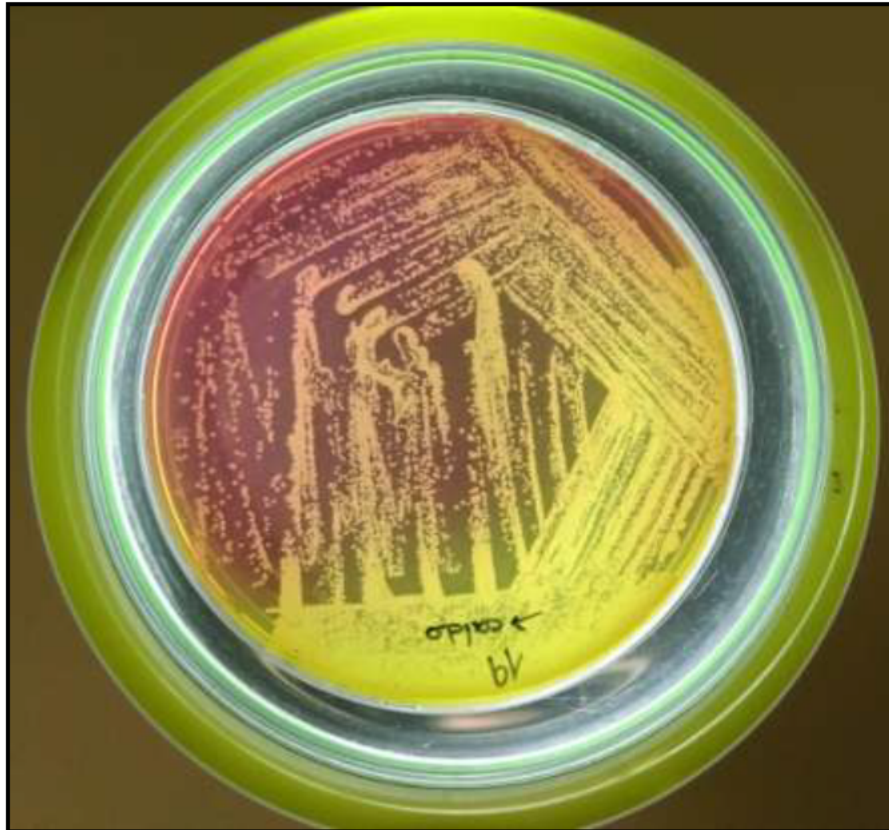


ESTAFILOCOCOS Y ENTEROBACTERIAS
DE INTERÉS SANITARIO EN BUITRE LEONADO
(*Gyps fulvus*)



Alicia Sánchez Gil. Julio 2016

Trabajo Fin de Máster.

Máster en Gestión de Fauna Silvestre.

Facultad de Veterinaria.

Universidad de Murcia

Alicia Sánchez Gil, con DNI [REDACTED], autor del Trabajo de Fin de Máster titulado “Estafilococos y enterobacterias de interés sanitario en buitre leonado (*Gyps fulvus*)”, del Máster Universitario en Gestión de la Fauna Silvestre, declara que la autoría del presente trabajo es original y, además, que todas las fuentes utilizadas para su elaboración han sido debidamente citadas.

Murcia a 7 de julio de 2016

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Alicia', enclosed within a large, loopy oval shape with a horizontal line extending from the right side.

Fdo. : Alicia Sánchez Gil

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a mi tutor, el profesor D. Francisco Cuello Gijón por su ayuda y dedicación durante todo el desarrollo de mi Trabajo Final de Máster, y también a todo el personal de la Unidad de Microbiología e Inmunología Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria por su ayuda y cercanía durante estos meses de trabajo.

Al equipo del Centro de Recuperación de Fauna Silvestre de Albacete y Centro de Recuperación de Fauna Silvestre El Valle, y en especial a Ana Cristina Miñano Bernal y a Diego Romero García por permitirme y ayudarme en la recogida de muestras. También agradecer a mis compañeros del Máster de Gestión de Fauna Silvestre 2015-2016 por su ayuda en la recogida de Alcoy.

Para finalizar, agradecer al laboratorio alemán Laboklin, en Bad Kissingen (Alemania), por proporcionarnos las cepas MRSA y MRSP usadas como controles positivos en este estudio.

ÍNDICE

○ RESUMEN	1
○ ABSTRACT	1
○ INTRODUCCIÓN	2
◦ Antibiorresistencias en <i>Staphylococcus</i> y otras bacterias de interés sanitario	5
◦ Objetivos	6
○ MATERIAL Y MÉTODOS	7
◦ Procedencia de las muestras	7
◦ Procesado de las muestras	8
○ RESULTADOS	10
◦ Especies de <i>Staphylococcus</i>	12
◦ Especies de <i>Enterobacteraceae</i> , y otras con significación clínica para el ser humano y los animales	13
◦ Pruebas de sensibilidad de los estafilococos a antibióticos	13
◦ Pruebas de sensibilidad a antibióticos de las cepas de <i>Enterobacteriaceae</i> y otras bacterias de interés sanitario identificadas	15
○ DISCUSIÓN	17
○ CONCLUSIONES	22
○ CONCLUSIONS	22
○ REFERENCIAS	23

RESUMEN

La fauna silvestre cumple un papel muy importante en la transmisión de microorganismos patógenos, tanto al ser humano, como a animales domésticos y a la propia fauna silvestre, sirviendo en muchas ocasiones de reservorio y vector de infecciones de carácter zoonótico. Este estudio pretende observar la presencia de estafilococos y enterobacterias de interés clínico presentes en cloaca de buitre leonado (*Gyps fulvus*). Se han muestreado aves en libertad y en cautividad, tomando muestras de cloaca. A partir de hisopos se han identificado ocho especies de estafilococos y seis de enterobacterias mediante pruebas bioquímicas clásicas o galerías API, y se ha determinado su perfil de sensibilidad frente a diecisiete antibióticos. La presencia de estas bacterias supone un riesgo para la Salud Pública y medio ambiente junto a la fauna que alberga. Es necesario el estudio de la comunidad silvestre para conocer la evolución de estos agentes infecciosos.

Palabras clave: Fauna silvestre, buitre leonado (*Gyps fulvus*), *Staphylococcus*, resistencias bacterianas.

ABSTRACT

Wildlife plays an important role in the transmission of pathogenic microorganisms to humans, pets and other wildlife, serving on many occasions as reservoir and vector of zoonotic infections. This study aims to observe the presence of staphylococci and *Enterobacteriaceae* of clinical interest in griffon vulture (*Gyps fulvus*). Cloacal swabs from birds both in wild and in captivity were sampled. Eight staphylococcal species and six enterobacteria species were identified by classical biochemical tests or API, and their sensitivity profile to seventeen antibiotics was determined. The presence of these bacteria could involve a risk to Public Health, environment and wildlife. It would be necessary to study further the wildlife community to know the evolution of these infectious agents.

Key words: wildlife, griffon vulture (*Gyps fulvus*), *Staphylococcus*, bacterial resistance.

INTRODUCCIÓN

El empleo prolongado sin una evaluación previa de sensibilidad ante los antimicrobianos utilizados en terapias contra infecciones o como promotores de crecimiento, provoca la selección de cepas bacterianas resistentes a antibióticos y la ineficacia de los tratamientos tanto médicos como veterinarios, así mismo el mal uso de antimicrobianos ejerce una presión evolutiva selectiva (Greig et al., 2015) que provoca modificaciones en las bacterias presentes en el hospedador.

Existen registros de datos relacionados con las ventas de productos antimicrobianos veterinarios de los diferentes países europeos que se publican de anualmente (Lloyd, 2007) y que, pese a estar en vías de complementación y mejora, puede convertirse en un buen indicador del uso de antibióticos a nivel europeo.

