



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

DETERMINACIÓN MOLECULAR DE *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Enteritidis EN COLONIAS AISLADAS DE *Salmonella* spp. EN CUYES DE LA PROVINCIA DE COTOPAXI.

Proyecto de Investigación previo a la obtención del Título de Médica Veterinaria

Autora:

Medina Medina Ruth Cristina

Tutora:

Herrera Yunga Vanessa Del Rosario

LATACUNGA – ECUADOR

Febrero 2024

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Medina Medina Ruth Cristina, con cédula de ciudadanía No. 0550014450, declaro ser autora del presente Proyecto de Investigación: "**DETERMINACIÓN MOLECULAR DE *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Enteritidis EN COLONIAS AISLADAS DE *Salmonella* spp. EN CUYES DE LA PROVINCIA DE COTOPAXI.**", siendo la Médico Veterinaria Zootecnista. Vanessa Del Rosario Herrera Yunga, Mtr, Tutora del presente trabajo; y, eximo expresamente a la Universidad Técnica de Cotopaxi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Latacunga, 20 de febrero del 2024



Ruth Cristina Medina Medina
C.C: 0550014450
ESTUDIANTE

CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR

Comparecen a la celebración del presente instrumento de cesión no exclusiva de obra, que celebran de una parte **MEDINA MEDINA RUTH CRISTINA**, identificada con cédula de ciudadanía **0550014450**, de estado civil soltera, a quien en lo sucesivo se denominará **LA CEDENTE**; y, de otra parte, la Doctora Idalia Eleonora Pacheco Tigselema, Mg, en calidad de Rectora, y por tanto representante legal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con domicilio en la Av. Simón Rodríguez, Barrio El Ejido, Sector San Felipe, a quien en lo sucesivo se le denominará **LA CESIONARIA** en los términos contenidos en las cláusulas siguientes:

ANTECEDENTES: CLÁUSULA PRIMERA. - LA CEDENTE es una persona natural, estudiante de la carrera de Medicina Veterinaria, titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado “**DETERMINACIÓN MOLECULAR DE *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Enteritidis EN COLONIAS AISLADAS DE *Salmonella* spp. EN CUYES DE LA PROVINCIA DE COTOPAXI**”, la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad; y, las características que a continuación se detallan:

Historial Académico

Inicio de la carrera: ABRIL 2019 – AGOSTO 2019

Finalización de la carrera: OCTUBRE 2023-FEBRERO 2024

Aprobación en Consejo Directivo: 25 de mayo del 2023

Tutora: MVZ. Vanessa Del Rosario Herrera Yunga. Mtr.

Tema: “**DETERMINACIÓN MOLECULAR DE *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Enteritidis EN COLONIAS AISLADAS DE *Salmonella* spp. EN CUYES DE LA PROVINCIA DE COTOPAXI**”

CLÁUSULA SEGUNDA. - LA CESIONARIA es una persona jurídica de derecho público creada por ley, cuya actividad principal está encaminada a la educación superior, formando profesionales de tercer y cuarto nivel normada por la legislación ecuatoriana la misma que establece como requisito obligatorio para publicación de trabajos de investigación de grado en su repositorio institucional, hacerlo en formato digital de la presente investigación.

CLÁUSULA TERCERA. - Por el presente contrato, **LA CEDENTE** autoriza a **LA CESIONARIA** a explotar el trabajo de grado en forma exclusiva dentro del territorio de la República del Ecuador.

CLÁUSULA CUARTA. - OBJETO DEL CONTRATO: Por el presente contrato **LA CEDENTE**, transfiere definitivamente a **LA CESIONARIA** y en forma exclusiva los siguientes derechos patrimoniales; pudiendo a partir de la firma del contrato, realizar, autorizar o prohibir:

- a) La reproducción parcial del trabajo de grado por medio de su fijación en el soporte informático conocido como repositorio institucional que se ajuste a ese fin.
- b) La publicación del trabajo de grado.
- c) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.
- d) La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio, incluyendo mediante transmisión.
- e) Cualquier otra forma de utilización del trabajo de grado que no está contemplada en la ley como excepción al derecho patrimonial.

CLÁUSULA QUINTA. - El presente contrato se lo realiza a título gratuito por lo que **LA CESIONARIA** no se halla obligada a reconocer pago alguno en igual sentido **LA CEDENTE** declara que no existe obligación pendiente a su favor.

CLÁUSULA SEXTA. - El presente contrato tendrá una duración indefinida, contados a partir de la firma del presente instrumento por ambas partes.

CLÁUSULA SÉPTIMA. - CLÁUSULA DE EXCLUSIVIDAD. - Por medio del presente contrato, se cede en favor de **LA CESIONARIA** el derecho a explotar la obra en forma exclusiva, dentro del marco establecido en la cláusula cuarta, lo que implica que ninguna otra persona incluyendo **LA CEDENTE** podrá utilizarla.

CLÁUSULA OCTAVA. - LICENCIA A FAVOR DE TERCEROS. – LA CESIONARIA podrá licenciar la investigación a terceras personas siempre que cuente con el consentimiento de **LA CEDENTE** en forma escrita.

CLÁUSULA NOVENA. - El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en la cláusula cuarta, constituirá causal de resolución del presente contrato. En consecuencia, la resolución se producirá de pleno derecho cuando una de las partes comunique, por carta notarial, a la otra que quiere valerse de esta cláusula.

CLÁUSULA DÉCIMA. - En todo lo no previsto por las partes en el presente contrato, ambas se someten a lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, Código Civil y demás del sistema jurídico que resulten aplicables.

CLÁUSULA UNDÉCIMA. - Las controversias que pudieran suscitarse en torno al presente contrato, serán sometidas a mediación, mediante el Centro de Mediación del Consejo de la Judicatura en la ciudad de Latacunga. La resolución adoptada será definitiva e inapelable, así como de obligatorio cumplimiento y ejecución para las partes y, en su caso, para la sociedad. El costo de tasas judiciales por tal concepto será cubierto por parte del estudiante que lo solicitare.

En señal de conformidad las partes suscriben este documento en dos ejemplares de igual valor y tenor en la ciudad de Latacunga, a los 20 días del mes de febrero del 2024.



Ruth Cristina Medina Medina
LA CEDENTE

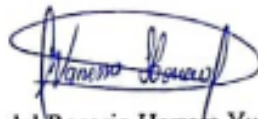
Dra. Idalia Pacheco Tigselema, Ph.D.
LA CESIONARIA

AVAL DE LA TUTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

En calidad de Tutora del Proyecto de Investigación sobre el título:

“DETERMINACIÓN MOLECULAR DE *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Enteritidis EN COLONIAS AISLADAS DE *Salmonella* spp. EN CUYES DE LA PROVINCIA DE COTOPAXI”, de Medina Medina Ruth Cristina, de la carrera de Medicina Veterinaria, considero que el presente trabajo investigativo es merecedor del Aval de aprobación al cumplir las normas, técnicas y formatos previstos, así como también ha incorporado las observaciones y recomendaciones propuestas en la Pre-defensa.

Latacunga, 20 de febrero del 2024



MVZ. Vanessa del Rosario Herrera Yunga, Mtr.
C.C: 1103758999
DOCENTE TUTORA

AVAL DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TITULACIÓN

En calidad de Tribunal de Lectores, aprobamos el presente Informe de Investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi; y, por la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales; por cuanto, el postulante: Medina Medina Ruth Cristina, con el título de Proyecto de Investigación :“DETERMINACIÓN MOLECULAR DE *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Enteritidis EN COLONIAS AISLADAS DE *Salmonella* spp. EN CUYES DE LA PROVINCIA DE COTOPAXI.”, ha considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometido al acto de sustentación del trabajo de titulación.

Por lo antes expuesto, se autoriza grabar los archivos correspondientes en un CD, según la normativa institucional.

Latacunga, 20 de febrero del 2024



Dra. Blanca Mercedes Toro Molina, Mg.
CC: 0501720999
LECTOR 1 (PRESIDENTE)



Dra. Nancy Margoth Cueva Salazar, Mg.
CC: 0501616353
LECTOR 2 (MIEMBRO)



Dra. Elsa Janceli Molina Molina, Mg.
CC: 0502409634
LECTOR 3 (MIEMBRO)

AGRADECIMIENTO

Primero a Dios por su infinita bondad, quien me permitió estar aquí y hacer este sueño realidad, viviendo cada día como un regalo para cumplir mis metas.

A mis padres Jorge y Miriam, quienes han formado parte de este proceso y de mi vida entera, que con su amor incondicional y su apoyo constante me impulsan a ser mejor cada día, a superar obstáculos y a luchar por mis sueños gracias a su guía y confianza.

A mis hermanos nunca me han dejado sola, y siempre han creído en mí, incluso cuando yo misma dudaba. Su amor y comprensión me han dado la fuerza para seguir adelante en los momentos difíciles.

A mis amigas quienes hicieron de mi vida universitaria una aventura completa y en especial a mi mejor amiga Dani quien a pesar de no ser de sangre, se convirtió en una hermana para mí.

A mi tutora y mis jefes por su amistad y compartir sus conocimientos conmigo para este logro y mi futuro.

A todos aquellos que se cruzaron en mi camino, que me han ayudado a crecer y se han preocupado por mí.

Ruth Cristina Medina Medina

DEDICATORIA

A aquellos que libran una batalla interna y que logran levantarse día tras día, que esperan con ansias que llegue la noche para poder descansar. Los que cuando por fin encuentran la fuerza para hablar, ya es demasiado tarde y nadie les escucha. Siempre habrá una luz al final del túnel. A ustedes, guerreros silenciosos.

A todas las mujeres que con valentía y determinación han optado por adentrarse en el vasto y fascinante mundo de la ciencia, dedicando sus talentos y esfuerzos al avance del conocimiento y la innovación.

Ruth Cristina Medina Medina

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

TÍTULO: “DETERMINACIÓN MOLECULAR DE *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Enteritidis EN COLONIAS AISLADAS DE *Salmonella* spp. EN CUYES DE LA PROVINCIA DE COTOPAXI.”

Autora:
Medina Medina Ruth Cristina

RESUMEN

La salmonelosis en cuyes está causada por varios serovares de *Salmonella* spp., los cuales son bacilos gram negativos, no esporulados pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae. Los síntomas incluyen diarrea, pérdida de peso, apatía y, en casos severos, la muerte. La principal fuente de infección son los alimentos contaminados. El presente proyecto de investigación tuvo como objetivo identificar de manera molecular *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Enteritidis en colonias pertenecientes a *Salmonella* sp. en cuyes de la provincia de Cotopaxi. Se desarrolló un refrescamiento de 24 aislados que se obtuvieron a partir de hisopados rectales y lesiones en órganos compatibles con salmonelosis que fueron bioquímicamente identificados como *Salmonella* spp, de estas muestras se realizó la PCR convencional y su interpretación mediante electroforesis, en los cuales se observaron las bandas de 559pb perteneciente a *fliC* (*Salmonella* Typhimurium) y sin manifestación de bandas en *sefA* (*Salmonella* Enteritidis), se usó como control positivo la cepa ATCC 14028 de *Salmonella* Typhimurium y como control negativo *E. coli*. Los resultados mostraron que el 83,33% (20/24) de las muestras fueron identificadas como *Salmonella* Typhimurium y el 16,67% (4/24) de las muestras no pertenecían a *Salmonella* Typhimurium, ni a *Salmonella* Enteritidis, lo que indica que podrían ser otros serovares de *Salmonella* spp. no identificados en este estudio. Se reporta por primera vez en Cotopaxi que el serovar *Salmonella* Typhimurium es uno de los causantes de salmonelosis y uno de los agentes etiológicos de linfadenitis.

Palabras claves: *Salmonella*, cuyes, Typhimurium, Enteritidis, PCR.

TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI
FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCE AND NATURAL RESOURCES

THEME: “MOLECULAR DETERMINATION OF *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis IN ISOLATED COLONIES OF *Salmonella* spp. IN CUYES OF THE PROVINCE OF COTOPAXI”

Author:
Medina Medina Ruth Cristina

ABSTRACT

Salmonellosis in guinea pigs is caused by several serovars of *Salmonella* spp., which are gram-negative, non-sporulating bacilli belonging to the Enterobacteriaceae family. Symptoms include diarrhea, weight loss, apathy, and, in severe cases, death. The main source of infection is contaminated food. The objective of this research project was to molecularly identify *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis in colonies belonging to *Salmonella* sp. in guinea pigs in the province of Cotopaxi. A refreshment of 24 isolates was developed that was obtained from rectal swabs and lesions in organs compatible with salmonellosis that were biochemically identified as *Salmonella* spp. Conventional PCR and its interpretation by electrophoresis were performed on these samples, in which the 559bp bands belonging to *fliC* (*Salmonella* Typhimurium) and without manifestation of bands in *sefA* (*Salmonella* Enteritidis), *Salmonella* Typhimurium strain ATCC 14028 was used as a positive control and *E. coli* as a negative control. The results showed that 83.33% (20/24) of the samples were identified as *Salmonella* Typhimurium and 16.67% (4/24) of the samples did not belong to *Salmonella* Typhimurium or *Salmonella* Enteritidis, which indicates . which could be other serovars of *Salmonella* spp. not identified in this study. It is reported for the first time in Cotopaxi that the serovar *Salmonella* Typhimurium is one of the causes of salmonellosis and one of the etiological agents of lymphadenitis.

