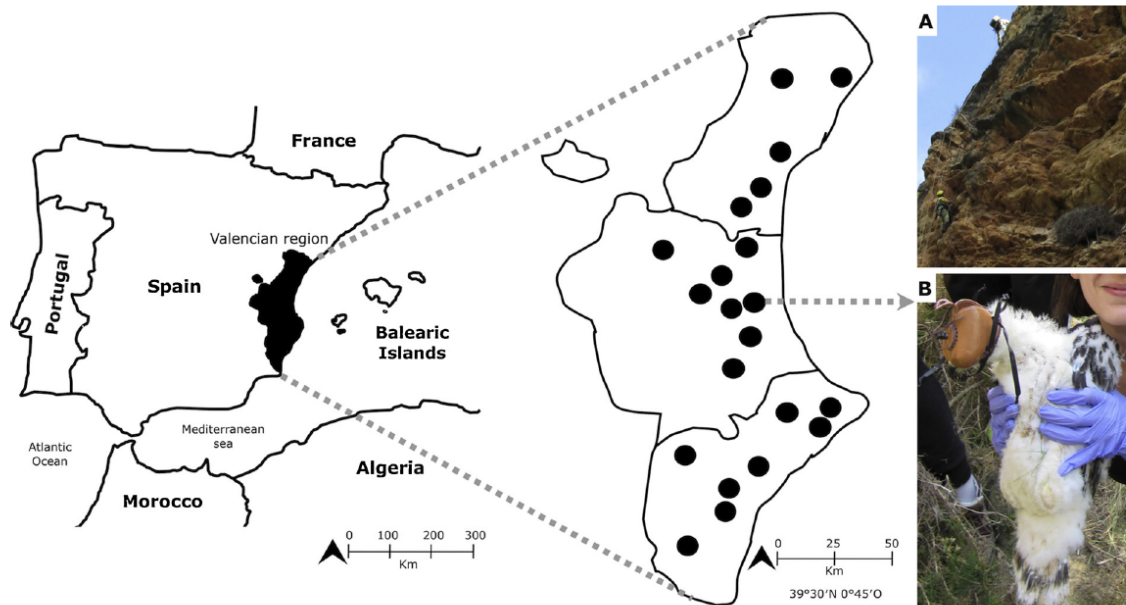


Fig. 1. Map of the study area showing the location of the sampled breeding colonies within the distribution range of Bonelli's eagles (*Aquila fasciata*) in Castellón, Valencia and Alicante provinces, Eastern Spain. Sampling location are represented as black circles. Details of a nest and nestling sampled.

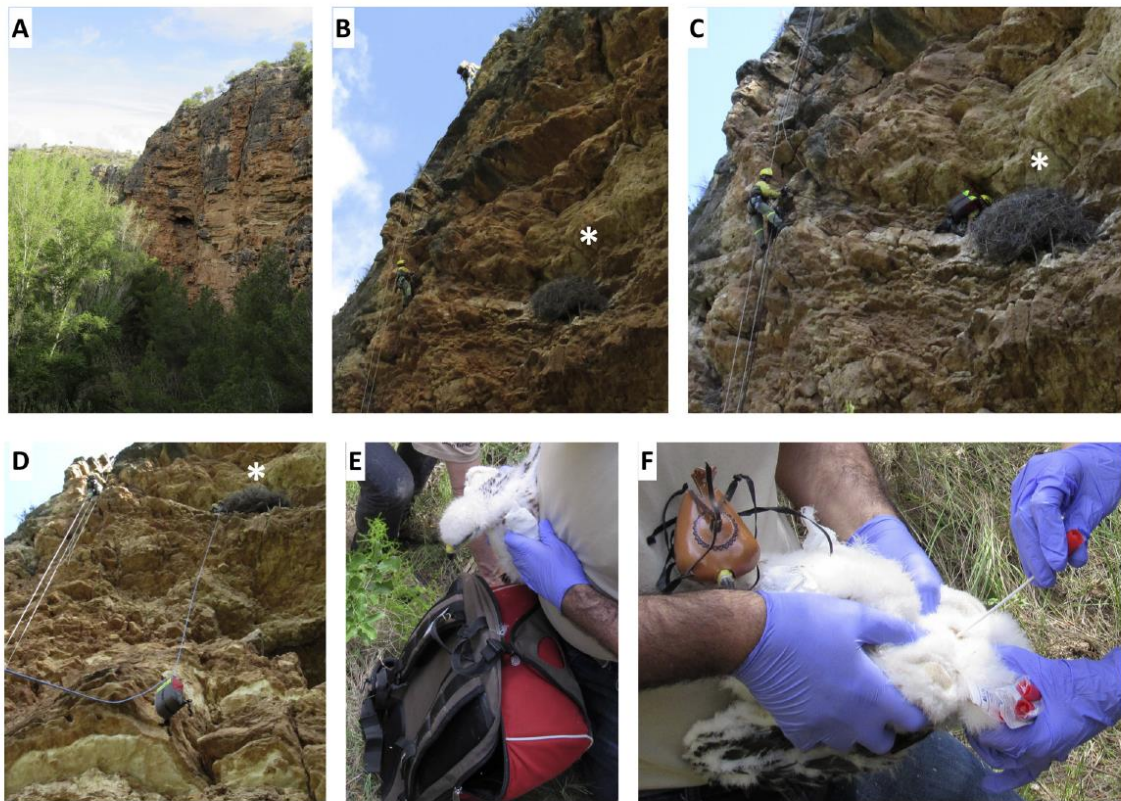


Fig. 2. Representation of the sampling. (A) Cliff example where the Bonelli's eagles (*Aquila fasciata*) usually nests in Spain. (B, C and D) Cliff descent of the Regional Ministry staff for the collection of samples. The nest is represented by a white star. (E) Nestlings recovery after the descent. (F) Cloacal swab sample collected from the nestling recovery.

2.4. *Campylobacter* isolation and identification

Bacteriological culture was performed based on the European official method ISO 10272-1:2006 for *Campylobacter* spp. [38]. All samples were analysed by direct culture, and the pre-enriched sample was plated if the direct culture was negative. Cloacal swabs were directly streaked onto two selective agar mediums: modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar (mCCDA, AES laboratories, Bruz Cedex, France) and Preston Agar (AES laboratories, Bruz Cedex, France). Both were incubated at $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$ for 44 ± 4 h in a microaerobic atmosphere. For the pre-enriched, the original sample was pre-enriched in Bolton Broth (OXOID, Dardilly, France) in 1:10 vol/vol proportion, and was incubated at $37 \pm 1^\circ\text{C}$. After 5 h of incubation, sample was incubated at $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$ for 43 ± 1 h. Then, if the direct culture was negative, 10 μL of mixing were cultured on the same two selective agar plates (mCCDA and Preston agar) and incubated as reported above ($41.5 \pm 1^\circ\text{C}$ for 44 ± 4 h). Characteristic *Campylobacter* spp. colonies were purified on blood agar and identified to species level with the standard procedure: hippurate hydrolysis test.

2.5. Antimicrobial agent susceptibility testing

Antimicrobial susceptibility was tested according the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) guidelines [39]. The source for zone diameters used for interpretation of the test was: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/. One *Campylobacter* and one *Salmonella* strain per positive nestling/nest was tested. Each strain was tested for antibiotic susceptibility using the Kirby–Bauer disk diffusion method [39], and following the antimicrobial concentrations recommended by the European Committee on

Antimicrobial Susceptibility Testing. *Salmonella* strains were streaked onto Mueller-Hinton agar to form a bacterial lawn and plates were incubated at 37°C for 24 h. *Campylobacter* strains were streaked to form a bacterial lawn onto Mueller-Hinton agar supplemented with 5% defibrinated sheep blood and then incubated with antimicrobial disks at 37°C for 48 h under microaerobic conditions. The antibiotics selected were those set forth in Decision 2013/653 [40], including two quinolones: ciprofloxacin (CIP, 5 μg) and nalidixic acid (NA, 30 μg); three β -lactams: ampicillin (AMP, 10 μg), cefotaxime (CTX, 30 μg) and ceftazidime (CAZ, 30 μg); one phenicol: chloramphenicol (C, 5 μg); one potentiated sulfonamide: trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT, 1.25/23.75 μg); one polymyxin: colistin (COL, 10 μg); one macrolide: azithromycin (AZM, 15 μg); one glycylicline: tigecycline (TGC, 15 μg); one aminoglycoside: gentamycin (GN, 10 μg), and one pyrimidine: trimethoprim (TM, 5 μg). MDR was defined as acquired resistance to at least one agent in two or more antimicrobial classes [41].

2.6. Statistical analysis

We tested whether occurrence of bacterium was related to sampling point. To do so, we fitted a generalised linear model (GLM) where occurrence of *Salmonella* and *Campylobacter* was the response variable and the sampling point (nest and nestlings), sample collected (faecal samples and cloacal swabs) and their interaction, sex (female and male), age (35–40, 41–45 and > 45 days of age) and province (Valencia, Castellón and Alicante) were fixed effects. For this analysis, the error was designated as having a binomial distribution and the probit link function was used. Binomial data for each sample were assigned a 1 if *Salmonella* and *Campylobacter* was isolated or a 0 if not. In addition, we tested whether occurrence of *Salmonella* was related to the number of

nestlings per nest, using a GLM as previously. To do so, we fitted GLM where occurrence of *Salmonella* was the response variable, and number of nestlings per nest (1 or more than 1) was the fixed effect. A P value < 0.05 was considered to indicate a statistically significant difference. Analyses were carried out using a commercially available software application (SPSS 21.0 software package; SPSS Inc., Chicago, IL, 2002).

3. Results

A total of 28 Bonelli's eagle nests with 45 nestlings from the Valencia Region (Eastern Spain) were sampled (province of Valencia [n = 11], Castellón [n = 7] and Alicante [n = 10]), 11 with 1 nestling and 17 with two nestlings. Sex identification revealed that the nestlings were 20 females and 25 males and ranged between 35 and 50 days of age. Diarrhea was not observed in the Bonelli's nestlings and nest sampled. From nests, *Salmonella* was isolated in $61 \pm 9.2\%$ (17/28) of samples, while *Campylobacter* was isolated in $11 \pm 5.8\%$ (3/28) of samples ($p < 0.05$). From nestlings, *Salmonella* and *Campylobacter* were isolated in $36 \pm 7.1\%$ (16/45) and $11 \pm 4.7\%$ (5/45) of the animals sampled ($p < 0.05$), respectively. Otherwise, there were no statistical differences between the microorganism isolated and the sampling methods. For *Salmonella* detection, faecal samples were positive in $71 \pm 11.1\%$ (12/17) of samples, while $53 \pm 12.1\%$ (9/17) of the cloacal swabs showed positive results ($p > 0.05$). Nevertheless, for *Campylobacter* detection, it is important to highlight that *C. jejuni* was not isolated from faecal samples, being all positive samples isolated from cloacal swabs. Moreover, statistical differences were found between the number of nestlings present in the nest and the bacteria shedding. For *Salmonella*, $65 \pm 11.6\%$ of positive nests contained two nestlings (11/17), while $35 \pm 11.6\%$ of the positive nests had only one nestling (6/17, $p < 0.05$). In 7 of the 11 *Salmonella* positive nests, both nestlings were shedding *Salmonella* simultaneously. Likewise, in 2 of the 3 *Campylobacter* positive nests, both nestlings present were shedding *Campylobacter* simultaneously. In 1 nest, the nestlings were shedding *Salmonella* and *Campylobacter* at the same time. Moreover, no statistical differences were found on age, sex or province where they inhabit ($p > 0.05$).

Salmonella serovars isolated (n = 28) were: *S. Enteritidis* (4/28), *S. Typhimurium* (4/28), *S. Houston* (4/28), *S. Cerro* (3/28), *S. Manhattan* (1/28), *S. Carnac* (1/28), *S. Tomegbe* (1/28) and *S. Schleissheim* (1/28). From all the strains serotyped, 9 serotypes were indeterminate. Only one *Campylobacter* species (*C. jejuni*) was identified (5/5).

Regarding the antibiotic resistance patterns, 7 strains from the 19 *Salmonella* isolates were resistant to ampicillin (36.8%) and one strain was also resistant to tigecycline (5.3%). The remaining *Salmonella* strains were susceptible to all antibiotics. All the serovars isolated and their resistance patterns are described in Table 1. Of the five *Campylobacter* isolates, only one could be recovered for antimicrobial susceptibility testing. This isolate was found to be multidrug resistant with

resistance to ciprofloxacin, ampicillin, nalidixic acid, trimethoprim-sulfamethoxazole, colistin and azithromycin (Table 1).

4. Discussion

Our study assessed the presence of *Salmonella* and *Campylobacter* in wild Bonelli's eagles. To our best knowledge, this is the first study in the scientific literature to evaluate a considerable sample size to healthy wild Bonelli's eagle nestlings. Besides, due to the wide range of hosts that *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. can colonise, Bonelli's eagles can serve as a reservoir of these bacteria.

Differences between faecal samples and cloacal swabs, collected directly from the nests and nestlings, could be partly explained due to the intermittent excretion of these microorganisms in faeces and the survival period of them in the environment [42,43]. Moreover, for *Salmonella* spp. faecal samples could be contaminated not only by the nestlings, but also by other sources such as parents' faeces or remains of prey. In contrast, *Campylobacter* spp. were not isolated from faecal samples, probably due to the poor survival of these bacteria in the environment [43,44].

Salmonella spp. showed a higher percentage of positive nestlings than those obtained in previous studies carried out with different species of raptors, such as in Central Spain (prevalence of 4.2%) [34], Andalusia (prevalence of 4.6%) [11], or Catalonia and the Basque Country (Prevalence of 4.7% and 8.5%, respectively) [14,45]. This fact could be explained by several hypotheses, such as the type of raptor studied, the age of the animals sampled, the kind or number of samples collected or the climatological conditions of the area. Specifically, in Bonelli's eagles, Reche et al. [34] did not detect *Salmonella* positive samples in the seven animals examined. In addition, the percentage of *Campylobacter* spp. in Bonelli's nestlings was higher compared to the 1% obtained in the same region (Eastern Spain) in vultures [6] or the 2.3% obtained in Andalusia in different raptor species [11]. Some studies suggest a seasonality for both genera, so that *Salmonella* is more prevalent from March to August while *Campylobacter* is more prevalent from May to October [46,47].

The *Salmonella* serovars most frequently detected in this study were *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* and *S. Houston*. All of these serovars having recently been published in free-living bird studies [1,6,7,40,48], and also in domestic animals (poultry and pigs) and human outbreaks [27]. In addition, *S. Typhimurium* has been reported as a multidrug antimicrobial resistance bacteria and the most frequent serovar involved in subclinical and clinical infections in birds, such as pigeons, an important feed source for Bonelli's eagles [9,49]. Some strains isolated in this study were resistant to ampicillin and tigecycline. Resistance to ampicillin has also been described before in wild birds by other authors [10], but to the best of our knowledge there are no previous records of tigecycline resistance strains in wild raptors. Both resistances have been previously reported in pigs; specifically, the European Food Safety Authority reported in 2016 that 44.7% of ampicillin resistance and

Table 1
Antimicrobial resistance of *Salmonella* and *Campylobacter* isolates from wild Bonelli's eagles.

Species	Serovars	n	AMP	CTX	CAZ	GM	NA	CIP	CST	CAM	AZM	TGC	SXT	TMP
<i>Salmonella</i>	Enteritidis	4	2 (50%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Typhimurium	4	2 (50%)	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (25%)	0	0
	Houston	4	1 (25%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Cerro	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Manhattan	1	1 (100%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Carnac	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tomogbe	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Schleissheim	1	1 (100%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Campylobacter</i>	<i>jejuni</i>	1	1 (100%)	0	0	0	1 (100%)	0	1 (100%)	0	1 (100%)	0	0

The resistance was determined by disk diffusion. AMP: ampicillin (10 µg); CTX: cefotaxime (30 µg); CAZ: ceftazidime (30 µg); GM: gentamycin (10 µg); NA: nalidixic acid (30 µg); CIP: ciprofloxacin (5 µg); CST: colistin (10 µg); CAM: chloramphenicol (5 µg); AZM: azithromycin (15 µg); TGC: tigecycline (15 µg); SXT: trimethoprim-sulfamethoxazole (25 µg); TMP: trimethoprim (5 µg).

1.7% of tigecycline resistance came from fattening pigs [27]. Eastern Spain is a region with a high presence of pig farms throughout the countryside. One hypothesis that may explain the fact that strains isolated from Bonelli's eagles nestlings are resistant to ampicillin could be that fattening farms attract birds and other wild animals for feed. Birds, such as pigeons, could acquire resistant bacteria, and then disseminate the resistant bacteria in the environment [50], however further studies are needed to establish the relationship between resistant strains isolated from eagles and those isolated from pig farms. In the same line, for *Campylobacter*, only one strain could be recovered to analyse the antimicrobial susceptibility, which showed a multidrug resistant phenotype to at least five antibiotics. It is important to highlight that the strain was resistant to colistin, and to the best of our knowledge, this is the first report on colistin-resistant *Campylobacter* in wild raptors. Wild birds not only act as a reservoir for *Campylobacter*, but can also contribute notably to the dissemination of antibiotic resistance, as previously reported in seabirds [13]. As reported above for ampicillin and tigecycline resistance, colistin was also widely used in poultry and swine production to prevent and treat colibacillosis across EU countries [51]. Indeed, more studies are needed to confirm the source of nestlings' infection with resistant and multidrug resistant strains.

In conclusion, our results indicate that *Salmonella* serovars and *Campylobacter* species are present in the wild Bonelli's eagles population in Eastern Spain. Many isolates are resistant to antimicrobial agents. In addition, faecal samples from nests were most reliable for *Salmonella* detection, while cloacal swab from nestlings were most reliable for *Campylobacter* detection. Further studies should be undertaken in other geographical areas to confirm our results. Moreover, we emphasise the need for continuous local surveillance programmes to identify the potential risk of dissemination of these pathogens to wildlife and the environment.

CRedit authorship contribution statement

Bárbara Martín-Maldonado: Formal analysis, Writing - original draft. **Laura Montoro-Dasi:** Data curation. **Maria Teresa Pérez-Gracia:** Data curation, Methodology. **Jaume Jordá:** Data curation. **Santiago Vega:** Conceptualization, Funding acquisition. **Francisco Marco-Jiménez:** Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing - original draft. **Clara Marin:** Conceptualization, Data curation, Funding acquisition, Writing - original draft.

Declaration of Competing Interest

All authors declare no competing interests.

Acknowledgements

We wish to thank the Ministry of Infrastructures, Territory and Environment (Regional Government/Generalitat Valenciana), the research group "Improvement of Production System-related Food Safety and End Products" research group (Veterinary Faculty, University CEU-Cardenal Herrera) and GEMAS (Study Group on Wildlife Medicine and Conservation) for their technical support. Moreover, we want to thank University CEU-UCH (Consolidación de Indicadores INDI 18/19 and IDOC 18/12) for the financial support. The English text version was revised by N. Macowan English Language Service.

References

- [1] G. Blanco, Supplementary feeding as a source of multidrug-resistant *Salmonella* in endangered Egyptian vultures, *Transbound. Emerg. Dis.* 65 (2018) 806–816.
- [2] S.C. Henderson, D.I. Bounous, M.D. Lee, Early events in the pathogenesis of avian salmonellosis, *Infect. Immun.* 67 (1999) 3580–3586.
- [3] I. Tizard, Salmonellosis in wild birds, *Semin Avian Exotic Pet Med* 13 (2004) 50–66.
- [4] F. Hilbert, F.J.M. Smulders, R. Chopra-Dewasthaly, P. Paulsen, *Salmonella* in the wildlife-human interface, *Food Res. Int.* 24 (2012) 603–608.
- [5] R.A. Horton, G. Wu, K. Speed, S. Kidd, R. Davies, N.G. Coldham, J.P. Duff, Wild birds carry similar *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains to those found in domestic animals and livestock Diseases of Wildlife Scheme (DoWS) and GB Wildlife Disease Surveillance, *Res. Vet. Sci.* 95 (2013) 45–48.
- [6] C. Marin, M.D. Palomeque, F. Marco-Jiménez, S. Vega, Wild griffon vultures (*Gyps fulvus*) as a source of *Salmonella* and *Campylobacter* in eastern Spain, *PLoS One* 9 (2014) e94191.
- [7] C. Marin, C. Torres, F. Marco-Jiménez, M. Cerdà-Cuellar, S. Sevilla, T. Ayats, S. Vega, Supplementary feeding stations for conservation of vultures could be an important source of monophasic *Salmonella typhimurium* 1, 4, [5], 12: i-, *Sci. Total Environ.* 636 (2018) 449–455.
- [8] J. Greig, A. Rajić, I. Young, M. Mascarenhas, L. Waddell, J. Lejeune, A scoping review of the role of wildlife in the transmission of bacterial pathogens and antimicrobial resistance to the food chain, *Zoonoses Public Health* 62 (2015) 269–284.
- [9] M. Krawiec, M. Kuczkowski, A.G. Kruszewicz, A. Wieliczko, Prevalence and genetic characteristics of *Salmonella* in free-living birds in Poland, *BMC Vet. Res.* 11 (2015) 15.
- [10] G. Blanco, Multiresistant *Salmonella* serovar typhimurium monophasic in wintering red kites (*Milvus milvus*) in Segovia, Central Spain, *BioOne Web site* 49 (2015) 337–341.
- [11] E. Jurado-Tarifa, A. Torralbo, C. Borge, M. Cerdà-Cuellar, T. Ayats, A. Carbonero, I. García-Bocanegra, Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Campylobacter* and *Salmonella* strains isolated from decoys and raptors, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 48 (2016) 14–2.
- [12] E.S. Lopes, W.C. Maciel, R.S. de Castro Teixeira, A.H. de Albuquerque, R.H. Vasconcelos, D.N. Machado, W.G.A. Bezerra, I.C.L. Santos, Isolamento de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* de psittaciformes: relevância em saúde pública, *Arq. Inst. Biol. (Sao Paulo)* 83 (2016) 1–10.
- [13] E. More, T. Ayats, P.G. Ryan, P.R. Naicker, K.H. Keddy, D. Gaglio, M. Witteveen, M. Cerdà-Cuellar, Seabirds (Laridae) as a source of *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. And antimicrobial resistance in South Africa, *Environ. Microbiol.* 19 (2017) 4164–4176.
- [14] R.A. Molina-Lopez, A. Vidal, E. Obón, M. Martín, L. Darwich, Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar typhimurium monophasic variant 4,12:i:- isolated from asymptomatic wildlife in a Catalonian Wildlife Rehabilitation Center, Spain, *J. Wildl. Dis.* 51 (2015) 759–763.
- [15] R.A. Molina-Lopez, N. Valverdú, M. Martín, E. Mateu, E. Obón, M. Cerdà-Cuellar, L. Darwich, Wild raptors as carriers of antimicrobial-resistant *Salmonella* and *Campylobacter* strains, *Vet. Rec.* 168 (2011) 565.
- [16] B. Wei, M. KanG, H.K. Jang, Genetic characterization and epidemiological implications of *Campylobacter* isolates from wild birds in South Korea, *Transbound. Emerg. Dis.* 66 (2019) 56–65.
- [17] J. Waldenström, D. Axelsson-Olsson, B. Olsen, B. Hasselquist, P. Griekspoor, L. Jansson, S. Teneberg, L. Svensson, P. Ellström, *Campylobacter jejuni* colonization in wild birds: results from an infection experiment, *PLoS One* 5 (2010) e9082.
- [18] H. Johansson, P. Ellström, K. Artursson, C. Berg, J. Bonnedahl, I. Hansson, J. Hernandez, J. Lopez-Martin, G. Medina-Vogel, L. Moreno, B. Olsen, E. Olsson Engvall, H. Skarin, K. Troell, J. Waldenström, J. Ågren, D. González-Acuña, Characterization of *Campylobacter* spp. Isolated from wild birds in the Antarctic and Sub-Antarctic, *PLoS One* 13 (2018) e0206502.
- [19] A. Battisti, D.G. Giovanni, U. Agrimi, A.I. Bozzano, Embryonic and neonatal mortality from salmonellosis in captive bred raptors, *J. Wildl. Dis.* 34 (1998) 64–72.
- [20] A.J. Hall, E.K. Saito, Avian wildlife mortality events due to salmonellosis in the United States, 1985–2004, *J. Wildl. Dis.* 44 (2008) 585–593.
- [21] D.N. Phalen, M.L. Drew, B. Simpson, K. Roset, K. Dubose, M. Mora, *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* in Cattle Egret (*Bubulcus ibis*) chicks from central Texas: prevalence, serotypes, pathogenicity, and epizootic potential, *J. Wildl. Dis.* 46 (2010) 379–389.
- [22] S. Uzzau, D.J. Brown, T. Wallis, S. Rubino, G. Leori, S. Bernard, J. Casadesús, D.J. Platt, J.E. Olsen, Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*, *Epidemiol. Infect.* 125 (2000) 229–255.
- [23] S. Andrés, J.P. Vico, V. Garrido, M.J. Grilló, S. Samper, P. Gavín, S. Herrera-León, R.C. Mainar-Jaime, Epidemiology of subclinical salmonellosis in wild birds from an area of high prevalence of pig salmonellosis: phenotypic and genetic profiles of *Salmonella* isolates, *Zoonoses Public Health* 60 (2013) 355–365.
- [24] L.O. Rouffaer, L. Lens, R. Haesendonck, A. Teyssier, N.S. Hudin, D. Strubbe, F. Haesebrouck, F. Pasmans, A. Martel, House sparrows do not constitute a significant *Salmonella typhimurium* reservoir across urban gradients in Flanders, Belgium, *PLoS One* 11 (2016) e0155366.
- [25] L. Espinosa, C. Varela, E.V. Martínez, R. Cano, Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. España, 2008-2011, *Boletín Epidemiológico Semanal.* 22 (2014) 130–136.
- [26] M. Riveros, T.J. Ochoa, Enteropatógenos de importancia en salud pública, *Revi. Peru. Med. Exp. Salud. Pública.* 32 (2015) 157–164.
- [27] EFSA (European Food Safety Authority), The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016, *The EFSA Journal* 16 (2018) 1–270.
- [28] G. Kapperud, G. Espeland, E. Wahl, A. Walde, H. Herikstad, S. Gustavsen, I. Tveit, O. Natås, L. Bevanger, A. Digranes, Factors associated with increased and decreased risk of *Campylobacter* infection: a prospective case-control study in Norway, *Am. J. Epidemiol.* 158 (2003) 234–242.
- [29] T.J. Gardner, C. Fitzgerald, C. Xavier, R. Klein, J. Pruckler, S. Stroika, J.B. McLaughlin, Outbreak of campylobacteriosis associated with consumption of raw peas, *Clin. Infect. Dis.* 53 (2011) 26–32.
- [30] Life Bonelli. Seguimiento de parejas reproductoras y extracción de pollos de nidos, (2013) Accessed on June, 2018 <http://www.lifebonelli.org/index.php/>

