



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**VARIACIÓN ESTACIONAL DE *Salmonella enterica* EN HECES DE  
GAVIOTA DOMINICANA (*Larus dominicanus*) EN LA REGIÓN DE  
VALPARAISO Y CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y  
GENOTÍPICA DE LAS CEPAS CON RESISTENCIA  
ANTIMICROBIANA**

**Rodrigo Ignacio Manquián Álvarez**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Medicina  
Preventiva

PROFESOR GUÍA: Dr. PATRICIO RETAMAL MERINO  
Universidad de Chile

Financiamiento Proyecto Fondecyt 11110398

SANTIAGO, CHILE  
2016



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**VARIACIÓN ESTACIONAL DE *Salmonella enterica* EN HECES DE GAVIOTA DOMINICANA (*Larus dominicanus*) EN LA REGIÓN DE VALPARAISO Y CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE LAS CEPAS CON RESISTENCIA ANTIMICROBIANA**

**Rodrigo Ignacio Manquién Álvarez**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Medicina  
Preventiva

Nota Final: .....

Prof. Guía:	Dr. Patricio Retamal	.....
Profesor Corrector:	Dra. Lisette Lapierre	.....
Profesor Corrector:	Dr. Cristóbal Briceño	.....

SANTIAGO, CHILE  
2016

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi profesor guía, Dr. Patricio Retamal, por tener siempre la mejor disposición para enseñarme en el laboratorio, resolver mis dudas y comprender cada vez que cometí algún error. A mis profesores consejeros, Dra. Lisette Lapierre y Dr. Cristóbal Briceño, por sus sugerencias y consejos para lograr finalizar esta Memoria. También quiero agradecer a Marcela Fresno, con su gran paciencia para explicarme contenidos y apoyarme en laboratorio.

Quiero agradecer también a mi grupo de amigos por su amistad, los buenos momentos, las conversaciones y tiempos de distracción. Mención especial a Yerko Onell, por ayudarme a desarrollar las actividades de muestreo, por los consejos y por apoyarme (y aguantarme) en los momentos de estrés.

Agradezco a personas muy importantes para mí: Sebastián, por ser un amigo, compañero y cómplice durante casi todo mi paso por la universidad, y que es actualmente alguien muy importante en mi vida. A Rodrigo, que llegó a cambiarme la mentalidad en muy poco tiempo y a quien le tengo mucho cariño. A mi hermana Francisca, por ser una de las personas más importantes en mi vida y por enseñarme a querer ser siempre alguien mejor. A mi mascota, Rulito, por recibirme siempre con movimientos de cola y alegría, el elemento fundamental que en los momentos difíciles me hacía recordar mi vocación. Finalmente, quiero agradecer a mi madre, Iris Álvarez, la persona más fuerte que conozco y a quien admiro mucho, gracias mamá por hacer posible lo que soy, en lo profesional y en lo personal.

## ÍNDICE

Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Revisión bibliográfica.....	4
Objetivo general.....	10
Objetivos específicos.....	10
Material y métodos.....	11
Resultados.....	15
Discusión.....	19
Conclusiones.....	25
Bibliografía.....	26
Anexos.....	30

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Mezcla de la reacción de PCR.....	12
<b>Tabla 2:</b> Condiciones PCR.....	12
<b>Tabla 3:</b> Distribución de aislamientos positivos y negativos de <i>Salmonella</i> spp. según el mes de muestreo respecto del total de muestras analizadas (en números absolutos).....	15
<b>Tabla 4:</b> Distribución estacional de las cepas aisladas desde heces frescas de gaviota dominicana ( <i>Larus dominicanus</i> ) en números absolutos y la tasa de reacción.....	16
<b>Tabla 5:</b> Perfiles fenotípicos de resistencia antimicrobiana.....	17
<b>Tabla 6:</b> Perfiles genéticos de resistencia antimicrobiana.....	18

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Gráfico de frecuencias de antibióticos asociados a fenotipos de resistencia antimicrobiana.....	18
--	----

## RESUMEN

Actualmente la importancia en salud pública de las bacterias del género *Salmonella* es ocasionada por el aumento de resistencia antimicrobiana que ha tenido en los últimos años, debido al inadecuado uso de antimicrobianos. La infección se asocia al consumo de alimentos contaminados, sin embargo, cobra importancia el rol de las aves silvestres como reservorios y agentes diseminadores de genes de resistencia a antimicrobianos en seres humanos y animales. A pesar de que la mayor cantidad de casos clínicos en seres humanos ocurren durante verano, pocos estudios reportan si existe estacionalidad en el aislamiento de cepas de *Salmonella* desde aves silvestres. El objetivo de esta Memoria fue determinar la existencia de variación estacional en la detección de cepas de *S. enterica* aisladas desde heces de *Larus dominicanus* de la Región de Valparaíso y caracterizar fenotípica y genotípicamente aquellas cepas con resistencia antimicrobiana.

Se analizó un total de 608 muestras obtenidas mediante torulado de heces frescas tomadas directamente desde el ambiente. Las cepas aisladas fueron confirmadas mediante la Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR) para el gen *invA*. Para determinar la asociación entre el aislamiento de cepas de *Salmonella* y la estación del año se utilizó el programa Infostat®. La determinación de fenotipos de resistencia se realizó mediante el método de difusión en placa (Kirby Bauer). Los perfiles genéticos fueron evaluados mediante un PCR para los genes: *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(G)*, *bla<sub>PSE-1</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>CMY</sub>*, *aadB*, *aacC* e integrones clase 1.

Se aislaron 7 cepas de *Salmonella* que no fueron asociadas estadísticamente a la estación del año en que fueron obtenidas. Se encontró un total de 5 perfiles fenotípicos, y 2 perfiles genotípicos de resistencia antimicrobiana, siendo *bla<sub>TEM</sub>* el único gen encontrado en las cepas estudiadas. Aunque genotípicamente no coinciden los resultados, probablemente porque la resistencia encontrada a nivel fenotípico es codificada por otros genes no estudiados en esta Memoria, se evidencia el impacto que tienen las aves silvestres en la mantención y diseminación de bacterias resistentes a agentes antimicrobianos.

Palabras clave: *Salmonella*, estacionalidad, resistencia antimicrobiana, gaviota dominicana.

## ABSTRACT

Nowadays, the importance in public health regarding the *Salmonella* genus bacteria is caused by the increase of the antimicrobial resistance in the last few years, given the injudicious use of antimicrobials. The infection is associated with the consumption of contaminated food, however, the role of wild birds takes an important place, for they behave as natural reservoirs and dissemination agents of resistance genes to antimicrobials in humans and animals. Despite that most of clinical cases in humans occur during the summer, little research has reported if there exists seasonality in the isolation of *Salmonella* strains from wild birds. The objective of this research was to determine the existence of seasonal variation in the detection of strains of *S. enterica* from faeces of *Larus dominicanus* in the Valparaíso Region, and, to characterise both phenotypically and genotypically those strains with antimicrobial resistance.

A total of 608 fresh faecal samples were taken with swabs directly from the environment. The isolated strains were confirmed by the polymerase chain reaction (PCR) for the *invA* gene. To determine the association between the isolation of *Salmonella* strains and the season, the software Infostat® was used. The determination of resistance phenotypes was carried out by the agar diffusion test (Kirby Bauer). The genetic profiles were evaluated through PCR for the genes *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(G)*, *bla<sub>PSE-1</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>CMY</sub>*, *aadB*, *aacC* and class 1 integrons.

Seven *Salmonella* strains were isolated, because they were not statistically associated with the season when they were taken. A total of 5 phenotypic profiles were found, as well as 2 genotypic profiles of antimicrobial resistance, being *bla<sub>TEM</sub>* the only gene found in the researched strains. Although the results do not match genotypically –probably perhaps the resistance found at a phenotypic level is codified by other genes which were not studied for this Project, the impact that wild birds have in the storage and spreading of bacteria resistant to antimicrobial agents is evident.

Key words: *Salmonella*, seasonality, antimicrobial resistance, Kelp gull.

## INTRODUCCIÓN

*Salmonella* es reconocida a nivel mundial como un importante patógeno zoonótico que ha estado presente desde antes de 1880, causando enfermedades como la fiebre tifoidea, paratifoidea y enfermedades asociadas al consumo de alimentos. En la actualidad, la principal emergencia de este patógeno en la salud pública radica en el aumento de resistencia antimicrobiana descrito durante la última década, dificultando la elección y eficacia del tratamiento antimicrobiano en aquellos pacientes de mayor riesgo.

A pesar de que se reconoce que la infección es principalmente ocasionada por ingestión de productos alimenticios contaminados, el rol de los animales de vida silvestre sigue siendo importante por actuar como reservorios y fuentes de transmisión de *Salmonella*, además de otros patógenos, y por ende, infectar directa o indirectamente a seres humanos y animales, tanto de producción como de compañía.

