

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
Departamento de Patología y Medicina Preventiva



**DETECCIÓN Y ANÁLISIS GENÓMICO DE ENTEROBACTERALES PRODUCTORES
DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO Y CARBAPENEMASAS EN
AVES SILVESTRES PROVENIENTES DE CENTROS DE REHABILITACIÓN**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PRESENTADO A
LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
DE LA UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN, PARA
OPTAR AL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIA**

VALENTINA ESPERANZA ARAVENA RAMÍREZ
CHILLÁN - CHILE
2024

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
Departamento de Patología y Medicina Preventiva

**DETECCIÓN Y ANÁLISIS GENÓMICO DE ENTEROBACTERIALES PRODUCTORES
DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO Y CARBAPENEMASAS EN
AVES SILVESTRES PROVENIENTES DE CENTROS DE REHABILITACIÓN**

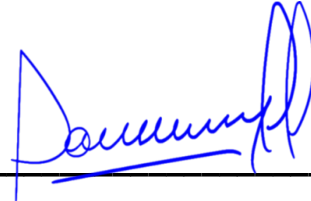
Por
VALENTINA ESPERANZA ARAVENA RAMÍREZ

**TRABAJO DE TITULACIÓN PRESENTADO A
LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
DE LA UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN, PARA
OPTAR AL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIA**

CHILLÁN – CHILE
2024

DETECCIÓN Y ANÁLISIS GENÓMICO DE ENTEROBACTERIALES PRODUCTORES DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO Y CARBAPENEMASAS EN AVES SILVESTRES PROVENIENTES DE CENTROS DE REHABILITACIÓN

Profesor Patrocinante



Danny Fuentes Castillo
Médico Veterinario. Dr. Cs.
Profesor Asistente

Profesor Guía



Paula Aravena Bustos
Médico Veterinario. Dr.
Profesor Asistente

Director Departamento
Patología y Medicina Preventiva



Sergio Donoso Erch
Médico Veterinario. Mg. Cs.
Profesor Asistente

TABLA DE CONTENIDOS

CAPÍTULO	PÁGINA
I. RESUMEN.....	1
II. SUMMARY.....	2
III. INTRODUCCIÓN.....	3
IV. MATERIALES Y MÉTODO.....	7
V. RESULTADOS.....	9
VI. DISCUSIÓN.....	15
VII. CONCLUSIONES.....	20
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
IX. DECLARACIÓN DE AUTORÍA.....	32
X. APÉNDICE.....	33

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N°		PÁGINA
EN EL TEXTO		
1.	Clasificación de patógenos resistentes a antibióticos según la Organización Mundial de la Salud (Taconelli et al., 2018).....	4
2.	Enterobacteriales productores de betalactamasas de espectro extendido o carbapenemasas detectadas en fauna silvestre de Chile.....	18
EN APÉNDICE		
3	Taxonomía de las aves muestreadas en el presente estudio, agrupados según orden, familia y especie.....	33

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N°	PÁGINA
EN EL TEXTO	
1. Muestras positivas y negativas provenientes de hisopados cloacales de aves silvestres analizadas en el presente estudio según centro de rehabilitación de origen.....	9
2. Mapa de Chile con la distribución geográfica del origen de las aves colonizadas del presente estudio por Enterobacterales productores de betalactamasas de espectro extendido.....	10
3. Susceptibilidad antimicrobiana de los Enterobacterales productores de betalactamasas de espectro extendido obtenidos de hisopados cloacales de aves silvestres del presente estudio frente a diferentes antimicrobianos de uso humano y veterinario.....	11
4. Resistoma de las Enterobacterales productores de betalactamasas de espectro extendido aislados de aves provenientes del Centro de Rehabilitación de Fauna Silvestre Universidad de Concepción y Fundación Ñamku.....	13
5. Plasmidoma de los Enterobacterales aislados en el presente estudio.....	14

I. RESUMEN

DETECCIÓN Y ANÁLISIS GENÓMICO DE ENTEROBACTERIALES PRODUCTORES DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO Y CARBAPENEMASAS EN AVES SILVESTRES PROVENIENTES DE CENTROS DE REHABILITACIÓN

DETECTION AND GENOMIC ANALYSIS OF EXTENDED-SPECTRUM BETA-LACTAMASE- AND CARBAPENEMASE-PRODUCING ENTEROBACTERIALES OF WILD BIRDS FROM REHABILITATION CENTERS

Los Enterobacteriales productores de betalactamasas de espectro extendido (E-BLEE) y productores de carbapenemasas son clasificadas como patógenos de prioridad crítica según la OMS. El objetivo de este trabajo es detectar y realizar un análisis genómico de Enterobacteriales productores de BLEE y carbapenemasas en aves silvestres que ingresan a centros de rehabilitación de la Región de Valparaíso y Ñuble durante el año 2022. Se obtuvieron 154 hisopados cloacales de los cuales 22 fueron E-BLEE y no hubo aislados productores de carbapenemasas. Once aislados fueron clasificados como cepas multirresistentes a los antimicrobianos. Veinte cepas positivas correspondieron a *E. coli* y se identificaron 15 secuencias de tipos, mientras que dos se identificaron como *K. pneumoniae*. El resistoma de las cepas en estudio arrojó los siguientes genes que codifican a BLEE: *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-8}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-27}, *bla*_{CTX-M-30}, *bla*_{CTX-M-32}, *bla*_{CTX-M-55}, *bla*_{CTX-M-177}. También se detectaron otras betalactamasas además de otros genes que confieren resistencia a aminoglucósidos, quinolonas, macrólidos, sulfadiazinas, tetraciclinas, trimetoprima, anfenicoles, fosfomicina, rifampicina y desinfectantes. Los replicones de plásmidos identificados de las cepas positivas fueron principalmente tipo Col, tipo Inc y p0111. El gen de BLEE más detectado fue *bla*_{CTX-M-15}. Se concluye que la adquisición de esta resistencia fue del medio ambiente en el que habitan estas aves silvestres, lo que está posiblemente relacionado con el nivel de contaminación ambiental del medio en el que habitan.

Palabras clave: resistencia antimicrobiana, BLEE, *E. coli*, *K. pneumoniae*, fauna silvestre.

II. SUMMARY

DETECTION AND GENOMIC ANALYSIS OF EXTENDED-SPECTRUM BETA-LACTAMASE- AND CARBAPENEMASE-PRODUCING ENTEROBACTERALES OF WILD BIRDS FROM REHABILITATION CENTERS

Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)- and carbapenemase-producing Enterobacterales are categorized as critical priority pathogens by the World Health Organization. The objective of this work is to detect and make a genomic analysis of ESBL and carbapenemase-producing Enterobacterales isolated from wild birds admitted at rehabilitation centers of V and XVI regions, Chile during 2022. 154 cloacal swabs were collected and 22 were confirmed as ESBL producers. Non carbapenemase-producing Enterobacterales were identified. Eleven isolates were classified as multidrug-resistant strains. Species identification revealed twenty isolates as *Escherichia coli* that belonged to 15 different sequence types (ST), and two *Klebsiella pneumoniae* of two different STs. The resistome of the isolates displayed ESBL genes: *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-8}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-27}, *bla*_{CTX-M-30}, *bla*_{CTX-M-32}, *bla*_{CTX-M-55}, and *bla*_{CTX-M-177}. Other beta-lactamase were also detected in addition of genes that conferring resistance to aminoglycosides, quinolones, macrolides, sulfadiazines, trimethoprim, tetracyclines, amphenicols, fosfomicin, rifampicin, and disinfectants. Plasmidome of positive ESBL strains were classified into Col-type, Inc-type, and p011 plasmid replicons. Our data shows that *bla*_{CTX-M-15} gene was the most prevalent among the ESBL positive samples. Regarding to the sample origins of the positive birds, we concluded that ESBL-producing Enterobacterales are related with the environment where wild birds live and maybe have a connection with the anthropogenic pollution.

Keywords: antimicrobial resistance, ESBL, *E. coli*, *K. pneumoniae*, wildlife

III. INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es una amenaza para la salud pública que se ha reportado desde la década de 1920 (Hutchings et al., 2019); sin embargo, durante los últimos años ha adquirido mayor preocupación a nivel global. Actualmente, alrededor de 700.000 personas en el mundo mueren cada año debido a la resistencia bacteriana, y son cada vez menos las alternativas terapéuticas para combatir infecciones provocadas por bacterias multirresistentes (Mancuso et al., 2021).

La propagación de genes de resistencia junto con los factores asociados a la interacción entre humanos, animales domésticos y/o silvestres, y el medio ambiente, supone como resultado bacterias multirresistentes adaptables a diversas especies y condiciones ambientales. Por esto, se hace necesario trabajar en un enfoque inclusivo para resolver el rápido avance y evolución de la RAM a nivel global (Aslam et al., 2021).

Desde el descubrimiento del primer antimicrobiano en 1910 (Hutchings et al., 2019), se han elaborado e investigado otra serie de compuestos para combatir infecciones bacterianas en humanos y animales domésticos (Brinkac et al., 2017). Las cefalosporinas aparecen como importante opción terapéutica en el año 1964, aunque unos años más tarde se describen bacterias capaces de inhibir el efecto de estos antibióticos (Hutchings et al., 2019).

En el año 1985 se comienzan a utilizar clínicamente los carbapenémicos, antibióticos de última generación para tratar infecciones producidas por bacterias resistentes a cefalosporinas (productoras de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE)) (Hutchings et al., 2019); sin embargo, en la década de los 90, se describen cepas de *K. pneumoniae* resistentes al efecto de carbapenémicos, principalmente mediante la producción de enzimas carbapenemasas (Paterson y Bonomo, 2005; Lutgring, 2019; Morrison y Zembower, 2020).