- seguimiento-de-parejas-reproductoras-y-extraccion-pollos-de-nidos.
- [31] J. Moleón, J.A. Sánchez-Zapata, J.M. Gil-Sánchez, E. Ballesteros-Duperón, J.M. Barea-Azcón, E. Virgós, Predator-prey relationships in a Mediterranean vertebrate system: bonelli's eagles, rabbits and partridges, *Oecologia*. 168 (2012) 679–689.
- [32] A. Dias, L. Palma, F. Carvalho, D. Neto, J. Real, P. Beja, The role of conservative versus innovative nesting behavior on the 25-year population expansion of an avian predator, *Ecol. Evol.* 7 (2017) 4241–4253.
- [33] L. Lloveras, R. Thomas, R. Lourenco, J. Caro, A. Dias, Understanding the taphonomic signature of Bonelli's eagles (*Aquila fasciata*), *J. Archaeol. Sci.* 49 (2014) 455–471.
- [34] M.P. Reche, P.A. Jiménez, F. Álvarez, J.E. García de los Ríos, A.M. Rojas, P. De Pedro, Incidence of *salmonellae* in captive and wild-free-living raptorial birds in Central Spain, *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 50 (2003) 42–44.
- [35] R. Griffiths, M.C. Double, K. Orr, R.J. Dawson, A DNA test to sex most birds, *Mol. Ecol.* 7 (1998) 1071–1075.
- [36] ISO 6579:2002 (Annex D), Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs. Horizontal Method for the Detection of *Salmonella* spp, International Organization for Standardization, Genève, Switzerland, 2002.
- [37] P.A. Grimont, F.X. Weill, Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars vol. 9, WHO collaborating centre for reference and research on *Salmonella*, 2007, pp. 1–166.
- [38] ISO 10272-1:2006, Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs. Horizontal Method for Detection and Enumeration of *Campylobacter* spp. Part 1: Detection Method, International Organization for Standardization, Genève, Switzerland, 2006.
- [39] E. Matuschek, D.F. Brown, G. Kahlmeter, Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories, *Clin. Microbiol. Infect.* 20 (2014) O255–66.
- [40] European Union, Commission Implementing Decision 2013/653 of 12 November 2013 As Regards a Union Financial Aid Towards a Coordinated Control Plan for Antimicrobial Resistance Monitoring in Zoonotic Agents in 2014 (notified Under Document C (2013) 7289), (2013).
- [41] ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2016. EU Protocol for Harmonised Monitoring of Antimicrobial Resistance in Human *Salmonella* and *Campylobacter* isolates, ECDC, Stockholm, 2016.
- [42] A. Andino, I. Hanning, *Salmonella enterica*: Survival, Colonization, and Virulence. Differences among Serovars, *Scientific World Journal* 2015 (2015) 520179.
- [43] F.J. García, J.C. Abad, T. Serrano, N. Frías, M. Castro, S. Lorente, Epidemiología de *Campylobacter* en avicultura, 50º Congreso Científico de Avicultura, Simposio WPSA-AECA, Lleida, Spain, 2013, pp. 1–12.
- [44] S. Ingresa-Capaccioni, S. González-Bodí, E. Jiménez-Trigos, F. Marco-Jiménez, P. Catalá, S. Vega, C. Marin, Comparison of different sampling types across the rearing period in broiler flocks for isolation of *Campylobacter* spp, *Poult. Sci.* 94 (2015) 766–771.
- [45] J. Millan, G. Auduriz, B. Moreno, R.A. Juste, M. Barral, *Salmonella* isolates from wild birds and mammals in the Basque Country (Spain), *Rev Sci Tech.* 23 (2004) 905–911.
- [46] H.M. Sommer, B. Borck Høgb, L.S. Larsen, A.I.V. Sørensen, N. Williams, J.Y. Merga, M. Cerdà-Cuellar, S. Urdaneta, R. Dolz, K. Wiczorek, J. Osek, B. David, M. Hofshagen, M. Jonsson, J.A. Wagenaar, N. Bolder, H. Rosenquist, Analysis of farm specific risk factors for *Campylobacter* colonization of broilers in six European countries, *Microb Risk Anal.* 2 (2016) 16–26.
- [47] K.G. Kuhn, E.M. Nielsen, K. Mølbak, S. Ethelberg, Epidemiology of campylobacteriosis in Denmark 2000–2015, *Zoonoses Public Health* 65 (2017) 59–66.
- [48] S. Troxler, C. Hess, C. Konicek, Z. Knotek, P. Barták, M. Hess, Microdilution testing reveals considerable and diverse antimicrobial resistance of *Escherichia coli*, thermophilic *Campylobacter* spp. and *Salmonella* spp. Isolated from wild birds present in urban areas, *Eur. J. Wildl. Res.* 63 (2017) 68.
- [49] S. Andrés-Barranco, J.P. Vico, C.M. Marín, S. Herrera-Leon, R.C. Mainar-Jaime, Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates from pigs and pig environment-related sources and evidence of new circulating monophasic strains in Spain, *J. Food Prot.* 79 (2016) 407–412.
- [50] S. Andrés, J.P. Vico, V. Garrido, M.J. Grilló, S. Samper, P. Gavín, S. Herrera-León, R.C. Mainar-Jaime, Epidemiology of subclinical salmonellosis in wild birds from an area of high prevalence of pig salmonellosis: phenotypic and genetic profiles of *Salmonella* isolates, *Zoonoses Public Health* 60 (2013) 355–365.
- [51] B. Catry, M. Cavaleri, K. Baptiste, K. Grave, K. Grein, A. Holm, H. Jukes, E. Liebana, A.L. Navas, D. Mackay, A.P. Magiorakos, M.A. Moreno, G. Moulin, C.M. Madero, M.C. Pomba, M. Powell, S. Pyorala, M. Rantala, M. Ruzauskas, P. Sanders, C. Teale, E.J. Threlfall, K. Torneke, E. van Duijkeren, J.T. Edo, Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health, *Int J Antimicrob Ag.* 46 (2015) 297–306.

4.2. Estudio comparativo de muestras cloacales conservadas de águila de Bonelli (*Aquila fasciata*) recogidas en lugares de difícil acceso para la detección de *Salmonella* spp.: congelación vs refrigeración

4.2.1. Resumen

Salmonella es una de las enterobacterias más importantes en salud pública y sanidad animal de los últimos años al ser la causante de numerosos brotes con diferente sintomatología clínica. Dentro del amplio rango de especies hospedadoras que presenta *Salmonella* se incluye la fauna silvestre, y más concretamente las aves silvestres, que pueden portar de manera asintomática la bacteria y diseminarla a largas distancias. Dada la cantidad de conexiones directas o indirectas, que existen entre la salud pública, la sanidad animal y el medio ambiente, el concepto *One Health* destaca la importancia de integrar las tres disciplinas para un completo abordaje. En este contexto, es esencial estudiar la epidemiología de *Salmonella* en estas especies silvestres a fin de obtener la información más óptima posible. Para la detección de *Salmonella*, las muestras deben ser procesadas lo antes posible. Sin embargo, el acceso a las poblaciones de aves silvestres puede resultar laborioso al habitar regiones distantes e inaccesibles, retrasándose el análisis de las muestras. Este estudio compara dos métodos diferentes de conservación de muestras. Para ello, se recogieron dos hisopos cloacales de 63 volantones de águila de Bonelli localizados en diferentes nidos de Andalucía. Uno de los hisopos fue conservado en medio nutritivo suplementado con FBP y carbón activado en congelación a -20°C . El otro hisopo fue conservado en refrigeración en medio Cary Blair. La detección de *Salmonella* se realizó siguiendo las recomendaciones de la norma ISO 6579-1:2017 (Anexo D). Independientemente del método de conservación utilizado, el aislamiento de *Salmonella* por cultivo bacteriológico no fue posible en ninguna muestra.

4.2.2. Referencias

Artículo científico:

Referencia: Martín-Maldonado, B., Moraleda Fernández, V., Mencía-Gutiérrez, A., Pastor Tiburón, N., López Márquez, I., Suárez Regalado, L., González, F., Revuelta, L., & Marin, C. Comparative study of preserved cloacal samples from Bonelli's Eagle (*Aquila fasciata*) collected in places with difficult Access for *Salmonella* detection: freezing vs. refrigeration. Under review in Current Microbiology.

Índice de Impacto de la revista: 1.746 en JCR en 2019 en Microbiology (enviado, en fase de revisión)

Posición de la revista: Q4 en JCR en 2019 en Microbiology

Current Microbiology

Comparative study of preserved cloacal samples from Bonelli's eagle (*Aquila fasciata*) collected in places with difficult access for *Salmonella* detection: freezing vs. refrigeration

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	CMIC-D-20-01677	
Full Title:	Comparative study of preserved cloacal samples from Bonelli's eagle (<i>Aquila fasciata</i>) collected in places with difficult access for <i>Salmonella</i> detection: freezing vs. refrigeration	
Article Type:	Original Paper	
Funding Information:	Universidad CEU Cardenal Herrera (INDI 16/32)	Dr Clara Marin
	LIFE Bonelli (LIFE12 NAT/ES/000701)	Mrs Virginia Moraleda Fernández
	AQUILA a-LIFE (LIFE16 NAT/ES/000235)	Mrs Laura Suárez Regalado
Abstract:	<p><i>Salmonella</i> is one of the most relevant enterobacteria in both public and animal health, as it causes a large number of outbreaks with different clinical signs. The wide range of species that <i>Salmonella</i> can host include wildlife, and more specifically wild birds, which can spread the bacteria over large distances. The One Health approach stands for the integration of public health, animal health and environmental health as one, due to the numerous interconnections between all of them. In this context, it becomes essential to study the epidemiology of <i>Salmonella</i> in these species in order to achieve the most optimal information possible. For <i>Salmonella</i> detection, samples should be analysed as soon as possible. However, the access to wild bird populations can be arduous when they live in distant or inaccessible regions. In this experimental study, two different methods of sample preservation are compared. Two cloacal swabs were collected from 63 Bonelli's eagle nestlings from different nests in Andalusia and stored in different transport media. The first one was preserved on FBP medium with activated charcoal and frozen. The second was refrigerated in Cary Blair medium. <i>Salmonella</i> detection was performed following ISO 6579-1:2017 (Annex D) recommendations. <i>Salmonella</i> isolation was not possible from all the samples, independently of the preservation method used.</p>	
Corresponding Author:	Bárbara Martín-Maldonado, L.V. GREFA Majadahonda, Madrid SPAIN	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	GREFA	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Bárbara Martín-Maldonado, L.V.	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Bárbara Martín-Maldonado, L.V.	
	Virginia Moraleda Fernández, LV	
	Aida Mencía-Gutiérrez, LV	
	Natalia Pastor Tiburón, LV	
	Irene López Márquez, LV	
	Laura Suárez Regalado, LV	
	Fernando González, LV	

	Luis Revuelta, PhD
	Clara Marin, PhD, Dip.ECVPS
Order of Authors Secondary Information:	
Author Comments:	
Suggested Reviewers:	Carlos Sanchez csanchez@fortworthzoo.org Wildlife veterinarian
	Fernando Esperón esperon@inia.es DVM and PhD from Research Center for Animal Health and Safety, National Institute for Agriculture and Food Research and Technology, Valdeolmos, Madrid, Spain
	Miguel Saggese msaggese@westernu.edu Veterinarian, assistant professor in microbiology and avian diseases at Western University College of Veterinary Medicine.

Title Page

Comparative study of preserved cloacal samples from Bonelli's eagle (*Aquila fasciata*) collected in places with difficult access for *Salmonella* detection: freezing vs. refrigeration

Martín-Maldonado, B.^{1,2*}, Moraleda Fernández, V.^{1,2}, Mencía-Gutiérrez, A.², Pastor Tiburón, N.^{1,2}, López Márquez, I.^{1,2}, Suárez Regalado, L.^{1,2}, González, F.^{1,2}, Revuelta, L.^{2,3}, Marin, C.^{2,4}

¹Grupo de Rehabilitación de la Fauna Autóctona y su Hábitat (GREFA). Hospital de Fauna Salvaje. Madrid, Spain.

²Grupo de Estudio de la Medicina y Conservación de la Fauna Silvestre (GEMAS), Spain.

³Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid. Departamento de Fisiología Animal. Madrid, Spain.

⁴Facultad de Veterinaria, Universidad CEU-Cardenal Herrera. Instituto de Ciencias Biomédicas. Departamento de Producción Animal, Sanidad Animal y Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Valencia, Spain.

*Corresponding author: Bárbara Martín-Maldonado. Postal address: GREFA C/ Monte del Pilar, s/n. CP 28220, Majadahonda (Madrid), SPAIN. E-mail address: bmmjimenezvet@gmail.com

Acknowledgements

The authors would like to thank the GEMAS Research Group (Grupo de Estudio de Medicina y Conservación de Animales Salvajes), CAMPYSALMO Research Group, Sandra Sevilla Navarro among them, and GREFA volunteers for their technical support, especially Francisco J. García-Peña, Omar El Moulate and Alicia Carrero.

Funding information

This study was funded by the CEU-Cardenal Herrera University (INDI 16/32) and University Complutense of Madrid, in collaboration with LIFE Bonelli (LIFE12 NAT/ES/000701) and AQUILA a-LIFE (LIFE16 NAT/ES/000235) projects.

Author contributions

All authors contributed to the study conception, design and development. Funding was obtained by Fernando González, Clara Marín and Luis Revuelta. Material preparation and samples collection were performed by Virginia Moraleda, Laura Suárez Regalado, Natalia Pastor Tiburón and Irene López Márquez. Microbiology analysis were performed by Clara Marin, Bárbara Martín-Maldonado and Aida Mencía-Gutiérrez. The study was supervised by Fernando González and Clara Marin. The first draft of the manuscript was written by Bárbara Martín-Maldonado and Clara Marín and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest. The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval. All procedures performed with animals are in accordance with the ethical standards of the European Union (Directive 2010/63/EU).

Blinded Paper**Comparative study of preserved cloacal samples from Bonelli's eagle (*Aquila fasciata*) collected in places with difficult access for *Salmonella* detection: freezing vs. refrigeration****Abstract**

Salmonella is one of the most relevant enterobacteria in both public and animal health, as it causes a large number of outbreaks with different clinical signs. The wide range of species that *Salmonella* can host include wildlife, and more specifically wild birds, which can spread the bacteria over large distances. The One Health approach stands for the integration of public health, animal health and environmental health as one, due to the numerous interconnections between all of them. In this context, it becomes essential to study the epidemiology of *Salmonella* in these species in order to achieve the most optimal information possible. For *Salmonella* detection, samples should be analysed as soon as possible. However, the access to wild bird populations can be arduous when they live in distant or inaccessible regions. In this experimental study, two different methods of sample preservation are compared. Two cloacal swabs were collected from 63 Bonelli's eagle nestlings from different nests in Andalusia and stored in different transport media. The first one was preserved on FBP medium with activated charcoal and frozen. The second was refrigerated in Cary Blair medium. *Salmonella* detection was performed following ISO 6579-1:2017 (Annex D) recommendations. *Salmonella* isolation was not possible from all the samples, independently of the preservation method used.

Keywords: Bonelli eagle, *Salmonella*, sample preservation, wildlife, conservation

Introduction

Salmonella is an enterobacterium with relevant impact upon public health due to the large number of salmonellosis cases reported every year. Clinical signs can vary from gastrointestinal symptomatology to septicaemia, arthritis or meningitis (EFSA 2019). The distribution of *Salmonella* is wide, as a multitude of animal species can host the bacteria in their intestine. Wild birds have been described as an important reservoir of *Salmonella* and potential disseminators in the environment (de Lucía *et al.* 2018; Rula *et al.* 2019). The prevention of *Salmonella* dissemination is essential for the control of salmonellosis in both humans and animals. Regarding One Health premises, a multifactorial approach is essential to obtain the best results, including public health, animal health and environmental health, involving wildlife. Nevertheless, the access to many wildlife species represents a major challenge, as they commonly inhabit remote regions and the handling of these animals requires a high level of specialisation. Thus, results obtained in different studies are difficult to compare (Reche *et al.* 2003; Millán *et al.* 2004; Marin *et al.* 2014).

Microbiologists' recommendations highlight the importance of analysing the samples as soon as practicable for *Salmonella* detection in order to obtain the most reliable results. In this context, some authors have described the use of different transport media for samples collected in remote regions in order to preserve culturable bacteria (Wasfy *et al.* 1995; García-Peña *et al.* 2010; Berenger *et al.* 2019). García-Peña *et al.* (2017) proved the effectivity of FBP medium supplemented with 0.5% activated charcoal on *Campylobacter* detection from samples collected from Antarctic penguins analysed in Spain few months later. Many studies manifest the effectivity of other transport media such as Cary Blair, charcoal Amies, Reinforced Clostridium Medium (RCM) or Fekal Enteric Plus®, to increase enterobacteria viability when the time between collection and analysis of samples increases (Mundy *et al.* 1991; Opara *et al.* 1992; Palmgren *et al.* 2000; Iveson *et al.* 2009; García-Peña *et al.* 2010; Vidal *et al.* 2013). However, for the best of our knowledge, there are no viability studies for *Salmonella* with frozen samples in charcoal FBP medium. Despite the lack of those studies, *Salmonella* has been isolated from frozen food at -20°C, confirming the resistance of the bacteria to freezing temperatures (Pal and Marshall 2008; Dominguez and Schaffner 2009; Strawn and Danyluk 2010).

In this context, the aim of this study was to study the viability of *Salmonella* in cloacal samples collected from wild Bonelli's eagles (*Aquila fasciata*) from remote areas, comparing two different preservation methods: freezing charcoal FBP vs. refrigerated Cary Blair.

Material and methods

Population study

During the 2017 and 2018 breeding seasons, Bonelli's eagle chicks from different nests in Andalusia (southern Spain) and captive breeding programmes were sampled. The study was carried out in collaboration with the Regional Administration, LIFE Bonelli and AQUILA a -LIFE projects, in order to improve conservation projects for endangered raptors. All animals were handled according to Directive 2010/63/EU (European Union 2010).

For free-living individuals, the access to nests was coordinated between GREFA veterinarians (Grupo de Rehabilitación de la Fauna Autóctona y su Hábitat), forest rangers and climbers, as one of the LIFE Bonelli and AQUILA a-LIFE actions. Chicks were caught by climbers and examined by vets, who collected all the necessary samples before ringing and GPS positioning. Age was determined by feather development and nest monitoring, establishing two categories: nestling (0-55 days), where the body is completely covered by down that gradually comes off, while the flight feathers develop; at this stage, nestlings are fed by parents; and fledgling (55-65 days), in which flight feathers are fully developed and there is hardly any down, with fledglings feeding on their own from prey provided by their parents. They begin to make short flights at the end of this stage. For the nestling born and bred in captivity, sample collection and veterinary examination were performed at 40-45 days of age. The gender of each individual was estimated by biometry.

For all individuals (free-living and captivity), the age, number of chicks per brood and nest location was recorded. Moreover, samples collection included cloacal swabs, as well as haematological samples in order to assess the health status of each animal and genetic samples to confirm the gender.

Sample collection and preservation

For *Salmonella* detection, two cloacal swabs were collected from both free-born and captive-born individuals. Sterile cotton swabs were inserted approximately 1 cm into the cloaca to obtain the sample; one was kept in charcoal FBP (Table 1) and the other in Cary Blair transport medium (DELTALAB, Barcelona) (Gorman and Adley, 2004). Samples preserved in charcoal FBP were stored frozen at -20°C for three months, while samples preserved in Cary Blair were stored refrigerated at 4°C for 72 hours.

Table 1. Formula employed for 500 ml of charcoal FBP medium (Gorman and Adley, 2004)

	Commercial reference	Quantity
Nutrient broth n°2	Oxoid® CM67	12,50 g
Bacteriological agar	Difco® 214010	0,60 g
Glycerol	Panreac®	75 ml
Yeast extract	Difco® 212750	0,5 g
Activated charcoal	Oxoid®	2,5 g
<i>Campylobacter</i> growth supplement	Oxoid® SR 0084	2 ml
Deionised water	-	425 ml

g: grams; mL: millilitres

Salmonella isolation

Frozen samples in charcoal FBP were gradually thawed under refrigeration for approximately five hours before homogenising and processing. *Salmonella* detection was performed according to ISO 6579-1:2017 (Annex D). First, the samples were pre-enriched in Buffered Peptone Water 2.5% (BPW, Scharlau, Barcelona, Spain), in 1:10 vol/vol proportion, and incubated at 37±1°C for 18±2 hours. Then, 100 µL of pre-enriched samples were transferred onto Semi-Solid Modification Rappaport Vassiliadis (MSRV, Difco, Valencia, Spain) and incubated at 41.5±1 °C for 24-48 h. For the positive plates, the colonies obtained were inoculated onto specific agar plates for *Salmonella* spp. detection: a selective chromogenic medium for detection of C8-esterase activity (ASAP, bioMerieux, Marcy l'Étoile, France). These agar plates were incubated at 37±1°C for 24-48 hours. After incubation, suspected *Salmonella* colonies should grow as purple colonies.