Actualmente, las aves son consideradas un importante factor de diseminación de *Salmonella*, siendo las de vida silvestre como las gaviotas, identificadas como un importante agente de contaminación por su elevada capacidad de adaptarse a los ambientes antrópicos. A nivel mundial, se reconoce a las aves como el principal reservorio de *S. Enteritidis*, uno de los principales serovares aislados en seres humanos.

Internacionalmente, los estudios muestran que la mayor cantidad de casos clínicos en seres humanos se aíslan durante el periodo de verano, de la misma manera que sugieren investigaciones a nivel nacional, encontrándose un mayor número de cepas aisladas durante los meses comprendidos entre diciembre y marzo. Sin embargo, son pocos los estudios que reportan si existe diferencia asociada a la estacionalidad del año en el aislamiento de cepas de *Salmonella* desde aves silvestres.

Producto de la importancia que tienen las aves silvestres como hospederos reservorios de *Salmonella*, es que el objetivo de esta Memoria de Título fue determinar la existencia de variación estacional en la detección de cepas de *S. enterica* aisladas desde heces de gaviotas dominicanas (*Larus dominicanus*) de la Región de Valparaíso y caracterizar fenotípica y genotípicamente aquellas cepas con resistencia antimicrobiana.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### Generalidades

La salmonelosis es una enfermedad infecciosa ocasionada por bacterias del género *Salmonella*, denominada así en 1880 por el patólogo veterinario Daniel Elmer Salmon (Rivera *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014). Las investigaciones han mostrado que es un patógeno zoonótico de gran importancia que puede afectar la salud de humanos y animales (Zhang *et al.*, 2014), siendo estos últimos considerados una fuente de gran importancia en los casos de salmonelosis humana (Mettee *et al.*, 2014).

En general, las personas con salmonelosis desarrollan un cuadro con diarrea, fiebre, vómitos y calambres abdominales. En la mayoría de los casos, estos síntomas desaparecen sin tratamiento en 4-7 días (Zhang *et al.*, 2014). Sin embargo, existen grupos de riesgo como personas de edades extremas o inmunocomprometidas que pueden presentar formas severas de la enfermedad y requerir tratamiento antimicrobiano como parte de la terapia (Hurley *et al.*, 2014).

### Características del agente

El género *Salmonella* (*S.*) pertenece a la familia Enterobacteriaceae, son bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, en su mayoría provistos de flagelos y móviles (ISP, 2012). Dentro de este género se describen dos especies: *S. enterica* y *S. bongori*, existiendo en el primer caso seis subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (Hurley *et al.*, 2014).

Según el esquema de Kauffman-White se puede serotipificar en base a tres tipos de antígenos: Antígeno O (somático), Antígeno H (flagelar) y Antígeno Vi (capsular) (Borie, 2010), existiendo actualmente más de 2500 serovares de *Salmonella*, la mayoría de ellos pertenecientes a la subespecie *enterica* (López-Martín *et al.*, 2011). Los serovares de la subespecie *enterica* se han dividido en tres grupos dependiendo de la habilidad para infectar diferentes hospederos. El primer grupo incluye serovares como *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, con un amplio rango de especies susceptibles, pudiendo afectar aves y mamíferos, entre otros. En el segundo grupo, están aquellos serovares como *S. Dublin* y *S.*

Choleraesuis, capaces de infectar a bovinos y cerdos respectivamente, pero también a roedores y seres humanos como hospederos portadores. Finalmente, el último grupo incluye aquellos serovares de un solo hospedero o muy restringidos, como por ejemplo *S. Typhi* que sólo afecta a seres humanos (Singh, 2013).

## **Epidemiología**

Durante la última década se ha observado un incremento significativo en el número de infecciones causadas por *Salmonella*. Se estima a nivel mundial, que 93,8 millones de casos de gastroenteritis en seres humanos son causados por este agente, provocando un total de 155.000 muertes cada año (Rahmani *et al.*, 2013). Sin embargo, el número de infecciones puede ser aún más elevado ya que muchos casos de menor severidad no se diagnostican ni reportan (Hurley *et al.*, 2014). Por muchos años, los casos de salmonelosis en países en vías de desarrollo, incluyendo Chile, eran predominantemente causados por *S. Typhi*, causante de la fiebre tifoidea en seres humanos (Jurado *et al.*, 2010; ISP, 2012). Sin embargo, a comienzos de la década de los 90 la incidencia de este agente disminuyó abruptamente como lo demuestra un reporte publicado en Chile por el Instituto de Salud Pública en el año 2012, pasando de existir 120 casos cada 100.000 habitantes, a 10 por cada 100.000 habitantes en 1997. Paralelamente, el cambio en la industria chilena, principalmente en la producción avícola, ha hecho que comiencen a emerger los casos debido a *S. Enteritidis* (ISP, 2012), que junto a *S. Typhimurium*, son los serovares más frecuentemente identificados en los casos de salmonelosis humana a nivel mundial y nacional (Gil-Setas *et al.*, 2002; Tirado *et al.*, 2009; López-Martín *et al.*, 2011; Rahmani *et al.*, 2013).

Actualmente la salmonelosis no tifoidea, causada por cualquier serovar diferente a *S. Typhi* (Jurado *et al.*, 2010), provoca sólo en Estados Unidos aproximadamente 1,2 millones de enfermos, 23.000 hospitalizaciones y 450 muertes al año (Mettee *et al.*, 2014). En Chile, los datos del Laboratorio Nacional y de Referencia para *Salmonella* spp. (Instituto de Salud Pública) muestran que 16.214 cepas de *Salmonella* spp. provenientes de aislamientos de origen clínico han sido confirmados entre los años 2009 y 2014, siendo los principales afectados los niños entre 0 - 4 años y entre 5 - 9 años, con un 23% y un 14,2% del total de casos, respectivamente (ISP, 2014).

## Resistencia antimicrobiana

En los últimos años, la principal importancia de *Salmonella* en la salud pública está asociada al aumento de la resistencia antimicrobiana debido al elevado uso de estos fármacos que ha tenido para el tratamiento en seres humanos y en medicina veterinaria para producción de ganado, prevención de enfermedades y como promotores de crecimiento (Putturu *et al.*, 2013), provocando un incremento en la resistencia para algunos antimicrobianos utilizados para el tratamiento empírico, en particular amoxicilina + ácido clavulánico, cefalosporinas de tercera generación o fluoroquinolonas (De Toro *et al.*, 2014), dificultando la elección y eficacia del tratamiento antimicrobiano. La importancia de este hecho, como señala Putturu *et al.* (2013), es que la tasa de mortalidad es 21 veces más alta en individuos infectados con cepas resistentes.

Las bacterias resistentes a los agentes antimicrobianos poseen diversos mecanismos de resistencia, tales como la producción de enzimas que inactivan estos fármacos, disminución de la permeabilidad celular de la bacteria hacia los antibióticos a través de expresión de bombas de eflujo o porinas, y la modificación de la molécula blanco sobre la que actúa el antimicrobiano (Sefton, 2002). Los genes codificantes para estos mecanismos de resistencia pueden ser transmitidos mediante elementos genéticos móviles, tales como plásmidos, transposones e integrones, y por lo tanto, contribuyen a la diseminación de estos genes entre poblaciones bacterianas (Butaye *et al.*, 2014; De Toro *et al.*, 2014). Como lo sugieren diferentes investigaciones, los integrones de clase 1 son uno de los elementos genéticos más frecuentemente involucrados en la transmisión de genes de resistencia, y su presencia puede variar dependiendo del serovar aislado. Se ha asociado *S. Enteritidis* a una baja presencia de integrones de clase 1, mientras que *S. Typhimurium* es reconocida por tener un importante rol en la diseminación de estos genes (Ranjbar *et al.*, 2011).

De Toro *et al.* (2014) utilizaron la técnica de Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR) con la finalidad de determinar los genes codificantes de resistencia para diferentes antimicrobianos. Los genes identificados fueron: *bla<sub>PSE</sub>* y *bla<sub>TEM</sub>* ( $\beta$ -lactámicos de amplio espectro); *tet(A)*, *tet(B)* y *tet(G)* (tetraciclina); *aadA1/A2* y *strA/B* (aminoglicósidos); *cml* (cloranfenicol); *aphAI* (kanamicina); *sul1* y *sul2* (sulfametoxazol + trimetoprim). Estos datos coinciden con los observado por otros autores, tales como Dolejská *et al.* (2009),

donde se observó que los genes más frecuentemente identificados son *tet(A)*, *bla<sub>TEM</sub>* y *strA*, evidenciándose fenotípicamente como resistencia a tetraciclina, ampicilina y estreptomicina, respectivamente.

