

TM8UCHVET
PAR CAT
2013
C.3



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS y PECUARIAS
ESCUELA DE POSTGRADO Y POSTÍTULO

**CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *Salmonella Enterica* EN
PINGÜINOS DE LA REGIÓN DE MAGALLANES Y LA
ANTÁRTICA CHILENA Y, COMPARACIÓN GENOTÍPICA CON
CEPAS AISLADAS DE OTRAS ESPECIES**

CATALINA PARDO ROA

**Tesis para optar al Grado de
Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias
Mención Patología Animal**

**Santiago-Chile
2013**



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE POSTGRADO Y POSTÍTULO

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *SALMONELLA ENTERICA*
EN PINGÜINOS DE LA REGIÓN DE MAGALLANES Y LA
ANTÁRTICA CHILENA Y, COMPARACION GENOTÍPICA CON
CEPAS AISLADAS DE OTRAS ESPECIES

CATALINA PARDO ROA

Tesis para optar al Grado de
Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias
Mención Patología Animal

DIRECTOR DE TESIS: DR. PATRICIO RETAMAL M.

Santiago-Chile
2013



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS y PECUARIAS
ESCUELA DE POSTGRADO Y POSTÍTULO

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

SE INFORMA A LA DIRECCIÓN DE POSTGRADO Y POSTÍTULO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS, QUE LA TESIS DE MAGÍSTER PRESENTADA POR LA CANDIDATA

CATALINA PARDO ROA

HA SIDO APROBADA POR LA COMISIÓN EVALUADORA DE TESIS COMO REQUISITO PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS ANIMALES Y VETERINARIAS CON MENCIÓN EN PATOLOGÍA ANIMAL EN EXAMEN DE DEFENSA DE TESIS RENDIDO EL DÍA 12 DE SEPTIEMBRE DE 2013

DIRECTOR DE TESIS

DR. PATRICIO RETAMAL M

COMISIÓN EVALUADORA E INFORMANTE DE TESIS

DRA. CONSUELO BORIE P.

DR. ROBERTO VIDAL A.

Esta Tesis de Grado se realizó en el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile y contó con Financiamiento Fondecyt N° 1110255

Trabajo de tesis para optar al título de Doctora en Ciencias Biológicas, presentado al Comité de Evaluación de Tesis de la Pontificia Universidad Católica de Chile, en cumplimiento de lo establecido en el Reglamento de Postgrado de la Pontificia Universidad Católica de Chile, en virtud de haber sido admitido a la carrera de Doctorado en Ciencias Biológicas, en el año 2010, en el programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, en el área de Genética y Evolución, bajo la supervisión de la Profesora Dra. María José Rodríguez.

Trabajo de tesis para optar al título de Doctora en Ciencias Biológicas, presentado al Comité de Evaluación de Tesis de la Pontificia Universidad Católica de Chile, en cumplimiento de lo establecido en el Reglamento de Postgrado de la Pontificia Universidad Católica de Chile, en virtud de haber sido admitido a la carrera de Doctorado en Ciencias Biológicas, en el año 2010, en el programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, en el área de Genética y Evolución, bajo la supervisión de la Profesora Dra. María José Rodríguez.

Trabajo de tesis para optar al título de Doctora en Ciencias Biológicas, presentado al Comité de Evaluación de Tesis de la Pontificia Universidad Católica de Chile, en cumplimiento de lo establecido en el Reglamento de Postgrado de la Pontificia Universidad Católica de Chile, en virtud de haber sido admitido a la carrera de Doctorado en Ciencias Biológicas, en el año 2010, en el programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, en el área de Genética y Evolución, bajo la supervisión de la Profesora Dra. María José Rodríguez.

*"Dedico este trabajo a mi amado esposo, quien tomo mi mano en cada paso,
brindándome siempre su apoyo, comprensión y paciencia incondicionales.
Pido a Dios que continúe bendiciendo nuestro hogar hoy y siempre"*



BIOGRAFÍA

Catalina Pardo Roa, nació en Bogotá-Colombia el 21 de mayo de 1981; siendo la segunda hija del matrimonio conformado por Jorge Pardo Vargas y Clemencia Roa de Pardo. En el año 1998 finaliza sus estudios de bachiller del Colegio "El minuto de Dios, Cal. A" e ingresa al año siguiente a la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, donde realizó sus estudios de Medicina Veterinaria, carrera de la cual se gradúa en el año 2006, después de haber realizado la pasantía en medicina interna equina en Costa Rica, área de la profesión que desempeño por años más en Colombia y México..

Durante los siguientes años, reforzó sus habilidades en el desarrollo de análisis en laboratorio clínico y microbiología, y se especializó en implementación de sistemas de gestión de calidad bajo la norma NTC ISO/IEC 17025:2005, mediante la realización de un Diplomado en Sistemas de Gestión de Calidad de Laboratorios en la Pontificia Universidad Javeriana donde se certificó como Auditor de calidad bajo la norma NTC ISO/IEC 17025:2005, desarrollando capacidad estratégica y cognitiva para abordar otras normativas y lineamientos de calidad, gestión ambiental y salud ocupacional. Y llevando a cabo actividades en implementación de sistemas de gestión tanto en la Universidad Nacional de Colombia, Universidad de Chile y Laboratorios Privados

Llega a Chile en Julio de 2010, e ingresa al Magister en Ciencias Veterinarias, Universidad de Chile, desarrollando su trabajo de grado en la CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *Salmonella enterica* EN PINGÜINOS DE LA REGIÓN DE MAGALLANES Y LA ANTÁRTICA CHILENA Y, COMPARACIÓN GENOTÍPICA CON CEPAS AISLADAS DE OTRAS ESPECIES, siendo este documento el soporte de dicho trabajo. Finalmente siguiendo su deseo de continuar su formación profesional para vincularse más adelante a la academia, ingresa en marzo del 2013 al programa de Doctorado Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo refleja el trabajo continuo y dedicado de decenas de personas que directa o indirectamente colaboraron para hacerlo una realidad espero que estas cortas palabras los incluyan a todos y sean un aliento para continuar la valiosa labor que día a día realizamos.

En primer lugar agradezco a CONICYT y FONDECYT por su apoyo económico y logístico para poder realizar el proyecto, y siguiendo en esta línea un millar de gracias al Dr. Fernando Fredes (Director del Proyecto) y a todo el equipo de trabajo muy especialmente al Dr. Pedro Abalos, Ángela Díaz, Catherine Dougnac y Cristóbal Arredondo, con quienes compartí uno de los momentos inolvidables de mi vida y a las instituciones oficiales que permitieron llevar a cabo este trabajo CONAF, SUBPESCA, SAG, Tourist OTWAY y a todo el personal del Monumento Natural *“Los Pingüinos”*

A mi tutor Patricio Retamal, a quien consideraré siempre como un amigo, a su familia (Nayi y Sergio) por la paciencia y el cariño; A todos los miembros del Laboratorio de Enfermedades Infecciosas encabezados por Marcela Fresno, mi fiel compañera de trabajo y los estudiantes de pregrado que pasaron por él durante estos dos años (Paula Vicencio, Catherine Rodríguez, Vanessa Gornall, Karla Mesa, Violeta Barrera y Paulina Marchant).

Gracias infinitas a todos los miembros de los laboratorios donde realizamos los ensayos y quienes nos colaboraron incondicionalmente con su experiencia. Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos de la facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias a cargo de las Dras. Pilar Oviedo y Anita Soto, Instituto de Ciencias Biomédicas de la facultad de Medicina en cabeza del Dr. Roberto Vidal y con el apoyo invaluable de Mirka Pardo; Laboratorio de microbiología del ISP, Sra. Alda Fernández, Laboratorio de microbiología SAG-Punta Arenas, Dr. Rigofredo Veneros y Laboratorio de diagnóstico SAG-Región Metropolitana.

Finalmente a mis amigos de travesía Giancarlo Maneschi y Constanza Vergara a quienes les auguro un futuro lleno de éxitos y a mi familia en Chile compuesta por mi hermanita Maru y mi esposito que me acompañaron y aguantaron en cada momento y a mis papás que desde Colombia siempre estuvieron presentes con sus bendiciones.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	RESÚMEN.....	3
3.	ABSTRACT	4
4.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
4.1.	<i>Salmonella enterica</i>	5
	Taxonomía y Características Generales.....	5
	Rango de hospederos y transmisión.....	6
	Patogénesis	7
	Resistencia a condiciones de estrés	8
	Epidemiología	12
4.2.	<i>Pingüino de Magallanes (Spheniscus magellanicus)</i>	14
	Características generales	14
	Agentes infecciosos	15
	Importancia Epidemiológica.....	17
5.	HIPÓTESIS EXPERIMENTAL	19
6.	OBJETIVO GENERAL.....	20
6.1.	<i>Objetivos específicos</i>	20
7.	MATERIALES Y MÉTODOS	21



7.1. <i>Las muestras</i>	21
7.2. <i>Aislamiento bacteriológico</i>	22
7.3. <i>Confirmación por PCR</i>	23
7.4. <i>Confirmación bioquímica</i>	24
7.5. <i>Caracterización fenotípica</i>	24
Serotipificación	24
Pruebas de supervivencia a factores de estrés.....	24
Prueba de resistencia a antimicrobianos	25
7.6. <i>Caracterización genotípica</i>	27
Virulotipificación.....	28
PFGE.....	30
7.7. <i>Análisis de Resultados</i>	31
8. BIOSEGURIDAD	32
9. RESULTADOS	33
9.1. <i>Aislamiento bacteriológico</i>	33
9.2. <i>Caracterización fenotípica</i>	33
Serotipificación y Resistencia Antibiótica.....	33
<u>Pruebas de supervivencia a factores de estrés</u>	34
9.3. <i>Caracterización genotípica</i>	35
10. DISCUSIÓN	42
11. CONCLUSIONES	46
12. BIBLIOGRAFÍA	47



ÍNDICE DE AYUDAS ILUSTRATIVAS (FIGURAS Y TABLAS)

FIGURAS:

FIGURA 1. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DEL <i>S. MAGELLANICUS</i>	15
FIGURA 2. MÉTODO DE CAPTURA Y SUJECCIÓN DE LOS INDIVIDUOS <i>S. MAGELLANICUS</i> PARA EL MARCAJE Y TOMA DE MUESTRAS	22
FIGURA 3. . PORCENTAJE (%) DE SUPERVIVENCIA DE LAS CEPAS DE <i>SALMONELLA</i> <i>ENTERICA</i> , AISLADAS DE <i>SPHENISCUS MAGELLANICUS</i> SOMETIDAS A DIFERENTES CONDICIONES DE ESTRÉS.	35
FIGURA 4. DENDOGRAMA OBTENIDO POR ANÁLISIS DE PFGE UTILIZANDO LA ENZIMA <i>XBAI</i> CON LAS CEPAS DE <i>S. ENTERICA</i> AISLADAS DESDE LAS MUESTRAS 2012 OBTENIDAS DESDE PINGÜINOS DE LA REGIÓN DE MAGALLANES Y ANTÁRTICA CHILENA.	38
FIGURA 5. DENDOGRAMA OBTENIDO POR ANÁLISIS DE PFGE UTILIZANDO LA ENZIMA <i>XBAI</i> CON LAS CEPAS DE <i>S. ENTERICA</i> AISLADAS DESDE PINGÜINOS, HUMANOS, AVES COMERCIALES Y AVES SILVESTRES EN CHILE.....	39
FIGURA 6. DENDOGRAMA GENERADO POR VIRULOTIPOS. REPRESENTA LA DIFERENCIA GENÉTICA ENTRE LAS DISTINTAS CEPAS EN PORCENTAJE.	40
FIGURA 7. ÁRBOL FILOGENÉTICO GENERADO POR VIRULOTIPOS Y PATRÓN DE RESTRICCIÓN DEL PFGE. REPRESENTA LA DIFERENCIA GENÉTICA ENTRE LAS DISTINTAS CEPAS EN PORCENTAJE.....	41

TABLAS:

TABLA 1. CLASIFICACIÓN DE LAS SUBESPECIES DE <i>SALMONELLA ENTERICA</i> , DE ACUERDO AL ESQUEMA PROPUESTO POR KAUFFMANN-WHITE.....	5
TABLA 2. REGULADORES TRANSCRIPCIONALES DE LAS PROTEÍNAS RESPONSABLES DE LA RESPUESTA AL ESTRÉS ACIDO EN <i>SALMONELLA SP.</i>	11
TABLA 3. PRINCIPALES ENZIMAS BACTERIANAS ASOCIADAS A LA REDUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO.	12
TABLA 4. AISLAMIENTOS DE <i>SALMONELLA SPP.</i> REPORTADOS EN DIFERENTES ESPECIES DE PINGÜINOS	17

TABLA 5. PARTIDORES PARA LA DETECCIÓN DEL GEN <i>INVÁ</i> DE <i>SALMONELLA ENTERICA</i>	23
TABLA 6. ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS Y VALORES DE REFERENCIA PARA DETERMINAR LA SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE ACUERDO AL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN PLACA.	26
TABLA 7. LISTADO DE CEPAS DE <i>SALMONELLA ENTERICA</i> EMPLEADAS PARA LA CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA.	27
TABLA 8. GENES EVALUADOS PARA EL ESTABLECIMIENTO DE LOS VIRULOTIPOS EN EL PRESENTE ESTUDIO.....	28
TABLA 9. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN PCR PARA DETECCIÓN DE VIRULOTIPOS EN <i>SALMONELLA SP.</i>	29
TABLA 10. SOLUCIONES DE PRE-DIGESTIÓN Y DIGESTIÓN DE LOS PLUGS PARA LA PFGE DE CEPAS DE <i>SALMONELLA ENTERICA</i> , EMPLEANDO LA ENZIMA <i>XBAI</i>	31
TABLA 11. DETECCIÓN DE <i>SALMONELLA SPP</i> , EN <i>SPHENISCUS MAGELLANICUS</i> EN LA REGIÓN MAGALLANES Y ANTÁRTICA DE CHILENA.....	33
TABLA 12. RESULTADOS DE LA SEROTIPIFICACIÓN Y ENSAYO DE KIRBY-BAUER DE LAS CEPAS DE <i>SALMONELLA ENTERICA</i> AISLADAS DE PINGÜINOS DE MAGALLANES DURANTE EL PERIODO DE MUESTREO 2012.....	33
TABLA 13. RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE SUPERVIVENCIA A DIFERENTES CONDICIONES DE ESTRÉS DE LAS CEPAS DE <i>SALMONELLA ENTERICA</i> AISLADAS DE PINGÜINOS DE MAGALLANES.....	34
TABLA 14. DISTRIBUCIÓN DE LA PRESENCIA DE GENES DE ASOCIADOS A VIRULENCIA EN CEPAS DE <i>SALMONELLA SP.</i> DE DIFERENTES HOSPEDEROS	35
TABLA 15. DISTRIBUCIÓN DE LOS GENES DE VIRULENCIA ENCONTRADOS EN LAS CEPAS EVALUADAS DE ACUERDO AL HOSPEDERO.	37
TABLA 16. DISTRIBUCIÓN DE LOS GENES DE VIRULENCIA ENCONTRADOS EN LAS CEPAS EVALUADAS DE ACUERDO AL ORIGEN GEOGRÁFICO.	37
TABLA 17. DISTRIBUCIÓN DE LOS GENES DE VIRULENCIA ENCONTRADOS EN LAS CEPAS EVALUADAS DE ACUERDO AL SEROTIPO.	38
TABLA 18. DISTRIBUCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA EN LAS DIVERSOS SEROVARES DE <i>SALMONELLA SP.</i>	45