Aunque se desconoce en gran medida el estado sanitario general de las poblaciones silvestres y las consecuencias a medio y largo plazo que podría provocar la presencia de estos patógenos en las comunidades faunísticas naturales (Blanco et al., 2007), la acumulación de residuos de fármacos antibacterianos en la fauna silvestre por acción del hombre es preocupante (Dipineto, 2015; Casas-Díaz, 2016), y es conocida la existencia actual de un deterioro del medio natural por presencia de agentes zoonóticos multirresistentes en el medio ambiente.

La fauna silvestre entra en contacto con bacterias resistentes a antimicrobianos, no por exposición directa a los fármacos, si no de manera indirecta por la contaminación ambiental generada por vertidos y basuras urbanas, canales colonizadas por estas bacterias, alta densidad de animales en muladares y vertederos, poblaciones cada vez más cercanas a las poblaciones humanas, etc. (Sousa, 2014). Una vez la fauna silvestre es colonizada, por el momento, de manera asintomática, ésta ejerce de reservorio (Daniels et al., 2003) manteniéndolos en el medio y aumentando su alcance territorial y de vector entre el medio natural, la ganadería y los seres humanos.

Un gran número de agentes patógenos para la especie humana tienen su origen en especies animales, incluidas las silvestres, y aproximadamente un 75% de los patógenos humanos emergentes han tenido su origen en la fauna (Wardyn et al., 2012), siendo las aves las principales diseminadoras de los mismos, dada su capacidad para cubrir grandes distancias, y especialmente la aves necrófagas, que ejercen un papel primordial en el funcionamiento de las cadenas tróficas y el equilibrio de los ecosistemas.

El buitre leonado (*Gyps fulvus*), es la especie elegida para nuestro estudio. Tras el declive que sufrieron sus poblaciones por modificaciones en la política agroganadera del país, además del uso de venenos y la desaparición de hábitats idóneos, actualmente se trata de la especie más abundante de ave carroñera que reside en España.

Según apunta Benskin et al. (2009), las aves resultan susceptibles a muchas enfermedades bacterianas comunes a los seres humanos y los animales domésticos, y a otros agentes potencialmente patógenos como protozoos o virus causantes de pandemias.

La resistencia a antibióticos está suponiendo un problema a la hora de instaurar tratamientos efectivos tanto en veterinaria como en medicina humana, de hecho aves y mamíferos silvestres colonizados por cepas de *E.coli* resistentes a antibióticos pueden convertirse en reservorios y vectores de las mismas (Literak et al., 2009) y existe documentación de aves silvestres portadoras de *Staphylococcus aureus* y de otros coagulasa negativos resistentes a antibióticos (Sousa, 2014). Hace relativamente poco tiempo se documentó la resistencia a antibióticos en bacterias colonizadoras de aves carroñeras como el Alimoche (*Neophron percnopterus*) en España, y estudios en mamíferos (Literak et al., 2009) indican una baja pero generalizada prevalencia de bacterias resistentes a antibióticos en el medio silvestre

Uno de los problemas que surgen a la hora de estudiar estas cepas resistentes a antibióticos en animales silvestres, y en nuestro caso en aves carroñeras, es la dificultad de diferenciar qué agentes presentes en su

microbiota entérica son naturales o patógenos (Dipineto et al., 2015) dado que existen pocos estudios sobre la microbiota normal de aves silvestres salvo excepciones como es el caso de ciertas especies de gaviotas (Benskin et al. 2009), y el efecto de estos agentes patógenos se desconoce salvo que sean microorganismos letales, y pese a todo, la evaluación de mortandades en estas especies animales resulta complicada por ocupar lugares poco accesibles. En general, y según este autor este tipo de estudios se ve limitado por la dificultad de conseguir un gran número de muestras, la ausencia de datos a lo largo del tiempo o limitaciones en las técnicas selectivas para aislar patógenos específicos.

Los hábitos alimentarios de las aves son determinantes en el contacto con estas bacterias multirresistentes (Sousa, 2014), así la alimentación de las aves carroñeras en menor o mayor medida con cadáveres de ganado estabulado, que puede ser portador de estas bacterias, por los tratamientos a los que son sometidos en las granjas, explicaría según Molina-López (2011), la presencia de las mismas en las carroñeras convirtiéndose en portadoras de bacterias resistentes, por lo que suponen un riesgo de transmisión a otros animales silvestres, (Houston y Cooper, 1975), personas o animales domésticos. Un estudio reciente (Dipineto et al., 2015) indica que las egagrópilas eliminadas por las aves portan una gran variedad de bacterias Gram positivas y negativas (enterobacterias, estafilococos, etc.) y por tanto suponen una vía de contagio para las personas y animales.

El conocimiento de la prevalencia y el efecto de estas nuevas cepas bacterianas multirresistentes en la fauna silvestre en general y en nuestras poblaciones de buitre leonado en particular son, según Blanco et al. (2006) de gran importancia de cara a su mejor conservación.

Antibiorresistencias en *Staphylococcus* y otras bacterias de interés sanitario

Los estafilococos son cocos Gram-positivos que aparecen agrupados en racimos en la observación microscópica, anaerobios facultativos y positivos en la prueba de la catalasa, que habitan de manera natural la piel y mucosas del hombre, animales domésticos, animales de producción y fauna silvestre. Las principales especies patógenas poseen la enzima coagulasa, responsable de la conversión del fibrinógeno plasmático en fibrina, son los estafilococos coagulasa positivos (CPS).

Los CNS o estafilococos coagulasa negativos, en general, son patógenos oportunistas que generan infecciones en hospedadores inmunocomprometidos (Bond y Loeffler, 2012) de relativa menor importancia que los CPS.

Staphylococcus aureus es un CPS potencialmente mortal, característico de infecciones nosocomiales y que constituye un gran problema para la salud pública ("MRSA Research Center : MRSA & Animals | University of Chicago", 2016), aunque las infecciones por CPS ya no son mayoritariamente nosocomiales (Sousa, 2014) sino que actualmente se tratan de infecciones de comunidad, es decir, la infección ya no es propia de centros hospitalarios sino que se trata de patógenos presentes en nuestro ambiente.

La mayoría de las enfermedades emergentes en los seres humanos tienen un reservorio de vida silvestre (Greig et al., 2014), pero en el caso de estafilococos se dispone de poca información sobre la prevalencia de éstos en la fauna silvestre, aunque hay estudios (Sousa, 2014) que indican la presencia de antibiorresistencia de estas bacterias asociadas a infecciones humanas.

La familia *Enterobacteriaceae* engloba más de 30 géneros y más de 100 especies de bacterias Gram negativas integrantes de la microbiota intestinal de seres humanos y animales. Una de las más importantes es *Escherichia coli*, que supone aproximadamente el 80% de la microbiota y que ejerce un papel limitante sobre las demás. Aunque la presencia de estas enterobacterias en el

organismo es normal, se trata de bacterias oportunistas que pueden influir y provocar la aparición de infecciones en huéspedes con estados de inmunosupresión.

El uso excesivo e incontrolado de antibióticos por la población humana puede provocar alteraciones en la microbiota entérica de animales silvestres residentes en áreas donde la contaminación fecal del medio ambiente es importante (Literak et al., 2009), pero además del peligro de infección que conlleva la aparición de estas cepas resistentes en el medio para las personas y para los animales, tanto domésticos, como silvestres, hay que resaltar (Greig et al., 2014) la relevancia que ocupan en el ámbito de la seguridad alimentaria.

Pseudomonas aeruginosa, es de especial interés por su multirresistencia intrínseca. Es un bacilo Gram negativo oportunista, implicado en infecciones nosocomiales de pacientes inmunodeprimidos que presenta resistencia natural y adquirida por múltiples mecanismos a muchos de los antibióticos de uso clínico (Delgado et al., 2007) como penicilinas, muchas cefalosporinas, tetraciclinas, aminoglucósidos, fluoroquinolonas y trimetoprim, entre otros.