Keywords: *Salmonella*, guinea pigs, Typhimurium, Enteritidis, PCR.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN DE AUTORÍA	ii
CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR	iii
AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	v
AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	vi
AGRADECIMIENTO	vii
DEDICATORIA	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
ÍNDICE DE CONTENIDOS	xi
ÍNDICE DE TABLAS	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS	xvi
1.- INFORMACIÓN GENERAL	7
2.- RESUMEN	8
3.- JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO	8
4.- BENEFICIARIOS DEL PROYECTO	9
5.- PROBLEMÁTICA	9
6.- OBJETIVOS	11
7.- ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS.	11
8.- FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA	12
8.1 Características principales del cuy	12
8.2 Principales enfermedades en cuyes	12
8.3 Salmonelosis	13
8.4 Generalidades de la Salmonella	13
8.5 Clasificación taxonómica	14
8.6 Especies y Subespecies	14
8.7 Genoma de la Salmonella	15
8.7.1 Serotipos:	15
8.7.2 Identificación de serotipos:	16
- Serovares que afectan a los cuyes	16
8.8 Salmonella Typhimrium	17
8.9 Salmonella Enteritidis	18
8.10 Epidemiología	19
8.11. Manifestaciones clínicas y alteraciones post mortem en cuyes	20
8.12. Diagnóstico	20
8.12.1 Bacteriológico	20
Enriquecimiento	20

Medios de cultivo	22
• Altamente selectivos	22
• Medianamente selectivos	23
Prueba Bioquímicas	24
8.12.2 Serológico	25
8.12.3 Molecular	25
- PCR	25
Etapas de la PCR	26
Condiciones de la PCR	27
- PCR múltiple	27
- PCR tiempo real	28
8.13 Extracción de ADN (GeneJET Genomic DNA Purification Kit)	28
8.14 Crioconservación	29
8.15 Tratamiento	29
8.16 Control y prevención	30
9.- VALIDACIÓN DE HIPÓTESIS:	31
10.- METODOLOGÍAS Y DISEÑO EXPERIMENTAL:	31
10.1 Ubicación del experimento	31
10.2 Muestra	31
10.3 Pruebas bacteriológicas	32
10.3.1 Procedimiento a refrescamiento de las muestras y resiembra	32
10.4 Pruebas Bioquímicas y morfológicas	33
10.5 Resultados de las pruebas microbiológicas	34
10.5.1 Resultados de aislamientos en medios de cultivo bacteriano	34
10.5.2 Resultados de pruebas bioquímicas	34
10.6 Crioconservación	34
10.6.1 Procedimiento de crioconservación.	35
10.7 Extracción de DNA	36
10.8 PCR	36
10.9 Electroforesis y visualización de las bandas	37
11.- ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	38
11.1 Crioconservación	38
11.2 Resultados de la PCR	38
11.3 DISCUSIÓN	41
12. IMPACTOS	42
12.1 Impacto técnico	42
13.- CONCLUSIONES	42
14.- RECOMENDACIONES	43
15.- BIBLIOGRAFÍA	44
16.- ANEXOS	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de la *salmonella spp*.....12

Tabla 2. Tabla 2. Condiciones de la PCR para S. Typhimurium y S. Enteritidis.....24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Presencia de enfermedades.....11

Figura 2. Procedimiento para la crioconservación.....34

Figura 3. Electroforesis de PCR *Salmonella* Typhimurium muestras de la 1-12.....36

Figura 4. Electroforesis de PCR *Salmonella* Typhimurium muestras de la 13-2437

Figura 5. Electroforesis de PCR *Salmonella* Enteritidis muestras de 4 muestras.....38

1.- INFORMACIÓN GENERAL

Título del Proyecto: Determinación molecular de *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Enteritidis en colonias pertenecientes A *Salmonella* sp. de cavícolas de la provincia de Cotopaxi en el período Octubre 2023-Febrero 2024

Fecha de inicio: Octubre 2023

Fecha de finalización: Febrero 2024

Lugar de ejecución: Provincia Cotopaxi, Ciudad Latacunga.

Facultad que auspicia: Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales

Carrera que auspicia: Carrera de Medicina Veterinaria

Proyecto de investigación vinculado: Prevención de enfermedades infecciosas y parasitarias en animales domésticos de la provincia de Cotopaxi del Ecuador.

Equipo de Trabajo:

MVZ. Herrera Yunga Vanessa. Mtr (Anexo 1)

Medina Medina Ruth Cristina (Anexo 2)

Área de Conocimiento:

62 Agricultura, Silvicultura y Pesca

SUB ÁREA

64 Veterinaria

Línea de investigación: Salud Animal

Sub líneas de investigación de la Carrera: Microbiología, Parasitología,

Inmunología y Sanidad Animal.

2.- JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

En la provincia de Cotopaxi no se han realizado estudios sobre los serovares circulantes de la *Salmonella* en las granjas cavícolas, por lo tanto, la tipificación molecular para conocer los serovares es necesario por cuánto es conocido que *Salmonella sp.* se aloja en los ganglios linfáticos, hígado e intestino, causando una enfermedad infecciosa conocida como Linfadenitis, razón por la cual dificulta proteger a través de la inmunización contra esta enfermedad ya que los biológicos empleados no tienen una protección de 100% y los brotes de salmonelosis siguen siendo un grave problema que afecta a los cuyes de la provincia de Cotopaxi.

El aporte de la investigación al pequeño y gran productor cotopaxense permiti reducir el porcentaje de cuyes contagiados así como de pérdidas económicas y fortaleciendo su vínculo con la sociedad, siendo la Universidad Técnica de Cotopaxi precursora de información base para el desarrollo de nuevos métodos de control y prevención de la *Salmonella* en cuyes dentro de Cotopaxi y el Ecuador.

Los beneficiarios de este proyecto de manera principal son los productores cavícolas de la provincia de Cotopaxi y de la región. El uso de este estudio para futuras investigaciones que instruyan a programas de control y prevención eficientes dentro del país es otro factor de beneficio.

Al tener el/los serovares identificados nos permite tener un mejor manejo de la enfermedad así como notificar a la entidad rectora nacional y recomendar el desarrollo con base a los serovares tipificados, lo cual permite elaborar programas de inmunización, que garanticen así mismo el consumo de la carne libre de esta bacteria para el consumidor.

El uso práctico de la tipificación es el monitoreo de la distribución y las tendencias de diferentes serotipos de *Salmonella* en cuyes, cómo detectar la aparición de nuevos serotipos o variantes, evaluando la eficacia de las medidas de control vigentes. En resumen es una herramienta valiosa para la salud pública, la seguridad alimentaria, la investigación y la vigilancia epidemiológica.

3.- BENEFICIARIOS DEL PROYECTO

Directos: Productores cavícolas donde se obtuvieron las muestras.

Indirectos: Productores cavícolas de la provincia de Cotopaxi.

4.- PROBLEMÁTICA

La *Salmonella spp.* es una bacteria que afecta directamente tanto humanos como animales dentro de nuestro país y a nivel mundial, siendo considerada la salmonelosis una zoonosis de gran envergadura dentro de las enfermedades de salud alimentaria de acuerdo con la Organización mundial de la Salud (OMS) y Organización Panamericana de la Salud (OPS) (1) y además es considerada de declaración voluntaria por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA) (2).

En Ecuador, Perú, Bolivia y Colombia, es común la tradición de producir y consumir cuy. En promedio, hay 21 millones de cuyes en el país que se reproducen constantemente y producen 47 millones de cuyes al año para la venta y consumo familiar. Según el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, representa 14.300 toneladas de producto (3).

La MSP reporta hasta el año 2022 un total de 1.062 casos de salmonelosis y 1.076 casos de fiebre tifoidea y paratifoidea provocada por *Salmonella spp.* y *Salmonella Typhi*, dando un total de 2138 afectados por *Salmonella sp.* a nivel nacional, siendo la población entre el rango de edad de 20-49 años la más afectada por salmonelosis y el grupo etario más prevalente el de entre 1 a 4 años para fiebre tifoidea y paratifoidea. En Cotopaxi se reportaron un total de 79 casos por *Salmonella sp.* en el mismo año, debido a la ingesta de alimentos contaminados (4).

Los serovares del género *Salmonella* son bacilos gram negativos no esporulados de la familia Enterobacteriaceae que causan salmonelosis en ellos. El serovar Typhimurium se aísla con mayor frecuencia, superando el 95% en comparación con otros serotipos(5).

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) menciona que la salmonelosis en cuyes produce hasta el 95% de muertes de la morbilidad general, siendo los cuyes lactantes con mayor porcentaje de morbilidad, llegando hasta el 52,70%, generando pérdidas significativas para el pequeño y gran productor (1). Ortega et al. Relata que en Perú la tasa de mortalidad se encuentra entre 15 y 18%, siendo la salmonelosis la enfermedad de mayor prevalencia (6).

En Perú, la vacuna oleosa contra *Salmonella* Typhimurium mostró porcentajes de protección de 64% y 83% en los cuyes con 1 dosis de vacuna respectivamente; mientras que el grupo placebo presentó mortalidad que ascendió al 85%. Considerando la vacuna como una buena alternativa para la prevención de Salmonelosis en cuyes, comparada con las formas actuales de control, basadas en promotores de crecimiento (antibióticos) que generan resistencia y presentan nivel residual en carne, que repercute en la producción debido a los requerimientos para el consumo humano tanto nacionales como internacionales (7).

En Ecuador el control de la salmonelosis a través del uso de vacunas en cuyes no es obligatorio, AGROCALIDAD menciona el uso de vacunas conforme al criterio de un técnico (8). Las vacunas de uso comercial contienen la cepa de *S. Typhimurium*, pero al desconocerse y no haber estudios de tipificación en el Ecuador, no se tiene una identificación de los serovares presentes en cuyes, por ende, existe la posibilidad de que la vacuna no tenga una eficacia del 100% de protección.

Torres, S. y Tirira, M. con medios de cultivos selectivos y tinción Gram determinaron un 15.15% de la incidencia de *Salmonella* Typhimurium en producciones cavícolas en las parroquias Natabuela y Chaltura en Imbabura (9). No obstante, en Ecuador existen investigaciones donde han realizado el tipificado molecular de *Salmonella sp.* en pollos de engorde de la provincia de Pichincha mientras que en cuyes no se han realizado la tipificación molecular (10).

5.- OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar molecularmente la *Salmonella* Typhimurium o *Salmonella* Enteritidis en colonias pertenecientes a *Salmonella* spp. de cavícolas de la ciudad de Latacunga.

Objetivos Específicos

- Evaluar el porcentaje de crioconservación con glicerol al 50%, 40% y 30% en muestras de *Salmonella* spp.
- Identificar la presencia de *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Enteritidis mediante PCR convencional a partir de colonias de *Salmonella* spp.

6.- ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS.

Objetivo	Actividades	Resultado de la actividad	Medios de verificación
Evaluar el porcentaje de crioconservación con glicerol al 50%, 40% y 30% en muestras de <i>Salmonella</i> spp y su viabilidad post descongelación.	Adaptar diferentes protocolos de crioconservación para la estandarización de uno con glicerol al 50%, 40% y 30%.	El 72,73% (24/33) de muestras crioconservadas al 50% de glicerol fueron viables, en las muestras crioconservadas al 40% de glicerol el 36.36% (12/33) sobrevivieron y en las muestras al 30% de glicerol el 60.61% (20/33) presentaron un crecimiento	Informe del Laboratorio de Crioconservación.
Identificar la presencia de <i>Salmonella</i> Typhimurium o <i>Salmonella</i> Enteritidis mediante PCR convencional a partir de colonias de <i>Salmonella</i> spp.	Utilización de cebadores específicos de los genes para amplificar las secuencias de ADN que están presentes en genes que codifican para la identificación de serotipos Typhimurium y Enteritidis.	El 83.33% (20/24) de las muestras para el serovar de S.Typhimurium, Mientras que para <i>Salmonella</i> Enteritidis no existió migración de bandas en las muestras 16.67% (4/20).	Certificado de Laboratorio de Electroforesis y PCR. Informe de Laboratorio de pruebas bioquímicas.

7.- FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA

7.1 Características principales del cuy

El cuy, conejillo de indias, también conocido como cobaya, es un mamífero roedor originario de los países de Ecuador, Colombia, Bolivia y Perú. Este pequeño animalito va más allá, consolidándose como un producto alimenticio de alto valor nutricional, de acuerdo a la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO) (11) .

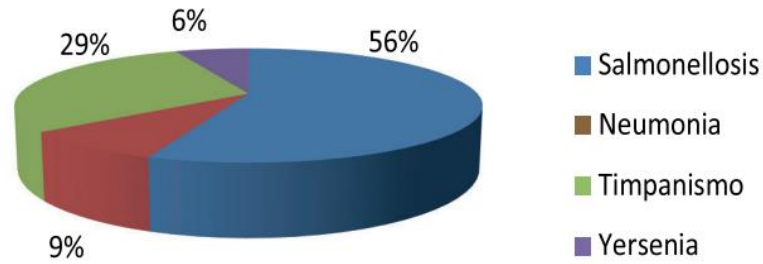
En Ecuador, el cuy se convierte en un protagonista culinario en la región Sierra, que comprende 10 provincias desde el Carchi hasta Loja. Su consumo se remonta a miles de años atrás, con las culturas ancestrales andinas, quienes lo incorporaron a su dieta y tradiciones (12).

7.2 Principales enfermedades en cuyes

Los cobayos, si bien adaptables, son susceptibles a enfermedades que afectan su crianza. Factores como temperatura, humedad, sobrepoblación, desnutrición e higiene influyen en su salud. Conocer las razas y aplicar medidas preventivas como control ambiental, alimentación adecuada, higiene y atención veterinaria es crucial para su bienestar y productividad. La crianza responsable de cobayos implica avances en manejo, genética y nutrición, considerando su bienestar social y previniendo enfermedades. Los retos como nuevas enfermedades y el cambio climático exigen investigación y desarrollo de estrategias para asegurar su salud. La crianza exitosa y sostenible de cobayos requiere conocimiento, dedicación y responsabilidad (13).

Conforme al INIAP (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias), la presencia frecuente de enfermedades es uno de los principales problemas en los criaderos de cuyes, que el estudio determinó como parte de la evaluación a salmonella, neumonía, timpanismo y yersinia, siendo la salmonelosis la más importante y con mayor presencia (14).

Figura 1. Presencia de enfermedades.



Fuente: INIAP. 2022 (14)

7.3 Salmonelosis

Esta patología representa una amenaza seria para los criaderos de cuyes, con potencial para causar un elevado número de fatalidades si no se aborda de manera oportuna. Conocida como la Peste del Cuy, se caracteriza por su extrema letalidad y su alta tasa de contagio (15).

Los síntomas se manifiestan de manera distintiva, incluyendo anorexia, piloerección y diarrea. La piloerección es evidente junto con la presencia de diarrea, a menudo con muestras hemáticas. En la etapa más aguda de la salmonelosis, se desarrolla una parálisis severa que afecta principalmente las extremidades posteriores del cuy. Durante la necropsia, se observa hepatomegalia con áreas de aspecto blanquecino y focos purulentos (16).

7.4 Generalidades de la *Salmonella*

En 1885 fue identificado y aislado por primera vez un microorganismo por el patólogo veterinario Daniel Elmer Salmon y Theobald Smith, que representaba al grupo bacteriano denominado 'Salmonella'. Este descubrimiento se llevó a cabo al analizar cerdos que mostraban lesiones típicas de la fiebre porcina clásica (PPC), según lo detalló Smith en 1891 (17).

En la etiología del grupo *Salmonella* spp., se atribuye a la consanguinidad dentro de Enterobacteriaceae, una familia de microorganismos gramnegativos que son facultativos, es decir, pueden funcionar tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas dentro de cada célula (18).

Los sustantivos "serovar" y "serotipo" son dos términos que significan lo mismo: la clasificación de un microorganismo infeccioso según los antígenos de su superficie celular. Aunque los CDC y la OMS utilizan el nombre de la especie "*Salmonella enterica*", este no ha

sido aprobado oficialmente por la Comisión Judicial. Por eso, la denominación de un serotipo normalmente no incluye la subespecie (19).