Results

During the two breeding seasons, a total of 63 chicks of Bonelli's eagle were sampled: 37 animals from the 2017 season and 26 animals from the 2018 season. From all the individuals included in the study, 36.5% (23/63) were born in captivity and bred under the LIFE Bonelli and AQUILA a-LIFE programmes, and 63.5% (40/63) were free-born and bred animals from 20 different nests, of which 9 were from Granada, 3 from Cádiz, 3 from Jaén, 3 from Málaga and 2 from Almería (Figure 1).

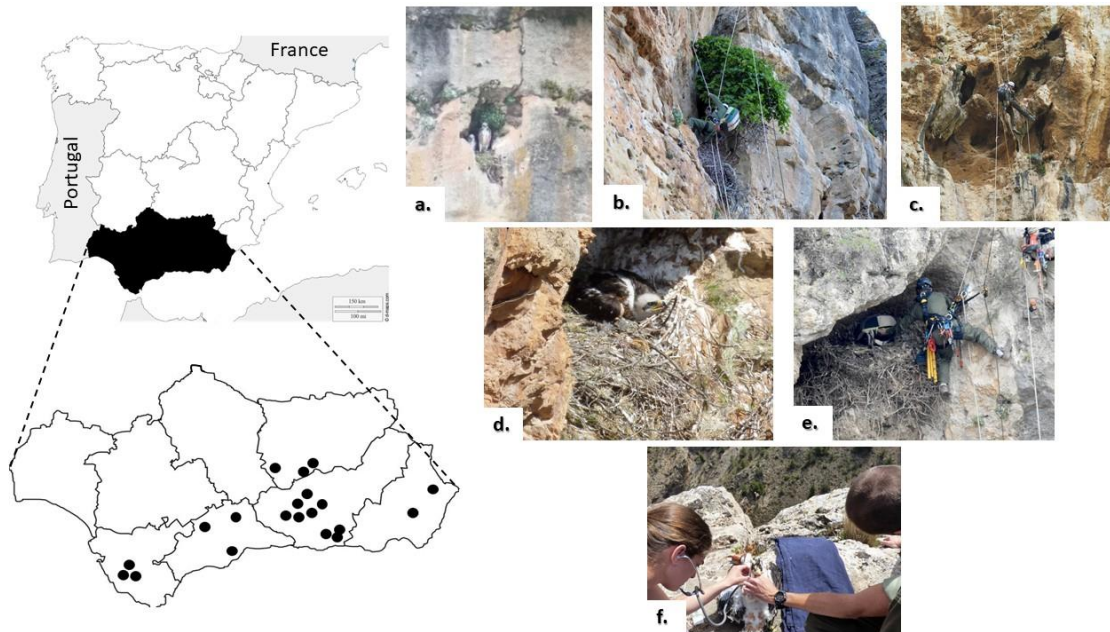


Figure 1. Map of the study area showing the location of free-living Bonelli's eagles nests in Andalusia (Spain) and images of the sampling process from observation of nestlings (image a) until veterinary examination (image f).

Genetic analysis showed 46% of females (29/63) and 54% of males (34/63). All the animals were considered nestlings, as they were 40 to 55 days old. Veterinary exam and haematological analysis confirmed the good health status of the animals, and none of individuals or nests presented diarrhoea.

Salmonella detection was not possible from samples collected, regardless of the preservation method used.

Discussion

Salmonella was not detected in wild Bonelli's nestlings from Andalusia, either from free-living or captive origin, independently of the transport medium and the storage temperature.

A wide range of prevalence of *Salmonella* and other zoonotic bacteria has been reported in wild birds, with variations depending on the geographical area, samples collected, age of animals and other factors (Troxler *et al.* 2017; Espinoza and Morales-Cauti 2019). For example, a recent study carried out in Eastern Spain showed that 35.5% of wild Bonelli's nestlings were positive for *Salmonella*, while other studies from

Southern or Northern Spain have shown a lesser prevalence (Molina-López *et al.* 2015; Jurado-Tarifa *et al.* 2016; Martín-Maldonado *et al.* 2019). Our results agreed with those obtained by Reche in 2003, who did not isolate *Salmonella* from Bonelli's eagle (Reche *et al.* 2003).

Different hypotheses may explain the disparity among the results from different studies. In Eastern Spain, the density of intensive livestock farms is higher than in other regions, so the circulation of *Salmonella* between domestic animals, wild birds and the environment might be higher. Regions with less livestock pressure may have a lower presence of some bacteria like *Salmonella* in wildlife (Andrés *et al.* 2013).

Another hypothesis that could be supported would be the sample collected (faeces, cloacal swabs, etc.) and the preservation method employed. It is important to highlight the difficulty of access to wild Bonelli's eagle nests and the organisation of field work teams, which hinders the analysis of samples within the recommended 24 hours from their collection (Cross *et al.* 2012; Ishii 2019). In this context, multiple studies confirm the efficacy of different preservation media when samples cannot be processed within a short timeframe (Mundy *et al.* 1991; Opara *et al.* 1992; Palmgren *et al.* 2000; Iveson *et al.* 2009; Gorman and Adley 2004; García-Peña *et al.* 2017).

Finally, storage temperature is one of the most important factors in the viability of enterobacteria. Recent studies have proven the survivability of *Salmonella* under freezing temperatures (He *et al.* 2016; Rocard *et al.* 2018). However, in our study no *Salmonella* strains were obtained among the 63 nestlings tested, including samples preserved on frozen charcoal FBP medium. Different theories can explain this fact. Firstly, freezing temperature affects cellular membrane integrity, as well as the pathogen recovery, so detection by bacteriological culture can show false negatives (Mindock *et al.* 2001, Ramamurthy *et al.* 2014). Secondly, rapid temperature fluctuations can accelerate bacterial death (Natving *et al.* 2002; Semenov *et al.* 2007). During spring, Andalusia's average weather temperature can rise to 25-30°C, which contrasts with storage freezing temperature (-20°C). Both theories could affect the correct preservation of samples, causing premature death of bacteria. Nevertheless, in this study, samples refrigerated and analysed 72 hours post-collection were also negative for *Salmonella*.

Numerous studies evidence the importance of an early post-collection analysis of samples. In 2004, Gorman and Adley published a study on the compromised viability of frozen bacteria depending on the time elapsed from sample collection to analysis, the freezing temperature and the preservation medium. The most effective method turned out to be preservation in nutritive broth with glycerol at -85°C (Gorman and Adley 2004). Another study tested the viability of faecal samples preserved in 10% glycerol solution for microbiota transplantation, and results confirmed that the method is effective for most enterobacteria for at least 6 months (Costello *et al.* 2015). In contrast, a *Salmonella* viability study performed on orange juice preserved at -20°C showed a significant reduction in *Salmonella* rates (Niemira *et al.* 2003). In spite of the decrease in viability, *Salmonella* has been isolated from different frozen foods, suggesting that more factors are involved in the survival of this bacteria at freezing temperatures (Fuller *et al.* 2008; Dominguez and Schaffner 2009; Strawn and Danyluk 2010). However, further studies on the viability of *Salmonella* in different preservation media are necessary in order to define the most effective method for samples whose analysis could be delayed.

In conclusion, the use of charcoal FBP at freezing temperatures and refrigerated Cary Blair for 72 hours did not allow differences in *Salmonella* survival in swabs from wild and captive young individuals of Bonelli's eagle.

Bibliography

1. Andrés S, Vico JP, Garrido V, Grilló MJ, Samper S, Gavín P, Herrera-León S, Mainar-Jaime, RC (2013) Epidemiology of subclinical salmonellosis in wild birds from an area of high prevalence of pig salmonellosis: phenotypic and genetic profiles of *Salmonella* isolates. *Zoonoses and public health*, 60(5), 355-365.
2. Berenger BM, Ferrato C, Chui L (2019) Viability of bacterial enteropathogens in fecal samples in the presence or absence of different types of transport media. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 95(3), 114862.
3. Costello SP, Conlon MA, Vuaran MS, Roberts-Thomson IC, Andrews JM (2015) Faecal microbiota transplant for recurrent *Clostridium difficile* infection using long-term frozen stool is effective: clinical efficacy and bacterial viability data. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 42(8), 1011-1018.
4. Cross PC, Creech TG, Ebinger MR, Heisey DM, Irvine KM, Creel, S (2012) Wildlife contact analysis: emerging methods, questions, and challenges. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 66(10), 1437-1447.
5. De Lucia A, Rabie A, Smith RP, Davies R, Ostanello F, Ajayi D, Petrovska L, Martelli, F (2018) Role of wild birds and environmental contamination in the epidemiology of *Salmonella* infection in an outdoor pig farm. *Veterinary microbiology*, 227, 148-154.
6. Dominguez SA, Schaffner DW (2009) Survival of *Salmonella* in processed chicken products during frozen storage. *Journal of food protection*, 72(10), 2088-2092.
7. EFSA (European Food Safety Authority) (2019) Scientific report on the European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 2019;17(12):5926, 276 pp.
8. Espinoza R, Morales-Cauti S (2019) *Salmonella* spp. in wild birds living around a well-managed guinea pig farm in the district of Manchay, Lima. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú (RIVEP)*, 30(1), 423-429.
9. European Union (2010) Directive 2010/63/UE of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Official Journal of the European Union, L276/33.
10. Fuller CC, Jawahir SL, Leano FT, Bidol SA, Signs K, Davis C, Holmes T, Morgan J, Teltow G, Jones B, Sexton RB, Davis GL, Branden CR, Patel NJ, Deasy III MP, Smith KE (2008) A multi-

- state *Salmonella* Typhimurium outbreak associated with frozen vacuum-packed rodents used to feed snakes. *Zoonoses and public health*, 55(8-10), 481-487.
11. García-Peña FJ, Pérez-Boto D, Jiménez C, San Miguel E, Echeita A, Rengifo-Herrera C, García-Párraga D, Ortega-Mora LM, Pedraza-Díaz S (2010) Isolation and characterization of *Campylobacter* spp. from Antarctic fur seals (*Arctocephalus gazella*) at Deception Island, Antarctica. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(17), 6013-6016.
 12. García-Peña FJ, Llorente, MT, Serrano T, Ruano MJ, Belliure J, Benzal J, Herrera-León S, Vidal V, D'Amico V, Pérez-Boto D, Barbosa A (2017) Isolation of *Campylobacter* spp. from three species of Antarctic penguins in different geographic locations. *EcoHealth*, 14(1), 78-87.
 13. Gorman R, Adley CC (2004) An evaluation of five preservation techniques and conventional freezing temperatures of -20°C and -85°C for long-term preservation of *Campylobacter jejuni*. *Letters in applied microbiology*, 38(4), 306-310.
 14. He S, Zhou X, Shi C, Shi X (2016) Ethanol adaptation induces direct protection and cross-protection against freezing stress in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Journal of applied microbiology*, 120(3), 697-704.
 15. Ishii S (2019) Ecology of pathogens and antibiotic-resistant bacteria in environments: Challenges and opportunities. *Microbes and environments*, 34(1), 1-4.
 16. ISO 6579-1:2017 (Annex D) Microbiology of the food chain. Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* spp. Part 1: Detection of *Salmonella* spp. International Organization for Standardization, Genève, Switzerland. 2017.
 17. Iveson JB, Shellam, GR, Bradshaw SD, Smith DW, Mackenzie JS, Mofflin RG (2009) *Salmonella* infections in Antarctic fauna and island populations of wildlife exposed to human activities in coastal areas of Australia. *Epidemiology & Infection*, 137(6), 858-870.
 18. Jurado-Tarifa E, Torralbo A, Borge C, Cerdà-Cuellar M, Ayats T, Carbonero A, García-Bocanegra I (2016) Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Campylobacter* and *Salmonella* strains isolated from decoys and raptors. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 48, 14-21.
 19. Marin C, Palomeque MD, Marco-Jimenez F, Vega S (2014) Wild griffon vultures (*Gyps fulvus*) as a source of *Salmonella* and *Campylobacter* in eastern Spain. *PLoS One*, 9(4), e94191.
 20. Martín-Maldonado B, Montoro-Dasi L, Pérez-Gracia MT, Jordá J, Vega S, Marco-Jiménez F, Marin C (2019) Wild Bonelli's eagles (*Aquila fasciata*) as carrier of antimicrobial resistant *Salmonella* and *Campylobacter* in Eastern Spain. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 67, 101372.

21. Millán J, Aduriz G, Moreno B, Juste RA, Barral M (2004) *Salmonella* isolates from wild birds and mammals in the Basque Country (Spain). *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*, 23(3), 905-912.
22. Mindock CA, Petrova MA, Hollingsworth RI (2001) Re-evaluation of osmotic effects as a general adaptative strategy for bacteria in sub-freezing conditions. *Biophysical Chemistry*, 89(1), 13-24.
23. Mundy LS, Shanholtzer CJ, Willard KE, Peterson LR (1991) An evaluation of three commercial fecal transport systems for the recovery of enteric pathogens. *American journal of clinical pathology*, 96(3), 364-367.
24. Natvig EE, Ingham SC, Ingham BH, Cooperband LR, Roper TR (2002) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli* contamination of root and leaf vegetables grown in soils with incorporated bovine manure. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(6), 2737-2744.
25. Niemira BA, Sommers CH, Boyd G (2003) Effect of freezing, irradiation, and frozen storage on survival of *Salmonella* in concentrated orange juice. *Journal of food protection*, 66(10), 1916-1919.
26. Opara OO, Mallinson ET, Tate CR, Carr LE, Miller RG, Stewart L, Kelleher C, Johnston RW, Joseph SW (1992) The effect of exposure, storage times, and types of holding media on the drag-swab monitoring technique for *Salmonella*. *Avian diseases*, 63-68.
27. Pal A, Marshall DL (2009) Comparison of culture media for enrichment and isolation of *Salmonella* spp. from frozen Channel catfish and Vietnamese basa fillets. *Food microbiology*, 26(3), 317-319.
28. Palmgren H, McCafferty D, Aspan A, Broman T, Sellin M, Wollin R, Bergström S, Olsen B (2000) *Salmonella* in sub-Antarctica: low heterogeneity in *Salmonella* serotypes in South Georgian seals and birds. *Epidemiology & Infection*, 125(2), 257-262.
29. Ramamurthy T, Ghosh A, Pazhani GP, Shinoda S (2014) Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria. *Frontiers in public health*, 2, 103.
30. Reche MP, Jiménez PA, Alvarez F, Garcia De Los Rios JE, Rojas AM, De Pedro P (2003) Incidence of *salmonellae* in captive and wild free-living raptorial birds in central Spain. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 50(1), 42-44.
31. Rocard JM, Asadishad B, Samonte PRV, Ghoshal S, Tufenkji N (2018) Natural freeze-thaw cycles may increase the risk associated with *Salmonella* contamination in surface and groundwater environments. *Water research X*, 1, 100005.
32. Rula O, Maiboroda O, Kryvoshei Y, Gerashchenko N, Muzyka D, Stegnyy BT (2019) Monitoring for the circulation of antibiotic-resistant *Salmonella* in poultry and wild birds in Ukraine in 2017. *International Journal of Infectious Diseases*, 79, 42.

33. Semenov AV, Van Bruggen AH, Van Overbeek L, Termorshuizen AJ, Semenov AM (2007) Influence of temperature fluctuations on *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in cow manure. *FEMS microbiology ecology*, 60(3), 419-428.
34. Strawn LK, Danyluk MD (2010) Fate of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* spp. on fresh and frozen cut mangoes and papayas. *International journal of food microbiology*, 138(1-2), 78-84.
35. Troxler S, Hess C, Konicek C, Knotek Z, Barták P, Hess M (2017) Microdilution testing reveals considerable and diverse antimicrobial resistance of *Escherichia coli*, thermophilic *Campylobacter* spp. and *Salmonella* spp. isolated from wild birds present in urban areas. *European journal of wildlife research*, 63(4), 68.
36. Vidal AB, Rodgers J, Arnold M, Clifton-Hadley F (2013) Comparison of different sampling strategies and laboratory methods for the detection of *C. jejuni* and *C. coli* from broiler flocks at primary production. *Zoonoses and public health*, 60(6), 412-425.
37. Wasfy M, Oyofu B, Elgindy A, Churilla A (1995) Comparison of preservation media for storage of stool samples. *Journal of clinical microbiology*, 33(8), 2176-2178.

4.3. Estudio de *Salmonella* y las resistencias a antimicrobianos asociadas en aves urbanas de la Comunidad de Madrid

4.3.1. Resumen

Las resistencias a antimicrobianos (AMR) es uno de los principales retos del siglo XXI. Las aves silvestres han sido descritas como reservorios de resistencias a antimicrobianos en diferentes especies bacterianas como *Salmonella* spp. Por otro lado, la escasez de alimento, el cambio climático y el crecimiento demográfico de los últimos años han forzado a numerosas especies de fauna silvestre a modificar sus hábitos alimentarios acercándose a zonas urbanas. En este contexto, el objetivo de este estudio fue detectar la presencia de *Salmonella*, junto con la de AMR, en aves silvestres que habitan en las ciudades y alrededores. Para ello, un total de 300 aves urbanas fueron incluidas, de las cuales se recogió un hisopo cloacal para la detección de *Salmonella*. Las muestras se procesaron siguiendo las recomendaciones de la norma ISO 6579-1:2017 (Anexo D), y el serotipado de las cepas aisladas se realizó de acuerdo con el esquema de White-Kauffman-Le Minor. El análisis de susceptibilidad a antimicrobianos se realizó de acuerdo con las recomendaciones de la Decisión Europea 2013/652/EU. Del total de muestras recogidas, se aisló *Salmonella* en el 12,3%, siendo las cigüeñas blancas provenientes de vertederos las aves con mayor porcentaje de positividad ($p < 0,05$). Los serotipos más frecuentemente hallados fueron zoonóticos (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y mST). Además, el 40,5% de las cepas aisladas mostraron resistencias, principalmente frente a ciprofloxacino (36,4%), ácido nalidíxico (36,4%) y colistina (27,3%). Estos resultados muestran la importancia del control del consumo de antimicrobianos, así como de la gestión de los residuos que generan a fin de disminuir el desarrollo de AMR en núcleos urbanos que puedan diseminarse por el medio ambiente. Para ello es vital la cooperación entre la comunidad científica, la administración pública y la población en general.

4.3.2. Referencias

Artículo científico:

Referencia bibliográfica: Martín-Maldonado, B., Vega, S., Mencía-Gutiérrez, A., Lorenzo-Rebenaque, L., de Frutos, C., González, F., Revuelta, L. & Marin, C. (2020). Urban birds: An important source of antimicrobial resistant *Salmonella* strains in Central Spain. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 101519.

Índice de Impacto de la revista: 1.573 en JCR en 2019 en Veterinary Science

Posición de la revista: Q2 en JCR en 2019 en Veterinary Science

Proceedings:

- Martín-Maldonado, B.; González, F.; Mencía-Gutiérrez, A.; López, I.; Suárez, L.; Moraleda, V.; Revuelta, L.; Marín, C.; Vega, S. "*Salmonella* spp detection in white storks and ring doves admitted at a wildlife rescue center in central Spain". 4th International Conference on Avian, Herpetological and Exotic Mammal Medicine – ICARE (Abril, 2019), London (UK). Póster.
- Martín-Maldonado, B.; Revuelta, L.; Vega, S.; Marín, C. "Importancia de los residuos urbanos en la diseminación de resistencias a antimicrobianos en *Salmonella* spp". V Jornadas de Investigación en Doctorado - PhDay Complutense – VETINDOC (Junio, 2019), Madrid. Comunicación oral.



Contents lists available at ScienceDirect

Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cimid

Urban birds: An important source of antimicrobial resistant *Salmonella* strains in Central Spain

B. Martín-Maldonado^{a,e,*}, S. Vega^{d,e}, A. Mencía-Gutiérrez^{a,c}, L. Lorenzo-Rebenaque^d,
C. de Frutos^b, F. González^{a,c}, L. Revuelta^{c,e}, C. Marin^{d,e}

^a Hospital de Fauna Salvaje, Grupo de Rehabilitación de la Fauna Autóctona y su Hábitat (GREFA), Madrid, Spain

^b Laboratorio Central de Veterinaria, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid, Spain

^c Departamento de Fisiología Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

^d Instituto de Ciencias Biomédicas, Departamento de Producción Animal, Sanidad Animal y Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad CEU-Cardenal Herrera, Valencia, Spain

^e Grupo de Estudio de la Medicina y Conservación de la Fauna Silvestre (GEMAS), Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Landfills
Urban birds
White stork
Salmonella
AMR
Quinolones
Colistin

ABSTRACT

Antimicrobial resistance (AMR) is one of the most important threats of the 21st century. Wild birds have been described as reservoirs of AMR in different bacterial species, such as *Salmonella* spp. Privation of food, climate change and overpopulation have forced many wild species to modify their feeding habits, attending urban areas. In this context, the aim of this study was to study *Salmonella* presence, as well as related AMR in urban birds that inhabit the city and its surroundings. A total of 300 urban birds were sampled for *Salmonella* detection according to the ISO 6579-1:2017 (Annex D) recommendations, and serotyping was carried out according to the White-Kauffman-Le Minor scheme. Antimicrobial susceptibility was tested following 2013/652/EU Decision guides. Wild birds analysed were positive for *Salmonella* in 12.3% of cases, with white storks fed in landfills as the most *Salmonella* prevalent species ($p < 0.05$). The most common serovars isolated were zoonotic (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* and *S. Typhimurium* monophasic variant). From *Salmonella* isolated strains, 40.5% were resistant to the most prevalent AMRs found in urban birds were ciprofloxacin (36.4%), nalidixic acid (36.4%) and colistin (27.3%). The scientific community, public administration and population in general should work together to control antimicrobial administration and drug waste management in order to decrease the development and spread of AMR.

1. Introduction

One health, the relationship between human, animal and environmental health, is one of the most important interdisciplinary integrations of medicine [1]. The phenomenon of urbanisation has a profound impact on ecological systems [2], and forces animals to change their feeding habits, nesting areas or even migration patterns. A multitude of species coexist today in urban areas (pigeons, sparrows, starlings, lizards, geckos, or even raccoons and wild boars), using the resources that human activity provides them to live, feed and reproduce [3].

The increase in human populations results in an increase in daily-renewed urban waste: meat, fish, chicken, fruit, etc. Many studies document the use of landfills by different species of wild bird, as dumping sites and supplier markets are excellent areas for these species to feed easily [4–6]. Moreover, the constant availability of food

resources in cities and milder winter temperatures, due to climate change, allow certain wild species to make shorter migrations or even halt their migration to form resident populations as urban birds (UB) [7]. In Spain, gulls and storks are two examples of this situation [5,8,9].

However, feeding based in wastes can favour the development of some nutritional diseases (vitamin and others nutrient deficiencies), intoxications (botulism, salmonellosis, colibacillosis, etc.), the bioaccumulation of metals as well as other noxious substances (lead, pesticides, etc.), or pathologies caused by waste such as plastics [10–12]. Moreover, poor waste management favours the accumulation of harmful substances in landfills, mostly drugs such as anti-inflammatory or antimicrobials. In this context, landfills can be a source of multi-resistant strains of many bacterial species for UB, which can become a source of contamination [13,14].