OBJETIVOS

1. Aislamiento e identificación de estafilococos de interés sanitario a partir de muestras cloacales de buitre leonado (*Gyps fulvus*).
2. Aislamiento e identificación de enterobacterias de interés sanitario a partir de muestras cloacales de buitre leonado (*Gyps fulvus*),
3. Establecimiento del perfil de sensibilidad/resistencia de las cepas aisladas frente a un panel de antibióticos de uso común tanto en medicina humana como en veterinaria.

MATERIAL Y MÉTODOS

Procedencia de las muestras

La mayor parte de las muestras se han obtenido en noviembre de 2015 en Alcoy (Alicante) gracias al Proyecto Canyet de reintroducción del Buitre leonado (*Gyps fulvus*) en las comarcas alicantinas de Alcoià y Comtat, llevado a cabo por la ONG FAPAS (Fondo para la Protección de los Animales Salvajes). Se muestrearon veintitrés buitres que viven en libertad, 16 individuos adultos y 7 juveniles, y con un estado sanitario aparentemente bueno, en una antigua cantera del Parque Natural de la Sierra de Mariola, donde se desarrolla parte de la actividad del citado proyecto.

Otros tres buitres leonados muestreados procedían del Centro de Recuperación de Fauna Silvestre El Valle (Murcia), dos individuos juveniles y un adulto, en cautividad e irrecuperables.

En el Centro de Recuperación de Fauna Silvestre de Albacete se muestrearon cuatro buitres leonados (de los cuales tres eran adultos y uno juvenil). También se trataba de animales en cautividad e irrecuperables.

Todas las muestras se tomaron de cloaca mediante hisopo en medio de transporte de Stuart, y conservadas en refrigeración hasta su transporte al laboratorio de la Unidad de Microbiología e Inmunología del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de Murcia, donde se procesaron.

Junto con las cepas aisladas de las treinta muestras recogidas personalmente, se han procesado también nueve cepas de *Staphylococcus* y doce de *Eschericia coli*, pertenecientes a la colección de la Unidad Docente de Microbiología e Inmunología, aisladas de buitres leonados juveniles del mismo muladar de la Sierra de Mariola en 2014.

A partir de los estafilococos identificados se ha realizado un estudio estadístico (Chi cuadrado) de las dos variables categóricas con las que se

dispone en el estudio (especie aislada y edad del animal) para saber si existe o no alguna causa que relacione la presencia de las especies aisladas en los individuos según su edad (jóvenes o adultos).

Con el fin de comparar los perfiles de sensibilidad/resistencia obtenidos en los antibiogramas realizados con las especies de *Staphylococcus* aisladas, se emplearon 5 cepas de *S. aureus* meticilin resistentes y otras cinco de *S. pseudointermedius* meticilin resistentes, proporcionadas por el laboratorio Laboklin, Bad Kissingen, Alemania.

Procesado de las muestras

Teniendo en cuenta que con el presente estudio se pretende el aislamiento e identificación de especies de *Staphylococcus* y de enterobacterias de interés clínico, y el establecimiento de su perfil de resistencia/sensibilidad antibiótica, se establecieron las siguientes fases.

1. Siembra en agar con 5% de sangre de cordero (Bio Merieux) y agar MacConkey (Bio Merieux) con el mismo hisopo, tras lo cual se introduce en caldo nutritivo con 7,5% de NaCl, como caldo de enriquecimiento para estafilococos (Wedley et. al., 2014). Las siembras se mantienen a 37°C durante 24 h.
2. Estudio de las colonias crecidas en agar sangre (morfología, hemólisis, Gram) y en MacConkey (fermentación de la lactosa, precipitación de sales biliares, Gram), y siembra en Manitol Sal Agar “MSA” (Bio Merieux) a partir del caldo salado. Siembra en agar triptosa inclinado “ATI” de las colonias de interés (cocobacilos Gram- a partir de colonias en Mac Conkey y cocos Gram + a partir de agar sangre).
3. Establecimiento del perfil bioquímico de los cultivos en ATI, según Barrow y Felthan (2003). Gram de las colonias crecidas en MSA y siembra de las que correspondan a cocos Gram +, en ATI.
4. Establecimiento del perfil bioquímico de los cultivos de cocos Gram + según Barrow y Felthan (2003).

5. Cuando no se consigue un perfil claro de los cultivos, se recurre a su identificación mediante galerías API 20E o STAPH (Bio Merieux).
6. Antibiógrama de los aislados e identificados, siguiendo el método de difusión en disco de Kyrby-Bauer (Ortez, 2005) sobre agar de Mueller Hinton (Bio Merieux) y utilizando los siguientes antibióticos (Bio Merieux):

Tabla 1. Antibióticos seleccionados para la determinación de perfiles de sensibilidad.

Aminoglucósidos	Kanamicina (K) 30µg, Gentamicina (GM) 10µg, Amikacina (AN) 30µg
β-Lactámicos	Amoxicilina (AMX) 25µg, Ampicilina (AM) 10µg, Penicilina (P) 10U, Amoxicilina-Ácido clavulánico (AMC) 30µg Sólo en Gram +: Oxacilina (OXC) 1µg
Tetraciclinas	Tetraciclina (TE) 30µg
Quinolonas	Ácido nalidíxico (NA) 30µg
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina (CIP) 5µg
Cefalosporinas	Cefuroxime (CXM) 30µg, Cefoperazona (CPZ) 75µg, Cefoxitina (FOX) 30µg, Cefalexina (CXN) 30µg
Polipéptido	Sólo en Gram -: Polimixina B (PB) 300U
Antagonistas del folato	Trimetoprim-sulfametoxazol (SXT) 25µg

7. Para la clasificación en sensible, intermedio o resistente hemos seguido el criterio de Ortez (2005) referente al diámetro del halo de inhibición:
 - (R) Resistente: hasta 8 mm de diámetro.
 - (I) Intermedio: entre 8 y 16 mm de diámetro.
 - (S) Sensible: mayor de 16 mm de diámetro.

RESULTADOS

A partir de las 30 muestras obtenidas durante el presente año en Alcoy y en los Centros de Recuperación de Fauna Silvestre de El Valle (Murcia) y de Albacete, se ha realizado el aislamiento e identificación de cepas pertenecientes al Género *Staphylococcus* y a la Familia *Enterobacteraceae* u otras Gram negativas de interés clínico. En la tabla 2 figura la relación de muestras y especies aisladas de cada una de ellas

El número de muestras recogidas personalmente mediante hisopo cloacal para el estudio es de 30. En 7 de las cuales no fue posible el aislamiento y posterior identificación de ningún agente microbiano de interés para el estudio y fueron desechadas.