### **Reservorios en fauna silvestre**

Por lo general, *Salmonella* es transmitida a los seres humanos a través de la cadena alimenticia, siendo los productos de origen animal como huevos, carne de pollo, cerdo o vacuno los principalmente involucrados (Hilbert *et al.*, 2012). Sin embargo, se han descrito casos asociados con el contacto directo entre humanos y animales de compañía, producción o fauna silvestre, incluyendo principalmente aves y reptiles, que además pueden actuar como fuentes de contaminación de frutas, verduras y otros alimentos (Hilbert *et al.*, 2012). A nivel mundial, se reconoce a las aves como los principales reservorios de *S. Enteritidis*, identificándose aquellas especies silvestres como gaviotas, palomas, pavos, loros, patos y aves costeras silvestres en general, como un importante factor de diseminación por su cantidad y dinámica poblacional (ISP, 2012).

Las gaviotas en muchos países han sido asociadas a la transmisión de *Salmonella*, cuya prevalencia puede variar de 0 a 75% dependiendo de la especie y ubicación en la que se recojan las heces de gaviotas (Gruszynski *et al.*, 2014). En Chile se han aislado numerosos serovares de *Salmonella* en gaviotas, siendo la más común la gaviota dominicana (*Larus dominicanus*), especie sinantrópica, oportunista y exitosa debido a la capacidad de adaptarse a distintos nichos alimenticios incluyendo basurales y carroña (López-Martín *et al.*, 2011; Fresno *et al.*, 2013). Un estudio realizado por López-Martín *et al.* (2011) directamente desde la cloaca de 123 gaviotas dominicanas, reveló que un 25,2% resultaron positivas para algún serovar de *Salmonella*. Por otra parte, Fresno *et al.* (2013) investigaron la presencia del mismo agente en heces de gaviotas del litoral costero chileno, mostrando una tasa de infección del 6,4%. En ambas investigaciones, el serovar aislado con mayor frecuencia fue *S. Enteritidis*, con una prevalencia del 50 y 70% respectivamente para cada estudio. Es por esta razón, y por la habilidad de estas aves de adaptarse a los ambientes antrópicos, que es considerada un importante reservorio de *Salmonella* que puede contribuir a la contaminación de aguas y alimentos.

## Variación estacional

Aunque la detección de diferentes cepas de *Salmonella* ocurre durante todo el año tanto en humanos como en animales, varios autores han encontrado diferencias estadísticamente significativas en el número de aislamientos asociado a ciertas épocas del año. Gil-Setas *et al.* (2002), encontraron entre los años 1993-2000 en un área de salud de Navarra, España, que los meses con más aislamientos fueron los de verano y otoño, con un 38,1% y 27% de los casos respectivamente, seguido con un 20,5% en primavera y un 14,4% en invierno. Tirado *et al.* (2009), obtuvieron resultados similares en Castellón, España, con un mayor número de cepas detectadas durante los meses de agosto (13,1%), julio (12%) y septiembre (10,8%), pertenecientes a la época de verano.

A nivel nacional, un estudio realizado por el Instituto de Salud Pública reveló que entre los años 2009-2014, la mayor cantidad de aislados clínicos desde humanos se obtuvo durante los meses correspondientes a primavera y verano, disminuyendo durante la época de invierno, observando estacionalidad en las cepas confirmadas. La Región Metropolitana seguida de la Región de Valparaíso, fue el área con la mayor tasa de detección de *Salmonella* (ISP, 2014). En el caso de las aves, la investigación realizada por Rodríguez *et al.* (2012), mostró que la mayor cantidad de aislamientos en gaviota dominicana (*L. dominicanus*) en la ciudad de Talcahuano fue durante los meses de otoño, resultado coincidente con lo encontrado por López-Martín *et al.* (2011) en la misma localidad chilena.

El impacto de *Salmonella* en la salud pública nacional y mundial es importante, identificándose a las aves como el principal reservorio de este agente. Dado a la poca información existente sobre estacionalidad en el aislamiento de *Salmonella* en aves silvestres, es que se propuso como objetivo de esta Memoria de Título, determinar la existencia de variación estacional en la detección de cepas de *S. enterica* aisladas desde heces de gaviotas dominicanas (*Larus dominicanus*) en la Región de Valparaíso por ser una de las principales localidades de Chile desde donde se han obtenido aislados clínicos desde seres humanos. Además, debido a la importancia que ha tenido en el último tiempo la resistencia antimicrobiana detectada en diferentes cepas de *Salmonella*, es que se realizó

una caracterización fenotípica y genotípica de aquellas cepas con resistencia antimicrobiana.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la variación estacional en la detección de cepas de *Salmonella entérica* aisladas en heces de gaviota dominicana en la Región de Valparaíso y caracterizar fenotípica y genotípicamente, aquellas cepas detectadas que presenten resistencia a antimicrobianos.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Detectar cepas de *S. enterica* en muestras de gaviota dominicana (*Larus dominicanus*) en la Región de Valparaíso.
2. Identificar la variación estacional en la detección de cepas de *S. enterica* aisladas desde gaviotas dominicanas (*Larus dominicanus*) en la Región de Valparaíso.
3. Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia antimicrobiana de las cepas de *S. enterica* aisladas desde gaviotas dominicanas (*Larus dominicanus*) en la Región de Valparaíso.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Muestreo**

Se obtuvieron un total de 608 muestras de heces entre los meses de abril del año 2015 y 2016. Las muestras correspondientes a los meses de verano y otoño fueron previamente tomadas y conservadas a temperatura de refrigeración en el laboratorio de Enfermedades Infecciosas de FAVET. Las actividades de muestreo para los meses asociados a invierno y primavera se realizaron en intervalos de dos meses con un promedio de 100 muestras por cada actividad. La población de estudio fueron ejemplares de gaviota dominicana (*Larus dominicanus*) desde la Caleta Portales, Región de Valparaíso.

La toma de muestras fue realizada mediante torulado de heces frescas en el ambiente, mantenidas en medio de transporte Cary-Blair (COPAN®) a temperatura de refrigeración, hasta llegar al laboratorio de Enfermedades Infecciosas de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile donde fueron procesadas.

### **Aislamiento**

Los procedimientos realizados fueron los descritos por Fresno *et al.* (2013) para el aislamiento de *Salmonella* desde heces frescas:

Día 1: Para lograr aislar la bacteria, las tómulas fueron introducidas en tubos de ensayo con 5mL de agua peptonada fosfatada (APT, Difco™) previamente suplementada con 20 µg/mL de novobiocina, para posteriormente ser incubada por 18-24 hrs. a 37°C.

Día 2: De aquellas muestras sospechosas de crecimiento bacteriano, que se identificaron por la turbidez en los tubos, se inoculó 2 – 3 gotas (100 µL) en placas de agar semisólido modificado Rappaport Vassiliadis (MSRV) suplementado con 20 µg/mL de novobiocina, y se incubó por 24 o 48 hrs. a 41.5°C.

Día 3: De las placas de las que se sospechó presencia de *Salmonella*, se realizó siembra por agotamiento en placas de agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD), y se incubaron por 24 hrs. a 37°C.

Día 4: Las colonias sospechosas fueron confirmadas mediante una Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR) para el gen *invA* utilizando los partidores: InvA1 (5'-gtgaaattatcgccacgttcgggcaa-3') e InvA2 (5'-tcatcgcaccgtcaaaggaacc-3') previamente descritos por Malorny *et al.* (2003). Como controles positivos se utilizaron cepas de *S. Enteritidis* previamente detectadas en el laboratorio y como controles negativos, mezclas de la reacción sin templado. Las condiciones de amplificación utilizadas se especifican en la Tabla 1 y 2.

Posteriormente, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2% y se utilizó tinción con GelRed® para la visualización de los amplificados.

**Tabla 1:** Mezcla de la reacción de PCR.

Reactivo	Concentración	Volúmenes ( $\mu\text{L}$ )
Buffer Taq 10x	1X	1
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1,35 mM	0,27
dNTPs 10 mM	0,2 mM	0,2
TaqPol platinum	0,25 U	0,05
DNA Templado	10-100 ng	0,5
Partidor 1 10x	500 nM	0,5
Partidor 2 10x	500 nM	0,5
H <sub>2</sub> O	csp	6,98
Volumen final		10

**Tabla 2:** Condiciones del termociclador.

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

### Determinación de variabilidad estacional

La presencia de variabilidad entre las estaciones del año (verano, otoño, invierno y primavera) asociado a la detección de cepas de *S. enterica* aisladas desde heces de gaviota dominicana (*Larus dominicanus*) se ha estudiado utilizando el estadístico de  $\chi^2$  para datos categorizados, mediante el uso de tablas de contingencia en el programa Infostat®.

