



Universidad
Complutense
Madrid



MÁSTER BIOLOGÍA DE LA CONSERVACIÓN

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

**Gorrión común (*Passer domesticus*)
y genes de resistencia a antimicrobianos.
Estudio comparado entre entorno ganadero y urbano.**



Verónica Delicado Losa

TUTORES: Prof. Dr. Jose Ignacio Aguirre y Dr. Fernando Esperón Fajardo

Afiliación: Grupo de Epidemiología y Sanidad Ambiental. CISA-INIA

Madrid, Noviembre de 2015.

ÍNDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	4
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1. Historia de las resistencias a antimicrobianos	6
1.1.1. Retos actuales en la Salud Pública.	6
1.1.2. La resistencia a antimicrobianos en ganadería y agricultura.	7
1.2. Mecanismos de resistencia: papel de los plásmidos.....	8
1.3. Resistencias a antimicrobianos en el medio ambiente.....	10
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
2.1. Obtención de las muestras.....	13
2.2. Extracción del ADN	14
2.3. Selección de genes de resistencia y PCR a tiempo real.....	14
2.4. Establecimiento de curvas patrón.	15
2.5. Cuantificación de las muestras.	15
2.6. Estadística.....	16
3. RESULTADOS.....	17
4. DISCUSIÓN	20
5. CONCLUSIONES	26
6. BIBLIOGRAFÍA.....	27
7. ANEXO. PROTOCOLOS DE rt-PCR GENES DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS.....	37

RESUMEN

Actualmente la resistencia a los antimicrobianos está considerada un serio problema creciente de salud pública. En los últimos 70 años, el consumo desmesurado y/o indebido de estos fármacos ha propiciado la aparición de organismos resistentes, responsables de graves enfermedades en todo el mundo. Si bien, la presencia y consecuencias de las resistencias a antimicrobianos están siendo ampliamente estudiadas en el ser humano y en los animales domésticos, existe un gran vacío de conocimiento de sus efectos sobre el medio ambiente, y muy especialmente sobre la fauna silvestre. Cada vez son más los estudios que sostienen que la presencia de las resistencias a antimicrobianos en fauna silvestre es potencialmente antropogénica, existiendo una correlación entre los niveles de resistencias que éstos pueden presentar y el nivel de contacto que establecen con el hombre. El objetivo de este trabajo es obtener información relevante sobre el impacto de la ganadería en la adquisición de genes de resistencia en especies sinantrópicas. Para ello, se ha seleccionado una población de gorriones comunes (*Passer domesticus*) procedentes de un entorno ganadero (granja intensiva de ovino) y otra población de la misma especie de un entorno urbano sin aparente exposición a antimicrobianos. Se ha realizado un experimento de jardín común, manteniendo ambas poblaciones en cautividad en condiciones estandarizadas de situación, exposición y alimentación.

Se han seleccionado seis genes de resistencia a antimicrobianos, detectados y cuantificados mediante PCR a tiempo real, trabajando directamente sobre el metagenoma intestinal bacteriano. Gracias a ello, hemos podido evidenciar cómo los genes de resistencia detectados con mayor frecuencia coinciden con los descritos en investigaciones previas, poniendo de manifiesto su elevada ubicuidad. Sin embargo, es la primera vez que se describe la detección del gen *mecA* en gorriones comunes. Un hallazgo de gran relevancia desde el punto de vista sanitario.

Se han observado diferencias significativas en los muestreos realizados en el entorno ganadero entre los años 2013-2015, lo cual se atribuye a los posibles tipos de tratamientos que se hayan suministrado al ganado ovino. Por otro lado, también se han hallado diferencias entre el entorno ganadero y urbano en el año 2013, poniendo de manifiesto la importancia de la exposición en la adquisición y en la cuantificación de los genes de resistencia, sirviendo éstos como indicadores del grado de exposición en explotaciones

ganaderas. Así mismo, la disminución de las resistencias durante el periodo experimental podría estar relacionada con la ausencia de exposición de los gorriones del entorno ganadero, cuyo descenso alcanzaría niveles de resistencia basales.

Este es el primer estudio de genes de resistencia a antimicrobianos realizado directamente sobre el metagenoma digestivo en fauna silvestre. Los resultados han demostrado el impacto de la ganadería en la presencia de dichos genes, y cómo éstos son capaces de disminuir cuando la exposición cesa. Se realizarán futuros estudios en otros escenarios productivos (p.e. aviar, porcino), y sobre la consecuencia que los genes de resistencia a antimicrobianos pueden ocasionar sobre la diversidad y abundancia de la microbiota digestiva, y por ende, sus efectos en la eficacia biológica de sus hospedadores.

Palabras clave: ganadería, aves sinantrópicas, PCR a tiempo real, resistoma, *mecA*

ABSTRACT

Currently, antimicrobial resistance is increasingly considered a serious public health problem. In the past 70 years, the excessive and / or misuse of these drugs has led to the emergence of resistant organisms, responsible for serious diseases worldwide. While the presence and impact of antimicrobial resistance is being widely studied in humans and domestic animals, there is a large gap in knowledge of its effects on the environment, and particularly on wildlife. More and more research to argue that the presence of antimicrobial resistance in wildlife is mainly anthropogenic, a correlation between the levels of resistance that they can present and the level of contact they have with the man.

The objective of this work is to obtain relevant information about the impact of livestock on the acquisition of resistance genes in synanthropic species. To achieve such goals, we selected a population of house sparrows (*Passer domesticus*) from a farming environment (intensive sheep farm) and a population of the same species of an urban environment without evident antimicrobials exposure. A common garden experiment was performed, keeping both captive populations under standardized conditions of situation, exposure and food.

We have selected six antimicrobial resistance genes, detected and quantified by real-time PCR, working directly on the intestinal bacterial metagenome. As a result, we were able to show how the resistance genes most frequently detected in line with those described in previous studies, demonstrating its high ubiquity. However, it is the first time the detection of the *mecA* gene is described in sparrows. Such fact reveals as very important from a health point of view.

Significant differences were observed in the samples of farming environment between the years 2013-2015, which is attributed to the possible types of treatments that have been delivered to the sheep. On the other hand, we have also found differences between the farm and the urban environment in 2013, highlighting the importance of the exhibition in the acquisition and quantification of resistance genes, serving them as indicators of the degree of exposure in livestock farms.

Likewise, the reduction in resistance during the experimental period could be related to the lack of exposure of the farming environment sparrows until the reach of basal levels of resistance.

This is the first study about antimicrobial resistance genes directly analyzed on the digestive metagenome of wildlife. Our main results have shown the impact of livestock on the presence of the antimicrobial resistance genes and how they decrease if exposure disappears. Further studies will be attempt in other productive frameworks (e.g. poultry, swine), as well as the consequences about the presence of antimicrobial resistance genes on diversity and abundance of the digestive microbiota and thus, their effects on their host's fitness.

Keywords: livestock, sinanthropic birds, real time PCR, resistome, *mecA*

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Historia de las resistencias a antimicrobianos.

El descubrimiento de los antimicrobianos se ha considerado desde el punto de vista sanitario uno de los avances más importantes en la historia de la humanidad, al reducir la mortalidad infantil en muchas partes del mundo, salvar a millones de personas o incrementar la esperanza de vida (Golkar et al., 2014; Blair et al., 2015; Hansen et al., 2015; Ventola, 2015).

No obstante, en los últimos 70 años el consumo desmesurado y/o indebido de los antimicrobianos por parte de la población (van de Bogaard y Stobberingh, 2000; Thompson et al., 2007; Sengupta et al., 2013; Michael et al., 2014; Hansen et al., 2015) ha originado una *era de abusos* que se ha visto reflejada en la reducción o pérdida de eficacia de los compuestos (CDC 2013; Sengupta et al., 2013; Read y Woods, 2014). De este modo, se ha favorecido el mantenimiento e incluso la aparición de enfermedades cuyos agentes causales han dejado de ser sensibles a la terapéutica convencional (Bergmans et al., 1997; Guerra et al., 2003; Sengupta et al., 2013). Esto ha promovido, incluso hasta nuestros días, la búsqueda incesante de nuevas sustancias, algo cada vez más complejo y preocupante, especialmente si tenemos en cuenta que en los últimos 20 años tan solo se ha introducido una nueva clase de antimicrobianos (oxazolidinona), y ya han tenido lugar los primeros casos de resistencia (Sengupta et al., 2013). De hecho, en la actualidad no hay ningún grupo de antimicrobianos que esté libre de este fenómeno (Aarestrup et al., 1999; Levy y Marshall, 2004; Rossolini et al., 2014; Sousa et al., 2014). Los estudios epidemiológicos han demostrado que hay una relación directa entre el consumo de antimicrobianos y la aparición y diseminación de cepas resistentes (CDC 2013; Nature, 2013; Luyt et al., 2014; Ventola, 2015).

1.1.1. Retos actuales en la Salud Pública.

El CDC (Center for Disease Control and Prevention) en 2013 o investigadores como Rossolini (2014) han hablado de la existencia de una pandemia mundial de cepas bacterianas Gram positivas resistentes, altamente patógenas y muy peligrosas para la salud pública (Talebi et al., 2015), como son las especies de *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis* resistentes a la Vancomicina (VRE) (Silva et al., 2012), y *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) (Golkar et al., 2014; Sousa et al.,

2014; Avendaño, 2015). En EEUU, unas 20000 personas se infectan anualmente por VRE y mueren alrededor de unas 1300. Esta cifra se incrementa hasta las 11285 defunciones si las infecciones están producidas por los MRSA (Gross, 2013; Avendaño, 2015). En el caso de las bacterias Gram negativas, su incipiente resistencia a prácticamente todos los fármacos disponibles recuerda a la *era pre-antibiótico* (CDC 2013; Golkar et al., 2014). De manera habitual están implicadas en infecciones graves, por lo que actualmente se consideran un gran problema de salud pública a nivel mundial (Fariñas y Martínez-Martínez, 2013).