Por tanto, el número total de muestras en las que se aislaron bacterias de interés para el estudio (estafilococos y ciertas enterobacterias) es de 23, lo que supone un 76,6% de éxito en el aislamiento. Además se emplearon en el estudio las nueve cepas de *Staphylococcus* (tabla 3) y las doce de *E. coli*, ya identificadas, de la colección de la Unidad de Microbiología e Inmunología. El número total de cepas identificadas y, disponibles para el estudio es de 44, entre las que se encuentran once especies de *Staphylococcus* y siete de *Enterobacteriaceae*, además de una cepa de *P. aeruginosa*

De las 23 muestras originales se aislaron ocho especies de estafilococos, en 16 muestras, correspondientes a 21 aislamientos, y en 13 muestras se consiguieron 17 aislamientos con seis especies de enterobacterias; además se aisló una cepa de *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabla 2. Especies bacterianas aisladas a partir de muestras cloacales de Buitre leonado (*Gyps fulvus*) recogidas en noviembre de 2015.

n	Ref.	Edad	Especies	
1	10	Adulto	/	<i>Proteus mirabilis</i>
2	11	Joven	<i>S. aureus</i>	/
3	12	Adulto	/	<i>E. coli</i>
4	13	Adulto	<i>S. aureus</i>	/
5	14	Adulto	/	<i>E. coli</i>
6	15	Adulto	<i>S. lugdunensis</i>	<i>E. coli</i>
7	16	Adulto	/	/
8	17	Adulto	<i>S. xylosus</i>	/
9	18	Adulto	/	<i>Enterobacter aerogenes</i>
10	19	Joven	<i>S. saprophyticus</i>	/
11	20	Joven	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> ; <i>Proteus mirabilis</i> <i>Citrobacter freundii</i> ; <i>P. aeruginosa</i> ;
12	21	Joven	<i>S. saprophyticus</i>	<i>E. hermanii</i>
13	22	Adulto	/	/
14	23	Joven	/	<i>Pantoea spp</i>
15	24	Adulto	/	/
16	25	Adulto	<i>S. saprophyticus</i>	/
17	26	Adulto	/	/
18	27	Joven	<i>S. lentus</i>	/
19	28	Joven	<i>S. saprophyticus</i>	/
20	29	Adulto	/	/
21	30	Adulto	/	/
22	31	Adulto	/	/
23	32	Adulto	<i>S. xylosus</i> ; <i>S. lentus</i>	/
24	1 Valle	Joven	<i>S. saprophyticus</i>	<i>E. coli</i> 1; <i>E. coli</i> 2
25	2 Valle	Adulto	<i>S. aureus</i> ; <i>S. saprophyticus</i> ; <i>S. schleiferi</i>	/
26	3 Valle	Joven	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
27	1 Alb	Joven	/	<i>E. coli</i>
28	2 Alb	Adulto	/	<i>E. coli</i>
29	3 Alb	Adulto	<i>S. pseudointermedius</i> ; <i>S. capitis</i> ; <i>S. lentus</i>	/
30	4 Alb	Adulto	<i>S. lentus</i>	<i>E. coli</i>

Tabla 3. Estafilococos pertenecientes a la colección de la U. D. de Microbiología e Inmunología.

n	Ref	Edad	Especie
1	1 (8)	Joven	<i>S. hominis</i>
2	2 (8)	Joven	<i>S. xylosus</i>
3	3 (8)	Joven	<i>S. sciuri</i>
4	4 (8)	Joven	<i>S. lentus</i>
5	5 (8)	Joven	<i>S. simulans</i>
6	6 (8)	Joven	<i>S. simulans</i>
7	7 (8)	Joven	<i>S. saprophyticus</i>
8	8 (8)	Joven	<i>S. pseudointermedius</i>
9	9 (8)	Joven	<i>S. pseudointermedius</i>

Especies de *Staphylococcus*:

En 16 muestras de las 30 recogidas se aislaron estafilococos (53,3% de éxito). A partir de esas 16 muestras se han realizado 21 aislamientos e identificaciones de cepas estafilocócicas, pertenecientes a 8 especies diferentes. De 13 muestras se aisló una sola especie, de la muestra 32, 2 especies y de las muestras 2 Valle y 3 Alb, 3 especies de estafilococos diferentes cada una. Estas dos últimas dos muestras pertenecen a buitres irre recuperables residentes en centros de recuperación de fauna silvestre (El Valle, Murcia y de Albacete).

Tabla 4. Especies estafilocócicas aisladas y frecuencia de aparición.

Especie	n=21
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	6 (28,6%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	5 (23,8%)
<i>Staphylococcus lentus</i>	4 (19%)
<i>Staphylococcus xylosus</i>	2 (9,5%)
<i>Staphylococcus pseudointermedius</i>	1 (4,8%)
<i>Staphylococcus capitis</i>	1 (4,8%)
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1 (4,8%)
<i>Staphylococcus schleiferi</i>	1 (4,8%)

Como se muestra en la tabla 4., *S. saprophyticus* es la especie aislada con mayor frecuencia (28,6%), seguida de *S. aureus* (23,8%), *S. lentus* (19%), y *S. xylosus* (9,5%). El resto de especies detectadas se aislaron en una sola ocasión cada una de ellas (4,8%). Es de especial interés el aislamiento de la especie *S. lugdunensis* por su singularidad. Se trata de una especie de estafilococos poco estudiada y subestimada en la medicina veterinaria, es un estafilococo emergente (Ardigò, et al., 2014), coagulasa negativo, semejante a *S. aureus* en cuanto a virulencia, y curso clínico de la infección que produce.

Especies de *Enterobacteriaceae*, y otras con significación clínica para el ser humano y los animales:

En 13 muestras de las 30 recogidas se logró aislar enterobacterias de interés en el estudio (43,3% de éxito). De 11 se aisló una sola especie, de la muestra 20 se aislaron 4, y de la muestra 1 Valle 2 cepas de *E. coli*. En líneas generales, se han podido aislar 17 cepas bacterianas correspondientes a 6 especies de enterobacterias y una de *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*).

Tabla 5. Especies de enterobacterias identificadas y frecuencia de aparición.

Especie	n=17
<i>Escherichia coli</i>	10 (58,8%)
<i>Proteus mirabilis</i>	2 (11,8%)
<i>Citrobacter freundii</i>	1 (5,9%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1 (5,9%)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1 (5,9%)
<i>Escherichia hermanii</i>	1 (5,9%)
<i>Pantoea spp</i>	1 (5,9%)

E. coli es la especie de enterobacteria que más se repite en la identificación (58,8%), seguida de *P. mirabilis* (11,8%). Las restantes cinco especies identificadas (*P. aeruginosa*, *C. freundii*, *E. aerogenes*, *E. hermanii* y *Pantoea spp*) aparecieron todas en una sola ocasión (5,9%).

Pruebas de sensibilidad de los estafilococos a antibióticos.

Se ha realizado antibiograma con las 30 cepas estafilocócicas (21 propias y 9 cedidas), utilizando los 17 antibióticos mencionados en “Material y Métodos”. En el anexo 1. se describen los resultados de las 30 cepas en dichas pruebas de sensibilidad.

Aminoglucósidos (K, GM, AN): 17 cepas de 30 (56,6%) presentan sensibilidad a los tres aminoglucósidos probados (K, GM y AN), y 5 cepas presentaron resistencia a los tres antibióticos (16,6%).

K	R=12(40%)	S=19(63,3%)	I=1(3,3%)
GM	R=8(26,6%)	S=19(63,3%)	I=5(16,6%)
AN	R=10(33,3%)	S=20(66,6%)	I=2(6,6%)

Betalactámicos: 4 cepas de 30 presentaron sensibilidad a los 5 antimicrobianos probados y sólo una cepa presentó resistencia a los 5 antibióticos (9 cepas no fueron probadas con AMC).

AMX	R=19(63,3%)	S=10(33,3%)	I=3(10%)
AMC	R=2(9,5%)	S=19(90,4%)	I=2(9,5%)
AM	R=11(36,6%)	S=15(50%)	I=6(20%)
PEN	R=19(63,3%)	S=10(33,3%)	I=3(10%)
OXC	R=14(46,6%)	S=16(53,3%)	I=2(6,6%)

Quinolonas: 6 cepas mostraron resistencia frente a las 2 quinolonas seleccionadas para el estudio, y únicamente una cepa se mostró sensible a los antimicrobianos testados.

NA	R=25(83,3%)	S=3(10%)	I=4(13,3%)
CIP	R=6(20%)	S=22(73,3%)	I=4(13,3%)

Cefalosporinas: 5 cepas mostraron sensibilidad por los 4 antimicrobianos testados y solamente una cepa se mostró resistente a todos ellos.

