



UNIVERSIDAD TECNICA DE COTOPAXI

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIA Y RECURSOS NATURALES

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

PROYECTO DE INVESTIGACION

**“APLICACIÓN DE LA PCR PARA LA DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA
EN AISLADOS DE *Salmonella spp.* DE CUYES DEL CANTÓN LATACUNGA”**

Proyecto de investigación previo a la obtención del título de Médica Veterinaria

Autora:

Intriago Moreira Erika Karina

Tutora:

Herrera Yunga Vanessa del rosario

Latacunga – Ecuador

Agosto 2024

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Intriago Moreira Erika Karina, con cédula de ciudadanía No. 1718666538, declaro ser autora del presente Proyecto de Investigación: “**APLICACIÓN DE LA PCR PARA LA DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA EN AISLADOS DE *Salmonella spp.* DE CUYES DEL CANTÓN LATACUNGA**”, siendo la Medica Veterinaria Zootecnista Mtr, Vanessa del Rosario Herrera Yunga, 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, 15 de agosto del 2024



Erika Karina Intriago Moreira
C.C: 17186666538
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 **INTRIAGO MOREIRA ERIKA KARINA**, identificada con cédula de ciudadanía **1718666538** de estado civil soltera, a quien en lo sucesivo se denominará **LA CEDENTE**; y, de otra parte, la Doctora Idalia Eleonora Pacheco Tigselema, 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 **“APLICACIÓN DE LA PCR PARA LA DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA EN AISLADOS DE *Salmonella spp.* DE CUYES DEL CANTÓN LATACUNGA”**, 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: Marzo 2019 – Agosto 2019

Finalización de la carrera: Abril 2024 – Agosto 2024

Aprobación en Consejo Directivo: 25 de mayo del 2023

Tutor: MVZ. Vanessa del Rosario Herrera Yunga, Mtr.

Tema: **“APLICACIÓN DE LA PCR PARA LA DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA EN AISLADOS DE *Salmonella spp.* DE CUYES DEL CANTÓN LATACUNGA”**

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 15 días del mes de agosto del 2024.



Erika Karina Intriago Moreira
LA CEDENTE

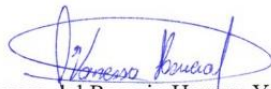
Dra. Idalia Pacheco Tigselema, Ph.D.
LA CESIONARIA

AVAL DE LA TUTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

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

“Aplicación de la PCR para la detección de genes de virulencia en aislados de *Salmonella* spp. De cuyes del cantón Latacunga” de Intriago Moreira Erika Karina , 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, 15 de agosto del 2024



MVZ. Vanessa del Rosario Herrera Yunga, Mtr.
C.C: 11037589999
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: Intriago Moreira Erika Karina, con el título de Proyecto de Investigación: **“APLICACIÓN DE LA PCR PARA LA DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA EN AISLADOS DE *Salmonella spp.* DE CUYES DEL CANTÓN LATACUNGA”** 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, 15 de agosto del 2024



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



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



Dr. Jorge Washington Armas Cajas, Mg.
C.C: 0501556450
LECTOR 3 (MIEMBRO)

Agradecimiento

En primer lugar, a Dios, por ser mi guía, fortaleza a lo largo de este proceso dándome la sabiduría y paciencia necesaria para alcanzar esta meta. A mi hijo Dominick por ser mi mayor motivación, la razón de mi lucha diaria, tu presencia ha sido mi fuerza y mi motor impulsor. A mis padres, Alberto y Aida, por su amor incondicional, su apoyo constante, enseñarme el verdadero significado del esfuerzo, perseverancia, enseñarme luchar por mis sueños. A mis hermanos Washington y Jessica por estar siempre a mi lado brindándome ánimo y motivación. A mi sobrino cuya alegría y curiosidad me inspiran a seguir adelante a no rendirme. A mi mejor amigo Bryan por estar siempre en los momentos más difíciles que he tenido que pasar, por su amistad, siempre ser un amigo incondicional. A mis amigas por su apoyo, amistad, comprensión y por estar siempre en los momentos difíciles. A mi tutora Vanessa, por su valiosa orientación, amistad y confianza en mí, su guía ha sido crucial para la culminación exitosa de esta etapa. A todas las personas de buen corazón que formaron parte de este proceso universitario y me han ofrecido su apoyo incondicional. A todos ustedes mi más profundo agradecimiento por su apoyo y confianza.

Dedicatoria

Este presente proyecto va dedicado con todo mi amor a mi hijo por ser la razón de mi vida, a mis padres y por ser mi pilar fundamental, a mis hermanos y sobrino por ser mi motivación a ser cada día mejor. Gracias a ustedes y todos sus esfuerzos y sacrificio pude alcanzar mi meta, por ustedes pude realizar mi sueño de ser una profesional, este logro es nuestro los amo.

A mi tutora y amiga Vanessa, con su guía, paciencia y apoyo incondicional ha sido fundamental en la realización de este proyecto, su dedicación y entusiasmo han hecho de este proceso una experiencia enriquecedora y gratificante. Gracias por creer en mí y por estar siempre dispuesta ayudarme. Esta tesis es tanto suya como mía.

Nunca subestimen el poder que tienes dentro de ti, las dudas y los miedos son parte de la vida, cuando tengas miedo hazlo con mucha más gana porque cada desafío es una oportunidad para descubrir tu verdadera fuerza no dejes que las inseguridades te frenen, cree en ti, trabaja con determinación y veras que eres capaz de lograr más de lo que te imaginas. Confía en tu potencial y recuerda que el primer paso hacia el éxito es creer que puedes hacerlo.

Con ánimo y fe en tus capacidades, con amor.

Karina Intriago Moreira

UNIVERSIDAD TECNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIA Y RECURSOS NATURALES
TITULO: “APLICACIÓN DE LA PCR PARA LA DETECCIÓN DE GENES DE
VIRULENCIAS EN AISLADOS DE *Salmonella spp* DE CUYES DEL CANTÓN
LATACUNGA”

Autora:

Intriago Moreira Erika Karina

RESUMEN

La Salmonelosis es una infección bacteriana la cual puede comenzar con un brote para luego estabilizarse como una enfermedad endémica, esto implica que la enfermedad puede surgir de manera repentina y luego mantenerse de forma constante en la población. El cuy como cualquier especie es susceptible a sufrir enfermedades infecciosas como bacterianas, víricas, fúngicas y parasitarias, siendo la falta de estudios microbiológicos, el principal factor de pérdidas económicas que existe en la crianza de los cuyes. La salmonelosis es una enfermedad bacteriana que tiene como agente etiológico causante *Salmonella sp*, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* los cuales son bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos que no contienen cápsula, ni esporas, son móviles por la presencia de flagelos peritricos. Existen más de 2500 serotipos de *Salmonella* diferentes que se han identificado hasta el momento, son oxidasas negativas en su gran mayoría son productoras de sulfato de hidrogeno, tienen su temperatura promedio para su crecimiento la cual va desde 5°C a 47°C y con una temperatura menor a 7°C su crecimiento se detiene. El presente proyecto de investigación tuvo como objetivo Aplicación de la PCR para la detección de genes de virulencia en aislados de *Salmonella spp.* de cuyes del cantón Latacunga. La *Salmonella* posee genes de virulencia que cumplen funciones biológicas asociadas al reconocimiento del hospedero, adhesión e invasión, supervivencia y muerte de macrófagos, entre otros, lo que posibilita el desarrollo y mantenimiento de la enfermedad en cuyes y otras especies. Por consiguiente, se planteó determinar los genes de virulencia de *Salmonella spp* a partir de 24 muestras recolectadas (hisopados rectales, hígado, abscesos y pulmón). La metodología consistió en la aplicación de la PCR y se usaron los siguientes genes *spiA*, *sipB*, *tolC*, *sitC* y *sopB* los cuales fueron revelados gracias a un gel de agarosa al 2% en la cámara de electroforesis horizontal. Los resultados reflejaron que el 99.2 % de los genes fueron amplificados con los respectivos tamaños de pares de base. Los aislados de *salmonella spp* indicaron que los patrones de virulencia son similares.

Palabras claves: *Salmonella spp*, genes de virulencia, PRC, cuyes, virulencia

COTOPAXI TECHNICAL UNIVERSITY

FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCES AND NATURAL RESOURCES

TOPIC: “PCR APPLICATION FOR THE VIRULENCE GENES DETECTION IN ISOLATES OF *Salmonella spp.* FROM GUINEA PIGS FROM LATACUNGA CANTON”.

Author:

Intriago Moreira Erika Karina

ABSTRACT

Salmonellosis is a bacterial infection, what can begin with an outbreak and then, it stabilizes as an endemic disease, this involves, what the disease can appear sudden manner and then, it maintains constant form in the population. The guinea pig, like any species, is susceptible to infectious diseases, such as bacterial, viral, fungal and parasitic diseases. The microbiological studies lack, the economic losses main factor, which exists in the guinea pigs breeding. Salmonellosis is a bacterial disease, what has as etiological agent caused *Salmonella sp.*, belonging to the Enterobacteriaceae family, the which are gram-negative bacilli, facultative anaerobes, what do not contain capsules or spores and are mobile by the peritrichous flagella presence. There are more than 2,500 different *Salmonella* serotypes that have been identified so far, they are mostly oxidase-negative, hydrogen sulphate producers, they have their average growth temperature ranges for their growth, the which from 5°C to 47°C, and with fewer temperatures to 7°C their growth stops. The research project had as aim PCR application for the virulence genes detection into *Salmonella spp.* isolates from Latacunga canton guinea pigs. *Salmonella* has virulence genes, which meet biological functions associated to the innkeeper recognition, adhesion and invasion, survival and macrophages death, among others, what enables the development and disease maintenance in guinea pigs and other species. By consequent, it was set out to determine the *Salmonella spp* virulence genes starting at 24 collected samples (rectal swabs, liver, abscesses and lung). The methodology consisted in the PCR application and it was used the following genes: *spiA*, *sipB*, *tolC*, *sitC* and *sopB*, which were revealed thanks to a 2% agarose gel to the horizontal electrophoresis chamber. The results reflected, what 99.2 % the genes, they were amplified with the respective base pair sizes. The *Salmonella spp* isolates indicated, what the virulence patterns are similar.

Keywords: *Salmonella spp*, virulence genes, PRC, guinea pigs, virulence.

INDICE DE CONTENIDO

DECLARACIÓN DE AUDITORIA.....	ii
CONTRATO DE CISION NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR.....	iii
AVAL DE LA TUTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACION.....	v
AVAL DE APROBACION DEL TRIBUNAL DE TITULACION.....	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
DEDICATORIA.....	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INFORMACION GENERAL.....	1
2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.....	2
3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO.....	3
3.1 Directo.....	3
3.2 Indirecto.....	3
4. PROBLEMÁTICA DE LA INVESTIGACION.....	4
5. OBJETIVOS.....	4
5.1 Objetivo general.....	4
5.2 Objetivos específicos.....	4
6. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREA EN RELACION A OS OBJETIVOS PLANTEADOS.....	5
7. FUNDAMENTACION CIENTIFICA TECNICA.....	5
7.1 Antecedentes y Generalidades de la Producción de Cuy (<i>Cavia porcellus</i>) en Latinoamérica (Perú, Colombia y Bolivia) y el Ecuador.....	5
7.2 Salmonelosis en el cuy.....	6
7.3 Generalidades de la <i>Salmonella</i>	7
7.4 Clasificación taxonómica del cuy.....	7
7.5 Especie y subespecies.....	7
7.6 Serovares identificados en cuyes.....	8
7.7 Genoma de la <i>salmonella</i>	8
7.8 Especies a las que afectan <i>Salmonella</i>	8
7.9 Patogenia de la <i>Salmonella</i> en general.....	8

7.10	Signos clínicos y alteraciones post mortem en cuyes.....	9
7.10.1	De carácter crónico.....	9
7.10.2	De carácter agudo.....	9
7.11	Diagnostico.....	10
7.11.1	Diagnóstico clínico.....	10
7.11.2	Diagnostico serológico.....	10
7.12	control y prevención en cuyes.....	10
7.13	Características Microbiológicas de la salmonella (Diagnostico bacteriológico...)	11
7.13.1	características de las colonias.....	11
7.13.2	Medios de cultivos.....	11
7.13.3	Pruebas bioquímicas para la identificación <i>Salmonella</i>	15
7.13.4	Pruebas de identificación de sensibilidad antibiótica.....	16
1.13.4.1	Tecnica de disco de agar.....	16
1.13.4.2	E-test.....	16
7.14	Genes de virulencia en <i>Salmonella</i>	16
8.	Crioconservación.....	18
8.1	Extracción de ADN.....	19
8.2	Kit comercial para la extracción de ADN.....	19
8.3	Cuantificación del ADN.....	19
8.4	Electroforesis.....	19
8.5	Detención molecular.....	20
8.	VALIDACIO DE LAS HIPOTESIS.....	20
9.	METODOLOGIA Y DISEÑO EXPERIMENTAL.....	20
9.1	Ubicación del experimento.....	20
9.2	Diseño experimental y tipo de investigación.....	21
9.3	Muestras.....	21
9.4	Pruebas bacteriológicas.....	21
9.4.1	Procedimiento de reacción de muestras.....	21