1. INTRODUCCIÓN

La modificación dinámica de la transmisión de enfermedades está influenciada por diversas variables, entre las cuales se destacan el cambio climático, la modificación del hábitat y la adaptación patogénica; en este sentido, el crecimiento exponencial de la población humana, ha llevado a la invasión y degradación del hábitat incrementando la probabilidad del contacto entre humanos y animales, tanto domésticos como silvestres, de forma directa e indirecta (Cabello y Cabello, 2008); esta situación puede llevar a la presentación de enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes, afectando tanto la salud humana como animal; situación que cobra relevancia cuando se observa que cerca del 80% de las enfermedades infecciosas emergentes en humanos son zoonóticas (Woolhouse y Gowtage-Sequeira, 2005) y de estas, entre un 40-50% pueden emplear como reservorios a los animales silvestres (Greger, 2007 y Gilbert *et al*, 2008). El pingüino magallánico (*Spheniscus magellanicus*) es considerado centinela del ambiente marino y dada la elevada densidad poblacional de las colonias durante el periodo reproductivo, la transmisión de agentes infecciosos entre individuos tiene un alto potencial de resultar en epidemias (Bonnedahl *et al*, 2005).

Las infecciones por *Salmonella sp.* en seres humanos son principalmente de origen alimentario, pero también pueden ocurrir a través del contacto con animales infectados o sus heces (Heyman y Thuriaux, 2004). La salmonelosis es una enfermedad que se traduce en cerca de 1,4 millones de infecciones, 15.000 hospitalizaciones y 400 muertes cada año en los Estados Unidos (Voetsch *et al*, 2004 y Mead *et al*, 1999). Este patógeno ha sido declarado de gran importancia epidemiológica (WHO/FAO/OIE, 2004), sin embargo su estudio en pingüinos se ha limitado a ciertas regiones de Argentina, Perú y del continente Antártico (Dimitrov *et al*, 2009; Smith *et al*, 2008 y Bonnedahl *et al*, 2005) y, la infección con *Salmonella spp.* ha sido asociada a la presencia cercana de asentamientos

humanos, ya que su detección se ha restringido a las áreas donde existen visitas esporádicas de turistas o científicos (Barbosa y Palacios, 2009).

Teniendo en cuenta el escaso número de investigaciones respecto al estatus sanitario de los pingüinos magallánicos, dado el papel que juegan como centinelas del ambiente marino, el incremento del turismo ecológico y los asentamientos humanos en cercanías de zonas de anidamiento de estos animales, se plantea como objetivo de este estudio detectar y caracterizar cepas de *Salmonella enterica* en pingüinos de la Región de Magallanes y Antártica Chilena.

2. RESUMEN

La Región de Magallanes y Antártica Chilena es una de las últimas áreas donde el impacto directo de los humanos es limitado. Por este motivo existe un interés científico, creciente en la última década, en evaluar los efectos de las actividades turísticas y pesqueras en las poblaciones silvestres del área. En Chile el impacto de las actividades humanas y las modificaciones ambientales en la presencia de *Salmonella* en colonias de pingüinos no han sido descritos. El objetivo de este estudio, abarco la identificación de cepas *Salmonella enterica* en dos colonias de *Spheniscus magellanicus* en vida libre en el estrecho de Magallanes así como su caracterización fenotípica y genotípica. La tasa de infección fue de 0,61% y se identificaron los serotipos Agona y Enteritidis. Las cepas presentaron resistencia a diversos antibióticos y demostraron tener capacidad de sobrevivir a condiciones de estrés asociado a patogenicidad. Además, se encontró similitud genotípica entre cepas del estudio con cepas aisladas de humanos y gaviotas, lo que sugiere eventos de transmisión inter-especie de *Salmonella* y refuerza el rol potencial de los pingüinos como centinelas de la salud pública en la zona austral.

Palabras clave: Pingüinos, *Salmonella*, Chile

3. ABSTRACT

Antarctic region in one of the last areas where direct human impact is limited, for this reason scientific interest in the last decade growing at assessing the effects of tourism and fishing in wild populations of the area. In Chile, impact of human activities and environmental changes associated with *Salmonella* presence in penguins colonies has not been described. The aim of this study include identification of *Salmonella enterica* strains into two wild life colonies of *Spheniscus magellanicus* in the strait of Magellan as well as phenotypic and genotypic characterization. Rate of *Salmonella* infection was 0.61% with two strains Agona and Enteritidis. These strains were resistant to several antibiotics, and demonstrated a capability to survive on stress conditions associated to pathogenicity. Almost, genotypic similarity was found between strains isolated in this study and strains isolated from humans and gulls, suggesting interspecies transmission of *Salmonella enterica* serotypes and strengthens the role of the penguin as public health sentinels in Austral area.

Keywords: Penguins, *Salmonella*, Chile

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



4.1. *Salmonella enterica*

Taxonomía y Características Generales

Las bacterias del género *Salmonella* pertenecen a la familia Enterobacteraceae, un grupo de bacterias gram-negativas, anaerobias facultativas, que se distribuyen actualmente en dos especies: *S. enterica* y *S. bongori* (CDC, 2007 y Agbaje *et al*, 2011) siendo la especie más reconocida *S. enterica*, que se ha reportado en un amplio rango de hospederos con cerca de 2500 serotipos identificados, clasificándose de acuerdo a sus características antigénicas en seis subespecies siguiendo el esquema propuesto por Kauffmann-White (Tabla 1) (Patrick y François-Xavier, 2007).

Tabla 1. Clasificación de las subespecies de *Salmonella enterica*, de acuerdo al esquema propuesto por Kauffmann-White

I	<i>S. enterica</i> subespecie <i>enterica</i>
II	<i>S. enterica</i> subespecie <i>salamae</i>
IIIa	<i>S. enterica</i> subespecie <i>arizona</i>
IIIb	<i>S. enterica</i> subespecie <i>diarizonae</i>
IV	<i>S. enterica</i> subespecie <i>houtenae</i>
VI	<i>S. enterica</i> subespecie <i>indica</i>

La salmonelosis es una enfermedad infecciosa del ser humano y los animales, causada principalmente por microorganismos de la especie *S. enterica*; reconocidos fundamentalmente como bacterias intestinales que, aunque están ampliamente distribuidas en el ambiente, se encuentran con mayor frecuencia en vertimientos de aguas residuales o cualquier material con contaminación fecal. En el humano, los microorganismos del género *Salmonella* son agentes etiológicos de infecciones intestinales y/o sistémicas, por lo general, como contaminantes de los alimentos de origen animal o la contaminación de frutas y verduras que se han fertilizado o regado con desechos orgánicos (OIE, 2011).

Rango de hospederos y transmisión

Salmonella puede residir en el tracto gastrointestinal tanto de animales de sangre fría como de sangre caliente sin producir obligadamente signología clínica y, ocasionalmente, forma parte de la flora normal de reptiles y anfibios. Existen algunos serotipos especie-específicos, pero en su mayoría tienen un amplio rango de hospederos (McLelland *et al*, 2001). En conjunto, los serotipos producen una gran variedad de infecciones, que van desde gastroenteritis autolimitantes hasta enfermedades sistémicas severas (Ausell *et al*, 2011). En el humano, cualquier individuo que se infecte con *S. enterica* puede enfermar; sin embargo, se ha encontrado una mayor incidencia de la enfermedad en niños menores de 5 años, individuos inmunosuprimidos o adultos mayores (Colville y Berryhill, 2007). Se ha demostrado además, que algunos animales como las aves comerciales, los reptiles y ciertas aves migratorias pueden actuar como vectores de la bacteria; mientras que otros pueden presentar infecciones latentes. Las aves silvestres, se infectan con *Salmonella spp.* por sus hábitos alimenticios rapaces, carroñeros o recogedores de basura, como es el caso de buitres, cuervos y gaviotas

respectivamente; siendo relativamente refractarias a la enfermedad y pudiendo actuar como portadores asintomáticos de la infección (Tizard, 2004).

En aves comerciales, *S. enterica* serovar Enteritidis produce infecciones intestinales asintomáticas, aunque se han descrito brotes agudos de enfermedad y altos niveles de mortalidad en pollos menores de dos semanas. Los huevos son infectados por vía transovárica y contaminación externa de la cáscara (Dunkley *et al*, 2009). La eliminación de las bacteria de las explotaciones es difícil ya que permanece en la materia fecal, el ambiente y es transmitida por roedores e insectos (Suarez y Mantilla, 2000). Una característica epidemiológica importante de *Salmonella* es su capacidad para persistir en la albúmina de los huevos, y se postula que esta capacidad es esencial para la transmisión a los humanos (Figueroa y Verdugo, 2005).

Patogénesis

S. enterica ingresa al organismo por vía oral, siendo la dosis infectiva 50 (ID_{50}) 10^5 a 10^{10} organismos. Luego de la ingestión, la bacteria resiste el ambiente ácido del estómago y supera la competencia de los microorganismos intestinales hasta llegar al íleon, lugar donde invade las células del hospedero en sitios específicos, adhiriéndose a las células epiteliales y a las células M asociadas con las placas de Peyer (Sánchez y Cardona, 2003). Bacterias no patogénicas pueden ser eliminadas por las células M; sin embargo, *Salmonella* sobrevive y crece en los macrófagos protegiéndose de este modo de los mecanismos de defensa del hospedero (Spector y Kenyon, 2011) y, siendo capaz de adaptarse y sobrevivir a las condiciones de estrés intestinal y celular, colonizando e invadiendo la mucosa intestinal mediante la activación de su propia endocitosis. Durante la infección de la célula, *Salmonella* expresa un sistema especializado de secreción de proteínas

conocido como sistema de secreción tipo III que permite secretar e inyectar proteínas bacterianas al citosol. Este sistema de secreción se encuentra codificado al interior del genoma en dos grupos de genes denominados islas de patogenicidad 1 y 2 (SPI-1 y SPI-2). SPI-1 se activa durante la primera fase de la penetración de la mucosa intestinal y SPI-2 actúa durante los estadios subsecuentes de la infección (Cardona y Sánchez, 2005 y Lee *et al*, 2000). Al momento inicial de la infección de la célula, *Salmonella* induce un re-arreglo del citoesqueleto estimulando la formación de pseudópodos que envuelven a la bacteria, terminando en la internalización de la misma en el compartimiento denominado “vacuola que contiene a *Salmonella* (SCV)”. Al invadir los enterocitos, *Salmonella* induce una respuesta proinflamatoria caracterizada por la secreción de diversos mediadores entre los que sobresale IL-8 (Guard-Petter, 2001; Shen y Fang, 2001 y Yim *et al*, 2010). Una infección moderada por *Salmonella* puede ser controlada en los nódulos linfáticos mesentéricos, no obstante, una infección severa puede continuar su diseminación hacia el hígado, bazo u otros órganos.

Resistencia a condiciones de estrés

La intensidad en el cuadro clínico que presente un individuo infectado con *Salmonella*, va a depender en gran medida de las diferentes capacidades de respuesta de la bacteria a las condiciones de estrés que se presentan al interior del organismo (Lu *et al*, 2002) asociado, principalmente a los mecanismos de defensa que se activan ante la infección, incluyendo cambios físico químicos como: temperatura, osmolaridad, pH y mecanismos bactericidas del sistema inmune (Booth *et al.*, 2002)

Salmonella, ha desarrollado múltiples mecanismos de resistencia y/o tolerancia para promover la supervivencia a la exposición de pH normalmente letal (3 o 2,5) conocidos como respuesta de tolerancia a ácido (ATR) y resistencia al ácido (AR) (Spector y Kenyon, 2011), donde la exposición ligera o moderada al estrés ácido resulta en la síntesis de proteínas que protegen a la bacteria frente a un desafío mayor de acidez (Wilmes - Riesenber *et al*, 1996). Dos ATR han sido identificados y se han asociado a cada fase de crecimiento bacteriano, el ATR de fase de crecimiento logarítmico (“logarithmic phase”, LP), que funciona durante la fase de crecimiento exponencial de las células y el ATR de fase de crecimiento estacionario (“stationary phase”, SP) (Dunkley *et al*, 2009 y Spector y Kenyon, 2011). En ambos casos, la exposición a un pH externo moderado induce un sistema de homeostasis del pH, que permite mantener un pH interno que facilita la viabilidad celular cuando el pH externo cae a condiciones letales (Foster, 2001; Dunkley *et al*, 2009 y Spector y Kenyon, 2011).