Entonces, cada vez que comienza el uso de un antimicrobiano, existe una presión selectiva que conlleva a la generación y/o adquisición de mecanismos de resistencia por parte de las bacterias (Rice, 2009; Ferri et al., 2017). Debido a esto, desde 1999 la creación de antibióticos ha disminuido en comparación con años anteriores (Projan y

Shlaes, 2004; Taconelli et al., 2018), ya que hay poco interés por la industria farmacéutica de crear nuevas moléculas antimicrobianas, principalmente por la abertura de otros mercados más rentables como medicamentos para tratar diabetes o cáncer (Ferri et al., 2017). Estos factores constituyen una problemática para los tratamientos del presente y futuro, sobre todo contra bacterias gramnegativas resistentes (Rice, 2009).

En la actualidad, Enterobacterales (como *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella sp.*, entre otras) resistentes a carbapenémicos o a cefalosporinas de tercera generación se clasifican como patógenos de prioridad crítica según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Tabla 1) (Taconelli et al., 2018; Mancuso et al., 2021).

Tabla 1. Clasificación de patógenos resistentes a antibióticos según la Organización Mundial de la Salud (Taconelli et al., 2018).

Prioridad	Patógenos resistentes
Prioridad crítica	<i>Acinetobacter baumannii</i> , resistente a carbapenémicos
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , resistente a carbapenémicos
	Enterobacterales, resistentes a carbapenémicos y/o cefalosporinas de tercera generación
Prioridad alta	<i>Enterococcus faecium</i> , resistente a vancomicina
	<i>Staphylococcus aureus</i> , resistente a meticilina y vancomicina
	<i>Helicobacter pylori</i> , resistente a claritromicina
	<i>Campylobacter spp.</i> , resistente a fluoroquinolonas
Prioridad media	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , no susceptible a penicilina
	<i>Haemophilus influenzae</i> , resistente a ampicilina
	<i>Shigella spp.</i> , resistente a fluoroquinolonas

La producción de enzimas BLEE o carbapenemasas es un mecanismo que confiere resistencia a antibióticos betalactámicos como penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y/o carbapenémicos, según el tipo de enzima (Guzmán-Blanco et al., 2014). En Enterobacterales, los genes que producen dichas enzimas están generalmente asociados a elementos genéticos móviles como los plásmidos (Madec et al., 2017). El primer plásmido descrito que era capaz de codificar genes productores de BLEE fue reportado en 1983 (Knothe et al., 1983), y se ha descubierto que estos plásmidos son capaces de transportar genes adicionales que otorguen mecanismos de resistencia a otras clases de antimicrobianos, desinfectantes y metales pesados (Bonnet, 2004).

En Latino América, se han reportado infecciones intrahospitalarias en humanos provocadas por Enterobacterales productores de BLEE (E-BLEE) desde los años 90, siendo la familia de genes de resistencia del tipo CTX-M la más relevante y prevalente en cuanto a la resistencia a cefalosporinas de espectro extendido (Guzmán-Blanco et al., 2014). En el caso de enzimas de importancia asociadas a resistencia a carbapenémicos en humanos, se encuentran KPC, NDM y/u OXA principalmente (Nordmann et al., 2012; Lovleva y Doi, 2017).

El impacto que esto ha tenido en la fauna silvestre es poco conocido, sin embargo, existen antecedentes de la detección de E-BLEE o carbapenemasas en fauna silvestre de diversas partes del mundo (Bonnedahl et al., 2015). En Chile, se han descrito en aves silvestres bacterias como *E. coli* y *Salmonella enterica* serovar Infantis productoras de BLEE, que a su vez eran portadoras de factores de virulencia clínicamente relevantes como sideróforos, toxinas y fimbrias (Hernández et al., 2013; Fuentes-Castillo et al., 2019; Fuentes-Castillo et al., 2020). Además, en un estudio reciente se detectaron cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasas (KPC-2 y NDM-5) en gaviotas migratorias (Ahlstrom et al., 2022).

La distribución de RAM se ve favorecida a nivel local y global por la fauna que vive en una determinada zona, así como por las especies migratorias (Laborda et al., 2022). En este contexto, se ha propuesto a las aves silvestres como centinelas ambientales y se ha sugerido que podrían actuar como diseminadores de la RAM (Bonnedahl y Järhult, 2014). En síntesis, la propagación de RAM y genes de resistencia a diferentes ambientes es una

realidad, y supone un riesgo múltiple para la salud humana, animal y medioambiental (Hernando-Amado et al., 2019).

Este estudio tiene como fin detectar y caracterizar genómicamente los E-BLEE y/o carbapenemasas que colonizan aves silvestres ingresadas a centros de rehabilitación de fauna silvestre de la región de Valparaíso y Ñuble de Chile.

Hipótesis

Las aves que ingresan al Centro de Rehabilitación de Fauna Silvestre Universidad de Concepción y a Fundación Ñamku, son portadoras de Enterobacterales productores de betalactamasas de espectro extendido y carbapenemasas.

Objetivo general

Evaluar la presencia y las características genómicas de Enterobacterales productores de beta-lactamasas de espectro extendido y carbapenemasas aves silvestres que ingresan a centros de rehabilitación de fauna silvestre en Chile.

Objetivos específicos

1. Analizar los Enterobacterales resistentes a cefalosporinas y/o carbapenémicos obtenidos desde hisopados cloacales de aves silvestres de Chile mediante test de Kirby Bauer utilizando antimicrobianos de uso humano y veterinario.
2. Caracterizar el genoma de Enterobacterales productores de beta-lactamasas de espectro extendido y/o carbapenemasas de aves silvestres de Chile considerando su secuencio-tipo, resistoma y plásmidos.

IV. MATERIALES Y MÉTODO

Las muestras provenían de los Centros de Rehabilitación de Fauna Silvestre Universidad de Concepción, Región de Ñuble y Fundación Ñamku, Región de Valparaíso, Chile. El muestreo se realizó por conveniencia y correspondió a hisopados cloacales de aves silvestres colectados al momento de ingreso durante el año 2022. Los hisopados fueron cultivados en agar MacConkey suplementado con ceftriaxona (2 µg/mL) y los aislados se encontraban almacenados en caldo cerebro-corazón suplementado con glicerol (20%) a -20° C.

Para la búsqueda de bacterias resistentes a cefalosporinas de 3ª generación y carbapenémicos se realizó cultivo de las muestras en agar MacConkey suplementado con ceftriaxona (2 µg/mL) incubándolas durante 24 horas a 37°C en el Laboratorio de Microbiología Veterinaria del Departamento de Patología y Medicina Preventiva de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Concepción, campus Chillán. Los Enterobacteriales aislados se identificaron mediante la prueba bioquímica API®20E (bioMérieux, Francia), sistema que permite identificar enterobacterias mediante 21 test bioquímicos miniaturizados.

Los aislados fueron sometidos a la prueba de susceptibilidad antimicrobiana Kirby Bauer donde se utilizaron los siguientes sensidiscos de antibióticos de uso humano y veterinario: amoxicilina/Ácido clavulánico, cefazolin, ceftriaxona, cefepime, ceftazidime, ceftiofur, cefoperazona, cefoxitin, imipenem, meropenem, cloranfenicol, amikacina, gentamicina, tetraciclina, enrofloxacin y sulfametoxazol/trimetoprim de acuerdo a los protocolos y puntos de corte determinados por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2022). El halo de inhibición de cada antibiótico fue medido para clasificar si la cepa bacteriana era sensible, medianamente resistente o resistente a dichos fármacos. Las cepas resistentes a más de dos clases de antibióticos serán consideradas como multirresistentes (Magiorakos *et al.*, 2012). Para evidenciar la producción de BLEE, se realizó la prueba de sinergismo de doble disco, que se forma debido a la inhibición que produce el ácido clavulánico sobre las betalactamasas (Jarlier *et al.*, 1988). Por otro lado, la producción de carbapenemasas fue confirmada utilizando la prueba NG-test® Carba 5 (Biotech).

Para los aislados de E-BLEE y/o carbapenemasas se realizó extracción de ADN total mediante la toma de una colonia bacteriana que se suspendió en 200µL de agua estéril en un microtubo de 1,5mL. Luego, se centrifugó por un minuto a 10.000 – 12.000 rpm, se descartó el sobrenadante y se adicionó 200µL del reactivo InstaGene™ Matrix (Bio-Rad Laboratories). Posteriormente, se incubó a 56°C por 30 minutos y se agitó a alta velocidad por 10 segundos. Los tubos fueron colocados en un termo-bloque a 100°C por 8 minutos, y se centrifugaron por 3 minutos a 10.000-12.000 rpm para finalmente guardar 50µL del sobrenadante (ADN) a -20°C. El secuenciamiento del genoma completo se realizó con la plataforma Illumina NextSeq en el centro de secuenciamiento SeqCenter, ubicado en Pittsburgh, Estados Unidos. El ensamble genómico se realizó en BV-BRC v3.26.4 mediante el ensamblador SPAdes v3.13.0. El secuencio tipo (muti-locus sequence typing, MLST), resistoma y replicones de plásmidos fueron identificados mediante MLST 2.0, ResFinder 4.1, PlasmidFinder 2.1, respectivamente, herramientas disponibles en Center of Genomic Epidemiology (<http://genomicepidemiology.org/>).

V. RESULTADOS

1. Origen y localización de las muestras

Se analizaron 154 muestras en total, 54 correspondientes al centro de rehabilitación (CRFS) Fundación Ñamku (CRFS Ñamku) y 100 correspondientes al CRFS Universidad de Concepción (CRFS UdeC). Las muestras correspondían a aves de 16 órdenes, 27 familias, constituyendo un total de 44 especies (Tabla 3, Apéndice).

Del total de muestras positivas a E-BLEE, 21 pertenecían al CRFS Ñamku (13,6% del total de muestras positivas), mientras que del CRFS UdeC solo una muestra fue positiva (0,6% del total de muestras positivas). La positividad respecto al total de muestras de ambos centros fue de 14,2% (Figura 1).