7.5 Clasificación taxonómica

La bacteria *Salmonella spp.* presenta una gran diversidad con alrededor de 2.400 serovariedades agrupadas en tres clases principales: *Salmonella enterica* (que abarca la mayoría con 2.443 serovariedades), *Salmonella bongori* (con 20 serovariedades) y *Salmonella subterránea*, una nueva especie recientemente descubierta en sedimentos del subsuelo (20).

Tabla 1. Taxonomía de la *salmonella spp*

REINO	Bacteria
FILO	Proteobacteria
CLASE	Gammaproteobacteria
ORDEN	Enterobacteria
FAMILIA	Enterobacteriaceae
GÉNERO	Salmonella

Fuente: Parra et al.

2002 (21)

7.6 Especies y Subespecies

El género *Salmonella* se compone de dos únicas especies:

- **S. enterica:** Esta especie representa la gran mayoría de las infecciones por *Salmonella* en humanos y animales. Se subdivide en seis subespecies:
 - *S. enterica* subsp. *enterica*: La subespecie más común, responsable de la mayoría de las enfermedades transmitidas por alimentos.
 - *S. enterica* subsp. *salamae*: Asociada principalmente a reptiles y cerdos.
 - *S. enterica* subsp. *arizonae*: Afecta principalmente a aves y reptiles, aunque puede causar infecciones en humanos.
 - *S. enterica* subsp. *diarizonae*: Similar a *S. enterica* subsp. *arizonae*, pero con un rango de hospedadores más amplio (21).

- *S. enterica* subsp. *houtenae*: Poco común, se ha asociado a infecciones en humanos y animales.
- *S. enterica* subsp. *indica*: Afecta principalmente a cerdos y bovinos.
- ***S. bongori***: Esta especie es menos común que *S. enterica* y se asocia principalmente a infecciones en reptiles.

Las subespecies de *S. enterica* se diferencian por:

- Características bioquímicas: Algunas pruebas bioquímicas, como la fermentación de ciertos azúcares, pueden ayudar a distinguir las subespecies.
- Susceptibilidad al bacteriófago Felix O1: Este virus sólo infecta a ciertas subespecies de *S. enterica*, lo que permite su diferenciación (22).

7.7 Genoma de la *Salmonella*

7.7.1 Serotipos:

Kauffman y White desarrollaron un sistema para clasificar aún más *Salmonella* por serotipo, basándose en tres antígenos: somático (O), capsular (K) y flagelar (H).

- Antígeno O: Es un componente de la membrana bacteriana externa. Un serotipo puede expresar más de un antígeno O.
- Antígeno H: Se encuentra en los flagelos y participa en la respuesta inmunitaria del huésped. La mayoría de *Salmonella* spp. son difásicas, lo que significa que pueden expresar dos proteínas flagelares diferentes.
- Antígeno K: Son polisacáridos capsulares. Los antígenos Vi son un subtipo especial de antígeno K que se encuentra solo en tres serotipos patógenos: Paratyphi C, Dublín y Typhi (23).

7.7.2 Identificación de serotipos:

La identificación formal de un serotipo se realiza mediante la serotipificación integral de todos los antígenos de la bacteria. Sin embargo, la mayoría de los laboratorios clínicos realizan reacciones de aglutinación con anticuerpos específicos para agrupar *Salmonellae* en seis serogrupos (A, B, C1, C2, D y E) (24).

La serotipificación se realiza siguiendo el esquema de Kauffman-White, en el cual *Salmonella* se divide en 67 serogrupos u grupos O, que a su vez se clasifican en más de 2500 serotipos diferentes en la unión de antígenos O y H en cada organismo. Este proceso implica la combinación del microorganismo sospechoso con antisueros específicos para *Salmonella*. La aglutinación en presencia del antisuero homólogo indica la presencia de antígeno (25).

- Serovares que afectan a los cuyes

Salmonella es un grupo de bacterias que causan grave enfermedad pero casi nunca la muerte, presenta diferencias en la especificidad del hospedero; mientras que algunos serovars no tienen una adaptación específica a un huésped, pueden producir enfermedades con diferentes características en diferentes especies animales y en humanos (21).

Ameghino menciona que en el Perú, nuestro país vecino del sur, la salmonelosis es producida de manera principal por el serovar de *Salmonella* Typhimurium (26). Cassart y Falconí confirman este hecho en Loja, Ecuador en el 2015 (27) pero, no hay investigaciones que confirmen la presencia de *Salmonella* enteritidis en el país.

7.8 *Salmonella* Typhimurium

Salmonella Typhimurium ocupa el primer lugar en los programas mundiales de vigilancia de *Salmonella*. En Colombia, la vigilancia de laboratorio de los Institutos Nacionales de Microbioma de la Salud identificó las variantes monofásicas de *Salmonella* enterica como el cuarto aislado clínico más común, pero no está claro si estos aislados están ligados con la variante de Typhimurium que circula en el mundo y sus características genéticas y fenotípicas (28).

Salmonella Typhimurium es una bacteria capaz de percibir y responder a las condiciones del ambiente en el que se encuentra. Es adaptable y poderosa que utiliza las condiciones del tracto gastrointestinal a su favor para invadir al hospedero y causar la enfermedad. Esta bacteria activa genes que le permiten sobrevivir en este ambiente con bajo oxígeno y la hiperosmolaridad del tracto gastrointestinal puede ser tóxica para las bacterias, pero la *Salmonella* Typhimurium responde activando genes que la protegen de la salinidad (29)

El serovar con más casos en cuyes es la *Salmonella* entérica subespecie entérica serovar Typhimurium, que se presenta en el 95% de los casos en comparación a otros serotipos (3). En varios estudios llevados a cabo en el Perú, se ha identificado principalmente *Salmonella*

Typhimurium como el serovar, el cual se ha diagnosticado principalmente mediante pruebas bioquímicas y serológicas (30). La mayoría de los estudios sobre la patogénesis de *Salmonella* aclaran los mecanismos de virulencia utilizando un modelo de fiebre tifoidea, a saber, la infección por *Salmonella* serotipo Typhimurium en ratones. La *Salmonella* serotipo Typhimurium causa una enfermedad similar a la fiebre tifoidea en ratones, con lesiones intestinales y extraintestinales muy parecidas a las observadas en las víctimas de fiebre tifoidea (31).

La *Salmonella* Typhimurium es el agente causal del tifus de los roedores y de toxiinfecciones con ingestión de alimento. Ocasiona brotes epidémicos como enteritis en varias especies, con frecuencia relacionadas con plagas de roedores (32).

Dentro del Ecuador solo existen dos vacunas comerciales circulantes para salmonelosis, estas son múltiples y tienen como serovar específico *Salmonella* Typhimurium (33).

Cebadores	Nombre del Gen	Secuencia	Amplificación de producto (bp)
Fli15 Tym	fliC	CGGTGTTGCCCAGGTTGGTAA ACTCTTGCTGGCGGTGCGACTT	559

Fuente: Alvaro DA. 2017 (34)

La secuencia FliC es la secuencia que más engloba los flagelos del serovar *Salmonella* Typhimurium.

7.9 *Salmonella* Enteritidis

Las salmonellas (*S. Typhimurium* y *Enteritidis*) se encuentran en el reservorio de animales domésticos y salvajes, como aves de corral, ganado porcino y bovino, roedores y mascotas, como iguanas y tortugas, perros y gatos y hámsters. Sin embargo, *Salmonella* Enteritidis puede colonizar otros órganos además de los órganos fecales y permanecer allí durante un período prolongado de tiempo (35).

El serotipo más predominante en los cuadros de salmonelosis humana es *Salmonella* Enteritidis (36). *S. Enteritidis* tiene el mismo antígeno somático del grupo D que *S. Pullorum/Gallinarum* y se cree que se origina en él. Se puede usar una prueba de sangre total y otras pruebas relacionadas para diagnosticar una infección por *S. Enteritidis*, pero esta prueba es poco

sensible. Otras pruebas se han desarrollado en los últimos años como la Prueba de Enzimonioensayo ligado a Enzimas (ELISA), para diagnosticar las infecciones por *S. Enteritidis* (22).

La *Salmonella* Enteritidis causa infecciones intestinales sin signos en muchas especies animales, especialmente en aves. La *Salmonella* Enteritidis infecta los ovarios de gallinas que parecen sanas en silencio y contamina los huevos antes de que se forme el cascarón. Los brotes de enfermedad clínica con alta mortalidad pueden ocurrir en pollos menores de dos semanas de edad. La *Salmonella* Enteritidis inicia la infección al adherirse a la mucosa intestinal y luego atacar las células epiteliales. Dependiendo de las fimbrias y flagelos, *Salmonella* Enteritidis puede adherirse a la superficie del epitelio. Las fimbrias SEF14, SEF17 y SEF21 son las principales fimbrias de *Salmonella* Enteritidis. La *Salmonella* Enteritidis coloniza principalmente el ciego. Cuando *S. Enteritidis* ingresa al epitelio y llega a la lámina intestinal, ataca a los macrófagos y utiliza estas células para atacar otros órganos, especialmente el hígado (38).

Cebadores	Nombre del Gen	Secuencia	Amplificación de producto (bp)
<i>sef167</i> <i>sef478</i>	sefA	AGG TTCAGGCAGCGGTTACT 5GGGACATTTAGCGTTTCTTG	312

Fuente: Alvaro DA. 2017 (34)

7.10 Epidemiología de la *Salmonella* sp.

La salmonelosis por *Salmonella* en cuyes es una enfermedad entérica de gran importancia económica y sanitaria. Se transmite principalmente por vía fecal-oral, siendo favorecida por el hacinamiento, la falta de higiene y el estrés. Afecta a cuyes de todas las edades, pero los jóvenes son más susceptibles. Los síntomas incluyen diarrea, pérdida de peso, apatía y, en casos severos, la muerte (39). Aunque los alimentos contaminados son la principal fuente de infección, se podría suponer que otras vías, como la intrauterina y a través de la leche, ayudarían a mantener la infección (2). Además, el contagio por la introducción de animales de procedencia desconocida; el acceso a los entornos de crianza de roedores nocivos y aves silvestres en fase

de portador que contaminan el alimento con sus deyecciones; y el personal que maneja animales puede considerarse como transportador cuando pisa el forraje y otros alimentos (39).

La enfermedad genera importantes pérdidas económicas por mortalidad, disminución de la producción y costos de tratamiento. Se puede prevenir y controlar mediante medidas de bioseguridad, vacunación, manejo adecuado, diagnóstico y tratamiento. La salmonelosis también es zoonótica, por lo que se deben tomar medidas para evitar la transmisión a los humanos (40).

Los animales en lactancia muestran mayor susceptibilidad a la salmonelosis, con un aumento del 52,70% en comparación con los adultos y un aumento del 30,65% en comparación con los animales adultos y de recría 19,83 por ciento (9).

Según las estimaciones realizadas en 2019, 9 millones de personas enferman cada año de fiebre tifoidea, de las cuales 110 000 mueren. Los grupos poblacionales sin acceso an agua salubre y saneamiento adecuado tienen mayor riesgo de contraer la enfermedad. Los niños son los más vulnerables (41).

7.11. Manifestaciones clínicas y alteraciones post mortem en cuyes

La pérdida de apetito, la anemia, el erizamiento del pelaje, el jadeo, la diarrea y la parálisis de los miembros posteriores son síntomas de los animales. Los abortos ocurren en las mujeres que están gestando. Los cuyes lactantes son los más vulnerables, ya que solo un estrés puede activar la Salmonella que ya está en estado latente (42).

7.12. Diagnóstico

7.12.1 Bacteriológico

Una variedad de métodos pueden utilizarse para aislar salmonelas, incluidos enriquecimientos para recuperar salmonelas que sufren daños mínimos, medios de enriquecimiento con sustancias inhibidoras para evitar microorganismos competidores, y medios selectivos con agar en placa para diferenciar salmonelas de otras enterobacterias y pruebas bioquímicas de confirmación (5).

Enriquecimiento

- *Caldo Tetracionato*

Es un medio de enriquecimiento el cual se prepara suspendiendo 4,6 g del polvo en 100 mL de agua purificada y se calienta hasta que hierva. Dejamos enfriar a menos de 60°C. Se realizó el medio de Caldo Tetracionato, siguiendo las instrucciones de fabricante, para 40 muestras se preparó 297 ml de agua destilada añadiendo 1,37 g del medio en un frasco boeco hasta dejar hervir sin autoclavar (43), y enfriar, para su colocación de 9 ml en los respectivos tubos con la ayuda de jeringa estériles de 10 ml, luego con la ayuda del asa de siembra completamente estéril se procedió a refrescar la muestra en la cámara de flujo laminar con el apoyo de una lámpara de alcohol industrial al 97% culminando con el respectivo sellado con ayuda del algodón, papel parafilm y papel aluminio y su respectivo rotulado para posteriormente incubar a 37°C por 24h (44).

- *Caldo selenito-cistina*

Medio de enriquecimiento selectivo destinado a la detección y aislamiento de Salmonella en muestras de agua, heces, orina y alimentos. Se suspenden 23 g en 1 L de agua destilada o desionizada, agitar hasta disolución completa, distribuir 10 mL en tubos y esterilizar a vapor fluente por 10 min (45).

En 1936, Leifson descubrió que el selenito estimulaba el crecimiento de Salmonella mientras inhibe el de enterococos y coliformes, lo que condujo al desarrollo del caldo selenito de sodio. Luego, se modificó añadiendo cistina para reducir la toxicidad del selenito y mejorar la recuperación de Salmonella en muestras fecales limitadas (46). La peptona especial proporciona nutrientes esenciales, la lactosa actúa como fuente de carbono, y el fosfato regula el pH. La presencia de L-cistina favorece la recuperación de Salmonella, mientras que el selenito de sodio inhibe los microorganismos Gram-positivos y la mayoría de las enterobacterias durante un período de incubación de 8 a 12 horas. El almacenamiento del medio deshidratado debe ser a menos de 15 °C, y el medio preparado debe mantenerse entre 2 y 8 °C por un período de un mes (45).

- *Caldo verde brillante*

La técnica del número más probable recomienda este método para el recuento de coliformes totales y fecales. En el medio de cultivo, la peptona proporciona los nutrientes necesarios para el

desarrollo bacteriano adecuado, la bilis y el verde brillante son los agentes selectivos que impiden el crecimiento de bacterias grampositivas y gramnegativas, excepto coliformes, y la lactosa es el hidrato de carbono fermentable. Es una característica del grupo coliforme, la fermentación de la lactosa y la generación de gas y ácido. 40 gramos de polvo se mezclan con un litro de agua purificada. 10 ml por tubo con campanita de Durham se diluyen y se distribuyen. Enfriar durante treinta minutos a 100 ° C (47).