Antimicrobial resistance (AMR) is one of the most important threats

* Corresponding author at: Hospital de Fauna Salvaje, GREFA. C/ Monte del Pilar, s/n, CP 28220, Majadahonda (Madrid), Spain.
E-mail address: barbara@grefa.org (B. Martín-Maldonado).

<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2020.101519>

Received 12 October 2019; Received in revised form 10 July 2020; Accepted 14 July 2020
0147-9571/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

in the 21st century, with implications of increased morbidity, mortality and cost rates [15,16]. Moreover, numerous AMR have been reported in *Enterobacteria* isolated from untreated urban wildlife, such as *Salmonella* spp. Resistant bacteria can be spread over large distances or increase the likelihood of uptake with close contact, as UB is an important vector for AMR [17,21].

The widespread distribution of *Salmonella* in birds makes them a great indicator for the AMR situation in wildlife, as it can colonise the intestine of most homeothermic animals, humans included. *Salmonella* is the second most prevalent zoonosis in the EU, with more than 91,000 cases reported in 2017 [22]. Generally, the clinical signs are those of acute gastroenteritis, but salmonellosis can also cause severe syndromes such as Reiter's Syndrome and Typhoid Fever in children and elderly people [23]. Wild animals might play a significant role in transmission of the pathogen in the environment; wild birds have been described as an asymptomatic reservoir of *Salmonella* and they are considered an important vector for the transfer of AMR bacteria in cattle, livestock and the environment [20,24]. The range of *Salmonella* detection in UB in Europe varies from 0% to 50% depending on the species, being more prevalent in gulls and storks [20,24]. More isolated serotypes in wild birds were *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Indiana* and *S. Enteritidis*, some of most frequently isolated serotypes in human salmonellosis outbreaks [20,22,25]. In this context, the aim of this study was to investigate *Salmonella* presence, as well as related AMR in wild birds that inhabit the city and its surroundings.

2. Material and methods

2.1. Study population

For this study, different UB species from the Community of Madrid (Spain) were sampled upon their admission to a wildlife rescue centre (GREFA, Madrid), from June 2018 to January 2019, following the principles of animal care published by Spanish Royal Decree 53/2013 (BOE, 2013). The birds' admission to the centre was due to several causes: nest fall, trauma and others causes such as botulism, gizzard impaction or being trapped in buildings. Birds were identified by species and classified by age as young (including nestlings and fledglings) or adults. Individuals belonging to the following species were included in the study: white storks (*Ciconia ciconia*), lesser black-backed gulls (*Larus fuscus*), common wood pigeons (*Columba palumbus*), common starlings (*Sturnus vulgaris*) and house sparrows (*Passer domesticus*). For the purpose of this study, the environment where they inhabit was recorded as urban or rural areas. In the case of gulls, urban individuals were always related to landfills. For white storks, the environment where they inhabit were three: urban, rural area and landfills.

Once all the information related to the bird was recorded, a first examination was performed at the hospital and the clinical signs were recorded. When necessary, haematology, biochemistry, radiography and ultrasonography were performed. From each animal, a cloacal swab was taken at each first examination, before any treatment was administered. Swabs were maintained at 4°C and processed within 24 h after collection.

2.2. Microbiological analysis

The collected samples were analysed according to ISO 6579-1:2017 (Annex D) [26]. First, the samples were pre-enriched in 1:10 vol/vol buffered peptone water 2.5% (Scharlau, Barcelona, Spain) and then incubated at 37 ± 1°C for 18 ± 2 h. Then, 100 µL of pre-enriched samples were transferred onto Semi-Solid Modification Rappaport Vassiliadis (MSRV, Difco, Valencia, Spain) and incubated at 41.5°C for 24–48 h. The culture obtained in MSRV was inoculated onto a chromogenic agar specific for detection of C8-esterase activity (ASAP, bio-Merieux, Marcy l'Étoile, France), and incubated at 37 ± 1°C for 24–48 hours. After incubation, positive colonies of *Salmonella* were

streaked onto the surface of pre-dried nutrient agar plates (International Organisation for Standardisation) 37 ± 1°C for 24 h. Moreover, *Salmonella* strains isolated were serotyped at the National Reference Laboratory for Animal Salmonellosis (Madrid, Spain). The method used for serotyping was antigenic agglutination with specific antisera according to the White-Kauffmann-Le Minor scheme [27].

Finally, the AMR was determined at the National Reference Laboratory for Animal Salmonellosis (Madrid, Spain). For the procedure, ISO 20776-1:2006 recommendations were followed, performing a Mueller-Hinton broth micro dilution to determine the minimum inhibitory concentration (MIC), using the epidemiologic breakpoints from the EUCAST recommendations [28,29] [30]. According to the 2013/652/EU Decision [31] a panel of 14 antimicrobials were tested from different families, including two quinolones: ciprofloxacin (CIP) and nalidixic acid (NA); four β-lactams: ampicillin (AMP), ceftazidime (CAZ) and meropenem (MEM); one phenicol: chloramphenicol (CHL); one sulphonamide: sulfamethoxazole (RL); one polymyxin: colistin (COL); one macrolide: azithromycin (AZM); one glycolcycline: tigecycline (TGC); one aminoglycoside: gentamycin (GN); one pyrimidine: trimethoprim (W) and one tetracycline: tetracycline (TCY). Azithromycin and sulfamethoxazole have no defined breakpoint, so they could not be interpreted. A multidrug-resistant (MDR) strain was considered when the isolate was non-susceptible to at least one antimicrobial agent in two or more antimicrobial categories.

2.3. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using a commercially available software application (SPSS 21.0 software package; SPSS Inc., Chicago, IL, 2002). A General Linear Model was performed to assess the relationship between *Salmonella* presence and different UB species characteristics (age, pathology and environment). Moreover, a chi-squared test was performed to study the relationship between *Salmonella* and their AMR. Finally, a chi-squared test was done to study the relationship between each serovar and its UB origin. A *p*-value ≤ 0.05 was considered to indicate a statistically significant difference.

3. Results

From June 2018 to January 2019, a total of 300 UB from the Community of Madrid (Spain) were sampled: white storks (*n* = 100), lesser black-backed gulls (*n* = 25), common wood pigeons (*n* = 100), house sparrows (*n* = 50) and common starlings (*n* = 25). According to bird age, 72% (*n* = 216) of the admissions were young and 28% (*n* = 84) adults. In addition, the reasons for admission to the hospital were mainly related to nest fall (134/300) and trauma (92/300). However, 24.7% did not present any pathology.

From all animals sampled, 12.3% (37/300) were positive for *Salmonella* spp. A wide range of *Salmonella* infection rate was observed depending on the UB specie analysed (*p* = 0.002). From *Salmonella*-positive birds (*n* = 37), the most infected species were white storks (59.5%, *n* = 22), followed by common wood pigeons (18.9%, *n* = 7), lesser black-backed gulls (13.3%, *n* = 5), house sparrows (5.4%, *n* = 2) and common starlings (2.7%, *n* = 1). According to age, 73% (27/37) of positive birds were young and 27% (10/37) adults. In addition, pathologies were mainly related to nest fall (19/37) and trauma (8/37). It is important to highlight that no significant differences were found between the bird age or pathology observed and *Salmonella* status of the animal (*p* > 0.05).

When the relationship between *Salmonella* status and the environment inhabited by UB was analysed, no statistical differences were found between *Salmonella* prevalence obtained in urban areas assessed (outskirts or city). However, when white storks had access to landfills, statistical differences were found (*p* = 0.031). From all *Salmonella* infected white storks (22/100), 77.3% (17/22) inhabited landfills, 18.2% (4/22) the city centre and 4.5% (1/22) the outskirts. In the case of

Table 1
Percentage of each *Salmonella* serovar isolated by species.

<i>Salmonella</i> serovars	n	Total (%)	Species (%)				
			White storks	Common woodpigeons	Lesser black-backed gulls	House sparrows	Common starlings
Enteritidis	16	43.2	68.7	18.7	–	6.2	6.2
Typhimurium	6	16.2	16.7	66.7	16.7	–	–
mST	5	13.5	60	–	20	20	–
Chester	2	5.4	100	–	–	–	–
Infantis	2	5.4	50	–	50	–	–
Kentucky	2	5.4	50	–	50	–	–
Abony	2	5.4	100	–	–	–	–
Pomona	1	2.7	100	–	–	–	–
Saintpaul	1	2.7	–	–	100	–	–
<i>Salmonella</i> spp.	37	12.3	–	–	–	–	–

n = number of isolates from each serovar.

lesser black-backed gulls, the only five positive individuals were related to landfill areas. Nevertheless, no statistical differences were found in that studied species.

The most prevalent serovar isolated from UB was *S. Enteritidis* (43.2 %, n = 16). From all *S. Enteritidis* strains isolated, 50 % (8/16) were isolated from white storks feeding in landfills. Moreover, *S. Enteritidis* serovar was also isolated in white stork from the city environment (n = 2) and outskirts (n = 1). The second and third most prevalent serovars were *S. Typhimurium* (16.2 %, n = 6) and *S. Typhimurium* monophasic variant (mST) (13.5 %, n = 5). *S. Typhimurium* was isolated from common wood pigeons (n = 4), white storks (n = 1) and gulls (n = 1) and, mST from white storks (n = 3), gulls (n = 1) and sparrows (n = 1). The less prevalent serovars isolated in this study were: *S. Chester*, *S. Infantis*, *S. Kentucky* and *S. Abony* (5.4 %, n = 2, respectively) and, *S. Pomona* and *S. Saintpaul* (2.7 %, n = 1, respectively). *Salmonella* serovars isolated from different UB species are summarised in Table 1.

3.1. Prevalence of AMR

For all strains isolated (n = 37), 40.5 % (n = 15) were resistant to at least one of the 12 antimicrobials tested. For white storks, 45.5 % (10/22) of the isolated strains were AMR, followed by common wood pigeons (42.9 %, 3/7) and lesser black-backed gulls (20 %, 1/5). Moreover, one of two house sparrows' strains isolated are AMR. It should be noted that the only strain isolated from common starling was completely susceptible.

For all *Salmonella* strains isolated from white storks (n = 22), the highest percentage of AMR was found in CIP and NA (36.4 %, respectively), followed by COL (27.3 %), TCY (13.6 %) and AMP (9.1 %). Moreover, statistical differences were found between the environment inhabited by white storks and the AMR detected, being landfills where more AMR *Salmonella* strains were isolated ($p < 0.05$). Regarding lesser black-backed gulls and house sparrows, resistances to AMP (1/5 and 1/2, respectively) and TCY (1/5 and 1/2, respectively) were found. Finally, for common wood pigeons, the highest percentage of AMR was found also to CIP (3/7) and NA (3/7), followed by COL (2/7). No statistical differences were found for UB (except white storks) and the environment they inhabit ($p > 0.05$). It is important to highlight that all the isolates were susceptible to AZM, FOX, CAZ, CHL, GN, MEM, RL, TGC and W. The AMR *Salmonella* strains isolated per UB species are summarised in Table 2.

3.2. Prevalence of multi-drug resistance

From all the resistant isolates (n = 15), 86.7 % were considered MDR, as they were resistant to at least one antimicrobial of two different categories. The highest percentage of MDR bacteria was found for storks (90 %, 9/10), followed by common wood pigeons (66.7 %, 2/

Table 2
Number of *Salmonella* strains isolated with antimicrobial resistance pattern according to the UB species.

Species	n	CIP	NA	AMP	COL	TCY
White storks	10	8	8	2	6	3
Common woodpigeons	3	3	3	–	2	–
Lesser black-backed gulls	1	–	–	1	–	1
House sparrows	1	–	–	1	–	1
Common starlings	–	–	–	–	–	–
Total	15	11	11	4	8	5

n. number of antimicrobial resistant strains, CIP: ciprofloxacin, NA: nalidixic acid, AMP: ampicillin, COL: colistin, TCY: tetracycline.

3). Moreover, the resistant strains isolated from lesser black-backed gulls and house sparrows were multi-resistant.

3.3. Antimicrobial resistance patterns

For white storks, 3 (13.6 %) *Salmonella* strains were resistant to two antimicrobials and 7 (31.8 %) to three. For common wood pigeons, 4 (57.1 %) *Salmonella* isolates were completely susceptible to all the antimicrobials tested, 1 (14.3 %) isolate was resistant to two antimicrobials and 2 (28.6 %) to two. For lesser black-backed gulls, 4 (80.0 %) of the isolates were completely susceptible and 1 (20 %) was resistant to two antimicrobials. Finally, for house sparrows, 1 (50 %) *Salmonella* isolate was resistant to two of the antimicrobials tested.

Overall, four different resistance patterns were observed. The combination of CIP-NA-COL (n = 8, 53.3 %) was most frequently observed, followed by the AMP-TCY combination (n = 4, 26.7 %), the CIP-NA combination (n = 2, 13.3 %) and, finally, the CIP-NA-TCY combination (n = 1, 6.7 %). In this sense, it is important to highlight that 5 of the 8 *S. Enteritidis* isolates from white storks which had access to landfills were multi-resistant and all of them had the resistance pattern CIP-NA-COL.

4. Discussion

Nowadays, cities constitute a shared environment between human and UB, which take advantage of the waste produced by human to feed [4]. The close association between humans and UB facilitates the risks of pathogen dissemination and so their AMR [20,21].

The role of UB as a *Salmonella* reservoir is of increasing interest, as wild birds have been outstanding as a source in the dissemination of *Salmonella* spp. [32–34]. Thus, a relationship has been documented between *Salmonella* strains isolated from UB and cattle, livestock and environment [20,24,35,36].

This study showed a *Salmonella* prevalence of 12.3 % in UB analysed. It is important to highlight the high incidence of *Salmonella* spp.

in white storks, especially young birds feeding in landfills [14]. The role of landfills is particularly noteworthy, as they provide UB with a constant source of food. This seems to be particularly evident in white storks and lesser black-backed gulls [5,37], where some researchers have found a relationship between the feeding habits of the birds and the prevalence of bacteria [37,28]. *Salmonella* occurrence in white storks found in this study was in accordance with a recent study carried out in central Spain on white storks that feed in landfills, where 34.8 % of animals were *Salmonella*-positive [39]. This fact highlights the role of landfills in the potentiation of wild birds as reservoirs, amplifiers and disseminators of *Salmonella* [32]. Recently, a relationship was demonstrated between farm waste contaminated with *Salmonella* and wild bird infection [40,41]. Contaminated waste from different origins could contaminate landfills and consequently the wild animals that feed from them [35], providing new *Salmonella* pathways from wild animals [33].

Young birds have been shown to carry more *Salmonella* than adults [42]. From positive UB, young individuals were shedding the bacteria in 72.9 % of cases. This fact may be because of multiple changes in gut microbiota within a short timespan during nestling development, due to the replacement and settling in of more stable bacterial taxa [42,43]. It is important to consider the nest placement effect on the nestling gut microbiota, which gives rise to differences in the bacterial communities. In this line, some UB such as white storks prefer to build their nests near landfills [5,42]. Thus, the *Salmonella* present in landfills would already be affecting chicks from the nest. In addition, if parent faeces or the remains of prey contaminate the nest, the nestlings could become infected with the bacteria [35,42]. In this sense, contamination of environment, agriculture fields or other wild animals by UB is recognised as an important risk factor for the transmission of AMR or pathogens, such as *Salmonella* [44,45].

In this study, nine different serovars were isolated from the different UB. Eight of them are considered zoonotic serovars, as they have been isolated in different human salmonellosis outbreaks [22,46,47]. The *Salmonella* serovar most frequently detected in this study was *S. Enteritidis*. Previously, the same serovars have been described in free-living bird studies and in domestic animals (poultry and pigs), as well as human outbreaks [22,41,48,49]. In addition, *Salmonella* strains isolated from UB mostly feeding in landfills correspond to serovars commonly isolated in livestock [22,49]. This fact supports the hypothesis that contaminated waste present in landfills is a source of UB *Salmonella* infections. Moreover, the second and third most prevalent serovars isolated in this study, *S. Typhimurium* and mST, have also been described in wild birds related to swine farms as a primary source of *Salmonella* [41,49]. In particular, the mST was initially characterised from pig samples in Spain, and today is considered an emerging pathogen associated with human and swine infections worldwide [49].

One of the most relevant results of this study is the level of AMR isolated from UB, especially those that live close to landfills. Recently, there has been increasing interest in resistant bacteria and resistance genes isolated from wildlife and the environment [38,40,41,50]. In our study, the NA-CIP-COL resistance pattern is especially noteworthy. Three antimicrobials are last-resort drugs used to treat human infectious diseases caused by multi-resistant bacteria [16,51]. Interestingly, this study reveals that the risk of AMR strains increases at landfills (21.6 %). According to the ecology and habits, UB could be more or less exposed to AMR bacteria and can play an important role in the spread of antimicrobial resistance genes [39,52]. Patterns of antimicrobial resistance in UB species may be developed by different factors, such as extensive use in human and/or veterinary medicine, a long time since their introduction in the market, or easy access to antimicrobials [40,52,53]. Overall, these facts confirm a long-lasting and constant selective pressure on environmental bacteria [40,52,53].

Resistance to NA and CIP were addressed combined, as they belong to the same class of antimicrobials: quinolones [16]. Both antimicrobials have been widely employed in veterinary medicine to treat infections, as growth promoters and to prevent disease in production

animals [52]. In consequence, a statistically significant increase in quinolone resistance has been observed in Spain [16]. These findings are particularly striking, as quinolones are synthetic antimicrobials, so bacteria have no natural resistance mechanism. Therefore, the spread of resistance to quinolones should be limited [52]. Furthermore, COL had been widely applied in food-producing animals over the years, but its use is now very restricted in animal health, as it represents the last line of defence against pan-resistant infections in humans. Despite the measures carried out to reduce the consumption of antimicrobials, the percentage of COL-resistant strains in UB that feed on landfills is critical and represent an important risk of colistin resistance spread. It is important to highlight that environmental bacteria may obtain resistance genes from resistant bacteria or from natural sources of antimicrobials, including urban environments [40,50,52]. Other studies reported that the resistance might easily transferred to microbiota bacteria, or to environmental bacteria, which can act as reservoirs and be a source of AMR [54]. In this context, the scientific community, public administration and the population in general should work together to control antimicrobial administration and drug waste management in order to minimise the development and spread of antimicrobial resistance.

CRedit authorship contribution statement

B. Martín-Maldonado: Methodology, Investigation, Writing - original draft. **S. Vega:** Conceptualization, Visualization, Funding acquisition. **A. Mencía-Gutiérrez:** Methodology. **L. Lorenzo-Rebenaque:** Writing - review & editing. **C. de Frutos:** Methodology, Writing - review & editing. **F. González:** Resources, Funding acquisition. **L. Revuelta:** Resources. **C. Marin:** Formal analysis, Validation, Resources, Supervision, Project administration.

Declaration of Competing Interest

The authors have no affiliation with or involvement in any organization or entity with any financial interest (such as honoraria; educational grants; participation in speakers' bureaus; membership, employment, consultancies, stock ownership or other equity; and expert testimony or patent-licensing arrangements), or non-financial interest (such as personal or professional relationships, affiliation, knowledge or beliefs) in the subject matter or materials discussed in the manuscript.

Acknowledgements

This study was funded by the CEU-Cardenal Herrera University (project INDI12/32 and IDOC18-12), and University Complutense of Madrid and GREFA (Madrid). We would like to thank the GEMAS Research Group (Grupo de Estudio de Medicina y Conservación de Animales Salvajes), the National Reference Laboratory for Animal Salmonellosis (LCV, Algete, Madrid) and all the GREFA volunteers for their technical support, especially Carolina Gusmão, Pablo Rodríguez Alcázar and Francisco J. García-Peña. Laura Lorenzo-Rebenaque was supported by a research grant from the Universidad Cardenal Herrera-CEU (programme FPI/CEU-UCH).

References

- [1] J.P.S. Neo, B.H. Tan, The use of animals as a surveillance tool for monitoring environmental health hazards, human health hazards and bioterrorism, *Vet. Microbiol.* 203 (2017) 40–48, <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.02.007>.
- [2] D. Hoornweg, P. Bhada-Tata, What a Waste: A Global Review of Solid Waste Management 15 World Bank, Washington, DC, 2012, p. 116.
- [3] A.C. Miranda, Mechanisms of behavioural change in urban animals: the role of microevolution and phenotypic plasticity, *Ecology and Conservation of Birds in Urban Environments*, Springer, Cham, 2017, pp. 113–132.
- [4] D. Oro, M. Genovart, G. Tavecchia, M.S. Fowler, A. Martínez-Abraín, Ecological and evolutionary implications of food subsidies from humans, *Ecol. Lett.* 16 (2013) 1501–1514, <https://doi.org/10.1111/ele.12187>.
- [5] N.I. Gilbert, R.A. Correia, J.P. Silva, C. Pacheco, I. Catry, P.W. Atkinson, J.A. Gill, A.M. Franco, Are white storks addicted to junk food? Impacts of landfill use on the