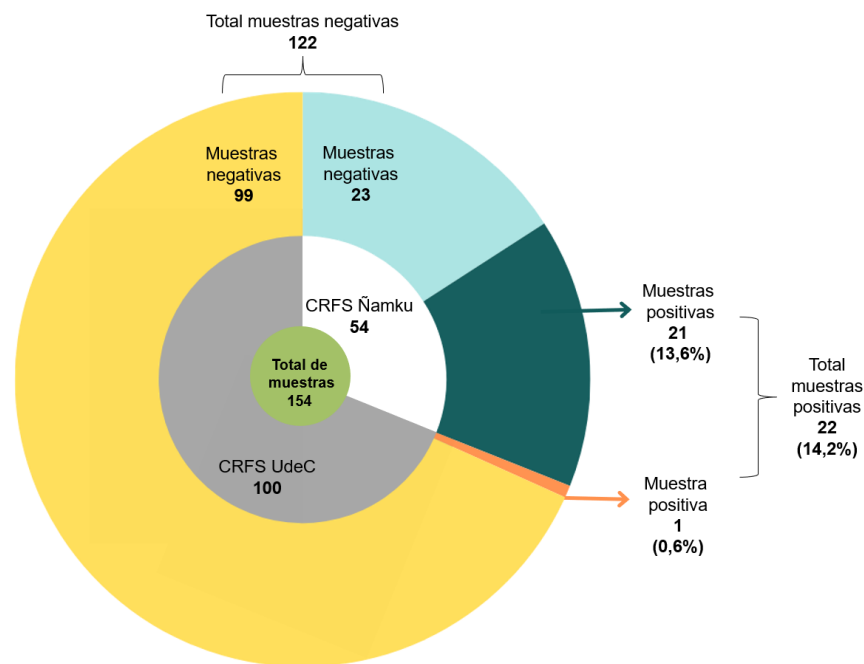


Figura 1. Muestras positivas y negativas provenientes de hisopados cloacales de aves silvestres analizadas en el presente estudio según centro de rehabilitación de origen. El total de muestras corresponden a 154 (verde), de las cuales 100 provienen del Centro de Rehabilitación de Fauna Silvestre Universidad de Concepción (CRFS UdeC) (gris), las que se dividen en 99 muestras negativas (amarillo) y 1 muestra positiva (naranja). Las otras 54 muestras provienen de Fundación Ñamku (CRFS Ñamku) (blanco), de las que 23 son negativas (celeste) y 21 positivas (esmeralda).

Los orígenes de las 22 aves positivas a E-BLEE correspondieron a Ñiquén (1), de la Región de Ñuble; y Viña del Mar (6), Valparaíso (5), Concón (6), San Antonio (1), Papudo (1), Quintero (1) y Casa Blanca (1), de la Región de Valparaíso (Figura 2).

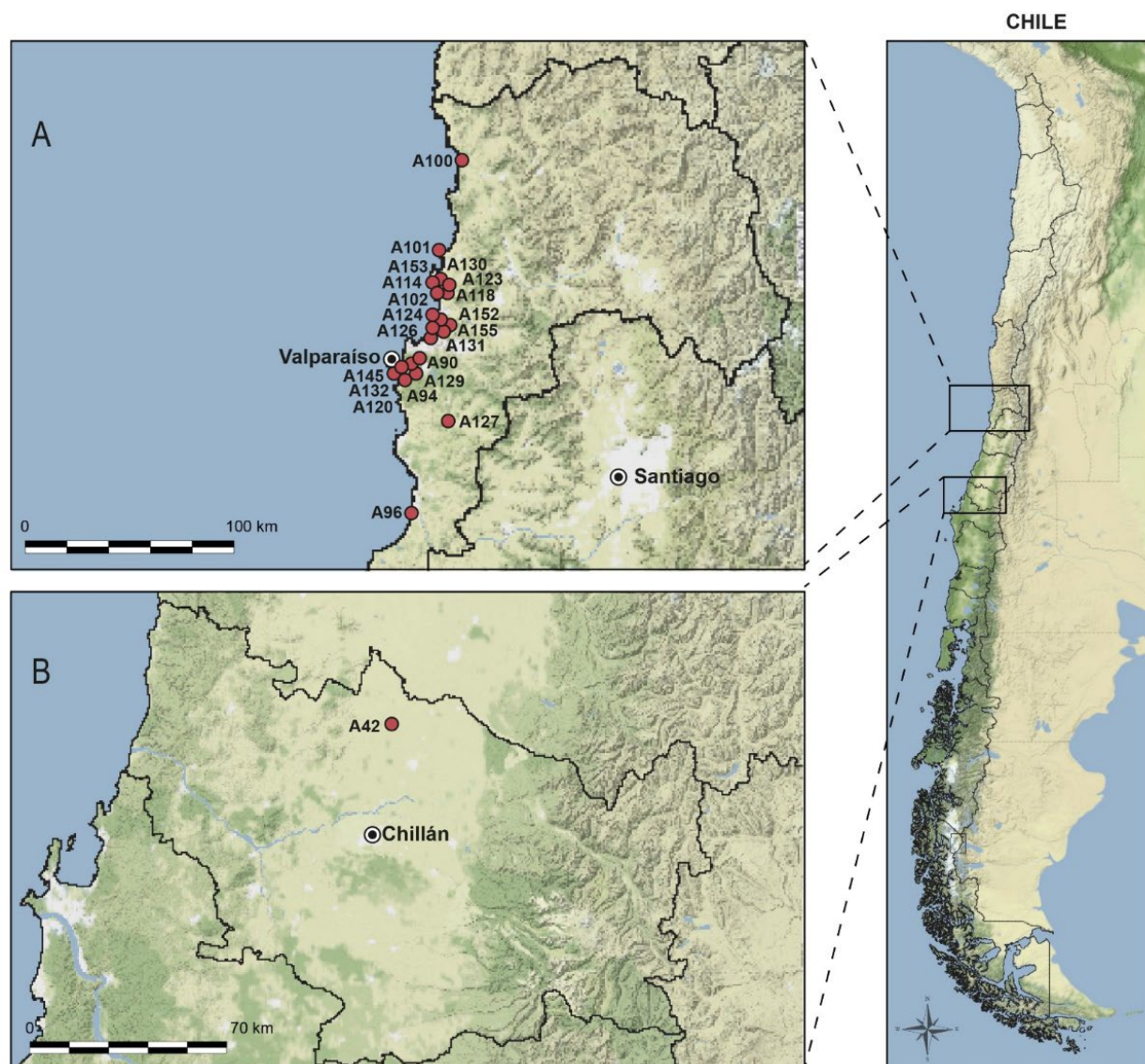


Figura 2. Mapa de Chile con la distribución geográfica del origen de las aves colonizadas del presente estudio por Enterobacteriales productores de betalactamasas de espectro extendido. A. distribución de las muestras provenientes de la Región de Valparaíso, B. muestra positiva de la Región de Ñuble.

Respecto a las especies de aves portadores de E-BLEE, *Larus dominicanus* obtuvo el mayor número de muestras positivas (17), *Pelecanus thagus* (1), *Leucacarbo bougainvillii* (1), *Falco peregrinus* (1), *Spheniscus magellanicus* (1), *Coragyps atratus* (1) (Figura 3).

2. Análisis fenotípico de Enterobacterales resistentes a cefalosporinas de tercera generación

Las Enterobacterales positivas al fenotipo de BLEE correspondieron a dos especies: *E. coli* (A124, A145, A118, A155, A153, A123, A90, A100, A152, A94, A129, A130, A132, A101, A120, A127, A96, A42, A131, A126, A102, A114) y *K. pneumoniae* (A102, A114) (Figura 3).

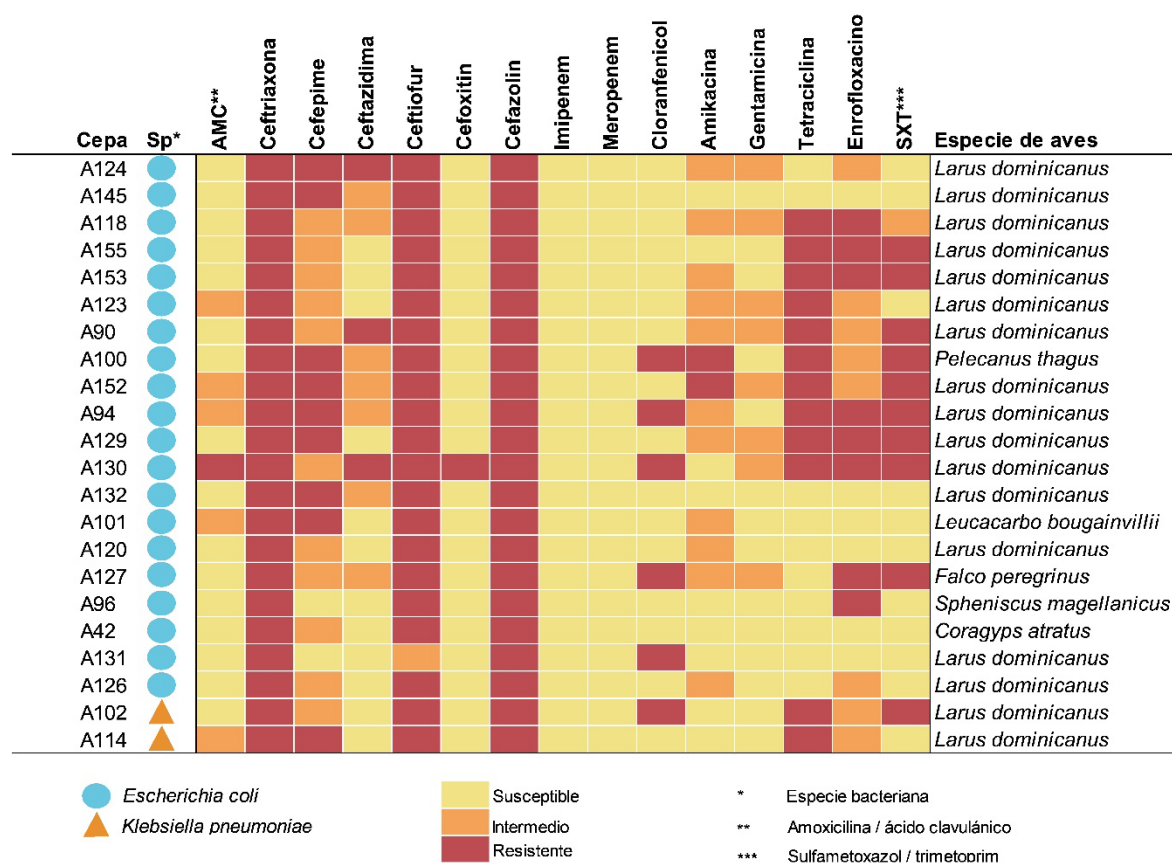


Figura 3. Susceptibilidad antimicrobiana de los Enterobacterales productores de betalactamasas de espectro extendido obtenidos de hisopados cloacales de aves silvestres del presente estudio frente a diferentes antimicrobianos de uso humano y veterinario.