- *Caldo Rappaport-Vassiliadis*

En 1976, Vassiliadis y colaboradores implementaron una modificación al Caldo de Enriquecimiento para Salmonella desarrollado por Rappaport, con el objetivo de mejorar la selectividad y el rendimiento en la recuperación de Salmonella a partir de diversas muestras (48). Esta modificación resultó en un caldo de enriquecimiento que muestra un porcentaje alto de selectividad para la microbiota acompañante y una eficaz recuperación de *Salmonella*, luego del preenriquecimiento. En comparación con el Caldo de Enriquecimiento para Salmonella original, esta formulación tiene concentraciones más bajas de verde malaquita y cloruro de magnesio, lo que favorece el crecimiento de Salmonella a 43 °C. El uso de peptona de soya también promueve su desarrollo. Además, la disminución del pH a 5,2 aumenta la selectividad del medio. La adición de fosfato potásico ayuda a mantener el pH dentro del rango óptimo durante el almacenamiento (49).

Aislamiento en medios selectivos

- **Altamente selectivos**

- *Agar Salmonella-Shigella*

El Agar S.S. es principalmente una modificación del medio Agar Desoxicolato-Citrato descrito por Leifson en 1935 (50). Este medio de cultivo selectivo y diferencial se utiliza para aislar Salmonella spp. y algunas especies de Shigella spp. de muestras fecales, alimentos u otros materiales donde se sospecha su presencia. Las sales biliares y el verde brillante inhiben el crecimiento de varias bacterias Gram positivas, la mayoría de los coliformes y el desarrollo invasivo de Proteus spp (51).

- *Agar Cromogenico Salmonella*

El procedimiento implica añadir 10 mL de un suplemento líquido a 1 L de agua destilada, seguido de la suspensión de 43,5 g de la base del medio y la posterior fusión del agar mediante calentamiento, evitando temperaturas superiores a 100 °C. Después de enfriar a 45 °C, la mezcla se dispone en placas de Petri estériles sin esterilizar en autoclave (52).

El medio utiliza reacciones cromogénicas y fluorogénicas para identificar funciones glucosidasas y respuestas bioquímicas, permitiendo la detección y diferenciación de serotipos de Salmonella y otros géneros Gram-negativos. Además, la presencia de un compuesto de azufre y un indicador facilita la detección de microorganismos generadores de gas sulfhídrico, reconocible por la manifestación de un punto negro en medio de la colonia (53).

- *Agar bismuto sulfito*

Se realiza el medio de agar bismuto sulfito, siguiendo las instrucciones de fabricante para 33 muestras se preparó 660 ml de agua destilada añadiendo 34.52 g del medio en un frasco boeco hasta dejar hervir sin autoclavar (54), y enfriar a una temperatura de 45°C y colocar 20 ml en las cajas petri con la ayuda de una jeringa de 20 ml esperamos hasta que se solidifique con la ayuda del asa de siembra fueron resembradas mediante técnica de estría en la cámara de flujo laminar con el apoyo de una lámpara de alcohol industrial al 97% culminando con el respectivo sellado con ayuda del papel parafilm y su respectivo rotulado para posteriormente incubarlas a 37°C por 24h (55).

● **Medianamente selectivos**

- *El Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD)*

(Xilosa, Lisina, Desoxicolato) es un medio selectivo distintivo, aplicado para el aislamiento y distinción de patógenos entéricos Gram negativos, se realiza el medio a través de las indicaciones del proveedor en un frasco boeco y dejar hervir sin autoclavar, luego se enfría a una temperatura de 45°C y colocar 20 ml en las cajas petri con la ayuda de una jeringa de 20 ml (56). Esperamos hasta que se solidifique con la ayuda del asa de siembra fueron sembradas mediante técnica de estría en la cámara de flujo laminar con el apoyo de una lámpara de alcohol industrial al 97% culminando con el respectivo sellado con ayuda del papel parafilm y su respectivo rotulado para posteriormente incubarlas a 37°C por 24h (57).

- *El Agar Desoxicolato/Citrato*

Colocar 48.5 g en 1 L de agua destilada o desionizada, dejarlo hervir completando su disolución y distribuir, evitando el sobrecalentamiento y sin autoclavar (58).

Este medio modificado de Leifson, ajustado por Hynes en 1942, es altamente selectivo para el aislamiento de patógenos entéricos como *Salmonella* y *Shigella* (59) . Contiene altas concentraciones de desoxicolato y citrato, lo que suprime la flora Gram positiva y los coliformes. Se puede agregar sacarosa al 1% para permitir el aislamiento de coliformes. Aunque algunas cepas de coliformes pueden persistir, su selectividad permite el uso de inóculos abundantes sin riesgo de contaminación. Este agar es menos inhibitorio que otros medios similares y se prefiere para aislar *Shigella* en lugar de *Salmonella* (60).

Prueba Bioquímicas bacteriológicas de identificación

- Triple Azúcar Hierro (TSI)

Se prepara 297 ml de agua destilada añadiendo 18,56 g del medio en un vaso de precipitación hasta dejar hervir posterior se colocó a esterilizar en la autoclave a 121°C por 15 min, se lo dejó enfriar y luego se realizó la debida colocación de 9 ml en los respectivos tubos con la ayuda de jeringa estériles de 10 ml, luego con la ayuda del asa de simbra completamente estéril se procedió a sembrar la muestra en la cámara de flujo laminar con el apoyo de una lámpara de alcohol industrial al 97% culminando con el respectivo sellado con ayuda del algodón, papel parafilm y papel aluminio y su respectivo rotulado para posteriormente incubar a 37°C por 24h (61).

Interpretación de resultados

- Superficie alcalina/profundidad ácida (pico rico/fondo amarillo): el microorganismo solo fermenta glucosa.
- Superficie ácida/profundidad ácida (pico amarillo/fondo amarillo): el microorganismo fermenta glucosa, lactosa y/o sacarosa.
- Superficie/profundidad alcalina (pico/fondo rojo): el microorganismo no fermenta azúcares. La aparición de burbujas o la ruptura del medio de cultivo indican la producción de gas por parte del microorganismo.
- El microorganismo produce ácido sulfhídrico debido al ennegrecimiento del medio. (62).

- SIM

Se realizó el medio, siguiendo las instrucciones de fabricante, para 32 muestras se preparó 297 ml de agua destilada añadiendo 8,91 g del medio en un vaso de precipitación hasta dejar hervir posterior se colocó a esterilizar en la autoclave a 121°C por 15 min, se lo dejó enfriar y luego se realizó la debida colocación de 9 ml en los respectivos tubos con la ayuda de jeringa estériles de 10 ml, luego con la ayuda del punzón completamente estéril se procedió a sembrar la muestra en la cámara de flujo laminar con el apoyo de una lámpara de alcohol industrial al 97% culminando con el respectivo sellado con ayuda del algodón, papel parafilm y papel aluminio y su respectivo rotulado para posteriormente incubar a 37°C por 24h (63).

Interpretación de resultados:

- Movilidad: presencia de turbidez o crecimiento más allá de la línea de siembra es un resultado positivo. Resultado desfavorable: solo aumento en la línea de cosecha.
- Producción de SH2: Resultado positivo: ennegrecimiento del medio de cultivo en todo el medio o a lo largo de la línea de siembra. El resultado negativo es que el medio no cambia de color.
- La prueba de indol mostró un resultado positivo: un color rojo. Resultado negativo: el reactivo revelador no pierde color amarillo (64).

7.12.2 Serológico

Las pruebas de aglutinación y ELISA son ejemplos de pruebas serológicas. La serología no se utiliza con frecuencia en animales específicos porque los anticuerpos no aparecen hasta dos semanas después de la infección y pueden estar presentes en animales no infectados. Algunas serovariedades pueden ser diagnosticadas y monitoreadas mediante enzimoimmunoanálisis, particularmente en cerdos y aves de corral (65).

7.12.3 Molecular

- PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un procedimiento que copia millones de veces un fragmento específico de ADN. Para ello, se necesitan dos cebadores (fragmentos cortos de ADN complementarios a los extremos del fragmento a amplificar) y una enzima polimerasa que sintetiza nuevas hebras de ADN. La PCR se realiza en ciclos de desnaturalización, alineamiento y extensión: se separa la doble hélice de ADN, se unen los cebadores a las hebras molde y la polimerasa sintetiza nuevas hebras complementarias. Al final, se obtiene una gran

cantidad del fragmento de ADN amplificado, que puede ser visualizado mediante técnicas de separación de ADN (66).

Etapas de la PCR

- Desnaturalización

Cuando una molécula de ADN de doble cadena (ADNdc) se calienta a 94°C, las cadenas emparejadas se separarán (desnaturalización). Esto permite que los cebadores tengan acceso a las moléculas de ADN de cadena sencilla (ADNcs) templates.

- Hibridación

La mezcla de reacción se enfría (aproximadamente a 50°C) para permitir que los cebadores seleccionen y se unan (híbriden) a sus posiciones complementarias en las moléculas de ADNcs templates .

- Elongación

La solución de ADNcs/cebador se calienta a 72°C. En presencia de la polimerasa termoestable, el tampón de PCR, los dNTP y las moléculas de magnesio (Mg²⁺), comienza el procedimiento de replicación. Con cada repetición de este ciclo, el objetivo se duplica y pronto, después de alrededor de 30 ciclos, la reacción producirá en exceso de 1 millón de copias del fragmento de ADN objetivo (67).

Condiciones de la PCR

Tabla 2. Condiciones de la PCR para *S.Typhimurium* y *S.Enteritidis*

Etapa	Temperatura		Tiempo		Ciclos
	<i>Typhimurium</i>	<i>Enteritidis</i>	<i>Typhimurium</i>	<i>Enteritidis</i>	<i>Typhimurium</i> <i>Enteritidis</i>
Desnaturalización inicial	95°C	95°C	5 min	4 min	1 CICLO
Desnaturalización	95°C	94°C	45 seg	30 seg	
Hibridación	58°C	56°C	45 seg	90 seg	35 CICLOS
Elongación	72°C	72°C	45 seg	30seg	
Elongación final	72°C	72°C	7 min	10 min	1 CICLO

Fuente: Ortiz GRD. 2016 (68) y Alvarado D.A. 2017 (34).

Dream Taq Green PCR Master Mix 2X

Thermo Scientific DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) es una solución lista para usar que contiene la enzima DreamTaq™ DNA polymerase, un tampón optimizado DreamTaq Green, MgCl₂ y dNTPs. La mezcla maestra está suplementada con dos colorantes de seguimiento y un reactivo de densidad que permite cargar directamente el producto de PCR en un gel. Los colorantes en la mezcla maestra no interfieren con el rendimiento de la PCR y son compatibles con aplicaciones posteriores como secuenciación de ADN, ligación y digestión por restricción. La mezcla maestra conserva todas las características de la enzima DreamTaq DNA polymerase. Es capaz de amplificar de manera robusta hasta 6 kb de ADN genómico y hasta 20 kb de ADN viral. Para aplicaciones que requieran análisis del producto de PCR por absorbancia o excitación de fluorescencia, recomendamos el uso del DreamTaq PCR Master Mix (2X) incoloro (69).

- PCR múltiple

En general, las PCR múltiples implican la participación de más de dos iniciadores en el proceso de amplificación, amplificando varias secuencias dianas en un solo tubo, lo que permite la detección e identificación simultánea de varios genes. Estos métodos han ganado popularidad

en la literatura científica en los últimos años, pero sus orígenes se remontan a la utilización de la PCR como herramienta para el diagnóstico a mediados de los años 90 del siglo pasado (70).

La opción de la PCR múltiple para la detección de *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Enteritidis es práctica y rápida ya que nos ayuda a tener resultados pronto en base al protocolo que amplifica 2 serotipos a la vez (67)

- PCR tiempo real

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real es la capacidad de monitorear el progreso de la PCR a medida que ocurre (es decir, en tiempo real). Por lo tanto, los datos se recopilan durante todo el proceso del PCR, en lugar de al final del mismo. Esto revoluciona por completo la forma en que se aborda la cuantificación de ADN y ARN basada en PCR. En la PCR en tiempo real (qPCR), las reacciones se caracterizan por el momento durante el ciclo en el que se detecta por primera vez la amplificación de un objetivo, en lugar de la cantidad de objetivo acumulada después de un número fijo de ciclos. Cuanto mayor sea el número de copias iniciales del ácido nucleico diana, antes se observará un aumento significativo de la fluorescencia. Por el contrario, un ensayo de punto final (también llamado “ensayo de lectura en placa”) mide la cantidad de producto de PCR acumulado al final del ciclo de PCR (71).

7.13 Extracción de ADN (GeneJET Genomic DNA Purification Kit)

El proceso de extraer ADN de una sustancia biológica mediante procesos físicos y químicos se conoce como extracción. La extracción es la separación y purificación del ADN para que se pueda estudiar, analizar o manipular (72). La calidad de la muestra a analizar, es decir, el ADN, debe ser de alta calidad y pureza. Por lo tanto, se requieren técnicas especializadas y estandarizadas para extraer ADN de alta calidad (73).

El kit de purificación de ADN genómico Thermo Scientific GeneJET está diseñado para la purificación rápida y eficiente de ADN genómico de alta calidad a partir de diversos cultivos de células de muestras de mamíferos y tejidos, sangre total, bacterias y levaduras (74). El ADN genómico aislado se vuelve ideal para su uso en procedimientos comunes de biología molecular gracias al protocolo, entre ellos: PCR (Anexo 3).

7.14 Crioconservación

La crioconservación es el proceso de almacenar células, tejidos u órganos a temperaturas muy bajas para su conservación a largo plazo (75). El proceso implica reducir la temperatura del

material a un punto en el que la actividad biológica se detiene esencialmente preservando así el material biológico (76).

Aunque hay muchos métodos para preservar los cultivos microbianos, la congelación sigue siendo una de las formas más populares de guardar cepas. Siempre que los cultivos sean puros y homogéneos y se almacenen en condiciones adecuadas, la preservación efectiva de los recursos microbianos depende en gran medida de la capacidad de los microorganismos para mantener su viabilidad y estabilidad genética durante la congelación (77) En microbiología, la congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ es uno de los métodos de conservación transitoria más comunes. Para reducir el estrés osmótico y la formación de cristales de hielo, se deben agregar crioprotectores; el glicerol es uno de ellos, ya que actúa como un protector penetrando en la célula microbiana (78).

La Crioconservación de bacterias se puede realizar mediante un caldo de enriquecimiento y glicerol a temperaturas bajo 0 así como lo realizaron Myonsun Yoh et al. al preservar *E.coli* con glicerol al 20% y caldo tripticasa (79).

7.15 Tratamiento

El uso de Kanamicina o estreptomycin para el tratamiento aplicado por Huey y Edwards a huevos infectados con *Salmonella saint paul* fue eficiente al contrario que con el tratamiento con *Salmonella Typhimurium*, presentando resistencia. (80).

Para el tratamiento de salmonella Typhimurium en cuyes Bazán et al, aplicaron varios tratamientos donde el uso de solución salina y zinc bacitracina al 10% demostró una mejora en el estado subclínico de la enfermedad y no produce pérdidas respecto a la ganancia de peso en los cuyes (81).