- movement and behaviour of resident white storks (*Ciconia ciconia*) from a partially migratory population, *Mov. Ecol.* 4 (2016) 7, <https://doi.org/10.1186/s40462-016-0070-0>.
- [6] P.I. Plaza, S.A. Lambertucci, How are garbage dumps impacting vertebrate demography, health, and conservation? *Glob. Ecol. Conserv.* 12 (2017) 9–20, <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2017.08.002>.
 - [7] D.S. Wilcove, M. Wikelski, Going, going, gone: is animal migration disappearing, *PLoS Biol.* 6 (7) (2008) e188, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060188>.
 - [8] I. Galván, J. Marchamalo, V. Bakken, J.M. Traverso, The origin of lesser black-backed gulls *Larus fuscus* wintering in central Iberia, *Ring. Migr.* 21 (2003) 209–214, <https://doi.org/10.1080/03078698.2003.9674295>.
 - [9] I. Catry, V. Encarnaçao, C. Pacheco, T. Catry, P. Tenreiro, L.P. da Silva, F. Leão, F. Bally, S. Roda, S. Lopes, C. Capela, H. Alonso, S. Saldanha, O. Urbano, J. Saraiva, P. Encarnaçao, N. Sequeira, M. Mendes, P. Monteiro, G. Elias, F. Moreira, Recent changes on migratory behavior of the White stork (*Ciconia ciconia*) in Portugal: towards the end of migration? *Airo* 24 (2017) 28–35.
 - [10] M.A. Taggart, N. Richards, C.A. Kinney, Impacts of pharmaceuticals on terrestrial wildlife, *Int. J. Sci. Environ. Technol.* (2015) 216–254.
 - [11] P.I. Plaza, S.A. Lambertucci, More massive but potentially less healthy: black vultures feeding in rubbish dumps differed in clinical and biochemical parameters with wild feeding birds, *Peer J.* 6 (2018) e4645, <https://doi.org/10.7717/peerj.4645>.
 - [12] S. Seif, J.F. Provencher, S. Avery-Gomm, P.Y. Daoust, M.L. Mallory, P.A. Smith, Plastic and non-plastic debris ingestion in three gull species feeding in an urban landfill environment, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 74 (2018) 349–360, <https://doi.org/10.1007/s00244-017-0492-8>.
 - [13] A. Camarda, E. Circella, D. Giovanardi, D. Pennelli, P. Battista, E. Campagnari, G. Bruni, S. Tagliabue, Avian pathogenic *Escherichia coli* in Audouin gulls (*Larus audouinii*) could they affect the surviving of the bird colonies? *Ital. J. Anim. Sci.* 6 (2007) 317–320, <https://doi.org/10.4081/ijas.2007.317>.
 - [14] M. Camacho, J.M. Hernández, J.F. Lima-Barbero, U. Höfle, Use of wildlife rehabilitation centres in pathogen surveillance: a case study in white storks (*Ciconia ciconia*), *Prev. Vet. Med.* 130 (2016) 106–111, <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.06.012>.
 - [15] J. O'Neill, Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations, *Rev. Antimicrob. Resist.* 20 (2014) 1–16.
 - [16] EFSA (European Food Safety Authority), The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017, *EFSA J.* 17 (2019) 5598.
 - [17] M. Dolejska, M. Masarikova, H. Dobiasova, I. Jamborova, R. Karpiskova, M. Havlicek, N. Carlile, D. Priddel, A. Cizek, I. Literak, High prevalence of *Salmonella* and IMP-4-producing *Enterobacteriaceae* in the silver gull on Five Islands, Australia, *J. Antimicrob. Chemother.* 71 (2015) 63–70, <https://doi.org/10.1093/jac/dkv306>.
 - [20] S. Troxler, C. Hess, C. Konicek, Z. Knotek, P. Barták, M. Hess, Microdilution testing reveals considerable and diverse antimicrobial resistance of *Escherichia coli*, thermophilic *Campylobacter* spp. and *Salmonella* spp. isolated from wild birds present in urban areas, *Eur. J. Wildl. Res.* 63 (2017) 68, <https://doi.org/10.1007/s10344-017-1125-2>.
 - [21] M.C. De Oliveira, B.Q. Camargo, M.P. Cunha, A.B. Saidenberg, R.H. Teixeira, C.E. Matajira, L.Z. Moreno, V.T. Gomes, A.P. Christ, M.R. Barbosa, M.I. Sato, A.M. Moreno, T. Knöbl, Free-ranging synanthropic birds (*Ardea alba* and *Columba livia domestica*) as carriers of *Salmonella* spp. and Diarrheagenic *Escherichia coli* in the vicinity of an urban zoo, *Vector Borne Zoonotic Dis.* 18 (2018) 65–69, <https://doi.org/10.1089/vbz.2017.2174>.
 - [22] EFSA, The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017, *EFSA J.* 16 (2018) 5500.
 - [23] R. Kapoor, S.M. Azad, A. Mukherjee, S. Dhar, Reiter's disease in a 8-year-old boy, *Indian J. Pediatr.* 19 (2018) 154, https://doi.org/10.4103/ijpd.IJPD_14_17.
 - [24] R. Ramos, M. Cerdà-Cuellar, F. Ramirez, L. Jover, X. Ruiz, Influence of refuse sites on the prevalence of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* serovars in seagulls, *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (2010) 3052–3056, <https://doi.org/10.1128/AEM.02524-09>.
 - [25] L. Migura-García, R. Ramos, M. Cerdà-Cuellar, Antimicrobial resistance of *Salmonella* serovars and *Campylobacter* spp. isolated from an opportunistic gull species, yellow-legged gull (*Larus michahellis*), *J. Wildl. Dis.* 53 (2017) 148–152, <https://doi.org/10.7589/2016-03-051>.
 - [26] Boletín Oficial del Estado, Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia, (2013).
 - [27] ISO 6579-1:2017 (Annex D) Microbiology of the food chain, Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* spp. Part 1: Detection of *Salmonella* spp., International Organization for Standardization, Genève, Switzerland, 2017.
 - [28] P.A. Grimont, F.X. Weill, Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars, 9, WHO collaborating centre for reference and research on *Salmonella*, 2007, pp. 1–166.
 - [29] ISO 20776-1:2006 Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems, Susceptibility Testing of Infectious Agents and Evaluation of Performance of Antimicrobial Susceptibility Test Devices. Part 1: Reference Method for Testing the In Vitro Activity of Antimicrobial Agents Against Rapidly Growing Aerobic Bacteria Involved in Infectious Diseases, International Organization for Standardization, Genève, Switzerland, 2006.
 - [30] R. Leclercq, R. Cantón, D.F. Brown, C.G. Giske, P. Heisig, A.P. MacGowan, J.W. Mouton, P. Nordmann, A.C. Rodloff, G.M. Rossolini, C.J. Soussy, M. Steinbakk, T.G. Winstanley, G. Kahlmeter, EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing, *Clin. Microbiol. Infect.* 19 (2013) 141–160, <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03703.x>.
 - [31] European Commission, Commission implementing decision 2013/652/EU on the monitoring and reporting of antimicrobial resistance in zoonotic and commensal bacteria, Off. J. Eur. Union (2013) L 303 Luxembourg: Publications Office of the European Union. 14.11..
 - [32] I. Tizard, Salmonellosis in wild birds, *Semin. Avian Exotic Pet Med.* 13 (2004) 50–66, <https://doi.org/10.1053/j.saep.2004.01.008>.
 - [33] F. Hilbert, F.J.M. Smulders, R. Chopra-Dewasthaly, P. Paulsen, *Salmonella* in the wildlife-human interface, *Food Res. Int.* 24 (2012) 603–608, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.08.015>.
 - [34] M. Krawiec, M. Kuczowski, A.G. Kruszewicz, A. Wieliczko, Prevalence and genetic characteristics of *Salmonella* in free-living birds in Poland, *BMC Vet. Res.* 11 (2015) 15, <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0332-x>.
 - [35] S. Andrés, J.P. Vico, V. Garrido, M.J. Grilló, S. Samper, P. Gavín, S. Herrera-León, R.C. Mainar-Jaime, Epidemiology of subclinical salmonellosis in wild birds from an area of high prevalence of pig salmonellosis: phenotypic and genetic profiles of *Salmonella* isolates, *Zoonoses Public Health* 60 (2013) 355–365, <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2012.01542.x>.
 - [36] S. Andrés, J.P. Vico, V. Garrido, S. Samper, P. Gavín, S. Herrera-León, C. de Frutos, R.C. Mainar-Jaime, Role of wild bird and rodents in the epidemiology of subclinical salmonellosis in finishing pigs, *Foodborne Pathog. Dis.* 11 (2014) 689–697, <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1755>.
 - [37] A. Bárbara, O. Torrontegi, M.C. Camacho, M. Barral, J.M. Hernández, U. Höfle, Avian influenza virus surveillance in South-Central Spain using fecal samples of aquatic birds foraging at landfills, *Front. Vet. Sci.* 4 (2017) 178, <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00178>.
 - [38] N. Antilles, A. Sanglas, M. Cerda-Cuellar, Free-living waterfowl as a source of zoonotic bacteria in a dense wild bird population area in North-eastern Spain, *Trans. Bound Emerg. Dis.* 62 (2015) 516–521, <https://doi.org/10.1111/tbed.12169>.
 - [39] P. Gómez, C. Lozano, M.C. Camacho, J.F. Lima-Barbero, J.M. Hernández, M. Zarazaga, U. Höfle, C. Torres, Detection of MRSA ST3061-t843-mecC and ST398-t011-mecA in white stork nestlings exposed to human residues, *J. Antimicrob. Chemother.* 71 (2016) 53–57, <https://doi.org/10.1093/jac/dkv314>.
 - [40] A.A. Faruq, M.M. Hassan, M.M. Uddin, M.L. Rahman, T.M. Rakib, M. Alam, A. Islam, Prevalence and multidrug resistance pattern of *Salmonella* isolated from resident wild birds of Bangladesh, *One Health* 2 (2016) 35–41, <https://doi.org/10.14202/ijoh.2016.35-41>.
 - [41] C. Marin, C. Torres, F. Marco-Jiménez, M. Cerdà-Cuellar, S. Sevilla, T. Ayats, S. Vega, Supplementary feeding stations for conservation of vultures could be an important source of monophasic *Salmonella typhimurium* 1, 4, [5], 12: i-, *Sci. Total Environ.* 636 (2018) 449–455, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.310>.
 - [42] A. Teyssier, L. Lens, E. Matthyssens, J. White, Dynamics of gut microbiota diversity during the early development of an avian host: evidence from a cross-foster experiment, *Front. Microbiol.* 9 (2018) 1524, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01524>.
 - [43] K.D. Kohl, A. Brun, E. Caviedes-Vidal, W.H. Karasov, Age-related changes in the gut microbiota of wild House Sparrow nestlings, *IBIS* 161 (2019) 184–191, <https://doi.org/10.1111/ibi.12618>.
 - [44] J. Greig, A. Rajić, I. Young, M. Mascarenhas, L. Waddell, J. Lejeune, A scoping review of the role of wildlife in the transmission of bacterial pathogens and antimicrobial resistance to the food chain, *Zoonoses Public Health* 62 (2015) 269–284, <https://doi.org/10.1111/zph.12147>.
 - [45] J. Wang, Z.B. Ma, Z.L. Zeng, X.W. Yang, Y. Huang, J.H. Liu, The role of wildlife (wild birds) in the global transmission of antimicrobial resistance genes, *Zool. Res.* 38 (2017) 55–80, <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2017.003>.
 - [46] J. Taylor, E. Galanis, L. Wilcott, L. Hoang, J. Stone, J. Ekkert, D. Quibell, M. Huddleston, R. McCormick, Y. Whitfield, B. Adhikari, C.C.R. Grant, D. Sharma, An outbreak of *Salmonella* Chester infection in Canada: rare serotype, uncommon exposure, and unusual population demographic facilitate rapid identification of food vehicle, *J. Food Prot.* 75 (2012) 738–742, <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-408>.
 - [47] Centers for Disease Control Prevention, Human *Salmonella* Infections Linked to Small Turtles, December 6, 2012 (2012) <http://www.cdc.gov/salmonella/small-turtles-03-12/map.html>.
 - [48] C. Marin, M.D. Palomeque, F. Marco-Jiménez, S. Vega, Wild griffon vultures (*Gyps fulvus*) as a source of *Salmonella* and *Campylobacter* in eastern Spain, *PLoS One* 9 (2014) e94191, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094191>.
 - [49] G. Blanco, Supplementary feeding as a source of multiresistant *Salmonella* in endangered Egyptian vultures, *Transbound Emerg. Dis.* 65 (2018) 806–816, <https://doi.org/10.1111/tbed.12806>.
 - [50] H.K. Allen, J. Donato, H.H. Wang, K.A. Cloud-Hansen, J. Davies, J. Handelsman, Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments, *Nat. Rev. Microbiol.* 8 (2010) 251–259, <https://doi.org/10.1038/nrmicro2312>.
 - [51] W.V. Kern, Multiresistant Bacteria - antibiotic prescription and antibiotics of last resort, *Dtsch. Med. Wochenschr.* 143 (2018) 643–650, <https://doi.org/10.1055/s-0043-119958>.
 - [52] D.L. Carter, K.M. Docherty, S.A. Gill, K. Baker, J. Teachout, M.J. Vonnhoff, Antibiotic resistant bacteria are widespread in songbirds across rural and urban environments, *Sci. Total Environ.* 627 (2018) 1234–1241, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.343>.
 - [53] L. Pallecchi, A. Bartoloni, F. Paradisi, G.M. Rossolini, Antibiotic resistance in the absence of antimicrobial use: mechanisms and implications, *Expert Rev. Anti. Ther.* 6 (2008) 725–732, <https://doi.org/10.1586/14787210.6.5.725>.
 - [54] J. Bonnedahl, M. Drobní, M. Gauthier-Clerc, J. Hernandez, S. Granholm, Y. Kayser, A. Melhus, G. Kahlmeter, J. Waldenström, A. Johansson, B. Olsen, Dissemination of *Escherichia coli* with CTX-M type ESBL between humans and yellow-legged gulls in the south of France, *PLoS One* 4 (2009) e9598, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005958>.

5. *Discusión general*

A lo largo de este trabajo se pone de manifiesto la importancia del estudio de la fauna silvestre en su papel como agente diseminador de microorganismos de importancia en salud pública como *Salmonella*. Además, resalta la importancia del método de conservación de muestras en especies que habitan zonas remotas a fin de llevar un control más exhaustivo y comparable sobre el estado sanitario de los ecosistemas.

Numerosos estudios muestran la estrecha relación que existe en la actualidad entre el ser humano, los animales y el ecosistema a través de múltiples vías de conexión (*One Health*), de manera que cualquier efecto en uno de los tres sectores repercute de una manera u otra en los otros dos (Rhyan y Spraker, 2007). El concepto *One Health* o Única Salud se refiere a la necesidad de abordar las enfermedades desde un punto de vista más amplio, que incluya la salud pública, la sanidad animal y la salud de los ecosistemas (Zaragoza *et al.*, 2019). En las últimas décadas se ha producido un aumento exponencial en la diseminación de numerosos patógenos, en parte debido a la globalización, por lo que cada vez es más necesario un sistema de alerta temprana de posibles patógenos. En este sentido, el ecosistema se puede definir como un buen indicador del estado sanitario de una región, siendo de vital importancia el estudio de la fauna silvestre para este fin (Zaragoza *et al.*, 2019).

Salmonella sigue siendo hoy por hoy una de las zoonosis más importantes tanto en Europa, como en el mundo (WHO, 2018; EFSA, 2019). A lo largo de los últimos años se ha detectado un alto porcentaje de aves silvestres portadoras de *Salmonella* (Reche *et al.*, 2003; Millán *et al.*, 2004; Molina-López *et al.*, 2011:2015; Marin *et al.*, 2014:2018; Krawiec *et al.*, 2015; Jurado-Tarifa *et al.*, 2016; Mather *et al.*, 2016; Troxler *et al.*, 2017). Sin embargo, no todos los serotipos de *Salmonella* tienen la misma capacidad patógena, por lo que en el estudio de epidemiológico de dicha bacteria resulta imperativo la determinación de los serotipos de las cepas aisladas (WHO, 2018). Los serotipos detectados en fauna silvestre son variados. Un estudio realizado por Marin *et al.* (2014) en buitre leonado (*Gyps fulvus*) detectó hasta seis serotipos diferentes, entre los cuales se encontraba *S. Typhimurium*, uno de los serotipos más detectados en los casos de salmonelosis humana y animal. Otros serotipos como Enteritidis, mST, Infantis o Newport han sido también detectados en muestras procedentes de diferentes especies de aves silvestres (Andrés *et al.*, 2013; Molina-López *et al.*, 2015; Gruszynski *et al.*, 2014; Marin *et al.*, 2014:2018).

Por otro lado, en los últimos años las AMR han adquirido gran protagonismo en todo el mundo, presentándose a día de hoy como el mayor reto al que se enfrenta la medicina occidental moderna (O'Neil, 2014; EFSA, 2019). Se consideran responsables de cerca de 700.000 muertes al año en todo el mundo, no sólo por el fallo terapéutico directo que producen en enfermedades

infecciosas contraídas de manera primaria, sino por infecciones nosocomiales derivadas de la estancia en un hospital, donde el desarrollo de AMR por parte de las bacterias circulantes en ese entorno se eleva exponencialmente (Jasovsky *et al.*, 2016). Por esta razón, se considera de gran interés incluir el estudio de las AMR en las investigaciones bacteriológicas llevadas a cabo no sólo en humanos, sino también en animales, incluyendo la fauna silvestre. De esta manera, se pretende obtener una visión más global del problema a fin de establecer y mejorar protocolos que ayuden a frenar su expansión (Zaragoza *et al.*, 2019). Diversos estudios demuestran que la presión ambiental de antibióticos a las que se exponen las bacterias influye directamente en el desarrollo o adquisición de resistencias frente a estos antibióticos (Oteo-Iglesias, 2016). En base a esta teoría, cabría esperar un porcentaje bajo o nulo de bacterias resistentes aisladas de fauna silvestre. Numerosos estudios muestran porcentajes moderados de detección de AMR en estas especies, los cuales van en aumento con el tiempo (Allen *et al.*, 2010; Ramos *et al.*, 2010; Antilles *et al.*, 2015; Faruq *et al.*, 2016; Troxler *et al.*, 2017; Marin *et al.*, 2018; Sevilla *et al.*, 2020).

En este sentido, nuestro primer trabajo experimental se centró en el estudio epidemiológico de *Salmonella*, así como de las resistencias a antimicrobianos asociadas, en individuos jóvenes de águila de Bonelli presentes en nidos de la Comunidad Valenciana. Los resultados obtenidos fueron muy superiores a lo esperado (35,5%), confirma el potencial reservorio y diseminador que supone la fauna silvestre para la transmisión de esta bacteria (Martín-Maldonado *et al.*, 2019). Es importante señalar que, al no haber observado signos compatibles con salmonelosis en ninguno de los animales, podemos considerar a esta especie como reservorio asintomático. A pesar de que estudios previos demuestran la presencia de *Salmonella* en aves rapaces silvestres, la tasa de animales positivos por lo general es notablemente inferior a los obtenidos en nuestro trabajo, variando entre 4,2% y 8,5% en la Península Ibérica (Millan *et al.*, 2004; Molina-López *et al.*, 2015; Jurado-Tarifa *et al.*, 2016). Concretamente en el águila de Bonelli, Reche *et al.* (2003) no obtuvo ningún individuo positivo. Sin embargo, ese estudio incluyó únicamente individuos adultos, mientras que el nuestro se centra en pollos. Numerosas publicaciones confirman una mayor presencia de *Salmonella* en individuos jóvenes, debido probablemente a las variaciones que sufre la microbiota intestinal durante el desarrollo de las crías hasta constituir una microbiota estable (Teyssier *et al.*, 2018; Kohl *et al.*, 2019). Además, las crías de águila de Bonelli son alimentadas por los padres, durante sus fases de pollo y volantón, hasta que desarrollan por completo el plumaje y son capaces de volar y obtener por sí mismos alimento (Battisti *et al.*, 1998). De esta manera, los restos de alimento se juntan con las heces de las crías y parentales en el nido, en el que se encuentran las crías hasta su emancipación, favoreciendo la transmisión de bacterias entre parentales, crías y restos de

alimento. En cuanto a los serotipos más detectados en los individuos de águila de Bonelli analizados, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y *S. Houston* destacan claramente. Los tres serovares han sido previamente hallados en diferentes especies de aves silvestres y animales domésticos, y con una evidente capacidad zoonótica, poniendo de manifiesto la importancia de las aves silvestres portadoras en la circulación de la bacteria en el medio rural y en la transmisión de la misma entre fauna silvestre, animales domésticos, de granja y el ser humano (Marin *et al.*, 2014:2018; Blanco, 2018; EFSA, 2019). Por otro lado, el porcentaje obtenido de cepas resistentes a antimicrobianos fue relativamente alto (36,8%), observando resistencia principalmente frente a ampicilina, aunque también se obtuvo una cepa resistente a tigeciclina. Ambos antibióticos han sido empleados de manera habitual en veterinaria, principalmente en producción porcina. En la Comunidad Valenciana la cabaña ganadera porcina destaca notablemente entre las demás, siendo una región con un alto número de explotaciones porcinas, a diferencia de otras comunidades como País Vasco o Madrid. A pesar de todas las medidas de seguridad implementadas, son muchas las especies de fauna silvestre que se alimentan en las proximidades de estas granjas, como las palomas, exponiéndose a la adquisición de multitud de bacterias muchas veces resistentes (Andrés *et al.*, 2013). A falta de perdiz roja y conejo, el águila de Bonelli se alimenta de otras aves de pequeño tamaño, entre las que destacan las columbiformes (Moleón *et al.*, 2012), bien porque la hayan adquirido en granjas de producción, abundantes en la región, o bien en ciudades. Las palomas podrían ser el agente transmisor de esta bacteria, ligando la actividad humana con el medio ambiente y confirmando la existencia de esa red de conexiones entre los diferentes sectores a la que hace alusión el concepto *One Health*. Finalmente, este estudio, nos permitió reafirmar que el mejor tipo de muestra para la detección de *Salmonella* en águila de Bonelli mediante cultivo bacteriológico son las heces frescas recogidas en el nido.

Al igual que el tipo de muestra recogido, la conservación de la misma hasta su análisis en el laboratorio tiene gran importancia en la obtención de resultados comparables entre países. En bacteriología, y más concretamente en la detección de *Salmonella*, los expertos recomiendan siempre el análisis de la muestra lo más temprano posible, a fin de mantener la viabilidad de las bacterias que puedan estar presentes en la muestra recogida. Sin embargo, en ocasiones los trabajos realizados con fauna silvestre, requieren de un mayor margen de tiempo desde que se recoge la muestra, hasta que se procesa en el laboratorio, pues se trata de animales huidizos de muy difícil captura, y que en muchas ocasiones se encuentran en zonas remotas o de difícil acceso para los investigadores (Cross *et al.*, 2012). Para estas situaciones, se ha descrito la utilidad de determinados medios de transporte para la conservación de ciertas bacterias

durante un mayor periodo de tiempo, dando más margen al investigador (Palmgren *et al.*, 2000; Gorman y Adley, 2004; Iverson *et al.*, 2009; Berenger *et al.*, 2019). Es importante tener en cuenta la logística que hay detrás de todos estos estudios, así como los objetivos propuestos, para poder elegir el método de conservación de muestras que más se ajuste a cada uno de ellos. El objetivo de nuestro segundo trabajo experimental fue comparar la eficacia de dos métodos previamente descritos en la detección de *Salmonella* a partir de hisopos cloacales de pollos de águila de Bonelli. Los métodos escogidos ya habían sido utilizados con éxito para la conservación, y posterior cultivo, de enterobacterias: el medio FBP enriquecido con carbón activado mantenido a -20°C por un lado, y el medio Cary Blair mantenido a 4°C por otro. Independientemente del medio de conservación empleado, no se consiguió aislar *Salmonella* de ninguna de las muestras recogidas. Mientras que García-Peña *et al.* (2017) utilizaron el medio FBP enriquecido con carbón activado en congelación para la detección de *Campylobacter* pero no de *Salmonella*, el medio de transporte Cary Blair mantenido en refrigeración sí que se ha utilizado previamente para la preservación de *Salmonella*, aumentando su viabilidad de la bacteria durante un margen mayor de tiempo (Berenger *et al.*, 2019). Por otro lado, las rápidas fluctuaciones de temperatura sufridas por las muestras desde su recogida hasta la llegada al laboratorio, pueden dar lugar a daños irreversibles en la membrana celular que impidan el posterior cultivo de las bacterias o incluso a la muerte prematura de las mismas, explicando los resultados obtenidos en este estudio (Mindock *et al.*, 2001; Semenov *et al.*, 2007; Ramamurthy *et al.*, 2014). Teniendo en cuenta esto, los estudios realizados en regiones remotas con fauna silvestre podrían dar lugar a resultados subestimados, según el método de conservación de muestras y el tiempo de demora entre la extracción de muestras y su análisis. En cambio, estudios realizados en centros de recuperación o poblaciones de más fácil acceso obtendrían resultados más veraces al llegar las muestras antes al laboratorio.