El análisis fenotípico de los E-BLEE detectados en este estudio, evidencia la resistencia a cefalosporinas de hasta 4ª generación con excepción de los carbapenémicos. Además, las cepas fenotípicamente positivas a producción de BLEE presentaron resistencia a otras clases de antibióticos como fenicoles, aminoglucósidos, tetraciclinas, quinolonas, sulfadiazinas y trimetoprim. En este sentido, se refleja que 11 cepas son multirresistentes: A18 y A90 resistentes a 3 clases de antibióticos, A155, A153, A152, A129, A127, A102 resistentes a 4 clases de antibióticos y A100, A94, A130 resistentes a 5 clases de antibióticos (Figura 3).

3. Caracterización genómica de Enterobacterales productoras de betalactamasas de espectro extendido que colonizan aves silvestres admitidas en centros de rehabilitación

De las 20 cepas de *E. coli*, se identificaron 15 secuencias tipo: ST38 (2), ST58(1), ST69(1), ST131 (1), ST345 (1), ST540 (3), ST744 (3), ST1112 (1), ST2015 (1), ST2200 (1), ST2973 (1), ST5150 (1), ST7840 (1), ST10048 (1) y ST13045 (1). Por otra parte, las 2 cepas de la especie *K. pneumoniae* pertenecían a los secuencias tipo: ST469 y ST37 (Figura 4).

Los genes que codifican a BLEE fueron: *bla*_{CTX-M-1} (A120 y A42), *bla*_{CTX-M-2} (A114), *bla*_{CTX-M-8} (A123 y A131), *bla*_{CTX-M-15} (A124, A155, A90, A100, A152, A96 y A102), *bla*_{CTX-M-27} (A118, A153 y A130), *bla*_{CTX-M-30} (A101), *bla*_{CTX-M-32} (A145), *bla*_{CTX-M-55} (A132, A127 y A126), *bla*_{CTX-M-177} (A94 y A129). Además, se detectaron otro tipo de betalactamasas como *bla*_{OXA-10} (A114), *bla*_{TEM-1B} (A155, A123, A90, A100, A152, A94, A129, A130 y A126), *bla*_{TEM-116} (A96), *bla*_{SHV-11} (A102), *bla*_{SHV-40} (A114), *bla*_{SHV-56} (A114), *bla*_{SHV-70} (A102), *bla*_{CMY-2} (A130) (Figura 4).

Dentro del resistoma también se detectaron genes que confieren resistencia a otras clases de antibióticos como aminoglucósidos, quinolonas, macrólidos, sulfadiazinas, tetraciclinas, trimetoprima, anfenicol, fosfomicina y rifampicina, además de genes de resistencia a desinfectantes de uso doméstico y hospitalario (Figura 4).

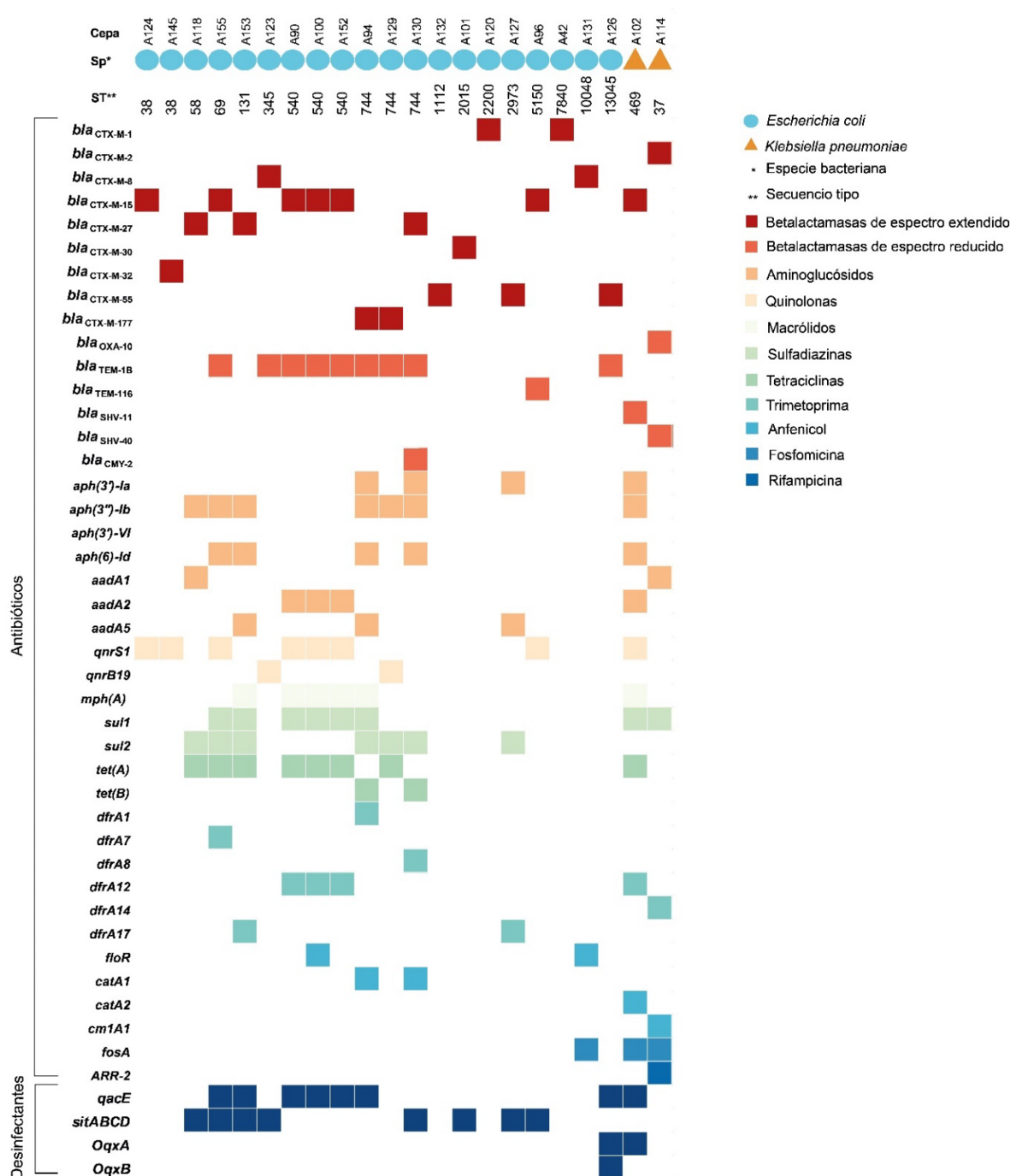


Figura 4. Resistoma de las Enterobacteriales productores de betalactamasas de espectro extendido aislados de aves provenientes del Centro de Rehabilitación de Fauna Silvestre Universidad de Concepción y Fundación Ñamku. Los cuadrados de colores indican la presencia de los genes según la clase de antibióticos betalactámicos y no betalactámicos (aminoglucósidos, quinolonas, macrólidos, sulfadiazinas, tetraciclinas, trimetoprima, fenicoles, fosfomicina y rifampicina) y desinfectantes a los que confieren resistencia.

VI. DISCUSIÓN

El presente estudio evaluó muestras cloacales colectadas al momento de ingreso a los CRFS, por lo que los aislados analizados fueron adquiridos por las aves en vida libre. La especie de ave *L. dominicanus* fue la que obtuvo más aislados positivos a BLEE en esta investigación. Aves de este género se han documentado como bioindicadores ambientales para evaluar la presencia de E-BLEE en otras partes del mundo (Literak et al., 2010; Cummins et al., 2020), además, se sugiere que la microbiota de las gaviotas otorga un ambiente favorable para la transmisión de resistencia a antibióticos entre especies bacterianas (Aires-de-Sousa et al., 2020).

Las especies bacterianas aisladas pertenecían a *E. coli* y *K. pneumoniae*, dichas especies se describen de como parte de la microbiota normal de aves silvestres (Cardoso et al., 2023). Naturalmente, *E. coli* debería expresar susceptibilidad a todos los antibióticos analizados, pues no tiene mecanismos intrínsecos que le confieran resistencia (Poirel et al., 2017). Para el caso de *K. pneumoniae*, está descrita la resistencia intrínseca a algunas cefalosporinas principalmente de primera generación mediante la producción de betalactamasas del tipo SHV (Bernardini et al., 2018).