Algunos esquemas de tratamiento para cobayos con algunas drogas son las siguientes: - Enrofloxacin 5-15 mg / Kg. PO, SC, IM cada 12 horas - Sulfatrimetropim 15-30 mg / Kg. PO, SC cada 12 horas - Estreptomycin 2 g/Litro de agua - Cloranfenicol 0.5 g. / Litro de agua - Furazolidona 2.4 g. /Litro de agua cada uno de ellos administrados en un lapso de 5 a 7 días (82).

7.16 Control y prevención

Nosotros podemos prevenir la salmonelosis siguiendo estos pasos:

- Mantenga otros animales lejos de los cuyes o pastos que consumen.
- El cuyero debe mantenerse limpio y desinfectándose cada 15 días para proteger al cuyero de depredadores y plagas.
- La cantidad recomendada de animales en una poza o jaula es de 6 a 9
- Mantener a los animales fuera del calor excesivo y protegerlos de las corrientes de aire.
- La dosis adecuada de vacunación en cuyes (83).

En Ecuador no existe una regulación específica para la vacunación contra salmonelosis en cuyes pero, se mantienen circulantes de venta libre dos biológicos múltiples que contienen cepas de *Salmonella Typhimurium* (33, 84).

En Perú, la vacuna oleosa contra *Salmonella Typhimurium* mostró porcentajes de protección de 64% y 83% en los cuyes con 1 dosis de vacuna respectivamente; mientras que el grupo placebo presentó mortalidad que ascendió al 85%. Considerando la vacuna como una buena alternativa para la prevención de Salmonelosis en cuyes, comparada con las formas actuales de control, basadas en promotores de crecimiento (antibióticos) que generan resistencia y presentan nivel residual en carne, que repercute en la producción debido a los requerimientos para el consumo humano tanto nacionales como internacionales (85).

8.- VALIDACIÓN DE HIPÓTESIS:

H1: En las colonias aisladas de las granjas cavícolas se identifica *Salmonella* Typhimurium o *Salmonella* Enteritidis.

H0: No se identifican *Salmonella* Typhimurium o *Salmonella* Enteritidis en las colonias aisladas de las granjas cavícolas.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación se valida la hipótesis alternativa, por cuanto se logró tipificar *S. Typhimurium*, obteniendo los siguientes resultados que el 83.33% de las muestras de cuyes en la provincia de Cotopaxi dieron positivo para *S. Typhimurium*, mientras que el 16.67% restante se dividió entre otros serovares de *Salmonella spp.* Esta alta prevalencia de *S. Typhimurium* en cuyes confirma que este serotipo es el más prevalente en la región.

9.- METODOLOGÍAS Y DISEÑO EXPERIMENTAL:

9.1 Ubicación del experimento

El presente proyecto de investigación se realizó en las instalaciones de la Clínica Veterinaria en el laboratorio de Microbiología de la Universidad Técnica de Cotopaxi con su localización en Latacunga, la provincia de Cotopaxi se encuentra en la parte central del Callejón Interandino de la República del Ecuador, Coordenadas geográficas: 1°00'03'S 78°37'07'W.

La segunda fase de la investigación se realizó en las instalaciones de la Universidad Católica de Cuenca, Centro de Investigación Innovación y Transferencia de Tecnología (CIITT) en Ricaurte, campus Miraflores, ubicada en Cuenca en la provincia de Azuay en la zona sur del Ecuador. Con las cajas de *salmonella spp* ya conservadas en dichas instalaciones por la Sra. Anita ex egresada de la Universidad, Coordenadas geográficas: 2°51'14"S 78°57'59 W..

9.2 Ensayos

Se realizó el refrescamiento de 40 aislados que se obtuvieron a partir de hisopados rectales y lesiones en órganos compatibles con salmonelosis que fueron bioquímicamente identificados como *Salmonella spp* (25).

- Enriquecimiento en el caldo tetrionato siguiendo las instrucciones del fabricante, en un tubo que contiene 9 ml del caldo se colocaron dos colonias, se dejó incubar por 24 h a 37 °C.

- Posteriormente, se colocó en el medio selectivo bismuto sulfito agar en estriado y se dejó en la incubadora por 24 h a 37 °C.
- Finalmente se almacenará a 4 °C hasta su posterior análisis.

El proyecto actual utilizó ensayos aisladas de hisopados rectales, hisopados de suelo y tejidos (hígado, bazo y otros órganos lesionados) de individuos sanos y enfermos en tres criaderos diferentes en los cantones de Pujilí, sector Collas Bajo, y Latacunga, sector Salache y Santa Marianita, en la provincia de Cotopaxi (25). Los primeros fueron enriquecidos en caldo de Lactosa, luego enriquecidos en caldo de Tetracionato y luego aislados selectivamente en agar bismuto-sulfito para su confirmación mediante pruebas bioquímicas convencionales utilizando TSI y SIM.. Estas muestras se mantuvieron en conservación luego de la investigación en medio de cultivo Agar Bismuto-Sulfito para luego ser sometidas a una reactivación y recuperación de la bacteria mediante un método de pre-enriquecimiento, enriquecimiento en medios selectivos, aislamiento en medio selectivos y diferenciales y su próxima confirmación a través de pruebas bioquímicas y ser empleadas para la actual investigación.

9.3 Pruebas bacteriológicas

9.3.1 Procedimiento a refrescamiento de las muestras y resiembra

- Caldo Tetracionato

Se realizó un medio de Caldo Tetracionato, siguiendo las instrucciones del fabricante para 40 muestras, se preparó 297 ml de agua destilada añadiendo 1,37 g del medio en un frasco boeco hasta dejar hervir sin autoclavar. con la ayuda del asa de simbra completamente estéril se procedió a refrescar la muestra en la cámara de flujo laminar con el apoyo de una lámpara de alcohol industrial al 97% culminando con el respectivo sellado con ayuda del algodón, papel para posteriormente incubar a 37°C por 24h (42, 22)

- Agar Sulfito-Bismuto

Se realizó el medio de agar bismuto sulfito, siguiendo las instrucciones de fabricante para 33 muestras se preparó 660 ml de agua destilada añadiendo 34.52 g del medio en un frasco boeco hasta dejar hervir sin autoclavar (53), y enfriar a una temperatura de 45°C, ya solidificadas la

cajas petri (20 ml por caja) con la ayuda del asa de siembra fueron resembradas mediante técnica de estría con el respectivo sellado con ayuda del papel parafilm y su respectivo rotulado para posteriormente incubarlas a 37°C por 24h (54).

- **Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD)**

Se realizó el medio siguiendo las instrucciones del fabricante para 40 muestras se preparó 660 ml de agua destilada añadiendo 37,62 g del medio en un frasco boeco (55). Esperamos hasta que se solidifique en las cajas petri (20 ml por caja) con la ayuda del asa de siembra fueron sembradas mediante técnica de estría con el respectivo sellado con ayuda del papel parafilm y su respectivo rotulado para posteriormente incubarlas a 37°C por 24h (56)

9.4 Pruebas Bioquímicas y morfológicas

Para encontrar bacilos gramnegativos con características similares a las bacterias de la familia Enterobacteriaceae (32), se utilizó tinción Gram con Violeta de Genciana, Lugol, Alcohol Acetona y Safranina para identificar bacterias microscópicas.

Se utilizaron medios de cultivos para encontrar colonias sospechosas de Salmonella spp.

Agarrar TSI: El fondo se punzó con una aguja de inoculación y se hizo el proceso de siembra en estría simple en la superficie del pico de flauta. Se incubó durante 24 horas a 37°C. Las colonias 34 que sugieren Salmonella spp. producen precipitado negro SH2 (61) y tienen un pico alcalino/fondo ácido (K/A) (61).

MEDIO SIM: Para verificar la movilidad, la producción de indol y el sulfuro de hidrógeno de los microorganismos a estudiar, se realizó un punción utilizando una aguja de inoculación recta, se incubó a 37°C durante 24 horas. Después de observar la movilidad y el color del medio, se realizó la prueba de indol agregando 5 gotas del reactivo de Kovacs. Las colonias de Salmonella spp. presuntivas muestran una motilidad positiva, un indol negativo y un SH2 positivo (86).

9.5 Resultados de las pruebas microbiológicas

9.5.1 Resultados de aislamientos en medios de cultivo bacteriano

Un total de 40 muestras de cuyes infectados con linfadenitis, hisopados rectales, hisopados de suelo y tejidos (hígado, bazo, ganglios abscesos y otros órganos dañados) fueron analizadas (25). De las cuales el 82.5% (33/40) resultaron con un crecimiento de colonias sospechosas a

Salmonella spp. siendo el 17.5% (7/40) cepas que no presentaron características correspondientes a *salmonella spp* (Anexo 6).

9.5.2 Resultados de pruebas bioquímicas

Se evaluó la presencia de *Salmonella spp* en pruebas bioquímicas convencionales (TSI y SIM), tomando diferentes colonias de 33 placas sospechosas inoculadas en el medio de Sulfito-Bismuto, arrojando resultados consistentes con los reportados para esta bacteria.

Las 33 muestras recuperadas fueron sometidas a prueba de SIM/INDOL, dónde el 100% dieron un resultado positivo en motilidad y SH₂, y un efecto en INDOL negativo debido a que *Salmonella* es negativa a indol (Anexo 7).

Se utilizaron tinciones de Gram y otras técnicas para identificar las bacterias a nivel microscópico mediante el uso de violeta de genciana, lugol, alcohol de acetona y safranina para la observación. Se visualizaron Bacilos gram, negativos que se asemejan a la familia de las bacterias en cuanto a sus características (Anexo 8).

9.6 Crioconservación

Tetrationato

Se realizó medio de Caldo Tetrationato, siguiendo las instrucciones del fabricante, para 33 muestras (87) y procedimos a colocar 0.5ml de caldo en tubos eppendorf de 1.5ml.

Se preparó la solución criogénica realizando modificaciones al protocolo de Yoh M et al y Fornaguera MJ, que constituye de una mezcla de agua y glicerol, para el cálculo de las cantidades se dividió en tres porcentajes, de 30%, 40% y 50%, partiendo de un cálculo en general para la cantidad de ul en cada tubo (78, 79)

Cálculo total de Agua

1. 33 muestras * 3 (n° de ensayos) = 99 tubos en total
2. 33 x 500 ul x 3 = 49 500
3. 49 500/1000 = 49.5 ml
4. 49,5/3 = 16.5 ml

Cálculo de porcentajes

40%: $40\% * 16.5\text{ml} = 6.6 \text{ ml}$ (Glicerol)

$60\% * 16.5\text{ml} = 9.9 \text{ ml}$ (Agua destilada)

50%: $50\% * 16.5 \text{ ml} = 8.25$ (Glicerol)

$50\% * 16.5 \text{ ml} = 8.25$ (Agua destilada)

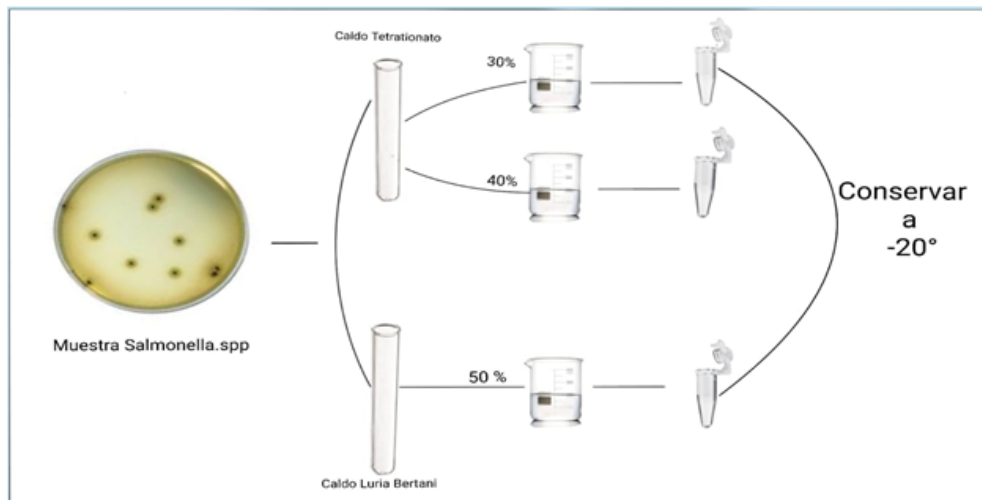
30%: $30\% * 16.5 \text{ ml} = 4.95$ (Glicerol)

$70\% * 16.5 \text{ ml} = 11.55$ (Agua destilada)

9.6.1 Procedimiento de crioconservación.

Para la crioconservación, se tomaron 0.5 ml de las muestras de los tubos de Tetrionato y se colocaron en tubos eppendorf y agregando 0.5 ml de solución criogénica. Se prepararon así 99 tubos, que se distribuyeron en tres porcentajes: 30%, 40% y 50%. Finalmente se colocaron las muestras en gradillas para tubos eppendorf y se conservaron a -20°C (79).

Figura 2. Procedimiento para la crioconservación.



9.7 Extracción de DNA

Se tomó con un asa de siembra estéril las colonias de *Salmonella spp.* previamente cultivadas en Agar Sulfito-Bismuto y se las diluyó en 1 ml de agua destilada colocada en un tubo eppendorf de 1.5ml llevado a vortex por aproximadamente 1 min (diluir completamente la colonia). Siguiendo las instrucciones del fabricante los tubos eppendorf de 1.5 ml fueron conservados a -20°C . Posterior a ello, se realizó la debida extracción de ADN de cada muestra conforme al protocolo de GeneJET Genomic DNA Purification Kit (74).

9.8 PCR

Se realizó una Reacción en Cadena de Polimerasa utilizando los serovares específicos de *S.Typhimurium* y *S.Enteritidis* con una solución de stock o trabajo a base de la solución madre.

La solución madre se realizó multiplicando el peso de cada primer por 10 para obtener el volumen de agua ultra pura para su dilución.

Solución Madre

- $25 \mu\text{Mol} \times 10 = 250 \mu\text{l}$ de agua ultra pura
- $50 \mu\text{Mol} \times 10 = 500 \mu\text{l}$ de agua ultra pura (88).

Solución de Trabajo

La solución de trabajo se obtuvo de la unión de 10µl de solución madre y 90µl de agua ultra pura.

$90\mu\text{l} + 10\mu\text{l} = 100\text{ ul}$ solución de stock (89)

- 90µl de agua ultra pura
- 10µl de solución madre

Los cálculos para los genes de la PCR se realizaron en base a las instrucciones del fabricante (Dream Taq Green PCR Master Mix 2X) donde se estandarizó un nuevo protocolo, llegando a un volumen final de 20µl (69).