9.4.2 Pruebas bioquímicas.....	22
9.4.3 Crioconservación.....	23
9.4.4 Procesos de la crioconservación.....	24
9.5 Extracción de DNA.....	25
9.5.1 Procedimiento para la extracción de DNA.....	25
9.6 PCR.....	25
9.6.1 selección de perfil de genes de virulencia.....	26
9.7 Condición de la PCR.....	26
9.8 Electroforesis y visualización de bandas.....	27
10. ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	27
10.1 Resultados.....	27
11. IMPACTO TECNICO.....	33
12. CONCLUSIONES.....	34
13. RECOMENDACIONES.....	34
14. REFERENCIA BIBLIOGRAFICAS.....	35
15. ANEXOS.....	43

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de la salmonella spp.....	7
Tabla 2. Medios de cultivos empleados para identificar las especies de <i>Salmonella</i>	14
Tabla 3. Pruebas bioquímicas para la identificación <i>Salmonella</i>	15
Tabla 4. Genes de virulencia presentes en <i>Salmonella spp</i>	18
Tabla 5. Selección del Perfil de genes de virulencia.....	26

INDICE DE GRAFICO

Grafico 1. Procedimiento de crio conservación.....	25
--	----

INDICE DE FIGURAS

Figura 1, 2. Gel de electroforesis de agarosa al 2 % del gen spiA.....	28
Figura 3,4. Gel de electroforesis de agarosa al 2 % del gen sipB.....	29
Figura 5,6. Gel de electroforesis de agarosa al 2 % del gen tolC.....	20
Figura 7,8. Gel de electroforesis de agarosa al 2 % del gen sitC.....	31
Figura 9,10. Gel de electroforesis de agarosa al 2 % del gen sopB.....	32

1- INFORMACION GENERAL

Título del Proyecto: Aplicación de la PCR para la detección de genes de virulencia en aislados de *Salmonella spp.* de cuyes del cantón Latacunga.

Fecha de inicio: Abril 2023

Fecha de finalización: Agosto 2024

Lugar de ejecución: Provincia de Cotopaxi, Ciudad Latacunga.

Facultad que auspicia: Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales

Carrera que auspicia: Carrera de medicina veterinaria

Proyecto de investigación vinculado: Salud y bienestar animal del cantón Latacunga

Equipo de trabajo:

MVZ. Herrera Yunga Vanessa. Mtr

Intriago Moreira Erika Karina

Área de conocimiento:

62 Agricultura, Silvicultura y Pesca

Sub Área:

64 Veterinaria

Línea de investigación: Producción y biotecnología animal

Sub líneas de investigación de la Carrera: Microbiología, parasitología, inmunología y sanidad animal.

1. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

La presente investigación se enfocará en determinar molecularmente los genes que codifican para los factores de virulencia de *Salmonella sp*, puesto que, no existe registros sobre los mismo en el Ecuador. Por su amplio rango de huéspedes la presente investigación se limitará a la especie menor, el cuy. La provincia de Cotopaxi es considerada una de las cuatro principales provincias productoras de cuyes y la salmonelosis en una de las principales causantes de pérdidas económicas. Además, la salmonelosis causa adherencia e invasión de las células de mamíferos ocasionando lesiones que pueden ir desde agudas a crónicas, lo que provoca altas tasas de mortalidad y morbilidad en los sistemas de producción de las cuyiculas, transformándola en una enfermedad infectocontagiosa. La falta de información se suma al hecho de que es una enfermedad de interés desde el punto de vista de salud pública.

Además, que este estudio sentará las bases para las entidades sanitarias puedan recomendar un plan sanitario con miras a reducir la presencia de *Salmonella spp*. en las granjas cuyiculas de Latacunga para luego ser difundido a nivel provincial y nacional, y garantizar un producto inocuo para el consumo de la sociedad.

De igual manera, los resultados obtenidos beneficiarán a los productores, a la comunidad, investigadores y será de gran utilidad en futuros estudios científicos relacionados con la *Salmonella spp*, o de cualquier otro agente implicado, y así mejorar la producción y evitar propagación de enfermedades causadas por la *Salmonella spp*.

2. BENEFICIOS DE PROYECTO

3.1 Directos

- Propietarios de los criaderos de cuyes (Pasuchisi), (Salache y Santa marianita) del cantón Latacunga (Pujilí, Collas Bajo).
- Población que consume la carne del cuy de los diferentes cantones de la Provincia de Cotopaxi

3.2 Indirectos

- Comerciantes del cuy de los diferentes cantones de la Provincia de Cotopaxi

3. PROBLEMÁTICA

El cuy es un mamífero perteneciente a Latinoamérica y con mayor producción en los países como Perú, Ecuador, Colombia y Bolivia, se considera un producto nativo con un alto valor nutritivo y bajo costo de producción, contribuye a la seguridad alimentaria de la población rural dedicados a la producción de cuy. Se estima que en los países andinos la población de cuyes es de 36 millones de animales (1).

En Ecuador el cuy tiene una gran demanda especialmente en ciudades de la Sierra centro, sin embargo, su aceptación se ha extendido hasta la Costa y Amazonía, esto debido a la migración de la población y la influencia de sus costumbres y tradiciones. En el país se consume aproximadamente 13 millones de animales anuales con un peso aproximado de 2.1kg, lo que representa alrededor de 26.590 toneladas de carne al año (2).

Las provincias con mayor demanda de consumo de cuyes son Tungurahua, Azuay, Cotopaxi, Pichincha y Chimborazo, según el último censo agropecuario la población de cuyes fue de 5'067.049 animales, de estas, el 97% corresponden a crianza familiar y tradicional y el restante a exportaciones tecnificadas. En Cotopaxi la producción de animales por año se registra en un total de 60.000 entre animales vivos y faenados, producción mucho más baja que la demanda total de 664.250 (3).

De acuerdo a la OIE, los animales destinados a la producción constituyen el 40 % del valor del sector agropecuario mundial. Representan los ingresos y los medios de subsistencia de una de cada cinco personas, sin embargo, esto se ve afectado por una serie de problemas de sanidad y bienestar (4).

Una de las enfermedades que más afecta a los cuyes es la salmonelosis, esta enfermedad limita el desarrollo de la crianza, debido que su tratamiento no siempre es exitoso, lo que significa una considerable pérdida para el productor (5).

Es una enfermedad infecciosa del ser humano y de los animales causada por bacterias del género *Salmonella*, la cual llegan a causar clínicamente infecciones diarreicas y sistémicas (6).

Los brotes epidémicos de *Salmonella spp.* en países en vías de desarrollo pueden asociarse con elevadas tasas de mortalidad hasta el 95% por diversas causas en cuyes. La susceptibilidad a esta enfermedad varía según la edad: los cuyes en lactancia presentan una tasa de morbilidad de hasta el 52,70%, los adultos hasta el 30,65% y los cuyes en recría hasta el 19,83% y la aparición de abortos, los animales afectados muestran pérdida de apetito, anemia, pelaje erizado, jadeo, diarrea y parálisis de las patas traseras. En las hembras gestantes, se observan abortos sobre todo cuando son provocados por cepas resistentes a los antibióticos (7).

Los genes de virulencia implicados son codificados por genes como *spvB*, *pefA*, *tolC*, *sopB*, *spiA*, *sipB*, *cdtB*, *sitC*, *IpfC*, *sifA*, que cumplen funciones biológicas asociadas al reconocimiento del hospedero, adhesión e invasión, supervivencia y muerte de macrófagos, etc. Con las que se posibilita el desarrollo y mantenimiento de la enfermedad. Por ello, es importante conocer los factores de virulencia que existen en *Salmonella spp* (8).

Por todo lo antes mencionado el presente proyecto de investigación, se enfocó en detectar los genes de virulencia en aislados de *Salmonella spp.*, en granjas cuyiculas del cantón Latacunga, Provincia de Cotopaxi – Ecuador.

5. OBJETIVOS

5.1 Objeto general

Aplicar la PCR para la detección de genes de virulencia en aislados de *Salmonella spp.* obtenidos a partir de cuyes del cantón de Latacunga, Ecuador.

5.2 Objetivos específicos

- Detectar los genes de virulencia en los aislados de *salmonella spp.*
- Identificar los genes que codifican a los factores de virulencia en aislados de *Salmonella spp.* mediante la aplicación de la PCR

6. ACTIVIDADES Y SISTEMAS DE TAREAS EN RELACION A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS.

Objetivos	Actividades	Resultado de la actividad	Medios de verificación
Detectar los genes de virulencia en los aislados de <i>salmonella spp.</i>	Se reactivaron las colonias en los medios de cultivos de verificación. Se verifico en los medios de cultivos selectivos la presencia de <i>Salmonella spp.</i>	Con las muestras obtenidas se comprobó 95.8% la presencia de los genes de virulencia en la <i>Salmonellas spp.</i>	En los geles de agarosa al 2% de la electroforesis obtenidos se verifica el resultado (Figura1,2,3,4,5,6,7,8,9,10)
Identificar los genes que codifican a los factores de virulencia aislados de <i>Salmonella spp.</i> mediante la aplicación de la PCR	La utilización de los cebadores para la amplificación de secuencias específicas de ADN que están presente en los genes que codifican la correcta visualización de los pares de base	De la extracción del ADN de los aislados conservados del 50% de glicerol fueron más viables para el uso. De las 24 muestras analizadas en los genes de virulencia <i>spiA</i> , <i>sipB</i> , <i>tolC</i> , <i>sitC</i> y <i>sopB</i> , el 4.2% dio negativo en el gen <i>tolC</i>	Pruebas e informe de los resultados obtenidos de las pruebas de la PCR. (Anexos 9) En el gel de electroforesis del gel <i>tolC</i> la muestra 15 no amplifico en los tamaños de pares de bases correspondiente. (figura 6)

7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA

7.1 Antecedentes y Generalidades de la Producción de Cuy (*Cavia porcellus*) en Latinoamérica (Perú, Colombia y Bolivia) y el Ecuador

El cuy es originario de Suramérica siendo Perú, Colombia, Bolivia y Ecuador los países con más producción de granjas cuyiculas para el consumo de carne por su alta tasa de valor

nutricionales ya que el promedio de grasas es menos del 10%, sus altos niveles de proteínas y tiene bajos niveles de colesterol, la producción se ve afectada por algunos patógenos tales como la *Salmonella sp*, la cual causa mortalidad y abortos, esto se da por las malas prácticas de manejo, estrés del animal y esto es la principal causa de pérdidas económicas y de la granja en general (9).

En Ecuador, el Instituto Nacional de Estadística y Censos estimó una población de cinco millones de cuyes, estando el 65% localizado en las provincias de Azuay, Tungurahua, Chimborazo y Cotopaxi, donde el consumo de carne de cuy fue de 0.41 kg por habitantes (10).

Los cuyes son criados en tres sistemas de producción

- **El sistema Familiar o Tradicional**, donde se maneja un número máximo de 25 cuyes, la crianza se desarrolla en pequeñas jaulas sin distinción de edad o sexo, el número de crías en promedio es de 5.5 gazapos hembra por año, la alimentación es básicamente con forraje y desechos de cocina y la producción es mayormente para el auto consumo (11).
- **El sistema Familiar Comercial**, que corresponde a un nivel de agricultores con mayor proyección de mercado, maneja un número no mayor a 100 cuyes, posee un manejo más técnico, sanitario, y el número de crías es de 9.0 gazapos hembra por año, la alimentación se basa en forrajes y algo de pienso (12).
- **El sistema Comercial (tecnificado)**, corresponde a más de 100 y no mayor a 500 cuyes, siendo micro empresas familiares, se desarrolla en galpones con cuyes mejorados, la alimentación es mixta (forrajes y pienso), el control sanitario es más estricto, los cuyes se agrupan por edad, sexo, el número de crías es de 10.8 gazapos hembra por año (13).