La inducción de LP-ATR se traduce en mayor resistencia a las condiciones de acidez y confiere resistencia a otros tipos de estrés (estrés oxidativo, alta osmolaridad) (Rychlik y Barrow, 2005 y Spector y Kenyon, 2011). La activación de ATR en cualquiera de las fases es dependiente de la expresión de proteínas reguladoras del estrés ácido ASP (“acid shock proteins”) (Tabla 2). Estas proteínas participan en la adaptación al ambiente ácido, siendo las más importantes: RpoS, Fur, PhoPQ y OmpR/EnvZ (Foster, 2001; Rychlik y Barrow, 2005 y Spector y Kenyon, 2011). El regulador transcripcional RpoS, participa frente a cambios de pH y temperatura (Robbe-Saule *et al*, 2003; Rychlik y Barrow, 2005 y Van Immerseel, 2010), controlando la respuesta al estrés en la fase estacionaria del crecimiento (Robbe-Saule *et al*, 2003; Rychlik y Barrow, 2005 y Dong y Schellhorn, 2010). Fur está ligado a la regulación bacteriana del metabolismo del hierro y participa en el LP-ATR. PhoPQ es esencial para la supervivencia intracelular de *Salmonella* y participa en la expresión de genes SPI-2 y OmpR/EnvZ; está

asociado con la supervivencia en cambios de osmolaridad, controlando la expresión de porinas de membrana externa como *ompF* en condiciones de hipoosmolaridad y *ompC* en condiciones de hiperosmolaridad; también participa en la regulación de los genes SPI-1 Y SPI-2. (Lee *et al*, 2000; Rychlik y Barrow, 2005 y Spector y Kenyon, 2011). En resumen, OmpR/EnvZ, junto con PhoPQ, regulan la expresión de distintos factores de virulencia en condiciones de acidez, mientras que RpoS y Fur protegen la célula contra el estrés ácido (Rychlik y Barrow, 2005).

La capacidad de *Salmonella* para sobrevivir y proliferar dentro de las células fagocíticas, específicamente al interior del SCV, se explica por mecanismos de defensa antioxidativos que pueden eliminar o reparar los daños producidos por las especies reactivas del oxígeno (Hebrard *et al*, 2009). Estas especies reactivas son generadas principalmente a través de la vía NADPH oxidasa y la vía óxido nítrico sintetasa inducida (iNOS, de su nombre en inglés) (Fang, 2004), que al ser inducidas generan los radicales superóxido (O_2^-) y óxido nítrico (NO) respectivamente. Estas moléculas pueden actuar directamente contra *Salmonella* durante el proceso infeccioso, transformarse enzimáticamente en otras especies reactivas (H_2O_2 y NO_2) o reaccionar entre ellas para formar el anión peroxinitrito ($ONOO^-$) (Hebrard *et al*, 2009).

Tabla 2. Reguladores transcripcionales de las proteínas responsables de la respuesta al estrés ácido en *Salmonella* sp.

Estrés Acido	Fase Célula	Regulador Central	Rol
Acido inorgánico		PhoPQ	Virulencia
Acido orgánico	Fase estacionaria	OmpR	Virulencia
	Fase exponencial	Fur	Estrés
		RpoS	Estrés

Fuente: Adaptado de Rychlik *et al.*, 2005.

La capacidad de *Salmonella* para sobrevivir y proliferar dentro de las células fagocíticas, específicamente al interior del SCV, se explica por mecanismos de defensa antioxidativos que pueden eliminar o reparar los daños producidos por las especies reactivas del oxígeno (Hebrard *et al*, 2009). Estas especies reactivas son generadas principalmente a través de la vía NADPH oxidasa y la vía óxido nítrico sintetasa inducida (iNOS, de su nombre en inglés) (Fang, 2004), que al ser inducidas generan los radicales superóxido (O_2^-) y óxido nítrico (NO) respectivamente. Estas moléculas pueden actuar directamente contra *Salmonella* durante el proceso infectivo, transformarse enzimáticamente en otras especies reactivas (H_2O_2 y NO_2) o reaccionar entre ellas para formar el anión peroxinitrito ($ONOO^-$) (Hebrard *et al*, 2009).

Salmonella, por su parte, expresa un arsenal de enzimas detoxificantes (Tabla 3), que difieren en su localización celular y sustrato. En el caso del anión superóxido las enzimas superóxido dismutasa, localizadas en el periplasma y citoplasma bacteriano, dismutan el superóxido a H_2O_2 y oxígeno molecular, considerándose la primera línea de defensa contra el anión superóxido (Herbrard *et al*, 2009). Como segunda línea de defensa existen catalasas, peroxirredoxinas, nitrato y nitrito reductasas, que se encuentran en el citoplasma y/o periplasma bacteriano

(Herbard *et al* 2009, Horst *et al*, 2010 y Lunberg *et al* 2004), y reducen los compuestos evitando así el daño oxidativo.

Tabla 3. Principales enzimas bacterianas asociadas a la reducción de especies reactivas del oxígeno.

Enzima	Localización	Reacción
Superóxido dismutasas	Periplasma	$O_2^- \rightarrow H_2O_2 + O_2$
Catalasas	Citoplasma	$H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$
Peroxirredoxinas	Citoplasma	$H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$
Nitrato reductasas	Periplasma y citoplasma	$NO_3^- \rightarrow NO_2^-$
Nitrito reductasas	Periplasma y citoplasma	$NO_2^- \rightarrow NH_4^+$

Epidemiología

Solamente los serotipos de *S. enterica* subespecie *enterica*, han sido asociados a la presentación de enfermedad en animales de sangre caliente (Amavisit *et al*, 2003); los serotipos patogénicos comparten cerca del 90% del material genético, pero tienen grandes diferencias en cuanto al rango de hospederos y cuadro clínico. Estas diferencias están determinadas por factores de virulencia codificados en las islas de patogenicidad y por elementos génicos móviles, o remanentes de estos, que generan polimorfismo entre las diferentes cepas y serovares de *S. enterica* (Schmidt y Hensel, 2004) jugando un papel importante como factor epidemiológico y clínico de la infección.

Otro factor epidemiológico poco conocido en la transmisión de *S. enterica* está representado por su presencia en aves silvestres. En general, algunos patógenos altamente transmisibles y/o zoonóticos tales como el Virus Influenza, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* o *Cryptosporidium spp.* han sido aislados en estos animales (Barbosa y Palacios, 2009). Este rol como reservorios es crítico por los periodos migratorios que caracterizan algunas de las especies, lo que incrementa la

potencialidad de adquirir y transmitir patógenos en extensas zonas geográficas (Hubalek, 2004). Existen algunos reportes que también sugieren la transmisión directa de *Salmonella spp.* desde las aves silvestres hacia humanos u otros animales, principalmente por contaminación de las fuentes de agua y coexistencia en los hábitats (Harbotle *et al*, 2006; Millan *et al*, 2004 y Reche *et al*, 2003).

La subtipificación molecular, se ha empleado para mejorar la definición epidemiológica de los casos de *Salmonella*, ya que permite caracterizar los brotes en etapa temprana, y detectar asociaciones con focos dispersos geográficamente. En *Salmonella* la tipificación molecular se realiza empleando electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) como método estándar a nivel internacional, el cual se basa en el análisis del DNA cromosómico mediante el establecimiento del "Restriction Enzyme Digestion Profile" (REDP), que se define como el patrón de bandas de DNA característico de cada cepa obtenido con la utilización de una determinada enzima de restricción y tras la realización de la técnica de electroforesis según el protocolo de referencia global proporcionado por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) (Barrett *et al*, 1995; Bedzyk *et al*, 1992 y Ribot *et al*, 2006).

Otra técnica de tipificación molecular empleada, es la virulotipificación, que consiste en la identificación de genes de virulencia. Para el caso de *Salmonella*, dichos genes suelen estar relacionados con la presencia de estructuras genéticas que brindan a la bacteria diversas funciones metabólicas asociadas a la adaptación a nuevos ambientes (profagos) o la especificidad de la bacteria por el hospedero (fimbrias). Empleando este modelo, Huehn *et al*, 2010 plantearon la posibilidad de detectar especificidad relacionada con el hospedero o la zona geográfica mediante la virulotipificación, encontrando variabilidad en la presencia de dichos genes asociada a las diferentes cepas de *Salmonella*.

Los hospederos silvestres

En especies de animales marinos, especialmente aves y mamíferos, se han realizado aislamientos de *S. enterica*, encontrando una prevalencia heterogénea que depende del lugar y las especies muestreadas (Stoddard *et al*, 2008); los serovares más frecuentes en aves acuáticas son *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* (Hubalek, 2004 y Kobayashi *et al*, 2007). En pingüinos son pocos los reportes existentes y como se detalla más adelante los aislamientos están restringidos a colonias de pingüinos Papúa (*Pygoscelis papua*) y Adelia (*Pygoscelis adeliae*, Tabla 4).

4.2. Pingüino de Magallanes (*Spheniscus magellanicus*)

Características generales

Los pingüinos pertenecen al orden Sphenisciforme, familia Spheniscidae que incluye 6 géneros y entre 16 a 19 especies (Boersma, 2008). Estas aves se encuentran distribuidas exclusivamente en el hemisferio sur, habiendo sido observadas en islas de la costa sur de África, Australia y Nueva Zelanda; así como a lo largo del borde costero de Chile, Argentina y Perú (Stonehose, 1975). Son las aves mejor adaptadas a la vida acuática, especializadas en nadar y pescar; tienen hábitos pelágicos y se organizan en colonias reproductivas altamente densas. Los pingüinos ocupan una posición alta en la cadena alimenticia (Jerez *et al*, 2008) y su competencia con la industria pesquera ha hecho que se movilicen hacia sectores cercanos a asentamientos humanos, agua contaminadas y áreas de procesamiento de la industria pesquera; lo cual eleva el riesgo de infección con agentes biológicos para los cuales, los pingüinos, pueden actuar como reservorios (Fowler y Cubas, 2001).

En Chile existen 10 especies de pingüinos pertenecientes a 5 de los 6 géneros existentes; la región de Magallanes y Antártica chilena, es el hábitat de 8 de estas especies donde las zonas costeras, principalmente por su organización en pequeñas islas, constituyen un ecosistema favorable para estas aves. Los pingüinos del genero *Spheniscus*, se dividen en cuatro especies distribuidas por las costas del océano pacifico y atlántico (Boersma, 2008).

El *S. magellanicus*, vive en la costa sur de Sur América incluyendo Chile, Argentina y Brasil (Figura 1), empleando cerca de medio año en cada temporada reproductiva (entre primavera y verano). En invierno, por sus hábitos pelágicos pueden encontrarse errando de forma individual por las costas de Brasil, e incluso hay reportes de avistamientos en Australia, Nueva Zelanda algunas islas en el sur del atlántico. (Venegas, 1999). El pingüino de Magallanes es el más abundante de los miembros de su familia, siendo un estimado de la población actual 1.300.000 parejas; Sin embargo, como todos los miembros de su grupo, se ha visto un descenso en la población en la última década (Boersma, 2008 y IUCN, 2010).



Figura 1. Distribución geográfica del *S. magellanicus*

Agentes infecciosos

A diferencia de las aves comerciales u otras aves silvestres, es poca la información relacionada con la presencia de patógenos en pingüinos. Se han descrito agentes infecciosos y parasitarios (Clarke y Kerry, 1993 y Jones, 1988), aunque son pocos los eventos que han sido asociados a mortalidades masivas (Kerry *et al*, 1999). Como consecuencia de las características de las colonias durante el periodo reproductivo, se estima que esto puede incrementar la transmisión horizontal de los patógenos como en el caso de las aves comerciales.

Diversos factores de estrés, como el contacto con humanos y/o el cambio climático, pueden predisponer a los pingüinos a la presentación de enfermedades. Respecto a esto, existen diferencias fisiológicas y comportamentales de los pingüinos que viven en zonas con estrecha relación con turistas versus aquellas que no la tienen, en donde la respuesta a las condiciones de estrés, aparece tempranamente en los polluelos de las zonas turísticas, comprobado por medio de la medición de la secreción de corticosterona (Boersma, 2008). El factor climático, por otro lado, afecta directamente la habilidad de los pingüinos para adaptarse al ecosistema, jugando un papel decisivo en la capacidad productiva, la disponibilidad de alimento en el hábitat, la capacidad de alimentarse y la habilidad para montar una respuesta inmune adecuada frente a los patógenos (Moller, 2002 y Moller y Erritzoe, 2003).

Se han descrito infectando a estos animales, en cautiverio y en vida libre, algunos agentes bacterianos como *Clamydophila psittaci* (Jencek *et al*, 2012), *Staphylococcus aureus* (Field *et al*, 2012), *Mycobacterium* (Napier *et al*, 2009), *Campylobacter* (Griekspoor *et al*, 2009), *Moraxela* y *Pseudomona* (Zdanowski *et al*, 2004); agentes virales como Avipoxvirus (Kane *et al*, 2012), Paramixovirus (Fornells *et al*, 2012 y Muller *et al*, 2010) y New Castle (Thomaselli *et al*, 2010) y;

parasitarios como *Eimeria*, *Sarcocystis*, *Plasmodium* y *Cryptosporidium* (Barbosa y Palacios, 2009).

Para el caso de *Salmonella* spp (Tabla 4), Dimitrov et al, 2009 describieron su presencia en dos colonias de pingüinos Papúa en la península antártica. Otros estudios realizados en pingüinos de la misma especie y pingüinos Adelia en diversas zonas de la Antártica, reportaron el hallazgo de los serotipos de *Salmonella*: Havana, Typhimurium y Enteritidis con tasas de infección entre el 7% y 38% (Oelke y Steiniger, 1973; Olsen et al 1996; Palmgreen et al, 2000 y Dimitrov et al, 2009).

Tabla 4. Aislamientos de *Salmonella* spp. reportados en diferentes especies de pingüinos

	Tasa de infección	Localización	Referencia
P. Papúa	37,5-18,8	Península Antártica	Dimitrov K, et al; 2009
P. Papúa	7	Bird Island	Palmgren H, et al; 2000.
P. Papúa	3	Bird Island	Olsen B, et al; 1996
P. Adelia	12	Antártica	Oelke H y Steiniger F ; 1973

Importancia Epidemiológica

La contaminación ambiental con heces procedentes de humanos o animales domésticos, representan una vía potencial de infecciones para la fauna silvestre con agentes zoonóticos (Applebee et al, 2005). Es considerada como una práctica de alto riesgo la descarga directa en actividades agrícolas y riego, así como el tratamiento inadecuado de los residuos humanos que llegan a los ríos y mares. En este escenario, *Salmonella enterica* y otros enteropatógenos pueden constituirse como marcadores biológicos de la contaminación fecal; que por su habilidad de sobrevivir en el agua pueden causar brotes asociados a tormentas, inundaciones o

aguas residuales; que transfieren aguas contaminadas a los ecosistemas marinos locales (Miller *et al*, 2010). Por esta razón, la identificación de los enteropatógenos en los animales silvestres, se ha propuesto como un indicador del impacto humano en los ecosistemas (Dimitrov, 2009).

