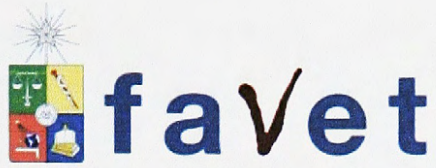


TUCHVET
MEZ a/o
2013
c.3



UNIVERSIDAD DE CHILE FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y
PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**AISLAMIENTO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* DESDE
PINGÜINOS DE MAGALLANES (*Spheniscus magellanicus*) DE LA
REGIÓN DE MAGALLANES Y ANTARTICA CHILENA Y
DETERMINACION DE RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS.**

KARLA FRANCISCA MEZA PARADA

Memoria para optar al Título Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Medicina Preventiva.

PROFESOR GUÍA: PATRICIO RETAMAL

Financiamiento PROYECTO FONDECYT N°1110255

SANTIAGO, CHILE 2013.



UNIVERSIDAD DE CHILE FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y
PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**AISLAMIENTO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* DESDE
PINGÜINOS DE MAGALLANES (*Spheniscus magellanicus*) DE LA
REGIÓN DE MAGALLANES Y ANTÁRTICA CHILENA Y
DETERMINACION DE RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS.**

KARLA FRANCISCA MEZA PARADA

Memoria para optar al Título Profesional de Médico Veterinario


Departamento de Medicina Preventiva.

Nota Final:

Prof. Guía: Patricio Retamal Merino

Nota: 7,0 (niete, cero) Firma: 

Profesor Corrector: Fernando Fredes Martinez

Nota: 7,0 (niete, cero) Firma: 

Profesor Corrector: Lisette Lapierre Acevedo

Nota: 7,0 (niete, cero) Firma: 

PROFESOR GUÍA: PATRICIO RETAMAL

Financiamiento PROYECTO FONDECYT N°1110255

SANTIAGO, CHILE 2013.

AGRADECIMIENTOS

Debo agradecer al doctor Patricio Retamal por la entrega tan generosa de sus conocimientos y sobre todo por guiarme en este proceso llamado memoria de título. Agradecer también al doctor Fernando Fredes, que junto al doctor Retamal me permitieron ser parte del equipo de trabajo de este proyecto. Junto a ellos agradezco a Marcela Fresno, Catalina Pardo, Catherine Dougnac y Vanessa Gornall por el apoyo y los conocimientos entregados. A todo el personal técnico del laboratorio de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Medicina Preventiva de FAVET, sin los cuales no hubiese podido realizar mi trabajo experimental en los tiempos necesarios y con la eficiencia requerida. A Patricia Alvarez por su excelente labor como secretaria del departamento, lo cual facilita el trabajo para todos aquellos que estamos trabajando en él. No puedo dejar de agradecer a todos los tesisistas del laboratorio de enfermedades infecciosas por el buen ambiente que hay en el laboratorio, lo que hizo que el trabajo fuera mucho más agradable y llevadero.

Finalmente, agradezco infinitamente a mi madre, padre, hermano, abuelos, tíos, tías y amigas por el apoyo recibido no solo en este último proceso, sino que por todo lo que me entregaron a lo largo de este difícil pero bello camino para llegar ser una profesional de la medicina veterinaria, ya que sin ellos no podría haber llegado a donde estoy.

RESUMEN

El pingüino de Magallanes (*Spheniscus magellanicus*) es el más abundante del género *Spheniscus*, vive en Argentina, Chile y las Islas Falkland y es considerado centinela de la vida marina. *Salmonella enterica* es importante en aves silvestres, ya que se ha descrito la transmisión directa de la bacteria desde éstas a otros animales incluyendo el ser humano. El rol de la actividad humana en la presencia de *Salmonella* en pingüinos no está clara. Existen pocos estudios sobre *Salmonella* en pingüinos, siendo los serovares Typhimurium y Enteritidis patógenos para ellos, desconociéndose la presencia de cepas resistentes a los antibióticos en estas aves. El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de cepas de *S. enterica* con resistencia a antimicrobianos en heces de *S. magellanicus*, de la región de Magallanes y la Antártica Chilena. A partir de 2114 muestras se aislaron 8 cepas pertenecientes a los serovares Agona y Enteritidis, obteniendo una tasa de aislamiento de 0,38%. Aunque todas las cepas resultaron ser sensibles a Cefradina, Cefadroxilo, Enrofloxacino, Amoxicilina + Ácido Clavulánico, Gentamicina y Sulfametoxazol + Trimetoprim, se detectó resistencia a los antibióticos Tetraciclina, Ampicilina, Ceftiofur y Cefotaxima. Estos resultados confirman la presencia de *S. enterica* en Pingüinos Magallánicos de la Región de Magallanes y la Antártica Chilena, y sugieren que existe un efecto antropogénico por el uso de antibióticos tanto en humanos como en animales domésticos, debido al aumento de la actividad turística y asentamientos humanos (actividad minera y agropecuaria en Seno Otway, y transporte marítimo en el estrecho de Magallanes), incrementando el volumen de desechos en época turística.