CXM	R=4(13,3%)	S=20(66,6%)	I=8(26,6%)
FOX	R=12(40%)	S=19(63,3%)	I=1(3,3%)
CPZ	R=1(3,3%)	S=23(76,6%)	I=8(26,6%)
CXN	R=12(40%)	S=18(60%)	I=2(6,6%)

Tetraciclina: se testaron 28 cepas aisladas e identificadas (todas salvo dos cepas).

TE	R=21(75%)	S=8(28,5%)	I=1(3,5%)
----	-----------	------------	-----------

Antagonistas del folato:

SXT R=7(23,3%) S=22(73,3%) I=3(10%)

Se ha observado que de las 30 cepas a las que se les ha realizado el antibiograma, una cepa proveniente del Centro de Recuperación de Fauna Silvestre de Albacete presenta sensibilidad al 100% de los antibióticos probados. Por el contrario, dos cepas aisladas de dos buitres del Centro de Recuperación de Fauna Silvestre de El Valle presentan sensibilidad a todos los antibióticos probados salvo al ácido nalidíxico, al cual son resistentes ambas.

Pruebas de sensibilidad a antibióticos de las cepas de *Enterobacteriaceae* y otras bacterias de interés sanitario identificadas.

Se ha realizado el test de sensibilidad a antimicrobianos de las 29 enterobacterias identificadas (17 propias y 12 cedidas). En el anexo 2. se presentan los resultados de las pruebas de sensibilidad a antibióticos de las cepas de la Familia *Enterobacteriaceae* y otras de interés clínico identificadas.

Aminoglucósidos: se ha realizado el test de sensibilidad a 28 muestras. De ellas, siete presentaron sensibilidad a los 3 antimicrobianos, y dos de las muestras presentaron resistencia al 100% de los antibióticos probados.

K R=8(28,5%) S=9(32,1%) I=12(42,8%)

GM R=6(21,4%) S=16(57,1%) I=7(25%)

AN R=3(10,7%) S=17(60,7%) I=9(32,1%)

Betalactámicos: 18 muestras fueron resistentes a todos los antimicrobianos probados, y sólo una muestra resultó sensible a los cuatro antibióticos.

AMX R=21(72,4%) S=5(17,2%) I=4(13,7%)

AMC R=17(58,6%) S=4(13,7%) I=9(31,03%)

AM R=22(75,8%) S=1(3,4%) I=7(24,1%)

PEN R=28(96,5%) S=1(3,4%) I=1(3,4%)

Quinolonas: 20 de las 29 cepas presentaron sensibilidad ante los 2 antimicrobianos seleccionados para las pruebas. Por el contrario, 5 cepas presentaron resistencia al 100% de los antibióticos a los que se expusieron.

NA R=9(31,03%) S=20(68,9%) I=1(3,4%)

CIP R=5(17,2%) S=23(79,3%) I=2(6,8%)

Cefalosporinas: de 29 cepas, una sola resultó ser sensible a todos los antibióticos probados (CPZ fue testada en 28 de las 29 muestras).

CXM R=3(10,3%) S=27(93,1%) I=0

FOX R=4(13,7%) S=25(86,2%) I=1(3,4%)

CPZ R=0 S=24(85,7%) I=5(17,8%)

CXN R=5(17,2%) S=2(6,8%) I=23(79,3%)

Antagonistas del folato: el antibiótico seleccionado para el test de sensibilidad de 29 muestras es Trimetoprim-sulfametoxazol.

SXT R=15(51,7%) S=13(44,8%) I=1(3,4%)

Polimixina B: antibiótico sólo probado en bacterias Gram negativas.

PB R=20(68,9%) S=1(3,4%) I=9(31,0%)

Tetraciclina: los resultados del test realizado en 28 cepas son los siguientes:

TE R=18(64,2%) S=3(10,7%) I=8(28,5%)

Se han empleado 5 cepas de *S. aureus* meticilin resistentes y otras 5 de *S. pseudointermedius* meticilin resistentes, proporcionadas por el laboratorio Laboklin, Bad Kissingen, Alemania, para comparar con ellas los perfiles de sensibilidad/resistencia obtenidos en los antibiogramas realizados con las cepas de *S. aureus* y *S. pseudointermedius* aisladas. Los perfiles de las muestras alemanas están reflejados en el anexo 3, y la comparación en el anexo 4.

DISCUSIÓN

De las 11 especies de estafilococos identificadas (*S. saprophyticus*, *S. aureus*, *S. lentus*, *S. xylosus*, *S. pseudointermedius*, *S. simulans*, *S. capitis*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. schleiferi* y *S. sciurii*), todas caracterizadas por poseer significación clínica en medicina humana (De Paulis et al., 2003) y estar relacionadas con múltiples resistencias antibióticas, es *S. saprophyticus* la que ha aparecido en mayor proporción (28,6%), seguida de *S. aureus* y *S. lentus* (23,8% y 19% respectivamente).

En una ocasión se identificó *S. lugdunensis* mediante API Staph. Se trata de un CNS emergente, subestimado y poco estudiado en medicina veterinaria (Ardigò, et al., 2014), que se encuentra de manera natural en la piel y presenta semejanzas con *S. aureus* en cuanto a virulencia, y curso clínico. Puede ser un agente capaz de provocar complicaciones letales (Schandiz, et al., 2015) tras intervenciones quirúrgicas menores y aborto en el ganado.

Por otro lado, se han identificado 6 cepas diferentes de la *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *E. hermannii*, *P. mirabilis*, *C. freundii*, *E. aerogenes* y *Pantoea spp.*) y una cepa de *P. aeruginosa*. *E. coli* ha sido la bacteria más frecuentemente encontrada (58,8%), lo que coincide con Schwarz y Chaslus-Dancla (2001), que aseguran que *E. coli* es una de las bacterias entéricas más abundantes en la microbiota y ejerce en muchas ocasiones una acción limitante en el asentamiento y proliferación de otras especies bacterianas.

Es de especial interés el aislamiento de *Pantoea spp.* por su singularidad, aunque no se pudo llegar a identificar la especie concreta. Se trata de un agente que forma asociaciones con gran variedad de huéspedes, incluyendo plantas, insectos y seres humanos (Cruz et al., 2007). Aunque a menudo es considerado como un patógeno vegetal, la evidencia reciente indica que *Pantoea* se está aislando en ambientes hospitalarios, donde es causante de infecciones articulares, dérmicas, urinarias (Kratz et al., 2003) por contaminación tras cirugías o por inoculación por punzamiento con cuerpos

extraños vegetales portadores de la bacteria. Algunos aislados son productores de antibióticos (Walterson y Stavrinides, 2015), por lo que se han utilizado como agentes de control biológico para el tratamiento de enfermedades en plantas

En cuanto al estudio estadístico (Chi cuadrado) de las variables edad y especie estafilocócica, todos los p-value obtenidos de cada especie aislada han sido superiores a 0'05 (no significativos), por lo que no es posible desechar la hipótesis nula consistente en que la edad de los animales muestreados y la presencia de unas u otras especies estafilocócicas es debida al azar y no a alguna relación o causa determinada.

Tras realizar las pruebas de sensibilidad/resistencia a las cepas de estafilococos se han observado resistencias a todos los antibióticos probados (resultados en clara discordancia con la generalizada sensibilidad a antibióticos de los estafilococos estudiados que apunta Porrero et al. (2014); existiendo la muestra 3HAlb (*S. pseudointermedius*) sensible a todos los antibióticos testados, y las muestras 2HH (*S. schleiferi*) y 3H (*S. aureus*) sensibles a todos los antibióticos salvo al ácido nalidíxico (NA). También se encontró la cepa 25g (*S. saprophyticus*) resistente a todos los antimicrobianos salvo a la amoxicilina, con o sin ácido clavulánico, y a la penicilina.

Aunque las 3 cepas que presentan los menores porcentajes de resistencia proceden de buitres residentes en CRFS (El Valle y de Albacete), y aunque el número de muestras de aves en CRFS es muy pequeño, no se aprecian diferencias entre las especies bacterianas aisladas de estos buitres y las de los de vida libre.