1.1.2. La resistencia a antimicrobianos en ganadería y agricultura.

La resistencia a antimicrobianos no es solo un problema asociado a la salud pública. En sanidad animal, es bien conocido el amplio uso de los antimicrobianos en animales de abasto: profilaxis, tratamiento de enfermedades y promotores del crecimiento (APC) (Marshall y Levy, 2011; García-Álvarez et al., 2012; Bartlett et al., 2013; Allen y Stanton, 2014). Anualmente en EEUU, alrededor de unos 7×10^6 kg. de antimicrobianos son administrados como APC en ganadería (Levy, 2002; Golkar et al., 2014). En cambio, en la Unión Europea el escenario es muy diferente. El primer país en prohibir los APC fue Suecia. Años más tarde le seguirían otros países como Dinamarca o Reino Unido debido a los continuos y nuevos hallazgos de cepas multirresistentes, no sólo en personas, sino también en las canales cárnicas y en los purines (Cogliani et al., 2011).

El problema de las resistencias asociado al elevado uso de los antimicrobianos con fines terapéuticos en ganadería (García-Álvarez et al., 2012), tiene un doble impacto negativo. El primero de ellos está relacionado con la cadena alimentaria (Levy y Marshall, 2004; Barton, 2014; Colobatiu et al., 2015). El hombre es capaz de incorporar las bacterias y/o genes de resistencia presentes en los animales de granja que consume (cerdos, aves de corral, ganado vacuno) (Wright et al., 2010; Barton, 2014; Wichmann et al., 2014). De este modo, las resistencias son incorporadas a su microbiota intestinal (van den Bogaard y Stobberingh, 2000), favoreciendo el desarrollo de resistencias incluso entre las bacterias comensales, que habitualmente no son causa de infección (Smith et al., 2002; Bartoloni et al., 2004; Golkar et al., 2014; Radhouani et al., 2014), pero que pueden actuar como un potente reservorio de resistencias (Allen y Stanton, 2014).

El fenómeno de la transferencia de resistencias a antimicrobianos entre personas y animales de granja fue demostrado por Levy (1976), a partir del experimental *in situ* que llevó a cabo

en una explotación avícola. Éste evidenció que los granjeros que suplementaban el pienso con tetraciclinas a bajas dosis como APC, desarrollaban en su microbiota intestinal bacterias coliformes resistentes a las tetraciclinas, de forma lenta y continuada. También las bacterias resistentes estaban presentes en la microbiota intestinal de las aves, pero aparecían de forma más rápida (a la semana de suministrar el pienso suplementado), y en mayores cargas que en los granjeros. Los resultados obtenidos de esta investigación fueron opuestos a los que obtuvieron de otros estudios que realizaron en granjas donde no se empleaban APC (Levy et al., 1976; Marshall y Levy, 2011; Bartlett et al., 2013; Ventola, 2015).

El segundo impacto está relacionado con la potencial alteración que sufren las comunidades microbianas del medio ambiente (Bartlett et al., 2013; Allen y Stanton, 2014). El 90% de los antimicrobianos empleados en la ganadería se excretan por la orina y por las heces, por lo que la presencia de dichos compuestos o sus metabolitos pueden favorecer la presión selectiva de las cepas resistentes en el entorno (Sayah et al., 2005; Wooldridge, 2012), siendo eliminadas y diseminadas al medio a través de los purines (Allen y Stanton, 2014). Se contamina el suelo y el agua (superficiales, subterráneas), que posteriormente es utilizada en el riego de frutas y verduras, además de ser abonadas con las excretas (estiércol) (Wright 2010; Wooldridge, 2012; Bartlett et al., 2013; Sousa et al., 2014; Wichmann et al., 2014).

1.2. Mecanismos de resistencia: papel de los plásmidos.

Para comprender el comportamiento epidemiológico de las cepas resistentes, resulta fundamental conocer los mecanismos de la resistencia a antimicrobianos. Las resistencias se producen por diferentes mecanismos, de ahí que diferenciamos entre las resistencias intrínsecas y las adquiridas (Blair et al., 2015). Hay especies bacterianas que pueden presentar en su genoma de forma inherente determinadas particularidades estructurales y/o funcionales, que les confiere resistencia a ciertos antimicrobianos (resistencia intrínseca) (Blair et al., 2015). En el caso de que las bacterias sean susceptibles a los antimicrobianos y ante la presencia de dichos compuestos, se pueden producir dos eventos diferentes: que sean eliminadas por el antimicrobiano o que desarrollen las resistencias a partir de mecanismos de resistencia adquirida. Existen dos principales mecanismos de resistencia adquirida: las mutaciones espontáneas (p.e. alteran la proteína diana del fármaco, expulsan el fármaco al incrementar la actividad de las bombas celulares, etc.) (McManus, 1997;

Guerra et al., 2003; Levy y Marshall, 2004; Allen y Stanton, 2014; Read y Woods, 2014; Blair et al., 2015); y la adquisición de elementos génicos móviles (plásmidos, transposones e integrones) (Levy y Marshall, 2004; Randall et al., 2004; Middleton y Ambrose, 2005; Sommer et al., 2009; Allen y Stanton, 2014; Read y Woods 2014; Blair et al., 2015). Precisamente, son los elementos móviles los que permiten la adaptación rápida de las bacterias a los nuevos antimicrobianos, así como la transferencia de los genes de resistencia, especialmente a dosis subinhibitorias (Allen y Stanton, 2014). De entre los elementos génicos móviles, los genes de resistencia a antimicrobianos asociados a plásmidos poseen una mayor relevancia epidemiológica, médica y práctica, gracias a la habilidad que poseen para transferirse entre las comunidades microbianas (Sommer et al., 2009; Dantas y Sommer, 2014; Ramírez et al., 2014). Se ha comprobado que los plásmidos hallados en especies bacterianas patógenas, previas a la *era pre-antibiótica*, no poseen genes de resistencia (Wright, 2010). Por lo que el uso abusivo e indebido de los antimicrobianos, ha propiciado su rápido surgimiento como principales vectores de genes de resistencia (Wright, 2010; Sousa et al., 2014). La presencia de dichos genes no resulta esencial para la supervivencia de las bacterias en condiciones fisiológicas, pero sí lo son cuando éstas tienen que sobrevivir bajo determinadas condiciones adversas, como por ejemplo, ante la presencia de un antimicrobiano (Schwarz et al., 2014).

Los plásmidos no sólo portan genes de resistencia a diferentes grupos de antimicrobianos, sino que pueden incorporar de forma simultánea ciertos factores de virulencia (Ramírez et al., 2014) y otros grupos de genes que le proporcionan resistencia a desinfectantes, biocidas e incluso a metales (Levy y Marshall, 2004; Baker-Austin et al., 2006; Thompson et al., 2007; Chattopadhyay y Grossart, 2010; Ramírez et al., 2014; Schwarz et al., 2014), confiriéndoles una ventaja adaptativa sobre el resto de la microbiota.

La adquisición de genes de resistencia vehiculados por plásmidos y el efecto de los mismos, asociados al consumo de antimicrobianos, está siendo muy estudiado en humanos. La microbiota intestinal se considera un ecosistema especialmente complejo (Suau et al., 1999; Pérez-Cobas et al., 2013), cuyos desequilibrios pueden tener un impacto importante en la salud (Grønvold et al., 2010; Allen y Stanton, 2014). Un ejemplo de ello es el ocasionado por el consumo de los antimicrobianos (Modi et al., 2013; Pérez-Cobas et al., 2013), especialmente cuando la microbiota intestinal está expuesta a dosis subinhibitorias

(Allen y Stanton, 2014). Se ha evidenciado que las bacterias que adquieren los genes de resistencia a antimicrobianos se multiplican y ejercen una selección y presión selectiva sobre el resto de la microbiota (van den Bogaard y Stobberingh, 2000; Dolejska et al., 2007; Sousa et al., 2014; Roca et al., 2015). De este modo, se potencian las mutaciones (Allen y Stanton, 2014; Suzuki et al., 2015), se incrementa la patogenicidad de las cepas patógenas resistentes; se convierten en cepas resistentes las bacterias comensales y proliferan los agentes patógenos oportunistas como *Clostridium difficile* (Wlodarska y Finlay, 2010; Pérez-Cobas et al., 2013; Allen y Stanton, 2014). Esto conlleva la perturbación del equilibrio ecológico (Grønvold et al., 2010), pues se altera la composición, la diversidad y por tanto, la funcionalidad de la comunidad microbiana, y por ende, de todo el ecosistema (Wlodarska y Finlay, 2010; Pérez-Cobas et al., 2013; Allen y Stanton, 2014; Power et al., 2014). Actualmente la microbiota intestinal se considera uno de los reservorios de genes de resistencia a antimicrobianos más importantes (Gosalbes et al., 2015).

1.3. Resistencias a antimicrobianos en el medio ambiente.

Si bien, la presencia y consecuencias de las resistencias a antimicrobianos están siendo ampliamente estudiadas en el ser humano y en los animales domésticos, existe un gran vacío de conocimiento de sus efectos sobre el medio ambiente, y muy especialmente sobre la fauna silvestre (Livermore et al., 2001). Ésta se ve expuesta a los microorganismos resistentes o a los elementos génicos que les confieren la resistencia, principalmente a través del alimento y el agua contaminada (Cole et al., 2005; Kozak et al., 2009; Guenther et al., 2010, 2011; Radhouani et al., 2012, 2014). Son varios los estudios que han demostrado que la frecuencia de aislamiento de bacterias resistentes a antimicrobianos son mayores en los animales que habitan en zonas próximas al hombre o en zonas agrícolas, que aquellos que viven en regiones más aisladas o vírgenes (Cole et al., 2005; Kozak et al., 2009). No obstante, también se han aislado cepas de *E. coli* resistentes en las aves del Ártico y de la tundra siberiana (Sjölund et al., 2008), por lo que se especula que el comportamiento migratorio de las aves favorece la diseminación de las resistencias a lugares remotos o a zonas preservadas del planeta (Guenther et al., 2011; Radhouani et al., 2014). A pesar de estos hallazgos, los investigadores sostienen que el origen de las resistencias a antimicrobianos en fauna silvestre es principalmente antropogénico

(Radhouani et al., 2009, 2014; Thaller et al., 2010; Albrechtova et al., 2014; Sousa et al., 2014), existiendo una correlación entre los niveles de resistencias que éstos pueden presentar y el nivel de contacto que establecen con el hombre (Skurnik et al., 2006; Radhouani et al., 2009, 2014; Guenther et al., 2011; Sousa et al., 2014). En este sentido, se han publicado estudios basados en el cultivo y aislamiento de cepas patógenas zoonóticas, como *Enterococcus sp.*, *Salmonella sp.* y *E. coli* en personas, en animales de granja (cerdos, aves de corral y vacas) (Skurnik et al., 2006; Dolejska et al., 2007) y en especies silvestres, principalmente en aves (Sjölund et al., 2008; Radhouani et al., 2009, 2014; Sacristán et al., 2014; Sulzner et al., 2014).