Palabras claves: *Spheniscus magellanicus*, *Salmonella enterica*, Chile



ABSTRACT

The Magallanic penguin (*Spheniscus magellanicus*) is the most abundant of the genus *Spheniscus*, lives in Argentina, Chile and the Falkland Islands and are considered sentinels of marine life. *Salmonella enterica* is important in wild birds because it has been described the direct transmission of the bacteria from wild birds to others animals including the human. The role of human activity in the presence of *Salmonella* in penguins is unclear. There are few studies on *Salmonella* in penguins, being the serovars Typhimurium and Enteritidis pathogens, the presence of antibiotic-resistant strains in these birds is unknown. The objective of this study was to determine the presence of strains of *S. enterica* with antimicrobial resistance in *S. magellanicus*, in the Region de Magallanes y la Antartica Chilena. From 2114 samples were isolated 8 strains belonging to serovars Agona and Enteritidis, obtaining an isolation rate of 0.38%. Although all strains were found to be sensitive to Cephradine, Cefadroxil, enrofloxacin, amoxicillin + clavulanate, gentamicin and Sulfamethoxazole + Trimethoprim, was detected tetracycline, ampicillin, ceftiofur and cefotaxime resistance. These results confirm the presence of *S. enterica* in Magellanic penguins in the region of Magallanes and Chilean Antarctica, and suggest an anthropogenic effect by the use of antibiotics in humans and pets, due to the increase of tourism and human settlements (mining and agricultural activity in Seno Otway, and shipping in the Strait of Magellan), increasing the volume of waste in tourist season.

Key words: *Spheniscus magellanicus*, *Salmonella enterica*, Chile



INTRODUCCIÓN

Dentro de los Spheniciformes hay cuatro especies de pingüinos del género *Spheniscus* que ocupan las zonas templadas, en las costas despobladas de los océanos Atlántico y Pacífico. Estas especies son el pingüino de Galápagos (*Spheniscus mendiculus*), el pingüino Magallánico (*S. magellanicus*) (Boersma, 2008), el pingüino de Humboldt (*S. humboldti*) y el pingüino Africano (*S. demersus*). El más abundante de los pingüinos de estas zonas es el pingüino Magallánico, con una población de más de un millón de parejas reproductoras, que vive en Argentina (en 63 zonas), Chile (al menos 10 localidades) y en las Islas Malvinas (Falkland Islands) con migración hacia el norte, hasta el sur de Brasil e incluso con algunos reportes tan al norte como en El Salvador. Hacia el sur se han descrito en la Isla Avian en la Península Antártica, además de Australia y Nueva Zelanda (IUCN, 2012). Es muy probable que la población de pingüino Magallánico este disminuyendo, debido a la expansión de la pesca que afecta su fuente alimenticia (Boersma, 2008). Al respecto, las tendencias son inciertas, pero hay descensos significativos en algunas áreas, con mortalidad sustancial debido a una variedad de amenazas, existiendo actualmente una población de 1,3 millones de parejas reproductoras (IUCN, 2012).

Los pingüinos son considerados centinelas de la vida marina, ya que reflejan la variación oceánica regional de mejor manera que otras aves marinas, como son los cambios en el medio ambiente producidos por la presión de pesca, la variación climática y la contaminación por petróleo, que es un factor importante en la disminución de la población de estas aves (Boersma, 2008). Las actividades o asentamientos humanos como son el aumento del turismo, las estaciones de investigación, además de la presencia de embarcaciones privadas (Barbosa y Palacios, 2009) en la región de Magallanes podrían tener un impacto en la población de pingüinos (Boersma, 2008). Aun así el rol del ser humano en la presencia de *Salmonella* en pingüinos no está clara (Dimitrov *et al.*, 2009).

Salmonella es un grupo diverso de enterobacterias Gram negativas (Tizard, 2004), de carácter baciliforme (Sanchez-Vargas *et al.*, 2011) y anaerobias facultativas (Health protection agency, 2007). Actualmente este género se divide en dos especies, *Salmonella bongori* y *S. enterica*, esta última con seis subespecies y más de 2.500 serovares (Levantesi, *et al.*, 2012).

Se describe que *Salmonella* vive en el interior del tracto intestinal de vertebrados, la que puede causar enfermedad tanto en mamíferos, incluyendo al ser humano, como en aves (Tizard, 2004). Usualmente es patógena en estas últimas, pero solo bajo condiciones de estrés (Barbosa y Palacios, 2009).