Cálculo estandarizado para los genes

- Dreams taq Green PCR Master Mix : 10 ul
- Forward primer : 2 µl
- Reverse primer: 2 µl
- Template DNA: 1.5 µl
- Agua: 4.5 µl
- Volumen total: 20 µl

9.9 Electroforesis y visualización de las bandas

Los productos obtenidos por PCR fueron separados mediante electroforesis, en un gel de agarosa al 2% que se realizó en 60 ml de TAE buffer 1X agregando 1.2g de agarosa ultrapura, con buffer TAE 1X a 100 V por 1 hora en la cámara de electroforesis horizontal. Para visibilizar las bandas de ADN, se añadió 2.1µl de sybrsafe como revelador, en un transiluminador de luz ultravioleta. El tamaño de las bandas fueron determinadas mediante marcador de peso molecular de 100pb (34) Se utilizó como control positivo la cepa ATCC 14028 de *Salmonella* Typhimurium y como control positivo *E.coli*.

10.- ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

10.1 Crioconservación

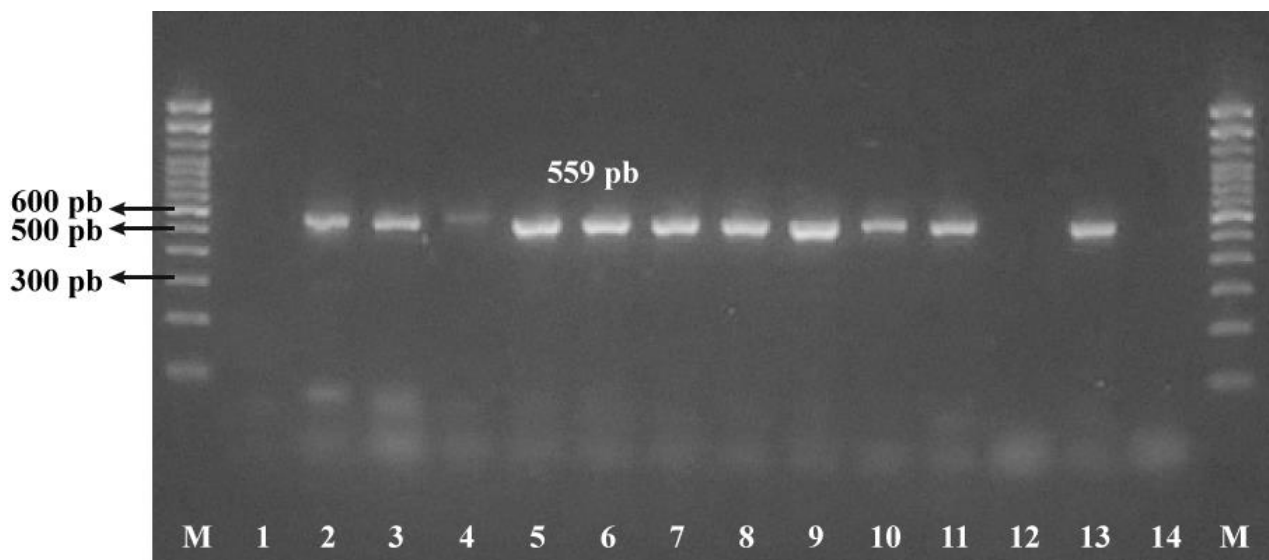
La evaluación de la viabilidad de las muestras crioconservadas al 30%, 40% y 50%, se realizó mediante una resiembra en Agar Sulfito-Bismuto en cajas petri triple. Los resultados presentados fueron que el 72,73% (24/33) de muestras crioconservadas al 50% de glicerol fueron viables, en las muestras crioconservadas al 40% de glicerol el 36.36% (12/33) sobrevivieron y en las muestras al 30% de glicerol el 60.61% (20/33) presentaron un crecimiento (Anexo 4).

La Crioconservación de bacterias se puede realizar mediante un caldo de enriquecimiento y glicerol, Miyamoto. menciona el uso de glicerol como crioprotector para criopreservación en bacterias para prevención de formación de cristales a temperaturas bajo 0, así como lo realizaron Myonsun Yoh et al. al preservar *E.coli* con glicerol al 20% y caldo tripticasa (79) y Fornaguera (77)

10.2 Resultados de la PCR

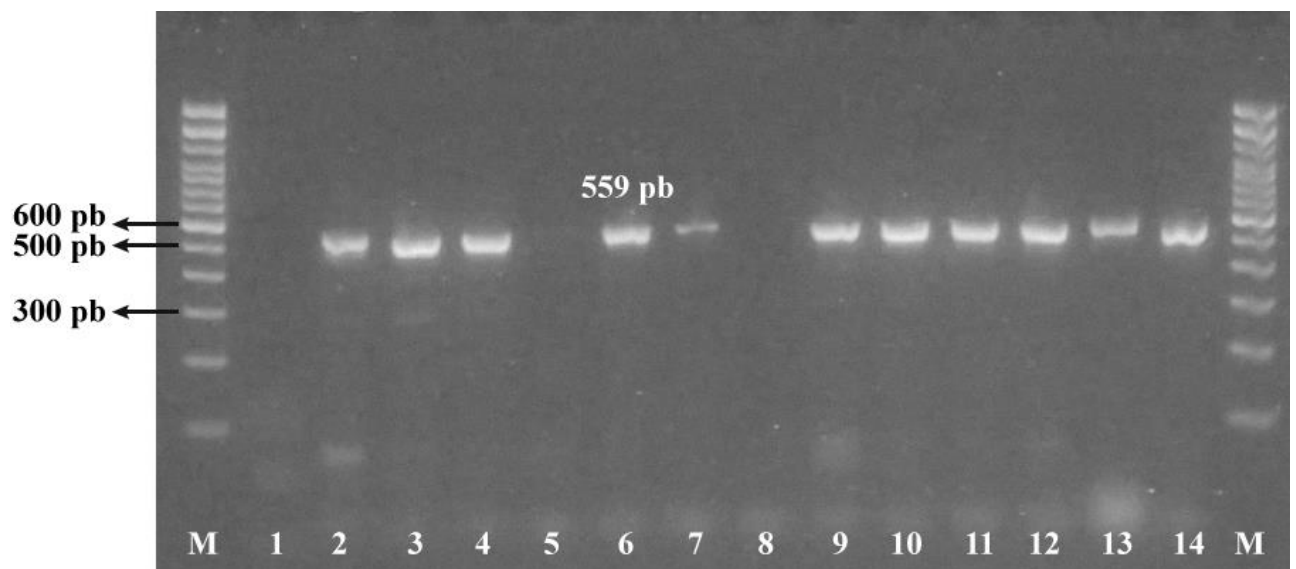
Las técnicas de PCR utilizadas demostraron ser eficaces para la serotipificación de *Salmonella* enterica. La electroforesis en agarosa al 2% presento una banda robusta en un 83.33% (20/24) de las muestras para el serovar de *S.Typhimurium*, proyectando un amplificación de aproximadamente 553 pb usando un control positivo de *S.Typhimurium* ATCC 14028 y como control negativo *Escherichia Coli*.

Figura 3. Electroforesis de PCR *Salmonella Typhimurium* muestras de la 1-12



M, marcador de peso molecular 100 bp Track Ladder, Línea 1, **Control Negativo *E.coli***; Línea 2, **Control positivo *S.Typhimurium* ATCC 14028**; Línea 3, ***Salmonella Typhimurium***; Línea 4, ***Salmonella Typhimurium***; Línea 5, ***Salmonella Typhimurium***; Línea 6, ***Salmonella Typhimurium***; Línea 7, ***Salmonella Typhimurium***; Línea 8, ***Salmonella Typhimurium***; Línea 9, ***Salmonella Typhimurium***; Línea 10, ***Salmonella Typhimurium***; Línea 11, ***Salmonella Typhimurium***; Línea 12, ***Salmonella spp***; Línea 13, ***Salmonella Typhimurium***; Línea 14, ***Salmonella spp***. M, marcador de peso molecular 100 bp Track Ladder.

Figura 4. Electroforesis de PCR *Salmonella Typhimurium* muestras de la 13-24



M, marcador de peso molecular 100 bp Track Ladder, Línea 1, **Control Negativo *E.coli***; Línea 2, **Control positivo *S.Typhimurium* ATCC 14028**; Línea 3, ***Salmonella Typhimurium***; Línea 4, ***Salmonella Typhimurium***; Línea 5, ***Salmonella spp***; Línea 6, ***Salmonella Typhimurium***; Línea 7, ***Salmonella Typhimurium***; Línea 8, ***Salmonella spp***; Línea 9, ***Salmonella Typhimurium***; Línea 10, ***Salmonella Typhimurium***; Línea 11, ***Salmonella Typhimurium***; Línea 12, ***Salmonella Typhimurium***; Línea 13, ***Salmonella Typhimurium***; Línea 14, ***Salmonella Typhimurium***. M, marcador de peso molecular 100 bp Track Ladder.

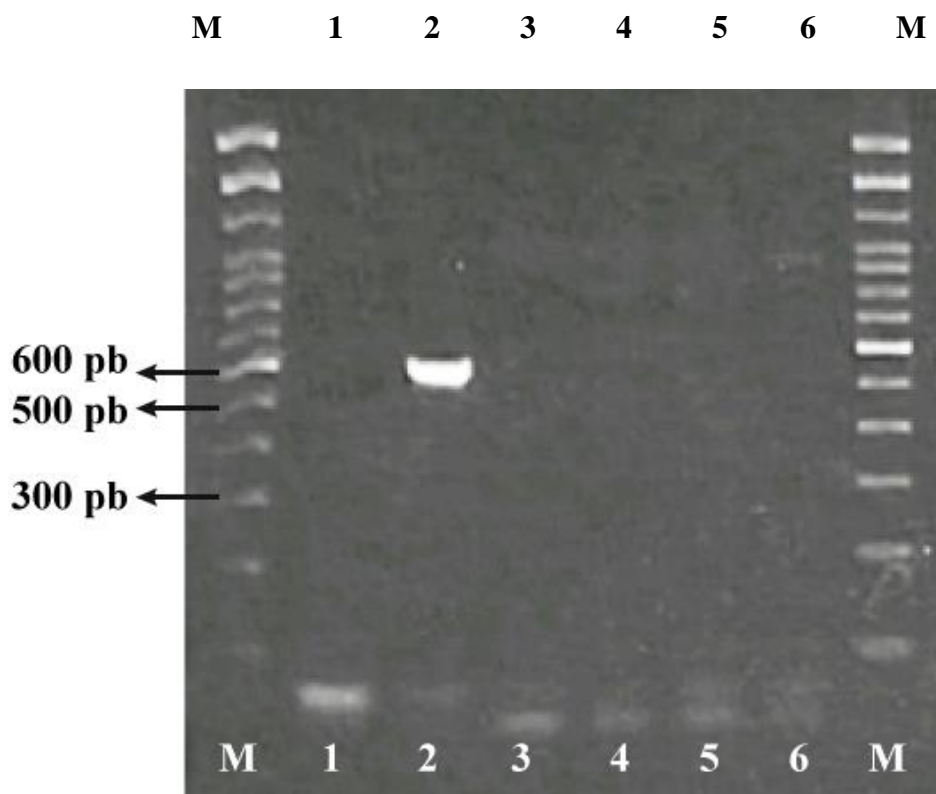
Estudios realizados en Perú mencionan que el serotipo aislado con mayor frecuencia es el serovar Typhimurium, en frecuencias que superan el 95% en relación a otros serotipos (5, 68). Esto lo reafirma Matsuura, sosteniendo que la enfermedad más importante que afecta al cuy es la *Salmonella* de especie Typhimurium (30). En Ecuador Torres S. y Tirira M encontraron un

15.15% de incidencia de *Salmonella* Typhimurium en Imbabura, así como Cassart y Falconí reafirman que este serotipo es frecuente en cuyes de provincia de Loja (9,27).

Los resultados del estudio revelaron que el 83.33% de las muestras de cuyes en Latacunga dieron positivo para *S. Typhimurium*, mientras que el 16.67% restante es perteneciente a *Salmonella spp.* pero no al serovar *S. Enteritidis*. Esta alta prevalencia de *S. Typhimurium* en cuyes de la provincia de Cotopaxi confirma que este serotipo es el más prevalente en la región.

Mientras que para *Salmonella* Enteritidis no existió migración de bandas en las muestras restantes, lo cual nos demuestra que el 16.67% (4/20) no son pertenecientes a *Salmonella* Typhimurium o *Salmonella* Enteritidis, siendo este otro serovar de *Salmonella spp.* Desconocido (Anexo 6).

Figura 5. Electroforesis de PCR *Salmonella* Enteritidis muestras de 4 muestras



M, marcador de peso molecular 100 bp Track Ladder, Línea 1, **Control Negativo *E.coli***; Línea 2, **Control *S.Typhimurium* ATCC 14028**; Línea 3, *Salmonella spp*; Línea 4, *Salmonella spp*; Línea 5, *Salmonella spp*; Línea 6, M, marcador de peso molecular 100 bp Track Ladder

La identificación de *S.Enteritidis* mediante PCR-m realizada por Díaz O et al, (67,34) lo realizaron con una fimbria específica Prot6E del serovar *Salmonella* Enteritidis para cuyes, no

existió detección para el mismo. El presente estudio utilizó el serotipo sefA que constituye la secuencia del gen, pero no se detectó amplificación de bandas en las muestras en cuyes a través de PCR convencional.

En Perú, la vacuna oleosa contra *Salmonella* Typhimurium mostró porcentajes de protección de 64% y 83% en los cuyes con 1 dosis de vacuna respectivamente; mientras que el grupo placebo presentó una mortalidad que ascendió al 85% (7). En Ecuador el control de la salmonelosis a través del uso de vacunas en cuyes no es obligatorio (8), se mantienen circulantes de venta libre dos biológicos múltiples que contienen cepas de *Salmonella* Typhimurium (33, 84).

Es importante destacar que algunas granjas cavícolas implementan programas de vacunación contra *Salmonella* Typhimurium, lo que podría explicar la alta frecuencia de *S. Typhimurium* en comparación con otros serovares. Las vacunas utilizadas en estas granjas son generalmente efectivas contra *S. Typhimurium*, lo que reduce la probabilidad de que los animales contraigan la enfermedad y la transmitan a otros. Sin embargo, el presente estudio confirma el hecho de que existe otro serovar presente en las granjas cavícolas de la provincia de Cotopaxi; por lo cual la vacuna no tendría eficacia al 100% en los cuyes contagiados con salmonelosis de este serotipo.

Es importante continuar con los programas de vigilancia y control de *Salmonella* en cuyes, ya que la presencia de otros serovares, aunque en menor medida, representa un riesgo para la salud pública.

En resumen, este estudio confirma que *S. Typhimurium* es el serotipo de *Salmonella* más prevalente en cuyes de Latacunga. La implementación de programas de vacunación y medidas de bioseguridad en las granjas cavícolas ha contribuido a reducir la incidencia de la enfermedad. Sin embargo, es necesario continuar con los esfuerzos de vigilancia y control para garantizar la salud pública.