Cuando las especies silvestres, sobre todo aquellas que tienen una estrecha relación con el hombre y el ganado, entran en contacto con cepas resistentes a antimicrobianos o con los elementos génicos, no sólo se infectan. También pueden convertirse en reservorios de cepas resistentes, en vectores de las mismas e incluso en organismos bioindicadores de contaminación microbiológica de origen antrópico (Sayah et al., 2005; Dolejska et al., 2007; Bonnedahl y Järhult, 2014; Sousa et al., 2014). De manera, que pueden emplearse como indicadores del grado de antropización (Bonnedahl y Järhult, 2014; Sacristán et al., 2014). Ya décadas atrás, autores como Kanai (1981), evidenciaron que, en concreto, las aves silvestres desempeñan un papel muy importante en la diseminación de cepas resistentes a antimicrobianos, pues al propagarlas por el medio ambiente, otros animales son capaces de adquirirlas (Dolejska et al., 2007; Sjölund et al., 2008).

Sin embargo, resulta imprescindible el desarrollo de estudios epidemiológicos que ayuden a comprender mejor cómo se produce la transmisión de bacterias resistentes a las aves silvestres y el papel que éstas desempeñan en el ambiente (Guenther et al., 2010). Tampoco se conoce suficientemente el papel que las bacterias comensales juegan en la adquisición, mantenimiento y dispersión de los elementos móviles de las resistencias (Pérez-Cobas et al., 2013; Allen y Stanton, 2014).

El análisis de la microbiota gastrointestinal se ha basado tradicionalmente en los métodos de cultivo y microscopía (Clapper y Meade, 1963; Power et al., 2014). Dado que en torno al 80% de la microbiota no es cultivable (Hamady y Knight, 2009), se han desarrollado técnicas moleculares, como las derivadas de la PCR a tiempo real, que proporcionan resultados más fiables al detectar de forma directa, y cuantificar los genes de resistencia

presentes en el metagenoma bacteriano, por lo que se considera una herramienta muy útil en estudios ambientales (Radhouani et al., 2014). Las técnicas no dependientes del cultivo bacteriano pueden ser herramientas fundamentales a la hora de valorar con una mayor precisión la presencia de genes de resistencia a antimicrobianos en el resistoma (conjunto de genes de resistencia a antimicrobianos) (Patterson y Singer, 2006; Cantón, 2009). Lamentablemente, hasta la fecha, no se ha realizado ningún estudio del resistoma en especies silvestres.

Disponer de un buen conocimiento de la relación entre hombre, animales domésticos y fauna silvestre, es necesario y valioso, pues nos permite adquirir una mejor comprensión de la problemática existente, así como de la dinámica que siguen las cepas resistentes en nuestro medio ambiente. La intensificación en la producción ganadera y con ello, la del empleo de los antimicrobianos y la rápida propagación de bacterias resistentes, ha generado muchos interrogantes respecto al impacto que éstas pueden ocasionar sobre la fauna silvestre (Dolejska et al., 2008; Sacristán et al., 2014).

El objetivo de este trabajo es comprender mejor el impacto que las actividades ganaderas ejercen sobre la presencia de genes de resistencia a antimicrobianos, así como la evolución de dichos genes a lo largo del tiempo en ausencia de la fuente potencial de exposición, empleando para el estudio, una especie sinantrópica, el gorrión común (*Passer domesticus*). Para ello, se han elegido dos poblaciones procedentes de dos escenarios (urbano y ganadero) y se han seleccionado los siguientes genes de resistencia a detectar contenidos en plásmidos: *suII*, *suIII*, *qnrS*, *tetA*, *tetQ* y *mecA* (Chopra y Roberts, 2001; Bryan et al., 2004; Pallecchi et al., 2012; Jiang et al., 2014; Schwarz et al., 2014; Colobatiu et al., 2015).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Obtención de las muestras

- Muestras de campo (t_0):

Con el fin de obtener información relevante sobre la influencia de los entornos ganaderos en la adquisición de genes de resistencia en gorriones comunes, se seleccionó una población de estudio y una de control.

- *Población de estudio*: gorriones procedentes de una granja de ovino, en intensivo, en la localidad de Olmeda de las Fuentes (Madrid) (40.21N, 3.12O).
- *Población control*: gorriones procedentes de una zona urbanizada, sin contacto con explotaciones ganaderas, en la localidad de Las Rozas (Madrid) (40.33N, 3.54O).

Se capturaron mediante redes japonesas y se realizó un marcaje mediante anillas oficiales del MAGRAMA. De todos los ejemplares se tomaron muestras de lavado cloacal, mediante enema, empleando PBS estéril y pipetas Pasteur de plástico estériles. El enema se realizó con un volumen aproximado de 0,5 mL y se depositó en un microtubo estéril de 1,7 mL. Los muestreos se realizaron en el periodo post-reproductor del año 2013 (8 individuos adultos de cada entorno).

Con el fin de identificar patrones de persistencia de genes de resistencia a antimicrobianos en los individuos de los mismos entornos a lo largo del tiempo, se replicó el muestreo en la misma época del año 2015 (9 individuos adultos del entorno ganadero y 13 individuos adultos del entorno urbano).

- Muestras del estudio experimental (t_1 y t_2):

Tras la toma de muestras en la temporada del 2013, los animales fueron capturados, trasladados a aviarios con condiciones controladas y sometidos a un estudio experimental. Antes de que éste se iniciase, los gorriones se mantuvieron en el aviario para aclimatarse a las instalaciones durante una semana. Pasado dicho periodo, los 16 individuos se dividieron en cuatro grupos experimentales siguiendo un modelo de jardín común, consistente en el mantenimiento de los ejemplares en aviarios.

La duración del experimento fue de tres semanas. Tras este período, los animales recibieron un suplemento vitamínico durante una semana para recuperarse de los

posibles efectos de la dieta y para mejorar su condición física antes de su liberación; posteriormente fueron devueltos a su lugar de origen.

Los aviarios disponían de agua y comida *ad libitum*; posaderos, refugio y bandejas de arena con gastrolitos, así como de espacio suficiente para que los animales pudiesen desplazarse sin dificultad (la densidad poblacional estimada del aviario es de 2.25 m³ por individuo). Debido al carácter gregario de esta especie, los gorriones se mantuvieron durante 21 días en grupos de 4 individuos compuestos por machos y hembras, para facilitar el mantenimiento de su conducta social habitual.

Se tomaron muestras antes de iniciar el experimento (t_0) a los 11 (t_1) y a los 21 días (t_2). Las muestras se refrigeraron y fueron transportadas al laboratorio conservándolas a -80°C hasta su posterior análisis, realizado en el Centro de Investigación en Sanidad Animal (INIA-CISA), Valdeolmos (Madrid).

2.2. Extracción del ADN

Se procedió a la extracción del ADN mediante filtración por presión (QuickGene DNA tissue kit S, Fujifilm®), de cada una de las muestras, siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN extraído fue posteriormente analizado mediante PCR a tiempo real.

2.3. Selección de genes de resistencia y PCR a tiempo real

Las muestras se validaron mediante la detección del gen 16S por PCR a tiempo real, empleando el protocolo descrito por Jiang (2013). Tras la validación, se llevó a cabo la detección de 6 genes de resistencia a antimicrobianos:

- Los genes *sulIy sulII* (resistencia a las sulfonamidas), *tet(A)* y *tet(Q)* (resistencia a las tetraciclinas) y *qnrS* (resistencia a las fluoroquinolonas) por el amplio uso de estos antimicrobianos en el tratamiento y profilaxis de enfermedades infecciosas en ganadería.
- El gen *mecA* (resistencia a la meticilina), por el impacto que conlleva su presencia para la salud pública.

Para la detección de los genes de resistencia, se empleó la PCR a tiempo real. Esta técnica molecular permite trabajar directamente sobre el metagenoma intestinal bacteriano de las aves. Puesto que el 80% de la microbiota intestinal no es cultivable, nuestro estudio no se ha limitado a una pequeña fracción de bacterias que solo pueden ser estudiadas a través del procedimiento clásico, el cultivo (Power et al., 2014).

Los genes y las pruebas realizadas figuran en la tabla 1 y anexo (pág. 37).

Tabla 1. Genes de resistencia a antimicrobianos para el estudio y técnicas que se han realizado.

Gen	Resistencia a	Método	Referencia
<i>suII</i>	Sulfonamidas	rtPCR (Sybr Green)	(Jiang et al., 2013)
<i>suIII</i>	Sulfonamidas	rtPCR (Sybr Green)	(Jiang et al., 2013)
<i>qnrS</i>	Fluoroquinolonas	rtPCR (Sybr Green)	(Marti y Balcazar, 2013)
<i>tet(A)</i>	Tetraciclinas	rtPCR (Sybr Green)	(Jiang et al., 2013)
<i>tet(Q)</i>	Tetraciclinas	rtPCR (Sybr Green)	(Jiang et al., 2013)
<i>mecA</i>	Meticilina (cepas MRSA)	rtPCR (sonda TaqMan)	(Francois et al., 2003)

2.4. Establecimiento de curvas patrón.

Para la cuantificación de los genes de resistencia se han elaborado controles estándares a partir de los amplicones obtenidos de las PCRs para cada gen de resistencia y para el gen 16S. Se clonaron en *E. coli* mediante kits comerciales (Bellière et al., 2011), para a continuación purificarse y cuantificarse mediante espectrofotometría. El número de copias se obtuvo mediante la división entre la concentración obtenida y el peso molecular del plásmido (vector más inserto), obtenido mediante la secuenciación del mismo. Se realizó una curva patrón, mediante diluciones en base 10, hasta alcanzar concentraciones inferiores a una copia por reacción. Se obtuvo la sensibilidad de la técnica, el coeficiente de correlación, la eficiencia y el rango de cuantificación.