Al parecer la prevalencia de *Salmonella* en poblaciones de aves silvestres migratorias sanas es baja, especialmente en el caso de aves que residen en lugares alejados de la actividad humana, como granjas o plantas de aguas residuales (Tizard, 2004). Hernández *et al.*, (2003) muestrearon 2.377 aves migratorias en diferentes épocas durante el año, en una estación de investigación costera en el sureste de Suecia, donde aislaron sólo una *Salmonella*, serotipo Schleissheim desde un Tordo Charlo (*Turdus viscivorus*). Esto concuerda con un estudio donde Palmgren *et al.*, (2000) no lograron aislar *Salmonella* desde 101 paseriformes, capturadas en Suecia, durante la migración de primavera. En el caso de albatros y pingüinos de la Antártica se han detectado 5 serotipos de *Salmonella*, *S. Enteritidis*, *S. Havana*, *S. Typhimurium*, *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* A (Barbosa y Palacios, 2009). Dimitrov *et al.*, (2009), determinaron que *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* se consideran patógenas en pingüinos. En tanto que en otro estudio realizado por Olsen *et al.*, (1996) se determinó una tasa de aislamiento de 3,33%, sugiriendo una baja incidencia en pingüinos Papúa en la Isla Bird, Georgia del Sur en el Atlántico Sur.

En cuanto a la resistencia y susceptibilidad a antimicrobianos en aves silvestres, Hudson *et al.*, (2000), reportan resistencia a sulfametoxazol, estreptomycin, ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol y kanamicina. En relación con la resistencia antimicrobiana en pingüinos hay muy pocos antecedentes, y uno de ellos es lo realizado por Miller *et al.*, (2009), donde se encontró la presencia de resistencia a antibióticos en aislados de microflora comensal desde heces de pingüinos siendo ésta alta y muy variada. En dicho estudio proponen que es necesaria mayor investigación sobre resistencia antimicrobiana en heces de pingüinos, para determinar si el alto valor encontrado es debido a la interacción con poblaciones humanas o es una característica natural de la microflora asociada a los pingüinos. Junto con esto se puede agregar que no existen estudios de resistencia a antibióticos en *S. enterica*. Además, Miller *et al.*, (2009) también sugieren que las poblaciones humanas pueden alterar los perfiles de antibióticos de las poblaciones bacterianas naturales, incluso cuando se hagan

los esfuerzos para minimizar los impactos medio ambientales. A su vez indican que aun cuando se ha minimizado el uso de antibióticos por parte de los humanos, se ve un aumento en la resistencia bacteriana frente a los antimicrobianos.

En el mundo no existen antecedentes de infección por *S. enterica* en *S. magellanicus*, información de importancia para contribuir en la evaluación de la situación sanitaria de estos animales y del impacto de la actividad humana sobre colonias de aves y lugares considerados como no intervenidos.

El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de cepas de *S. enterica* y su resistencia a los antimicrobianos en Pingüinos Magallánicos (*S. magellanicus*) de la Región de Magallanes y la Antártica Chilena.

MATERIAL Y METODOS



Muestras

Se analizaron 2.114 muestras de heces de *S. magellanicus* obtenidas desde el ambiente o desde la cloaca con tómulas con medio de transporte Cary-Blair. Los animales fueron muestreados en Isla Magdalena y Seno Otway en la Región de Magallanes y la Antártica Chilena, durante los meses de enero y febrero del 2012 y 2013 (Figura 1), siendo 1.054 obtenidas desde Isla Magdalena y 1.060 desde Seno Otway. Este trabajo se realizó en el marco del proyecto Fondecyt N°1110255, que contó con las autorizaciones bioéticas y de bioseguridad respectivas. Las muestras fueron transportadas vía aérea desde la Región de Magallanes y la Antártica Chilena hasta la Región Metropolitana.

Aislamiento bacteriológico

El contenido fecal de cada tórula se inoculó en tubos de ensayos con 5 mL de agua peptonada fosfatada (APT, Difco®) suplementada con 20 mg/mL Novobiocina (Sigma®) y se incubaron a 37° C por 18 a 24 horas. Luego 100 µL de la suspensión bacteriana se sembraron en agar modificado semisolido Rappaport Vassiliadis (MSRV, Oxoid®) suplementado con 20 mg/mL novobiocina e incubaron por 24 a 48 horas a 41,5° C. Aquellas muestras que presentaron crecimiento y/o difusión se sembraron por agotamiento en agar Xylose Lysine Deoxycholate (XLD, Difco®) y se incubaron a 37° C por 24 horas. Aquellas cepas con colonias oscuras o translucidas se confirmaron mediante la detección del gen *invA* en una prueba de PCR, para lo cual se tomó una colonia y se suspendió en 100 µL de agua destilada estéril, se hirvió por 15 min y luego la suspensión se centrifugó por 5 min a 5.000 rpm. Se preparó una mezcla de la reacción según los volúmenes de la Tabla 1 (10 uL vol. final por reacción), y la amplificación se realizó según los tiempos indicados en Tabla 2.

Los aislados se serotipificaron mediante método de Kauffmann White en el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP).