7.2 Salmonelosis en el Cuy

La salmonelosis es una enfermedad bacteriana que tiene como agente etiológico causante *Salmonella sp*, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* los cuales son bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos que no contienen cápsula, ni esporas, son móviles por la presencia de flagelos peritricos (14).

Existen más de 2500 serotipos de *Salmonella* diferentes que se han identificado hasta el momento, el citrato es su única fuente de mantenimiento del carbón, son oxidasas negativas en su gran mayoría son productoras de sulfato de hidrogeno, tienen su temperatura promedio para

su crecimiento la cual va desde 5°C a 47°C y con una temperatura menor a 7°C su crecimiento se detiene (15).

7.3 Generalidades de la *Salmonella*

El nombre de *Salmonella* fue dado por el patólogo veterinario Estadounidense Daniel Elmer Salmon, siendo descubierta por su colega Theobald Smith en el año 1885, obteniéndola a partir de un aislado de muestra de cerdo infectado de colera la cual la describió como un microorganismo gramnegativo facultativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* de los cuales existen más 2,500 serotipos de *Salmonella* (16).

7.4 Clasificación taxonómica del cuy

Tabla 1. Taxonomía de la *salmonella spp*

REINO	Bacteria
FILO	<i>Proteobacteria</i>
CLASE	<i>Gammaproteobacteria</i>
ORDEN	<i>Enterobacteria</i>
FAMILIA	<i>Enterobacteriaceae</i>
GENERO	<i>Salmonella</i>

Fuente: Acevedo M, 2018

7.5 Especies y subespecies

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

- **S. entérica:** Esta especie representa la gran mayoría de las infecciones por *Salmonella* en humanos y animales. Se subdivide en seis subespecies:
 - *S. enterica* subsp. entérica: 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.
 - *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 (17).

- **S. bongori:** Esta especie es menos común que *S. entérica* y se asocia principalmente a infecciones en reptiles (18).

7.6 Serovares identificados en cuyes

Existen dos serovares más frecuentemente aislados de cuyes con Salmonelosis los cuales son:

- *Salmonella Typhimurium*
- *Salmonella Enteritidis* (19).

7.7 Genoma de la *Salmonella*

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 (20).

7.8 Especies a las que afectan *Salmonella*

Salmonella vive en los intestinos de las personas y animales. Algunos animales, especialmente las vacas, cerdos, gallinas, roedores (como ratones), reptiles (como tortugas, serpientes y lagartijas) y anfibios (como ranas y salamandras) pueden llevar naturalmente la *Salmonella* en sus intestinos y en sus cuerpos, pero se ven y actúan como si estuvieran sanos (21).

7.9 Patogenia de la *Salmonella* en general

La patogenia de *Salmonella* comienza con adquisición elevada de microorganismos vía oral, por ingerir agua o alimentos contaminados, la infección por *Salmonella* spp, depende de diversos factores como son:

1. Ingesta de microorganismos.

2. Capacidad para atravesar las barreras defensivas del huésped.
3. Capacidad invasiva del germen (22).

La cantidad para producirse una infección es de 10⁶ a 10⁹ microorganismos, en diferentes circunstancias, como una disminución de la acidez gástrica secundaria a la ingesta de alcalinos, las barreras defensivas del huésped son:

1. Acidez gástrica, que destruye gran cantidad de bacterias, motivo por el que es preciso un inóculo grande para que se desarrolle la infección.
2. Peristaltismo intestinal, que se incrementa con la infección, favorece el arrastre de los gérmenes e impide que se adhieran a la mucosa.
3. Presencia de flora saprofita del colon evita que se adhiera una parte de *Salmonella spp.*, a la mucosa, por lo que los pacientes que presentan una reducción de la flora intestinal tras recibir tratamiento antibiótico de amplio espectro tienen más posibilidades de presentar una menor infección.
4. Presencia de inmunidad específica (IgA), que impide que los microorganismos se adhieran (23).

Después de ser ingerida la bacteria pasar a través del estómago, las salmonelas son capaces de alojarse y de reproducirse en las células M (micropliegues) las cuales se localizan en las placas de Peyer de la región terminal del intestino delgado. Las placas de Peyer son un agregado de folículos linfoides que se encuentran como parte del tejido linfoide asociado a intestino. Se caracterizan por una arquitectura en forma de cúpula cubierta por el epitelio del folículo asociados (FAE). La FAE se distingue de la del epitelio veloso colindante por la falta de células caliciformes y lo más importante por la presencia de membranas de las células (24).

7.10 Signos clínicos y alteraciones post mortem en cuyes

7.10.1 De carácter crónico: anorexia, diarrea, abortos, neumonía, abdomen inflado y parálisis de las extremidades

7.10.2 De carácter agudo: Se presenta un cuadro septicémico concluyendo con la muerte del animal en un periodo de 24 a 48 horas por muerte hiperaguda, la destrucción de la mayoría de los órganos sugiere su carácter septicémico (25). En la necropsia se observa la afección que hay en los órganos afectados por *Salmonella* por lo general son hasta 5 órganos afectados por esta enfermedad (hígado, bazo, ganglios linfáticos, pulmones, mucosa intestinal) una lesión común en cuyes con salmonelosis es el agrandamiento de ganglios linfáticos cervicales, que

ocasionalmente contienen pus en el tracto reproductivo puede haber focos necróticos en el miometrio y abortos, el bazo presenta esplenomegalia con focos purulentos en su superficie, la mucosa intestinal muestra congestión y hemorragia, así como abscesos que sobresalen de la superficie del órgano a manera de grano de arroz lo cual se asocia a la hipertrofia de las placas de Peyer. Los linfonódulos mesentéricos presentan aumento de tamaño y congestión el principal órgano afectado es el hígado éste presenta inflamación y exudado más frecuente el necrótico por el tropismo por parte de la bacteria (26).

7.11 Diagnóstico

7.11.1 Diagnóstico clínico

Generalmente el diagnóstico clínico se da tras el aislamiento de *Salmonella* en hisopados rectales y abscesos mediante aislamientos, puede considerarse en los casos con fiebre persistente durante más de 72 horas. El hisopado debe realizarse a partir de muestras recién tomadas y mantenidas refrigeradas en medio de transporte. La utilización de los medios de cultivos es fundamental cuando se trata de comprobar los animales infectado con salmonelosis (27).

7.10.2 Diagnóstico serológico

- **Antígenos somáticos (O):** Antígenos de la pared bacteriana cuya naturaleza de un polisacárido, siendo la porción externa un lipopolisacárido (LPS).
- **Antígeno flagelar (H):** es la parte filamentosa del flagelo bacteriano; que se compone de subunidades de proteína llamadas flagelinas que permiten al flagelo tomar su estructura filamentosa característica. Hay dos tipos fase 1 y fase 2 (28).
- **Antígeno Vi:** Únicamente existe en *S. typhi*, *S. paratyphi* y *S. dubli*. La presencia de este antígeno hace imposible la aglutinación de suero anti O.

La diversidad de estos antígenos permite la designación de más de 2 500 serotipos de los que sólo 50 son aislados en humanos (29).

7.12 Control y prevención en cuyes

La prevención se basa en la aplicación de una bacterina triple que protege contra *Salmonella*, *E. coli*, *Pastereulla*, siguiendo el siguiente esquema de vacunación 0.5ml por animal, vacunar a primera semana de edad y revacunar a los 30 días de edad (30).

Para controlar su diseminación se recomienda:

- Manejar bien los alimentos para evitar proporcionar alimentos contaminados.

- Controlar los factores que causan estrés en la población, evitando cambios bruscos en la alimentación y manteniendo constante la temperatura de los galpones (31).
- Efectuar desinfecciones periódicas de las instalaciones. (Vacio sanitarioa)
- Mantener en cuarentena a todo animal que se introduce de otros criaderos.
- Mantener la seguridad al galpón para evitar el ingreso de roedores (32).

7.13 Características Microbiológicas de la salmonella (Diagnostico bacteriológico)

7.13.1 Características de las Colonias

Una colonia se forma a partir de la proliferación de un microorganismo en la superficie de un medio sólido, formando una masa compuesta por millones de organismos que son visibles a simple vista. La observación minuciosa de las características de la colonia es fundamental para identificar el microorganismo (33). La morfología de la colonia está relacionada con las propiedades de la célula de origen y la masa celular. Entre las características que se examinan de cada colonia se encuentran:

- a) Tamaño, el cual es característico y uniforme para cada especie o tipo, variando desde dimensiones muy pequeñas o apenas perceptibles hasta unos centímetros de diámetro.
- b) Consistencia, que puede ser blanda, seca o viscosa.
- c) Forma, que está determinada por el borde y el espesor. El borde puede ser liso, ondulado, aserrado, entre otros, mientras que el espesor varía según la elevación, pudiendo ser plana, elevada, convexa, cónica, crateriforme, etc (34).

7.13.2 Medios de cultivo

Son herramientas fundamentales para el crecimiento y la identificación de microorganismos. Estos proporcionan los nutrientes necesarios para el crecimiento, la diferenciación y la identificación de bacterias, hongos y virus, lo que los convierte en una pieza fundamental para la microbiología (35).

Enriquecimiento

- **Caldo Tetrionato:**

Se emplea para el cultivo selectivo de *Salmonella spp.* a partir de muestras de heces, alimentos y otros materiales relevantes para la salud pública. Está compuesto por peptona, carbonato de calcio, sales biliares y Tetrionato, *Salmonella spp.* cuenta con la enzima Tetrionato reductasa, lo que le permite crecer en este medio a pesar de la toxicidad del Tetrionato (36).

- **Caldo selenito-cistina**

Medio de enriquecimiento selectivo destinado a la detección y aislamiento de *Salmonella spp* en muestras de agua, heces, orina y alimentos. Se suspenden 23 g en 1 litro de agua destilada, agitar hasta disolución completa, distribuir 10 ml en cada tubo y esterilizar a vapor fluente por 10 min (37). En 1936, Leifson descubrió que el selenito estimulaba el crecimiento de *Salmonella spp* 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 (36). 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 (37).

- **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 en el hidrato de carbono fermentado. Es una característica del grupo coliforme, la fermentación de la lactosa y la generación de gas a ácido se mezclan 40 gramos de polvo en un litro de agua purificada, 10 ml por tubo con campanitas de Durham se diluye y se distribuye enfriar por treinta minutos a 100 °C (38).

- **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. Esta modificación resultó en un caldo de enriquecimiento que muestra un porcentaje alto de selectividad para el 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 (39).

Aislamiento en medios selectivos

- **Agar MacConkey:** Medio poco selectivo que permite diferenciar entre bacterias Gram positivas y Gram negativas (40). Las bacterias Gram negativas fermentan la lactosa y forman colonias de color rojo, mientras que las Gram positivas no fermentan la lactosa y son incoloras (41).
- **Agar Eosina Azul de Metileno (EMB):** Similar al Agar MacConkey, pero permite una mejor diferenciación entre coliformes (colonias azul-verdosas) y otros Gram negativos (colonias incoloras) (42).
- **Agar Hektoen:** Medio selectivo para el aislamiento de *Salmonella spp.* Contiene sales biliares, verde brillante y tiosulfato de sodio. *Salmonella spp.* produce H₂S, dando colonias de color verde claro con precipitado negro (43).
- **Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD):** Este medio es moderadamente selectivo y diferencial, diseñado para aislar y distinguir patógenos entéricos Gram negativos, como *Salmonella spp* (44). Contiene extracto de levadura, desoxicolato de sodio, xilosa, lisina, lactosa y sacarosa. Facilita la distinción entre *Salmonella spp.* y otros entéricos como Shigella y coliformes (45).
- ***Salmonella Shigella***
El Agar S.S. es principalmente una modificación del medio Agar Desoxicolato-Citrato, 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 (46). 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* (47).
- **Bismuto**
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 (48), 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 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 (49).