11. IMPACTOS

11.1 Impacto técnico

El impacto técnico de esta investigación es de suma importancia como base y guía para futuras investigaciones. Provee asesoramiento sobre el descubrimiento de nuevas cepas circulantes de

Salmonella spp mediante los resultados obtenidos y las técnicas empleadas en el estudio. Sin embargo, en la provincia, aún no se conocen los serovares presentes, lo que limita el conocimiento sobre la inmunización en los cuyes de la zona. Esta falta de información se agrava por la presencia de otro tipo de serovar circulante que no ha sido identificado debido a la ausencia de estudios locales. La carencia de un mecanismo de control específico para esta cepa adicional dificulta la obtención de una inmunización completa en los cuyes, lo que conlleva a una disminución en la productividad debido a una elevada tasa de morbilidad y mortalidad.

La investigación proporciona a los productores de cuyes información crucial para mejorar la salud y la productividad de sus animales. Al identificar la cepa circulante de Salmonella spp en la zona y comprender los desafíos específicos relacionados con la inmunización.

En primer lugar, al conocer la cepa presente, los productores podrían adaptar sus prácticas de manejo y bioseguridad para reducir la exposición de los cuyes a Salmonella y otras enfermedades.

En última instancia, al mejorar la salud y la resistencia de los cuyes, los productores podrían aumentar su productividad y rentabilidad. Menos enfermedades significan menos pérdidas de animales y una producción más consistente, lo que beneficiaría significativamente a la industria de la cría de cuyes a nivel local.

12.- CONCLUSIONES

- La criopreservación de muestras en glicerol a diferentes concentraciones es una técnica viable para la preservación de microorganismos. Los resultados de este estudio demostraron que la viabilidad de las muestras criopreservadas disminuyó a medida que disminuye la concentración de glicerol. La concentración de glicerol del 50% fue la más efectiva para la criopreservación de las muestras, con una tasa de viabilidad del 72,73% mientras que las concentraciones de glicerol del 40% y 30% también mostraron tasas de viabilidad aceptables, con 36,36% y 60,61%, respectivamente. Estos resultados son

importantes para la investigación y el desarrollo de técnicas de crioconservación para microorganismos. Las aplicaciones potenciales de esta técnica incluyen la preservación de bacterias, virus, hongos y otros microorganismos para investigación científica y la conservación de recursos genéticos de microorganismos. Este estudio proporciona evidencia adicional de que la crioconservación en glicerol es una técnica viable para la preservación de microorganismos.

- Las técnicas de PCR utilizadas en este estudio fueron efectivas para la serotipificación de *Salmonella enterica*. Los resultados específicos fueron que 83,33% (20/24) de las muestras fueron identificadas como *Salmonella Typhimurium* y el 16,67% (4/24) de las muestras no pertenecían a *Salmonella Typhimurium* ni a *Salmonella Enteritidis*, lo que indica que podrían ser otros serovares de *Salmonella spp.* no identificados en este estudio. La PCR es una herramienta poderosa para la identificación rápida y precisa de serovares de *Salmonella* y la electroforesis en agarosa al 2% es un método eficaz para visualizar los productos de PCR. Este estudio demuestra que la PCR es una herramienta valiosa para la serotipificación de *Salmonella enterica*.

13.- RECOMENDACIONES

- Las aplicaciones potenciales de esta técnica incluyen la preservación de bacterias, virus, hongos y otros microorganismos para investigación científica y la conservación de recursos genéticos de microorganismos. Este estudio proporciona evidencia adicional de que la criopreservación en glicerol es una técnica viable para la preservación de microorganismos. Se necesitan más investigaciones para optimizar las condiciones de criopreservación para diferentes tipos de microorganismos, también es importante evaluar la estabilidad de las muestras criopreservadas a largo plazo así como desarrollar un protocolo estandarizado para la criopreservación de microorganismos.
- Se recomienda utilizar un panel de cebadores específicos para identificar una mayor variedad de serovares de Salmonella y el utilizar la secuenciación de ADN para confirmar la identificación de los serovares de Salmonella. Es importante utilizar controles positivos y negativos para garantizar la precisión de los resultados. Se necesitan más investigaciones para identificar los serovares de Salmonella spp. no identificados en la provincia de Cotopaxi. Además, se recomienda implementar medidas adicionales de bioseguridad en las granjas, como el control de acceso, la limpieza y desinfección regular y el manejo adecuado de los animales y sus productos.

14.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. Alerta Epidemiológica: Salmonella entérica serovar Typhi haplotipo H58. 10 de octubre de 2018, Washington, D.C. OPS/OMS. 201
2. Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO LO. Producción de cuyes (*Cavia porcellus*) [Internet]. Fao.org. [citado el 27 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.fao.org/3/W6562s/w6562s07.htm>
3. Ministerio de Agricultura y Ganadería - Crianza de cuyes ayuda a la reconversión de actividades productivas [Internet]. 2015. Gob.ec. [citado el 28 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.agricultura.gob.ec/crianza-de-cuyes-ayuda-a-reconversion-de-actividades-productivas/>
4. Salud Pública M. Gaceta ETAS SE 2022 – Ministerio de Salud Pública [Internet]. Gob.ec. 2022 [citado el 27 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.salud.gob.ec/gaceta-et-as-se-2022>
5. Layme M Américo, Perales C Rosa, Chavera C Alfonso, Gavidia C César, Calle E Sonia. Lesiones anatomopatológicas en cuyes (*cavia porcellus*) con diagnóstico bacteriológico de salmonella sp. Rev. investiga. vet. Perú [Internet]. 2011 Dic [citado 2023 Abr 28] ; 22(4): 369-376. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172011000400011&lng=es
6. Ortega O Gabriela, Jiménez A Ronald, Ara G Miguel, Morales C Siever. La salmonelosis como factor de riesgo de mortinatalidad en cuyes. Rev. investig. vet. Perú [Internet]. 2015 Dic [citado 2023 Abr 27] ; 26(4): 676-681. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172015000400015&lng=es. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v26i4.11203>
7. Peña EJC. “EVALUACIÓN DE LA VACUNA DE SALMONELLA Enteritidis CONTRA LA SALMONELLA Typhimurium QUE AFECTA A LOS CUYES (*Cavia Porcellus*). Edu.pe. 2019. [citado el 3 de mayo de 2023]. Disponible en: <http://repositorio.unica.edu.pe/bitstream/handle/20.500.13028/3705/Evaluaci%C3%B3n%20de%20la%20vacuna%20de%20salmonella%20Enteritidis%20contra%20la%20>

- [salmonella%20Typhimurium%20que%20afecta%20a%20los%20cuyes.pdf?sequence=1&isAllowed=y#:~:text=La%20vacuna%20oleosa%20contra%20Salmonella,mortalidad%20que%20ascendi%C3%B3%20al%2085%25](#)
8. AGROCALIDAD. Buenas Prácticas Pecuarias en la producción de Cuyes [Internet]. Gob.ec. 2013 [citado el 7 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2023/03/Gu%C3%ADa-de-BPP-en-la-Producci%C3%B3n-de-Cuyes-jul.pdf>
 9. Torres S y Tiria M. PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR SEDE IBARRA (PUCE -SI) [Internet]. 2017. Edu.ec. [citado el 27 de abril de 2023]. Disponible en: <https://dspace.pucesi.edu.ec/bitstream/11010/195/3/TESIS%20SANDRA%20TORRES%20c%20MARCO%20TIRIRA.pdf>
 10. Daniela S, Estrada V, Vinueza C, Julio D. UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA AISLAMIENTO Y SEROTIPIFICACIÓN DE Salmonella Enteritidis, Typhimurium, E Infantis EN CARCASAS DE POLLO DESTINADAS PARA CONSUMO HUMANO EN UN CAMAL INDUSTRIALIZADO DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el título de Médico Veterinario Y Zootecnista [Internet]. 2015. Edu.ec. [citado el 29 de abril de 2023]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/6964/1/T-UCE-0014-069.pdf>
 11. D.F. Avilés, María Amparo Martínez Martínez, Vincenzo Landi, Juan Vicente Delgado Bermejo. El cuy (“Cavia porcellus”) [Internet]. Unirioja.es. 2014 [citado el 11 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=521657>
 12. GoRaymi. El Cuy en Ecuador [Internet]. GoRaymi. [citado el 11 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://www.goraymi.com/es-ec/ecuador/gastronomias/cuy-ecuador-ajuqflufk>
 13. Llagua EBP. IDENTIFICACIÓN DE LAS PRINCIPALES ENFERMEDADES EN CUYES Y PORCINOS DEL CANTÓN PELILEO - TUNGURAHUA [Internet].

- Edu.ec. 2023 [citado el 11 de febrero de 2024]. Disponible en: <http://dspace.epoch.edu.ec/bitstream/123456789/19172/1/17T01867.pdf>
14. Camacho J. y Patiño R. Diagnóstico del sistema de producción de cuyes en pequeños y medianos productores de la sierra del Ecuador. Boletín Técnico Nro 182. Quito, Ecuador. 60 pp [Internet]. Gob.ec. 2022 [citado el 11 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/5836>
 15. Abdou H, Marichatou H, Beckers J-F, Dufrasne I. Chemical composition of colostrum from Azawak cow in Niger compared with meta-analytical data [Internet]. Fao.org. [citado el 11 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://www.fao.org/3/i4063t/i4063t.pdf>
 16. Red de Servicios Multiregionales SAC P. ENFERMEDADES DEL CUY Y SU CONTROL: Venta de Vacuna para Salmonelosis y Botiquín para Cuyes [Internet]. Rmr-peru.com. [citado el 11 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://www.rmr-peru.com/salud-cuyes.htm>
 17. Márquez RJA. La Sanidad animal al servicio de la Salud Pública: El Paradigma de Salmonella. Real Acad Ciencias Vet Andalucía Orient [Internet]. 2013;26(1):35. Available from: www.insacan.org/racvao.ahtml
 18. Barreto Marlen, Castillo-Ruiz Mario, Retamal Patricio. Salmonella enterica: una revisión de la trilogía agente, hospedero y ambiente, y su trascendencia en Chile. Rev. chil. infectol. [Internet]. 2016 Oct [citado 2024 Feb 03]; 33(5): 547-557. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182016000500010&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182016000500010>
 19. Salmonella homepage [Internet]. Cdc.gov. 2023 [citado el 2 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/salmonella/index.html>
 20. Soria MA, Soria MA. Presencia de Salmonella y características físicas de huevos destinados al consumo humano. 2012; Available from: <http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8080/tesis/handle/11185/3>
 21. Parra M, Durango J, Mattar S. Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por Salmonella. MVZ-CÓRDOBA.

- 2002;7(2):187-200. [Internet]. Redalyc.org. 2002 [citado el 13 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/693/69370201.pdf>
22. OMSA. SALMONELOSIS-Manual Terrestre de la OIE [Internet]. Woah.org. 2018 [citado el 6 de febrero de 2024]. Disponible en: https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.09.08_SALMONELLOSIS.pdf
23. Jiménez Manso, Babich, Sánchez Moreno et al. Procedimiento de Microbiología Clínica; Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Recomendaciones [Internet]. Seimc.org. 2022 [citado el 7 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimiento78.pdf>
24. Inda Marcela Figueroa Ochoa *. Antonio Verdugo Rodríguez*. Mecanismos moleculares de patogenicidad de Salmonella sp [Internet]. Medigraphic.com. 2005 [citado el 7 de febrero de 2024]. Disponible en: https://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2005/mi05-1_2e.pdf.
25. OMS. ANTIGENIC FORMULAE OF THE SALMONELLA SEROVARS [Internet]. Scacm.org. 2007 [citado el 13 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://www.scacm.org/free/Antigenic%20Formulae%20of%20the%20Salmonella%20Serovars%202007%209th%20edition.pdf>
26. Ameghino EF. 1968. Sobre un brote de salmonelosis en cuyes (Cavia cobaya): 3er Boletín Extraordinario. Lima: IVITA. p 260-261.
27. Casart Y, Falconí M. Tipificación molecular de Salmonella aislada de cuyes (Cavia porcellus) de Loja, Ecuador. Revista 180 [Internet]. 2016 [citado el 13 de febrero de 2024];3(1). Disponible en: <https://revistaecuadorestabilidad.agrocalidad.gob.ec/revistaecuadorestabilidad/index.php/revista/article/view/19>
28. Arias PC. Caracterización molecular y fenotípica de aislamientos clínicos de Salmonella Typhimurium variante monofásica (1,4,[5],12:i:-) recuperados en Colombia [Internet].