## **Determinación de fenotipos de resistencia antimicrobiana**

La susceptibilidad antimicrobiana fue evaluada mediante el método de difusión en placa (Kirby Bauer), de acuerdo a las normas recomendadas por el *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012) y el *National Antimicrobial Resistance Monitoring System* (NARMS, 2011) con algunas modificaciones descritas por Sjölund-Karlsson *et al.* (2011). Se evaluaron los siguientes antimicrobianos: enrofloxacino (10µg), amoxicilina + ácido clavulánico (20/10 µg), gentamicina (10µg), tetraciclina (30µg), sulfametoxazol + trimetoprim (23,75/1,25 µg), ceftiofur (30µg), ampicilina (10µg), cefadroxilo (30µg), amikacina (30 µg), azitromicina (15 µg), ceftriaxona (30 µg), cloranfenicol (30 µg), ciprofloxacino (5 µg), kanamicina (30 µg), ácido nalidíxico (30 µg), estreptomicina (10 µg), sulfisoxazole (250 µg). Se utilizó *Escherichia coli* ATCC 25922 como cepa control. Los rangos de inhibición de crecimiento bacteriano utilizados como criterio para determinar susceptibilidad y resistencia según el NARMS (2011) se encuentran en el Anexo 1.

Para el ensayo de Kirby Bauer se usó agar Mueller-Hinton, preparado según las recomendaciones del fabricante (Difco®). Se utilizó el método descrito previamente por Fresno *et al.* (2013), donde las cepas en estudio y la cepa control se sembraron en 2 mL de APT y fueron incubadas durante 18 a 24 horas a  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Luego, 100 µL de la suspensión bacteriana se inocularon en 5 mL de APT y esto se incubó en agitación a  $37^{\circ}\text{C}$  hasta alcanzar una densidad óptica (o absorbancia, OD600) de 0,25, lo que es equivalente a  $1-5 \times 10^8$  UFC/mL. Las placas fueron sembradas mediante el método de siembra en césped y, los discos de antimicrobianos se posicionaron de manera equidistante para posteriormente, incubar las placas a  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 18 a 24 horas.

## **Determinación de perfiles genéticos de resistencia antimicrobiana**

Se seleccionaron genes que codifican resistencia a tetraciclina (*tet(A)*, *tet(B)* y *tet(G)*), amoxicilina + ácido clavulánico y ampicilina (*bla<sub>PSE-1</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, y *bla<sub>CMY</sub>*), ceftiofur (*bla<sub>CMY</sub>*), gentamicina (*aadB* y *aacC*), y además se detectó la presencia de integrones clase 1, tal como ha sido descrito previamente por Benavides (2015). Como controles positivos se utilizó cepas de *S. Enteritidis* cuyos perfiles de resistencia han sido previamente

caracterizados en el laboratorio de Enfermedades Infecciosas de FAVET. Como controles negativos se han utilizado mezclas de reacción sin templado.

Para la detección de los genes asociados a resistencia antimicrobiana se utilizó PCR convencional, según las mismas condiciones descritas anteriormente en las Tablas 1 y 2.

Posteriormente, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2% y se utilizó tinción con GelRed® para la visualización de los amplificados.

### **Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia antimicrobiana**

La presencia de un fenotipo o de un gen de resistencia se registró con un valor de 1, y su ausencia con un valor de 0. De esta manera, cada cepa tiene un perfil de fenotipos y de genes de resistencia antimicrobiana con un número de 17 y 9 dígitos respectivamente.

### **Bioseguridad**

Debido a que *S. enterica* está clasificada como un patógeno de riesgo intermedio, se han utilizado medidas de bioseguridad como: uso de delantal blanco, guantes, lavado de manos y superficies, y desinfección con alcohol 70%. Además, se ha realizado un entrenamiento previo en la manipulación de muestras y procedimientos experimentales, se vacunó contra Influenza a todo el personal involucrado en la obtención de muestras, y se utilizó una Cabina de Flujo Laminar tipo IIA, para seguridad biológica.

## RESULTADOS

### 1. Detección de cepas de *S. enterica* en muestras de gaviota dominicana (*Larus dominicanus*) en la Región de Valparaíso.

En esta Memoria de Título se analizó un total de 608 muestras recolectadas desde heces frescas de gaviota dominicana (*Larus dominicanus*) tomadas directamente del ambiente, durante los meses comprendidos entre Abril de 2015 y Abril de 2016.

Las muestras fueron distribuidas de acuerdo a si se logró aislar cepas de *Salmonella* y según el mes en que se han recolectado (Tabla 3). Del total de muestras, se logró identificar 7 cepas de *S. enterica* y por lo tanto, en 601 muestras de heces frescas no se logró aislar el patógeno.

**Tabla 3:** Distribución de aislamientos positivos y negativos de *Salmonella* spp. según el mes de muestreo respecto del total de muestras analizadas (en números absolutos).

<b>Fecha de muestreo</b>	<b>Aislamientos positivos de <i>Salmonella</i> spp.</b>	<b>Aislamientos negativos de <i>Salmonella</i> spp.</b>	<b>Total de muestras analizadas</b>
<b>Abril</b>	0	103	103
<b>Junio</b>	1	104	105
<b>Agosto</b>	2	98	100
<b>Noviembre</b>	1	99	100
<b>Enero</b>	0	100	100
<b>Abril</b>	3	97	100
<b>TOTAL</b>	7	601	608

## 2. Identificación de la variación estacional en la detección de cepas de *S. enterica* aisladas desde gaviotas dominicanas (*Larus dominicanus*) en la Región de Valparaíso.

La información obtenida fue ordenada según la estación del año a la que correspondían los aislamientos positivos, y se agregó la tasa de reacción como se observa en la Tabla 4.

**Tabla 4:** Distribución estacional de las cepas aisladas desde heces frescas de gaviota dominicana (*Larus dominicanus*) en números absolutos y la tasa de reacción.

Estación del año	Aislamientos positivos (Número absoluto)	Tasa de reacción (%)
Otoño	4	2
Invierno	2	1,2
Primavera	1	1
Verano	0	0
TOTAL	7	1,1

Una vez organizada la información, los datos fueron introducidos en el programa Infostat® utilizando el estadístico de  $\chi^2$  para datos categorizados mediante el uso de tablas de contingencia. El valor obtenido fue de  $p=0.5984$  ( $gl=3$ ;  $\alpha=0.05$ ), mayor al nivel de significancia establecido ( $p>0.05$ ). Por lo tanto, no existe asociación entre las variables de estacionalidad y detección de *Salmonella* spp., por lo que las diferencias encontradas son debidas al azar.

## 3. Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia antimicrobiana de las cepas de *S. enterica* aisladas desde gaviotas dominicanas (*Larus dominicanus*) en la Región de Valparaíso.

Las cepas aisladas fueron denominadas: Spp. 128, Spp. 131, Spp. 132, Spp. 133, Spp. 134, Spp. 135, y Spp. 136. En base a los resultados del radio de inhibición de crecimiento

bacteriano mediante el método de difusión en placa (Anexo 2), se obtuvieron 5 perfiles fenotípicos de resistencia antimicrobiana que se observan en la Tabla 5.

**Tabla 5:** Perfiles fenotípicos de resistencia antimicrobiana.

N° / Agente antimicrobiano																	ID (Spp.)	
	Enrofloxacino	Amoxicilina + ácido clavulánico	Gentamicina	Tetraciclina	Sulfametoxazol + trimetoprim	Ceftiofur	Ampicilina	Amikacina	Azitromicina	Ceftriaxona	Cloranfenicol	Ciprofloxacino	Kanamicina	Ácido nalidíxico	Estreptomina	Sulfisoxazole		Cefadroxilo
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	131 134
2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	128
3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	135
4	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	132 133
5	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	136

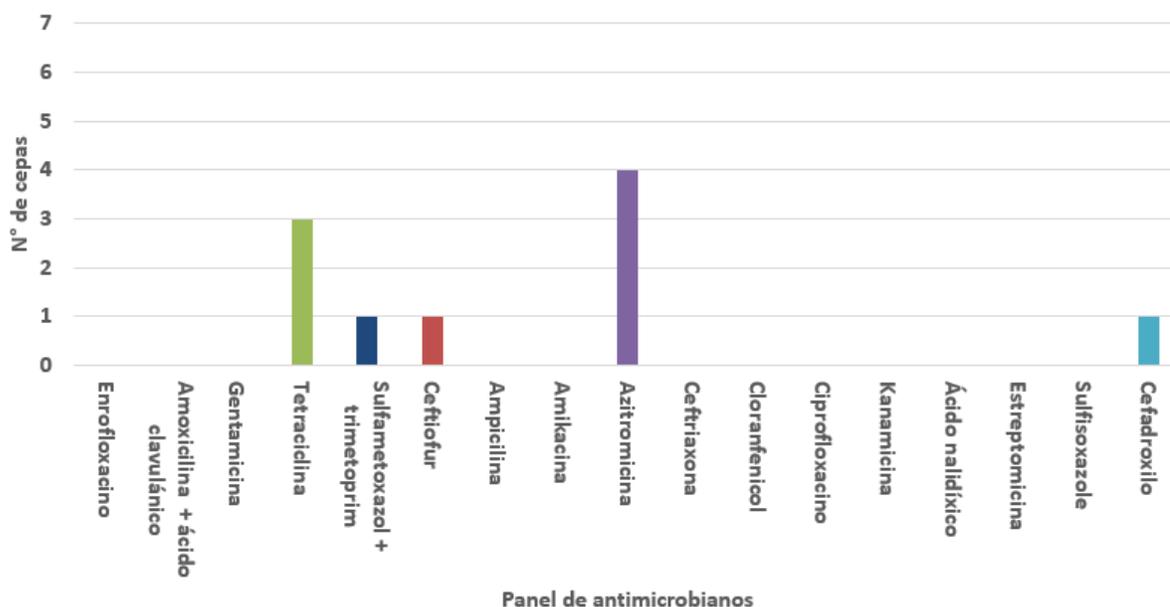
1 = presencia de un fenotipo de resistencia; 0 = ausencia de un fenotipo de resistencia; ID (Spp.): Código de identificación de las cepas.