El alto porcentaje de positividad a E-BLEE en las muestras colectadas del CRFS Ñamku frente a las muestras colectadas en el CRFS UdeC, puede ser explicado debido a la notoria cercanía a la costa de la Región de Valparaíso (Figura 2), sector geográfico en donde además desemboca al Océano Pacífico el Río Maipo que cruza ciudades altamente pobladas como Santiago. En este sentido, la Región de Valparaíso y la Región Metropolitana, son zonas de alto desarrollo comercial y con más polución ambiental debido al desarrollo de poblaciones humanas respecto al resto del país (Marín et al., 2017). Además, cabe destacar que los medios acuáticos pueden actuar como acumuladores de residuos hospitalarios, siendo potencial fuente de bacterias resistentes de importancia clínica (Hu et al., 2021; Esposito et al., 2023). Entonces, al igual como ha sido reportado en estudios anteriores (Allel et al., 2023; Angulo et al., 2023), podría existir una relación entre la densidad poblacional humana y la cantidad de aves colonizadas por E-BLEE. De esta forma, el bajo porcentaje de muestras positivas en la Región de Ñuble podría deberse a esto, ya que, posee 36,47 habitantes por Km², lo cual es

significativamente menor en comparación con las regiones ligadas a la mayor cantidad de muestras positivas; regiones de Valparaíso (110,74 habitantes por Km²) y Metropolitana (461,77 habitantes por Km²) (Biblioteca del Congreso Nacional de Chile 2017a; Biblioteca del Congreso Nacional de Chile, 2017b; Biblioteca del Congreso Nacional de Chile 2017c).

En este estudio no se detectaron Enterobacteriales productores de carbapenemasas, sin embargo, existen estudios recientes que lo describen en aves silvestres de Chile (Ahlstrom et al., 2022), por lo que no se pudo descartar que este tipo de resistencia está circulando en especies silvestres de Chile.

De los secuencio tipos detectados destacan: ST38, ST58, ST69 y ST131 clasificados como patógenos de importancia clínica en humanos (Manges et al., 2019). El linaje patogénico ST38 está asociado generalmente a la producción de BLEE y se ha descrito en humanos, fauna doméstica y silvestre alrededor del mundo (Schaufler et al., 2018; Fonseca et al., 2022). *E. coli* ST58 es considerado un patógeno emergente a nivel global, que causa principalmente infecciones del tracto urinario y septicemia en humanos; además, se reporta en animales de ganado enfermos y sanos, cursos de agua y animales silvestres (McKinnon et al., 2018; Reid et al., 2022). *E. coli* ST131 es un linaje pandémico de alto riesgo en la salud humana, ya que, es uno de los principales causantes de infecciones urinarias y del sistema circulatorio en el mundo (Day et al., 2019; Wang et al., 2021; Lindblom et al., 2022), mientras que fuera del ambiente clínico se ha descrito en torrentes de agua cercanas a sitios urbanos (Biggel et al., 2023), animales de compañía (Li et al., 2021) y fauna silvestre (Ewbank et al., 2022).

Los demás secuencio tipos de *E. coli* que se detectaron en este estudio y se han descrito en la literatura portando resistencia a betalactámicos mediante producción de BLEE son: ST540 de una muestra de orina de humano (Bharathi y Rajamohan 2022), ST744 de humanos, animales de abasto y fauna silvestre (Guenther et al., 2012; Nicolas-Chanoine et al., 2013; Haenni et al., 2018), ST345 de muestras de carne de aves (Casella et al., 2017), ST2973 en una muestra de un paciente humano (Mhaya et al., 2022).

K. pneumoniae ST37 se describe en infecciones intrahospitalarias en hospitales humanos (Yang et al., 2013; Li et al., 2017) y se ha detectado produciendo BLEE en pandas gigantes cautivos (Su et al., 2022). Por otra parte, el ST469 de *K. pneumoniae* se reporta en aislados de infecciones urinarias en humanos (Lee et al., 2021).

El análisis de genes de resistencia de los genomas de las cepas en este estudio revela que las betalactamasas del tipo CTX-M-15 son las más registradas en los resistomas de los Enterobacteriales aislados de aves silvestres ingresadas al Centro de Rehabilitación de Fauna silvestre Universidad de Concepción, y Fundación Ñamku, Región de Valparaíso. Respecto a este grupo de enzimas, se describe que existe una diseminación a nivel mundial (especialmente de CTX-M-15), incluso se describen con gran frecuencia en humanos en países de Europa y Latino América (Wilson y Török, 2018). En el caso de los registros de BLEE o carbapenemasas producidas por Enterobacteriales aislados de fauna silvestre de Chile (Tabla 2) se documentan principalmente enzimas CTX-M, lo que concuerda con los resultados de este estudio.

También fueron detectadas otras betalactamasas que no confieren resistencia a cefalosporinas de tercera generación (Ma et al., 2022), por lo que no se clasifican como betalactamasas de espectro extendido; estas betalactamasas fueron las siguientes: OXA, TEM, SHV y CMY, las que generalmente se encuentran de manera intrínseca en el genoma bacteriano o pueden ser adquiridos mediante elementos genéticos móviles (Wilson y Török, 2018).

Los aislados presentan además genes que otorgan resistencia a desinfectantes, principalmente amonio cuaternario. Genes de este tipo se han reportado en los mismos plásmidos en donde se encuentran genes que otorgan resistencia a antibióticos (Pal et al., 2015), por lo que se sugiere que las bacterias que portan mecanismos de resistencia a antibióticos es probable que contengan genes de resistencia a desinfectantes y de esta forma lograr una mejor adaptación a los ambientes antrópicos.

Tabla 2. Enterobacterales productores de betalactamasas de espectro extendido o carbapenemasas detectadas en fauna silvestre de Chile.

Hospedero	Especie bacteriana	Enzima BLEE o carbapenemasa	Región de Chile	Referencia
Gaviota de Franklin (<i>Leucophaeus pipixcan</i>)	<i>Escherichia coli</i>	Grupo CTX-M-1, grupo CTX-M-2, grupo CTX-M-9, SHV-tipo	Valparaíso, Biobío	Hernández et al., 2013
Gaviota de Franklin (<i>L. pipixcan</i>)	<i>Escherichia coli</i>	CTX-M-2, CTX-M-15, CTX-M-22	Antofagasta	Báez et al., 2015
Tucúquere (<i>Bubo magellanicus</i>), Concon (<i>Strix rufipes</i>)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella enterica</i> serovar Infantis	CTX-M-8, CTX-M-65	Ñuble, Biobío	Fuentes-Castillo et al., 2019
Cóndor andino (<i>Vultur gryphus</i>)	<i>Escherichia coli</i>	CTX-M-14, CTX-M-55, CTX-M-65	Maule, Metropolitana	Fuentes-Castillo et al., 2020
Degu (<i>Octodon degus</i>)	<i>Escherichia coli</i>	Grupo CTX-M-1	Metropolitana	Benavides et al., 2021
Gaviota de Franklin (<i>L. pipixcan</i>)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2, OXA-2, CTX-M-15, NDM-5, OXA-9, SHV-110	Valparaíso	Ahlstrom et al., 2022
Cóndor andino (<i>Vultur gryphus</i>)	<i>Escherichia coli</i>	NDM-5, CTX-M-177, OXA-2, OXA-9, SHV-12	Metropolitana	Fuentes-Castillo et al., 2022
Rata marrón (<i>Rattus norvegicus</i>)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Citrobacter freundii</i>	CTX-M-15, CTX-M-32, OXA-1, CMY-48	Biobío	Moreno et al., 2022
Gaviota de Franklin (<i>L. pipixcan</i>), Gaviota cahuil (<i>Chroicocephalus maculipennis</i>)	<i>Escherichia coli</i>	CTX-M-1, CTX-M-55	Los Lagos	Fuentes-Castillo et al., 2023
Degu (<i>Octodon degus</i>)	<i>Escherichia coli</i>	CTX-M-15	Metropolitana	Hayer et al., 2023

Los resultados otorgan antecedentes respecto a los plásmidos que portan las cepas en estudio, sin embargo, el método utilizado para secuenciar (Illumina, short reads) no permite ensamblar completamente el ADN plasmidial para comprobar su total contenido. Aun así, antecedentes previos demuestran que el linaje de plásmidos Col, está generalmente relacionado a la presencia de factores de virulencia, pero durante los últimos años algunos se han detectado portando genes de resistencia a algunas clases de antibióticos (Ares-Arroyo et al, 2021; Cummins et al., 2022; Rodrigues et al., 2023). Los plásmidos del grupo IncF son capaces de portar genes de resistencia a diversas clases de antibióticos como betalactámicos, quinolonas, aminoglucósidos, tetraciclicas y cloranfenicol (Yang et al., 2015). Además, este grupo de plásmidos se ha asociado al aumento de la distribución mundial de CTX-M-15 (Haenni et al., 2018). Respecto al plásmido p011, también se ha visto implicado en el transporte de resistencia a betalactámicos mediante genes de la familia CTX-M (Leão et al., 2021).

Las aves silvestres analizadas en este estudio provenían de la vida silvestre en consecuencia no deberían estar expuestas a la presión selectiva generada por los antibióticos, por lo tanto, los individuos estudiados no deberían ser portadores de E-BLEE. Estos resultados evidencian una problemática que debe ser atendida desde el enfoque One Health, ya que, es probable que estas bacterias resistentes provengan de humanos y mediante los desechos pasan a circular al medio ambiente de donde adquiere resistencia bacteriana la fauna silvestre de nuestro país.