Tabla 2: Medios de cultivos empleados para identificar las especies de *Salmonella*

Medio de cultivos	Grado de selectividad	Aspecto de las colonas
Agar BPLS (Agar verde brillante, rojo de fenol, lactosa y sacarosa)	Bajo	Rosas
Agar EMB (Agar eosina, lactosa, azul de metileno)	Bajo	Incolora
Agar MC (Agar Mac Conkey)	Bajo	Incolora
Agar DCLS (Agar Desoxicolato, citrato, lactosa, sucrosa)	Bajo	Incolora
Agar para <i>Salmonella</i> (Agar lactosa, sacarosa, tiosulfato, citrato férrico, sales biliares, verde brillante y rojo neutro)	Mediana	Amarilla con centro negro. Medio de cultivo periférico a la colonia de color amarillo
Agar BGA (Agar verde brillante)	Alta	Rasada, blancas o transparentes sobre fondo rojo
Agar bismuto-sulfito	Alta	Bordes claros y centros negros, con precipitado periférico negro con brillo metálico (ojo de conejo o de pecado)
Agar HK (Agar Hektoen)	Alta	Verde azulado-centro negro
Agar SS (Agar <i>salmonella Shigella</i>)	Alta	Incoloras con centros negros
Agar XLD (Agar xilacina, lisina, Desoxicolato)	Alta	Rojos con centros negros
Caldo RVS (caldo peptona soja de Rappaport Vassiliadis)	Muy alta	--

Fuente: Lujan M, Vigo G, 2010

7.13.3 Pruebas bioquímicas para la identificación *Salmonella*

Las salmonelas son oxidasas negativas y la catalasa positiva, siempre debemos tener presente que este microorganismo es positivo a la prueba de rojo de metilo, al citrato, fermenta la glucosa arginina dihidrolasa y descarboxilación de lisina y ornitina, también es negativa en las pruebas del indol, Voges Proskauer y ureasa, esta son identificaciones bioquímicas generales por lo que podemos encontrar variaciones en los resultados dependiendo del metabolismo de cada sepa particular (50).

Tabla 3: Pruebas bioquímicas para la identificación *Salmonella*

Pruebas bioquímicas	Salmonella						S. bongori (V)
	Salmonella enterica (I)	Subsp salamae (II)	Salmonella enterica Subsp arizonae (IIIa)	Subsp diarizonae (IIIb)	Subsp houtena (IV)	Subsp pindica (VI)	
Lactosa	-	-	-(75%)	+(75%)	-	V	-
H ₂ S	+	+	+	+	+	+	+
Gelatina	-	+	+	+	+	+	-
KCN	-	-	-	-	+	-	+
ONPG	-	-	+	+	-	V	+
Dulcitol	+	+	-	-	-	V	+
Malonato	-	+	+	+	-	-	-
Sorbita	+	+	+	+	+	-	+
L(+) tartrato	+	-	-	-	-	-	-
Mucato	+	+	+	-(70%)	-	+	+
Salicina	-	-	-	-	+	-	-

Fuente: Lujan M, Vigo G, 2010

- **Prueba de Indol:** Se utiliza para determinar si la bacteria es capaz de desdoblar el indol. Se utiliza el reactivo de Kovacs, que forma un complejo rojo con el indol. *Salmonella* spp. no produce indol (50).
- **Tinción de Gram:** Permite clasificar las bacterias en Gram positivas y Gram negativas. Se realiza una tinción primaria, decoloración y tinción de contraste (51).

7.13.4 Pruebas de identificación de sensibilidad antibiótica

7.13.4.1 Técnica en disco en agar

La prueba de difusión en agar se utiliza de rutina en muchos laboratorios clínicos para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos de bacterias de comunes de desarrollo rápido y también para algunas bacterias con requerimientos nutricionales especiales (52).

7.13.4.2 E-TEST

Se incorpora una serie de diluciones dobles de un antibiótico en una tira portadora de plástico desde la cual el antibiótico se difunde libremente en el agar, creando un gradiente de difusión a lo largo de la tira agar HTM o agar chocolate suplementado (53).

En este método determina únicamente la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), la cual se encuentra en la interfaz de una elipse, es importante realizar una lectura cuidadosa, incluso con la ayuda de una lupa, especialmente si la interfaz cae entre dos puntos. Además, se debe observar la presencia de pequeñas colonias en las áreas de bajo crecimiento, ya que esto puede indicar resistencia o niveles bajos de la misma (54).

7.14 Genes de virulencia en *Salmonella*

- **El gen *spvB*,** perteneciente al plásmido de virulencia de *Salmonella*, cuya función radica en despolimerizar filamentos de actina, destruyendo el citoesqueleto e inhibiendo la formación del autofagosoma en el estado temprano de la autofagia (55).
- **El gen *spiA*,** codifica la proteína de la membrana externa del Sistema de Secreción tipo III, componente de la Isla de Patogenicidad de *Salmonella* 2, requerido para el transporte de moléculas; de igual manera, como parte del Sistema Spi/Ssa secreta proteínas que inhiben la fusión del complejo fagosoma-lisosoma o la acidificación del fagosoma, confiriéndole a *Salmonella* la supervivencia intramacrófago (56)

- **El gen sipB**, codifica la proteína de invasión B, la cual es necesaria para transferir otras proteínas efectoras dentro de la célula, mediante el Sistema de Secreción Tipo 3 (57).
- **El gen tolC**, expresa la proteína de canal de membrana externa, requerida para el sistema de excreción de sustancias, como solventes orgánicos y proteínas, y α hemolisinas; de igual manera, funciona como bomba de efusión de moléculas, incluyendo antibióticos (56).
- **El gen cdtB**, expresa la subunidad β de la toxina citoletal distensiva, de *Salmonella Typhi*, la cual causa daños en el ADN, como el arresto celular antes de que se lleve a cabo la mitosis, estudios recientes refieren que la toxina citoletal es capaz de acentuar los síntomas de la fiebre tifoidea, modular al sistema inmune y favorecer la persistencia in vivo de S, sin embargo, ha sido reportada la presencia inusual de este gen en Serotipos de *Salmonella* No Tifoidea (NTS), como *S. Javiana*, *S. Montevideo*, *S. Orianienburg*, *S. Mississippi* y *S. Typhimurium*, mediante Secuenciamiento Completo del Genoma (57).
- **El gen sitC**, expresa el sistema de transporte de hierro que interviene en el movimiento transmembrana de dicha sustancia (55).
- **El gen lpfC**, es una de las secuencias fimbriales únicas de *Salmonella Typhimurium*, que codifica la fimbria polar larga, que interviene en la colonización intestinal en ratones (58).
- **El gen sifA**, codifica a la proteína de secreción efectora sifA. que requiere el sistema de secreción de tipo III, para causar efecto en las células huésped e invadir y alargar la vacuola (SVC), de la que se originan estructuras tubulares, conocidas como filamentos inducidos por *Salmonella* (59).
- **El gen sopB**, (*Salmonella* outer protein) expresa la proteína secretora efectora, la cual mantiene las concentraciones de fosfatidil inositol trifosfato para la elaboración y mantenimiento de la vacuola que contiene a *Salmonella* (SVC), un fagosoma en el cual *Salmonella spp.* replica y evade la exocitosis como parte de la respuesta del hospedero (60).
- **El gen pefA**, al igual que **lpfC**, es una de las secuencias fimbriales únicas de *S. Typhimurium*, el cual expresa la fimbria codificada en plásmido, la cual interviene en la adhesión al epitelio intestinal en ratones, con posterior acumulación de fluidos) (58).

Tabla 4: Genes de virulencia presentes en *Salmonella spp*

Gen	Secuencia	Tamaño (pares de base)
TolC	TACCCAGGCGCAAAAAGAGGCTATCCCGCGTTATCCAGGTTG TTGC	161
CstB	ACAACGTGTCGCATCTCGCCCCGTCATTCAATTTGCGTGGGTTC TGTAGGTGCGAGT	268
SitC	CAGTATATGCTCAACGCGATGTGGGTCTCCCGGGGCGAAAAT AAAGGCTGTGATGAAC	768
SpiA	CCAGGGGTTCGTTAGTGTATTGCGTGAGATGCGCGTAACAAAG AACCCGTAGTGATGGATT	550
SopB	CGGACCGGCCAGCAACAAAACAAGAAGAAGTAGTGATGCCC GTTATGCGTGAGTGTATT	220
LpfC	GCCCCGCTGAAGCCTGTGTTGCAGGTCGCCGCTGTTTGAGGT TGGATA	641
SifA	TTTGCCGAACGCGCCCCCACACG GTTGCCTTTTCTTGCGCTTCCACCCATCT	449
SpvB	CTATCAGCCCCGCACGGAGAGCAGTTTTTTAGGAGGAGGCGGT GGCGGTGGCATCATA	717
PefA	GCGCCGCTCAGCCGAACCAGGCAGCAGAAGCCCAGGAAACA GTG	157
SipB	GGACGCCGCCCGGGAAAACTCTCACACTCCCGTCGCCGCCT TCACAA	875

Fuente: Duran C, 2019

8. Crio conservación

El principal objetivo de la conservación es preservar los microorganismos para que permanezcan viables y limpios durante décadas, y para ello utilizamos la tecnología de conservación. Este método reduce el metabolismo celular casi a cero, lo que permite a los microorganismos sobrevivir durante mucho tiempo. El método más importante que se ha investigado es el subcultivo de microorganismos en un medio nutritivo adecuado. Este

procedimiento se llevó a cabo en condiciones de aislamiento en una cabina de bioseguridad, utilizando diferentes proporciones (30 %, 40 % y 50 %) para la preparación de la solución de crioconservación (mezcla de agua/glicerol). La concentración se calculó en función de la cantidad total necesaria (61).

8.1 Extracción de ADN

La etapa de extracción implica el aislamiento y la purificación en función de las propiedades fisicoquímicas de la molécula de ADN. Los kits comerciales simplifican este proceso a sólo unas horas y minimizan el número de pasos necesarios. Además, si se utilizan de acuerdo con las recomendaciones del proveedor, la extracción del ADN y la eliminación de contaminantes se llevan a cabo de forma muy eficiente, garantizando así una extracción muy limpia (62).

8.2 Kit comercial para la extracción de ADN

Thermo Scientific™ kit de purificación de ADN

Este kit le permite extraer rápida y fácilmente ADN genómico de alta calidad a partir de una variedad de fuentes, incluyendo sangre total, suero, líneas celulares, células bacterianas, tejidos de plantas y mamíferos, y precipitar selectivamente ADN a partir de soluciones de lavado ásperas. Esto se puede hacer. El tiempo requerido es de aproximadamente 25 minutos y normalmente se pueden obtener de 2 a 10 µg de ADN genómico (63).

8.3 Cuantificación del ADN.

El Fluorómetro Qubit está diseñado para medir con precisión la cantidad de ADN, ARN y proteínas y también la integridad y calidad del ARN, utilizando los ensayos Qubit altamente sensibles (62).

8.4 Electroforesis

La electroforesis es una técnica de laboratorio utilizada para separar moléculas de ADN, ARN o proteínas en función de su tamaño y carga. Se lleva a cabo utilizando una corriente eléctrica que desplaza las moléculas a través de un gel o matriz, en el que los poros del gel actúan como un tamiz, permitiendo que las moléculas más pequeñas se desplacen más rápidamente (64). La electroforesis en gel de agarosa, en particular, es una forma común de este método en el que se prepara un gel de agarosa y se coloca una muestra en los pocillos del gel, permitiendo que las moléculas migren según su carga y tamaño. La velocidad de migración depende de varios factores, como la concentración de agarosa, el voltaje y la composición del tampón del gel. El

tamaño de las moléculas de la muestra puede determinarse por comparación con un patrón de tamaño conocido (65).

8.5 Detección Molecular

Qué es la Prueba de Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) convencional.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una potente y fundamental técnica de biología molecular. Es un método *in vitro* eficiente y rápido para la amplificación enzimática de secuencias específicas de ADN o ARN procedentes de varias fuentes (66).

Una PCR convencional consta de un ADN específico, un conjunto de cebadores oligonucleótidos sintéticos que flanquean la secuencia de ADN específico, una ADN polimerasa termoestable (normalmente una polimerasa Taq) y nucleótidos (67). Utilizando cicladores térmicos, existen tres etapas durante cada ciclo de amplificación que son, la desnaturalización de la doble hebra del ADN (dsDNA) en ADN monocatenarios separados, la hibridación de los cebadores con la secuencia específica de ADN y la extensión, en la cual la ADN polimerasa extiende el ADN desde los cebadores creando nuevos ADN bicatenarios que contienen una hebra antigua y una nueva (68). Las cadenas sintetizadas en un ciclo sirven como molde en el siguiente, lo que produce un aumento de un millón de veces de la cantidad de ADN en tan sólo 20 ciclos (69).

8. VALIDACION DE LAS HIPÓTESIS

H0: En los aislados de *Salmonella sp.* no se detectaron los genes de virulencia *spiA*, *sipB*, *tolC*, *sitC* y *sopB*.

H1: En los aislados de *Salmonella sp.* se detectaron los genes de virulencia *spiA*, *sipB*, *tolC*, *sitC* y *sopB*.