De las 7 cepas aisladas, un 28,5% fue sensible a todo el panel antimicrobiano estudiado y, por ende, un 71,4% presentó algún tipo de resistencia, donde un 28,5% fue resistente para un sólo un fármaco, y un 42,8% para dos o más antibióticos. Spp. 131 y Spp. 134 fueron sensibles a todo el panel de antimicrobianos. Spp. 128 y 135 sólo fueron resistentes a un antimicrobiano, azitromicina y tetraciclina, respectivamente, mientras que las cepas Spp. 132 y 133 presentaron el mismo perfil fenotípico con resistencia a ambos fármacos. Spp. 136 fue la cepa que presentó resistencia a un mayor número de antibióticos (sulfametoxazol + trimetoprim, ceftiofur, azitromicina y cefadroxilo). En la Figura 1 se observan las frecuencias de los antimicrobianos asociados a perfiles fenotípicos de resistencia, encontrándose un mayor número de cepas resistentes a azitromicina y tetraciclina.

Respecto de los genes de resistencia se obtuvo un total de 2 perfiles genéticos de resistencia antimicrobiana diferentes que se observan en la Tabla 6. En la cepa Spp. 128 no se detectó la existencia de ninguno de los genes buscados, mientras que en las cepas Spp.

131 hasta la Spp. 136 se identificó la presencia del gen *bla<sub>TEM</sub>* codificante para la resistencia a amoxicilina + ácido clavulánico y ampicilina. En ninguna de las cepas detectadas se encontró la presencia de integrones de clase 1, indicando que el traspaso de información genética puede estar asociada a otros elementos génicos móviles.

**Figura 1:** Gráfico de frecuencias de antibióticos asociados a fenotipos de resistencia antimicrobiana.



**Tabla 6:** Perfiles genéticos de resistencia antimicrobiana

Perfiles genéticos de resistencia antimicrobiana										ID (Spp.)
N°	<i>tet(A)</i>	<i>tet(B)</i>	<i>tet(G)</i>	<i>bla<sub>PSE-1</sub></i>	<i>bla<sub>TEM</sub></i>	<i>bla<sub>CMY</sub></i>	<i>aadB</i>	<i>aacC</i>	Int-1	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	128
2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	131 - 136

1 = presencia de un gen de resistencia; 0 = ausencia de un gen de resistencia; ID (Spp.): Código de identificación de las cepas.

## DISCUSIÓN

Desde 1980, las enfermedades zoonóticas han sido asociadas con más de la mitad de los brotes registrados en seres humanos hasta el año 2013, siendo *Salmonella* el principal patógeno involucrado (Smith *et al.*, 2014). Aunque la enfermedad está relacionada con mayor frecuencia al consumo de alimentos (Majowicz *et al.*, 2010), se ha relacionado que la presencia de aves silvestres en cercanías de instalaciones agrícolas, puede significar un alto riesgo en la transmisión de *Salmonella* a otras especies (Andrés-Barranco *et al.*, 2014; Luque *et al.*, 2009; Skov *et al.*, 2008).

En esta Memoria de Título se aisló un 1,1% de cepas de *Salmonella enterica* de un total de 608 muestras tomadas mediante torulado de heces frescas desde el ambiente provenientes de gaviota dominicana (*L. dominicanus*) en la Región de Valparaíso. Estos resultados son bastante similares a lo encontrado en dos investigaciones hechas en gaviotas mediante el mismo método de muestreo. Palmgren *et al.* (2006) aislaron el patógeno en un 2,7% de gaviotas de cabeza negra (*Chroicocephalus ridibundus*) del sur de Suecia, mientras que en *L. dominicanus* de diferentes regiones de Chile, Fresno *et al.* (2013) detectó *Salmonella* en un 6% de las gaviotas estudiadas. Por otro lado, en Talcahuano, Chile, López-Martín *et al.* (2011) encontró un 25,2% y un 2,7% de gaviotas dominicanas y gaviotas de Franklin (*Leucophaeus pipixcan*) respectivamente, infectadas por algún serovar de *Salmonella*.

La baja tasa de aislamiento encontrada en este estudio puede estar explicada por diferentes factores. Por un lado, se ha descrito que la expulsión de este patógeno mediante las heces en gaviotas es durante un corto período, no mayor a 4 días. Además, generalmente la concentración bacteriana en las heces es baja, menor a 200 organismos/gramo (Girdwood *et al.*, 1985). Si tomamos en cuenta que el muestreo en promedio se realizó durante un día cada dos meses, es probable que muchas gaviotas hayan estado infectadas y no fueran detectadas, y por lo tanto, no se reflejarán en los resultados del estudio. Si a esto le sumamos la baja concentración bacteriana en las heces, y las condiciones ambientales a las que están sometidas las bacterias, existe también la opción de que algunas hayan podido morir por estrés ambiental, o estuvieran muy débiles para crecer y multiplicarse a pesar de la etapa de pre-enriquecimiento con agua peptonada fosfatada. Sin embargo, aunque se describe una baja concentración excretada de *Salmonella*, por lo general las gaviotas se

organizan en bandadas de 40 a 50 individuos, y por lo tanto, la contaminación de múltiples superficies por estas aves implica riesgo de diseminación de este patógeno a los seres humanos, así como también a otros animales.

Las conductas alimentarias han sido también detectadas como un factor ligado a la presencia de *Salmonella* en aves silvestres. En un estudio realizado en este tipo de aves en Dinamarca, se detectó una asociación significativa entre las preferencias alimentarias y el riesgo de infectarse, siendo mayor en aquellas que se alimentaban preferentemente de insectos, y menor en aquellas que prefieren semillas y granos (Skov *et al.*, 2008). López-Martín *et al.* (2011) han encontrado resultados similares en gaviotas, donde se concluyó que la menor detección del patógeno en gaviotas de Franklin era debido a su dieta principalmente a base de crustáceos, mientras que en gaviotas dominicanas la detección era mayor debido a que en su dieta se incluye además de peces, mariscos y crustáceos, alimentos de industrias pesqueras, plantas procesadoras de alimentos, desperdicios de alimentos, y basurales. Sin embargo, aunque se haya encontrado una mayor tasa de detección de *Salmonella* en *L. dominicanus*, su nivel de infección dependerá de la contaminación ambiental a la que estén expuestas, tal como ha sido demostrado por estudios realizados en gaviotas argénteas (*Larus argentatus*), gaviotas sombrías (*Larus fuscus*) y gaviotas de cabeza negra (*Larus ridibundus*) (Girdwood *et al.*, 1985) y en otros animales de vida silvestre (Farías *et al.*, 2015). Dolejská *et al.* (2009) también relacionan la contaminación ambiental con la infección de *Salmonella* en aves silvestres, al encontrarla en heces de gaviotas de cabeza negra que anidaban en un estanque de República Checa. Además, quisieron determinar la existencia de este patógeno en la superficie del agua de ese estanque. Los resultados encontrados fueron similares entre ambas (16% y 24%, respectivamente), donde *S. Enteritidis* fue el serovar más frecuentemente aislado en los dos casos. Es decir, a pesar de la capacidad de adaptación a los ambientes antrópicos de las gaviotas dominicanas y los hábitos alimenticios que presenta, el riesgo de infección depende directamente de la presencia de *Salmonella* en el ambiente que puede ser contaminado directa o indirectamente por distintas especies animales, por factores ambientales y humanos (Farías *et al.*, 2015). En este estudio, la detección de *Salmonella* en *L. dominicanus* es de preocupación debido al estrecho contacto entre estas aves y los productos del mar en venta para consumo humano, suponiendo una fuente de

contaminación hacia o desde estos alimentos y, por ende, podría ser un riesgo de salmonelosis para los seres humanos u otros animales que consumen estos productos.