Todos los grupos de antibióticos han evidenciado la presencia cepas resistentes. Los antibióticos que menores resistencias han registrado son la amoxicilina con ácido clavulánico (AMC), la ciprofloxacina (CIP) y la cefoperazona (CPZ). Por el contrario, se han registrado numerosas cepas de estafilococos resistentes a kanamicina (K), a penicilina (P), a amoxicilina (AMX), al ácido nalidíxico (NA) y a tetraciclina (TE). El resto de los antibióticos

se encuentran en valores intermedios de sensibilidad/resistencia, estando todos reflejados en los anexos 1 y 2. En general, los estudios sobre sensibilidad o resistencia de estafilococos y enterobacterias de la microbiota de animales silvestres muestran resultados contradictorios (Malayeri, et al., 2010), por motivos ecológicos, geográficos, aspectos intra e interespecíficos, hábitos alimentarios, etc.

Tras la comparación de los perfiles de sensibilidad/resistencia (anexo 3 y 4) de las 5 cepas de *S. aureus* meticilin resistentes cedidas por el laboratorio Laboklin, Bad Kissingen, Alemania y las 5 cepas de *S. aureus* aisladas de muestras cloacales recogidas en 2015 en Alcoy (Alicante), se observa similitud de resultados frente a la mayoría de los antimicrobianos utilizados (K, GM, AMX, AMC, AM, P, FOX, CPZ Y CXN). Aunque, existen diferencias frente a la TE (las cepas alemanas son sensibles y las alicantinas son resistentes) y frente a SXT (las cepas alemanas son resistentes al antibiótico y las alicantinas son en general sensibles), por lo que estos resultados parecen indicar que nuestras cepas podrían ser meticilin resistentes, pero se necesitarían estudios moleculares (PCR) para confirmar este hecho.

No ocurre lo mismo con la comparación de los perfiles de sensibilidad de las cepas de *S. pseudointermedius* meticilin resistentes de Alemania y las 3 cepas de *S. pseudointermedius* aisladas de buitres en Alcoy, ya que entre ellas existen más diferencias. Se encuentran similitudes frente a K, GM, AMX, P Y SXT; y se encuentran resultados opuestos frente a la AM, OXC, TE, CPZ y CXN.

Ninguna de las cepas de enterobacterias aisladas ha mostrado sensibilidad o resistencia al total de los 17 antibióticos probados, lo que está en línea con lo referido por Malayeri, et al., (2010).

La cepa identificada como *Pseudomonas aeruginosa* mostró sensibilidad frente a aminoglucósidos y ciprofloxacina (CIP), resultados coincidentes con Harada et al. (2012), pero en cambio, es resistente a betalactámicos, contrariamente a lo que aseguran estos investigadores.

La penicilina (P), la ampicilina (AM) y la polimixina B (PB) son los antibióticos que mayor porcentaje de resistencias han mostrado frente a enterobacterias (96,5%, 75,8% y 68,9% respectivamente) y, por el contrario, los mayores índices de sensibilidad bacteriana los han mostrado el cefuroxime (CXM) y la ciprofloxacina (CIP) con valores de 10,3% y 17,2%.

Cabe destacar que, en el caso de los aminoglucósidos usados (K, GM y AN), betalactámicos (AMX, AMC y AM), cefalexina (CXN) en especial de las cefalosporinas utilizadas, la polimixina B (PB) y la tetraciclina (TE), se han observado valores intermedios en elevado porcentaje, llegando a alcanzar, por ejemplo, 79,3% de valores intermedios frente a la cefalexina (CXN). Esto podría indicar que nos encontramos frente a una microbiota entérica de aves silvestres (en este caso de buitre leonado) en pleno proceso de adquisición de resistencias, y que en un hipotético sondeo posterior sería muy probable encontrar una disminución de cepas sensibles a antibióticos por la transformación de estos resultados intermedios a resistentes. Esta teoría podría estar respaldada por Authier, et al., (2006), quienes explican en su estudio que las bacterias multirresistentes varían su grado de resistencia a diferentes antibióticos a lo largo del tiempo.

Todos los datos recogidos hasta el momento en el estudio indican que los buitres leonados de vida en libertad, muestreados en Alcoy durante 2015 y 2014, presentan cepas de estafilococos y enterobacterias de importancia clínica en medicina humana y veterinaria, la mayoría resistentes a más de un antibiótico. La exposición directa de la fauna silvestre a antibióticos es rara (Greig et al., 2015), su fuente reside en hábitats compartidos con la ganadería, fuentes de agua poco higienizadas o contaminación del medio ambiente, pero esto no excluye la posibilidad de llegada de estas bacterias tanto al ganado como a la especie humana.

Se desconoce el impacto en la salud de la fauna del uso de antibióticos con la intensificación de la producción ganadera (Blanco et al., 2007). En el caso de las aves carroñeras, sus hábitos alimenticios favorecen la ingestión de restos animales que pueden estar contaminados con estos microorganismos

multirresistentes y pasar a comportarse como reservorios, alterando su salud y su dinámica poblacional (Porrero et al., 2014). El problema se torna bidireccional, ya que existe peligro de transmisión de estos agentes patógenos del humano y el ganado a la fauna silvestre, y en sentido opuesto.

La fauna silvestre se alimenta en ocasiones con vísceras, canales infectadas, en muladares con alta densidad de animales y de roedores, vertederos con pobres medidas de descontaminación, etc. (Benskin et al., 2009). Como Blanco et al. (2007) indica, es muy importante el papel de la carroña de ganado estabulado, ya que parece existir una relación positiva y significativa entre el consumo de carroña de ganado estabulado y la resistencia bacteriana a múltiples antibióticos de las especies bacterianas constituyentes de la microbiota de estos animales silvestres. De hecho, Casas-Díaz et al., (2016) determinan que el porcentaje de fármacos en buitres de zonas de alta densidad de cadáveres (presencia de muladares o zonas de complementación de alimento para estas aves) es mayor que donde la disponibilidad de cadáveres es más impredecible.

Es de enorme importancia la implantación de medidas de gestión para minimizar la exposición de la fauna silvestre a este tipo de microorganismos multirresistentes a fármacos. Una de las primera medidas sería la realización de test de sensibilidad a antibióticos previo a la implantación de tratamiento contra infecciones bacterianas, tanto en medicina humana como en medicina veterinaria (Blanco et al., 2006). También sería beneficioso que las canales provinieran de los mataderos, donde se pudiera exigir productos que hayan cumplido los plazos de seguridad y estén libres de fármacos.

Todos los estudios relacionados con este tipo de patógenos ponen de manifiesto (Lozano et al., 2009) la necesidad e importancia de una mejora cuantitativa y cualitativa de las investigaciones relacionadas con la Salud Pública, Salud Animal, Seguridad Alimentaria y sus interrelaciones.

CONCLUSIONES

1. No hemos encontrado diferencias significativas entre las especies de *Staphylococcus* de animales adultos y las procedentes de jóvenes.
2. *Staphylococcus lugdunensis* y *Pantoea spp.*, no aparecen reseñados en la bibliografía consultada referente a fauna silvestre. Muestran resistencia a amoxicilina, penicilina, ampicilina, ácido nalidíxico y cefoxitina, y son considerados agentes emergentes, por lo que su presencia en aves carroñeras puede ocasionar su difusión hacia el ganado y la especie humana.
3. Entre los perfiles de sensibilidad a antibióticos de las enterobacterias identificadas se han encontrado valores intermedios en un elevado porcentaje, lo que indica un posible proceso de adquisición y aumento de resistencias a lo largo del tiempo.