Las actividades al aire libre como el ecoturismo, han aumentado su popularidad en los últimos años, facilitando la migración de patógenos hacia áreas silvestres. Los pingüinos, están particularmente involucrados en estas actividades, dado que por su ubicación exclusiva en el hemisferio sur, cientos de personas viajan anualmente a través del mundo para conocerlos (Boersma, 2008). En Chile, las colonias de *S. magellanicus* más visitadas se encuentran en el Estrecho de Magallanes y, son pocos los estudios sanitarios desarrollados que permitan establecer la prevalencia de ciertos agentes infecciosos como *Salmonella* spp. en pingüinos y, determinar el efecto del ser humano en la salud de la fauna silvestre.

5. HIPÓTESIS EXPERIMENTAL

- Existen cepas de *Salmonella enterica* en *Spheniscus magellanicus* de la Región de Magallanes y Antártica Chilena
- Las cepas de *Salmonella enterica* de los pingüinos, presentan similitud fenotípica y genotípica con cepas aisladas previamente en humanos y aves comerciales.

6. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar fenotípica y genotípicamente cepas de *Salmonella enterica* aisladas desde *S. Magellanicus* que habitan en las colonias reproductivas de la Isla de Magdalena y Seno Otway, Región de Magallanes y Antártica Chilena.

6.1. *Objetivos específicos*

- Aislar y caracterizar fenotípicamente las cepas de *Salmonella enterica* presentes en individuos *S. magellanicus* que habitan la Región de Magallanes y Antártica Chilena, durante el periodo reproductivo.
- Tipificar genotípicamente las cepas de *Salmonella enterica* presentes en los individuos del estudio.
- Determinar semejanzas fenotípicas y genotípicas entre las cepas de *Salmonella enterica* aisladas en el presente estudio y cepas aisladas previamente en humanos y aves comerciales.

7. MATERIALES Y MÉTODOS



7.1. Las muestras

El tamaño de la muestra se determinó teniendo en cuenta los antecedentes de la prevalencia de *Salmonella spp.* en estudios realizados previamente; estimando un tamaño de muestra $n=645$, considerando $\alpha=0,05$, $d=0,10$, $1-\beta=80\%$ (Dimitrov *et al*; 2009) para lograr el aislamiento de al menos 15 cepas. La toma de muestras se realizó en el periodo estival 2011 - 2012; colectando muestras de hisopados cloacales a los pingüinos de las colonias de la Isla de Magdalena ($n=436$) y Seno Otway ($n=210$) en la Región de Magallanes y la Antártica Chilena. Cuando fue posible, se tomaron heces frescas. Las muestras fueron conservadas a 4°C en medio de transporte Cary-Blair.

Los animales fueron capturados con red tipo chinguillo y posterior contención manual (Figura 2) por un tiempo inferior a los 10 minutos, siguiendo el protocolo recomendado por Global Penguin Society y, respetando las recomendaciones entregadas por la Corporación Nacional Forestal de Chile (CONAF). Para este procedimiento se contó con la autorización de CONAF, la Subsecretaría de Pesca (SUBPESCA) y TourisOtway (Administrador de la pingüinera en Seno Otway). Una vez registradas las variables morfométricas de cada individuo (largo y alto del pico, largo del ala y del pie, peso, evaluación de la pérdida de plumas de la cara y género estimado de acuerdo al alto del pico), se realizó identificaron de cada espécimen mediante la colocación de un crotal metálico numerado (National Band and Tag Corp®) en el pliegue interdigital externo del

miembro inferior izquierdo. Una vez obtenidas las muestras y finalizado el procedimiento, los animales fueron liberados en el mismo sitio de su captura.

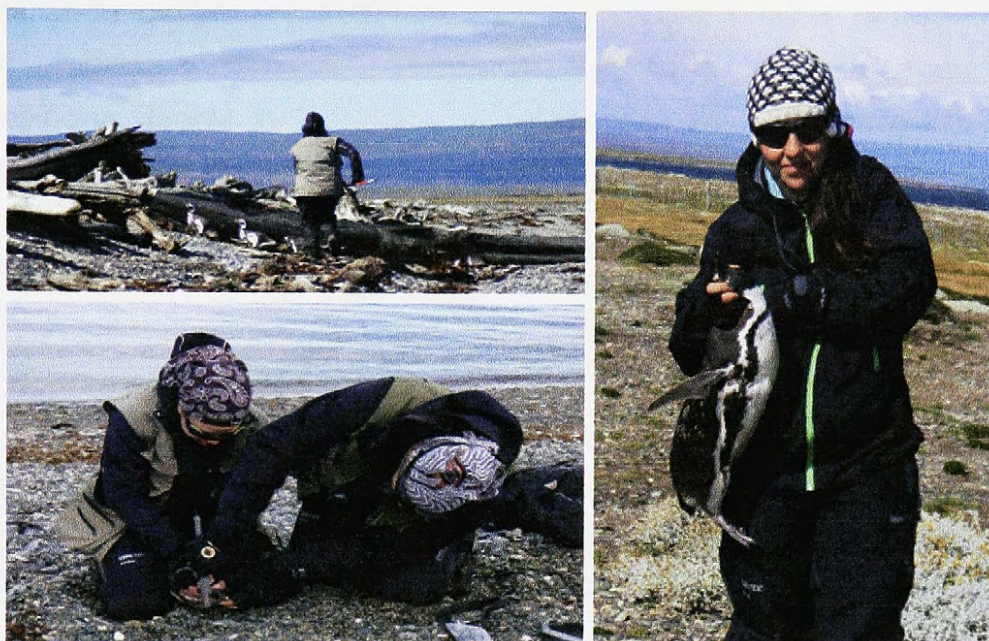


Figura 2. Método de captura y sujeción de los individuos *S. magellanicus* para el marcaje y toma de muestras

Para realizar las comparaciones genotípicas entre las cepas aisladas en el presente estudio y cepas de otros hospederos aisladas previamente, se emplearon cepas de *S. enterica* suministradas por el Instituto de Salud Pública (ISP) en casos humanos, por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) para el caso de aves comerciales y aislados de aves silvestres realizados por el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas, en número equivalente.

7.2. Aislamiento bacteriológico

Se realizó empleando una adaptación del protocolo descrito por la ISO 6579:2002(E). En resumen, se realizó inoculación de cada tórula en 5mL de

caldo APT (APT Broth, Difco BD.) suplementado con 20µg/mL novobiocina (Sigma) y se incubó por 24h ± 2h a 37°C ± 1°C; luego, de las muestras que presentaron turbidez en el caldo se tomaron 100µL que fueron inoculados en agar modificado semisólido Rappaport Vassiliadis (MSRV, Oxoid) con novobiocina (Jansen *et al*, 2003) e incubados a 41,5 ± 1°C durante 24h ± 3h (hasta 48h). Las muestras que presentaron crecimiento con difusión, fueron sembradas por agotamiento con asa bacteriológica en agar Xylose Lysine Deoxycholate (XLD, Medium, Difco, BD.) e incubadas a 37 ± 1°C por 24 ± 3h.

7.3. Confirmación por PCR

Se evaluaron varias colonias desde el conglomerado en la placa, empleando los partidores para identificar la presencia del gen *invA* de *S. enterica* (Tabla 5, Hughes *et al*, 2008). Este gen ha sido documentado ampliamente para la detección específica de *S. enterica*, dado que es un gen marcador que codifica para una proteína de membrana necesaria para la invasión de las células epiteliales (Darwin y Miller, 1999). Posteriormente de las placas positivas, se repitió el procedimiento para al menos 3 colonias, hasta identificar la colonia positiva.

La extracción del DNA fue desarrollada por calor. Los segmentos amplificados, separados en la electroforesis en agarosa 1%, fueron visualizados empleando la tinción GelRed® siendo consideradas positivas las muestras con amplificados de 284pb.

Tabla 5. Partidores para la detección del gen *invA* de *Salmonella enterica*

Partidor	Nombre	Secuencia 5´ - 3´	Tm (°C)
<i>invA</i>	inv_D	ctggcgggggtttgtgtctctctatt	65.6
	Inv_R	agtttctccccctctcatgcgttacc	65.8



7.4. Confirmación bioquímica

De acuerdo al protocolo descrito por la ISO 6579:2002(E) se seleccionaron hasta 5 colonias (al menos 3 colonias) consideradas típicas o sospechosas desde el agar XLD y, se realizó confirmación de las cepas de *S. enterica* mediante la evaluación de las propiedades bioquímicas tales como fermentación de azúcares, producción de gas, producción de H₂S, decarboxilación y desaminación de lisina, entre otros; empleando el panel bioquímico API20E Biomeriux de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

7.5. Caracterización fenotípica

Serotipificación

La serotipificación de las cepas de *S. enterica* se realizó de acuerdo al protocolo de Kauffmann-White en el Instituto de Salud Pública (ISP).

Pruebas de supervivencia a factores de estrés

Las cepas de *S. enterica* se sembraron en medio Luria-Bertani (LB) (Bacto Tryptone 10 g/L; Bacto Yeast Extract 5g/L y NaCl 5g/L) ajustado a pH 7.0 (NaHPO₄/NaH₂PO₄ 25mM) a 37°C con agitación. El medio fue solidificado con la adición de agar (15g/L) y se realizaron los siguientes ensayos de tolerancia a condiciones de estrés (Lu *et al*, 2002) empleando 3 colonias por muestra y desarrollando cada ensayo por triplicado:

- **Ensayo de supervivencia a NaNO₂ 10mM:** De las cepas crecidas en caldo LB se realizaron diluciones de 1:100 en caldo LB pH 5 (tampón citrato de

sodio/ácido cítrico 0,1M), y se agregó NaNO_2 a una concentración final de 10mM. Luego el inoculo se incubó en agitación a 37°C durante 3h. La supervivencia se evaluó con el recuento de UFC a los tiempos 0 y 3h, expresando los valores en porcentaje respecto del tiempo 0, que se consideró como el 100%.

- **Ensayo de supervivencia a H_2O_2 15mM:** De las cepas crecidas en caldo LB se realizaron diluciones de 1:100 en caldo LB, se agregó H_2O_2 a una concentración final de 15mM y se incubó en agitación a 37°C durante 30 min. La supervivencia se evaluó con el recuento de UFC a los tiempos 0 y 30 min expresando los valores en porcentaje respecto del tiempo 0, que se consideró como el 100%.

- **Ensayo de supervivencia a pH ácido:** De las cepas crecidas en caldo LB se realizaron diluciones de 1:100 en caldo LB pH3 y se incubó en agitación a 37°C durante 30 min. La supervivencia se evaluó con el recuento de UFC a los tiempos 0 y 30 min expresando los valores en porcentaje respecto del tiempo 0, que se consideró como el 100%.

Prueba de resistencia a antimicrobianos

Se realizó empleando el método de difusión en placa (Kirby-Bauer) de acuerdo a las normas recomendadas por el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006). Inicialmente se sembraron las cepas en 2mL de APT y se incubaron por 18 a 24 h a $36\pm 1^\circ\text{C}$, empleando como referencia la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922. Luego 100 μL de la suspensión bacteriana se inocularon en 5 mL de APT, se midió la concentración inicial por espectrofotometría OD_{600} , se incubaron en agitación a 37°C midiendo el

crecimiento regularmente hasta alcanzar una $OD_{600} = 0,25$ ($1-5 \times 10^8$ UFC/mL). Cada suspensión bacteriana, fue sembrada en césped sobre la superficie de una placa de agar Mueller-Hinton empleando una tórula de algodón estéril, para luego colocar los sensidiscos de antibiótico; las placas fueron incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 a 24h y finalmente se realizó la lectura midiendo el diámetro del halo de inhibición del crecimiento bacteriano proyectado desde el sensidisco, interpretándose como Sensible (S), Sensibilidad Intermedia (I) o Resistente (R) usando como pauta los rangos establecidos por el CLSI (Tabla 6), para este trabajo, las cepas se clasificaron en sensibles o resistentes, considerandose también como resistentes las cepas que presentaron halos de difusión equivalentes a la sensibilidad intermedia.

Tabla 6. Antimicrobianos utilizados y valores de referencia para determinar la sensibilidad antibiótica de acuerdo al método de difusión en placa.

Antibiótico	Código	Diámetro Estándar (mm)			Control (mm) <i>E. coli</i> ATCC25922
		Resistente	Intermedio	Susceptible	
Ampicilina	AMP-10	<13	14-16	>17	16-22
Amoxicilina- Acido clavulánico	AMC-30	<13	14-17	>18	18-24
Cefotaxima	CTX-30	<14	15-22	≥ 23	29-35
Gentamicina	GM-10	<12	13-14	≥ 15	19-26
Tetraciclina	TE-30	<14	15-18	≥ 19	18-25
Sulfamethoxazol- trimethoprim	STX-25	<10	11-15	≥ 16	23-29
Enrofloxacina	ENR-5	≤ 15	16-20	≥ 21	32-40
Cefadroxila	CFR-30	≤ 14	15-17	≥ 18	12-18
Ceftiofur	EFT-30	≤ 14	15-22	≥ 23	26-31
Cefradina	CE-30	≤ 14	15-17	≥ 18	12-14

7.6. Caracterización genotípica

Se emplearon las cepas de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis y Agona aisladas desde los pingüinos y, cepas de los mismos serovares, disponibles en el cepario del Laboratorio de Enfermedades Infecciosas aisladas desde humanos, aves comerciales y aves silvestres (Tabla 7), desarrollando los protocolos de virulotipificación y electroforesis de campo pulsado (PFGE).

Tabla 7. Listado de cepas de *Salmonella enterica* empleadas para la caracterización genotípica.

ID LAB.	Serotipo	Procedencia	Origen
SAG2	Agona	Gaviota	Valparaíso
SAG4	Agona	Humano	No Reportado
SAG5	Agona	Humano	No Reportado
SAG1	Agona	Pingüino Magallanes	Magallanes
SAG3	Agona	Pingüino Magallanes	Magallanes
SAG6	Agona	Pingüino Magallanes	Magallanes
SEN81	Enteritidis	Ave Comercial	Valdivia
SEN82	Enteritidis	Ave Comercial	Valdivia
SEN84	Enteritidis	Ave Comercial	Arica
SEN87	Enteritidis	Ave Comercial	Región Metropolitana
SEN88	Enteritidis	Ave Comercial	Región Metropolitana
SEN15	Enteritidis	Gaviota	Bio-Bio
SEN17	Enteritidis	Gaviota	Bio-Bio
SEN98	Enteritidis	Gaviota	Coquimbo
SEN99	Enteritidis	Gaviota	Coquimbo
SEN22	Enteritidis	Humano	Región Metropolitana
SEN24	Enteritidis	Humano	Región Metropolitana
SEN75	Enteritidis	Humano	No Reportado
SEN96	Enteritidis	Pingüino Magallanes	Magallanes

Virulotipificación

Las cepas se cultivaron en medio LB y se incubaron en agitación a 37°C por 20 horas, posteriormente se extrajo el ADN de las cepas utilizando el método de extracción por columnas del “High pure PCR template preparation kit” de Roche® siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Los genes que se detectaron fueron seleccionados por presentar una distribución variable entre cepas de *S. Enteritidis* de acuerdo a lo reportado por Huehn *et al*, 2010 y Pan *et al*, 2009. Tanto los genes, su función y los partidores para su detección, se detallan en la tabla 8.