- Revistabiomedica.org. 2020 [citado el 13 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/5417/4781>
29. Gonzales CGD. Evaluación de factores de virulencia de cepas de *Salmonella* spp. aisladas de cuyes (*Cavia porcellus*) enfermos y sanos [Internet]. Edu.pe. 2019 [citado el 13 de febrero de 2024]. Disponible en: https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/10779/Duran_gc.pdf?sequence=1&isAllowed=y
30. Matsuura A, Morales S, Calle S, Ara M. 2010. Susceptibilidad a Antibacterianos in vitro de *Salmonella enterica* aislada de Cuyes de Crianza Familiar-Comercial en la Provincia de Carhuaz- Áncash. *Revista de Investigación Veterinaria del Perú*. 21(1): 93-99
31. Zhang S, Kingsley RA, Santos RL, Andrews-Polymenis H, Raffatellu M, Figueiredo J, et al. Molecular pathogenesis of salmonella *enterica* serotype typhimurium-induced diarrhea. *Infect Immun* [Internet]. 2003 [citado el 13 de febrero de 2024];71(1):1–12. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/iai.71.1.1-12.2003>
32. Angel CCM. Evaluación microbiológica de carcasas de cuy (*Cavia porcellus*) para determinar su contaminación frente a *Salmonella* spp. en los centros de expendio de alimentos: A, B, C, D y E [Internet]. Core.ac.uk. 2014 [citado el 13 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/198126563.pdf>
33. Biolovet. CUY-VAC [Internet]. Biolovet | Fármacos veterinarios producidos en Ecuador. 2018 [citado el 14 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://biolovet.com.ec/productos/cuy-vac/>
34. Alvarado DA. “Tipificación molecular de aislados de *Salmonella* entérica subespecie entérica de muestras obtenidas de sistemas de producción avícola en Perú” [Internet]. Edu.pe. 2017 [citado el 13 de febrero de 2024]. Disponible en: https://repositorio.urp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14138/1702/Alvarado_Daniel.pdf?sequence=1&isAllowed=y
35. RENAPRA. Salmonelosis [Internet]. Gob.ar. [citado el 14 de febrero de 2024]. Disponible en: https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/anmat_ficha_tecnica_salmonelosis.pdf

36. Elika. Salmonella [Internet]. ELIKA Seguridad Alimentaria. 2018 [citado el 14 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://seguridadalimentaria.elika.eus/fichas-de-peligros/salmonella>
37. Gutiérrez Castillo Adriana del Carmen, Paasch Martínez Leopoldo Henri, Calderón Apodaca Norma Leticia. Salmonelosis y campilobacteriosis, las zoonosis emergentes de mayor expansión en el mundo. Vet. Méx [revista en Internet]. 2008 Mar [citado 2024 Feb 14] ; 39(1): 81-90. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-50922008000100007&lng=es.
38. Asheg AA, Levkut M, Revajova V, Sevcikova Z, Kolodzieyski L, Pisl J. Dynamics of Lymphocyte Subpopulations in Immune Organs of Chickens Infected with *Salmonella* Enteritidis. Acta Vet Brno 2003; 72:359–364
39. Sanidad Animal OM. Manual terrestre de la OIE, Capítulo 3.9.8 SALMONELOSIS [Internet]. Woah.org. 2018 [citado el 3 de mayo de 2023]. Disponible en: https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.09.08_SALMONELLOSIS.pdf
40. Revista MVZ Córdoba [Internet]. Redalyc.org. 2002 [citado el 6 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/693/69370201.pdf>
41. OMS. Fiebre tifoidea [Internet]. Who.int. 2023 [citado el 29 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/typhoid>
42. Mamani AL. Frecuencia de lesiones anatomopatológicas en cobayos con diagnóstico bacteriológico de Salmonella sp. remitidos al Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria de la FMV-UNMSM durante el periodo 2001-2007 [Internet]. Edu.pe. 2010 [citado el 10 de febrero de 2024]. Disponible en: https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/748/Layme_ma.pdf?sequence=1&isAllowed=y
43. Difco™ y BBL™ . Base de caldo de tetratoato, manual, segunda edición [Internet]. Cloudfront.net. [citado el 6 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://d163axztg8am2h.cloudfront.net/static/doc/32/c3/f5c64d84fd1c3f37215a99db29d9.pdf>

44. OMSA. SALMONELOSIS-Manual Terrestre de la OIE [Internet]. Woah.org. 2018 [citado el 6 de febrero de 2024]. pag 5. Disponible en: https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.09.08_SALMONELLOSIS.pdf
45. Biocen, centro nacional de biopreparados. MANUAL DE MEDIOS DE CULTIVO 2018 [Internet]. Biocen.cu. 2018 [citado el 10 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://www.biocen.cu/wp-content/uploads/2021/05/Manual-MC-2018.pdf>
46. Leifson, S.: "New Selenite Enrichment Media for the Isolation of Typhoid and Paratyphoid (Salmonella) Bacilli". Amer J Hyg 24:423, 1936. t Buchbinder, L., Boris, Y. y Goldstein, L.: "Further Studies on New Milkfree Media for the Standard Plate Count of Dairy Products". Amer J Public Health 43:869, 1953 Britania. Verde Brillante Bilis 2% Caldo [Internet]. Britanialab.com. [citado el 10 de febrero de 2024]. Disponible en: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6054e8cd82576.pdf
47. Vassiliadis P, Pateraki E, Papaiconomou N, Papadakis JA and Trichopoulos SD. 1976. Nouveau procédé d'enrichissement de Salmonell. - Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 127 B: pp.195-100
48. Vassiliadis P, Trichopoulos D, Pateraki E and Papaiconomou N. 1978. Isolation of Salmonella from minced meat by the use of a new procedure of enrichment. - Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B, 166: pp. 81-86
49. Leifson E. 1935. J. Pathol. Bacteriol., 40: 581.
50. Britania. Agar Salmonella Shigella [Internet]. Britanialab.com. [citado el 10 de febrero de 2024]. Disponible en: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6070900c78db3.pdf
51. (Biocen C de B. BASE DE MEDIO CROMOCEN® SALM [Internet]. Biocen.cu. 2018 [citado el 10 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://www.biocen.cu/wp-content/uploads/2021/05/Manual-MC-2018.pdf>
52. Rambach, A. 1990. New plate medium for facilitated of Salmonella spp from Proteus spp. And other enteric bacteria. Appl Environ Microbiol. 56(1):301-3

53. Laboratorio M. Agar Sulfito y Bismuto [Internet]. mcd. [citado el 6 de febrero de 2024]. Disponible en: <http://file:///C:/Users/Usuario/Downloads/FT%20Agar%20Sulfito%20de%20Bismuto.pdf>
54. Gonzalez Pedraza Jose, Pereira Sanandres Nicole, Soto Varela Zamira, Hernández Aguirre Enio, Villarreal Camacho José. Aislamiento microbiológico de Salmonella spp. y herramientas moleculares para su detección. Salud, Barranquilla [Internet]. 2014 enero [citado el 6 de febrero de 2024] ; 30(1): 73-94. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-55522014000100009&Ing=en
55. Universidad Central de Venezuela. Agar XLD [Internet]. Ucv.ve. [citado el 10 de febrero de 2024]. Disponible en: http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Agar_XLD.pdf
56. XLD Agar [Internet]. Microbiologie-clinique.com. [citado el 10 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://microbiologie-clinique.com/xld-agar-xylose-lysine-desoxycholate.html>
57. Biocen C de B. Agar Desoxicolato/Citrato [Internet]. Biocen.cu. 2018 [citado el 10 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://www.biocen.cu/wp-content/uploads/2021/05/Manual-MC-2018.pdf>
58. Holt-Harris JE, Teague O. A new culture medium for the isolation of Bacillus typhosus from stools. J Infect Dis [Internet]. 1916 [citado el 14 de febrero de 2024];18(6):596–600. Disponible en: <https://academic.oup.com/jid/article-abstract/18/6/596/817813?redirectedFrom=fulltext>
59. Condalab. Agar Desoxicolato Citrato [Internet]. Condalab. [citado el 10 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/86-15117-agar-desoxicolato-citrato.html>
60. Laboratorios BTSI Agar (Agar Triple Azúcar Hierro) [Internet]. Britanialab.com. [citado el 6 de febrero de 2024]. Disponible en: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6070971eb11bd.pdf

61. Pharmacopea MM. Triple sugar iron agar (tsi) [Internet]. Microkit.es. [citado el 14 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://www.microkit.es/fichas/TRIPLE-SUGAR-IRON-AGAR-TSI.pdf>
62. BD. BBL SIM MédiuM, Rev.10, L007503, Septiembre [Internet]. Wwww.bd.com. 2014 [citado el 6 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=22352>
63. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC). Pruebas bioquímicas de identificación de bacterias [Internet]. Ulpgc.es. [citado el 10 de febrero de 2024]. Disponible en: https://www2.ulpgc.es/hege/almacen/download/35/35729/pruebas_bioquimicas_de_identificacion_de_bacterias.pdf
64. Fernández FAF. CARACTERIZACIÓN BACTERIANA POR SECUENCIACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE Salmonella AISLADAS DE CUYES (*Cavia porcellus*) Y USO DEL OZONO (O₃) PARA LA ELABORACIÓN DE UNA VACUNA INACTIVADA [Internet]. Edu.pe. 2017 [citado el 10 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://repositorio.unsa.edu.pe/server/api/core/bitstreams/cfb84b77-ef1f-49a0-b383-806cb4459def/content>
65. Pérez de Castro AM. Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR) [Internet]. Upv.es. [citado el 8 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacci%C3%B3n%20en%20cadena%20de%20la%20polimerasa.pdf>
66. Viljoen GJ, NEL y JOHN R. CROWTHER LH. MOLECULAR DIAGNOSTIC PCR HANDBOOK [Internet]. E-bookshelf.de. [citado el 13 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://download.e-bookshelf.de/download/0000/0033/09/L-G-0000003309-0002333226.pdf>
67. DíazO Gerardo, Rosadio A Raúl, Marcelo M Geraldine, Chero O Ana, Jiménez A Ronald, Reyna W Iván et al . Evaluación de una Técnica de PCR-Múltiple para la Detección Rápida de Salmonella Typhimurium y Enteritidis en Cuyes (*Cavia porcellus*) Naturalmente Infectados. Rev. investig. vet. Perú [Internet]. 2017 Jul [citado 2024 Feb 12] ; 28(3): 713-722. Disponible en:

- http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172017000300025&lng=es . <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v28i3.13361>
68. ThermoScientific. Product information: DreamTaq Green PCR Master Mix (2X), #K1081 [Internet]. Igem.org. [citado el 11 de febrero de 2024]. Disponible en: https://static.igem.org/mediawiki/2016/b/b5/T--Aalto-Helsinki--DreamTaq_Green_PCR_MasterMix.pdf
69. Rubio JM, Tammam MA, Ta-Tang TH. Uso de PCR múltiple en el diagnóstico simultáneo de parasitosis [Internet]. Revistabiomedica.org. [citado el 13 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/download/562/692/3104#:~:text=Las%20PCR%20m%C3%BAltiples%20son%20aquellas,P%C3%A9rez%2DRoth%2C%202004>
70. Scientific TF. Essentials of real-time PCR - US. [citado el 13 de febrero de 2024]; Disponible en: <https://www.thermofisher.com/ec/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/essentials-real-time-pcr.html>
71. Rojas AC. Extracción de ADN [Internet]. Conogasi. 2016 [citado el 12 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://conogasi.org/articulos/extraccion-de-adn>
72. Cuan AG, Cárdenas AM. Evaluación de métodos de extracción de ADN bacteriano en muestras fecales de pacientes diagnosticados con infección por Helicobacter pylori Evaluation of bacterial DNA extraction methods in fecal samples of patients diagnosed with Helicobacter pylori infection Aracely García Cuan Anny Miranda Cárdenas [Internet]. Bvsalud.org. 2018 [citado el 12 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2019/03/981156/4996-texto-del-articulo-8462-1-10-20190220.pdf>
73. Thermo Scientific™ Kit de purificación de ADN genómico GeneJET - Productos bioquímicos y reactivos Ciencias de la vida [Internet]. Fishersci.es. [citado el 12 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://www.fishersci.es/shop/products/genejet-genomic-dna-purification-kit-2/p-4530565>

74. PHC Corporation. Crioconservación [Internet]. Phchd.com. [citado el 12 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://www.phchd.com/es/biomedical/preservation/Product-Technology/Cryopreservation>
75. Suleiman-Martos Nora, García-Lara Rubén Antonio, Narbona-Sánchez Isaac, Domínguez-Vías Germán. Proyecto Lázaro (2016): de la criopreservación celular a humana. Mito y realidad para la formación docente en el área de Ciencias de la Salud. Rev Med Cine [Internet]. 2022 Sep [citado 2024 Feb 12] ; 18(3): 193-204. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1885-52102022000300002&lng=e. Epub 07-Nov-2022. <https://dx.doi.org/10.14201/rmc.27412>.
76. Miyamoto-Shinohara Y, Sukenobe J, Imaizumi T, Nakahara T. Survival of freeze-dried bacteria. Journal of General and Applied Microbiology 2008; 54(1):9-24
77. Fornaguera MJ, Martos GI, Perez Chaia AB. EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL TIEMPO DE EQUILIBRIO “BACTERIA-GLICEROL” EN LA CRIOCONSERVACIÓN A -20 °C [Internet]. Gov.ar. 2019 [citado el 12 de febrero de 2024]. Disponible en: https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/193394/CONICET_Digital_Nro.b607ec5a-3513-42ff-9bde-73bc2cc877d7_B.MST.pdf?sequence=5&isAllowe
78. Yoh M, Narita I, Honda T, Miwatani T, Nishibuchi M. Comparison of preservation methods for enterotoxigenic Escherichia coli producing heat-labile enterotoxin. J Clin Microbiol [Internet]. 1991;29(10):2326–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.29.10.2326-2328.1991>
79. Huey CR, Edwards PR. Resistance of Salmonella Typhimurium to tetracyclines. Proc Soc Exp Biol Med [Internet]. 1958;97(3):550–1. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3181/00379727-97-23801>
80. Bazán R Víctor, Bezada Q Sandra, Carcelén C Fernando, Yamada A Graciela. Efecto de la infección subclínica de Salmonella Typhimurium sobre los parámetros productivos en la producción de cuyes de engorde (Cavia porcellus). Rev. investig. vet. Perú [Internet]. 2019 Oct [citado 2023 Mayo 03] ; 30(4): 1697-1706. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172019000400032

81. Oceano. Merck Manual de Veterinaria. Oceano; 2000.
82. Guerra León MVC. MANUAL TÉCNICO DE CRIANZA DE CUYES [Internet]. Org.pe. [citado el 14 de febrero de 2024]. Disponible en: https://www.cedepas.org.pe/sites/default/files/manual_tecnico_de_crianza_de_cuyes.pdf
83. Llaguno L. CUY-CON-VAC+Y [Internet]. Laboratoriollaguno.com. [citado el 14 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://www.laboratoriollaguno.com/productos/cuy-con-vacy/>
84. Peña EJC. “EVALUACIÓN DE LA VACUNA DE SALMONELLA Enteritidis CONTRA LA SALMONELLA Typhimurium QUE AFECTA A LOS CUYES (Cavia Porcellus). Edu.pe. 2019. [citado el 3 de mayo de 2023]. Disponible en: <http://repositorio.unica.edu.pe/bitstream/handle/20.500.13028/3705/Evaluaci%C3%B3n%20de%20la%20vacuna%20de%20salmonella%20Enteritidis%20contra%20la%20salmonella%20Typhimurium%20que%20afecta%20a%20los%20cuyes.pdf?sequence=1&isAllowed=y#:~:text=La%20vacuna%20oleosa%20contra%20Salmonella,mortalidad%20que%20ascendi%C3%B3%20al%2085%25>
85. Morales-Hernández L, Hernández-Anguiano AM, Cháidez-Quiroz C, Rendón-Sánchez G, V. Suslow T. Detección de Salmonella spp. en melón Cantaloupe en unidades de producción y unidad de empaque. Agric téc Méx [Internet]. 2009 [citado el 10 de febrero de 2024];35(2):135–45. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0568-25172009000200001
86. Difco™ y BBL™. Base de caldo de tetratiónato, manual, segunda edición [Internet]. Cloudfront.net. [citado el 6 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://d163axztg8am2h.cloudfront.net/static/doc/32/c3/f5c64d84fd1c3f37215a99db29d9.pdf>
87. Biosciences G. Reconstitución de Primers [Internet]. Macrogen; 2021 [citado el 13 de febrero de 2024]. Disponible en: https://youtu.be/_12IJV2MABE?si=XFwIl4FW4RAupze

88. Capital F. Solucion madre del stock a la dilucion el arte de la preparacion [Internet]. Fastercapital.com. 2023 [citado el 13 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://fastercapital.com/es/contenido/Solucion-madre--del-stock-a-la-dilucion--el-arte-de-la-preparacion.htm>