Detección de resistencia a antimicrobianos

Se realizó el método Kirby-bauer utilizando sensidiscos con los siguientes antibióticos: Enrofloxacino (10µg), Amoxicilina + Ácido Clavulánico (30µg), Cefotaxima (30µg), Gentamicina (10µg), Tetraciclina (30µg), Sulfametoxazol + Trimetoprim (25µg), Ceftiofur (30µg), Cefradina (30µg), Ampicilina (10µg) y Cefadroxilo (30µg). Para el procedimiento se utilizó agar Muller-Hinton, preparado de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las cepas se inocularon en 2 mL de APT y se incubaron por 18 a 24 hrs a 37° C, luego la suspensión bacteriana se inoculó en 5 mL de APT, se midió en OD₆₀₀ en espectrofotómetro incubando en agitación a 37° C hasta alcanzar un OD₆₀₀ de 0,25 (1-5 x 10⁸ UFC/mL). La suspensión bacteriana se sembró en las placas de agar MH de forma uniforme, usando una tórula de algodón estéril, cada placa se dejó secar unos minutos y luego se colocaron los sensidiscos con los respectivos antibióticos ya mencionados (CLSI, 2010). La prueba se estandarizó por medio de la cepa de *E. coli* ATCC 25992 obteniendo como resultados la sensibilidad para todos los antibióticos.

Análisis Estadístico

Los resultados se analizaron mediante el estadístico de χ^2 en tablas de contingencia para variables categóricas utilizando el programa Infostat® (versión 2010).

Bioseguridad

Esta bacteria está clasificada como agente de riesgo intermedio (CONICYT, 2008), y sus medidas de contención son de nivel de aislamiento tipo II. Los protocolos de manejo de muestras se realizaron en una cabina de bioseguridad nivel IIA, el acceso a los laboratorios esta restringido, y se utilizaron desinfectantes y contenedores para material contaminado que fueron autoclavados antes de su eliminación.

RESULTADOS

A partir de las 2.114 muestras de *S. magellanicus* provenientes de la Región de Magallanes y la Antártica Chilena, de las cuales 1.054 fueron obtenidas en la Isla Magdalena y 1060 desde Seno Otway, se aislaron 8 cepas de *S. enterica* (Tabla 3). En el caso de Isla Magdalena el porcentaje de aislamiento fue de 0,19% y en Seno Otway de 0,56%, teniendo en total una tasa de aislamiento de 0,38%.

Al realizar el análisis de los resultados se pudo observar diferencias ($p < 0,05$) en el porcentaje de serovares aislados según año de muestreo (Figura 2.).

En cuanto a la ensayo de Kirby-Bauer, se detectaron fenotipos de resistencia a los antimicrobianos Tetraciclina, Ampicilina, Ceftiofur y Cefotaxima (Figuras 3, 4 y 5), siendo diferente ($p < 0,05$) la resistencia a tetraciclina entre los serovares aislados, Figura 4.



DISCUSIÓN



Los resultados obtenidos a partir de las muestras del estudio confirman la presencia de *S. enterica*, en *S. magellanicus*. Además, sugieren que la tasa de infección de *Salmonella* en pingüinos en nuestro país es de 0,38%, un valor menor que la tasa de aislamiento de 3,33% obtenida por Olsen *et al.*, (1996) en pingüinos Papúa, en la Antártica. Esta diferencia se puede deber a varios factores, entre los cuales podrían estar la temperatura ambiental y el tamaño muestral empleado en cada estudio, ya que en el trabajo de Olsen *et al.*, (1996) el número de muestras fue considerablemente menor que el utilizado en este trabajo y la temperatura en la que se encontraban los hospederos es considerablemente menor en la Antártica.

El porcentaje de serovares aislados por año (Figura 2.) indica que el serovar Enteritidis ha aumentado de un año para otro, lo que nos podría evidenciar que la influencia del ser humano en las colonias de pingüinos tiene variaciones temporales debido al aumento del turismo y la urbanización en esas zonas, lo que podría generar un problema sanitario en *S. magellanicus* debido a que *S. Enteritidis* es considerada patógena para los Sphenisiformes (Dimitrov *et al.*, 2009), como también puede deberse a la interacción directa o indirecta con otras aves domésticas o silvestres, estas últimas de carácter migratorio. Además podemos ver una disminución del serovar Agona, cuyos principales reservorios son cerdos, pavos y pollos (Jackson *et al.*, 2013).

Con respecto a la resistencia a antimicrobianos, Naghoni *et al.*, (2010) indican que el fenotipo de multiresistencia ha ido aumentando significativamente en cepas de *Salmonella*, teniendo más de un 68% de los aislamientos multiresistencia a los fármacos. Esto da mayor trascendencia a los resultados de este trabajo, ya que los pingüinos de Magallanes podrían actuar como reservorios de cepas con resistencia a antimicrobianos y con potencial patogénico y zoonótico en nuestro país.