Tabla 8. Genes evaluados para el establecimiento de los virulotipos en el presente estudio

Gen	Localización	Función	Partidores	Producto (pb)	Ref.
<i>GipA</i>	Bacteriófago Gifsy-1	Factor de virulencia específico de Placas de Peyer.	acgactgagcaggctgag ttgaaatggtgacgg tagac	518	Huehn <i>et al</i> , 2010
<i>TrhH</i>	Isla genómica <i>Salmonella</i> I	Proteína ensambladora del pili hipotética	aactggtgccgtgt cattg gatggtctgtgctg ctgag	418	Huehn <i>et al</i> , 2010
<i>spvC</i>	Plásmido pSLT	Región <i>spv</i> promotora de un Rápido crecimiento y supervivencia en el hospedero	ctcctgcacaaccaa atgcg tgtctctgcatttcaccacat c	570	Huehn <i>et a</i> , 2010
<i>Sira</i>	Islote	Sistema de dos componentes con barA	tgcgcctggtgacaaa actg actgactcccaggctacag ca gcctaaggtagtgtgactct c	313	Huehn <i>et al</i> , 2010
<i>prot6e</i>	Plásmido pSLT	Fimbria	ctagcagccgttggtat cc	579	Huehn <i>et al</i> , 2010

<i>pefA</i>	Plásmido pSLT	Fimbria	cctgtgacctgaccactctg gtaagccactgcgaaagat g gtgaaattatgccac gttcgggcaa	418	Huenh <i>et al</i> , 2010
<i>invA</i>	Cromosoma	Proteína exportadora del complejo aguja	tcatgcaccgcaaa ggaacc gatcgctggctgctc	284	Malomy, 2003
<i>SEN1417</i>	Cromosoma	Transportador putativo de aminoácidos	ctgaccgtaatggcga	670	Pan, 2009

Se realizó un PCR convencional para cada gen 1 unidad de Platinum® Taq DNA polymerase (Invitrogen, Brazil); 10x PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂; 0.2 mM de cada dinucleotido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 5µM de cada partidor (forward / reverse), 0.5 µl del templado de DNA y agua calidad PCR para completar un volumen de reacción de 10 µl. El PCR se realizó teniendo en cuenta las condiciones de amplificación descritas en la tabla 9, y finalmente los productos fueron visualizados mediante electroforesis en gel agarosa al 1% con tinción con GelRed®.

Tabla 9. Condiciones de amplificación PCR para detección de Virulotipos en *Salmonella sp.*

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

PFGE

Se elaboraron los plugs para la PFGE empleando bacterias crecidas en agar LB. Se realizó una suspensión bacteriana en 3mL de CSB (TRIS 100mM, EDTA 100mM, pH 8,0) empleando un hisopo estéril y se ajustó a una concentración de 0,8 (OD_{420nm}) considerando un volumen final de 400uL; posteriormente se adicionaron 20µL de proteínasa K (20mg/mL) y se formaron los plugs con 400µL de agarosa Seakem Gold 1% (al menos 2 plugs por muestra). Se realizó la lisis bacteriana incubando los plugs en 5mL de CLB (TRIS 50mM, EDTA 50mM, N-L Sarkosyl 1%, pH 8,0) + 25µL de proteínasa K (20mg/mL) por 3 horas a 55°C; a continuación se retiró el CLB y se realizaron lavados de los plugs, dos veces con 5mL de H₂O desionizada estéril y 3 veces con 5mL de Buffer TE (TRIS 1000mM, EDTA 500mM, pH 8,0); incubando entre cada lavado en baño termostático a 50°C durante 20 minutos, finalmente los plugs fueron almacenados en refrigeración a 4°C inmersos en 1mL de buffer TE.

Se cortaron los plugs en fragmentos de 2mm y realizó la digestión incubando los plugs en una solución de predigestión por 20 minutos a 37°C y posteriormente en la solución de digestión enzimática con la enzima *Xba*I (Tabla 10) por 3 horas a 37°C. Se realizó el montaje de la cámara de electroforesis preparando un gel con Certified PFGE Agarosa (Bio-Rad®) donde se cargaron los plugs de 2mm y se realizó la electroforesis en el CHEF DRIII CHILER (Bio-Rad®) teniendo en cuenta los parámetros indicados en el protocolo PulseNet para *Salmonella* (Auto Algoritmo b-low MW, 700 kb-high MW, pulso inicial de 2,16 sg y un pulso final de 63,8sg, en un tiempo total de 21 horas); se adicionaron 0,072g de tiourea al Buffer TBE de corrida. Se retiró el gel finalizando el tiempo y se realizó la tinción con bromuro de etidio por 30 min,

se lavó el gel con H₂O desionizada estéril y se capturó la imagen para realizar el análisis y los dendogramas.

Tabla 10. Soluciones de pre-digestión y digestión de los plugs para la PFGE de cepas de *Salmonella enterica*, empleando la enzima *Xba*I

	Predigestión	Digestión
H2O desionizada para PCR	135 µL	130 µL
Buffer Restricción 10X (Tango® Buffer)	15 µL	15 µL
Enzima <i>Xba</i> I	0 U	50 U

7.7. Análisis de Resultados

Se desarrolló un ANOVA no paramétrico, empleando la prueba Kruskal Wallis ($p < 0,05$) para realizar la comparación entre los valores obtenidos de cada ensayo realizado en la caracterización fenotípica de las muestras. Se elaboraron tablas de contingencia para analizar los resultados de distribución de genes de virulencia de las distintas cepas agrupadas según hospedero, procedencia, serotipo o perfil de resistencia antibiótica empleando el estadígrafo de Pearsons para determinar diferencias ($p < 0,05$). Los análisis se desarrollaron empleando el programa InfoStat® V2010.

Para el análisis del PFGE se determinó la similitud de las cepas de acuerdo al coeficiente de Dice, y se realizó el árbol filogenético empleando el programa GelCompair® estableciendo los clúster de acuerdo al algoritmo UPGMA con un 1.0% de tolerancia en la posición de las bandas.

Finalmente, teniendo en cuenta los virulotipos obtenidos y el PFGE, se confeccionaron árboles filogenéticos incluyendo las cepas de los diversos hospederos utilizando el programa TREECON®.

8. BIOSEGURIDAD

S. enterica está clasificada como un agente de riesgo intermedio de acuerdo al Manual de Medidas de Bioseguridad CONICYT. Las medidas de contención correspondieron a un nivel de aislamiento tipo II, y por este motivo se consideraron los siguientes aspectos de bioseguridad en el proyecto:

- Transporte, manejo de las muestras y desarrollo de los análisis haciendo énfasis en los estándares de bioseguridad descritos por los organismos de referencia nacional (SAG, ISP) e internacional (OIE; OMS).
- Toma y manipulación de muestras empleando elementos de protección personal adecuados (overoles, botas, guantes, mascarilla, delantales)
- Todo el personal que manipuló las aves del muestreo fue vacunado contra influenza de acuerdo a las recomendaciones dadas por la OMS.
- Los protocolos se realizaron en Cabina de Bioseguridad Nivel IIA
- Existió acceso restringido a las áreas de laboratorio, señalización de peligro, desinfectante y contenedores especiales para almacenar el material contaminado, los cuales fueron aptos para uso en autoclave.
- En todos los laboratorios participantes, los residuos químicos peligrosos eran almacenados en contenedores especiales hasta su neutralización y eliminación.

9. RESULTADOS

9.1. Aislamiento bacteriológico

Se aislaron 4 cepas de *Salmonella enterica* (Tabla 11), con una tasa de aislamiento total en *S. magellanicus* de 0,61%

Tabla 11. Detección de *Salmonella* spp, en *Spheniscus magellanicus* en la Región Magallanes y Antártica de Chilena.

Origen	Muestras Positivas	Tasa de reacción (n)
Isla Magdalena	2	0,45% (2 / 436)
Seno Otway	2	0,95% (2 / 210)
TOTAL	4	0,61% (4 / 646)

9.2. Caracterización fenotípica

Serotipificación y Resistencia Antibiótica.

En la tabla 12 se encuentra el registro de la serotipificación y el ensayo de resistencia antibiótica realizado a las cepas de *S. enterica*. Todas las cepas del serotipo Agona, resultaron resistentes, al menos, a un antibiótico.

Tabla 12. Resultados de la serotipificación y ensayo de Kirby-Bauer de las cepas de *Salmonella enterica* aisladas de pingüinos de Magallanes durante el periodo de muestreo 2012

Cepa	Serotipo	Procedencia	Kirby-Bauer
SEN96	Enteritidis	Seno Otway	Sensible
SAG1	Agona	Isla Magdalena	R:EFT
SAG3	Agona	Seno Otway	R:EFT
SAG6	Agona	Isla Magdalena	R:AMP, EFT, CTX

R: Resistente, EFT: Cefitofur, CTX: Cefotaxima, AMP: Ampicilina

Pruebas de supervivencia a factores de estrés

Tabla 13. Resultados de los ensayos de supervivencia a diferentes condiciones de estrés de las cepas de *Salmonella enterica* aisladas de pingüinos de Magallanes.

Cepa	% Supervivencia			Desviación Estándar		
	NaNO ₂	H ₂ O ₂	pH 3	NaNO ₂	H ₂ O ₂	pH 3
SEN96	5,47	4,43	148,15	1,06	1,78	11,50
SAG1	4,78	6,09	161,02	1,74	0,72	26,12
SAG3	8,99	9,74	73,42	1,00	1,63	25,33
SAG6	7,26	56,96	115,79	3,10	3,26	22,28

Los resultados de los ensayos de supervivencia a condiciones de estrés se encuentran registrados en la Tabla 13 y la Figura 3. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la capacidad de supervivencia de las cepas en presencia de NaNO₂ 10mM (Figura 3A), mientras que se encontraron diferencias significativas en la capacidad de supervivencia de las cepas a condiciones de hiperosmolaridad en el ensayo de supervivencia a H₂O₂ 15 mM (Figura 3B) y de pH ácido (Figura 3C)

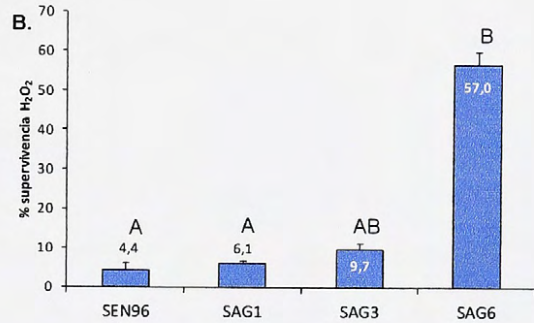
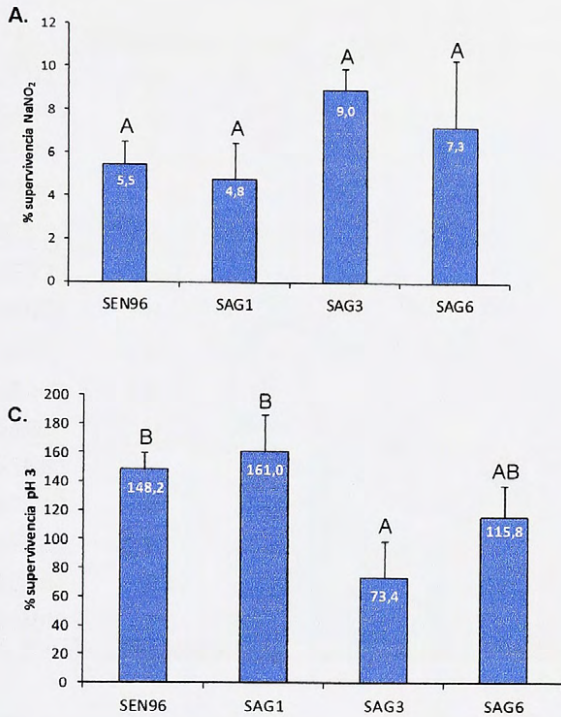


Figura 3. . Porcentaje (%) de supervivencia de las cepas de *Salmonella enterica*, aisladas de *Spheniscus magellanicus* sometidas a diferentes condiciones de estrés. Las barras con letras distintas implican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en la prueba de Kruskal - Wallis. **A.** Porcentaje de supervivencia a NaNO₂ 10mM, **B.** Porcentaje de supervivencia a H₂O₂ 15mM y **C.** Porcentaje de supervivencia a pH3

Virulotipificación

La presencia de los genes de virulencia se describe en la tabla 14, donde la presentación del gen está representada por el sombreado en las celdas. Para este estudio fueron determinados 10 virulotipos, 4 para *S. Agona* y 6 para *S. Enteritidis* (Tabla 17).

Tabla 14. Distribución de la presencia de genes de asociados a virulencia en cepas de *Salmonella sp.* de diferentes hospederos

ID.	Hospedero	Genes de Virulencia							
		<i>invA</i>	<i>pefA</i>	<i>spvC</i>	<i>sirA</i>	<i>gipA</i>	<i>SEN1417</i>	<i>trhH</i>	<i>prot6e</i>
SAG1	S	■	■				■		■
SEN96	S	■	■				■		■
SAG3	S	■			■		■		■
SAG6	S	■			■		■		■

ID.	Hospedero	Genes de Virulencia							
		<i>invA</i>	<i>pefA</i>	<i>spvC</i>	<i>Sira</i>	<i>gipA</i>	<i>SEN1417</i>	<i>trhH</i>	<i>prot6e</i>
SEN15	G	■					■		
SEN17	G	■					■		
SAG2	G	■			■				■
SEN98	G	■	■	■			■		■
SEN99	G	■	■	■			■		■
SEN22	H	■	■	■			■		■
SEN24	H	■	■	■			■		■
SEN75	H	■	■	■	■				■
SAG4	H	■	■	■	■		■	■	■
SAG5	H	■	■	■	■		■	■	■
SEN81	P	■	■	■	■				■
SEN82	P	■	■	■	■	■			■
SEN84	P	■	■	■	■				■
SEN87	P	■	■	■	■				■
SEN88	P	■	■	■	■				■

S: *Spheniscus magellanicus*, G: *Larus dominicanus*, H: Humano, P: Aves domésticas

Se encontraron diferencias significativas ($p=0,0362$) en la distribución de los genes de virulencia asociadas al hospedero (Tabla 15). Por otro lado se encontraron diferencias significativas ($p=0,0257$) entre los virulotipos y la localización geográfica de procedencia de las muestras, donde claramente se observa que las muestras de la Región Metropolitana se encontraron asociadas con el Virulotipo I (Tabla 16). Para este mismo virulotipo se encontró asociación con el serotipo Enteritidis ($p=0,0252$, Tabla 17). No se encontraron diferencias significativas en la distribución de los virulotipos y su asociación con la resistencia antibiótica ($p=0,2509$).