CONCLUSIONS

1. We did not find significant differences between species of *Staphylococcus* isolated from adult animals and those from young birds.
2. In the reviewed literature there is a lack of information concerning the role of *S. lugdenensis* and *Pantoea spp.* in wildlife. These species show resistance to, amoxicillin, penicillin, ampicillin, nalidix acid and cefoxitin and are considered emerging agents. Therefore, their presence in carrion birds may lead to their spread to livestock and humans.
3. Among the antibiotic sensitivity profiles of identified enterobacteria, we found intermediate values of resistance in a high percentage, indicating a possible acquisition process and increasing resistance over time.

REFERENCIAS

- Ardigo, P., D'Incau, M., y Pongolini, S. (2014). Abortion in cattle due to infection with *Staphylococcus lugdunensis*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 26(6), 818-820.
- Authier, S., Paquette, D., Labrecque, O., y Messier, S. (2006). Comparison of susceptibility to antimicrobials of bacterial isolates from companion animals in a veterinary diagnostic laboratory in Canada between 2 time points 10 years apart. *The Canadian Veterinary Journal*, 47(8), 774.
- Barrow, G.I. y R.K.A. Feltham. Edit. (2003). *Cowan and Steel's Manual for the identification of medical bacteria*. (Edit) (3ª Ed.) Cambridge University Press.
- Benskin, C. M., Wilson, K., Jones, K., y Hartley, I. R. (2009). Bacterial pathogens in wild birds: a review of the frequency and effects of infection. *Biological Reviews*, 84(3), 349-373.
- Blanco, G., Lemus, J. A., Grande, J., Gangoso, L., Grande, J. M., Donázar, J. A., Arroyo, B., Frías, O., e Hiraldo, F. (2007). Retracted Geographical variation in cloacal microflora and bacterial antibiotic resistance in a threatened avian scavenger in relation to diet and livestock farming practices. *Environmental Microbiology*, 9(7), 1738-1749.
- Blanco, G., Lemus, J. A., y Grande, J. (2006). Retracted: Faecal bacteria associated with different diets of wintering red kites: influence of livestock carcass dumps in microflora alteration and pathogen acquisition. *Journal of Applied Ecology*, 43(5), 990-998.
- Bond, R., y Loeffler, A. (2012). What's happened to *Staphylococcus intermedius*? Taxonomic revision and emergence of multi-drug resistance. *Journal of Small Animal Practice*, 53(3), 147-154.
- Casas-Díaz, E., Cristòfol, C., Cuenca, R., Agustí, S., Carneiro, M., Marco, I., Lavín, S., y Margalida, A. (2016). Determination of fluoroquinolone antibiotic residues in the plasma of Eurasian griffon vultures (*Gyps fulvus*) in Spain. *Science of the Total Environment*, 557, 620-626.
- Cruz, A. T., Cazacu, A. C., y Allen, C. H. (2007). *Pantoea agglomerans*, a plant pathogen causing human disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(6), 1989-1992.
- Daniels, M. J., Hutchings, M. R., y Greig, A. (2003). The risk of disease transmission to livestock posed by contamination of farm stored feed by wildlife excreta. *Epidemiology and Infection*, 130(03), 561-568.
- De Paulis, A. N., Predari, S. C., Chazarreta, C. D., y Santoianni, J. E. (2003). Five-test simple scheme for species-level identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(3), 1219-1224.
- Delgado, M. G., Mayorgas, A. G., Rodríguez, F., Ibarra, A., y Román, M. C. (2007). Sensibilidad y resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a los antimicrobianos. *Revista Española de Quimioterapia*, 20(2), 230-233.
- Dipineto, L., Bossa, L. M. D. L., Pace, A., Russo, T. P., Gargiulo, A., Ciccarelli, F., Raia, P., Caputo, T. P., y Fioretti, A. (2015). Microbiological survey of birds of prey pellets. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 41, 49-53.
- Greig, J., Rajić, A., Young, I., Mascarenhas, M., Waddell, L., y 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.
- Harada, K., Arima, S., Niina, A., Kataoka, Y., y Takahashi, T. (2012). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from dogs and cats in Japan: current status of antimicrobial resistance and prevailing resistance mechanisms. *Microbiology and Immunology*, 56(2), 123-127.
- Houston, D. C., y Cooper, J. E. (1975). The digestive tract of the whiteback griffon vulture and its role in disease transmission among wild ungulates. *Journal of Wildlife Diseases*, 11(3), 306-313.

- Literak, I., Dolejska, M., Radimersky, T., Klimes, J., Friedman, M., Aarestrup, F. M., Hasman, H., y Cizek, A. (2010). Antimicrobial-resistant faecal *Escherichia coli* in wild mammals in central Europe: multiresistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in wild boars. *Journal of Applied Microbiology*, 108(5), 1702-1711.
- Lloyd, D. H. (2007). Reservoirs of antimicrobial resistance in pet animals. *Clinical Infectious Diseases*, 45(Supplement 2), S148-S152.
- Lozano, C., López, M., Gómez-Sanz, E., Ruiz-Larrea, F., Torres, C., y Zarazaga, M. (2009). Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in food samples of animal origin in Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(6), 1325-1326.
- Kratz, A., Greenberg, D., Barki, Y., Cohen, E., y Lifshitz, M. (2003). *Pantoea agglomerans* as a cause of septic arthritis after palm tree thorn injury; case report and literature review. *Archives of Disease in childhood*, 88(6), 542-544.
- Malayeri, H. Z., Jamshidi, S., y Salehi, T. Z. (2010). Identification and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria causing otitis externa in dogs. *Veterinary Research Communications*, 34(5), 435-444.
- Molina-Lopez, R. A., Valverdú, N., Martín, M., Mateu, E., Obon, E., Cerdà-Cuellar, M., y Darwich, L. (2011). Wild raptors as carriers of antimicrobial-resistant *Salmonella* and *Campylobacter* strains. *Veterinary Record-English Edition*, 168(21), 565.
- MRSA Research Center : MRSA & Animals | University of Chicago. (2016). Recuperado de http://mrsa-research-center.bsd.uchicago.edu/mrsa_animals/index.html
- Ortez, J.H. (2005). Prueba de difusión en disco. En M.B. Coyle (Ed.), *Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana*. American Society for Microbiology.
- Porrero, M. C., Mentaberre, G., Sánchez, S., Fernández-Llario, P., Casas-Díaz, E., Mateos, A., Vidal, D., Lavín, S., Fernández-Llario, J. F., y Domínguez, L. (2014). Carriage of *Staphylococcus aureus* by free-living wild animals in Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(16), 4865-4870.
- Schandiz, H., Olav Hermansen, N., Jørgensen, T., y Roald, B. (2015). *Staphylococcus lugdunensis* endocarditis following vasectomy—report of a case history and review of the literature. *APMIS*, 123(8), 726-729.
- Schwarz, S., y Chaslus-Dancla, E. (2001). Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Veterinary Research*, 32(3-4), 201-225.
- Smith, S. y Forbes, N. Treatment of pyotraumatic dermatitis infected with methicillin resistant *staphylococcus aureus* in three pet psittacines. *Great Western Exotic Vets*. Recuperado de <http://www.gwexotics.com/wccms-resources/4/7/d/0/7db747bc-a724-11e0-a685-0050568626ea.pdf>
- Sousa, M., Silva, N., Igrejas, G., Silva, F., Sargo, R., Alegria, N., Benito, D., Gómez, P., Lozano, C., Gómez-Sanz, E., Torres, C., Caniça, M., y Poeta, P. (2014). Antimicrobial resistance determinants in *Staphylococcus* spp. recovered from birds of prey in Portugal. *Veterinary Microbiology*, 171(3), 436-440.
- Walterson, A. M., & Stavrinides, J. (2015). *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiology Reviews*, fuv027.
- Wardyn, S. E., Kauffman, L. K., y Smith, T. C. (2012). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in central Iowa wildlife. *Journal of Wildlife Diseases*, 48(4), 1069-1073.
- Wedley, A.L., Dawson, S., Maddox, T.W., et al., (2014). Carriage of *Staphylococcus* species in the veterinary visiting dog population in mainland UK: molecular characterization of resistance and virulence. *Veterinary Microbiology*, 170, 81-88.