Si bien es cierto no existen estudios de resistencia a antimicrobianos de *Salmonella* en pingüinos, el ISP ha realizado algunos análisis de resistencia a antibióticos en cepas de *S. Enteritidis* obtenidas a partir de muestras de seres humanos y de alimentos, no encontrando resistencia frente a ciprofloxacino, ampicilina, cefotaxima, cloranfenicol, cotrimoxazol ni

ácido nalidíxico. Sin embargo, no evalúan la resistencia a tetraciclina, por lo que no se puede contrastar con los resultados de este estudio. Con respecto a *S. Agona*, no existen cepas estudiadas por el ISP. Podríamos inferir, que en el caso de los lugares de donde provienen las muestras analizadas en el presente estudio las aves portadoras podrían tener relación con algunos asentamientos humanos (Figura 3.). Así por ejemplo, en el caso de Seno Otway existen las instalaciones de la mina Invierno, mina Adela y mina Río Eduardo en la localidad de Isla Riesco. Además, en los alrededores de los sitios de nidificación de los pingüinos existen predios ganaderos lo que implica intervención humana o efecto antrópico. En tanto que en el caso de Isla Magdalena, existe un gran flujo de buques y cruceros que hoy en día están transitando por el estrecho de Magallanes, lo que conlleva a que exista una eliminación de un volumen de desechos considerable en el lugar, sobretudo en la época turística, donde además es la fecha en que las colonias de pingüinos son más numerosas y tienen individuos neonatos más susceptibles a todo tipo de infecciones.

En la Figura 4, se observa que el serovar Enteritidis presenta una mayor resistencia a tetraciclina, siendo la totalidad de las muestras obtenidas el año 2013 resistentes a dicho antibiótico, situación que se había reportado anteriormente por Douadi *et al.*, (2010) con el serovar Typhimurium, los que obtuvieron una tasa de resistencia a tetraciclina de 70,2% en muestras obtenidas desde humanos, bovinos, gallinas y cerdos. En el mencionado estudio, se sugiere el uso de tetraciclina en la alimentación animal como promotor del crecimiento, lo que explicaría ese resultado (Douadi *et al.*, 2010).

En cuanto al análisis de la resistencia antimicrobiana por año de muestreo (Figura 5.), solo se detectó resistencia a tetraciclina el año 2013, a diferencia del año anterior donde si hubo resistencia a otros antibióticos como ceftiofur, cefotaxima y ampicilina. Este último antibiótico junto con trimetoprim-sulfametoxazol y cloranfenicol fueron drogas de elección para el tratamiento de infecciones severas de *Salmonella* durante muchos años, pero las crecientes tasas de resistencia obligaron a un cambio en las drogas de elección para el tratamiento, siendo actualmente recomendadas las fluoroquinolonas y las cefalosporinas de amplio espectro (Reis *et al.*, 2011). En este sentido, se debe tener precaución con la pertinencia y calidad de las terapias en uso, ya que se ha encontrado resistencia en los medicamentos que son usados como tratamiento para la salmonelosis en la actualidad,

como ceftiofur y cefotaxima que son cefalosporinas de amplio espectro, como se evidencia en este trabajo.

Estos resultados dejan en claro la necesidad de continuar la evaluación de la infección por *S. enterica* en pingüinos, y de los fenotipos de resistencia a antimicrobianos detectables en estas cepas, como indicadores del efecto antropogénico en la zona austral y su potencial impacto en la salud pública, en la salud animal y en la conservación de la fauna acuática de nuestro país.



BIBLIOGRAFIA

- BARBOSA, A.; PALACIOS, M.** 2009. Health of Antarctic birds: a review of their parasites, pathogens and diseases. *Polar Biol* 32: 1095-1115.
- BOERSMA, P.** 2008. Penguins as Marine Sentinels. *BioScience* 58(7): 597-607.
- CLSI.** 2010. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twentieth informational supplement. M100-S20. 30(1):1-10.
- COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA (CONICYT).** 2008. Manual de normas de bioseguridad. 2ª ed. Gobierno de Chile. Santiago, Chile. 139 p.
- DIMITROV, K.; METCHEVA, R.; KENAROVA, A.** 2009. *Salmonella* presence – an indicator of direct and indirect human impact on Gentoo in Antarctica. *Biotechnol & Biotechnol Eq.* 23: 246-249.
- DOUADI, B.; LIN THONG, K.; WATANABE, H.; DEVI, S.** 2010. Characterization of drug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium by antibiograms, plasmids, integrons, resistance genes, and PFGE. *J Microbiol Biotechnol* 20(6): 1042-1052.
- HEALTH PROTECTION AGENCY.** 2007. Identification of *Salmonella* species. National Standard Method BSOP ID 24 Issue 2.1. [en línea]. <http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf_sops.asp> [consulta: 19-03-13].
- HERNANDEZ, J.; BONNEDAHL, J.; WALDENSTRÖM, J.; PALMGREN, H.; OLSEN, B.** 2003. *Salmonella* in birds migrating through Sweden. *Emerg Infect Dis* 9(6): 753-755.
- HUDSON, C.; QUIST, C.; LEE, M.; KEYES, K.; DODSON, S.; MORALES, C.; SANCHEZ, S.; WHITE, D.; MAURER, J.** 2000. Genetic Relatedness of *Salmonella* Isolates from Nondomestic Birds in Southeastern United States. *J Clin Microbiol* 38(5): 1860-1865.
- IUCN.** 2012. BirdLife International 2012. *Spheniscus magellanicus*. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. [en línea] <www.iucnredlist.org>. [consulta: 27-03-

JACKSON, B.; GRIFFIN, P.; COLE, D.; WALSH, K.; CHAI, S. 2013. Outbreak-associated *Salmonella enterica* Serotypes and Food Commodities, United States, 1998–2008. *Emerg Infect Dis.* 19(8): 1239-1244.