Tabla 15. Distribución de los genes de virulencia encontrados en las cepas evaluadas de acuerdo al hospedero.

Vir cod	Genes de Virulencia								Hospedero*				Total
	<i>InvA</i>	<i>pefA</i>	<i>spvC</i>	<i>sirA</i>	<i>gipA</i>	<i>SEN1417</i>	<i>trhH</i>	<i>prot6e</i>	G	H	P	S	
C	1	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	2
J	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	2	2
K	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	2
S	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1
Q	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1
T	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1
L	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
A	1	1	1	0	0	1	0	1	1	2	0	0	3
I	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	4	0	5
N	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1
Total									5	5	5	4	19

Vir cod: Código alfabético asignado al virulotipo; el cual se emplea también en los dendogramas de PFGE *G=*Larus dominicanus*, H: Humano, P: Aves Domésticas, S: Pingüino de Magallanes

Tabla 16. Distribución de los genes de virulencia encontrados en las cepas evaluadas de acuerdo al origen geográfico.

Genes de Virulencia									Origen*						Total	
<i>invA</i>	<i>pefA</i>	<i>spvC</i>	<i>Sira</i>	<i>gipA</i>	<i>SEN1417</i>	<i>trhH</i>	<i>prot6e</i>	BB	CQ	MG	NR	RM	VL	VP		
1	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2	
1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	2	0	0	0	0	2	
1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	2	
1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	
1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	
1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	
1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	
1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	2	0	0	3	
1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	3	1	0	5	
1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	
Total									2	2	4	3	5	2	1	19

*BB=Bio-Bio, CQ: Coquimbo, MG: Magallanes, NR: No Reportado, RM: Región Metropolitana, VL: Valdivia, VP: Valparaíso

Tabla 17. Distribución de los genes de virulencia encontrados en las cepas evaluadas de acuerdo al Serotipo.

Genes de Virulencia								Serotipo		Total
<i>invA</i>	<i>pefA</i>	<i>spvC</i>	<i>sirA</i>	<i>gipA</i>	<i>SEN1417</i>	<i>trhH</i>	<i>prot6e</i>	Agona	Enteritidis	
1	0	0	0	0	1	0	0	0	2	2
1	0	0	0	0	1	0	1	2	0	2
1	0	0	1	0	1	0	1	2	0	2
1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1
1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1
1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1
1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1
1	1	1	0	0	1	0	1	0	3	3
1	1	1	1	0	0	0	1	0	5	5
1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1
Total								6	13	19

PFGE

Se realizó la caracterización genotípica de las 4 cepas de *S. enterica* aisladas desde los pingüinos, desarrollando el protocolo PFGE establecido por PulseNet® (Figura 4) y se realizaron comparaciones con 5 cepas de *Salmonella* Enteritidis de aves comerciales, 5 cepas de *Salmonella* de humanos (3 *S. Enteritidis*, 2 *S. Agona*) y 5 cepas de *Salmonella* de aves silvestres (4 *S. Enteritidis* y 1 *S. Agona*), dada la disponibilidad de las cepas (Figura 5). Se incluyeron, en los datos de cada cepa, la información correspondiente a los virulotipos (Tabla 14) y los ensayos de resistencia antibiótica (Tabla 12) para observar si existía algún patrón de distribución en los clusters en relación a estas variables.

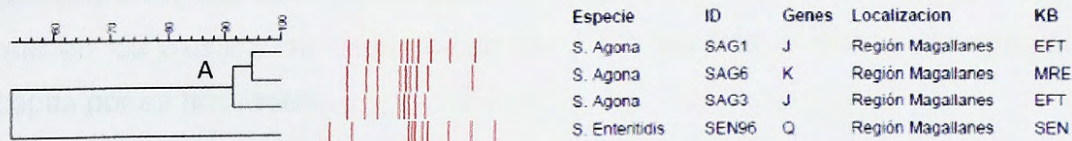


Figura 4. Dendrograma obtenido por análisis de PFGE utilizando la enzima *Xba*I con las cepas de *S. enterica* aisladas desde las muestras 2012 obtenidas desde pingüinos de la Región de Magallanes y Antártica Chilena. ID: Identificación de la muestra y KB: Resultado Kirby-Bauer

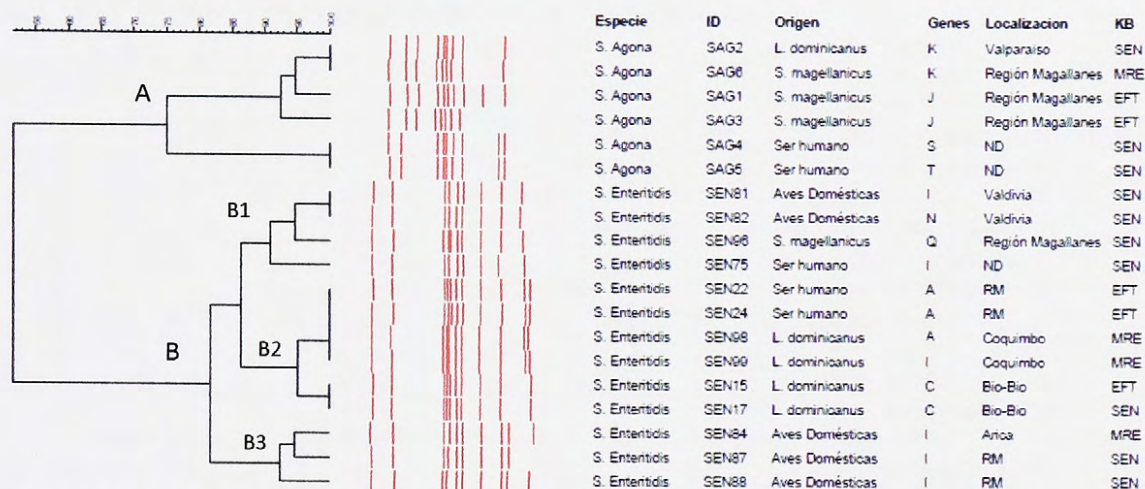


Figura 5. Dendrograma obtenido por análisis de PFGE utilizando la enzima *Xba*I con las cepas de *S. enterica* aisladas desde pingüinos, humanos, aves comerciales y aves silvestres en Chile. *ID*: Identificación de la muestra y *KB*: Resultado Kirby-Bauer

En las figuras 4 y 5 se observan 2 agrupamientos claros relacionados directamente a los serotipos. El cluster A en los dos gráficos corresponde a la agrupación donde se destaca la similitud del 100% entre una cepa de pingüino (SAG6) con una aislada en gaviota dominicana (SAG2). En el cluster B, donde se encuentran las cepas de *S. Enteritidis*, se identifican 3 nodos: B3, en la cual están la mayoría de aislados de aves domésticas todas con el mismo virulotipo I; B2, que contiene las cepas de gaviota dominicana con dos aislados humanos (SEN22 y SEN24) que no comparten un virulotipo pero que presentan resistencia a al menos un antibiótico y B1 donde se encuentran la cepa del pingüino, de humanos y de aves comerciales todas sensibles en el antibiograma. En este análisis se destacó la organización de los clúster en relación directa con el serotipo, mientras que en los clusters de *S. Enteritidis* B2 y B3 hay una tendencia de agrupar las cepas por su hospedero.

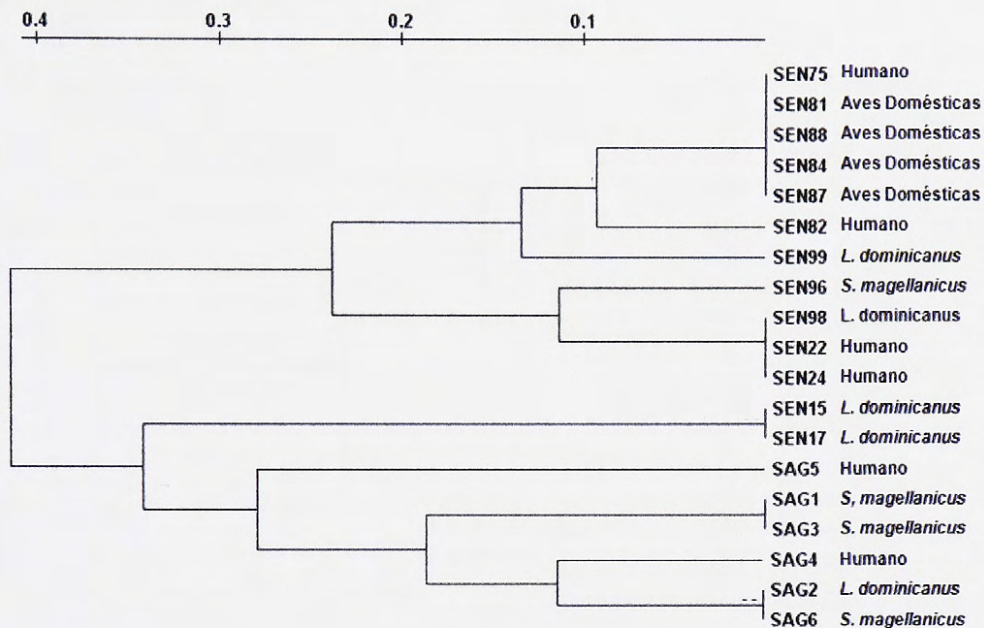


Figura 6. Dendrograma generado por virulotipos. Representa la diferencia genética entre las distintas cepas en porcentaje.

El dendrograma de la cepas, basado en los virulotipos (Figura 6) presentó una distribución en 2 clúster, aunque a diferencia de PFGE, no se logró una discriminación completa entre serotipos.

Por último el árbol basado en los resultados conjuntos de los virulotipos y los patrones PFGE (Figura 7), se observan 2 clusters, A y B, conformados por los serotipos Enteritidis y Agona, respectivamente; la distribución de las Agona fue similar a lo observado en el PFGE; el clúster formado por las cepas Enteritidis, se dividió en 3 nodos: A3 con 2 cepas aisladas de *L. dominicanus*, A2 con las otras cepas aisladas de *L. dominicanus*, humanos y la cepa de *S. magellanicus* y, finalmente A1, con la totalidad de cepas de aves comerciales y una cepa de humano.

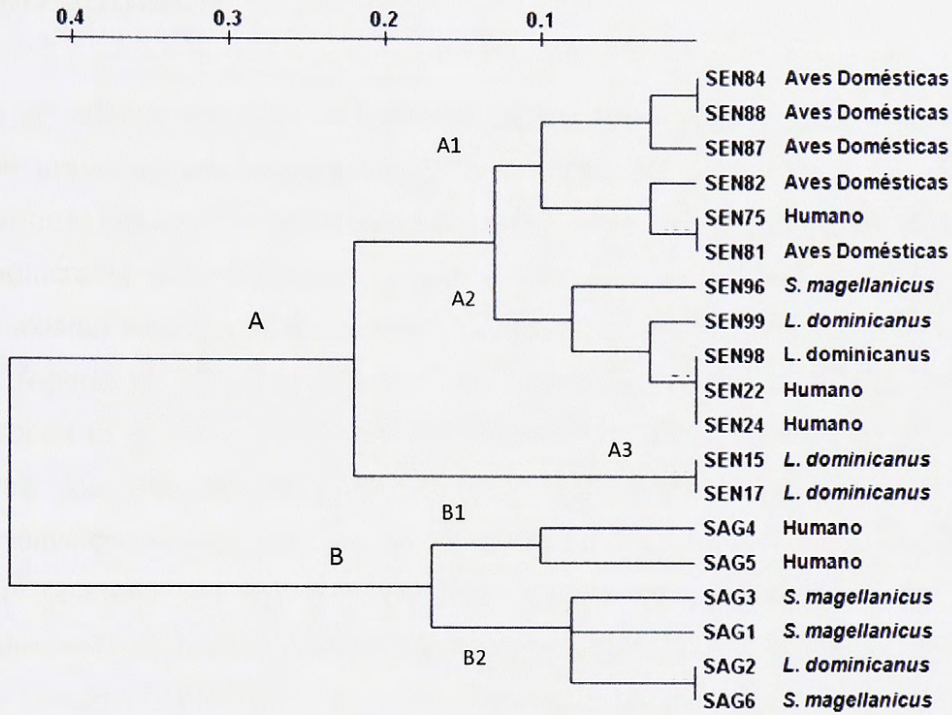


Figura 7. Árbol filogenético generado por virulotipos y patrón de restricción del PFGE. Representa la diferencia genética entre las distintas cepas en porcentaje.

10. DISCUSIÓN

En las últimas décadas, el aumento de las actividades humanas en la Antártica, que impactan los hábitats costeros y zonas de alimentación de los animales marinos, generan un incremento del riesgo para la cadena alimentaria marina de involucrarse en la epidemiología de la salmonelosis (Iveson *et al*, 2009). Aunque no existen estudios sobre la flora bacteriana normal en el pingüino de Magallanes, un reporte en diversas especies de pingüinos antárticos, principalmente Adelia (Woods *et al*, 2009), determinó la presencia de 62 grupos de bacterias aerobias, entre los que se destacan *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus sp* y *Staphylococcus sp*; también se identificaron 7 grupos de bacterias anaerobias, principalmente de los géneros *Actinomyces sp* y *Clostridium sp*. El género *Salmonella* no fue identificado en estos individuos, por lo que su presencia podría ser considerada indicador del estatus sanitario en animales de la zona austral.