Se valida la hipótesis alternativa ya que se detectó el 99.2% de los genes de virulencia en las 24 muestras de ADN de *salmonella spp* las cuales amplifican 23 muestras a los pares de bases correspondiente.

9. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

9.1 Ubicación del experimento

Los aislados bacterianos que se analizaron para este estudios fueron obtenidos de los trabajos de Rivadeneira (2023) Yaguapaz (2023) las muestras fueron recolectadas del criadero ubicado sector Pusuchisi del cantón de Latacunga que pertenece a la provincia de Cotopaxi, con una extensión de 6.985 km², con una altitud de 3847msnm, latitud -0.933659 y una longitud -

78.614973 dedicados al sistema de crianza familiar- comercial y las siguientes muestras se tomaron en tres criaderos diferentes ubicados en los cantones de Pujilí sector Collas Bajo, y Latacunga sector Salache y Santa Marianita, de la provincia de Cotopaxi, dedicados al sistema de crianza familiar-comercial.

El análisis microbiológico: En la primera etapa se realizó el refrescamiento de los aislados en (tetrionato, bismuto, XLD), las pruebas bioquímicas (TSI, SIM), la crioconservación (Tetrionato, glicerol) de los aislados de *salmonella spp*, en las instalaciones de la Clínica Veterinaria en el laboratorio de Microbiología de la Universidad Técnica de Cotopaxi con su localización en Latacunga, provincia de Cotopaxi, localizada en el centro norte del callejón interandino de la República del Ecuador.

El análisis molecular: La segunda fase de la investigación se realizó la atracción del ADN y electroforesis en las instalaciones de la Universidad Católica de Cuenca, en el Centro de Investigación Innovación y Transferencia de Tecnología (CIITT) en Parroquia Ricaurte, campus Miraflores, ubicada en Cuenca en la Provincia de Azuay en la zona sur del Ecuador.

9.2 Diseño experimental y tipo de investigación

Este estudio empleó el enfoque deductivo y se clasifica como una investigación de naturaleza exploratoria y descriptiva.

9.3 Muestra

Se realizó la reactivación de 40 aislados que se obtuvieron a partir de hisopados rectales y lesiones en órganos compatibles con salmonelosis que fueron bioquímicamente identificados como *Salmonella sp.* conforme al siguiente protocolo.

- 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.

9.4 Pruebas bacteriológicas

9.4.1 Procedimiento de reactivación de muestras

- **Caldo Tetrionato**

Se preparó el medio de Caldo Tetrionato conforme a las instrucciones del fabricante. Para 40 muestras, se prepararon 297 ml de agua destilada, a la cual se añadieron 1,37 g del medio en un frasco Boeco. Luego se llevó a ebullición sin autoclavar y se enfrió. Posteriormente, se distribuyeron 9 ml del medio en los tubos correspondientes utilizando jeringas estériles de 10 ml. Se procedió a refrescar las muestras en la cámara de flujo laminar utilizando un asa de siembra completamente estéril, con el apoyo de una lámpara de alcohol industrial al 97%. Finalmente, se sellaron los tubos con algodón, papel parafilm y papel aluminio, y se rotularon para su posterior incubación a 37°C durante 24 horas.

- **Agar Sulfito-Bismuto**

Se preparó el medio de agar bismuto sulfito conforme a las indicaciones del fabricante. Para 33 muestras, se prepararon 660 ml de agua destilada, a la cual se añadieron 34.52 g del medio en un frasco Boeco. Luego se llevó a ebullición sin autoclavar y se enfrió a una temperatura de 45°C. Se distribuyeron 20 ml del medio en las placas de Petri utilizando una jeringa de 20 ml y se esperó a que se solidificara. Posteriormente, se sembraron las muestras utilizando la técnica de estría en la cámara de flujo laminar, con el apoyo de una lámpara de alcohol industrial al 97%. Finalmente, se sellaron las placas con papel parafilm y se rotularon para su posterior incubación a 37°C durante 24 horas.

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

(Xilosa, Lisina, Desoxicolato) es un medio selectivo diferencial, utilizado para el aislamiento y diferenciación de patógenos entéricos Gram negativos, se realiza el medio siguiendo las instrucciones de fabricante para 33 muestras se preparó 660 ml de agua destilada añadiendo 37,62 g del medio en un frasco boeco hasta dejar hervir sin autoclavar, 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.

Se analizaron un total de 40 muestras obtenidas de cuyes infectados con linfadenitis, hisopados rectales, hisopados de suelo, y tejidos (hígado, bazo, ganglios abscesos y otros órganos con lesiones). De las cuales el 82.5% (33/40) resultaron con un crecimiento de colonias sospechosas a *Salmonella spp.* Siendo.

9.4.2 Pruebas bioquímicas

Resultados de las pruebas microbiológicas

- **Agar Triple Azúcar Hierro**

El TSI es un medio de cultivo que tiene habilidad para fermentar azúcares y generar ciertos productos metabólicos.

El procedimiento consiste en preparar el medio de conformidad con las instrucciones del fabricante, seguido de esterilizar el agua en autoclave a 121 °C durante 15 minutos para esterilizarla. Se distribuyeron 9 ml del medio en tubos esterilizados. Luego, las muestras se apilaron en una cámara de flujo laminar, se sellaron adecuadamente y se rotularon para facilitar la identificación. Finalmente se incubaron durante 24 a 37° C.

La interpretación de los resultados se basa en cambios en el color y la consistencia del medio.

- **Medio de azufre indol para movilidad**

La prueba SIM, se llevó a cabo la preparación del medio siguiendo las indicaciones del fabricante. Para 32 muestras, se prepararon 297 ml de agua destilada, a los cuales se les añadieron 8,91 g del medio en un recipiente de precipitación. Después de llevarlo a ebullición, se procedió a esterilizarlo en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Tras el enfriamiento, se vertieron 9 ml del medio en los respectivos tubos utilizando jeringas estériles de 10 ml. Posteriormente, se sembraron las muestras en la cámara de flujo laminar utilizando un punzón completamente estéril, con el apoyo de una lámpara de alcohol industrial al 97%. Finalmente, se sellaron los tubos con algodón, papel parafilm y papel aluminio, y se rotularon adecuadamente para su posterior incubación a 37°C durante 24 horas.

Interpretación de resultados:

Tras la realización de las pruebas bioquímicas el 100% dieron un resultado positivo en motilidad y SH₂, y un efecto negativo en INDOL debido a que *Salmonella* spp, no produce indol

9.4.3 Crioconservación

Enriquecimiento de las muestras

Tetrationato

Se realizó el medio de Caldo Tetrionato, siguiendo las instrucciones de fabricante, para 33 muestras se preparó 297 ml de agua destilada añadiendo 1,37 g del medio en un frasco boeco hasta dejar hervir sin auto clavar, 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 incubarlo a 37°C por 24h .

Preparación de solución criogénica

Se preparó la solución criogénica, 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 0,5 ul en cada tubo.

Calculo total de Agua

33 muestras * 3 = 99 tubos en total

33x500ul x 3 = 49 500

49 500 / 1000 = 49.5 ml

49,5 / 3 = 16.5 ml

Cálculo de porcentajes

40%: 40% * 16.5ml = 6.6 (Glicerol)

60% * 16.5 = 9.9 ml (Agua)

50%: 50% * 16.5 ml = 8.25 (Glicerol)

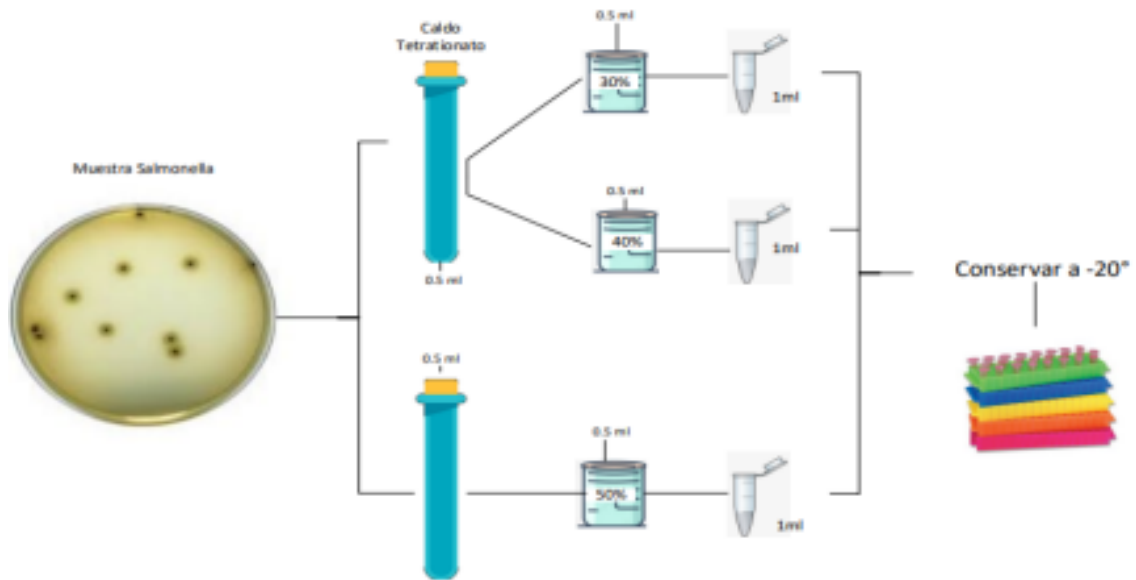
50% * 16.5 ml = 8.25 (Agua)

30%: 30% * 16.5 ml = 4.95 (Glicerol)

70% * 16.5 ml = 11.55 (Agua)

9.4.4 Procedimiento de la crioconservación.

Para la crioconservación, se tomaron 0.5 ml de las muestras de los tubos de Tetrionato. Se colocaron en tubos eppendorf y se agregaron 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°.

Gráfico 1. Procedimiento de crio conservación

9.5 Extracción de DNA

9.5.1 Procedimiento para la extracción de DNA

Siguiendo la instrucción del kit THERMO SCIENTIFIC PARA 100 REACCIONES, las muestras se colocaron en duplicados, alicuotando en dos eppendorf de 1.5 ml y fueron conservadas a -80 °C hasta su posterior análisis, este proceso fue compartido junto con las muestras para tipificación.

9.6 PCR

Se realizó una reacción en cadena de polimerasa utilizando los genes específicos *spiA*, *sipB*, *tolC*, *sitC* y *sopB* con una solución de stock o trabajo a base de la solución madre, estas soluciones fueron estandarizadas en conjunto con el equipo de trabajo en el laboratorio de biotecnología de la Universidad Católica de Cuenca.

Solución madre

- 25 nMol \times 10 = 250 ul de agua ultra pura
- 50 nMol \times 10 = 500 ul de agua ultra pura

Conforme al peso de los genes se multiplica y se agrega el agua ultra pura.

Solución de trabajo

90ul + 10ul = 100 ul solución de stock

- 90ul de agua ultra pura
- 10ul 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 20 μ l para cada muestra. Estos cálculos se estandarizaron tanto para las muestras de virulencia como para las de tipificación.

Calculo estandarizado para los genes de virulencia

- Dream Taq Green PCR Master Mix 10 ul
- Primer Forward 2 ul
- Primer Reverse 2 ul
- Template DNA 1,5 ul
- Agua ultra-pura 4,5 ul

VOLUMEN TOTAL 20 ul

9.6.1 Selección del Perfil de genes de virulencia

Tabla 5: Selección del Perfil de genes de virulencia

Gen	Secuencia	Tamaño (pares de base)
spiA	Forward: CCAGGGGTCGTTAGTGTATTGCGTGAGATG Reverse: CGCGTAACAAAGAACCCGTAGTGATGGATT	550
sipB	Forward: GGACGCCGCCCCGGGAAAAACTCTC Reverse: AACTCCCGTCGCCGCCTTCACAA	875
tolC	Forward: TACCCAGGCGCAAAAAGAGGCTATC Reverse: CCGCGTTATCCAGGTTGTTGC	161
sitC	Forward: CAGTATATGCTCAACGCGATGTGGGTCTCC Reverse: CGGGGCGAAAATAAAGGCTGTGATGAAC	768
sopB	Forward: CGGACCGGCCAGCAACAAAACAAGAAGAAG Reverse: TAGTGATGCCCGTTATGCGTGAGTGTATT	220

Fuente: Duran C, 2019

9.7 Condiciones de la PCR

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador (Bio-Rad). Las temperaturas de amplificación consistieron en una etapa inicial de desnaturalización a 95 °C por 5 minutos; seguidos por 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, hibridación a 66.5 °C por 30 segundos, y elongación a 72°C por 1 minuto; y una elongación final a 72°C por 10 minutos.