LEVANTESI, C.; BONADONNA, L.; BRIANCESCO, R.; GROHMANN, E.; TOZE, S.; TANDOI, V. 2012. Salmonella in surface and drinking water: occurrence and water-mediated transmission. *Food Res Int* 45: 587- 602.

MILLER, R.; GAMMON, K.; DAY, M. 2009. Antibiotic resistance among bacteria isolated from seawater and penguin fecal samples collected near Palmer Station, Antarctica. *Can J Microbiol* 55: 37-45.

NAGHONI, A.; RANJBAR, R.; TABARAIE, B.; FARSHAD, S.; OWLIA, P.; SAFIRI, Z.; MAMMINA, C. 2010. High prevalence of integrin-mediated resistance in clinical isolates of *Salmonella enterica*. *Jpn J Infect Dis* 63: 417-421.

OLSEN, B.; BERGSTROM, S.; MCCARFFERTY, D.; SELLIN, M.; WISTRÖM, J. 1996. *Salmonella enteritidis* in Antarctica: zoonosis in man or humanosis in penguins? *The Lancet* 348: 1319-1320.

PALMGREN, H.; McCAFFERTY, D.; ASPAN, A.; BROMAN, T.; SELLIN, M.; WOLLIN, R.; BERGSTRÖM, S.; OLSEN, B. 2000. Salmonella in sub-Antarctica: low heterogeneity in salmonella serotypes in South Georgian seals and birds. *Epidemiol Infect* 125: 257-262.

REIS, E.; PRAZERES, D.; FREITAS-ALMEIDA, A.; HOFER, E. 2011. Prevalence of R-type ACSSuT in strains of *Salmonella* serovar Typhimurium DT193 isolated from human infections in Brazil. *Rev Panam Salud Publica* 29(6): 387-392.

SANCHEZ- VARGAS, F.; ABU-EL-HAIJA, M.; GOMEZ- DUARTE, O. 2011. Salmonella infections: an update on epidemiology, management, and prevention. *Travel Med Infect Dis* 9: 263-277.

TIZARD, I. 2004. Salmonellosis in wild birds. *Seminars in Avian and Exotic pet Medicine* 13(2): 50-66.

ANEXOS



Figura 1. Mapa de las zonas donde fueron obtenidas las muestras para el estudio. A.-Seno Otway. B.-Isla Magdalena.

Tabla 1. Formulación del mix para la realización del PCR para la confirmación de *Salmonella enterica*.

	Vol para 1 reacción (uL)	Vol para virulotipo completo de 1 cepa
Buffer 10x	1	10
MgCl 50mM	0,27	2,7
dNTPs 10 mM	0,2	2
TaqPol platinum	0,05	0,5
Templado	0,5	5
Agua	6,98	69,8



Tabla 2. Condiciones de amplificación para la realización de PCR.

Condiciones de Amplificación.		
T°	Tiempo	N° ciclos
94	5 min	1
94	30 seg	35
55	30 seg	
72	50 seg	
72	7 min	1

Tabla 3. ID de la cepa, año de obtención, serovar, procedencia y fenotipo de resistencia de las cepas positivas a *Salmonella enterica*.

ID Cepa	Año	Serovar	Procedencia	Tetraciclina	Ampicilina	Ceftiofur	Cefotaxima
SEN36	2012	Enteritidis	Seno Otway	0	0	0	0
SAG33	2012	Agona	Isla Magdalena	0	0	1	0
SAG44	2012	Agona	Seno Otway	0	0	1	0
SAG45	2012	Agona	Isla Magdalena	0	1	1	1
Spp111	2013	Enteritidis	Seno Otway	1	0	0	0
Spp112	2013	Enteritidis	Seno Otway	1	0	0	0
Spp113	2013	Enteritidis	Seno Otway	1	0	0	0
Spp114	2013	Enteritidis	Seno Otway	1	0	0	0