En este sentido, nuestro tercer estudio se centró en el estudio epidemiológico de *Salmonella* en 300 aves urbanas ingresadas en un centro de recuperación de fauna silvestre de Madrid, incluyendo diferentes especies autóctonas con diferentes comportamientos y hábitos. La estrecha relación entre ser humano y fauna silvestre, que se observa en las ciudades, puede potenciar enormemente la diseminación en ambas direcciones de microorganismos como *Salmonella*, así como la de resistencias a antimicrobianos (Ramos *et al.*, 2010; Hilbert *et al.*, 2012; Andrés *et al.*, 2013:2014; Antilles *et al.*, 2015; Krawiec *et al.*, 2015; Gomez *et al.*, 2016; Bárbara *et al.*, 2017; Migura-García *et al.*, 2017). En esta ocasión, las muestras recogidas para nuestro estudio fueron hisopos cloacales, debido a la facilidad de muestreo durante la primera exploración veterinaria del animal, en el momento de su ingreso. Para asegurar unos buenos

resultados, las muestras fueron procesadas en menos de 12 horas en el laboratorio del mismo centro. Pese a haber obtenido en total un 12,3% de individuos positivos a *Salmonella*, nuestros resultados muestran diferencias significativas entre las diferentes especies, siendo la cigüeña blanca la que mayor positividad de *Salmonella* obtuvo (59,5%), y mancando una enorme diferencia con especies como el gorrión común o el estornino negro (Gómez *et al.*, 2016, Dolejska *et al.*, 2016; Haesendonk *et al.*, 2016). En el caso de los gorriones, en cambio, obtuvimos una positividad del 5,4%, pese a que la familia de las passeriformes siempre ha mostrado prevalencias superiores de *Salmonella*, siendo incluso una importante causa de mortandad en estas especies (Refsum *et al.*, 2003; Hernández *et al.*, 2012; Giovannini *et al.*, 2013; Brobey *et al.*, 2017). No obstante, la mayoría de estos estudios se centran el diagnóstico de animales con sintomatología y que presentaban altas mortalidades, mientras que nuestro estudio recogió muestras de individuos sanos. En este sentido, Rouffaer *et al.* (2016) concluyeron que los gorriones comunes no constituyen un reservorio significativo de *Salmonella*, pues no se aisló la bacteria de ninguno de los individuos incluidos en el estudio. De nuevo, los serotipos más frecuentes aislados entre las cepas aisladas de las aves urbanas, se corresponden con los tres serotipos zoonóticos más prevalentes en producción animal y los cuales han sido aislados también en brotes de salmonelosis humana: *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y mST (Hernandez *et al.*, 2016; Troxler *et al.*, 2017; Blanco *et al.*, 2018; EFSA, 2019). En este contexto, Hernández *et al.* (2016) relacionaron la presencia de *S. Typhimurium* en ibis blanco de Florida, en diferentes casos de salmonelosis en personas, poniendo de manifiesto el fuerte carácter zoonótico de este serotipo, así como el papel que juega la fauna urbana como reservorio y diseminador del mismo.

Por otro lado, se detectó una relación estadísticamente significativa entre las cigüeñas positivas *Salmonella* y el lugar de procedencia de las mismas, siendo mayor la positividad en aquellas que venían de vertedero (77,3%). Además, en el caso de la gaviota sombría, todos los individuos positivos se alimentaban también en vertederos (Martín-Maldonado *et al.*, 2020). La mala gestión de residuos y la acumulación de los mismos en los vertederos, favorecen la proliferación y supervivencia de numerosos microorganismos, así como el desarrollo de resistencias a antimicrobianos por parte de las bacterias ambientales. El análisis de la resistencia a antimicrobianos mostró un alto porcentaje de cepas resistentes al menos a un antimicrobiano (40,5%), siendo los antimicrobianos más afectados la ciprofloxacina (36,4%), el ácido nalidíxico (36,4%) y la colistina (27,3%). Estos datos se asemejan a los obtenidos por Troxler *et al.* (2017), y adquieren gran relevancia en el caso de las enterobacterias, y concretamente de *Salmonella*, debido a los antimicrobianos afectados, debido a la importancia de las quinolonas y la colistina en el tratamiento de la salmonelosis (Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2016; Rebelo *et al.*, 2018).

Finalmente cabe destacar que, de todas las cepas resistentes de *Salmonella* aisladas de aves urbanas, el 86,7% fueron consideradas multirresistentes, lo que pone de manifiesto la presión ambiental de antimicrobianos a la que se ven sometidas estas especies urbanas, y por tanto las personas.

En conclusión, las aves autóctonas, tanto de vida silvestre como urbana, constituyen un importante reservorio de *Salmonella*, así como de resistencias a antimicrobianos, y juegan un papel crucial en la diseminación de ambos en ciudades y medio ambiente. Además, la falta de estandarización de los protocolos de recogida de muestras, así como la conservación de las mismas hasta su análisis, puede dar lugar a resultados muy dispares entre comunidades e incluso países. Por tanto, es necesario realizar controles sanitarios estandarizados de la fauna autóctona, a fin de estudiar la evolución en microorganismos patógenos como *Salmonella*, así como de sus resistencias.

6. Conclusiones

1. El águila de Bonelli juega un importante papel como portadores asintomáticos y diseminadores de *Salmonella* spp. así como de resistencias a antimicrobianos.
2. En la comparación de recogida de hisopo cloacal frente a recogida de heces frescas para la detección de *Salmonella* por cultivo, resulta ser más eficaz el análisis a partir de muestras de heces frescas.
3. En cuanto a la conservación de muestras, el uso de medio nutritivo con suplemento FBP mantenido en congelación no es efectivo para la detección de *Salmonella* mediante cultivo bacteriológico a partir de hisopos cloacales de individuos jóvenes de águila de Bonelli, al igual que el medio Cary Blair conservado en refrigeración durante 72 horas.
4. Las aves urbanas son también reservorio de *Salmonella*, variando notablemente la prevalencia entre las especies estudiada, siendo mayor en cigüeña blanca (59,5%), seguida de paloma torcaz (18,9%), gaviota sombría (13,3%), gorrión común (5,4%) y estornino negro (2,7%).
5. Además, en el caso de las cigüeñas, se observa una relación estadísticamente significativa entre la presencia de *Salmonella* y el origen de los individuos, siendo más frecuente en aquellos que provienen de vertederos y alrededores.
6. Finalmente, se ha detectado un moderado-alto porcentaje de AMR en las cepas de *Salmonella* aisladas, siendo ligeramente mayor en aves urbanas (40,5%) que en águila de Bonelli (36,8%). Entre todas las resistencias halladas, cabe destacar la resistencia frente a colistina en aves urbanas (27,3%).

1. Bonelli's eagle plays an important role as asymptomatic carriers and disseminators of different serovars of *Salmonella* spp. and antimicrobial resistances.
2. Comparing cloacal swab collection versus fresh feces collection for *Salmonella* detection, the analysis from fresh feces samples is more efficient.
3. On the sample preservation, nutritive medium with FBP supplement maintained in freezing temperatures is not effective for *Salmonella* detection by bacteriological culture from cloacal swabs from young Bonelli's eagles. Cary Blair medium maintained in refrigeration temperatures during 72 hours is neither effective.
4. Urban birds are also reservoirs of different zoonotic serotypes of *Salmonella*. However, *Salmonella* detection varies among bird species, being higher in white stork (59.5%), followed by common wood pigeons (18.9%), black-backed gulls (13.3%), house sparrows (5.4%) and common starlings (2.7%).
5. In addition, in white storks, a statistically important relation has been obtained between *Salmonella* detection and the origin of animals, being more frequent in storks from landfills.
6. Finally, a moderate-high percentage of antimicrobial resistances was observed in both studies, being higher in urban birds (40.5%) than in Bonelli's eagle (36.8%). Among AMR detected, colistin resistance stands out in urban birds (27.3%).

7. Referencias bibliográficas

- Acha, P. N., & Szyfres, B. (2003). Zoonoses and communicable diseases common to man and animals. Vol. I. Bacterioses and mycoses. Scientific and Technical Publication No. 580. *Pan American Health Organization, Regional Office of the WHO, Washington, USA, 384*, pp. 392.
- Agersø, Y., Torpdahl, M., Zachariasen, C., Seyfarth, A., Hammerum, A. M., & Nielsen, E. M. (2012). Tentative colistin epidemiological cut-off value for *Salmonella* spp. *Foodborne pathogens and disease, 9*(4), 367-369.
- Ajene, A. N., Walker, C. L. F., & Black, R. E. (2013). Enteric pathogens and reactive arthritis: a systematic review of *Campylobacter*, *Salmonella* and *Shigella*-associated reactive arthritis. *Journal of health, population, and nutrition, 31*(3), 299.
- Alvarado, A., & Xavier, D. (2016). Factores clínicos asociados a multirresistencia bacteriana en el Hospital de Especialidades de las Fuerzas Armadas N° 1 en el periodo enero-septiembre 2015. Tesis doctoral. Universidad Central de Ecuador, Ecuador.
- Allen, H. K., Donato, J., Wang, H. H., Cloud-Hansen, K. A., Davies, J., & Handelsman, J. (2010). Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology, 8*(4), 251-259.
- Andino, A., & Hanning, I. (2015). *Salmonella enterica*: survival, colonization, and virulence differences among serovars. *The Scientific World Journal, 2015*, 520179.
- Andrés, S., Vico, J. P., Garrido, V., Grilló, M. J., Samper, S., Gavín, P., Herrera-León, S. & Mainar-Jaime, R. C. (2013). Epidemiology of subclinical salmonellosis in wild birds from an area of high prevalence of pig salmonellosis: phenotypic and genetic profiles of *Salmonella* isolates. *Zoonoses and public health, 60*(5), 355-365.
- Andrés, S., Vico, J. P., Garrido, V., Samper, S., Herrera-León, S., de Frutos, C., & Mainar-Jaime, R. C. (2014). Role of wild bird and rodents in the epidemiology of subclinical salmonellosis in finishing pigs. *Foodborne pathogens and disease, 11*(9), 689-697.
- Andrés-Barranco, S., Vico, J. P., Marín, C. M., Herrera-Leon, S., & Mainar-Jaime, R. C. (2016). Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates from pigs and pig environment-related sources and evidence of new circulating monophasic strains in Spain. *Journal of food protection, 79*(3), 407-412.
- Antilles, N., Sanglas, A., & Cerdà-Cuéllar, M. (2015). Free-living Waterfowl as a Source of Zoonotic Bacteria in a Dense Wild Bird Population Area in Northeastern Spain. *Transboundary and emerging diseases, 62*(5), 516-521.
- Aquila a-Life (2018). Recuperación de las poblaciones de águila de Bonelli (*Aquila fasciata*) en el Mediterráneo occidental. Recurso online. Website: <https://aquila-a-life.org/index.php/es/intereses/multimedia/descargas/category/2-biblioteca-virtual-del-aguila-de-bonelli>. Acceso en febrero de 2020.

- Arizaga, J., Resano-Mayor, J., Villanúa, D., Alonso, D., Barbarin, J. M., Herrero, A., Resano-Mayor, J., Lekuona, J.M. & Rodríguez, R. (2018). Importance of artificial stopover sites through avian migration flyways: a landfill-based assessment with the White Stork *Ciconia ciconia*. *Ibis*, 160(3), 542-553.
- Armbruster, W. J., & Roberts, T. (2018). The Political Economy of US Antibiotic Use in Animal Feed. In *Food Safety Economics* (pp. 293-322). Springer, Cham.
- Arriero, E., Müller, I., Juvaste, R., Martínez, F. J., & Bertolero, A. (2015). Variation in immune parameters and disease prevalence among lesser black-backed gulls (*Larus fuscus* sp.) with different migratory strategies. *PLoS one*, 10(2), e0118279.
- Balmori, A., & Hallberg, Ö. (2007). The urban decline of the house sparrow (*Passer domesticus*): a possible link with electromagnetic radiation. *Electromagnetic biology and medicine*, 26(2), 141-151.
- Bárbara, A., Torrontegi, O., Camacho, M. C., Barral, M., Hernández, J. M., & Höfle, U. (2017). Avian Influenza Virus surveillance in South-Central Spain Using Fecal samples of aquatic Birds Foraging at landfills. *Frontiers in veterinary science*, 4, 178.
- Bard, J. D., & Lee, F. (2018). Why can't we just use PCR? The role of genotypic versus phenotypic testing for antimicrobial resistance testing. *Clinical Microbiology Newsletter*, 40(11), 87-95.
- Barrow, P. A., & Methner, U. (Eds.). (2013). *Salmonella in domestic animals*. CABI.
- Battisti, A., Giovanni, D. G., Agrimi, U., & Bozzano, A. I. (1998). Embryonic and neonatal mortality from salmonellosis in captive bred raptors. *Journal of Wildlife Diseases*, 34(1), 64-72.
- Bayot, M. L., & Bragg, B. N. (2019). Antimicrobial Susceptibility Testing. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. Recurso online. Website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539714/>. Ultimo acceso: noviembre 2019.
- Becker, D. J., Crowley, D. E., Washburne, A. D., & Plowright, R. K. (2019). Temporal and spatial limitations in global surveillance for bat filoviruses and henipaviruses. *Biology Letters*, 15(12), 20190423.
- Bengis, R. G., Kock, R. A., & Fischer, J. (2002). Infectious animal diseases: the wildlife/livestock interface. *Revue Scientifique et Technique-Office international des épizooties*, 21(1), 53-66.
- Bennett, J. W., & Chung, K. T. (2001). Alexander Fleming and the discovery of penicillin. *Advances in applied microbiology*, 49, 163-184.
- Berenger, B. M., Ferrato, C., & Chui, L. (2019). Viability of bacterial enteropathogens in fecal samples in the presence or absence of different types of transport media. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 95(3), 114862.
- Bernat-Ponce, E., Gil-Delgado, J. A., & Guijarro, D. (2018). Factors affecting the abundance of House Sparrows *Passer domesticus* in urban areas of southeast of Spain. *Bird Study*, 65(3), 404-416.

Bernat-Ponce, E., Ferrando, D. F., Gil-Delgado, J. A., & López-Iborra, G. M. (2019). Underground trash containers: bad times for the House Sparrow? 6th WGUS (Working group of urban sparrows) Meeting, Breda, March 2019.

Biberstein, E. L., & Chung Zee, Y. (1994). Tratado de microbiología veterinaria. Editorial Acribia. Zaragoza, España.

Blanco, G. (2015). Multiresistant *Salmonella* Serovar Typhimurium Monophasic in Wintering Red Kites (*Milvus milvus*) in Segovia, Central Spain. *Journal of Raptor Research*, 49(3), 337-341.

Blanco, G. (2018). Supplementary feeding as a source of multiresistant *Salmonella* in endangered Egyptian vultures. *Transboundary and emerging diseases*, 65(3), 806-816.

BOE (Boletín Oficial del Estado) (1990). Real Decreto 4309/1990, de 30 de marzo, por el que se regula el Catálogo Nacional de Especies Amenazadas.

BOE (Boletín Oficial del Estado) (2003). Reglamento (CE) Nº 2160/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo de 17 de noviembre de 2003 sobre el control de la *Salmonella* y otros agentes zoonóticos específicos transmitidos por los alimentos.

BOE (Boletín Oficial del Estado) (2005). Reglamento (CE) Nº 1003/2005 de la Comisión de 30 de junio de 2005 por el que se aplica el Reglamento (CE) nº 2160/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo con respecto al objetivo comunitario de reducción de la prevalencia de determinados serotipos de *Salmonella* en las gallinas ponedoras de la especie *Gallus gallus* y se modifica el Reglamento (CE) nº 2160/2003.

BOE (Boletín Oficial del Estado) (2006). Reglamento (CE) Nº 1168/2006 de la Comisión de 31 de julio de 2006 por el que se aplica el Reglamento (CE) nº 2160/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo con respecto al objetivo comunitario de reducción de la prevalencia de determinados serotipos de *Salmonella* en las gallinas ponedoras de la especie *Gallus gallus* y se modifica el Reglamento (CE) nº 1003/2005.

BOE (Boletín Oficial del Estado) (2013). Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

BOE (Boletín Oficial del Estado) (2019a). Real Decreto 216/2019, de 29 de marzo, por el que se aprueba la lista de especies exóticas invasoras preocupantes para la región ultraperiférica de las islas Canarias y por el que se modifica el Real Decreto 630/2013, de 2 de agosto, por el que se regula el Catálogo español de especies exóticas invasoras.

BOE (Boletín Oficial del Estado) (2019b). Orden TEC/596/2019, de 8 de abril, por la que se modifica el anexo del Real Decreto 139/2011, de 4 de febrero, para el desarrollo del Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial y del Catálogo Español de Especies Amenazadas. Junio, 2019.

- Bonnedahl, J., Drobní, M., Gauthier-Clerc, M., Hernandez, J., Granholm, S., Kayser, Y., Melhus, A., Kahlmeter, G., Waldenström, J., Johansson, A. & Olsen, 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.
- Bonnie, E. (2001). Isolation and identification of *Salmonella* from meat, poultry and egg products. *Food Safety and Inspection Service. Washington DC: Department of Agriculture*.
- Boseret, G., Losson, B., Mainil, J. G., Thiry, E., & Saegerman, C. (2013). Zoonoses in pet birds: review and perspectives. *Veterinary Research*, 44(1), 36.
- Botti, V., Navillod, F. V., Domenis, L., Orusa, R., Pepe, E., Robetto, S., & Guidetti, C. (2013). *Salmonella* spp. and antibiotic-resistant strains in wild mammals and birds in north-western Italy from 2002 to 2010. *Vet Ital*, 49(2), 195-202.
- Brobey, B., Kucknoor, A., & Armacost, J. (2017). Prevalence of *Trichomonas*, *Salmonella*, and *Listeria* in wild birds from Southeast Texas. *Avian diseases*, 61(3), 347-352.
- Cabezas-Díaz, S., Lozano, J., & Virgós, E. (2009). The declines of the wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and the Iberian lynx (*Lynx pardinus*) in Spain: redirecting conservation efforts. *Handbook of nature conservation: global, environmental and economic issues*, 283-310.
- Cadahía, L., Urios, V., & Negro, J. J. (2005). Survival and movements of satellite-tracked Bonelli's Eagles *Hieraetus fasciatus* during their first winter. *Ibis*, 147, 415-419.
- Camacho, M., Hernández, J. M., Lima-Barbero, J. F., & Höfle, U. (2016). Use of wildlife rehabilitation centres in pathogen surveillance: A case study in white storks (*Ciconia ciconia*). *Preventive veterinary medicine*, 130, 106-111.
- Camarda, A., Circella, E., Giovanardi, D., Pennelli, D., Battista, P., Campagnari, E., Bruni, G. & Tagliabue, S. (2007). Avian Pathogenic Escherichia coli in Audouin gulls (*Larus audouinii*) Could they affect the surviving of the bird colonies?. *Italian Journal of Animal Science*, 6(3), 317-320.
- Cantón, R., García, J. E., Gómez, L., Martínez, L., Rodríguez, C., Vila, J., & García, J. A. (2000). Procedimientos en Microbiología Clínica. *Métodos Básicos Para el Estudio de la Sensibilidad a los Antimicrobianos en Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Editor Picazo J J.
- Carmichael, J. T., & Brulle, R. J. (2017). Elite cues, media coverage, and public concern: an integrated path analysis of public opinion on climate change, 2001–2013. *Environmental Politics*, 26(2), 232-252.
- Carter, D. L., Docherty, K. M., Gill, S. A., Baker, K., Teachout, J., & Vonhof, M. J. (2018). Antibiotic resistant bacteria are widespread in songbirds across rural and urban environments. *Science of the Total Environment*, 627, 1234-1241.

Catry, I., Encarnação, V., Pacheco, C., Catry, T., Tenreiro, P., da Silva, L. P., & Moreira, F. (2017). Recent changes on migratory behaviour of the White stork (*Ciconia ciconia*) in Portugal: Towards the end of migration. *Airo*, 24, 28-35.

CDC (Centers for Disease Control Prevention) (2012). Human *Salmonella* Infections Linked to Small Turtles. December 6, 2012. Recurso online. Website: <http://www.cdc.gov/salmonella/small-turtles-03-12/map.html>, 2012. Último acceso: enero 2020.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2017). CDC Yellow Book 2020: Health Information for International Travel. New York: Oxford University Press; 2017.

Chambers, R. M., McAdam, P., De Sa, J. D. H., Ward, L. R., & Rowe, B. (1987). A phage-typing scheme for *Salmonella* Virchow. *FEMS Microbiology Letters*, 40(2-3), 155-157.

Conde de Dios, M. (2018). Establecimiento y dinámica del territorio del Águila de Bonelli (*Aquila fasciata*) en la isla de Mallorca. Trabajo de Fin de Máster. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid, España.

Corrente, M., Sangiorgio, G., Grandolfo, E., Bodnar, L., Catella, C., Trotta, A., Martella, V. & Buonavoglia, D. (2017). Risk for zoonotic *Salmonella* transmission from pet reptiles: a survey on knowledge, attitudes and practices of reptile-owners related to reptile husbandry. *Preventive veterinary medicine*, 146, 73-78.

Costello, S. P., Conlon, M. A., Vuaran, M. S., Roberts-Thomson, I. C., & Andrews, J. M. (2015). Faecal microbiota transplant for recurrent *Clostridium difficile* infection using long-term frozen stool is effective: clinical efficacy and bacterial viability data. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 42(8), 1011-1018.

Craven, S. E., Stern, N. J., Line, E., Bailey, J. S., Cox, N. A., & Fedorka-Cray, P. (2000). Determination of the incidence of *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, and *Clostridium perfringens* in wild birds near broiler chicken houses by sampling intestinal droppings. *Avian diseases*, 715-720.

Cross, P. C., Creech, T. G., Ebinger, M. R., Heisey, D. M., Irvine, K. M., & Creel, S. (2012). Wildlife contact analysis: emerging methods, questions, and challenges. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 66(10), 1437-1447.

Cruz, C. G. (2016). Sensibilidad antimicrobiana en cepas de *Salmonella* sp. de importancia en salud pública. Tesis de fin de Grado. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Ricardo Palma, Perú.

Darwin, C. (1859). On the origin of the species. John Murray Ed., London.

Daza, R.M. (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, 22 (3), 57-67.

De Lucia, A., Rabie, A., Smith, R. P., Davies, R., Ostanello, F., Ajayi, D., Ajayi, D., Petrovska, L. & Martelli, F. (2018). Role of wild birds and environmental contamination in the epidemiology of *Salmonella* infection in an outdoor pig farm. *Veterinary microbiology*, 227, 148-154.

De Oliveira, M. C., Camargo, B. Q., Cunha, M. P., Saidenberg, A. B., Teixeira, R. H., Matajira, C. E., Moreno, L.Z., Gomes, V.T.M., Christ, A.P.G., Barbosa, M.R.F., Sato, M.I.Z., Moreno, A.M. & Knöbl, T. (2018). Free-Ranging Synanthropic Birds (*Ardea alba* and *Columba livia domestica*) as Carriers of *Salmonella* spp. and Diarrheagenic *Escherichia coli* in the Vicinity of an Urban Zoo. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 18(1), 65-69.

Dekker, J. P., & Frank, K. M. (2015). *Salmonella*, *Shigella*, and *Yersinia*. *Clinics in laboratory medicine*, 35(2), 225-246.

Dias, A., Palma, L., Carvalho, F., Neto, D., Real, J., & Beja, P. (2017). The role of conservative versus innovative nesting behavior on the 25-year population expansion of an avian predator. *Ecology and evolution*, 7(12), 4241-4253.

Dolejska, M., Masarikova, M., Dobiasova, H., Jamborova, I., Karpiskova, R., Havlicek, M., Carlile, N., Priddle, D., Cizek, A. & Literak, I. (2016). High prevalence of *Salmonella* and IMP-4-producing Enterobacteriaceae in the silver gull on Five Islands, Australia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(1), 63-70.

Dominguez, S. A., & Schaffner, D. W. (2009). Survival of *Salmonella* in processed chicken products during frozen storage. *Journal of food protection*, 72(10), 2088-2092.

ECDC (European Centre of Disease Prevention and Control) (2019). Surveillance atlas of infectious diseases. Recurso online. Website: <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>. Último acceso: marzo 2020.

EFSA (European Food Safety Authority) (2009). Report on the availability of molecular typing methods for *Salmonella*, *Campylobacter*, verotoxigenic *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* isolates from food, animals and feeding stuffs in European Union Member States (and in some other reporting countries). *The EFSA Journal* (2009), 272, 1-52.

EFSA (European Food Safety Authority) (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal* 2018;16(12):5500.

EFSA (European Food Safety Authority) (2019). Scientific report on the European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 2019;17(12):5926, 276 pp.

EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) (2018). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. *EFSA Journal* 2018; 16(2): 5182, 270 pp.

EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) (2019). The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in Zoonotic and Indicator Bacteria from Humans, Animals and Food in 2017. *EFSA Journal* 2019; 17(2):5598, 278 pp.

Espinosa, L., Varela, C., Martínez, E. V., & Cano, R. (2015). Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. España, 2008-2011 (excluye brotes hídricos). *Boletín epidemiológico semanal*, 22(11), 130-136.

Espinoza, R., & Morales-Cauti, S. (2019). *Salmonella* spp. in wild birds living around a well-managed guinea pig farm in the district of Manchay, Lima. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú (RIVEP)*, 30(1), 423-429.

European Community (1979). Council Directive 79/409/CEE, of 2 April 1979, on the conservation of wild birds. Official Journal of the European Communities, L103/1.

European Community (2003). Directive 2003/99/EC of the European Parliament and of the Council of 17 November 2003 on the monitoring zoonoses and zoonotic agents, amending Council Decision 90/424(EEC and repealing Council Directive 92/117/EEC.

European Medicines Agency (2020). Categorization of antibiotics used in animals promoted responsible use to protect public and animal health. European Medicines Agency.

European Union (2010). Directive 2010/63/UE of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Official Journal of the European Union, L276/33.

European Union (2013). Commission Implementing Decision 2013/653 of 12 November 2013 As Regards a Union Financial Aid Towards a Coordinated Control Plan for Antimicrobial Resistance Monitoring in Zoonotic Agents in 2014 (notified Under Document C (2013) 7289).

Farmer, J.J. (2003). Enterobacteriaceae: introduction and identification. *Manual of clinical microbiology*. Vol. 1. 8th edition. ASM Press. Washington, D.C.

Faruq, A. A., Hassan, M. M., Uddin, M. M., Rahman, M. L., Rakib, T. M., Alam, M., & Islam, A. (2016). Prevalence and multidrug resistance pattern of *Salmonella* isolated from resident wild birds of Bangladesh. *Int J One Health*, 2, 35-41.

Felsenstein, S., Bender, J. M., Sposto, R., Gentry, M., Takemoto, C., & Bard, J. D. (2016). Impact of a rapid blood culture assay for Gram-positive identification and detection of resistance markers in a pediatric hospital. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 140(3), 267-275.

Fernandes, P., & Martens, E. (2017). Antibiotics in late clinical development. *Biochemical pharmacology*, 133, 152-163.

Fuller, C. C., Jawahir, S. L., Leano, F. T., Bidol, S. A., Signs, K., Davis, C., Holmes, T., Morgan, J., Teltow, G., Jones, B., Sexton, R. B., Davis, G.L., Branden, C.R., Patel, N.J., Deasy III, M.P. & Smith, K.E. (2008). A multi-state *Salmonella* Typhimurium outbreak associated with frozen vacuum-packed rodents used to feed snakes. *Zoonoses and public health*, 55(8-10), 481-487.

- Gaillot, O., Di Camillo, P., Berche, P., Courcol, R., & Savage, C. (1999). Comparison of CHROMagar *Salmonella* medium and Hektoen enteric agar for isolation of salmonellae from stool samples. *Journal of clinical microbiology*, 37(3), 762-765.
- Gallardo, B., Aldridge, D. C., González-Moreno, P., Pergl, J., Pizarro, M., Pyšek, P., Thuiller, W., Yesson, C., & Vilà, M. (2017). Protected areas offer refuge from invasive species spreading under climate change. *Global change biology*, 23(12), 5331-5343.
- Galván, I., Marchamalo, J., Bakken, V., & Traverso, J. M. (2003). The origin of Lesser Black-backed Gulls *Larus fuscus* wintering in central Iberia. *Ringing & Migration*, 21(4), 209-214.
- Gambino-Shirley, K., Stevenson, L., Concepción-Acevedo, J., Trees, E., Wagner, D., Whitlock, L., Roberts, J., Garrett, N., Van Duyne, S., McAllister, G., Schick, B., Schlater, L., Peralta, V., Reporter, R., Li, L., Waechter, H., Gomez T., Fernández Ordenes, J., Ulloa, S., Ragimbeau, C., Mossong, J., & Nichols M. (2018). Flea market finds and global exports: four multistate outbreaks of human *Salmonella* infections linked to small turtles, United States—2015. *Zoonoses and public health*, 65(5), 560-568.
- García, C. (2011). Salmonelosis porcina en España: prevalencia, factores de riesgo y resistencia antimicrobiana. Tesis doctoral del Departamento de Sanidad Animal, Universidad de León.
- García-Peña, F.J., Pérez-Boto, D., Jiménez, C., San Miguel, E., Echeita, A., Rengifo-Herrera, C., García-Párraga, D., Ortega-Mora, L.M. & Pedraza-Díaz, S. (2010). Isolation and characterization of *Campylobacter* spp. from Antarctic fur seals (*Arctocephalus gazella*) at Deception Island, Antarctica. *Appl. Environ. Microbiol.* 76.17 : 6013-6016.
- García-Peña, F. J., Llorente, M. T., Serrano, T., Ruano, M. J., Belliure, J., Benzal, J., Herrera-León, S., Vidal, V., D'Amico, V., Pérez-Boto, D. & Barbosa, A. (2017). Isolation of *Campylobacter* spp. from three species of Antarctic penguins in different geographic locations. *EcoHealth*, 14(1), 78-87.
- Giambelluca, S., Cammarata, M., Dara, S., Orefice, T., Camiña-Cardenal, A., & Vazzana, I. (2017). The impact of captivity on some haematological parameters of griffon vultures (*Gyps fulvus*). *Veterinaria italiana*, 53(3), 243-249.
- Gilbert, N.I., Correia, R.A., Silva, J.P., Pacheco, C., Catry, I., Atkinson, P.W., Gill, J.A. & Franco, A. M. (2016). Are white storks addicted to junk food? Impacts of landfill use on the movement and behaviour of resident white storks (*Ciconia ciconia*) from a partially migratory population. *Movement Ecology*, 4(1), 7.
- Giovannini, S., Pewsner, M., Hüsey, D., Hächler, H., Degiorgis, M. P. R., Hirschheydt, J. V., & Origgi, F. C. (2013). Epidemic of salmonellosis in passerine birds in Switzerland with spillover to domestic cats. *Veterinary pathology*, 50(4), 597-606.
- Gómez, P., Lozano, C., Camacho, M. C., Lima-Barbero, J. F., Hernández, J. M., Zarazaga, M., Höfle, U. & Torres, C. (2016). Detection of MRSA ST3061-t843-mecC and ST398-t011-mecA in white stork nestlings exposed to human residues. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(1), 53-57.

Gómez, M.T., Martínez-Herrero, M.C., Sansano, J. & Garijo-Toledo, M.M. (2018). Oropharyngeal trichomonads in wild birds. *Advances in Animal Science and Zoology*, 1. Nova Science Publishers, Inc.

González G, Mella S, Zemelman R, Bello H & Domínguez M. (2004). Integrones y cassettes genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antibacterianos. *Revista médica de Chile*. 2004 May;132(5):619-26.

González, M.A. (2010). Identificación de rapaces ibéricas. III Ciclo de Conferencias de Fauna Exótica y Salvaje. Simposio Avafes-León. León, España, 2010.

Gorman, R., & Adley, C. C. (2004). An evaluation of five preservation techniques and conventional freezing temperatures of -20° C and -85° C for long-term preservation of *Campylobacter jejuni*. *Letters in applied microbiology*, 38(4), 306-310.

Greig, J., Rajić, A., Young, I., Mascarenhas, M., Waddell, L., & LeJeune, J. (2015). A scoping review of the role of wildlife in the transmission of bacterial pathogens and antimicrobial resistance to the food chain. *Zoonoses and Public Health*, 62(4), 269-284.

Griffiths, R., Double, M. C., Orr, K., & Dawson, R. J. (1998). A DNA test to sex most birds. *Molecular ecology*, 7(8), 1071-1075.

Grimes, J. E. (1987). Zoonoses acquired from pet birds. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 17(1), 209-218.

Grimont, P. A., & Weill, F. X. (2007). Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. *WHO collaborating centre for reference and research on Salmonella*, 9, 1-166.

Gruszynski, K., Pao, S., Kim, C., Toney, D., Wright, K., Ross, P. G., Colon, A. & Levine, S. (2014). Evaluating Wildlife as a Potential Source of *Salmonella* serotype Newport (JJPX 01.0061) Contamination for Tomatoes on the Eastern Shore of Virginia. *Zoonoses and public health*, 61(3), 202-207.

Haesendonck, R., Rasschaert, G., Martel, A., Verbrugghe, E., Heyndrickx, M., Haesebrouck, F., & Pasmans, F. (2016). Feral pigeons: A reservoir of zoonotic *Salmonella* Enteritidis strains? *Veterinary microbiology*, 195, 101-103.

Hall, A. J., & Saito, E. K. (2008). Avian wildlife mortality events due to salmonellosis in the United States, 1985–2004. *Journal of wildlife diseases*, 44(3), 585-593.

Hart, C. A. (1998). La resistencia a los antibióticos. ¿un problema creciente? *Br Med J (Ed Latinoam)*, 6(1), 147-148.

He, S., Zhou, X., Shi, C., & Shi, X. (2016). Ethanol adaptation induces direct protection and cross-protection against freezing stress in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Journal of applied microbiology*, 120(3), 697-704.

Henderson, S. C., Bounous, D. I., & Lee, M. D. (1999). Early events in the pathogenesis of avian salmonellosis. *Infection and immunity*, 67(7), 3580-3586.

Hernandez, S. M., Keel, K., Sanchez, S., Trees, E., Gerner-Smidt, P., Adams, J. K., Cheng, Y., Ray III, A., Martin, G., Presotto, A., Ruder, M.G., Brown, J., Blehert, D.S., Cottrell, W. & Maurer, J. (2012). Epidemiology of a *Salmonella enterica* subsp. enterica serovar Typhimurium strain associated with a songbird outbreak. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78(20), 7290-7298.

Hernandez, S. M., Welch, C. N., Peters, V. E., Lipp, E. K., Curry, S., Yabsley, M. J., Sanchez, S., Presotto, A., Gerner-Smidt, P., Hise, K.B., Hammond, E., Kistler, W.M., Madden, M., Conway, A.L., Kwan, T., & Maurer, J.J. (2016). Urbanized white ibises (*Eudocimus albus*) as carriers of *Salmonella enterica* of significance to public health and wildlife. *PLoS One*, 11(10), e0164402.

Hernández-Matías, A., Real, J., Parés, F., & Pradel, R. (2015). Electrocutation threatens the viability of populations of the endangered Bonelli's eagle (*Aquila fasciata*) in Southern Europe. *Biological Conservation*, 191, 110-116.

Hersey, E., & Mason, D. V. (1963). *Salmonella* surveillance report No. 10. *Center for Disease Control, Atlanta, Georgia*.

Hilbert, F., Smulders, F. J. M., Chopra-Dewasthaly, R., & Paulsen, P. (2012). *Salmonella* in the wildlife-human interface. *Food Research International*, 45(2), 603-608.

Hoorweg, D., & Bhada-Tata, P. (2012). What a waste: a global review of solid waste management. Urban developments series; knowledge papers no. 15. World Bank, Washington, DC.

Horton, R. A., Wu, G., Speed, K., Kidd, S., Davies, R., Coldham, N. G., & Duff, J. P. (2013). Wild birds carry similar *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains to those found in domestic animals and livestock. *Research in veterinary science*, 95(1), 45-48.

Hudzicki, J. (2009). Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. Protocol in: American Society for Microbiology.

Hurtado, F. (2001). Obtención de un hidrolizado proteico utilizando excedentes de la industria pesquera y agrícola. Tesis doctoral. Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción. Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador.

Iglesias, J.J., Llamas, A. & Álvarez, E. (2017). Uso del espacio en águila de Bonelli (*Aquila fasciata*): supervivencia, dispersión y asentamiento durante el proyecto Life Bonelli. En *Recuperación Integral de las Poblaciones de Águila de Bonelli en España. Life Bonelli*.

Instituto Nacional de Salud (2003). Manual de Procedimientos para el diagnóstico bacteriológico de Enfermedad Diarreica Bacteriana Aguda. Identificación de *Salmonella*, *Shigella* y *Vibrio cholerae*. Laboratorio Nacional de Referencia. Red Nacional de Laboratorio. Grupo de Microbiología. Bogotá, D.C.

- Ishii, S. (2019). Ecology of pathogens and antibiotic-resistant bacteria in environments: Challenges and opportunities. *Microbes and environments*, 34(1), 1-4.
- Ishola, O.O. (2009). Effects of challenge dose on faecal shedding of *Salmonella* enteritidis in experimental infected chickens. *African Journal of Biotechnology*, 8(7), 1343-1346.
- ISO 20776-1:2006 Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems. Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices. Part 1: Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. International Organization for Standardization, Genève, Switzerland. 2006.
- ISO 6579:2002 (Annex D) Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs. Horizontal Method for the Detection of *Salmonella* spp, International Organization for Standardization, Genève, Switzerland, 2002.
- ISO 6579-1:2017 (Annex D) Microbiology of the food chain. Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* spp. Part 1: Detection of *Salmonella* spp. International Organization for Standardization, Genève, Switzerland. 2017.
- Ivanek, R., Österberg, J., Gautam, R., & Lewerin, S. S. (2012). *Salmonella* fecal shedding and immune responses are dose-and serotype-dependent in pigs. *PLoS One*, 7(4), e34660.
- Iveson, J. B., Shellam, G. R., Bradshaw, S. D., Smith, D. W., Mackenzie, J. S., & Mofflin, R. G. (2009). *Salmonella* infections in Antarctic fauna and island populations of wildlife exposed to human activities in coastal areas of Australia. *Epidemiology & Infection*, 137(6), 858-870.
- Janecko, N., Čížek, A., Halová, D., Karpíšková, R., Myšková, P., & Literák, I. (2015). Prevalence, Characterization and Antibiotic Resistance of *Salmonella* Isolates in Large Corvid Species of Europe and North America Between 2010 and 2013. *Zoonoses and public health*, 62(4), 292-300.
- Jasovský, D., Littmann, J., Zorzet, A., & Cars, O. (2016). Antimicrobial resistance—a threat to the world's sustainable development. *Upsala journal of medical sciences*, 121(3), 159-164.
- Jawetz, E., Melnick, J., & Adelberg, E. (2014). Microbiología Médica 26ª edición. Editado por: Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A., & Mietzner, T. A. AMGH Editora.
- Jiménez, M. A., Galas, M., Corso, A., Hormazábal, J. C., Duarte Valderrama, C., Salgado Marcano, N., Ramón-Pardo, P., & Melano, R. G. (2019). Consenso latinoamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes, con resistencia extendida o panresistentes. *Rev Panam Salud Publica*; 43.
- Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L., & Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451(7181), 990.

- Jurado-Tarifa, E., Torralbo, A., Borge, C., Cerdà-Cuéllar, M., Ayats, T., Carbonero, A., & García-Bocanegra, I. (2016). Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Campylobacter* and *Salmonella* strains isolated from decoys and raptors. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, *48*, 14-21.
- Jurado-Tarifa, E. (2016). Estudio epidemiológico de patógenos zoonóticos (influenza aviar, *Flavivirus*, *Campylobacter* spp. y *Salmonella* spp.) en cimbeles y rapaces de Andalucía. Tesis doctoral. Departamento de Sanidad Animal, Universidad de Córdoba, España.
- Kapoor, R., Azad, S. M., Mukherjee, A., & Dhar, S. (2018). Reiter's disease in a 8-year-old boy. *Indian Journal of Paediatric Dermatology*, *19*(2), 154.
- Kern, W. V. (2018). Multiresistant Bacteria-Antibiotic Prescription and Antibiotics of Last Resort. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)*, *143*(9), 643-650.
- Kingsley, R. A., & Bäumlér, A. J. (2000). Host adaptation and the emergence of infectious disease: the *Salmonella* paradigm. *Molecular microbiology*, *36*(5), 1006-1014.
- Kohl, K. D., Brun, A., Caviedes-Vidal, E., & Karasov, W. H. (2019). Age-related changes in the gut microbiota of wild House Sparrow nestlings. *Ibis*, *161*(1), 184-191.
- Krawiec, M., Kuczkowski, M., Kruszewicz, A. G., & Wieliczko, A. (2015). Prevalence and genetic characteristics of *Salmonella* in free-living birds in Poland. *BMC veterinary research*, *11*(1), 15.
- Larsson, E. (2016). Movement patterns of common cranes at European stopover sites. Student Project, Dept. of Ecology. Swedish University of Agricultural Sciences.
- Le Minor, L., Veron, M., & Popoff, M. (1982). The taxonomy of *Salmonella*. In *Annales de microbiologie*, *133*(2), p. 223.
- Le Minor, L., Popoff, M. Y., Laurent, B., & Hermant, D. (1986). Individualisation d'une septième sous-espèce de *Salmonella*: *S. choleraesuis* subsp. *indica* subsp. *nov.* In *Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie*, *137*(1), pp. 211-217. Elsevier Masson.
- Lebrija, J. J. I., Izquierdo, P., & Álvarez, E. (2012). Cría en cautividad y reforzamiento de Águila-azor perdicera (*Aquila fasciata*) en la Comunidad de Madrid. *Chronica naturae*, (2), 73-82.
- Leclercq, R., Cantón, R., Brown, D.F., Giske, C.G., Heisig, P., MacGowan, A.P., Mouton, J.W., Nordmann, P., Rodloff, A.C., Rossolini, G.M., Soussy, C.J., Steinbakk, M., Winstanley, T.G. & Kahlmeter, G. (2013). EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clinical Microbiology and Infection*, *19*(2), 141-160.
- Life Bonelli (2013). Recuperación integral de las poblaciones de Águila Perdicera en España. Recurso online. Website: <http://www.lifebonelli.org/index.php/multimedia/biblioteca-virtual>. Acceso en febrero 2019.

- Lim, C., Takahashi, E., Hongsuwan, M., Wuthiekanun, V., Thamlikitkul, V., Hinjoy, S., Day, N.P.J., Peacock, S.J. & Limmathurotsakul, D. (2016). Epidemiology and burden of multidrug-resistant bacterial infection in a developing country. *Elife*, 5, e18082.
- Liminana, R., Soutullo, A., Urios, V., & Reig-Ferrer, A. (2012). Migration and wintering areas of adult Montagu's Harriers (*Circus pygargus*) breeding in Spain. *Journal of Ornithology*, 153(1), 85-93.
- Linaza, M. & Viejo, J.L. (2007). La diversidad animal de España. Documentación administrativa nº 278-279 de mayo-diciembre 2007. Número extraordinario sobre biodiversidad (I.N.d.A. Pública, Ed.). INAP, Madrid.
- Lloveras, L., Thomas, R., Lourenço, R., Caro, J., & Dias, A. (2014). Understanding the taphonomic signature of Bonelli's Eagle (*Aquila fasciata*). *Journal of archaeological science*, 49, 455-471.
- Lopes, E. D. S., Maciel, W. C., Teixeira, R. S. D. C., Albuquerque, Á. H. D., Vasconcelos, R. H., Machado, D. N., Bezerra, W.G.A. & Santos, I. C. L. (2016). Isolamento de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* de psittaciformes: relevância em saúde pública. *Arquivos do Instituto Biológico*, 83.
- López-Pueyo, M. J., Barcenilla-Gaite, F., Amaya-Villar, R., & Garnacho-Montero, J. (2011). Multirresistencia antibiótica en unidades de críticos. *Medicina Intensiva*, 35(1), 41-53.
- Lowden, P., Wallis, C., Gee, N., & Hilton, A. (2015). Investigating the prevalence of *Salmonella* in dogs within the Midlands region of the United Kingdom. *BMC veterinary research*, 11(1), 239.
- MacFaddin, J. F. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Ed. Médica Panamericana.
- Maciorowski, G., Kosicki, J., Polakowski, M., Urbańska, M., Zduniak, P., & Tryjanowski, P. (2019). Autumn Migration of Immature Red Kites *Milvus milvus* from a Central European Population. *Acta Ornithologica*, 54(1), 45-50.
- Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T. & Monnet, D.L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection*, 18(3), 268-281.
- Malbrán, C. (2012). Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución. *MIC testing*, 32(2), 1-43.
- Marchello, C. S., Hong, C. Y., & Crump, J. A. (2019). Global Typhoid Fever Incidence: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*, 68(Supplement_2), S105-S116.
- Marin, C., Palomeque, M. D., Marco-Jimenez, F., & Vega, S. (2014). Wild griffon vultures (*Gyps fulvus*) as a source of *Salmonella* and *Campylobacter* in eastern Spain. *PLoS One*, 9(4), e94191.

- Marin, C., Torres, C., Marco-Jiménez, F., Cerdà-Cuéllar, M., Sevilla, S., Ayats, T., & Vega, S. (2018). Supplementary feeding stations for conservation of vultures could be an important source of monophasic *Salmonella typhimurium* 1, 4,[5], 12: i-. *Science of the Total Environment*, 636, 449-455.
- Martín-Maldonado, B., Montoro-Dasi, L., Pérez-Gracia, M. T., Jordá, J., Vega, S., Marco-Jiménez, F., & Marin, C. (2019). Wild Bonelli's eagles (*Aquila fasciata*) as carrier of antimicrobial resistant *Salmonella* and *Campylobacter* in Eastern Spain. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 67, 101372.
- Martín-Maldonado, B., Vega, S., Mencía-Gutiérrez, A., Lorenzo-Rebenaque, L., de Frutos, C., González, F., Revuelta, L. & Marin, C. (2020). Urban birds: An important source of antimicrobial resistant *Salmonella* strains in Central Spain. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 72, 101519.
- Martínez, J. A., & Zuberogoitia, I. (2004). Habitat preferences and causes of population decline for Barn Owls *Tyto alba*: a multi-scale approach. *Ardeola*, 51(2), 303-317.
- Marx, M., Reiner, G., Willems, H., Rocha, G., Hillerich, K., Masello, J.F., Mayr, S.L., Moussa, S., Dunn, J.C., Thomas, R.C., Goodman S.J., Hamer, K.C., Metzger, B., Cecere, J.G., Spina, F., Koschkar, S., Calderón, L., Romeike, T., & Quillfeldt, P. (2017). High prevalence of *Trichomonas gallinae* in wild columbids across western and southern Europe. *Parasites & vectors*, 10(1), 242.
- Mather, A.E., Lawson, B., De Pinna, E., Wigley, P., Parkhill, J., Thomson, N.R., Page, A.J, Holmes M.A. & Paterson, G.K. (2016). Genomic analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from wild passerines in England and Wales. *Appl. Environ. Microbiol.*, 82(22), 6728-6735.
- Matuschek, E., Brown, D. F., & Kahlmeter, G. (2014). Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(4), O255-O266.
- Merck. (1994). Manual de medios de cultivo. Darmstadt – Alemania.
- Migura-Garcia, L., Ramos, R., & Cerdà-Cuéllar, M. (2017). Antimicrobial resistance of *Salmonella* Serovars and *Campylobacter* spp. isolated from an opportunistic gull species, yellow-legged gull (*Larus michahellis*). *Journal of wildlife diseases*, 53(1), 148-152.
- Millán, J., Aduriz, G., Moreno, B., Juste, R. A., & Barral, M. (2004). *Salmonella* isolates from wild birds and mammals in the Basque Country (Spain). *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*, 23(3), 905-912.
- Mindock, C. A., Petrova, M. A., & Hollingsworth, R. I. (2001). Re-evaluation of osmotic effects as a general adaptative strategy for bacteria in sub-freezing conditions. *Biophysical Chemistry*, 89(1), 13-24.