2.5. Cuantificación de las muestras.

Las fórmulas de cuantificación se obtuvieron a partir del ciclo umbral (Ct) de las curvas patrón de cada uno de los genes de resistencia, incluyendo el 16S, que se empleó como cuantificación bacteriana. El Ct se define como el ciclo a partir del cual una muestra presenta una variación de la fluorescencia ($\Delta F/\Delta C$), considerándose dicha muestra como positiva a la detección. Para normalizar el estudio, el Ct se ha obtenido en todos los casos con el valor de $\Delta F/\Delta C$ de 0,02. A continuación, se calcularon los coeficientes de la curva patrón, siendo la fórmula:

$\log x = -ay + b$, donde

x es la concentración del control positivo, e

y es el Ct del mismo.

Para el cálculo del número de copias de cada uno de los genes de resistencia (incluyendo el gen 16S) en las muestras positivas se tomó el Ct de las mismas, obtenido con el valor $\Delta F/\Delta C$ de 0,02. Para la comparación de las cargas de genes de resistencia entre distintas muestras se relativizó con el número total de bacterias, tal como figura en la fórmula siguiente:

$$\text{concentración relativa del gen } X = \frac{\text{n}^\circ \text{ de copias del gen } X}{\text{n}^\circ \text{ de copias de } 16S}$$

La cuantificación solo ha sido posible en los genes *suII* y *suIII* al estar presentes en la mayor parte de los individuos (ver resultados). Dado el reducido número de individuos positivos al resto de genes (*qnrS*, *tet(A)*, *tet(Q)*, *mecA*), solo se ha valorado la presencia- ausencia de los mismos.

2.6. Estadística

Para evaluar las diferencias entre las poblaciones de gorriones del entorno ganadero y urbano se ha realizado un test- de la T para comparar los porcentajes de copias, así como la prevalencia de los genes *suII* y *suIII* y el número promedio de genes y establecer si hay diferencias en dichos emplazamientos entre los años de muestreo 2013-2015 y entre emplazamientos en cada una de las fases del estudio experimental. Además, para evaluar la variación en la prevalencia de cada gen de resistencia a lo largo del estudio experimental, se ha realizado el test de Kruskal Wallis.

Todos los datos se han analizado mediante el programa STATISTICA[®]. Se han considerado los datos estadísticamente significativos a partir de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

Los resultados se hallan resumidos en las tablas 2, 3 y 4. Cabe destacar que los seis genes estudiados se han detectado en al menos una muestra.

Tabla 2. Resultados de la detección de genes de resistencia en gorriones comunes (*Passer domesticus*).

Origen	Año	Tiempo	n	% <i>suII</i> ¹	% <i>suIII</i> ¹	% <i>qnrS</i> ¹	% <i>tet(A)</i> ¹	% <i>tet(Q)</i> ¹	% <i>mecA</i> ¹	n° promedio de genes ²	% copias del gen <i>suII</i> ³	% copias del gen <i>suIII</i> ³
Gorriones entorno Ganadero	2013	0	8	100	75	38	25	13	0	2,5	8,5x10 ⁻²	10x10 ⁻²
		1	8	100	37	13	0	13	0	1,6	1,4x10 ⁻²	7,0x10 ⁻⁵
		2	8	100	25	13	0	0	0	1,4	1,4x10 ⁻³	1,9x10 ⁻⁵
	2015	0	9	22	33	0	22	22	0	1,0	7,5x10 ⁻¹	1,2x10 ⁻¹
Gorriones entorno Urbano	2013	0	8	75	0	0	0	0	0	0,75	2,8x10 ⁻³	n/a [*]
		1	8	88	25	13	13	38	13	1,9	3,0x10 ⁻³	3,6x10 ⁻⁵
		2	8	88	12	0	0	0	0	1,0	3,3x10 ⁻³	1,3x10 ⁻⁴
	2015	0	13	0	8	0	8	23	8	0,46	n/a [*]	4,2x10 ⁻³

¹ porcentaje de individuos positivos a la detección del gen.

² media de genes detectada por individuo.

³ porcentaje medio de cepas con el gen de resistencia con respecto al total bacteriano (gen ARNr 16S).

* n/a (no aplicable); por debajo del límite de detección.

Según los resultados obtenidos, observamos que tanto en el 2013 como en el 2015, las resistencias a las sulfonamidas (*suII* y *suIII*) y tetraciclinas (*tet(A)* y *tet(Q)*) son las más frecuentes en los gorriones del entorno ganadero. A diferencia de las resistencias a las fluoroquinolonas (*qnrS*), que sólo están presentes en el 2013. El porcentaje de individuos positivos a genes de resistencia, el número promedio de genes detectados y el porcentaje de copias de *suII* y *suIII*, decrecen a lo largo del estudio experimental.

Los gorriones del entorno urbano sólo presentan resistencias a las sulfonamidas en el 2013 a t₀ y al resto de genes en el t₁. En el 2015, también presentan resistencias a las sulfonamidas, además de resistencias a las tetraciclinas y meticilina (*mecA*). Esta última de gran relevancia en salud pública al estar involucrada en graves enfermedades nosocomiales.

Tabla 3. Resultados del estudio estadístico (I). Comparación entre entornos y años.

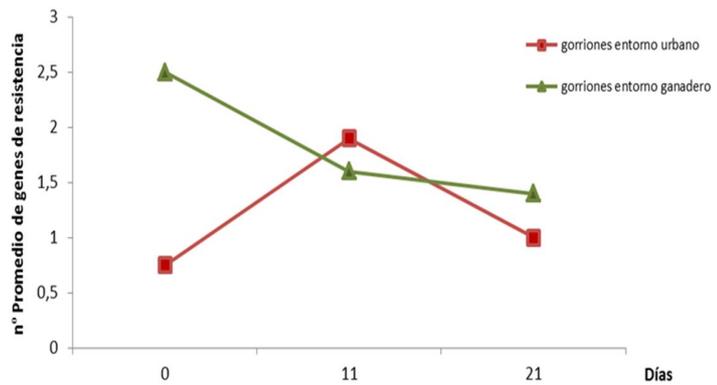
	Gorriones entorno Ganadero 2013-2015	Gorriones entorno Urbano 2013-2015	Gorriones entorno Ganadero y Urbano 2013 (t=0)
% <i>suII</i>	t= 4.970 p= 0.000	t= 5.941 p=0.000	n.s.
% <i>suIII</i>	n.s.	n.s.	t= -4.583 p= 0.000
% copias del gen <i>suII</i>	t= -2.499 p= 0.037	n.s.	n.s.
n° promedio de genes	t= 3.195 p=0.006	n.s.	t= -5.584 p= 0.000

n.s. no significativo

Se observan diferencias significativas interanuales dentro de una misma localidad. Entre los años de muestreo 2013-2015, los gorriones del entorno ganadero presentan diferencias significativas en el porcentaje de individuos positivos al gen *suII*, así como en el porcentaje de copias de éste y en el número promedio de genes. Los gorriones del entorno urbano solo muestran diferencias en el porcentaje de individuos positivos al gen *suII*.

También se observan diferencias significativas en el porcentaje de individuos positivos al gen *suIII* y en el número promedio de genes al comparar los gorriones de ambos escenarios en el año 2013 a tiempo 0.

No se han encontrado diferencias significativas entre las poblaciones de gorriones urbanos y ganaderos a tiempo 1 y 2 del estudio experimental.



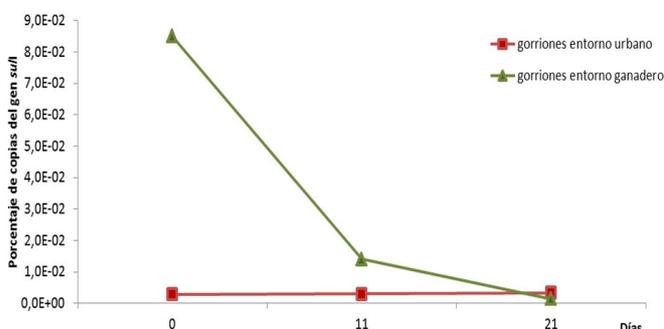
Gráfica 1. Número promedio de genes de resistencia a antimicrobianos presentes en los gorriones de ambos entornos durante el estudio experimental. *diferencias significativas (p<0.05).

Tabla 4. Resultados del estudio estadístico (II). Variación a lo largo del estudio experimental de cada variable.

	% <i>tet(Q)</i>	% copias del gen <i>suII</i>	n° promedio de genes
Gorriones entorno Ganadero 2013	n.s.	H= 8.735 p=0.013	H= 9.706 p= 0.008
Gorriones entorno Urbano 2013	H=6.571 p= 0.037	n.s.	n.s.

n.s. no significativo

Se observan diferencias significativas en el porcentaje de copias del gen *suII* y en el número



Gráfica 2. Porcentaje de cepas con el gen *suII* con respecto al total bacteriano durante el estudio experimental. *diferencias significativas ($p < 0.05$).

promedio de genes en los gorriones del entorno ganadero, cuyos valores descienden a lo largo del estudio experimental hasta alcanzar valores similares a los presentados por los gorriones del entorno urbano.

No se han encontrado diferencias significativas en los porcentajes de prevalencia en las fluoroquinolonas (*qnrS*), tetraciclinas (*tet(A)*, *tet(Q)*)

y meticilina (*mecA*) en los gorriones del entorno ganadero en el año 2013. Los gorriones del entorno urbano solo presentan diferencias en el porcentaje de individuos positivos al gen *tet(Q)*.

4. DISCUSIÓN

El presente estudio es el primero en el que se han detectado, cuantificado y evaluado a lo largo del tiempo la presencia y concentración de genes de resistencia a antimicrobianos, trabajando directamente sobre el metagenoma bacteriano intestinal de aves sinantrópicas (gorriones comunes). Para ello, se ha empleado una técnica molecular altamente sensible y fiable como es la PCR a tiempo real. Gracias a ésta, ha sido posible profundizar algo más en un mundo tan complejo como es de las resistencias a los antimicrobianos.

Investigaciones previas han evidenciado que la tasa de resistencias a antimicrobianos en gorriones comunes que habitan en entornos ganaderos es baja (Dolejska et al., 2008; Sacristán et al., 2014). Dichas evidencias están en línea con las observadas en este trabajo (p.e. los porcentajes de bacterias positivas a *suII* y *suIII* no han superado en ninguno de los casos el 0,12% del total bacteriano).