VII. CONCLUSIONES

1. Se detectaron 22 cepas de Enterobacteriales productores de beta-lactamasas de espectro extendido en aves silvestres provenientes de la región de Valparaíso y Ñuble, mas no hubo cepas positivas a producción de carbapenemasas. La caracterización genómica detectó 9 variantes de la enzima CTX-M en 17 linajes diferentes de Enterobacteriales.
2. El análisis de los aislados productores de beta-lactamasas de espectro extendido evidencia la resistencia a cefalosporinas de hasta 4^a generación. Además, 11 de los aislados fueron clasificados como multirresistentes.
3. La caracterización genómica de los aislados positivos a producción de beta-lactamasas de espectro extendido, demostró 15 secuencia tipos de *E. coli* y 2 de *K. pneumoniae*. Además, se detectó un amplio resistoma con genes que confieren resistencia a otros antibióticos y desinfectantes. El gen de betalactamasa de espectro extendido más detectado fue *bla*_{CTX-M-15}. Finalmente, los plásmidos descritos en este estudio se asocian a portar genes de resistencia a antibióticos.
4. Según el origen de las muestras, se concluye que la adquisición de esta resistencia fue del medio ambiente en el que habitan estas aves silvestres, lo que está posiblemente relacionado con el nivel de polución ambiental que existe en medio el medio en el que se desarrollan.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahlstrom, C. A., Woksepp, H., Sandegren, L., Mohsin, M., Hasan, B., Muzyka, D., Hernandez, J., Aguirre, F., Tok, A., Söderman, J., Olsen, B., Ramey, A. M., y Bonnedahl, J. (2022). Genomically diverse carbapenem resistant Enterobacteriaceae from wild birds provide insight into global patterns of spatiotemporal dissemination. *Science of the total environment*, 824, 153632. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153632>
2. Aires-de-Sousa, M., Fournier, C., Lopes, E., de Lencastre, H., Nordmann, P., y Poirel, L. (2020). High colonization rate and heterogeneity of ESBL- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae isolated from gull feces in Lisbon, Portugal. *Microorganisms*, 8(10), 1487. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101487>
3. Allel, K., Day, L., Hamilton, A., Lin, L., Furuya-Kanamori, L., Moore, C. E., Van Boeckel, T., Laxminarayan, R., y Yakob, L. (2023). Global antimicrobial-resistance drivers: an ecological country-level study at the human-animal interface. *The Lancet Planetary health*, 7(4), 291–303. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(23\)00026-8](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(23)00026-8)
4. Angulo, A. S., Fajardo, F. E., Salom-Pérez, R., Carazo-Salazar, J., Taylor, F., Pilé, E., Quesada-Alvarado, F., y Blanco-Peña, K. (2023). Identification of anthropogenic impact on natural habitats by antimicrobial resistance quantification in two neotropical wild cats and their geospatial analysis. *Journal of wildlife diseases*, 59(1), 12–23. <https://doi.org/10.7589/JWD-D-21-00182>
5. Ares-Arroyo, M., Rocha, E. P. C., y Gonzalez-Zorn, B. (2021). Evolution of ColE1-like plasmids across γ -Proteobacteria: From bacteriocin production to antimicrobial resistance. *PLoS genetics*, 17(11), 1009919. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009919>
6. Aslam, B., Khurshid, M., Arshad, M. I., Muzammil, S., Rasool, M., Yasmeen, N., Shah, T., Chaudhry, T. H., Rasool, M. H., Shahid, A., Xueshan, X., y Baloch, Z. (2021). Antibiotic resistance: one health one world outlook. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 771510. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.771510>
7. Báez, J., Hernández-García, M., Guamparito, C., Díaz, S., Olave, A., Guerrero, K., Cantón, R., Baquero, F., Gahona, J., Valenzuela, N., Del Campo, R., y Silva, J. (2015). Molecular characterization and genetic diversity of ESBL-producing Escherichia coli

- colonizing the migratory Franklin's gulls (*Leucophaeus pipixcan*) in Antofagasta, North of Chile. *Microbial drug resistance*, 21(1), 111–116. <https://doi.org/10.1089/mdr.2014.0158>
8. Benavides, J. A., Salgado-Caxito, M., Opazo-Capurro, A., González Muñoz, P., Piñeiro, A., Otto Medina, M., Rivas, L., Munita, J., y Millán, J. (2021). ESBL-producing *Escherichia coli* carrying CTX-M genes circulating among livestock, dogs, and wild mammals in small-scale farms of central Chile. *Antibiotics*, 10(5), 510. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050510>
 9. Bernardini, A., Cuesta, T., Tomás, A., Bengoechea, J. A., Martínez, J. L., y Sánchez, M. B. (2019). The intrinsic resistome of *Klebsiella pneumoniae*. *International journal of antimicrobial agents*, 53(1), 29–33. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.09.012>
 10. Bharathi, S. V., y Rajamohan, G. (2022). Biocide-resistant *Escherichia coli* ST540 co-harboring ESBL, *dfra14* confers *qnrS*-dependent plasmid-mediated quinolone resistance. *Antibiotics*, 11(12), 1724. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11121724>
 11. Biblioteca del Congreso Nacional de Chile. (2017). *Región de Ñuble*. <https://www.bcn.cl/siit/nuestropais/region16#:~:text=Seg%C3%BAn%20el%20Censo%202017%20la,47%20habitantes%20por%20kil%C3%B3metro%20cuadrado.>
 12. Biblioteca del Congreso Nacional de Chile. (2017). *Región de Valparaíso*. <https://www.bcn.cl/siit/nuestropais/nuestropais/region5/>
 13. Biblioteca del Congreso Nacional de Chile. (2017). *Región Metropolitana*. <https://www.bcn.cl/siit/nuestropais/nuestropais/region13/>
 14. Biggel, M., Hoehn, S., Frei, A., Dassler, K., Jans, C., y Stephan, R. (2023). Dissemination of ESBL-producing *E. coli* ST131 through wastewater and environmental water in Switzerland. *Environmental pollution*, 337, 122476. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122476>
 15. Brinkac, L., Voorhies, A., Gomez, A., y Nelson, K. E. (2017). The threat of antimicrobial resistance on the human microbiome. *Microbial ecology*, 74(4), 1001–1008. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-0985-z>
 16. Bonnedahl, J., y Järhult, J. D. (2014). Antibiotic resistance in wild birds. *Upsala journal of medical sciences*, 119(2), 113–116. <https://doi.org/10.3109/03009734.2014.905663>

17. Bonnet R. (2004). Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(1), 1-14. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.1.1-14.2004>
18. Capita, R., y Alonso-Calleja, C. (2013). Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Critical reviews in food science and nutrition*, 53(1), 11–48. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.519837>
19. Cardoso, M. D., Gonçalves, V. D., Graef, A. S., Pedrosa, V. M., Pires, J. R., Travassos, C. E. P. F., Domit, C., Vieira-Da-Motta, O., Dos Prazeres Rodrigues, D., y Siciliano, S. (2023). Detection of Escherichia coli and other Enterobacteriales members in seabirds sampled along the Brazilian coast. *Preventive veterinary medicine*, 218, 105978. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2023.105978>
20. Casella, T., Cerdeira, L. T., Fernandes, M. R., Souza, T. A., Haenni, M., Madec, J. Y., Lincopan, N., y Nogueira, M. C. L. (2017). Draft genome sequence of a CTX-M-15-producing Escherichia coli ST345 from commercial chicken meat in Brazil. *Journal of global antimicrobial resistance*, 9, 124–125. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.04.002>
21. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. (32th ed.) CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2022.
22. Cummins, M. L., Reid, C. J., y Djordjevic, S. P. (2022). F plasmid lineages in Escherichia coli ST95: implications for host range, antibiotic resistance and zoonoses. *mSystems*, 7(1), 0121221. <https://doi.org/10.1128/msystems.01212-21>
23. Cummins, M. L., Sanderson-Smith, M., Newton, P., Carlile, N., Phalen, D. N., Maute, K., Monahan, L. G., Hoye, B. J., y Djordjevic, S. P. (2020). Whole-genome sequence analysis of an extensively drug-resistant Salmonella enterica serovar Agona isolate from an Australian silver gull (Chroicocephalus novaehollandiae) reveals the acquisition of multidrug resistance plasmids. *mSphere*, 5(6), 00743-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00743-20>
24. Day, M. J., Hopkins, K. L., Wareham, D. W., Toleman, M. A., Elviss, N., Randall, L., Teale, C., Cleary, P., Wiuff, C., Doumith, M., Ellington, M. J., Woodford, N., y Livermore, D. M. (2019). Extended-spectrum β -lactamase-producing Escherichia coli in human-derived and foodchain-derived samples from England, Wales, and

- Scotland: an epidemiological surveillance and typing study. *The Lancet Infectious diseases*, 19(12), 1325–1335. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30273-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30273-7)
25. Esposito, F., Cardoso, B., Sellera, F. P., Sano, E., Fuentes-Castillo, D., Fontana, H., Fuga, B., Moura, Q., Sato, M. I. Z., Brandão, C. J., y Lincopan, N. (2023). Expansion of healthcare-associated hypervirulent KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11/KL64 beyond hospital settings. *One health*, 17, 100594. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2023.100594>
26. Ewbank, A. C., Esperón, F., Sacristán, C., Sacristán, I., Neves, E., Costa-Silva, S., Antonelli, M., Rocha Lorenço, J., Kolesnikovas, C. K. M., y Catão-Dias, J. L. (2021). Occurrence and quantification of antimicrobial resistance genes in the gastrointestinal microbiome of two wild seabird species with contrasting behaviors. *Frontiers in veterinary science*, 8, 651781. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.651781>
27. Ewbank, A. C., Fuentes-Castillo, D., Sacristán, C., Cardoso, B., Esposito, F., Fuga, B., de Macedo, E. C., Lincopan, N., y Catão-Dias, J. L. (2022). Extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* survey in wild seabirds at a pristine atoll in the southern Atlantic Ocean, Brazil: First report of the O25b-ST131 clone harboring blaCTX-M-8. *Science of the total environment*, 806(Pt 2), 150539. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150539>
28. Ferri, M., Ranucci, E., Romagnoli, P., y Giaccone, V. (2017). Antimicrobial resistance: a global emerging threat to public health systems. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(13), 2857–2876. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1077192>
29. Fonseca, E. L., Morgado, S. M., Caldart, R. V., y Vicente, A. C. (2022). Global genomic epidemiology of *Escherichia coli* (ExPEC) ST38 lineage revealed a virulome associated with human infections. *Microorganisms*, 10(12), 2482. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122482>
30. Fuentes-Castillo, D., Fuga, B., Fontana, H., Cardoso, B., Esposito, F., Castro-Tardón, D., Barraza, J., Sano, E., Parragué-Migone, C., Robbiano, S., González-Acuña, D., Catão-Diaz, J. y Lincopan, N. (2022). *Escherichia coli* resistente a carbapenémicos volando en los Andes. Trabajo presentado en el XLIV Congreso Chileno de Microbiología. 10.13140/RG.2.2.34567.68007