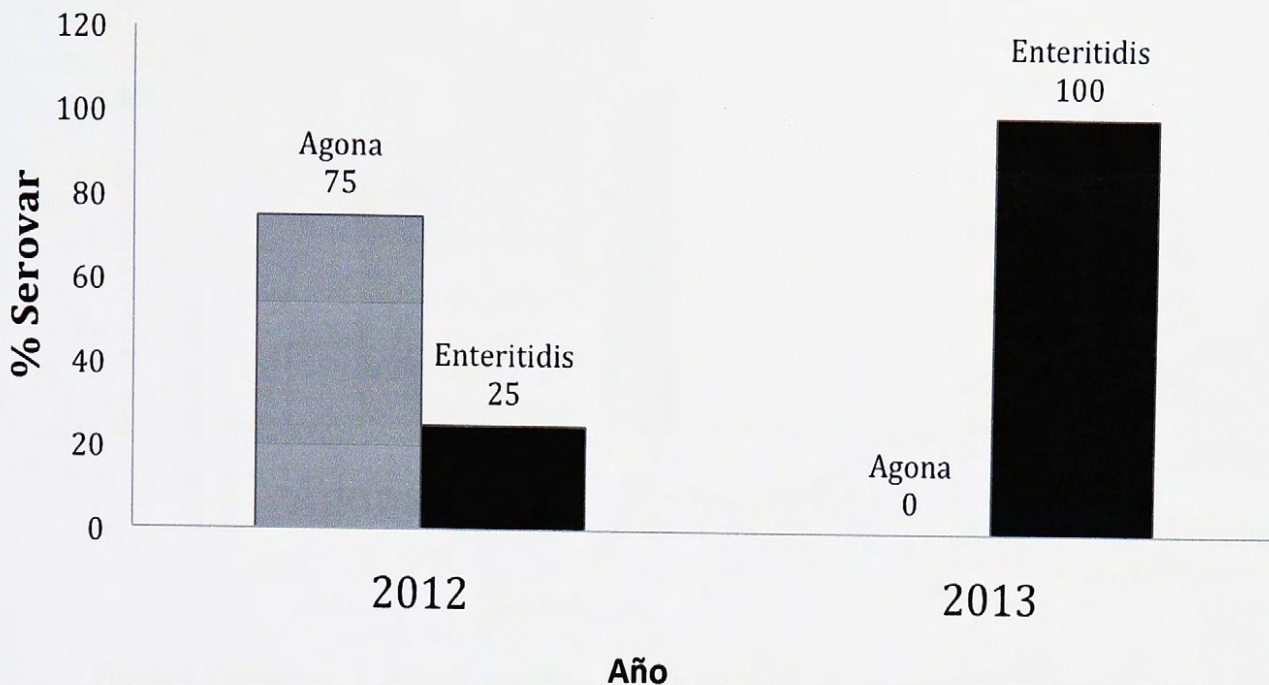


Figura 2. Porcentaje (%) de serovares aislados desde muestras de pingüinos de Magallanes según año ($p \leq 0,05$)

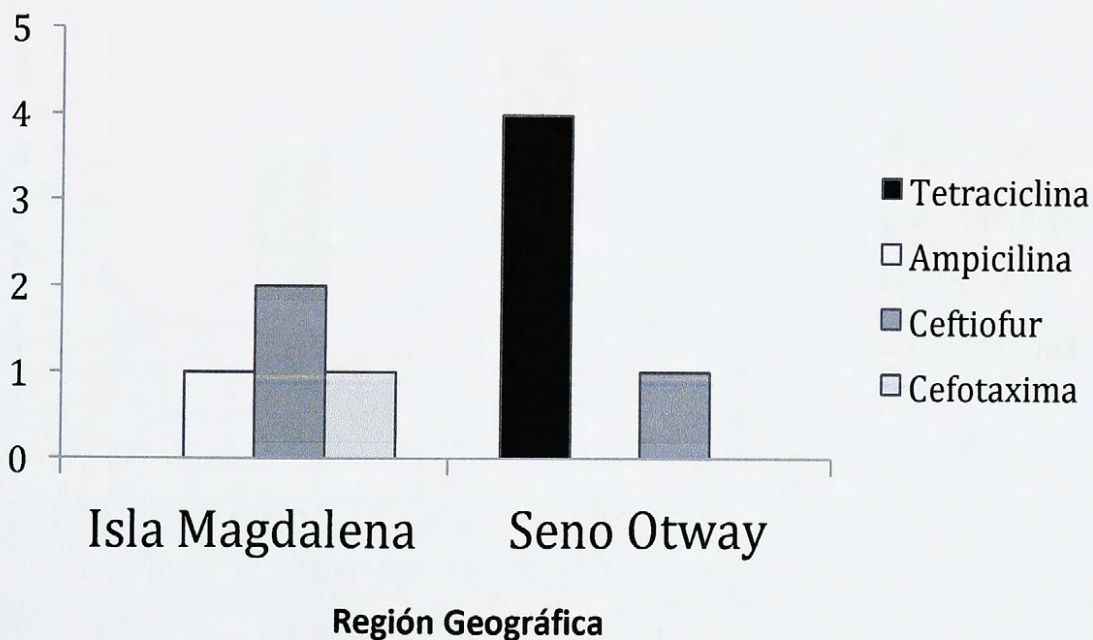


Figura 3. Resistencia a antibióticos según procedencia de las cepas aisladas desde pingüinos de Magallanes.