Entre los genes estudiados, los más frecuentes en ambos entornos son los responsables de resistencias frente a las sulfonamidas (*suII*, *suIII*) y a las tetraciclinas (*tet(A)*, *tet(Q)*). El marcado uso de estos compuestos en medicina humana (Chopra y Roberts, 2001; Lanz et al., 2003; Dolejska et al., 2007; Thompson et al., 2007; Jurado-Rabadán et al., 2014; Suzuki et al., 2015) y en veterinaria (Bywater et al., 2004; Dolejska et al., 2007; Pallecchi et al., 2012; Suzuki et al., 2015), tanto en animales domésticos (Chopra y Roberts, 2001; Lanz et al., 2003; Dolejska et al., 2007; Costa et al., 2008) como en animales de abasto, habría favorecido la aparición, la dispersión y el mantenimiento de dichas resistencias, siendo actualmente las más abundantes en todo el mundo (Guenther et al., 2010; Pallecchi et al., 2012).

Multitud de estudios realizados en explotaciones ganaderas han constatado que las resistencias a las sulfonamidas y a las tetraciclinas son las más frecuentes en ganado vacuno, aves de corral, cerdos (van den Bogaard et al., 2000; Guerra et al., 2003; Lanz et al., 2003; Bywater et al., 2004; Dolejska et al., 2007; Jurado-Rabadán et al., 2014) e incluso en pequeños rumiantes (Filioussis et al., 2013; Cheney et al., 2015), a pesar de que el empleo de estos compuestos es más reducido en estos animales. Tales hallazgos coinciden con los obtenidos en este trabajo.

A pesar de que las sulfonamidas y las tetraciclinas continúan siendo los antimicrobianos de primera elección en ganadería, se ha venido observando cómo en los últimos años parece haber una tendencia en el empleo de nuevos fármacos. Este es el caso de las fluoroquinolonas (van den Bogaard et al., 2000; Filioussis et al., 2013). Probablemente la detección del gen *qnrS* en los gorriones del entorno ganadero se deba a que han sido expuestos al mismo.

Otro de los hallazgos más interesantes que ha tenido lugar en este estudio, ha sido la detección del gen *mecA* (resistencia a la meticilina). Su presencia suele estar ligada a la bacteria *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA, por sus siglas en inglés). Actualmente es el agente causal de numerosas enfermedades nosocomiales (Grundmann et al., 2006) y responsable de hasta 11285 defunciones al año en EEUU (Gross, 2013; Sousa et al., 2014; Avendaño, 2015). Investigaciones previas han evidenciado la presencia de cepas de *Staphylococcus* spp. portadoras del gen *mecA* en aves silvestres como el ratonero común (*Buteo buteo*) (Sousa et al., 2014), buitre leonado (*Gyps fulvus*) (Porrero et al., 2013) o grajos (*Corvus frugilegus*) (Loncaric et al., 2013), sin embargo no ha sido hasta ahora cuando se ha descrito por primera vez su presencia en gorriones comunes. La detección del gen *mecA* en los gorriones del entorno urbano, nos hace sospechar que pueden actuar como diseminadores y reservorios del gen (Porrero et al., 2013; Sousa et al., 2014), contribuyendo a su permanencia en un entorno que no es el hospitalario. Las hipótesis planteadas para explicar su presencia son dos. La primera de ellas es que podría deberse a una excreción intermitente, y la otra, que lo hubieran adquirido a partir del personal encargado del estudio experimental (Sousa et al., 2014). Esta última es descartada por las condiciones controladas en las que se realizó el experimento. A pesar de que hay poca información disponible sobre su epidemiología y se estima que la prevalencia de las Cepas MRSA en fauna silvestre es baja (Porrero et al., 2013; Sousa et al., 2014), sería de gran interés la realización de estudios que ahondasen en el conocimiento de estas resistencias debido al riesgo potencial que representan para la salud pública (Porrero et al., 2013).

A pesar del bajo nivel de resistencias a antimicrobianos presentes en los gorriones del entorno ganadero de este estudio, se ha comprobado como hay diferencias en las mismas entre los años de muestreo 2013-2015, lo que parece indicar niveles de exposición

diferenciales entre dichos años en la población estudiada. Esta interpretación se ha basado principalmente en las diferencias significativas halladas en el número promedio de genes, evidenciando que los niveles de resistencia presentes en los gorriones muestreados del año 2013 son superiores a los muestreados en el año 2015. Este hallazgo sería un reflejo de cómo la exposición a los antimicrobianos y por ende, los niveles de resistencia, estarían determinados por las necesidades de uso de estos compuestos en la explotación ganadera (Cole et al., 2005; Kozak et al., 2009; Dolejska et al., 2008; Sacristán et al., 2014) bien como tratamientos profilácticos en las distintas fases productivas de las ovejas o bien, como tratamientos en casos clínicos, que a su vez condicionan el tipo y la dosis de los fármacos a utilizar. Por ejemplo, se sabe que el consumo de antimicrobianos es mayor durante la entrada de animales nuevos a la explotación ganadera. Lamentablemente, no hemos dispuesto para cada fecha de muestreo de la información relativa a los tratamientos realizados en la explotación, así como los referidos a la entrada de nuevos animales.

En el caso de los gorriones del entorno urbano, tan sólo se han hallado diferencias significativas en el porcentaje de individuos positivos al gen *suII*. Esto pondría de manifiesto que los niveles en entornos urbanos se hallan de forma estable en las poblaciones.

También se ha comprobado cómo hay diferencias significativas en el número promedio de genes al evaluar las cargas de resistencia en los gorriones de ambos entornos en el año 2013, siendo más elevado en los gorriones del entorno ganadero que en los del entorno urbano. La explicación más plausible a este hecho sería que los gorriones del entorno ganadero tienen una mayor exposición a los antimicrobianos, pues el tratamiento y la profilaxis de muchas enfermedades que sufren los animales de abasto, están basados en el amplio uso de estos compuestos. En base a ello, podríamos suponer que los antimicrobianos que se hayan dado a las ovejas, habrían favorecido la aparición de cepas resistentes (van den Bogaard y Stobberingh, 2000; Dolejska et al., 2007; Sousa et al., 2014; Roca et al., 2015). Dichas cepas serían eliminadas junto con la orina y las heces, diseminándose en el entorno y contaminando desde el suelo (Bartlett et al., 2013), que puede actuar como un potente reservorio de cepas resistentes o genes de resistencia, hasta el agua y el alimento (Wright 2010; Wooldridge, 2012; Bartlett et al., 2013; Sousa et al., 2014; Wichmann et al., 2014), al que tienen acceso los gorriones de manera continua. Éstos

también podrían haber adquirido las resistencias a través del contacto con sus propias excretas. De un modo u otro, las cepas o genes de resistencia pasarían a formar parte de su microbiota intestinal, favoreciendo el mantenimiento y por ende, la diseminación y persistencia de las resistencias dentro de la población y del propio entorno (Allen y Stanton, 2014).

La realización del estudio experimental ha permitido conocer por primera vez la evolución de las resistencias a antimicrobianos en animales, en ausencia de exposición. El dato más significativo es la reducción de las cargas de resistencia en los gorriones del entorno ganadero durante dicho estudio, hasta igualarse a los que presentan los gorriones del entorno urbano. Esta suposición está basada en las diferencias significativas halladas en el porcentaje de copias del gen *suII* y en el número promedio de genes en los gorriones del entorno ganadero. Aunque no se hayan encontrado diferencias significativas en el resto de variables, se ha observado cómo el porcentaje de copias del gen *suIII* decrece a lo largo del experimental, al igual que también lo hace el porcentaje de individuos positivos a los diferentes genes (a excepción del gen *suII*), hasta no detectarse en ningún gorrión los genes que codifican las resistencias a las fluoroquinolonas (*qnrS*) y a las tetraciclinas (*tet(A)*, *tet(Q)*) al finalizar el experimento. Esto podría deberse a que en el momento en el que deja de haber exposición, los genes contenidos en los plásmidos y que proporcionan una ventaja adaptativa a las bacterias que los presentan para no ser sensibles al antimicrobiano (Schwarz et al., 2014), serían eliminados y con ello, las resistencias.

En cambio, los gorriones del entorno urbano presentan diferencias significativas en el gen *tet(Q)* durante el estudio experimental. Esto podría deberse a excreciones intermitentes del gen, como ocurre con cepas bacterianas (Van Immerseel et al., 2004; Stenzel et al., 2014; Laurin et al., 2015).

Hasta la fecha, son cada vez más los estudios que reiteran que la fauna silvestre puede actuar como un potente reservorio ambiental de resistencias a antimicrobianos (Jamborova et al., 2015), contribuyendo a la dispersión de las mismas a través de su comportamiento migratorio (Guenther et al., 2011). Las aves migratorias desempeñan un papel crucial en la circulación y el mantenimiento de las bacterias y/o genes de resistencia (Jamborova et al., 2015). Es por ello, la necesidad de crear estudios centinela que monitoreen el impacto que

éstas pueden ocasionar, no solo sobre el medio ambiente, sino también sobre la propia fauna silvestre (Guenther et al., 2011).

Actualmente, los estudios de resistencia que se han realizado en fauna silvestre están basados en la detección e identificación de bacterias resistentes y sus repercusiones para la salud pública (Jamborova et al., 2015), ignorando las repercusiones que pueden tener para los propios animales que los vehiculan. Si bien en medicina humana y en animales domésticos se ha comprobado cómo la presencia de genes de resistencia en la microbiota intestinal es capaz de alterar la funcionalidad de la misma (Grønvold et al., 2010; Wlodarska y Finlay, 2010; Pérez-Cobas et al., 2013; Power et al., 2014), teniendo serias consecuencias para la salud (Allen y Stanton, 2014), podríamos pensar que de igual modo puede afectar a la de la fauna silvestre. Desafortunadamente, existe un gran desconocimiento a cerca de la composición y la funcionalidad de la microbiota intestinal de las aves silvestres (Guenther et al., 2011), así como las consecuencias que puede tener la alteración de ésta sobre su eficacia biológica.

En esta investigación se ha trabajado con una especie que actualmente está en detrimento poblacional en muchas ciudades del mundo (De Laet y Summers-Smith, 2007; Shaw et al., 2008), el gorrión común. Los factores de riesgo relacionados con el descenso poblacional continúan siendo un vivo debate, sin que se haya logrado dar una respuesta satisfactoria. Algunos de ellos son: fuerte expansión de la ciudad y la pérdida simultánea de zonas verdes (parques y jardines) (Murgi y Macias, 2010), el aumento de las edificaciones (Shaw et al., 2008), el incremento de vehículos (atropellos) (CODA 1993), la competencia por los recursos con otras especies (palomas), el incremento de depredadores (gatos) (Shaw et al., 2008) o la presencia de contaminantes en el medio (Koivula y Eeva, 2010).