Diversos estudios realizados en diferentes especies han sugerido la existencia de estacionalidad en la detección de *Salmonella*. Por ejemplo, en seres humanos se ha encontrado que la mayor proporción de casos de salmonelosis está asociada principalmente a los meses de verano, tal y como lo señalan diferentes autores (Tirado *et al.*, 2009). Sin embargo, también se han encontrado mayores casos clínicos durante otoño, como ha sido reportado en Italia (Graziani *et al.*, 2013). En una investigación realizada en aves de vida libre en Inglaterra también se ha encontrado una marcada estacionalidad en el aislamiento de esta bacteria, donde un 77% de aislamientos en verderones europeos (*Chloris chloris*) fueron logrados entre los meses de diciembre y febrero, mientras que en los meses de verano sólo se consiguió identificar al patógeno en un 9% del total de aves (Lawson *et al.*, 2010). En este estudio no se encontró asociación estadística entre la detección de *Salmonella* y la estación del año en que se realizó el muestreo, resultados concordantes con lo observado en el año 2011 por López-Martín *et al.*

Algunos autores han encontrado asociación entre la estación del año y los aislamientos de *Salmonella* mientras que otros no, sin embargo, en la mayor parte de investigaciones realizadas en aves silvestres, el mayor número de detección de esta bacteria se logra en los meses de otoño e invierno. Esto ha sido asociado a una depresión en el sistema inmune de las aves, dejándolas de esta forma más susceptibles a infecciones por diferentes patógenos como *Salmonella* (Rodríguez *et al.*, 2012). De hecho, en aves paseriformes, el mayor número de mortalidad por salmonelosis se registró durante los meses correspondientes a invierno (Resfum *et al.*, 2003). Adicionalmente, se ha descrito que durante el verano la buena condición corporal de las aves debido a la mayor disponibilidad de alimentos, las hace menos susceptibles a la infección por esta bacteria (Resfum *et al.*, 2003).

Por otro lado, se describe que los ambientes fríos permiten una mejor supervivencia de patógenos ambientales como ha sido demostrado en el año 2009 por Kirchner *et al.*, quienes encontraron que a temperaturas de refrigeración controladas (4°C) se logró extender la persistencia de *Salmonella* Typhimurium durante un mes más en comparación con el almacenamiento de las cepas a temperatura ambiente. Por lo tanto, la mayor

infección durante invierno estaría explicada por la mayor supervivencia del patógeno en el ambiente. Además, se ha encontrado mayor resistencia de *Salmonella* en ambientes húmedos que en aquellos más secos, evidenciándose también diferencias entre serovares, donde *S. Typhimurium* fue mucho más resistente que *S. Dublin*.

En esta memoria, se observó que las cepas que fueron resistentes presentaron resistencia mayoritariamente para azitromicina (AZM). Este resultado no coincide con otros estudios previos de sensibilidad antimicrobiana, donde se ha evidenciado que este macrólido es eficiente contra cepas de *Salmonella* aisladas desde muestras de seres humanos, animales y alimentos cárneos (Sjölund-Karlsson *et al.*, 2011), motivo por el cual es uno de los fármacos de elección en el tratamiento de salmonelosis complicada. Sin embargo, algunos estudios ya han mostrado aumento en la resistencia contra esta droga como lo demuestra un estudio realizado en pacientes finlandeses, donde se encontró un 1,9% de resistencia para azitromicina en 12 serovares distintos, siendo *S. Stanley* el serovar más frecuentemente aislado, pero incluyendo también otros serovares como *S. Newport*, *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* (Gunell *et al.*, 2010). Por otro lado, la investigación de Sjölund-Karlsson *et al.* (2011) mostró tres cepas de *Salmonella* resistentes, dentro de los que se encontraban los serovares Kentucky y Montevideo, además de *S. Paratyphi A*, causante de fiebre paratifoidea en seres humanos (Jurado *et al.*, 2010). En esta memoria no se incluyó la serotipificación de las cepas y, por lo tanto, es recomendable que se envíen al laboratorio de referencia (Instituto de Salud Pública de Chile) para identificar a qué serovar corresponden las cepas aisladas y de ese modo evidenciar si existe relación entre la resistencia hacia AZM y los serovares descritos en estudios previos.

Por otro lado, la resistencia encontrada para tetraciclina (TE) fue la segunda con mayor frecuencia. Este resultado es concordante con un estudio realizado en costas chilenas en gaviotas (*L. dominicanus* y *L. pipixcan*) donde la tetraciclina fue el fármaco para el cual *Salmonella* presentó la más baja sensibilidad (74%; Fresno *et al.*, 2013). La resistencia antimicrobiana hacia TE es probablemente una de las más diseminadas entre diferentes especies, como es demostrado por Farías *et al.* (2014), quien evidenció que en animales en cautiverio y especies exóticas también existe una alta frecuencia de resistencia de *Salmonella* contra TE (11.8%). En el caso de los seres humanos también hay un alto

porcentaje de cepas de *Salmonella* resistentes. En el año 2013, un 58% de resistencia fue detectada por De Toro *et al.* donde los mayores porcentajes de resistencia se observaron entre los aislados del serotipo Typhimurium, mientras que en pacientes pediátricos de Irán un 51.8% de aislados fue resistente a tetraciclina, solo superado por doxiciclina (64,7%) y ácido nalidíxico (61,2%) (Ranjbar *et al.*, 2011).

Dentro de los resultados de esta memoria se ha observado que dos cepas fueron resistentes para azitromicina y tetraciclina individualmente, dos cepas más fueron resistentes a ambos antimicrobianos en forma simultánea, mientras que solo una cepa presentó resistencia para más de dos fármacos: sulfametoxazol + trimetoprim (STX), ceftiofur (EFT) y cefadroxilo (CFR), además de AZM. Fresno *et al.* (2013) también encontraron un bajo porcentaje de resistencia para los tres primeros antimicrobianos en gaviotas dominicanas y gaviotas de Franklin. Aunque la resistencia a STX en seres humanos está muy diseminada, en el caso de las aves silvestres, el porcentaje de cepas resistentes es bastante bajo, encontrándose cepas de *Salmonella* 100% sensibles al fármaco como es demostrado por algunos estudios (Hughes *et al.*, 2008; Mirzaie *et al.*, 2010), sugiriendo que la resistencia para este fármaco no está aún tan diseminada. Kidie *et al.* (2013) estudió la resistencia antimicrobiana de *Salmonella* en un matadero de aves para consumo humano, detectando un porcentaje de resistencia de 2,3% para STX, cifra inferior al de otros grupos de antimicrobianos como TE (22.7%) o ácido nalidíxico (21,6%). Lo importante es que en este mismo estudio, se encontró que el 52,3% de aislados fue resistente a un antibiótico y un 21,6% fue resistente a más de uno, datos similares a lo encontrado en esta memoria, donde de las 7 cepas aisladas, un 42,8% presentó resistencia a más de un antimicrobiano, señalando la importancia del uso regulado de estos fármacos. El hecho de que se haya observado resistencia para cefadroxilo y ceftiofur, principalmente este último de uso exclusivo para animales, deja manifiesto la importancia que tiene el evitar el uso de antibióticos para promover el crecimiento en industrias ganaderas y avícolas, y regular el uso generalizado de antibióticos para el tratamiento de las enfermedades, tanto en animales como seres humanos.

Respecto a los genes codificantes para resistencia antimicrobiana, se encontraron dos perfiles genéticos de resistencia, el primero con ausencia de todos los genes, y el segundo con la presencia del gen *bla<sub>TEM</sub>* codificante para la resistencia a amoxicilina + ácido

clavulánico y ampicilina. Lo que muestran estos resultados es que la resistencia para estos  $\beta$ -lactámicos está asociada a la producción de enzimas  $\beta$ -lactamasas del tipo TEM, concordantes con los resultados obtenidos previamente por otros autores en seres humanos y aves silvestres y comerciales (De Toro *et al.*, 2014; Benavides, 2015). A pesar de que *tet(A)* ha sido uno de los genes codificantes para resistencia a tetraciclina más frecuentemente identificados (Dolejská *et al.*, 2009; De Toro *et al.*, 2014), en este estudio, no se ha reportado en ninguna de las cepas estudiadas, así como tampoco los genes *tet(B)* ni *tet(G)*. En el caso de los genes de resistencia a gentamicina, *aadB* y *aacC*, no han sido detectados en este estudio, resultados que difieren a lo encontrado en el año 2008 por Lynne *et al.* en cepas de *S. Newport*.

Adicionalmente, se incluyó el estudio de integrones de clase 1, elementos genéticos más frecuentemente involucrados en la transmisión de genes de resistencia. Sin embargo, los resultados muestran que las cepas estudiadas no presentan en su estructura estos elementos. Para un mejor análisis de estos resultados, se hace necesario realizar una serotipificación de las cepas, ya que la presencia de esta clase de integrones puede variar dependiendo del serovar aislado, asociándose las cepas de *S. Enteritidis* a una baja presencia de integrones de clase 1, a diferencia de *S. Typhimurium*, altamente asociada a la diseminación de estos genes (Ranjbar *et al.*, 2011).