31. Fuentes-Castillo, D., Castro-Tardón, D., Esposito, F., Neves, I., Rodrigues, L., Fontana, H., Fuga, B., Catão-Dias, J. L., y Lincopan, N. (2023). Genomic evidences of gulls as reservoirs of critical priority CTX-M-producing *Escherichia coli* in Corcovado Gulf, Patagonia. *Science of the total environment*, 874, 162564. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162564>
32. Fuentes-Castillo, D., Esposito, F., Cardoso, B., Dalazen, G., Moura, Q., Fuga, B., Fontana, H., Cerdeira, L., Dropa, M., Rottmann, J., González-Acuña, D., Catão-Dias, J. L., y Lincopan, N. (2020). Genomic data reveal international lineages of critical priority *Escherichia coli* harbouring wide resistome in Andean condors (*Vultur gryphus* Linnaeus, 1758). *Molecular ecology*, 29(10), 1919–1935. <https://doi.org/10.1111/mec.15455>
33. Fuentes-Castillo, D., Farfán-López, M., Esposito, F., Moura, Q., Fernandes, M. R., Lopes, R., Cardoso, B., Muñoz, M. E., Cerdeira, L., Najle, I., Muñoz, P. M., Catão-Dias, J. L., González-Acuña, D., y Lincopan, N. (2019). Wild owls colonized by international clones of extended-spectrum β -lactamase (CTX-M)-producing *Escherichia coli* and *Salmonella* *Infantis* in the Southern Cone of America. *Science of the total environment*, 674, 554–562. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.149>
34. Guenther, S., Aschenbrenner, K., Stamm, I., Bethe, A., Semmler, T., Stubbe, A., Stubbe, M., Batsajkhan, N., Glupczynski, Y., Wieler, L. H., y Ewers, C. (2012). Comparable high rates of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in birds of prey from Germany and Mongolia. *PloS one*, 7(12), 53039. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053039>
35. Guzmán-Blanco, M., Labarca, J. A., Villegas, M. V., Gotuzzo, E., y Latin America Working Group on Bacterial Resistance (2014). Extended spectrum β -lactamase producers among nosocomial Enterobacteriaceae in Latin America. *Brazilian journal of infectious diseases*, 18(4), 421–433. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2013.10.005>
36. Haenni, M., Beyrouthy, R., Lupo, A., Châtre, P., Madec, J. Y., y Bonnet, R. (2018). Epidemic spread of *Escherichia coli* ST744 isolates carrying *mcr-3* and *bla*CTX-M-55 in cattle in France. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 73(2), 533–536. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx418>

37. Hayer, J., Salgado-Caxito, M., Opazo-Capurro, A., Muñoz, P. G., Millán, J., Piñeiro, A., Munita, J. M., Rivas, L., y Benavides, J. A. (2023). Multiple clonal transmissions of clinically relevant extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* among livestock, dogs, and wildlife in Chile. *Journal of global antimicrobial resistance*, 34, 247–252. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2023.07.009>
38. Hernandez, J., Johansson, A., Stedt, J., Bengtsson, S., Porczak, A., Granholm, S., González-Acuña, D., Olsen, B., Bonnedahl, J., y Drobni, M. (2013). Characterization and comparison of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) resistance genotypes and population structure of *Escherichia coli* isolated from Franklin's gulls (*Leucophaeus pipixcan*) and humans in Chile. *PloS one*, 8(9), 76150. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076150>
39. Hernando-Amado, S., Coque, T. M., Baquero, F., y Martínez, J. L. (2019). Defining and combating antibiotic resistance from one health and global health perspectives. *Nature microbiology*, 4(9), 1432–1442. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0503-9>
40. Hu, Z., Chen, W., Guo, G., Dong, C., Shen, Y., Qin, S., Chen, L., y Zhang, W. (2021). An *Escherichia coli* isolate from hospital sewage carries bla_{NDM-1} and bla_{OXA-10}. *Archives of microbiology*, 203(7), 4427–4432. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02431-2>
41. Hutchings, M. I., Truman, A. W., y Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current opinion in microbiology*, 51, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>
42. Iovleva, A., y Doi, Y. (2017). Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Clinics in laboratory medicine*, 37(2), 303–315. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2017.01.005>
43. Jarlier, V., Nicolas, M. H., Fournier, G., y Philippon, A. (1988). Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Reviews of infectious diseases*, 10(4), 867–878. <https://doi.org/10.1093/clinids/10.4.867>
44. Knothe, H., Shah, P., Krcmery, V., Antal, M., y Mitsuhashi, S. (1983). Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of

- Klebsiella pneumoniae and Serratia marcescens. *Infection*, 11(6), 315–317. <https://doi.org/10.1007/BF01641355>
45. Kopotsa, K., Osei Sekyere, J., y Mbelle, N. M. (2019). Plasmid evolution in carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a review. *The New York Academy of Sciences*, 1457(1), 61–91. <https://doi.org/10.1111/nyas.14223>
 46. Laborda, P., Sanz-García, F., Ochoa-Sánchez, L. E., Gil-Gil, T., Hernando-Amado, S., y Martínez, J. L. (2022). Wildlife and antibiotic resistance. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 12, 873989. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.873989>
 47. Leão, C., Clemente, L., Guerra, V., Botelho, A., y Amaro, A. (2021). Occurrence of a rare multidrug resistant Escherichia coli coharboring bla_{CTX-M-32} and bla_{CTX-M-2} genes in a bovine. *Microbial drug resistance*, 27(8), 1155–1157. <https://doi.org/10.1089/mdr.2020.0520>
 48. Li, D., Wyrsh, E. R., Elankumaran, P., Dolejska, M., Marena, M. S., Browning, G. F., Bushell, R. N., McKinnon, J., Chowdhury, P. R., Hitchick, N., Miller, N., Donner, E., Drigo, B., Baker, D., Charles, I. G., Kudinha, T., Jarocki, V. M., y Djordjevic, S. P. (2021). Genomic comparisons of Escherichia coli ST131 from Australia. *Microbial genomics*, 7(12), 000721. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000721>
 49. Li, P., Wang, M., Li, X., Hu, F., Yang, M., Xie, Y., Cao, W., Xia, X., Zheng, R., Tian, J., Zhang, K., Chen, F., y Tang, A. (2017). ST37 Klebsiella pneumoniae: development of carbapenem resistance in vivo during antimicrobial therapy in neonates. *Future microbiology*, 12, 891–904. <https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0165>
 50. Lindblom, A., Kizakiewicz, C., Kristiansson, E., Yazdanshenas, S., Kamenska, N., Karami, N., y Åhrén, C. (2022). The impact of the ST131 clone on recurrent ESBL-producing E. coli urinary tract infection: a prospective comparative study. *Scientific reports*, 12(1), 10048. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14177-y>
 51. Literak, I., Dolejska, M., Janoszowska, D., Hrusakova, J., Meissner, W., Rzycka, H., Bzoma, S., y Cizek, A. (2010). Antibiotic-resistant Escherichia coli bacteria, including strains with genes encoding the extended-spectrum beta-lactamase and QnrS, in waterbirds on the Baltic Sea Coast of Poland. *Applied and environmental microbiology*, 76(24), 8126–8134. <https://doi.org/10.1128/AEM.01446-10>

52. Lutgring, J. D. (2019). Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: An emerging bacterial threat. *Seminars in diagnostic pathology*, 36(3), 182–186. <https://doi.org/10.1053/j.semdp.2019.04.011>
53. Ma, X., Lv, X., Feng, S., Liu, R., Fu, H., Gao, F., y Xu, H. (2022). Genetic Characterization of an ST5571 Hypervirulent Klebsiella pneumoniae Strain Co-Producing NDM-1, MCR-1, and OXA-10 Causing Bacteremia. *Infection and drug resistance*, 15, 2293–2299. <https://doi.org/10.2147/IDR.S360715>
54. Madec, J. Y., Haenni, M., Nordmann, P., y Poirel, L. (2017). Extended-spectrum β -lactamase/AmpC- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in animals: a threat for humans? *Clinical microbiology and infection*, 23(11), 826–833. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.01.013>
55. Mancuso, G., Midiri, A., Gerace, E., y Biondo, C. (2021). Bacterial antibiotic resistance: the most critical pathogens. *Pathogens*, 10(10), 1310. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101310>
56. Manges, A. R., Geum, H. M., Guo, A., Edens, T. J., Fibke, C. D., y Pitout, J. D. D. (2019). Global extraintestinal pathogenic Escherichia coli (ExPEC) lineages. *Clinical microbiology reviews*, 32(3), e00135-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00135-18>
57. Marín, JC., Raga, GB., Arévalo, J., Baumgardner, D., Córdova, AM., Pozo, D. y Sorribas, M. (2017). Propiedades de la contaminación por partículas en la ciudad portuaria de Valparaíso, Chile. *Medio ambiente atmosférico*, 171, 301-316.
58. McKinnon, J., Roy Chowdhury, P., y Djordjevic, S. P. (2018). Genomic analysis of multidrug-resistant Escherichia coli ST58 causing urosepsis. *International journal of antimicrobial agents*, 52(3), 430–435. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.06.017>
59. Mhaya, A., Trabelsi, R., Aillerie, S., M'Zali, F., Bégu, D., Tounsi, S., Gdoura, R., y Arpin, C. (2022). Detection of clones B2-ST131-C2 and A-ST617 in Escherichia coli producing both CTX-M-15 and CTX-M-27 from tunisian community patients. *Antibiotics*, 11(10), 1329. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101329>
60. Moreno, L., Sepúlveda, V., Riquelme, F., Salvo, J., Jara, S., Reyes, C., Abufarhue, K., Zabala, A. y Fuentes-Castillo, D. (2022). *Rattus norvegicus* colonizados por enterobacterales productores de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) en

una zona urbana de Talcahuano. Trabajo presentado en V Conferencia Bienal de la Wildlife Disease Association Sección Latinoamericana. 10.13140/RG.2.2.28276.22403/1