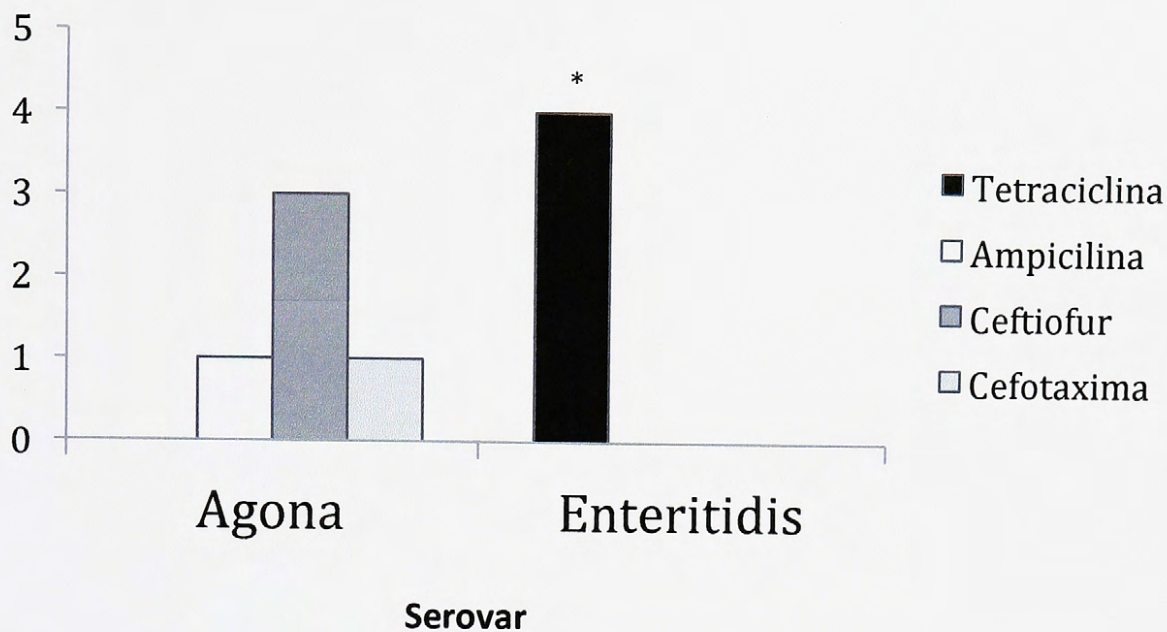


Figura 4 Resistencia a antibióticos según serovar ($p \leq 0,05$) de las cepas obtenidas desde pingüinos de Magallanes.

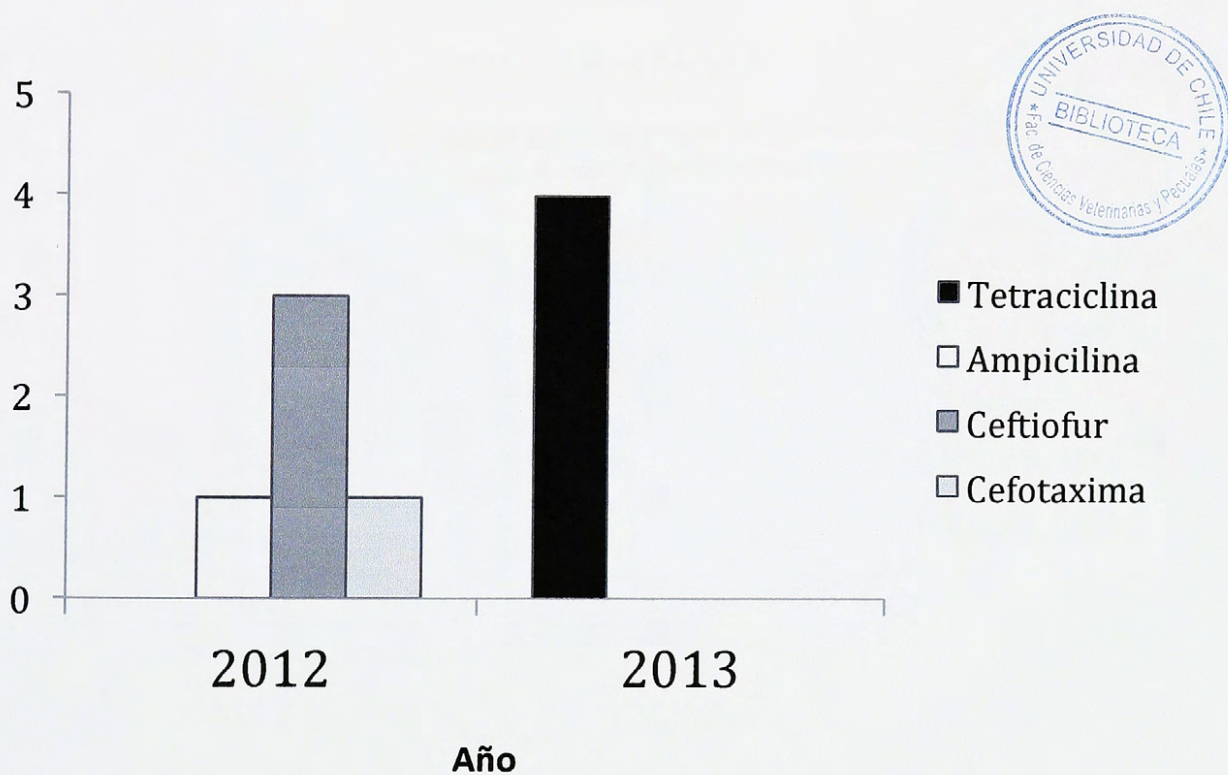


Figura 5. Resistencia a antibióticos de las cepas aisladas desde pingüinos de Magallanes según año.