9.8 Electroforesis y visualización de las bandas

Los productos obtenidos por PCR fueron separados mediante electroforesis, en un gel de agarosa al 2% en la cámara de electroforesis horizontal, con buffer TBE 0.5X a 100 Voltio por 1 hora. Para visualizar las bandas de ADN, se utilizará sybrsafe como revelador, en un transiluminador de luz ultravioleta. El tamaño de las bandas será determinado mediante marcador de peso molecular de 100 pb (DNA Gel Loading Dye, Fermentas)

En el primer pocillo colocamos el marcador del peso molecular, en el segundo el control positivo que usamos fue *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028, en el tercer para el control negativo *E. Coli* a partir del cuarto pocillo se colocó las muestras para su respectivo análisis en la máquina de electroforesis (ENDURO™ GDS TOUCH).

10. ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS

10.1 Resultados

Resultados de la detección de los genes de virulencia

Se realizaron el análisis de 24 muestras y se determinó la presencia de los genes de virulencia de *Salmonella spp*, los genes utilizados fueron *spiA*, *sipB*, *tolC*, *sitC* y *sopB*, donde los resultados evidenciaron casi en su totalidad la presencia de los 5 genes con un rango de 99.2% amplificando los pares de bases correspondientes.

En los geles de agarosa se observan los fragmentos mediante la PCR amplificando los pares de bases correspondiente. En el pocillo 1 el marcador de peso molecular de 100 pb (DNA Gel Loading Dye, Fermentas). En el pocillo 2 se colocó el control positivo *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028, en el pocillo 3 como control negativo *E. coli*. A partir del pocillo 4 se ubicaron las muestras 1-13 del DNA de *Salmonella spp*. En el segundo gel de cada gen a partir del pocillo 4 se ubicaron las muestras 14-24 del DNA de *Salmonella spp*.

GEN DE VIRULENCIA *spiA*

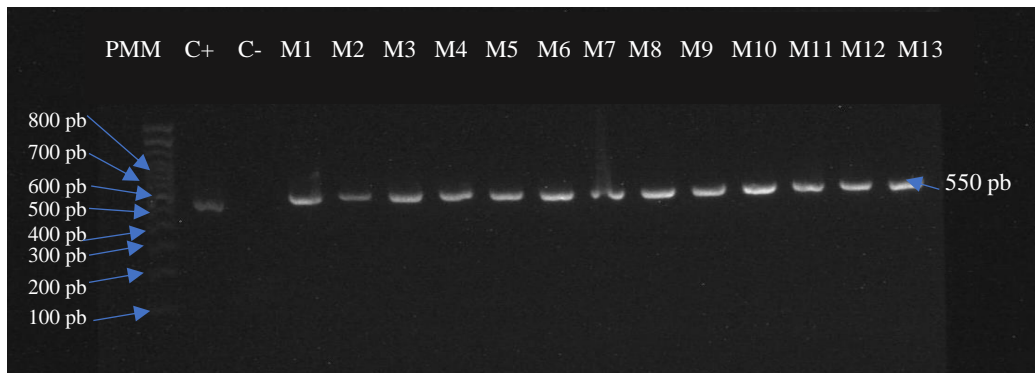


Figura 1. Gel de electroforesis de agarosa al 2 % del gen *spiA*

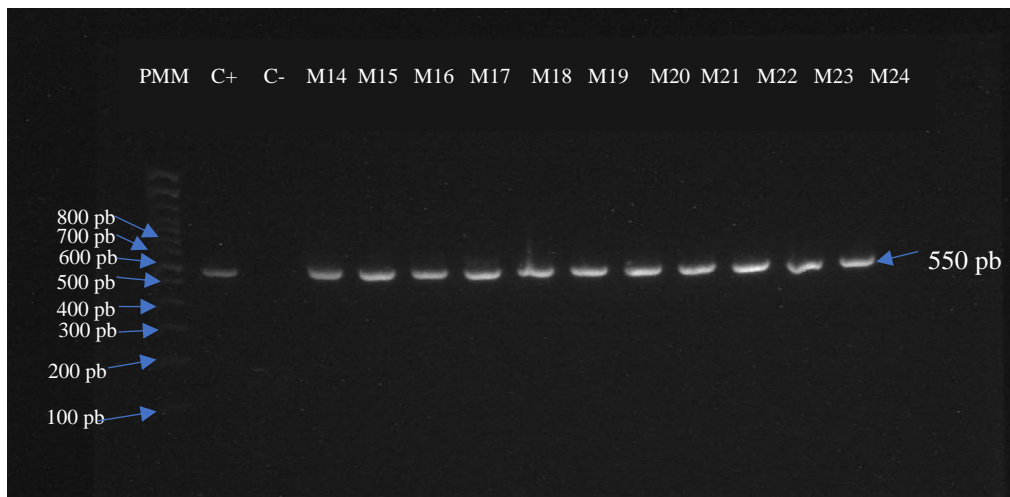


Figura 2. Gel de electroforesis de agarosa al 2 % del gen *spiA*,

En la presente investigación, se observó el resultado de la electroforesis para este gen mostró que el 100% de las muestras de *Salmonella spp.* amplificaron para el gen de virulencia *spiA*, con un peso molecular 550pb, así como reporta en investigaciones pasadas. Según Tora-Seral et al (2016) menciona que este gen siempre está presente y es uno de los principales factores de virulencia en el sistema de secreción III (T3SS) requerido para el transporte de moléculas secretoras de proteínas que inhiben la fusión del complejo fagosoma y limosa el cual actúa

como una jeringa molecular para inyectar proteínas efectoras directamente a la célula del huésped.

GEN DE VIRULENCIA sipB

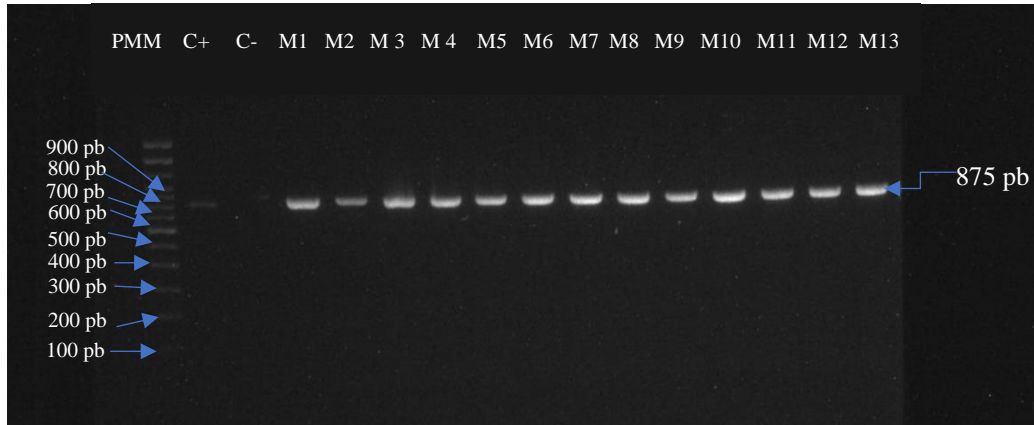


Figura 3. Gel de electroforesis de agarosa al 2 % del gen sipB

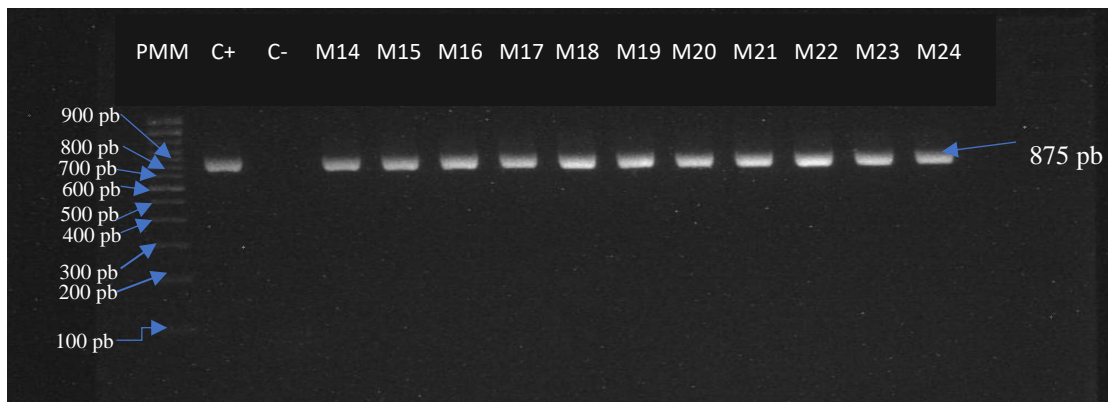


Figura 4. Gel de electroforesis de agarosa al 2 % del gen sipB

En la presente investigación se pudo observar como resultado de la electroforesis en el gen mostró que el 100% de las muestras de *Salmonella spp.* amplificaron para el gen de virulencia sipB, con un peso molecular 875pb. En un estudio realizado en Perú por Duran (2021) el cual menciona que el gen de virulencia sipB amplifico a un 90% en cuyes sano cuyo dato no coincide con los resultados obtenido en este estudio, ya que dicho comportamiento de la virulencia de la bacteria depende del serovar y del hospedador afectado, ya que este gen se encarga de codificar la proteína de invasión B, la cual es necesaria para transferir proteínas efectoras de la célula.

GEN DE VIRULENCIA tolC

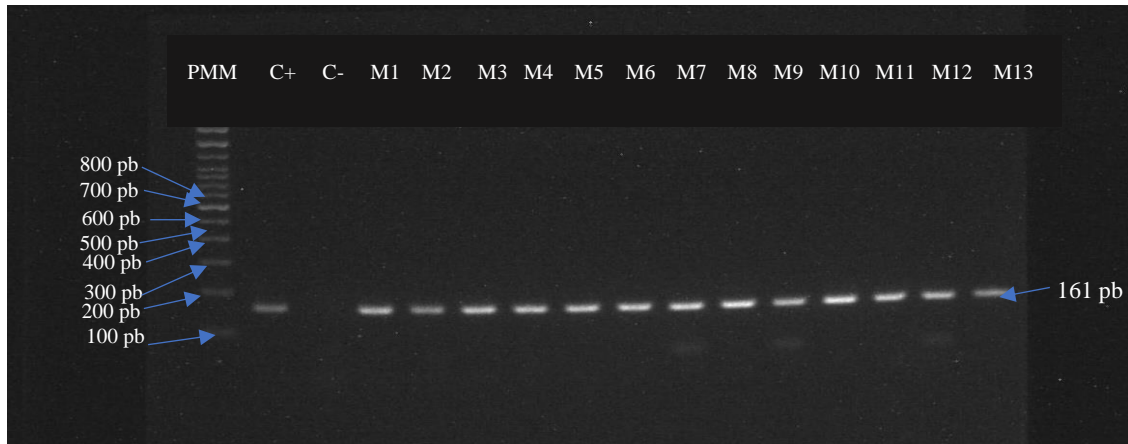


Figura 5. Gel de electroforesis de agarosa al 2 % del gen *tolC*

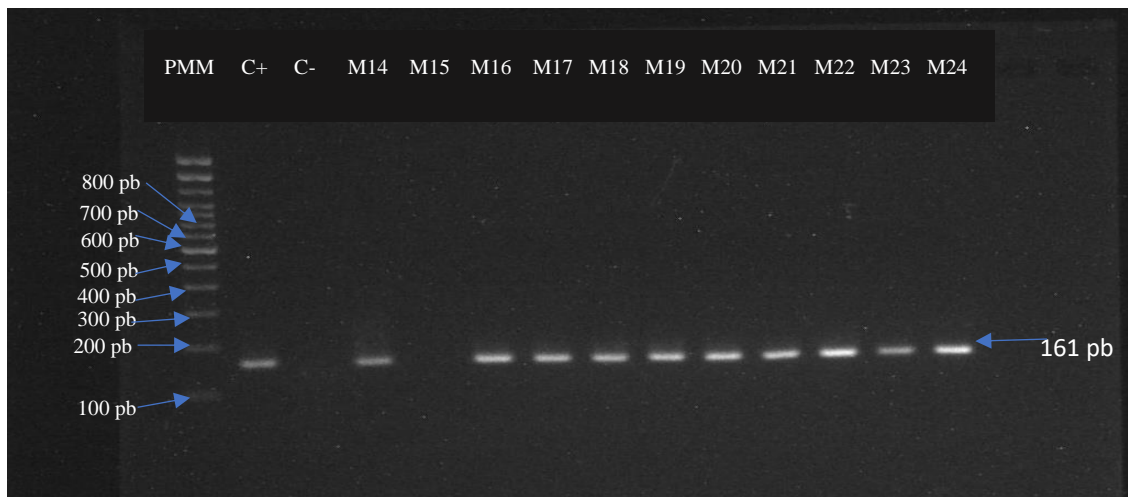


Figura 6. Gel de electroforesis de agarosa al 2 % del gen *tolC*

En un estudio realizado en Perú de acuerdo a los resultados descritos por Duran (2021) el cual menciona que el gen de virulencia *tolC* en cuyes sanos amplificó al 100% el cual no coincide con este estudio, los resultados de electroforesis en este gel demostraron que el 95% amplificaron con una marcación de 161 pares de base en *salmonella spp*, en el pocillo 5; la muestra M15 dio negativo la muestra no amplificó para los pares de base de *Salmonella spp*. Estos resultados también son comparados con Skyberg (2006) quien realizó un estudio en aves sanas y enfermas lo cual encontró una prevalencia del 100% en el gel *tolC* resultado que tampoco coincide con esta investigación.