- Miranda, A. C. (2017). Mechanisms of behavioural change in urban animals: the role of microevolution and phenotypic plasticity. In *Ecology and conservation of birds in urban environments* (pp. 113-132). Springer, Cham.
- Mirzaie, S., Hassanzadeh, M., & Ashrafi, I. (2010). Identification and characterization of *Salmonella* isolates from captured house sparrows. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 34(2), 181-186.
- Moleón, M., Sebastián-González, E., Sánchez-Zapata, J. A., Real, J., Pires, M. M., Gil-Sánchez, J. M., Bautista, J., Palma, L., Bayle, P., Guimaraes Jr, P.R. & Beja, P. (2012). Changes in intrapopulation resource use patterns of an endangered raptor in response to a disease-mediated crash in prey abundance. *Journal of Animal Ecology*, 81(6), 1154-1160.
- Molina-Lopez, R. A., Valverdú, N., Martín, M., Mateu, E., Obon, E., Cerdà-Cuéllar, M., & Darwich, L. (2011). Wild raptors as carriers of antimicrobial-resistant *Salmonella* and *Campylobacter* strains. *Veterinary Record*, 168, 565.
- Molina-López, R. A., Vidal, A., Obón, E., Martín, M., & Darwich, L. (2015). Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium monophasic variant 4, 12: i-isolated from asymptomatic wildlife in a Catalan wildlife rehabilitation center, Spain. *Journal of wildlife diseases*, 51(3), 759-763.
- Moré, E., Ayats, T., Ryan, P. G., Naicker, P. R., Keddy, K. H., Gaglio, D., Witteveen, M. & Cerdà-Cuéllar, M. (2017). Seabirds (*Laridae*) as a source of *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. and antimicrobial resistance in South Africa. *Environmental microbiology*, 19(10), 4164-4176.
- Mundy, L. S., Shanholtzer, C. J., Willard, K. E., & Peterson, L. R. (1991). An evaluation of three commercial fecal transport systems for the recovery of enteric pathogens. *American journal of clinical pathology*, 96(3), 364-367.
- Muñoz, N., Agudelo, C. I., Ovalle, M. V., & Realpe, M. E. (2000). Vigilancia en red de los serotipos y la susceptibilidad antimicrobiana de *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *Vibrio cholerae*. 01, 1 997-1 999. *Biomédica*, 20(3), 210-217.
- Muñoz, C. (2017). Módulo I: Generalidades. Jornada Formativa sobre la Resistencia a los Antibióticos. Plan Nacional de Resistencias frente a Antibióticos. Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid, Madrid, España, 24 y 25 de Enero 2017.
- Murray, P. R., & Shea, Y. R. (2004). *Pocket guide to clinical microbiology*. ASM Press.
- Natvig, E. E., Ingham, S. C., Ingham, B. H., Cooperband, L. R., & Roper, T. R. (2002). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli* contamination of root and leaf vegetables grown in soils with incorporated bovine manure. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(6), 2737-2744.
- Neo, J. P. S., & Tan, B. H. (2017). The use of animals as a surveillance tool for monitoring environmental health hazards, human health hazards and bioterrorism. *Veterinary microbiology*, 203, 40-48.

Niemira, B. A., Sommers, C. H., & Boyd, G. (2003). Effect of freezing, irradiation, and frozen storage on survival of *Salmonella* in concentrated orange juice. *Journal of food protection*, 66(10), 1916-1919.

Ochoa, I. M. F., & Rodríguez, A. V. (2005). Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. *Revista latinoamericana de microbiología*, 47(1-2), 25-42.

OIE (World Organisation for Animal Health) & IUCN (International Union for Conservation of Nature) (2014). Guidelines for Wildlife Disease Risk Analysis. OIE, Paris, 24 pp. Published in association with the IUCN and the Species Survival Commission.

O'Neill, J. I. M. (2014). Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Rev. Antimicrob. Resist*, 20, 1-16.

Ontiveros, D. (2016). Águila perdicera *Hieraaetus fasciatus*. In: Carrascal, L.M., Salvador, A. Enciclopedia virtual de los vertebrados españoles. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.

Opara, O. O., Mallinson, E.T., Tate, C.R., Carr, L.E., Miller, R.G., Stewart, L., Kelleher, C., Johnston, R.W. & Joseph, S.W. (1992). The effect of exposure, storage times, and types of holding media on the drag-swab monitoring technique for *Salmonella*. *Avian diseases*, 63-68.

Oro, D., Genovart, M., Tavecchia, G., Fowler, M. S., & Martínez-Abraín, A. (2013). Ecological and evolutionary implications of food subsidies from humans. *Ecology letters*, 16(12), 1501-1514.

Oteo-Iglesias, J. (2016). La resistencia a Antibióticos: La amenaza de las superbacterias. *Editorial Catarata*.

Ovejero, C. M. (2017). Mecanismos emergentes de resistencia a antibióticos en enterobacterias de origen humano, animal y ambiental. Tesis doctoral, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, España.

Pachón, D. A. (2009). Aislamiento, identificación y serotipificación de enterobacterias del género *Salmonella* en una población de *Crocodylus intermedius* y testudinos mantenidos en cautiverio en la estación de biología tropical Roberto Franco EBTRB de la Facultad de Ciencias Universidad Nacional de Colombia en Villavicencio-Meta. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

Pal, A., & Marshall, D. L. (2009). Comparison of culture media for enrichment and isolation of *Salmonella* spp. from frozen Channel catfish and Vietnamese basa filets. *Food microbiology*, 26(3), 317-319.

Pallecchi, L., Bartoloni, A., Paradisi, F., & Rossolini, G. M. (2008). Antibiotic resistance in the absence of antimicrobial use: mechanisms and implications. *Expert review of anti-infective therapy*, 6(5), 725-732.

Palmer, M. V., Thacker, T. C., Waters, W., Gortázar, C., & Corner, L. A. (2012). *Mycobacterium bovis*: a model pathogen at the interface of livestock, wildlife, and humans. In *Mycobacterial Diseases of Animals, Veterinary Medicine International*, 2012, 236205.

- Palmgren, H., McCafferty, D., Aspan, A., Broman, T., Sellin, M., Wollin, R., Bergström, S. & Olsen, B. (2000). *Salmonella* in sub-Antarctica: low heterogeneity in *Salmonella* serotypes in South Georgian seals and birds. *Epidemiology & Infection*, 125(2), 257-262.
- Palmgren, H. (2002). Importance of wild birds in the spread of *Salmonella*. Doctoral dissertation, Faculty of Medicine, Umeå Universitet, Sweden.
- Palumbo, S. A., & Alford, J. A. (1970). Inhibitory action of tetrathionate enrichment broth. *Appl. Environ. Microbiol.*, 20(6), 970-976.
- Pasteran, F., Corso, A., & Galas, M. (2003). Manual de Procedimiento *Salmonella* Parte II. Sensibilidad a los Antimicrobianos. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Global Salm – Surv y CDC. Buenos Aires – Argentina.
- Pavón, D., López-López, P., Limiñana, R., & Urios, V. (2009). Dispersión juvenil y reclutamiento a la fracción adulta de juveniles de Águila-azor perdicera (*Aquila fasciata*) y Águila real (*Aquila chrysaetos*) en España. *Revista de la Societat Valenciana d'Ornitologia El Serenet* (7) 1-9.
- Pedraza, J. G., Sanandres, N. P., Varela, Z. S., Aguirre, E. H., & Camacho, J. V. (2014). Aislamiento microbiológico de *Salmonella* spp. y herramientas moleculares para su detección. *Salud Uninorte*, 30(1), 73-94.
- Petrow, S., Kasatiya, S. S., Pelletier, J., Ackermann, H. W., & Peloquin, J. (1974). A phage typing scheme for *Salmonella* newport. In *Annales de microbiologie*, 125(4), p. 433.
- Phalen, D. N., Drew, M. L., Simpson, B., Roset, K., Dubose, K., & Mora, M. (2010). *Salmonella enterica* subsp. *enterica* in cattle egret (*Bubulcus ibis*) chicks from central Texas: prevalence, serotypes, pathogenicity, and epizootic potential. *Journal of wildlife diseases*, 46(2), 379-389.
- Pignon, C., & Mayer, J. (2011). Zoonoses of ferrets, hedgehogs, and sugar gliders. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*, 14(3), 533-549.
- Plaza, P. I., & Lambertucci, S. A. (2017). How are garbage dumps impacting vertebrate demography, health, and conservation? *Global Ecology and Conservation*, 12, 9-20.
- Plaza, P. I., & Lambertucci, S. A. (2018). More massive but potentially less healthy: black vultures feeding in rubbish dumps differed in clinical and biochemical parameters with wild feeding birds. *PeerJ*, 6, e4645.
- Pödra, M., & Gómez, A. (2018). Rapid expansion of the American mink poses a serious threat to the European mink in Spain. *Mammalia*, 82(6), 580-588.
- Popoff, M. Y., & Le Minor, L. (1997). Formules antigéniques des sérovars de *Salmonella*. WHO Collaborating center for reference and research on *Salmonella*. Institute Pasteur. Paris - France.

Prieto, V. R. (2014). Nuevas aportaciones epidemiológicas y diagnósticas para el estudio de la interacción entre la fauna doméstica y silvestre. Tesis doctoral, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, España.

Quinn, P. J., Markey, B. K., Carter, M. E., Donnelly, W. J., & Leonard, F. C. (2002). Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias. Acribia.

Rabsch, W., Andrews, H. L., Kingsley, R. A., Prager, R., Tschäpe, H., Adams, L. G., & Bäumlér, A. J. (2002). *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and its host-adapted variants. *Infection and immunity*, 70(5), 2249-2255.

Ramamurthy, T., Ghosh, A., Pazhani, G. P., & Shinoda, S. (2014). Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria. *Frontiers in public health*, 2, 103.

Ramos, R., Cerdà-Cuéllar, M., Ramírez, F., Jover, L., Ruiz, X. (2010). Influence of refuse sites on the prevalence of *Campylobacter* spp. And *Salmonella* serovars in seagulls. *Appl Environ Microbiol.* 76, 3052-3056.

Rebelo, A. R., Bortolaia, V., Kjeldgaard, J. S., Pedersen, S. K., Leekitcharoenphon, P., Hansen, I. M., Guerra, B., Malorny, B., Borowiak, M., Hammerl, J.A., Battisti, A., Franco, A., Alba, P., Perrin-Guyomard, A., Granier, S.A., de Frutos Escobar, C., Malhotra-Kumar, S., Vill, L., Carattoli, A. & Hendriksen, R.S. (2018). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5 for surveillance purposes. *Eurosurveillance*, 23(6), 17-00672.

Reche, M. P., Jiménez, P. A., Alvarez, F., Garcia De Los Rios, J. E., Rojas, A. M., & De Pedro, P. (2003). Incidence of *salmonellae* in captive and wild free-living raptorial birds in central Spain. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 50(1), 42-44.

Reeves, M. W., Evins, G. M., Heiba, A. A., Plikaytis, B. D., & Farmer, J. J. (1989). Clonal nature of *Salmonella* Typhi and its genetic relatedness to other *salmonellae* as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. *Journal of clinical microbiology*, 27(2), 313-320.

Refsum, T., Vikøren, T., Handeland, K., Kapperud, G., & Holstad, G. (2003). Epidemiologic and pathologic aspects of *Salmonella* typhimurium infection in passerine birds in Norway. *Journal of Wildlife Diseases*, 39(1), 64-72.

Reimschuessel, R., Grabenstein, M., Guag, J., Nemser, S. M., Song, K., Qiu, J., Clothier, K.A., Byrne, B.A., Marks, S.L., Cadmus, K., Pabilonia, K., Sanchez, S., Rajeev, S., Ensley, S., Frana, T.S., Jergens, A.E., Chappell, K.H., Thakur, S., Byrum, B., Cui, J., Zhang, Y., Erdman, M.M., Rankin, S.C., Daly, R., Das, S., Ruesch, L., Lawhon, S.D., Zhang, S., Baszler, T., Diaz-Campos, D., Hartmann, F. & Okwumabua O. (2017). Multilaboratory survey to evaluate *Salmonella* prevalence in diarrheic and non-diarrheic dogs and cats in the United States between 2012 and 2014. *Journal of clinical microbiology*, 55(5), 1350-1368.

- Rhyan, J. C., & Spraker, T. R. (2010). Emergence of diseases from wildlife reservoirs. *Veterinary Pathology*, 47(1), 34-39.
- Riveros, M., & Ochoa, T. J. (2015). Enteropatógenos de importancia en salud pública. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 32(1), 157-164.
- Robertson, S., Burakoff, A., Stevenson, L., Tompkins, B., Patel, K., Tolar, B., Whitlock, L., House, J., Schlater, L., Mackie, T., Morningstar-Shaw, B., Nichols, M., & Basler, C. (2018). Notes from the Field: Recurrence of a Multistate Outbreak of *Salmonella* Enteritidis Infections Linked to Contact with Guinea Pigs—Eight States, 2015–2017. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 67(42), 1195.
- Rocard, J. M., Asadishad, B., Samonte, P. R. V., Ghoshal, S., & Tufenkji, N. (2018). Natural freeze-thaw cycles may increase the risk associated with *Salmonella* contamination in surface and groundwater environments. *Water research X*, 1, 100005.
- Rossolini, G. M., Mantengoli, E., Docquier, J., Musmanno, R. A., & Coratza, G. (2007). Epidemiology of infections caused by multiresistant gram-negatives: ESBLs, MBLs, panresistant strains. *MICROBIOLOGICA-BOLOGNA*, 30(3), 332.
- Rouffaer, L. O., Lens, L., Haesendonck, R., Teyssier, A., Hudin, N. S., Strubbe, D., Haesebrouck, F., Pasmans, F. & Martel, A. (2016). House sparrows do not constitute a significant *Salmonella typhimurium* reservoir across urban gradients in Flanders, Belgium. *PloS one*, 11(5), e0155366.
- Ruiz-Garbajosa, P., & Cantón, R. (2016). Epidemiología de los bacilos gramnegativos multirresistentes. *Rev Esp Quimioter*, 29(1), 21-25.
- Rukambile, E., Sintchenko, V., Muscatello, G., Kock, R., & Alders, R. (2019). Infection, colonization and shedding of *Campylobacter* and *Salmonella* in animals and their contribution to human disease: A review. *Zoonoses and public health*, 66(6), 562-578.
- Rula, O., Maiboroda, O., Kryvoshei, Y., Gerashchenko, N., Muzyka, D., & Stegnyy, B. T. (2019). Monitoring for the circulation of antibiotic-resistant *Salmonella* in poultry and wild birds in Ukraine in 2017. *International Journal of Infectious Diseases*, 79, 42.
- Sánchez, P., Muñoz, R., & Gutiérrez, N. P. (2012). Resistencia bacteriana a los antibióticos: mecanismos de transferencia. *Spei Domus*, 8(17).
- Sanchez-Vizcaino, J. M., Martinez-Aviles, M., Sanchez-Matamoros, A., & Rodriguez-Prieto, V. (2014). Emerging vector-borne diseases and the potential to prevent them spreading. *CAB Reviews*, 9(039), 1-13.
- Santos, N., Jambas, J., Monteiro, A., Amaral, J., Martins, N., Garcia, J., Martinez Fernández, A., Morris Tyler, K., Almeida, T., Abrantes, J. & Esteves, P. J. (2019). *Trichomonas* Infection in a Community of Free-Ranging Domestic and Wild Columbiformes and Bonelli's Eagle (*Aquila fasciata*). *Frontiers in veterinary science*, 6, 148.

- Seif, S., Provencher, J. F., Avery-Gomm, S., Daoust, P. Y., Mallory, M. L., & Smith, P. A. (2018). Plastic and non-plastic debris ingestion in three gull species feeding in an urban landfill environment. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 74(3), 349-360.
- SEO BirdLife (2008). Enciclopedia de las Aves de España. Editada por SEO BirdLife y Fundación BBVA. Recurso online. Website: <https://www.seo.org/listado-aves-2/>. Ultimo acceso: Febrero de 2020.
- Semenov, A. V., Van Bruggen, A. H., Van Overbeek, L., Termorshuizen, A. J., & Semenov, A. M. (2007). Influence of temperature fluctuations on *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in cow manure. *FEMS microbiology ecology*, 60(3), 419-428.
- Sevilla, E., Marín, C., Delgado-Blas, J. F., González-Zorn, B., Vega, S., Kuijper, E., Bolea, R. & Mainar-Jaime, R. C. (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.
- Siegel, J. D., Rhinehart, E., Jackson, M., & Chiarello, L. (2007). Management of multidrug-resistant organisms in health care settings, 2006. *American journal of infection control*, 35(10), S165-S193.
- Simón-Vivan, P., Sanz-Colomo, M., Horna-Campos, O., & Ros-Samsó, M. (2012). Transmisión de *Salmonella* entre tortugas y niños: experiencia de la enfermería de salud pública a propósito de un caso. *Enfermería Clínica*, 22(1), 51-57.
- Simpson, K. M., Hill-Cawthorne, G. A., Ward, M. P., & Mor, S. M. (2018). Diversity of *Salmonella* serotypes from humans, food, domestic animals and wildlife in New South Wales, Australia. *BMC infectious diseases*, 18(1), 623.
- Smith, K. F., Acevedo-Whitehouse, K. & Pedersen, A. B. (2009). The role of infectious diseases in biological conservation. *Animal Conservation*. doi: 10.1111/j.1469-1795.2008.00228.x
- Sommer, S. (2005). The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. *Frontiers in zoology*, 2(1), 16.
- Sommer, H.M., Høg, B.B., Larsen, L.S., Sørensen, A.I.V., Williams, N., Merga, J.Y., Cerdà-Cuellar, M., Urdaneta, S., Dolz, R., Wiczorek, K., Osek, J., David, B., Hofshagen, M., Jonsson, M., Wagenaar, J.A., Bolder, N., & Rosenquist, H. (2016). Analysis of farm specific risk factors for *Campylobacter* colonization of broilers in six European countries. *Microbial Risk Analysis*, 2, 16-26.
- Stanchi, N., Martino, P., Gentilini, E., Reinoso, E., Echeverría, M., Leardini, N., & Copes, J. (2007). *Microbiología Veterinaria*. 1ra. Ed. Buenos Aires: Inter-Médica.
- Strawn, L. K., & Danyluk, M. D. (2010). Fate of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* spp. on fresh and frozen cut mangoes and papayas. *International journal of food microbiology*, 138(1-2), 78-84.

Taggart, M.A., Richards, N., & Kinney, C.A. (2015). Impacts of pharmaceuticals on terrestrial wildlife. *Issues in Environmental Science and Technology*, (41), 216-254.

Taylor, J., Galanis, E., Wilcott, L., Hoang, L., Stone, J., Ekkert, J., Quibell, D., Huddleston, M., McConrnick, R., Whitfield, Y., Adhikari, B., Grant, C.C.R. & Sharma, D. (2012). An outbreak of *Salmonella* Chester infection in Canada: rare serotype, uncommon exposure, and unusual population demographic facilitate rapid identification of food vehicle. *Journal of food protection*, 75(4), 738-742.

Terragno, R., Caffer, M.A.I., Bruno, S., & Binsztein, N. (2003). Parte I: Aislamiento Identificación y Serotipificación de *Salmonella*. *Manual de Procedimientos*, 56.

Teyssier, A., Lens, L., Matthysen, E., & White, J. (2018). Dynamics of gut microbiota diversity during the early development of an avian host: Evidence from a cross-foster experiment. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1524.

Tizard, I. (2004). Salmonellosis in wild birds. In *Seminars in avian and exotic pet medicine* (Vol. 13, No. 2, pp. 50-66). WB Saunders.

Tortora, G.J., Funke, B.R., & Case, C.L. (2007). Introducción a la microbiología. Ed. Médica Panamericana.

Tran, J.H., & Jacoby, G.A. (2002). Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(8), 5638-5642.

Troxler, S., Hess, C., Konicek, C., Knotek, Z., Barták, P., & Hess, M. (2017). Microdilution testing reveals considerable and diverse antimicrobial resistance of *Escherichia coli*, thermophilic *Campylobacter* spp. and *Salmonella* spp. isolated from wild birds present in urban areas. *European journal of wildlife research*, 63(4), 68.

USDA (United States Department of Agriculture) – Economic Research Service (2014). *Cost Estimates of Foodborne Illnesses*. Recurso online. Website: <http://www.ers.usda.gov/data-products/cost-estimates-of-foodborne-illnesses.aspx>. Acceso en diciembre 2019.

Uzzau, S., Brown, D. J., Wallis, T., Rubino, S., Leori, G., Bernard, S., Casadéus, J., Platt, D.J. & Olsen, J. E. (2000). Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiology & Infection*, 125(2), 229-255.

Van Dongen, W. F., White, J., Brandl, H. B., Moodley, Y., Merklings, T., Leclaire, S., Blanchard, P., Danchin, E., Hatch, S. & Wagner, R. H. (2013). Age-related differences in the cloacal microbiota of a wild bird species. *BMC ecology*, 13(1), 11.

Van Schothorst, M., Renaud, A., & Van Beek, C. (1987). *Salmonella* isolation using RVS broth and MLCB agar. *Food Microbiology*, 4(1), 11-18.

Vereen Jr, E., Lowrance, R. R., Jenkins, M. B., Adams, P., Rajeev, S., & Lipp, E. K. (2013). Landscape and seasonal factors influence *Salmonella* and *Campylobacter* prevalence in a rural mixed use watershed. *Water research*, 47(16), 6075-6085.

- Vidal, A. B., Rodgers, J., Arnold, M., & Clifton-Hadley, F. (2013). Comparison of different sampling strategies and laboratory methods for the detection of *C. jejuni* and *C. coli* from broiler flocks at primary production. *Zoonoses and public health*, *60*(6), 412-425.
- Wang, J., Ma, Z. B., Zeng, Z. L., Yang, X. W., Huang, Y., & Liu, J. H. (2017). The role of wildlife (wild birds) in the global transmission of antimicrobial resistance genes. *Zoological research*, *38*(2), 55.
- Ward, M. P., Alinovi, C. A., Couëtil, L. L., & Wu, C. C. (2005). Evaluation of a PCR to detect *Salmonella* in fecal samples of horses admitted to a veterinary teaching hospital. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, *17*(2), 118-123.
- Wasfy, M., Oyoyo, B., Elgindy, A., & Churilla, A. (1995). Comparison of preservation media for storage of stool samples. *Journal of clinical microbiology*, *33*(8), 2176-2178.
- Woodward, D. L., Khakhria, R., & Johnson, W. M. (1997). Human salmonellosis associated with exotic pets. *Journal of Clinical Microbiology*, *35*(11), 2786-2790.
- WHO (World Health Organization) (2002). Risk assessments of *Salmonella* in eggs and broiler chickens (Vol. 2). Food & Agriculture Org.
- WHO (World Health Organization) (2018). Fact sheets: *Salmonella* (non-typhoidal). Food & Agriculture Org. Recurso online. Website: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)). Último acceso: Febrero 2020.
- Wilcove, D. S., & Wikelski, M. (2008). Going, going, gone: is animal migration disappearing. *PLoS biology*, *6*(7).
- Wilson, B. A., Ho, B. T., & Winkler, M. E. (2019). Bacterial pathogenesis: a molecular approach. John Wiley & Sons.
- Zaragoza, F. M., Guerrero, F. F., & García, S. V. (2019). One health: Cambio climático, contaminación ambiental y el impacto sobre la salud humana y animal. Amazing Books.
- Zhao, C., Shao, N., Yang, S., Ren, H., Ge, Y., Zhang, Z., Zhao, Y. & Yin, X. (2019). Integrated assessment of ecosystem health using multiple indicator species. *Ecological engineering*, *130*, 157-168.
- Zinsstag, J., Schelling, E., Waltner-Toews, D., & Tanner, M. (2011). From “one medicine” to “one health” and systemic approaches to health and well-being. *Preventive veterinary medicine*, *101*(3-4), 148-156.