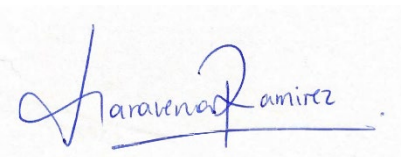
61. Morrison, L., y Zembower, T. R. (2020). Antimicrobial Resistance. *Gastrointestinal endoscopy clinics of North America*, 30(4), 619–635. <https://doi.org/10.1016/j.giec.2020.06.004>
62. Nicolas-Chanoine, M. H., Gruson, C., Bialek-Davenet, S., Bertrand, X., Thomas-Jean, F., Bert, F., Moyat, M., Meiller, E., Marcon, E., Danchin, N., Noussair, L., Moreau, R., y Leflon-Guibout, V. (2013). 10-Fold increase (2006-11) in the rate of healthy subjects with extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* faecal carriage in a Parisian check-up centre. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 68(3), 562–568. <https://doi.org/10.1093/jac/dks429>
63. Nordmann, P., Dortet, L., y Poirel, L. (2012). Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends in molecular medicine*, 18(5), 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.03.003>
64. Pal, C., Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E., y Larsson, D. G. (2015). Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. *BMC genomics*, 16, 964. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2153-5>
65. Paterson, D. L., y Bonomo, R. A. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clinical microbiology reviews*, 18(4), 657–686. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657-686.2005>
66. Pavez, M., Troncoso, C., Osses, I., Salazar, R., Illesca, V., Reydet, P., Rodríguez, C., Chahin, C., Concha, C., y Barrientos, L. (2019). High prevalence of CTX-M-1 group in ESBL-producing Enterobacteriaceae infection in intensive care units in southern Chile. *Brazilian journal of infectious diseases*, 23(2), 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2019.03.002>
67. Poirel, L., Madec, J. Y., Lupo, A., Schink, A. K., Kieffer, N., Nordmann, P., y Schwarz, S. (2018). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology spectrum*, 6(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017>

68. Prandi, I., Bellato, A., Nebbia, P., Stella, M. C., Ala, U., von Degerfeld, M. M., Quaranta, G., y Robino, P. (2023). Antibiotic resistant *Escherichia coli* in wild birds hospitalised in a wildlife rescue centre. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 93, 101945. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2023.101945>
69. Projan, S. J., y Shlaes, D. M. (2004). Antibacterial drug discovery: is it all downhill from here?. *Clinical microbiology and infection*, 10 Suppl 4, 18–22. <https://doi.org/10.1111/j.1465-0691.2004.1006.x>
70. Reid, C. J., Cummins, M. L., Börjesson, S., Brouwer, M. S. M., Hasman, H., Hammerum, A. M., Roer, L., Hess, S., Berendonk, T., Nešporová, K., Haenni, M., Madec, J. Y., Bethe, A., Michael, G. B., Schink, A. K., Schwarz, S., Dolejska, M., y Djordjevic, S. P. (2022). A role for ColV plasmids in the evolution of pathogenic *Escherichia coli* ST58. *Nature communications*, 13(1), 683. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28342-4>
71. Rice L. B. (2009). The clinical consequences of antimicrobial resistance. *Current opinion in microbiology*, 12(5), 476–481. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.08.001>
72. Rodrigues, C., Lanza, V. F., Peixe, L., Coque, T. M., y Novais, Â. (2023). Phylogenomics of globally spread clonal groups 14 and 15 of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology spectrum*, 11(3), e0339522. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03395-22>
73. Sanz Herrero F. (2022). Ceftazidime-avibactam. *Revista española de quimioterapia*, 35(Suppl 1), 40–42. <https://doi.org/10.37201/req/s01.09.2022>
74. Schaufler, K., Nowak, K., Düx, A., Semmler, T., Villa, L., Kourouma, L., Bangoura, K., Wieler, L. H., Leendertz, F. H., y Guenther, S. (2018). Clinically relevant ESBL-Producing *K. pneumoniae* ST307 and *E. coli* ST38 in an urban west african rat population. *Frontiers in microbiology*, 9, 150. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00150>
75. Su, X., Yan, X., Li, Y., Zhang, D., Li, L., Geng, Y., Su, F., Yue, C., Hou, R., y Liu, S. (2022). Identification of extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M)-producing *Klebsiella pneumoniae* belonging to ST37, ST290, and ST2640 in captive giant pandas. *BMC veterinary research*, 18(1), 186. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03276-7>

76. Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outterson, K., Patel, J., Cavalieri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Singh, N., Theuretzbacher, U., ... WHO Pathogens Priority List Working Group (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious diseases*, 18(3), 318–327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)
77. Vallejo, A., Muniesa, A., Ferreira, C., y de Blas, I. (2013). New method to estimate the sample size for calculation of a proportion assuming binomial distribution. *Research in veterinary science*, 95(2), 405–409. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.04.005>
78. Wang, J. L., Ko, W. C., Hung, C. H., Cheng, M. F., Wang, H. Y., Shiau, Y. R., Lai, J. F., Huang, I. W., Hsieh, L. Y., Lauderdale, T. Y., y On Behalf Of Tsar Hospitals (2021). Temporal trend of ST131 clone among urinary Escherichia coli isolates in the community: a Taiwan national surveillance from 2002 to 2016. *Microorganisms*, 9(5), 963. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050963>
79. Wilson, H., y Török, M. E. (2018). Extended-spectrum β -lactamase-producing and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Microbial genomics*, 4(7), 000197. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000197>
80. Yang, J., Ye, L., Guo, L., Zhao, Q., Chen, R., Luo, Y., Chen, Y., Tian, S., Zhao, J., Shen, D., y Han, L. (2013). A nosocomial outbreak of KPC-2-producing Klebsiella pneumoniae in a chinese hospital: dissemination of ST11 and emergence of ST37, ST392 and ST395. *Clinical microbiology and infection*, 19(11), E509–E515. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12275>
81. Yang, Q. E., Sun, J., Li, L., Deng, H., Liu, B. T., Fang, L. X., Liao, X. P., y Liu, Y. H. (2015). IncF plasmid diversity in multi-drug resistant Escherichia coli strains from animals in China. *Frontiers in microbiology*, 6, 964. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00964>

IX. DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Declaro que el trabajo presentado es personal e inédito, que cada una de las citas bibliográficas son correctas y están debidamente reconocidas, que no contiene copias totales ni parciales de otros investigadores excepto citas aceptadas como trabajos científicos, que no afectan los derechos de autor y que se mantiene dentro del marco de trabajos científicos de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Concepción.



Valentina Esperanza Aravena Ramírez

X. APÉNDICE

Tabla 3. Taxonomía de las aves muestreadas en el presente estudio, agrupados según orden, familia y especie.

Orden	Familia	Especie	N° de individuos
Strigiformes	Tytonidae	<i>Tyto furcata</i>	16
	Strigidae	<i>Athene cunicularia</i>	2
	Strigidae	<i>Bubo magellanicus</i>	14
	Strigidae	<i>Glaucidium nana</i>	7
Falconiformes	Accipitridae	<i>Parabuteo unicinctus</i>	3
	Accipitridae	<i>Geranoaetus polyosoma</i>	3
	Accipitridae	<i>Elanus leucurus</i>	2
	Falconidae	<i>Milvago chimango</i>	6
	Falconidae	<i>Falco sparverius</i>	5
	Falconidae	<i>Falco peregrinus</i>	3
	Falconidae	<i>Caracara plancus</i>	1
Ciconiiformes	Ardeidae	<i>Egretta thula</i>	1
	Cathartidae	<i>Vultur gryphus</i>	1
	Cathartidae	<i>Cathartes aura</i>	1
	Cathartidae	<i>Coragyps atratus</i>	1
	Ardeidae	<i>Bubulcus ibis</i>	1
	Threskiornithidae	<i>Theristicus caudatus</i>	2
Passeriformes	Thraupidae	<i>Thraupis episcopus</i>	1
	Tyrannidae	<i>Elaenia albiceps</i>	2
	Turdidae	<i>Turdus falckandii</i>	7
	Troglodytidae	<i>Troglodytes aedon</i>	1
	Icteridae	<i>Leistes loyca</i>	1
	Hirundinidae	<i>Tachycineta leucopyga</i>	1
Anseriformes	Anatidae	<i>Coscoroba coscoroba</i>	1
	Anatidae	<i>Anas flavirostris</i>	2
	Anatidae	<i>Anas georgica</i>	2
	Anatidae	<i>Cygnus melancoryphus</i>	4
Pelecaniformes	Sulidae	<i>Sula variegata</i>	2

	Pelecanidae	<i>Pelecanus thagus</i>	2
Charadriiformes	Charadriidae	<i>Vanellus chilensis</i>	2
	Laridae	<i>Larus dominicanus</i>	32
	Laridae	<i>Leucophaeus pipixcan</i>	1
	Laridae	<i>Leucophaeus modestus</i>	1
Suliformes	Phalacrocoracidae	<i>Poikilocarbo gaimardi</i>	1
	Phalacrocoracidae	<i>Nannopterum brasilianum</i>	1
	Phalacrocoracidae	<i>Leucocarbo bougavillii</i>	4
Sphenisciformes	Spheniscidae	<i>Spheniscus magellanicus</i>	5
Procellariiformes	Oceanitidae	<i>Oceanites oceanicus</i>	1
Gruiformes	Rallidae	<i>Pardirallus sanguinolentus</i>	1
Tinamiformes	Tinamidae	<i>Nothoprocta perdicaria</i>	1
Columbiformes	Columbidae	<i>Zenaida auriculata</i>	6
Caprimulgiformes	Caprimulgidae	<i>Systellura longirostris</i>	1
Apodiformes	Trochilidae	<i>Sephanoides sephanoides</i>	1
Psittaciformes	Psittacidae	<i>Enicognathus leptorhynchus</i>	1