Anexo 1. Perfil de sensibilidad/resistencia a antibióticos realizado en las 21 cepas identificadas propias y las 9 cepas ya identificadas (cedidas por el Departamento de Microbiología e Inmunología) de estafilococos.

	Aminoglucósidos			Betalactámicos					TE	Quinolonas		Cefalosporinas				SXT
	K	GM	AN	AMX	AMC	AM	P	OXC		NA	CIP	CXM	FOX	CPZ	CXN	
1NH	R	R	R	S	R	I	S	R	I	R	I	I	R	I	R	R
2H	S	S	S	R	I	R	R	R	R	R	S	S	S	S	I	R
2NH	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	I	I	R	I	R	S
2HH	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
3H	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
11	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S
13	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	I	R
15	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
17	R	I	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	I	R	S
19	S	S	S	I	S	I	I	S	R	S	S	S	R	S	R	S
20	S	S	I	S	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S	R	S
21	R	R	I	S	S	S	S	R	R	R	I	I	R	S	R	I
25g	R	R	R	S	S	R	S	R	/	R	R	R	R	R	R	R
27	R	I	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S
28g	R	I	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R
32	R	I	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
32-2	S	S	S	R	R	R	R	R	S	I	S	R	S	S	R	S
1(8)	R	R	S	R	/	I	R	I	R	R	S	I	S	I	S	R
2(8)	S	S	S	R	/	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S
3(8)	S	S	S	R	/	R	R	R	R	R	S	I	S	S	S	S
4(8)	I	S	S	R	/	I	R	I	S	R	S	I	S	S	S	S
5(8)	S	S	S	R	/	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S
6(8)	S	S	S	R	/	S	R	S	R	R	S	I	S	S	S	S
7(8)	S	R	S	R	/	S	R	S	R	R	I	R	R	S	S	I
8(8)	S	S	S	R	/	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	I
9(8)	S	S	S	R	/	S	R	S	R	R	S	S	S	I	S	S
3H Alb	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
3NH Alb	S	S	S	I	S	I	I	S	R	I	S	S	S	I	S	S
3m-Alb	S	S	S	I	S	I	I	S	R	I	S	S	S	I	S	S
4m+ Alb	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S

Anexo 2. Perfil de sensibilidad/resistencia a antibióticos realizado con las 17 cepas identificadas propias y las 12 cepas ya identificadas (cedidas por el Departamento de Microbiología e Inmunología) de bacterias de la Familia *Enterobacteriaceae* y otras de interés clínico.

	Aminoglucósidos			Betalactámicos				TE	Quinolonas		Cefalosporinas				SXT	PB
	K	GM	AN	AMX	AMC	AM	P		NA	CIP	CXM	FOX	CPZ	CXN		
1McK	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	S	S	S	I	R	R
1H	I	S	S	R	I	R	R	R	S	S	S	S	I	R	R	R
3McK	I	I	R	I	I	I	R	I	S	S	S	S	S	R	S	R
10	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	I	R	R
12	R	R	I	R	R	R	R	R	R	I	S	I	I	R	S	R
14	I	I	I	S	S	I	R	I	S	S	S	S	S	I	S	R
15-2	I	I	I	R	I	R	R	R	R	R	R	S	S	I	R	R
18	S	S	S	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S	R	R	I
20-1McK	R	R	I	I	I	I	R	I	R	I	S	S	S	I	R	R
20-1AS	R	R	I	R	I	R	R	R	R	R	S	R	I	I	R	R
20-2McK	S	S	S	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S	R	I	S
20-2AS	I	I	I	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	I	S	R
21McK	I	I	I	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	I	R	R
23	S	S	S	I	I	R	R	I	S	S	S	R	S	I	S	I
1Alb	I	I	S	S	I	I	R	I	S	S	S	S	S	I	S	R
2Alb	I	I	I	S	I	I	R	I	S	S	S	S	S	I	S	R
4I+AI	I	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	S	I	S	R
1HA	S	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	I	R	I
1HV	I	S	S	R	R	R	R	I	S	S	S	S	S	I	R	I
2HA	I	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	I	S	I
11HA	S	S	S	R	R	R	R	I	S	S	S	S	S	I	S	I
11HV	S	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	I
15HV	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	I	R	R
19HA	I	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	I	R	I
19HV	/	/	/	R	R	R	R		S	S	S	S	S	I		R
20HA	R	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	I	R	I
20HV	R	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	I	I	R	R
23HV	S	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	I	I	S	R
24H	S	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	I	S	R

Anexo 3. Perfiles de sensibilidad/resistencia de las cepas cedidas por el laboratorio Laboklin, Bad Kissingen, Alemania.

	K	GM	AMX	AMC	AM	PE	OXC	TE	FOX	CPZ	CXN	SXT
<i>S. pseudointermedius</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	/	R	R	S
<i>S. pseudointermedius</i>	S	S	R	R	R	R	R	S	/	R	R	S
<i>S. pseudointermedius</i>	S	S	R	R	R	R	R	S	/	R	R	S
<i>S. pseudointermedius</i>	S	S	R	R	/	/	/	S	/	R	R	S
<i>S. pseudointermedius</i>	S	S	R	R	R	R	/	I	R	R	R	S
<i>S. aureus</i>	S	I	R	S	R	R	/	S	S	S	S	R
<i>S. aureus</i>	S	S	R	S	R	R	/	S	S	S	S	R
<i>S. aureus</i>	S	S	R	S	R	R	/	S	S	S	S	R
<i>S. aureus</i>	R	R	R	S	R	R	/	S	S	S	S	R
<i>S. aureus</i>	S	S	R	S	R	R	/	S	S	S	R	R

Anexo 4. Comparación de perfiles de sensibilidad de 5 cepas de *S.*

pseudointermedius meticilin resistentes cedidas por el laboratorio Laboklin, Bad Kissingen, Alemania; con las 3 cepas de *S. intermedius* aisladas de las muestras obtenidas en 2015 en Alcoy (Alicante).

<i>S. pseudointermedius</i>	K	GM	AMX	AMC	AM	PE	OXC	TE	FOX	CPZ	CXN	SXT
1 Alemania	R	R	R	R	R	R	R	S	/	R	R	S
2 Alemania	S	S	R	R	R	R	R	S	/	R	R	S
3 Alemania	S	S	R	R	R	R	R	S	/	R	R	S
4 Alemania	S	S	R	R	/	/	/	S	/	R	R	S
5 Alemania	S	S	R	R	R	R	/	I	R	R	R	S
8(8)	S	S	R	/	S	R	S	R	S	S	S	I
9(8)	S	S	R	/	S	R	S	R	S	I	S	S
3H A	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S

Comparación de perfiles de sensibilidad/resistencia de 5 cepas de *S. aureus* meticilin resistentes cedidas por el laboratorio Laboklin, Bad Kissingen, Alemania; con las 3 cepas de *S. aureus* aisladas de las muestras obtenidas en 2015 en Alcoy (Alicante).

<i>S. aureus</i>	K	GM	AMX	AMC	AM	PE	TE	FOX	CPZ	CXN	SXT
6 Alemania	S	I	R	S	R	R	S	S	S	S	R
7 Alemania	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	R
8 Alemania	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	R
9 Alemania	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	R
10 Alemania	S	S	R	S	R	R	S	S	S	R	R
2H	S	S	R	I	R	R	R	S	I	R	R
3H	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
11	S	S	R	S	R	R	R	R	S	S	S
13	R	R	R	S	R	R	R	R	S	I	R
20	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S