Así mismo, se ha intentado relacionar el declive poblacional con alteraciones en los parámetros fisiológicos e inmunológicos de estos animales, corroborándose que este último está íntimamente relacionado con el éxito reproductivo y la supervivencia de las aves (Parejo y Silva, 2009; Herrera et al., 2015). Dada la importancia que la microbiota digestiva posee en los organismos, que empiezan a tener una consideración de “superorganismos” (Gill et al., 2006), sería fundamental estudiar el impacto que estos genes tienen en la diversidad, abundancia y funcionalidad de dicha microbiota, como un parámetro fisiológico más.

Para ello resulta esencial la creación de nuevos estudios que esclarezcan el papel que desempeñan los genes de resistencias, así como las potenciales repercusiones que puede suponer su presencia en la salud de la fauna silvestre.

La realización de este trabajo, nos ha permitido conocer un poco mejor el comportamiento de las resistencias en ambos escenarios a través de una especie sinantrópica, el gorrión común. A pesar de que se seleccionaron las condiciones más conservadoras, tanto por ser una especie reconocida como de baja incidencia de resistencias (gorrión común) (Dolejska et al., 2008; Sacristán et al., 2014), como por tratarse de una especie productiva con bajo índice de intensificación de la producción (producción ovina) (Morris y Kenyon, 2014), se observaron diferencias significativas en ciertos parámetros. Por ejemplo, el número promedio de genes, puede servir de indicador de contacto con ganadería, de tal forma que se pueden aplicar en multitud de estudios de calidad de hábitat. Se espera que dicho valor sea todavía mayor en otros escenarios ganaderos de mayor intensificación en la producción, como el avícola o el porcino, que serán estudiados próximamente.

También es necesario estudiar la relación entre los tratamientos realizados en las explotaciones y la adquisición de las resistencias en la fauna sinantrópica, habida cuenta de las diferencias que se han hallado en las aves que habitan en la explotación de ovino entre 2013 y 2015. Además de servir como un indicador de contacto con ganadería, la presencia de genes de resistencia podría tener consecuencias potenciales en la composición y en la diversidad de la microbiota, que, si bien no han sido estudiadas en el presente trabajo, serán incluidas en los próximos estudios.

Este trabajo también incluye una fase experimental que no fue diseñada con el propósito de estudiar los genes de resistencia a antimicrobianos. Sin embargo, dado la carencia de estudios sobre este tema en fauna silvestre y por la complejidad que supone la captura de los animales, se ha considerado de gran valía la utilización y el análisis de las muestras obtenidas a lo largo del experimental. Gracias a ello, se ha podido comprobar cómo el número de genes de resistencia y la concentración de los mismos desciende en los gorriones del entorno ganadero hasta niveles similares a los del entorno urbano, que podrían considerarse basales. Este resultado tiene un gran impacto, ya que por primera vez se aportan datos sobre la persistencia de genes en el resistoma intestinal, abriendo paso a futuros estudios epidemiológicos sobre la dispersión de los mismos en el medio ambiente.

5. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones obtenidas de este estudio son:

1. Los genes de resistencia a antimicrobianos detectados con mayor frecuencia coinciden con los observados en estudios previos, poniendo de manifiesto su elevada ubicuidad.
2. Se ha detectado por primera vez en gorriones comunes el gen *mecA*, de elevada importancia en salud pública.
3. Se han observado diferencias significativas entre los muestreos ganaderos de 2013-2015, hecho atribuido a las posibles diferencias de tratamiento en el ganado ovino para cada época de muestreo.
4. Las diferencias observadas en los entornos ganadero y urbano de 2013 ponen de manifiesto la importancia de la exposición en la adquisición y cuantificación de genes de resistencia; sirviendo éstos como indicadores del grado de exposición a explotaciones ganaderas.
5. El descenso de las resistencias durante el periodo experimental, puede estar relacionado con la ausencia de exposición de los gorriones de entornos ganaderos, lo que conlleva un descenso hasta niveles considerados basales de resistencia.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Aarestrup FM. Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. *Int J Antimicrob Agents*. 1999 Aug;12(4):279–85.
- Albrechtova K, Papousek I, De Nys H, Pauly M, Anoh E, Mossoun A, et al. Low rates of antimicrobial-resistant Enterobacteriaceae in wildlife in Taï National Park, Côte d'Ivoire, surrounded by villages with high prevalence of multiresistant ESBL-producing *Escherichia coli* in people and domestic animals. *PLoS ONE*. 2014;9(12):e113548.
- Allen HK, Stanton TB. Altered egos: antibiotic effects on food animal microbiomes. *Annu Rev Microbiol*. 2014;68:297–315.
- Avendaño C. Teixobactine, a new antibiotic that would hardly produce resistance. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. 2015;81(1):4–10.
- Baker-Austin C, Wright MS, Stepanauskas R, McArthur JV. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol*. 2006 Apr;14(4):176–82.
- Bartlett JG, Gilbert DN, Spellberg B. Seven ways to preserve the miracle of antibiotics. *Clin Infect Dis*. 2013 May;56(10):1445–50.
- Bartoloni A, Bartalesi F, Mantella A, Dell'Amico E, Roselli M, Strohmeyer M, et al. High prevalence of acquired antimicrobial resistance unrelated to heavy antimicrobial consumption. *J Infect Dis*. 2004 Apr 1;189(7):1291–4.
- Barton MD. Impact of antibiotic use in the swine industry. *Curr Opin Microbiol*. 2014 Jun;19:9–15.
- Bellière EN, Esperón F, Sánchez-Vizcaíno JM. Genetic comparison among dolphin morbillivirus in the 1990-1992 and 2006-2008 Mediterranean outbreaks. *Infect Genet Evol*. 2011 Dec;11(8):1913–20.
- Bergmans DC, Bonten MJ, Gaillard CA, van Tiel FH, van der Geest S, de Leeuw PW, et al. Indications for antibiotic use in ICU patients: a one-year prospective surveillance. *J Antimicrob Chemother*. 1997 Apr;39(4):527–35.
- Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2015 Jan;13(1):42–51.

- Bonnedahl J, Järhult JD. Antibiotic resistance in wild birds. *Ups J Med Sci*. 2014 May;119(2):113–6.
- Bryan A, Shapir N, Sadowsky MJ. Frequency and Distribution of Tetracycline Resistance Genes in Genetically Diverse, Nonselected, and Nonclinical *Escherichia coli* Strains Isolated from Diverse Human and Animal Sources. *Appl Environ Microbiol*. 2004 Apr;70(4):2503–7.
- Bywater R, Deluyker H, Deroover E, de Jong A, Marion H, McConville M, et al. A European survey of antimicrobial susceptibility among zoonotic and commensal bacteria isolated from food-producing animals. *J Antimicrob Chemother*. 2004 Oct;54(4):744–54.
- Cantón R. Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting. *Clin Microbiol Infect*. 2009 Jan;15 Suppl 1:20–5.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Office of Infectious Disease. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. April 2013. Available at: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013>. Accessed January 28, 2015.
- Chattopadhyay MK, Grossart H-P. Antibiotic resistance. Intractable, and here's why. *BMJ*. 2010;341:c6848.
- Cheney TEA, Smith RP, Hutchinson JP, Brunton LA, Pritchard G, Teale CJ. Cross-sectional survey of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from diseased farm livestock in England and Wales. *Epidemiol Infect*. 2015 Sep;143(12):2653–9.
- Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2001 Jun;65(2):232–60; second page, table of contents.
- Clapper WE, Meade GH. Normal flora of the nose, throat, and lower intestine of dogs. *J Bacteriol*. 1963 Mar;85:643–8.
- CODA (1993). Millones de animales mueren atropellados cada año en las carreteras españolas. *Quercus* 83, 12-19.
- Cogliani C, Goossens H, Greko C. Restricting antimicrobial use in food animals: lessons from Europe. *Microbe*, 2011, vol. 6, no 6, p. 274.
- Cole D, Drum DJV, Stalknecht DE, White DG, Lee MD, Ayers S, et al. Free-living Canada geese and antimicrobial resistance. *Emerging Infect Dis*. 2005 Jun;11(6):935–8.

- Colobatiu L, Tabaran A, Flonta M, Oniga O, Mirel S, Mihaiu M. First description of plasmid-mediated quinolone resistance determinants and β -lactamase encoding genes in non-typhoidal *Salmonella* isolated from humans, one companion animal and food in Romania. *Gut Pathog.* 2015;7:16.
- Costa D, Poeta P, Sáenz Y, Coelho AC, Matos M, Vinué L, et al. Prevalence of antimicrobial resistance and resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates recovered from healthy pets. *Vet Microbiol.* 2008 Feb 5;127(1-2):97–105.
- Dantas G, Sommer MOA. How to Fight Back Against Antibiotic Resistance. *American Scientist.* 2014;102(1):42.
- De Laet J, Summers-Smith JD. The status of the urban house sparrow *Passer domesticus* in north-western Europe: a review. *J Ornithol.* 2007 Dec;148:S275–8.
- Dolejská M, Cizek A, Literak I. High prevalence of antimicrobial-resistant genes and integrons in *Escherichia coli* isolates from Black-headed Gulls in the Czech Republic. *J Appl Microbiol.* 2007 Jul;103(1):11–9.
- Dolejská M, Senk D, Cízek A, Rybářiková J, Sychra O, Literák I. Antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolates in cattle and house sparrows on two Czech dairy farms. *Res Vet Sci.* 2008 Dec;85(3):491–4.
- Fariñas MC, Martínez-Martínez L. Infecciones causadas por bacterias gram negativas multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gram negativos no fermentadores. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 2013 Jun;31(6):402–9.
- Filioussis G, Tzivara A, Petridou E, Giadinis ND, Burriel AR, Kritas SK. Ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* isolated from the intestinal microbiota of goats in Greece in the absence of selective pressure. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013 Jul;76(3):352–5.
- Francois P, Pittet D, Bento M, Pepey B, Vaudaux P, Lew D, et al. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from sterile or nonsterile clinical samples by a new molecular assay. *J Clin Microbiol.* 2003 Jan;41(1):254–60.
- Garcia-Alvarez L, Dawson S, Cookson B, Hawkey P. Working across the veterinary and human health sectors. *J Antimicrob Chemother.* 2012 Jul;67 Suppl 1:i37–49.
- Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science.* 2006 Jun 2;312(5778):1355–9.