GEN DE VIRULENCIA *sitC*

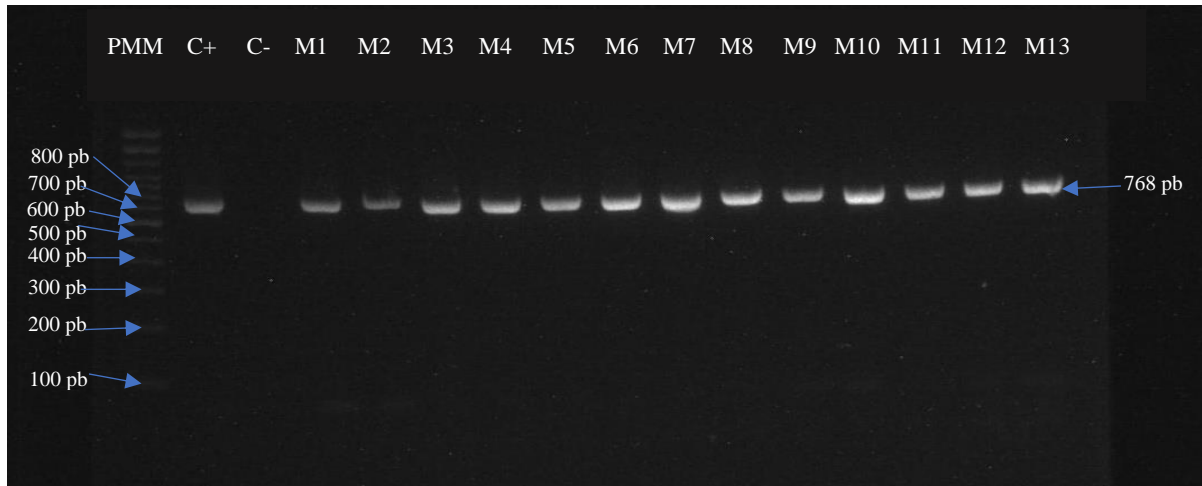


Figura 7 Gel de electroforesis de agarosa al 2 % del gen sitC

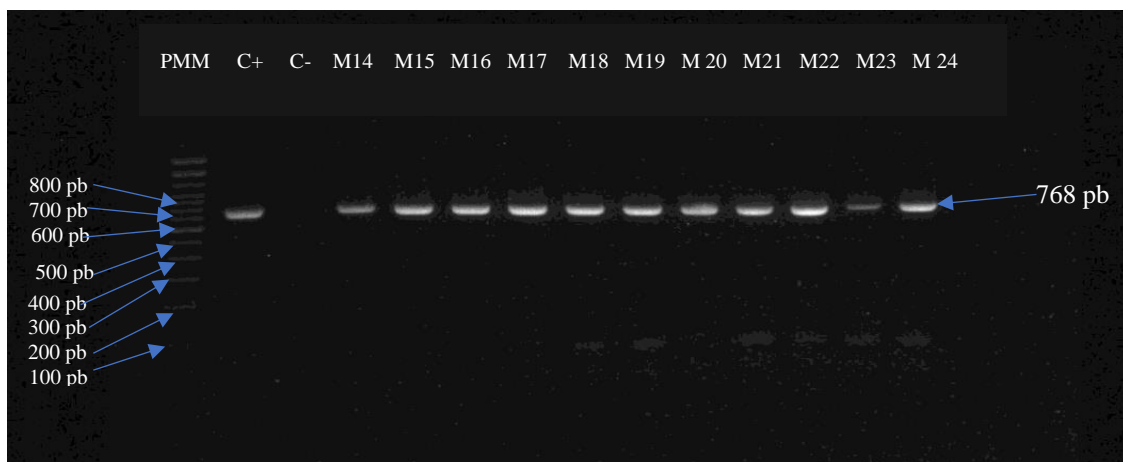


Figura 8. Gel de electroforesis de agarosa al 2 % del gen sitC

Los resultados de los estudios realizados por Skyberg (2006) han reportado que encontró una prevalencia del 100% del gen sitC en aves sanas y enfermas lo que coincide con este estudio las muestras de *Salmonella spp.* amplificaron para el gen de virulencia sitC, con un peso molecular 768 pares de base, según Cordis (2017) este gen es el encargado de transportar el hierro que interviene en el movimiento transmembrana del mismo.

GEN DE VIRULENCIA SopB

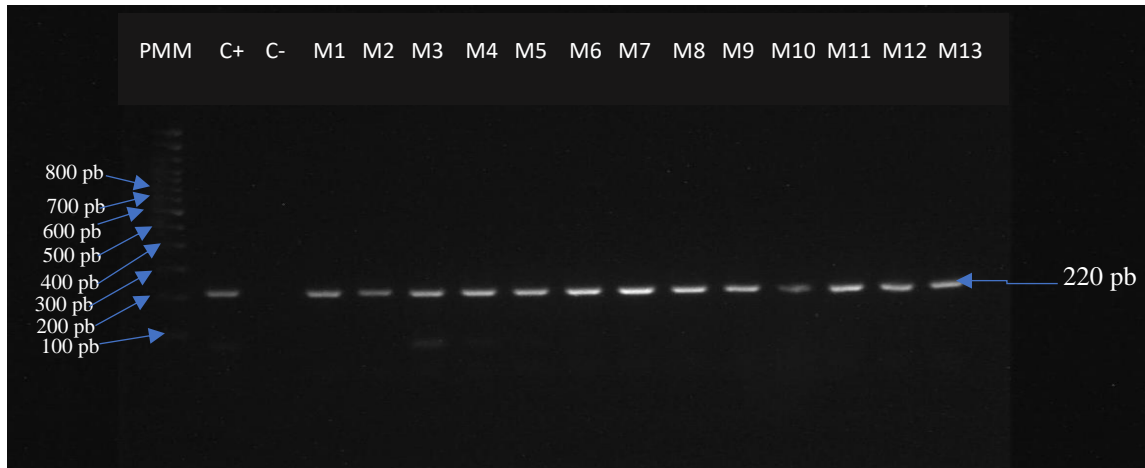


Figura 9: Gel de electroforesis de agarosa al 2 % del gen *sopB*

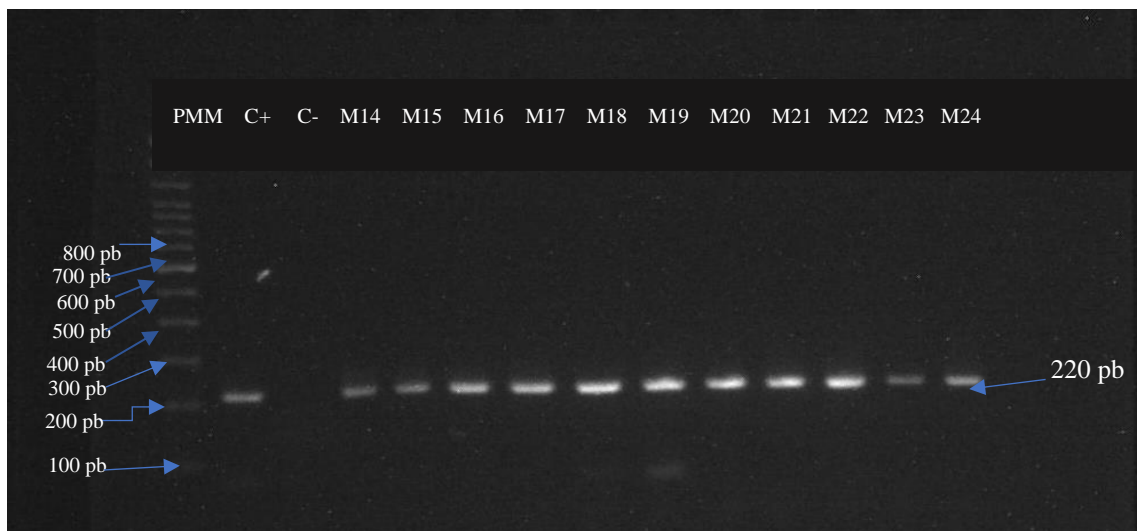


Figura 10. Gel de electroforesis de agarosa al 2 % del gen *sopB*

El resultado de este gel de la electroforesis mostró que el 100% de las muestras de *Salmonella spp.* amplificaron para el gen de virulencia *sopB*, con un peso molecular 220pb, según en una investigación realizada por Skyberg (2006) en aves sanas y enfermas reporto la presencia del gen *sopB* en aves sanas 98.75% y en aves enferma el 100% datos que coincide con los resultados obtenidos en esta investigación, este gen es el encargado de expresar la proteína efectora, mantiene las concentraciones de vacuola que contiene la *salmonella*.

Según Cordis (2017), menciona que estos genes permiten a la *Salmonella* adaptarse y prosperar en diferentes entornos dentro del huésped, siendo esenciales para su capacidad de causar enfermedad y se incluyen en una variedad de mecanismos que permiten a invadir, sobrevivir y proliferar dentro del huésped.

11. IMPACTO TECNICO

El impacto técnico de esta investigación es multifacético, abarcando avances en la detección molecular, mejoras en la sanidad animal, optimización de la producción y un fortalecimiento de la salud pública. La adopción y difusión de estos conocimientos y técnicas pueden transformar significativamente la gestión de la salmonelosis en cuyes, con beneficios notorios para los productores, la comunidad científica y la sociedad en general.

La identificación de genes de virulencia permite un diagnóstico más preciso de las infecciones por *Salmonella spp.* en cuyes. Esto es crucial para el desarrollo de estrategias de control y manejo de la enfermedad, mejorando la salud de los animales y reduciendo la mortalidad y morbilidad en las granjas

El conocimiento detallado de los genes de virulencia puede orientar la investigación y desarrollo de vacunas específicas y tratamientos antimicrobianos más efectivos. Al conocer los factores de virulencia más prevalentes, es posible diseñar intervenciones que neutralicen estos componentes y prevengan infecciones severas.

La información generada por este estudio puede ser utilizada para diseñar planes de bioseguridad específicos para granjas de cuyes. Esto incluye la implementación de medidas preventivas basadas en el control de la diseminación de cepas virulentas de *Salmonella spp.*, mejorando así la calidad y seguridad de la producción animal. Al reducir la incidencia de salmonelosis mediante diagnósticos y tratamientos más eficaces, los productores pueden optimizar sus recursos. Esto incluye la reducción de pérdidas económicas asociadas a la mortalidad de los animales y los costos de tratamiento, así como la mejora de la productividad general de las granjas.

La identificación y control de *Salmonella spp.* en cuyes tiene un impacto directo en la seguridad alimentaria. Al garantizar que los productos derivados de cuyes estén libres de esta bacteria, se protege la salud de los consumidores y se previenen brotes de enfermedades transmitidas por alimentos.