En este estudio se realizó el aislamiento de 4 cepas de *Salmonella* en pingüinos magallánicos de la Región de Magallanes y Antártica Chilena, lo que sugiere que estas aves son susceptibles de ser infectadas y actuar como portadores. Además, los serotipos detectados se encuentran entre los más comúnmente aislados en pacientes humanos en Sur América (Hendriksen *et al*, 2011). Aislamientos previos de *Salmonella* en diversas especies de pingüinos en la región antártica, reportaron tasas variables, por ejemplo, *Salmonella* Enteritidis ha presentado tasas del 3% en pingüinos Adelia en Cabo Denison (Iveson *et al*, 2008), 18,8% en pingüino papúa en King George Island (Dimitrov *et al*, 2009) y 7% - 3%, en pingüinos papúa en Bird Island (Olsen *et al*, 1996 y Palmgreen, 2005 respectivamente), también se han reportado aislamientos de otros serotipos, como S. Blockley, S. Johannesburgo, S. Infantis, y S. Panamá desde pingüinos Adelia en Ross Island (Oelke y Steiniger, 1973) y S. Typhimurium en pingüinos Adelia de King George

Island (Dimitrov *et al*, 2009). En contraste, este trabajo identificó una tasa de aislamiento para *Salmonella enterica* de 0,61% (Tabla 11), lo cual es considerablemente inferior a lo reportado previamente por otros autores en otras especies.

La diferencia en la tasa de detección puede estar relacionada con la especie del estudio. Siendo este el primer reporte de infección por *Salmonella* en *S. magellanicus* son necesarios mayores esfuerzos para caracterizar temporal y geográficamente la infección por *Salmonella* en el pingüino de Magallanes. Una caracterización adecuada debiera ser basada en la aproximación multifactorial de la infección que incluya factores de los hospederos (abundancia y diversidad), parámetros ambientales y las interacciones entre ellos (Perez-Ramírez *et al*, 2012); estas asociaciones permiten estudiar la transmisión y la persistencia de *Salmonella* en el ambiente antártico y definir el posible escenario epidemiológico de la infección donde, se establezca claramente el rol de los pingüinos.

Actividades como la caza de mamíferos marinos y la pesca, han tenido un impacto en la cadena trófica de los ambientes acuáticos desde hace más de un siglo. Por lo tanto, la diversidad de serotipos y cepas aisladas podrían representar la exposición de los animales a las prácticas insalubres de cazadores en tiempos pasados y en las últimas décadas; al transporte marítimo, la pesca intensiva y las actividades turísticas humanas (Iveson *et al*, 2008). Aunque no se ha establecido una relación de causa-efecto entre las infecciones por *Salmonella* en las especies marinas y la exposición a actividades de transporte marítimo, hay reportes de brotes de enfermedades transmitidas por el agua debido a la contaminación con *S. Typhi*, *S. Enteritidis* y otros serotipos en pasajeros y tripulación de los buques de crucero (WHO, 2001) y, es posible, que los patógenos puedan diseminarse en el medio marino por la descarga de residuos contaminados. Las evidencias detectadas en este trabajo sugieren la necesidad de establecer medidas de control

y monitoreo para reducir el riesgo potencial en la salud animal, la salud ambiental y la salud pública.

La variación de la virulencia en las diferentes cepas de *S. enterica*, depende directamente de la capacidad de sobrevivir a condiciones de estrés. Estudios previos han demostrado que las cepas de alta virulencia difieren fenotípica y genotípicamente de aquellas con baja virulencia (Solano *et al*, 1998 y Huen *et al*, 2010). Este estudio, encontró diferencias significativas en la capacidad de supervivencia de las cepas de *S. Agona* tanto para el ensayo de H₂O₂ como el de pH 3 (Figura 3B y 3C), lo cual sugiere que la variabilidad fenotípica asociada a patogenicidad puede ser transversal a los diferentes serotipos de *Salmonella*. Sin embargo, es importante desarrollar estudios posteriores con un mayor número de aislados a fin de determinar diferencias estadísticas en la capacidad de supervivencia, eliminando el sesgo generado por el bajo número de muestras.

.En los últimos años, la multirresistencia antimicrobiana de los patógenos bacterianos, ha sido un tema de gran relevancia en salud pública. Estudios en humanos y bovinos, han revelado que un gran número de cepas de *S. Typhimurim* y *S. Enteritidis* han adquirido multirresistencia asociada al uso inadecuado de ampicilina, cloramfenicol, estreptomycin, sulfonamidas y tetraciclinas (Sivakumar *et al*, 2012). En este estudio encontramos que 3 de nuestras 4 cepas presentaron resistencia a ceftiofur, mientras que una de ellas presentó multirresistencia con cefotaxima y ampicilina.

En el presente estudio se evaluó la distribución de los genes de virulencia en relación con el hospedero, la procedencia, el serotipo y el patrón de resistencia antimicrobiana de las cepas aisladas desde los pingüinos; realizando comparaciones con aislamientos procedentes de otros hospederos. La distribución de los genes de virulencia en las cepas de *S. Enteritidis* fueron comparables a los

reportes encontrados en la literatura; en el caso de *S. Agona*, este estudio corresponde al primer reporte de genes de virulencia en este serovar donde resalta la presencia en la totalidad de las cepas de los genes *prot6e* y *SEN1417* (Tabla 18) que pueden participar activamente en la capacidad infectiva de la bacteria.

Tabla 18. Distribución de genes de virulencia en los diversos serovares de *Salmonella sp.*

Gen	Reportes Bibliográficos			Presente Estudio	
	<i>S. Enteritidis</i>	<i>S. Typhimurium</i>	Referencia	<i>S. Enteritidis</i>	<i>S. Agona</i>
<i>gipA</i>	8,9	49,7	Huenh <i>et al.</i> , 2010	7,7	0,0
<i>trhH</i>	10,5	52,4	Huenh <i>et al.</i> , 2010	0,0	16,7
<i>spvC</i>	69,9	82,1	Huenh <i>et al.</i> , 2010	76,9	16,7
<i>Sira</i>	74	100	Huenh <i>et al.</i> , 2010	46,2	56,7
<i>prot6e</i>	89	0	Huenh <i>et al.</i> , 2010	84,6	100
<i>pefA</i>	89,5	57,1	Huenh <i>et al.</i> , 2010	84,6	16,7
<i>invA</i>	100	100	Malorny, 2003	100	100
<i>SEN1417</i>	69,5	Sin información	Pan, 2009	30,8	100

El análisis de las cepas por PFGE, empleando la enzima de restricción *XbaI*, permitió discriminar adecuadamente los diferentes aislados de *S. enterica*, incluso entre cepas del mismo serotipo. En la organización interna del árbol (Figura 5) se resalta la presencia de cepas con un alto porcentaje de similitud genotípica principalmente entre aislados humanos y de gaviotas (*SEN22*, *SEN24*, *SEN98*, *SEN99*) así como entre aislados de pingüinos y gaviotas (*SAG6* y *SAG2*), distribución que se mantiene incluso al realizar el análisis de virulotipos. Estos resultados sugieren eventos de transmisión interespecie de cepas de *Salmonella enterica* y fundamentan futuros esfuerzos para investigar la importancia de las gaviotas en la dispersión y perpetuación de las cepas en el ambiente.

11. CONCLUSIONES

Existe en la región de Magallanes y Antártica Chilena una baja presentación de *Salmonella* sp. en *Spheniscus magellanicus* durante el periodo reproductivo; con variabilidad en los serotipos circulantes, aunque por el bajo número de cepas aisladas no es posible establecer un serotipo predominante.

Las cepas aisladas en los pingüinos, tienen potencialmente capacidad patogénica; ya que presentan características de supervivencia a condiciones de estrés, presencia de genes de virulencia y adicionalmente han adquirido características de resistencia a uno o varios antibióticos, asociados principalmente a la terapéutica en medicina veterinaria.

Hay variabilidad en los virulotipos encontrados en las cepas del estudio, encontrando una mayor diversidad para las cepas de *S. Agona* (4 virulotipos / 6 cepas) que en *S. Enteritidis* (6 virulotipos / 15 cepas).

Filogenéticamente, existe similitud entre al menos una cepa de *Salmonella* aislada desde los pingüinos con aislados de otras especies, lo que sumado al hallazgo de resistencia a antimicrobianos, sugiere eventos de transmisión inter-especie e impacto de la actividad humana en el hábitat de estos animales.



12. BIBLIOGRAFÍA

Agbaje, M., Begum, R.H., Oyekunle, M.A., Ojo O.E., Adenubi, O.T. 2011. Evolution of *Salmonella* nomenclature: a critical note. *Folia Microbiol* 56:497–503

Amavisit, P., Lightfoot, D., Browning, G.F., Markham, P.F. 2003. Variation between Pathogenic Serovars within *S. Pathogenicity Islands*. *J Bacteriol.* 185:3624–3635.

Appelbee, A.J., Thompson, R.C.A., Olson, M.E. 2005. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife – current status and future needs. *TRENDS in Parasitology* 27:370-376.

Aussel, L., W. Zhao, M. Hebrard, A. A. Guilhon, J. P. Viala, S. Henri, L. Chasson, J. P. Gorvel, F. Barras, and S. Meresse. 2011. *Salmonella* detoxifying enzymes are sufficient to cope with the host oxidative burst. *Mol Microbiol* 80:628-640.

Barbosa, A., Palacios, M.J. 2009. Health of Antarctic birds: a review of their parasites, pathogens and diseases. *Polar Biol.* 32:1095–1115.

Barrett, T. J., H. Lior, J. H. Green, R. Khakhria, J. G. Wells, B. P. Bell, K. D. Greene, J. Lewis, and P. M. Griffin. 1995. Laboratory investigation of a multistate food-borne

outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 by using pulsedfield gel electrophoresis and phage typing. J. Clin. Microbiol. 32:3013–3017

Bedzyk, L. A., Shoemaker N. B., Young K. E., Salyers A. A. 1992. Insertion and excision of *Bacteroides* conjugative chromosomal elements. J. Bacteriol. 174:166–172

Boersma, P.D. 2008. Penguins as Marine Sentinels. BioScience 58:597-607

Bonnedahl, J., Broman, T., Waldenström, J., Palmgren, H., Niskanen, T., Olsen, B. 2005. In Search of Human-associated Bacterial Pathogens in Antarctic Wildlife: Report from Six Penguin Colonies Regularly Visited by Tourists. AMBIO 34: 430-432.

Booth, I., Cash, P., O'byrne, C. 2002. Sensing and adapting to acid stress. Kluwer Academic Publishers 81:33-42.

Cabello, C., Cabello, F. 2008. Zoonosis con reservorios silvestres: Amenazas a la salud pública y a la economía. Rev Med Chile. 136:385-393.

Cardona, N., Sanchez, M. 2005. Evaluation of the invasive capacity of *Salmonella enterica* serum varieties to hep-2 cells. Revista CES MEDICINA 19:7-17

CDC. 2007. *Salmonella* Surveillance: Annual Summary, 2005. US Department of Health and Human Services, CDC.

Clarke, J., Kerry, K. 1993. Diseases and Parasites of penguins. Korean J Polar Res 4:79–86.

Clinical Laboratory Standards Institute. 2006. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard—9th ed. CLSI document M2-A9. 26:1. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Colville, J., Berryhill, D. 2007. Handbook of Zoonoses: Identification and Prevention. Cap 2: Salmonellosis: 167–171.

CONICYT. 2008. Manual de normas de bioseguridad. Segunda Edición.

Darwin, K.H., Miller, V.L. 1999. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. Clin Microbiol Rev. 12:405-428.

Dimitrov, R., Metcheva, A., Kenarova. 2009. *Salmonella* presence: an indicator of direct and indirect human impact on gentoo in Antarctica. Biotechnol and Biotechnol Eq. 23:246-249.

Dong, T., Schellhorn, H. 2010. Role of RpoS in virulence of pathogens. Infect Immun 78: 887-897.

Dunkley, K.D., Callaway, T.R., Chalova, V.I, McReynolds, J.L., Hume, M.E., Dunkley, C.S., Kubena, L.F., Nisbet, D.J., Ricke, S.C. 2009. Foodborne *Salmonella* ecology in the avian gastrointestinal tract. Anaerobe 15:26-35.

Edwards, R.A., Olsen, G.J., Malo, S.R. 2002. Comparative genomics of closely related *Salmonellae*. Trends Microbiol. 10:94-99.

Fang, F.C. 2004. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. Nat Rev Microbiol 2:820-832.

Field, C.L., Beaufrère, H., Wakamatsu, N., Rademacher, N., MacLean, R.J. 2012. Discospondylitis caused by *Staphylococcus aureus* in an African black-footed penguin (*Spheniscus demersus*). *Avian Med Surg* 26:232-8.

Figueroa, I.A., Verdugo, A. 2005. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. *Rev Latinoam Microbiol* 47:25-42.

Foster, J. 2001. Acid stress responses of *Salmonella* and *E.coli*: survival mechanisms, regulation, and implications for pathogenesis. *J Microbiol* 39:89-94.

Fowler, M., Cubas, Z. 2001. *Biology, Medicine and Surgery of South American Wild Animals*. Iowa State University Press 455-470

Gilbert, M., Slingenbergh, J., Xiao, X. 2008. Climate change and Avian Influenza. *Rev Sci Tech.* 27:459-66.

Greger, M. 2007. The human/animal interface: emergence and resurgence of zoonotic infectious diseases. *Crit Rev Microbiol.* 33:243-99.

Griekspoor, P., Olsen, B., Waldenström, J. 2009. *Campylobacter jejuni* in penguins, Antarctica. *Emerg Infect Dis* 15:847-8.

Guard-Petter, J. 2001. The chicken, the egg and *Salmonella* enteritidis. *Environ Microbiol* 3:421-430.

Harbottle, H., White, D.G., McDermott, P.F., Walker, R.D., Zhao, S. 2006. Comparison of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial susceptibility typing for characterization of *S. enterica* serotype Newport isolates. *J Clin Microbiol.* 44:2449-57.

Hebrard, M., Viala, J.P., Meresse, S., Barras, F., Aussel, L. 2009. Redundant hydrogen peroxide scavengers contribute to *Salmonella* virulence and oxidative stress resistance. *J Bacteriol* 191:4605-4614.

Hendriksen R.S., Vieira A.R., Karlsmose S., Lo Fo Wong D.M.A., Jensen A.B., Wegener H.C., Aarestrup F.M. 2011. Global Monitoring of Salmonella Serovar Distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: Results of Quality Assured Laboratories from 2001 to 2007. *Foodborne Pathog Dis* 8: 887-900.