- Golkar Z, Bagasra O, Pace DG. Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *J Infect Dev Ctries*. 2014 Feb;8(2):129–36.
- Gosalbes MJ, Vallès Y, Jiménez-Hernández N, Balle C, Riva P, Miravet-Verde S, et al. High frequencies of antibiotic resistance genes in infants' meconium and early fecal samples. *J Dev Orig Health Dis*. 2015 Sep 10;1–10.
- Grønvold A-MR, L'abée-Lund TM, Sørum H, Skancke E, Yannarell AC, Mackie RI. Changes in fecal microbiota of healthy dogs administered amoxicillin. *FEMS Microbiol Ecol*. 2010 Feb;71(2):313–26.
- Gross M. Antibiotics in crisis. *Curr Biol*. 2013 Dec 16;23(24):R1063–5.
- Grundmann H, Aires-de-Sousa M, Boyce J, Tiemersma E. Emergence and resurgence of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *Lancet*. 2006 Sep 2;368(9538):874–85.
- Guenther S, Ewers C, Wieler LH. Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing *E. coli* in Wildlife, yet Another Form of Environmental Pollution? *Front Microbiol*. 2011;2:246.
- Guenther S, Grobbel M, Lübke-Becker A, Goedecke A, Friedrich ND, Wieler LH, et al. Antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* from common European wild bird species. *Vet Microbiol*. 2010 Jul 29;144(1-2):219–25.
- Guerra B, Junker E, Schroeter A, Malorny B, Lehmann S, Helmuth R. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. *J Antimicrob Chemother*. 2003 Sep;52(3):489–92.
- Hamady M, Knight R. Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques, and challenges. *Genome Res*. 2009 Jul;19(7):1141–52.
- Hansen MP, Hoffmann TC, McCullough AR, van Driel ML, Del Mar CB. Antibiotic Resistance: What are the Opportunities for Primary Care in Alleviating the Crisis? *Front Public Health*. 2015;3:35.
- Herrera-Duenas A, Pineda J, Teresa Antonio M, Aguirre JI. Oxidative stress of House Sparrow as bioindicator of urban pollution. *Ecol Indic*. 2014 Jul;42:6–9.
- Jamborova I, Dolejska M, Vojtech J, Guenther S, Uricariu R, Drozdowska J, et al. Plasmid-mediated resistance to cephalosporins and fluoroquinolones in various *Escherichia coli* sequence types isolated from rooks wintering in Europe. *Appl Environ Microbiol*. 2015 Jan;81(2):648–57.

- Jiang L, Hu X, Xu T, Zhang H, Sheng D, Yin D. Prevalence of antibiotic resistance genes and their relationship with antibiotics in the Huangpu River and the drinking water sources, Shanghai, China. *Sci Total Environ*. 2013 Aug 1;458-460:267–72.
- Jiang X, Li J, Zhang Y, Yan H, Wang Y, Shi L, et al. Detection of plasmid-mediated quinolone resistance determinants and qnrS expression in Enterobacteriaceae clinical isolates. *J Infect Dev Ctries*. 2014 Dec;8(12):1625–9.
- Jurado-Rabadán S, de la Fuente R, Ruiz-Santa-Quiteria JA, Orden JA, de Vries LE, Agersø Y. Detection and linkage to mobile genetic elements of tetracycline resistance gene tet(M) in *Escherichia coli* isolates from pigs. *BMC Vet Res*. 2014;10:155.
- Kanai H, Hashimoto H, Mitsuhashi S. "Drug-resistance and Conjugative R Plasmids in *Escherichia coli* Strains isolated from Wild Birds (Japanese tree sparrows, Green pheasants and Bamboo partridges)". *Japanese poultry science*. 1981;18(4):234-9.
- Koivula MJ, Eeva T. Metal-related oxidative stress in birds. *Environ Pollut*. 2010 Jul;158(7):2359–70.
- Kozak GK, Boerlin P, Janecko N, Reid-Smith RJ, Jardine C. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from swine and wild small mammals in the proximity of swine farms and in natural environments in Ontario, Canada. *Appl Environ Microbiol*. 2009 Feb;75(3):559–66.
- Lanz R, Kuhnert P, Boerlin P. Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Vet Microbiol*. 2003 Jan 2;91(1):73–84.
- Laurin EL, Chaffer M, McClure JT, McKenna SLB, Keefe GP. The association of detection method, season, and lactation stage on identification of fecal shedding in *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis infectious dairy cows. *J Dairy Sci*. 2015 Jan;98(1):211–20.
- Levy SB, FitzGerald GB, Macone AB. Changes in intestinal flora of farm personnel after introduction of a tetracycline-supplemented feed on a farm. *N Engl J Med*. 1976 Sep 9;295(11):583–8.
- Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med*. 2004 Dec;10(12 Suppl):S122–9.
- Levy SB. The 2000 Garrod lecture. Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2002 Jan;49(1):25–30.

- Livermore DM, Warner M, Hall LM, Enne VI, Projan SJ, Dunman PM, et al. Antibiotic resistance in bacteria from magpies (*Pica pica*) and rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from west Wales. *Environ Microbiol*. 2001 Oct;3(10):658–61.
- Loncaric I, Stalder GL, Mehinagic K, Rosengarten R, Hoelzl F, Knauer F, et al. Comparison of ESBL--and AmpC producing Enterobacteriaceae and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from migratory and resident population of rooks (*Corvus frugilegus*) in Austria. *PLoS ONE*. 2013;8(12):e84048.
- Luyt C-E, Bréchet N, Trouillet J-L, Chastre J. Antibiotic stewardship in the intensive care unit. *Crit Care*. 2014;18(5):480.
- Marshall BM, Levy SB. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clin Microbiol Rev*. 2011 Oct;24(4):718–33.
- Marti E, Balcázar JL. Real-Time PCR assays for quantification of *qnr* genes in environmental water samples and chicken feces. *Appl Environ Microbiol*. 2013 Mar;79(5):1743–5.
- McManus MC. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Am J Health Syst Pharm*. 1997 Jun 15;54(12):1420–33; quiz 1444–6.
- Michael CA, Dominey-Howes D, Labbate M. The antimicrobial resistance crisis: causes, consequences, and management. *Front Public Health*. 2014;2:145.
- Middleton JH, Ambrose A. Enumeration and antibiotic resistance patterns of fecal indicator organisms isolated from migratory Canada geese (*Branta canadensis*). *J Wildl Dis*. 2005 Apr;41(2):334–41.
- Modi SR, Lee HH, Spina CS, Collins JJ. Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome. *Nature*. 2013 Jul 11;499(7457):219–22.
- Morris ST, Kenyon PR. Intensive sheep and beef production from pasture--a New Zealand perspective of concerns, opportunities and challenges. *Meat Sci*. 2014 Nov;98(3):330–5.
- Murgui E, Macias A. Changes in the House Sparrow (*Passer domesticus*) population in Valencia (Spain) from 1998 to 2008. *Bird Stud*. 2010;57(3):281–8.
- Pallecchi L, Bartoloni A, Riccobono E, Fernandez C, Mantella A, Magnelli D, et al. Quinolone resistance in absence of selective pressure: the experience of a very remote community in the Amazon forest. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(8):e1790.

- Parejo D, Silva N. Immunity and fitness in a wild population of Eurasian kestrels *Falco tinnunculus*. *Naturwissenschaften*. 2009 Oct;96(10):1193–202.
- Patterson SK, Singer RS. Development of a polymerase chain reaction assay for the detection of antibiotic resistance genes in community DNA. *J Vet Diagn Invest*. 2006 Mar;18(2):172–81.
- Pérez-Cobas AE, Artacho A, Knecht H, Ferrús ML, Friedrichs A, Ott SJ, et al. Differential effects of antibiotic therapy on the structure and function of human gut microbiota. *PLoS ONE*. 2013;8(11):e80201.
- Porrero MC, Mentaberre G, Sánchez S, Fernández-Llario P, Gómez-Barrero S, Navarro-Gonzalez N, et al. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carriage in different free-living wild animal species in Spain. *Vet J*. 2013 Oct;198(1):127–30.
- Power SE, O'Toole PW, Stanton C, Ross RP, Fitzgerald GF. Intestinal microbiota, diet and health. *Br J Nutr*. 2014 Feb;111(3):387–402.
- Radhouani H, Poeta P, Igrejas G, Gonçalves A, Vinué L, Torres C. Antimicrobial resistance and phylogenetic groups in isolates of *Escherichia coli* from seagulls at the Berlengas nature reserve. *Vet Rec*. 2009 Aug 1;165(5):138–42.
- Radhouani H, Poeta P, Gonçalves A, Pacheco R, Sargo R, Igrejas G. Wild birds as biological indicators of environmental pollution: antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* and enterococci isolated from common buzzards (*Buteo buteo*). *J Med Microbiol*. 2012 Jun;61(Pt 6):837–43.
- Radhouani H, Silva N, Poeta P, Torres C, Correia S, Igrejas G. Potential impact of antimicrobial resistance in wildlife, environment and human health. *Front Microbiol*. 2014;5:23.
- Ramirez MS, Traglia GM, Lin DL, Tran T, Tolmasky ME. Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance and Virulence in Gram-Negatives: the *Klebsiella pneumoniae* Paradigm. *Microbiol Spectr*. 2014 Oct;2(5).
- Randall LP, Cooles SW, Osborn MK, Piddock LJV, Woodward MJ. Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. *J Antimicrob Chemother*. 2004 Feb;53(2):208–16.
- Read AF, Woods RJ. Antibiotic resistance management. *Evol Med Public Health*. 2014;2014(1):147.
- Roca I, Akova M, Baquero F, Carlet J, Cavalieri M, Coenen S, et al. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New Microbes New Infect*. 2015 Jul;6:22–9.