Finalmente, en este estudio no se observa concordancia entre los fenotipos de resistencia encontrados y los genes de resistencia antimicrobiana, esto debido a que en el método de difusión en placa se observó resistencia fenotípica hacia determinados agentes antimicrobianos para los que sin embargo no hubo detección a nivel genético asociado. Lo que estos resultados sugieren, es que la diferencia está dada porque los perfiles fenotípicos encontrados en este estudio están codificados por otros genes codificantes a dicha resistencia que no se han incluido en este estudio.

## CONCLUSIONES

1. Existe presencia de *Salmonella enterica* en heces frescas de gaviotas dominicanas (*Larus dominicanus*) de la Región de Valparaíso.
2. En este estudio no existe variación estacional asociada a la detección de cepas de *S. enterica* aislada desde heces de gaviotas dominicanas (*L. dominicanus*).
3. Se detectaron fenotipos de resistencia antimicrobiana en las cepas estudiadas, sin embargo, no existe concordancia con los genes codificantes para esa resistencia, sugiriendo que la resistencia a nivel fenotípico está codificada por genes no incluidos en el presente estudio.
4. Es necesario realizar una serotipificación de las cepas estudiadas para lograr un análisis más completo de los perfiles fenotípicos y genotípicos identificados.

## BIBLIOGRAFÍA

**ANDRÉS-BARRANCO, S.; VICO, J.; GARRIDO, V.; SAMPER, S.; HERRERA-LEÓN, S.; DE FRUTOS, C.; MAINAR-JAIME, R.** 2014. Role of Wild Bird and Rodents in the Epidemiology of Subclinical Salmonellosis in Finishing Pigs. *Foodborne Pathog Dis.* 11(9):689-697.

**BENAVIDES, M.** 2015. Comparación de los perfiles genéticos de resistencia a antimicrobianos de cepas de *Salmonella enterica* obtenidas de distintos hospederos en Chile. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 34p.

**BORIE, C.** 2010. Salmonelosis. **In:** Retamal, P.; Abalos, P.; Fredes, F. (Eds.). Enfermedades animales producidas por agentes biológicos. Editorial Universitaria. pp. 95-100.

**BUTAYE, P.; VAN DUIJKEREN, E.; PRESCOTT, J.; SCHWARZ, S.** 2014. Antimicrobial resistance in bacteria from animals and the environment. *Vet Microbiol.* 171:269-272.

**CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE.** 2012. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. 32(3):42-60.

**DE TORO, M.; SERAL, C.; ROJO-BEZARES, B.; TORRES, C.; CASTILLO, F.; SÁENZ, Y.** 2014. Resistencia a antibióticos y factores de virulencia en aislados clínicos de *Salmonella enterica*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 32(1):4-10.

**DOLEJSKÁ, M.; BIEROSOVÁ, B.; KOHOUTOVÁ, L.; LITERÁK, I.; CÍZEK, A.** 2009. Antibiotic-resistant *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates with integrons and extended-spectrum beta-lactamases in surface water and sympatric black-headed gulls. *J Appl Microbiol.* 106(2009):1941-1950.

**FARIAS, L.; OLIVEIRA, C.; MEDARDUS, J.; MOLLA, B.; WOLFE, B.; GEBREYES, W.** 2015. Phenotypic and Genotypic Characterization of *Salmonella enterica* in Captive Wildlife and Exotic Animal Species in Ohio, USA. *Zoonoses Public Health.* 62(6):438-444.

**FRESNO, M.; BARRERA, V.; GORNALL, V.; LILLO, P.; PAREDES, N.; ABALOS, P.; FERNÁNDEZ, A.; RETAMAL, P.** 2013. Identification of diverse *Salmonella* Serotypes, Virulotypes, and Antimicrobial Resistance Phenotypes in Waterfowl From Chile. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 13(12):1-4.

**GIL-SETAS, A.; MAZÓN, A.; MARTÍN, C.; URTIAGA, M.; INZA, M.** 2002. Salmonelosis no tifoidea en un área de salud de Navarra, España. *Rev Esp Salud Pública.* 76(1):49-56.

**GIRDWOOD, R.; FRICKER, C.; MUNRO, D.; SHEDDEN, C.; MONAGHAN, P.** 1985. The incidence and significance of *Salmonella* carriage by gulls (*Larus* spp.) in Scotland. *J. Hyg., Camb.* 95:229-241.

**GRAZIANI, C.; MUGHINI-GRAS, L.; OWCZAREK, S.; DIONISI, A.; LUZZI, I.; BUSANI, L.** 2013. Distribution of *Salmonella enterica* isolates from human cases in Italy, 1980 to 2011. *Euro Surveill.* 18(27):1-9.

**GRUSZYNSKI, K.; PAO, S.; KIM, C.; TONEY, D.; WRIGHT, K.; COLÓN, A.; ENGELMEYER, T.; LEVINE, S.** 2014. Evaluating Gulls as Potential Vehicles of *Salmonella enterica* Serotype Newport (JJPX01.0061) Contamination of Tomatoes Grown on the Eastern Shore of Virginia. *Appl Environ Microbiol.* 80(1):235-238.

**GUNELL, M.; KOTILAINEN, P.; JALAVA, J.; HUOVINEN, P.; SIITONEN, A.; HAKANEN, A.** 2010. *In Vitro* Activity of Azithromycin against Nontyphoidal *Salmonella enterica*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54(8):3498–3501.

**HILBERT, F.; SMULDERS, F.; CHOPRA-DEWASTHALY, R.; PAULSEN, P.** 2012. *Salmonella* in the wildlife-human interface. *Food Res Int.* 45:603–608.

**HUGHES, L.; SHOPLAND1, S.; WIGLEY, P.; BRADON1, H.; LEATHERBARROW, A.; WILLIAMS, N.; BENNETT, M.; DE PINNA, E.; LAWSON, B.; CUNNINGHAM, A.; CHANTREY, J.** 2008. Characterisation of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates from wild birds in northern England from 2005 – 2006. *BMC Vet. Res.* 4(4):1-10.

**HURLEY, D.; McCUSKER, M.; FANNING, S.; MARTINS, M.** 2014. *Salmonella*–host interactions – modulation of the host innate immune system. *Front Immunol.* 5:1-11.

**INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA.** 2012. Boletín Laboratorio y Vigilancia al día. [en línea]. <<http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento/2012/06/BOLETIN%2015.pdf>>. [consulta: 24-03-2015].

**INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA.** 2014. Vigilancia de laboratorio *Salmonella* spp. 2009 - 2014. *Boletín ISP.* 4(10):1-18.

**JURADO, R.; ARENAS, A.; DOBLAS, A.; RIVERO, A.; TORRE-CISNEROS, J.** 2010. Fiebre tifoidea y otras infecciones por salmonellas. *Medicine.* 10(52):3497-3501.

**KIDIE, D.; BAE, D.; LEE, Y.** 2013. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from poultry slaughterhouses in Korea. *Jpn J Vet Res.* 61(4): 129-136.

**KIRCHNER, M.; LIEBANA, E.; MCLAREN, I.; CLIFTON-HADLEY, F.; WALES, A.; DAVIES, R.** 2012. Comparison of the environmental survival characteristics of *Salmonella* Dublin and *Salmonella* Typhimurium. *Vet Microbiol.* 159:509–514.

**LYNNE, A.; RHODES, B.; BLIVEN, K.; ZHAO, SH.; FOLEY, S.** 2008. Antimicrobial resistance genes associated with *Salmonella enterica* serovar Newport isolates from foods animals. *Antimicrob Agents CH.* 52(1):353-356.

**LÓPEZ-MARTÍN, J.; JUNOD, T.; RIQUELME, F.; CONTRERAS, C.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.** 2011. Detección de especies de *Salmonella* y *Mycobacterium* en gaviotas dominicanas (*Larus dominicanus*) y gaviotas de Franklin (*Leucophaeus pipixcan*) en la ciudad de Talcahuano, Chile. *Rev Med Chile.* 139:1496-1502.

**LUQUE, I.; ECHEITA, A.; LEÓN, J.; HERRERA-LEÓN, S.; TARRADAS, C.; GONZÁLEZ-SANZ, R.; HUERTA, B.; ASTORGA, R.J.** 2009. *Salmonella* Indiana as a cause of abortion in ewes: Genetic diversity and resistance patterns. *Vet Microbiol.* 134(2009):396–399.