Heymann, D.L., Thuriaux, M.C. 2004. Salmonellosis. In: Control of communicable diseases manual. 18th ed. Washington: United Book Press 469–473.

Horst, S.A., Jaeger, T., Denkel, L.A., Rouf, S.F., Rhen, M., Bange, F.C. 2010. Thiol peroxidase protects *Salmonella enterica* from hydrogen peroxide stress in vitro and facilitates intracellular growth. *J Bacteriol* 192:2929-2932.

Hubalek, Z. 2004. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratorybirds. *J Wildl Dis.* 40:639-59.

Huehn, S., La Ragione, R., Anjum, M., Saunders, M, Woodward, M., Bunge, C., Helmuth, R., Hauser, E., Guerra, B., Beutlich, J., Brisabois, A., Peters, T., Svensson, L., Madajczak, G., Litrup, E, Imre, A., Herrera, S., Mevius, D., Newell, D., Malorny, B. 2010. Virulotyping and antimicrobial resistance typing of *Salmonella enterica* serovars relevant to human health in Europe. *Foodborne Pathog Dis* 7:523-535

Hughes, L.A., Shopland, S., Wigley, P., Bradon, H., Leatherbarrow, A.H., Williams, N.J., Bennett, M., de Pinna, E., Lawson, B., Cunningham, A.A., Chantrey, J. 2008. Characterization of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates from wild birds in northern England from 2005 - 2006. BMC Vet Res 4:4

ISO. 2002. ISO 6579:2002(E) 4rd ed. Microbiology - General guidance on methods for the detection of *Salmonella*, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

IUCN. 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. www.iucnredlist.org. Downladed on 10 July 2013.

Iveson J. B., Shellam G. R., Bradshaw S. D., Smith D. W., Mackenzie J. S., Mofflin R. G. 2009. *Salmonella* infections in Antarctic fauna and island populations of wildlife exposed to human activities in coastal areas of Australia. Epidemiol Infect 137:858-870.

Jencek, J.E., Beaufrère, H., Tully, T.N. Jr., Garner, M.M., Dunker, F.H., Baszler, T.V. 2012. An outbreak of *Chlamydophila psittaci* in an outdoor colony of Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). J Avian Med Surg 26:225-31.

Jensen, A.N., Sørensen, A., Baggesen, D.L., Bødker, D., Hoorfar, J. 2003. Addition of Novobiocin in pre-enrichment step can improve *Salmonella* culture protocol of modified semisolid Rappaport–Vassiliadis. J Microbiol Methods. 55:249–255.

Jerez, S., Motas, M., Tortosa, M., Ortiz, J., Valera, F., Palacios, M.J., Benzal, J., de la Cruz, C., Cuervo, J., Martinez, A., Barbosa, A. 2008. Trace and toxic

elements in tree species of Antarctic penguins: A preliminary research. *Toxicology Letters* 180S:S32-S246

Jones, H.I. 1988. Notes on Parasite in Penguins (*Sphenicidae*) and Petrels (*Procellariidae*) in the Antarctic and Sub-antarctic. *Journal of Wildlife Diseases* 24:166-167

Kane, O.J., Uhart, M.M., Rago, V., Pereda, A.J., Smith, J.R., Van Buren, A., Clark, J.A., Boersma, P.D. 2012. Avian pox in Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*). *J Wildl Dis* 48:790-4.

Kerry, K., Riddle, M., Clarke, K. 1999. Diseases of Antarctic Wildlife. A report for SCAR and COMNAP. SCAR. Australian Antarctic Division. p104

Kobayashi, H., Kanazaki, M., Shimizu, Y., Nakajima, H., Khatun, M.M., Hata, E., Kubo, M. 2007. *S.* isolates from cloacal swabs and footpads of wild birds in the immediate environment of Tokyo Bay. *J Vet Med Sci.* 69:309-11.

Lee, A., Detweiler, C., Falkow, S. 2000. OmpR regulates the two-component system SsrA-SsrB in *Salmonella* pathogenicity island 2. *J Bacteriol* 182:771-781.

Lu, S., Killoran, S.P., Fang, F.C., Riley, L.W. 2002. The global regulator ArcA controls resistance to reactive nitrogen and oxygen intermediates in *Salmonella enterica* serovar enteritidis. *Infect Immun.* 70:451-61.

Lundberg, J.O., Weitzberg, E., Cole, J.A., Benjamin, N. 2004. Nitrate, bacteria and human health. *Nat Rev Microbiol* 2:593-602.

Malorny, B., Hoorfar, J., Bunge, C., Helmuth, R. 2003. Multicenter Validation of the Analytical Accuracy of *Salmonella* PCR: towards an International Standard. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:290-296.

McClelland, M., Sanderson, K.E., Spieth, J., Clifton, S.W., Latreille, P., Courtney, L., Porwollik, S., Ali, J., Dante, M., Du, F., Hou, S., Layman, D., Leonard, S., Nguyen, C., Scott, K., Holmes, A., Grewal, N., Mulvaney, A., Ryan, E., Sun, H., Florea, L., Miller, W., Stoneking, T., Nhan, M., Waterston, R., Wilson, R.K. 2001. Complete genome sequence of *S. enteric* serovar Typhimurium LT2. *Nature* 413:852-6.

Mead, P.S., Sultsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 5:607–25.

Millan, J., Aduriz, G., Moreno, B., Juste, R.A., Barral, M. 2004. *S.* isolates from wild birds and mammals in the Basque Country (Spain). *Rev Sci Tech* 23:905-11.

Miller, M.A., Byrne, B.A., Jang, S.S., Dodd, E.M., Dorfmeier, E., Harris, M.D., Ames, J., Paradies, D., Worcester, K., Jessup, D.A., Miller, W.A. 2010. Enteric bacterial pathogen detection in southern sea otters (*Enhydra lutris mereis*) is associated with coastal urbanization and freshwater runoff. *Vet. Res* 41:01.

Miller, P.J., Afonso, C.L., Spackman, E., Scott, M.A., Pedersen, J.C., Senne, J.A., Brown, J.D., Fuller, C.M., Uhart, M.M., Karesh, W.B., Brown, I.H., Alexander, D.J., Swayne, D.E. 2010. Evidence for a new avian paramyxovirus serotype 10 detected in rockhopper penguins from the Falkland Islands. *J Virol* 84:11496-504.

Moller, A.P. 2002. North Atlantic Oscillation (NAO) effects of climate on the relative importance of first and second clutches in a migratory passerine birds. *J. Anim Ecol* 71:201-210

Moller, A.P., Erritzoe, J. 2003. Climate, body condition and spleen size in birds. *Oecologia* 442:661 – 626.

Napier, J.E., Hinrichs, S.H., Lampen, F., Iwen, P.C., Wickert, R.S., Garrett, J.L., Aden, T.A., Restis, E., Curro, T.G., Simmons, L.G., Armstrong, D.L. 2009. An outbreak of avian mycobacteriosis caused by *Mycobacterium intracellulare* in little blue penguins (*Eudyptula minor*). *J Zoo Wildl Med* 40:680-6.

Oelke, H., Steiniger, F. 1973. *Salmonella* in Adélie Penguins (*Pygoscelis adeliae*) and South Polar Skuas (*Catharacta maccormicki*) on Ross Island. *Antarctica* 17: 568-573.

OIE. 2011. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Prevención, detección y control de las infecciones de aves de corral por *Salmonella* disponible on line: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.09.09_SALMONELLOSIS.pdf (consulta realizada en Enero de 2012).

Olsen, B., Bergstrom, S., McCafferty, D., Sellin, M., Wistrom, J. 1996. *S. enteritidis* in Antarctica: zoonosis in man or humanosis in penguins?. *Lancet*, 348:1319-1320.

Palmgren, H., McCafferty, D., Aspán, 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.

Pan, Z., Carter, B., Núñez-García, J., Abuoun, M., Fookes, M., Ivens, A., Woodward, M., Anjum, M. 2009. Identification of genetic and phenotypic differences associated with prevalent and non-prevalent *Salmonella* Enteritidis phage types: analysis of variation in amino acid transport. *Microb.* 155: 3200–3213.

Patrick, A.D., François-Xavier, W. 2007, Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars 9th edition. WHO Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*; Institute Pasteur, France.

Pérez-Ramírez, E., Acevedo, P., Allepuz, A., Gerrikagoitia, X., Alba, A., Busquets, N., Díaz-Sánchez, S., Alvarez, V., Abad, F., Barral, M., Majó, N., Höfle, U. 2012. Ecological factors driving avian influenza virus dynamics in Spanish wetland ecosystems. *PLoS ONE* 7(11): e46418. doi:10.1371/journal.pone.0046418

Reche, M.P., Jimenez P.A., Alvarez, F., Garcia de los Rios J.E., Rojas A.M., Pedro P. 2003. Incidence of *Salmonellae* in captive and wild free-living raptorial birds in central Spain. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 50:42-4.

Retamal, P., M. Castillo-Ruiz, N. Villagra, J. Morgado, and G. Mora. 2010. Modified Intracellular-Associated Phenotypes in a Recombinant *Salmonella* Typhi Expressing *S. Typhimurium* SPI-3 Sequences. *PLoS ONE* 5: e9394. doi:10.1371/journal.pone.0009394

Ribot, E.M, Fair, M.A., Gautom, R., Cameron, D.N., Hunter, S.B, Swaminathan, B., Barrett, T. J. 2006. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis* 3:59-67.

Robbe-Saule, V., Algorta, G., Rouilhac, I., Norel, F. 2003. Characterization of the RpoS status of clinical isolates of *Salmonella enterica*. *Appl Environ Microbiol* 69:4352-4358.

Rychlik, I., Barrow, P. 2005. *Salmonella* stress management and its relevance to behaviour during intestinal colonisation and infection. *FEMS Microbiology Reviews*. 1021–1040.

Sánchez, M., Cardona, N. 2003. Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. *Revista de la Asociación Colombiana de Infectología* 7:22-29.

Schmidt, H., and M. Hensel. 2004. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin. Microbiol Rev.* 17: 14-56

Shen, S., Fang, F. 2001. Integrated stress responses in *Salmonella*. *Int J Food Microbiol.* 152:75-81.

Sivakumar T., Avinash Saravanel N., Prabhu D., Shankar T., Vijayabaskar P. 2012. Characterization of Multidrug Resistant Patterns of *Salmonella sp.* *World Journal of Medical Sciences* 7:64-67.



Smith, K.M., Karesh, W.B., Majluf, P., Paredes, R., Zavalaga, C., Reul, A.H., Stetter, M., Braselton, W.E., Puche, H., Cook, R.A. 2008. Health evaluation of free-ranging Humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*) in Peru. Avian Dis. 52:130-135.

Solano, C., B. Sesma, M. Alvarez, T. J. Humphrey, C. J. Thorns, and C. Gamazo. 1998. Discrimination of strains of *Salmonella* Enteritidis with differing levels of virulence by an in vitro glass adherence test. J Clin Microbiol 36:674-678.

Spector, M., Kenyon, W. 2011. Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. Food Research International.

Stoddard, R.A., DeLong, R.L., Byrne, B.A., Jang, S., Gulland, F.M.D. 2008. Prevalence and characterization of *Salmonella* spp. among marine animals in the Channel Islands, California. Dis Aquat Org. 81:5–11

Stonehouse, B. 1975. The biology of penguins. De: B. Stonehouse. Macmillan (London) 413-435.

Suárez, M., Mantilla, J. 2000. Presencia de *Salmonella* serovariedad Enteritidis en productos de origen avícola y su repercusión en salud pública. Revista Médica Universidad de Antioquia. 13:237-241.

Thomazelli, L.M., Araujo, J., Oliveira, D.B., Sanfilippo, L., Ferreira, C.S., Brentano, L., Pelizari, V.H., Nakayama, C., Duarte, R., Hurtado, R., Branco, J.O., Walker, D., Durigon, E.L. 2010. Newcastle disease virus in penguins from King George Island on the Antarctic Region. Vet Microbiol 146:155-60.

Tizard, I. 2004. Salmonellosis in Wild Birds. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 13:50-66.

Van Immerseel, F. 2010. Stress-induced survival strategies enable *Salmonella* enteritidis to persistently colonize the chicken oviduct tissue and cope with antimicrobial factors in egg white: A hypothesis to explain a pandemic. *Gut Pathogens* 2: 23.

Van de Peer, Y., De Wachter, R., 1994, TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Applic. Biosci.* 10, 569-570.

Venegas, C. 1999. Estado de conservación de pingüinos en la Región de Magallanes, Chile. *Estud. Oceanol.* 18:45-56

Voetsch, A.C., VanGilder, T.J., Angulo, F.J., Farley, M.M., Shallow, S., Marcus, R., 2004. FoodNet estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. *Clin Infect Dis.* 38 (Suppl 3): S127–34.

WHO/FAO/OIE. 2004. Report of the WHO/FAO/OIE joint consultation on emerging zoonotic diseases. Available in: http://whqlibdoc.who.int/hq/2004/WHO_CDS_CPE_ZFK_2004.9.pdf.

Wilmes-Riesenberg, M., Bearson, B., Foster, J., Curtiss, R. 1996. Role of the acid tolerance response in virulence of *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 64:1085-92.

Woods R., Jones H.I., Watts J., Miller G.D., Shelman G.R. 2009. Health of Antarctic Wildlife. Cap 2: Disease of Antarctic Sea Bird 35–59.

Woolhouse, M.E.J., Gowtage-Sequeria, S. 2005. Host range and emerging and reemerging pathogens. *Emerg Infect. Dis* 11:1842-1847.

World Health Organization. 2001. Sanitation on ships: compendium of outbreaks of food borne and waterborne disease and Legionnaire' diseases associated with ships, 1997–2000. Geneva

Yim, L., L. Betancor, A. Martinez, G. Giossa, C. Bryant, D. Maskell, and J. A. Chabalgoity. 2010. Differential phenotypic diversity among epidemic-spanning *Salmonella enterica* serovar enteritidis isolates from humans or animals. *Appl Environ Microbiol* 76:6812-6820.

Zdanowski, M.K., Weglenski, P., Golik, P., Sasin, J.M., Borsuk, P., Zmuda, M.J., Stankovic, A. 2004. Bacterial diversity in Adélie penguin, *Pygoscelis adeliae*, guano: molecular and morpho-physiological approaches. *FEMS Microbiol Ecol* 50:163-73.