- Rossolini GM, Arena F, Pecile P, Pollini S. Update on the antibiotic resistance crisis. *Curr Opin Pharmacol*. 2014 Oct;18:56–60.
- Sacristán C, Esperón F, Herrera-León S, Iglesias I, Neves E, Nogal V, et al. Virulence genes, antibiotic resistance and integrons in *Escherichia coli* strains isolated from synanthropic birds from Spain. *Avian Pathol*. 2014;43(2):172–5.
- Sayah RS, Kaneene JB, Johnson Y, Miller R. Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic- and wild-animal fecal samples, human septage, and surface water. *Appl Environ Microbiol*. 2005 Mar;71(3):1394–404.
- Schwarz S, Shen J, Wendlandt S, Feßler AT, Wang Y, Kadlec K, et al. Plasmid-Mediated Antimicrobial Resistance in Staphylococci and Other Firmicutes. *Microbiol Spectr*. 2014 Dec;2(6).
- Sengupta S, Chattopadhyay MK, Grossart H-P. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Front Microbiol*. 2013;4:47.
- Shaw LM, Chamberlain D, Evans M. The House Sparrow *Passer domesticus* in urban areas: reviewing a possible link between post-decline distribution and human socioeconomic status. *J Ornithol*. 2008 Jul;149(3):293–9.
- Silva N, Igrejas G, Felgar A, Gonçalves A, Pacheco R, Poeta P. Molecular characterization of *vanA*-containing Enterococcus from migratory birds: song thrush (*Turdus philomelos*). *Braz J Microbiol*. 2012 Jul;43(3):1026–9.
- Sjölund M, Bonnedahl J, Hernandez J, Bengtsson S, Cederbrant G, Pinhassi J, et al. Dissemination of multidrug-resistant bacteria into the Arctic. *Emerging Infect Dis*. 2008 Jan;14(1):70–2.
- Skurnik D, Ruimy R, Andremont A, Amorin C, Rouquet P, Picard B, et al. Effect of human vicinity on antimicrobial resistance and integrons in animal faecal *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*. 2006 Jun;57(6):1215–9.
- Smith DL, Harris AD, Johnson JA, Silbergeld EK, Morris JG. Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002 Apr 30;99(9):6434–9.
- Sommer MOA, Dantas G, Church GM. Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. *Science*. 2009 Aug 28;325(5944):1128–31.

- Sousa M, Silva N, Igrejas G, Silva F, Sargo R, Alegria N, et al. Antimicrobial resistance determinants in *Staphylococcus spp.* recovered from birds of prey in Portugal. *Vet Microbiol.* 2014 Jul 16;171(3-4):436–40.
- Stenzel T, Pestka D, Choszcz D. The prevalence and genetic characterization of *Chlamydia psittaci* from domestic and feral pigeons in Poland and the correlation between infection rate and incidence of pigeon circovirus. *Poult Sci.* 2014 Dec;93(12):3009–16.
- Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson GR, Collins MD, et al. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol.* 1999 Nov;65(11):4799–807.
- Sulzner K, Kelly T, Smith W, Johnson CK. Enteric pathogens and antimicrobial resistance in turkey vultures (*Cathartes aura*) feeding at the wildlife-livestock interface. *J Zoo Wildl Med.* 2014 Dec;45(4):931–4.
- Suzuki S, Ogo M, Koike T, Takada H, Newman B. Sulfonamide and tetracycline resistance genes in total- and culturable-bacterial assemblages in South African aquatic environments. *Front Microbiol* [Internet]. 2015 Aug 4 [cited 2015 Oct 28];6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4523819/>
- Talebi M, Sadeghi J, Rahimi F, Pourshafie MR. Isolation and Biochemical Fingerprinting of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* From Meat, Chicken and Cheese. *Jundishapur J Microbiol.* 2015 Apr;8(4):e15815.
- Thaller MC, Migliore L, Marquez C, Tapia W, Cedeño V, Rossolini GM, et al. Tracking acquired antibiotic resistance in commensal bacteria of Galápagos land iguanas: no man, no resistance. *PLoS ONE.* 2010;5(2):e8989.
- The antibiotic alarm. *Nature.* 2013 Mar 14;495(7440):141.
- Thompson SA, Maani EV, Lindell AH, King CJ, McArthur JV. Novel tetracycline resistance determinant isolated from an environmental strain of *Serratia marcescens*. *Appl Environ Microbiol.* 2007 Apr;73(7):2199–206.
- Van Den Bogaard AE, London N, Stobberingh EE. Antimicrobial resistance in pig faecal samples from the Netherlands (five abattoirs) and Sweden. *J Antimicrob Chemother.* 2000 May;45(5):663–71.
- Van den Bogaard AE, Stobberingh EE. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *Int J Antimicrob Agents.* 2000 May;14(4):327–35.

- Van Immerseel F, De Buck J, Pasmans F, Bohez L, Boyen F, Haesebrouck F, et al. Intermittent long-term shedding and induction of carrier birds after infection of chickens early posthatch with a low or high dose of *Salmonella enteritidis*. *Poult Sci*. 2004 Nov;83(11):1911–6.
- Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T*. 2015 Apr;40(4):277–83.
- Wichmann F, Udikovic-Kolic N, Andrew S, Handelsman J. Diverse antibiotic resistance genes in dairy cow manure. *MBio*. 2014;5(2):e01017.
- Wlodarska M, Finlay BB. Host immune response to antibiotic perturbation of the microbiota. *Mucosal Immunol*. 2010 Mar;3(2):100–3.
- Wooldridge M. Evidence for the circulation of antimicrobial-resistant strains and genes in nature and especially between humans and animals. *Rev - Off Int Epizoot*. 2012 Apr;31(1):231–47.
- Wright GD. Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Curr Opin Microbiol*. 2010 Oct;13(5):589–94.

7. ANEXO. PROTOCOLOS DE rt-PCR GENES DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS

Genes:

1. ARNr 16S

16S-F: 5'-ATGGCTGTCGTCAGCT-3'

16S-R: 5'-ACGGGCGGTGTGTAC-3'

REACTIVOS	VOLUMEN (20 μ l reacción)	CONCENTRACIÓN FINAL
Kappa Master Mix 2x	10 μ l	1 x
16S-F (20 μ M)	0,1 μ l	0,2 μ M
16S-R (20 μ M)	0,1 μ l	0,2 μ M
H ₂ O	5,8 μ l	-

PCR: 95°C 6min, 40x (95°C 30s, 62°C 30s, 72°C 60s)

2. *suII*

suI-F: 5'-CGCACCGGAAACATCGCTGCAC-3'

suI-R: 5'-TGAAGTTCGCCGCAAGGCTCG-3'

REACTIVOS	VOLUMEN (20 μ l reacción)	CONCENTRACIÓN FINAL
Kappa Master Mix 2x	10 μ l	1 x
<i>suI</i> (I)-F (20 μ M)	0,1 μ l	0,2 μ M
<i>suI</i> (I)-R (20 μ M)	0,1 μ l	0,2 μ M
H ₂ O	5,8 μ l	-

PCR: 95°C 6min, 40x (95°C 10s, 68°C 30s)

3. *suIII*

suII-F: 5'-TCCGGTGGAGGCCGGTATCTGG-3'

suII-R: 5'-CGGGAATGCCATCTGCCTTGAG-3'

REACTIVOS	VOLUMEN (20 μ l reacción)	CONCENTRACIÓN FINAL
Kappa Master Mix 2x	10 μ l	1 x
<i>suII</i> (II)-F (20 μ M)	0,2 μ l	0,2 μ M
<i>suII</i> (II)-R (20 μ M)	0,2 μ l	0,2 μ M
H ₂ O	5,6 μ l	-

PCR: 95°C 6min, 40x (95°C 30s, 62°C 30s, 72°C 60s)

4. *tet(A)*:

tet(A)-F: 5'-GCGCTNTATGCGTTGATGCA-3'

tet(A)-R: 5'-ACAGCCCGTCAGGAAATT-3'

REACTIVOS	VOLUMEN (20 μ l reacción)	CONCENTRACIÓN FINAL
Kappa Master Mix 2x	10 μ l	1 x
<i>tet(A)</i> -F (20 μ M)	0,2 μ l	0,2 μ M
<i>tet(A)</i> -R (20 μ M)	0,2 μ l	0,2 μ M
H ₂ O	5,6 μ l	-

PCR: 95°C 6min, 40x (95°C 30s, 62°C 30s, 72°C 60s)

5. tet(Q):*tet(Q)-F*: 5'-AGAATCTGCTGTTTGCCAGTG -3'*tet(Q)-R*: 5'-CGGAGTGTCAATGATATTGCA -3'

REACTIVOS	VOLUMEN (20 µl reacción)	CONCENTRACIÓN FINAL
Kappa Master Mix 2x	10 µl	1 x
<i>tet(Q)-F</i> (20 µM)	0,2 µl	0,2 µM
<i>tet(Q)-R</i> (20 µM)	0,2 µl	0,2 µM
H ₂ O	5,6 µl	-

PCR: 95°C 6min, 40x (95°C 30s, 62°C 30s, 72°C 60s)**6. qnr(S):***qnrSrt-F1*: 5'- GACGTGCTAACTTGCGTGAT -3'*qnrSrt-R1*: 5'- TGGCATTGTTGGAAACTTG -3'

REACTIVOS	VOLUMEN (20 µl reacción)	CONCENTRACIÓN FINAL
Kappa Master Mix 2x	10 µl	1 x
<i>qnrSrtF</i> (20 µM)	0,2 µl	0,2 µM
<i>qnrSrtR</i> (20 µM)	0,2 µl	0,2 µM
H ₂ O	5,6 µl	-

PCR: 95°C 6min, 40x (95°C 30s, 62°C 30s, 72°C 60s)**7. mecA***mecA-F2*: 5'-CATTGATCGCAACGTTCAATTT-3'*mecA-R2*: 5'-TGGTCTTTCTGCATTCCTGGA-3'*mecA-probe*: 5'-6FAM- TGGAAGTTAGATTGGGATCATAGCGTCAT -BHQ-1-3'

REACTIVOS	VOLUMEN (20 µl reacción)	CONCENTRACIÓN FINAL
2x Quantiprobos	10 µl	1 x
<i>mecA-F2</i> (20 µM)	0,1 µl	0,2 µM
<i>mecA-R2</i> (20 µM)	0,1 µl	0,2 µM
<i>mecA-probe</i> (10 µM)	0,15 µl	0,3 µM
H ₂ O	3,65 µl	-

PCR: 95°C 5min, 50x (95°C 15s, 60° C 60s).