**MAJOWICZ, S.; MUSTO, J.; SCALLAN, E.; ANGULO, F.; KIRK, M.; O'BRIEN, S.; JONES, T.; FAZIL, A.; HOEKSTRA, R.** 2010. The Global Burden of Nontyphoidal *Salmonella* Gastroenteritis. *Clin Infect Dis.* 50:882–889.

**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(1):290–296.

**METTEE, S.; BENNETT, S.; HALL, J.; YAEGER, J.; LUJAN, K.; ADAMS-CAMERON, M.; WINPISINGER, K.; BRENDEN, R.; BIGGERSTAFF, G.; HILL, V.; SHOLTES, K.; GARRETT, N.; LAFON, P.; BARTON, C.; SODHA, S.** 2013. US Outbreak of Human *Salmonella* Infections Associated With Aquatic Frogs, 2008–2011. *Pediatrics.* 131:724–731.

**MIRZAIE, S.; HASSANZADEH, M.; ASHRAFI, I.** 2010. Identification and characterization of *Salmonella* isolates from captured house sparrows. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 34(2):181-186.

**NATIONAL ANTIMICROBIAL RESISTANCE MONITORING SYSTEM.** 2011. National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria (NARMS): Human Isolates Final Report. Department of Health and Human Services, CDC. Atlanta, Georgia, U.S. 70p.

**PALMGREN, H.; ASPÁN, A.; BROMAN, T.; BENGTSSON, K.; BLOMQUIST, L.; BERGSTRÖM, S.; SELLIN, M.; WOLLIN, R.; OLSEN, B.** 2006. *Salmonella* in Black-headed gulls (*Larus ridibundus*); prevalence, genotypes and influence on *Salmonella* epidemiology. *Epidemiol. Infect.* 134:635–644.

**PUTTURU, R.; THIRTHAM, M.; EEVURI, T.** 2013. Antimicrobial sensitivity and resistance of *Salmonella* Enteritidis isolated from natural samples. *Vet World.* 6(4):185-188.

**RAHMANI, M.; PEIGHAMBARI, S.; SVENDSEN, C.; CAVACO, L.; AGERSØ, Y.; HENDRIKSEN, R.** 2013. Molecular clonality and antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Infantis from broilers in three Northern regions of Iran. *BMC Vet Res.* 9(1):1-9.

**RANJBAR, R.; GIAMMANCO, G.; FARSHAD, S.; OWLIA, P.; ALEO, A.; MAMMINA, C.** 2011. Serotypes, Antibiotic Resistance, and Class 1 Integrons in *Salmonella* Isolates from Pediatric Cases of Enteritis in Tehran, Iran. *Foodborne Pathog Dis.* 8(4):547-553.

**REFSUM, T.; VIKØREN, T.; HANDELAND, K.; KAPPERUD, G.; HOLSTAD, G.** 2003. Epidemiologic and pathologic aspects of *Salmonella* Typhimurium infection in passerine birds in Norway. *J Wildl Dis.* 39(1):64–72.

- RIVERA, L.; MOTTA, P.; CERÓN, M.; CHIMONJA, F.** 2012. Resistance of *Salmonella* to conventional antimicrobials for their treatment. Rev CES Med Vet Zootec. 7(1):115-127.
- RODRÍGUEZ, F.; MORENO, J.; ORTEGA, R.; MATHIEU, C.; GARCÍA, A.; CERDA-LEAL, F.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.** 2012. Evidence for Kelp Gulls (*Larus dominicanus*) and Franklin's Gulls (*Leucophaeus pipixcan*) as Carriers of *Salmonella* by Real-time Polymerase Chain Reaction. J. Wildl. Dis. 48(4):1105-1108.
- SEFTON, A.** 2002. Mechanisms of antimicrobial resistance: Their clinical relevance in the new millennium. Drug. 62:557-566.
- SINGH, V.** 2013. *Salmonella* Serovars and Their Host Specificity. J Vet Sci Anim Husband. 1(3):1-4.
- SJÖLUND-KARLSSON, M.; JOYCE, K.; BLICKENSTAFF, K.; BALL, T.; HARO, J.; MEDALLA, F.; FEDORKA-CRAY, P.; ZHAO, S.; CRUMP, J.; WHICHARD, J.** 2011. Antimicrobial Susceptibility to Azithromycin among *Salmonella enterica* Isolates from the United States. Antimicrob Agents Chemother. 55(9):3985-3989.
- SKOV, M.N.; MADSEN, J.J.; RAHBEK, C.; LODAL, J.; JESPERSEN, J.B.; JØRGENSEN, J.C.; DIETZ, H.H.; CHRIÉL, M.; BAGGESEN, D.L.** 2008. Transmission of *Salmonella* between wildlife and meat-production animals in Denmark. J Appl Microbiol. 105(2008):1558–1568.
- SMITH, K.; GOLDBERG, M.; ROSENTHAL, S.; CARLSON, L.; CHEN, J.; CHEN, C.; RAMACHANDRAN, S.** 2014. Global rise in human infectious disease outbreaks. J. R. Soc. Interface. 11(101):20140950.
- TIRADO, M.; MORENO, R.; CELADES, M.; BELLIDO-BLASCO, J.; PARDO, F.** 2009. Evolución de los serotipos, fagotipos y Resistencia a antimicrobianos de *Salmonella* sp en el departamento de salud 02 de la provincia de Castellón, España (2000-2006). Rev Chil Infect. 26(6):520-527.
- ZHANG, J.; DONG, L.; REN, Q.; WANG, X.; YANG, Y.; ZHOU, W.; ZHU, C.; MENG, X.; ZHU, G.** 2014. Simple and Rapid Detection of *Salmonella* by Direct PCR Amplification of Gene *fimW*. Curr Microbiol. 69:429–435.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Rangos de inhibición de crecimiento bacteriano utilizados como criterio para determinar susceptibilidad, sensibilidad intermedia y resistencia según lo indicado por el *National Antimicrobial Resistance Monitoring System* (NARMS, 2011).

<b>Agente antimicrobiano</b>	<b>Cantidad en disco (µg)</b>	<b>Sensible (mm)</b>	<b>Intermedio (mm)</b>	<b>Resistente (mm)</b>
Enrofloxacino	10	≥21	16-20	≤15
Amoxicilina + ácido clavulánico	42663	≥ 18	14 - 17	≤ 13
Gentamicina	10	≥ 15	13 – 14	≤ 12
Tetraciclina	30	≥ 15	12 – 14	≤ 11
Sulfametoxazol + trimetoprim	23,75 + 1,25	≥ 16	11–15	≤ 10
Ceftiofur	30	≥23	15-22	≤14
Ampicilina	10	≥ 17	14–16	≤ 13
Amikacina	30	≥ 17	15–16	≤ 14
Azitromicina	15	≥ 13	-	≤ 12
Ceftriaxona	30	≥ 23	20 - 22	≤ 19
Cloranfenicol	30	≥ 18	13–17	≤ 12
Ciprofloxacino	5	≥ 21	16–20	≤ 15
Kanamicina	30	≥ 18	14–17	≤ 13
Ácido nalidíxico	30	≥ 19	14–18	≤ 13
Estreptomina	10	≥ 15	12–14	≤ 11
Sulfisoxazole	250	≥17	13-16	≤12
Cefadroxilo	30	≥18	15-17	≤14

**Anexo 2.** Radio de inhibición de crecimiento bacteriano (en milímetros) para el panel de 17 antimicrobianos.

Cepas / Agente antimicrobiano	Enrofloxacino	Amoxicilina + Ác. clavulánico	Gentamicina	Tetraciclina	Sulfametoxazol + trimetoprim	Ceftiofur	Ampicilina	Amikacina	Azitromicina	Ceftriaxona	Cloranfenicol	Ciprofloxacino	Kanamicina	Ácido nalidíxico	Estreptomina	Sulfisoxazole	Cefadroxilo
<b><i>E. coli</i> ATCC 25922</b>	13	23	23	23	22	27	20	24	13	34	24	38	19	25	16	21	16
<b>Spp 128</b>	28	26	19	28	24	23	25	25	0**	34	24	35	24	22	17	20	18
<b>Spp 131</b>	33	27	22	26	28	26	27	24	16	30	31	35	24	23	18	20	19
<b>Spp 132</b>	29	26	20	0**	25	24	24	22	11**	30	30	31	25	22	17	20	19
<b>Spp 133</b>	29	26	22	0**	27	24	24	21	0**	29	27	31	25	23	20	27	18
<b>Spp 134</b>	32	22	20	24	31	26	20	23	13	31	29	35	24	26	18	28	18
<b>Spp 135</b>	30	25	21	0**	26	24	23	21	15	30	28	31	25	22	21	25	19
<b>Spp 136</b>	28	25	22	12	0**	17*	23	22	0**	27	27	30	22	21	20	26	10**

*E. coli* ATCC 25922 = cepa control de calidad.

\* = Sensibilidad intermedia; \*\* = Resistencia antimicrobiana