12. CONCLUSIONES

- En este estudio se detectó la presencia de genes de virulencia en aislados de *salmonella spp.* Con la ayuda de pruebas microbiológicas y moleculares las cuales revelaron la presencia significativa de los genes de virulencia como son *spiA*, *sipB*, *tolC*, *sitC* y *sopB* en las muestras analizadas con una amplificación positiva de *salmonella* lo cual tienen un potencial virulento considerable, la producción de cuyes enfrenta desafíos importantes debido a la salmonelosis, una enfermedad infecciosa que causa altas tasas de mortalidad y pérdidas económicas para los productores.
- La aplicación de la PCR es una técnica eficaz para la identificación a la *salmonella spp.*, y la electroforesis en agarosa al 2% es un método eficaz para la visualización de los genes de virulencia y la amplificación de los pares de base de cada gen, el conocimiento de esta enfermedad permite un diagnóstico más preciso, lo que facilita el desarrollo de estrategias de control y manejo de la enfermedad, mejorando la salud animal y la productividad en las granjas. Además, este conocimiento puede orientar a la creación de vacunas y tratamientos más efectivos, así como la implementación de planes de bioseguridad que beneficien tanto a los productores como a la salud pública, garantizando productos alimenticios más seguros.

13. RECOMENDACIONES

Es fundamental que se realicen más estudios microbiológicos y epidemiológicos en la producción de cuyes, especialmente en las regiones con alta demanda de consumo, la identificación y caracterización de los genes de virulencia en *Salmonella spp.*, como lo realizado en esta investigación los cuales son cruciales para el desarrollo de estrategias efectivas del control y prevención de enfermedades como la salmonelosis. Estas acciones no solo mejorarán la salud animal, sino que también la seguridad alimentaria, también fortalecerán la sostenibilidad económica de las producciones, asegurando que este recurso siga siendo una fuente vital de nutrición.

14. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS

1. Fao. Producción de cuyes (*cavia porcellus*) en los países andinos [internet]. Fao.org. 2021 [citado el 2 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://www.fao.org/3/v6200t/v6200t05.htm>
2. Reyes-Silva, Aguiar-novillo. Et al, Análisis del manejo, producción y comercialización del cuy (*cavia porcellus* l.) en ecuador [internet]. Dialnet. 2019 [Citado el 2 de mayo de 2023]. Disponible en: [http://file:///d:/hp/downloads/dialnet-analisisdelmanejoproduccionycomercializaciondelcuy-8383725%20\(2\).pdf](http://file:///d:/hp/downloads/dialnet-analisisdelmanejoproduccionycomercializaciondelcuy-8383725%20(2).pdf).
3. Bucarán j. El misionero. Produciendo lo autónomo. Edición #861 - junio del 2021. [internet]. dialnet. 2019 [Citado el 2 de mayo de 2023]. Disponible en: http://archivo.uagraria.edu.ec/web/el_misionero/el-misionero-861.pdf
4. Organización Mundial para la Sanidad Animal (OIE). Gbads - El impacto global de las enfermedades animales [internet]. woah.org. [citado el 2 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://gbads.woah.org/index-es.html>.
5. Producción de cuyes (*cavia porcellus*) [internet]. fao.org. [Citado el 2 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://www.fao.org/3/w6562s/w6562s07.htm>
6. **Bazán V, Bezada S, at.** Rev. investig. vet. Perú vol.30 no.4. **Efecto de la infección subclínica de Salmonella typhimurium sobre los parámetros productivos en la producción de cuyes de engorde (*cavia porcellus*).** Lima oct./dic. 2019. [internet]. [Citado el 2 de mayo de 2023]. disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s1609-91172019000400032
7. OIE. manual terrestre salmonelosis [internet]. woah.org. 2018 [Citado el 2 de mayo de 2023]. disponible en: https://www.woah.org/fileadmin/home/esp/health_standards/tahm/3.09.08_salmonellosis.pdf.
8. Sandoval J, Sosa M, et al. Neumonía causada por salmonella en niño inmunocompetente: reporte de caso. polo del conocimiento [Internet]. 2020 [Citado el 2 de mayo de 2023];5(3):105–19. Disponible en: <https://polodelconocimiento.com/ojs/index.php/es/article/view/1325/html>
9. Lilia Chauca de zaldívar. coordinadora de crianzas familiares instituto nacional de investigación agraria la molina, Perú. antecedentes históricos (*cavia porcellus*. [citado el 2 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://www.fao.org/4/w6562s/w6562s01.htm>
10. Cresci A. *Veterinaria digital*. El cuy. 10/12/2019. [internet]. [citado el 2 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://www.veterinariadigital.com/articulos/el-cuy/>

11. Tapia I. Esquivel D. Caracterización del sistema de producción de cuyes del cantón mocha, ecuador. Rev. investig. vet. Perú vol.33 no.2 lima mar./abr. 2022. epub 01-abr-2022. org.pe. [citado el 2 de mayo de 2023]. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=s160991172022000200005&script=sci_arttext#:~:text=el%20sistema%20de%20crianza%20m%c3%a1s,por%20las%20mujeres%20\(76.6%25\).](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=s160991172022000200005&script=sci_arttext#:~:text=el%20sistema%20de%20crianza%20m%c3%a1s,por%20las%20mujeres%20(76.6%25).)
12. Crianza de cuyes ayuda a reconversión de actividades productivas – ministerio de agricultura y ganadería [internet]. gob.ec. [citado el 2 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://www.agricultura.gob.ec/crianza-de-cuyes-ayuda-a-reconversion-de-actividades-productivas/9>
13. César M, Guerra león r, et al. Manual técnico de crianza en cuyes. Cajamarca, octubre 2009 [citado el 2 de mayo de 2023]. Disponible en: https://www.cedepas.org.pe/sites/default/files/manual_tecnico_de_crianza_de_cuyes.pdf
14. Lilia chauca de zaldívar. coordinadora de crianzas familiares instituto nacional de investigación agraria la molina, Perú. sanidad en cuyes (cavia porcellus. [citado el 2 de mayo de 2023]. Disponible en: https://www.fao.org/4/w6562s/w6562s01.htm#p30_4325
15. Moya A. Prevalencia de salmonelosis en cuyes (cavia porcellus) procedentes de granjas del centro poblado “huancaquito alto” – virú – la libertad. 2019. [citado el 2 de mayo de 2023]. Disponible en: https://repositorio.upao.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12759/5577/rep_med.vete_anghy.moya_prevalencia.salmonelosis.cuyes.cavia.porcellus.procedentes.granjas.centro.poblado.huancaquito.alto.vir%da.la.libertad.pdf;jsessionid=e5a95134c2b479387c371522996c2998?sequence=1
16. Navarro R. Salmonella, biofilms y persistencia. 14/02/2019. [citado el 2 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://www.christeyns.com/eses/539/#:~:text=la%20bacteria%20salmonella%20recibe%20su,de%20cerdos%20infectados%20de%20c%c3%b3lera.>
17. Guaman M. Determinación de género y especie de salmonela en cuyes mestizos en diferentes sistemas de crianza en la comunidad de oñacapa en el cantón Saraguro. cuenca-ecuador 2014. [citado el 2 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/6351/1/ups-ct002914.pdf>

18. Howard Ochman. *Salmonella bongori* proporciona información sobre la evolución de las salmonelas. agosto del 2011. [citado el 2 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc3158058/>
19. Rodríguez M. Instituto de salud pública de Chile. vol. 9, no.13, diciembre 2019. [internet]. edu.ar. [consultado el 14 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://www.ispch.cl/sites/default/files/bolet%c3%adnsalmonella-12052020a.pdf>
20. Trabajo práctico n o 3 [internet]. edu.ar. [consultado el 14 de febrero de 2024]. Disponible en: https://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/183670/mod_resource/content/1/2019%20tp3%20farmacia.pdf
21. Miguel P, Durango J. et al. [internet]. microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por salmonella. [consultado el 14 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/693/69370201.pdf>
22. Saúl Quirós. Revista clínica de la escuela de medicina ucr – hsjd. infecciones por bacterias del género salmonella. [consultado el 14 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revcliescmed/ucr-2016/ucr164e.pdf>
23. Jorge R. Zapata. Salmonelosis. [consultado el 14 de febrero de 2024]. Disponible en: https://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/161039/documento_completo.pdf-pdfa.pdf?sequence=1&isallowed=y
24. Pérez M. Salmonelosis: epidemiología, prevención y patogenia. diciembre del 2022. [consultado el 14 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://revistamedica.com/salmonelosis-epidemiologia-prevencion-patogenia/>
25. Américo L, Perales R. *Scielo*. rev. investig. vet Perú v.22 n.4 lima, diciembre del 2011. lesiones anatomopatológicas en cuyes (*cavia porcellus*) con diagnóstico bacteriológico de *salmonella spp*. [consultado el 14 de febrero de 2024]. Disponible en: <file:///c:/users/hp/downloads/admojs,+14513-50206-1-ce.pdf>
26. Sánchez M. Cardona C. Mecanismos de interacción de salmonella con la mucosa intestinal. [consultado el 14 de febrero de 2024]. Disponible en: <file:///c:/users/hp/downloads/biteca,+mecanismos+de+interaccion+de+salmonella+con+la+mucosa+intest.pdf>
27. Ruiz M. Ramallo G. et al. Diferentes métodos para aislamiento y detección de *salmonella spp*. en canales porcinos. Rev colomb. biotecnol vol.20 no.2 Bogotá 2018. [consultado el

- 14 de febrero de 2024]. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0123-34752018000200117
28. 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>
29. 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>
30. Iscii.es. [citado el 13 de febrero del 2024]. Disponible en: <https://www.iscii.es/quehacemos/servicios/vigilanciasaludpublicarenavenave/enfermedadestransmisibles/documents/protocolos/protocolo%20de%20vigilancia%20de%20salmonelosis.pdf>
31. Lilia chauca. Manual de bioseguridad y sanidad en cuyes. instituto nacional de innovación agraria-inia, lima1-perú. [citado el 13 de febrero del 2024]. Disponible en: [https://repositorio.inia.gob.pe/bitstream/20.500.12955/936/1/huam%20c3%20a1n-manual de bioseguridad y sanidad en cuyes.pdf](https://repositorio.inia.gob.pe/bitstream/20.500.12955/936/1/huam%20c3%20a1n-manual%20de%20bioseguridad%20y%20sanidad%20en%20cuyes.pdf)
32. Edu.ec. [consultado el 14 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/5599/1/11928.pdf>
33. Suárez M. Susceptibilidad antimicrobiana in vitro de cepas de salmonella spp. en granjas de ponedoras comerciales del departamento de Antioquia. [internet]. org.co. [citado el 13 de febrero del 2024]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rccp/v19n3/v19n3a06.pdf>
34. Herrera B. *redvet rev. electrón. vet.* salmonelosis, zoonosis de las aves y una patogenia muy particular. [internet]. 2015 volumen 16 n.º 01. [consultado el 14 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/636/63638739002.pdf>
35. Solmegas. medios de cultivo [internet]. solmeglas.com. [consultado el 14 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://solmeglas.com/medios-de-cultivo-que-son-funcionalidades-calidad/>
36. 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>

37. Microgenolabg&m. Caldo selenito. [citado el 10 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://www.microgenltda.com.co/microbiologia/caldos-preparados/caldo-selenito/#:~:text=el%20caldo%20selenito%20es%20un,glutamato%20s%c3%b3dico%2c%20sal%20y%20agar.>
38. Britanialab.com. Verde brillante bilis 2% caldo. [citado el 10 de febrero de 2024]. Disponible en: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6054e8cd82576.pdf
39. Britanialab.com. Rappaport vassiliadis Caldo. [citado el 10 de febrero de 2024]. Disponible en: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_60707dddb4f87.pdf
40. Previsto u. bd cled Agar / Macconkey ii agar (biplate) [internet]. www.bd.com. [consultado el 14 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://www.bd.com/resource.aspx?id31333>
41. Britanialab.com. mac conkey agar. [citado el 10 de febrero de 2024]. disponible en: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_60707267ecda2.pdf
42. Britanialab.com. e.m.b. agar (con eosina y azul de metileno). [citado el 2 de mayo de 2023]. Disponible en: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6054e713a290e.pdf
43. Iritanialab.com. hektoen entérico agar. [citado el 10 de febrero de 2024]. Disponible en: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6054e9a137b18.pdf
44. Insumolab. agar xld (xilosa-lisina-desoxicolato). [citado el 10 de febrero de 2024]. Disponible en: https://www.insumolab.cl/descargas/educacion/placas_90mm/ficha_tecnica/02.pdf
45. Yaltek sa. agar xilosa - lisina - desoxicolato (agar xld) [internet]. valtek.cl. 2021 [consultado el 14 de febrero del 2024]. Disponible en: <https://www.valtek.cl/wp-content/uploads/2020/02/agar-xld-valtek-version-3.pdf>
46. 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
47. Britanialab.com. Salmonella shigella agar. [citado el 10 de febrero de 2024]. Disponible en: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6070900c78db3.pdf
48. Wilson-blair. agar bismuto - sulfito. [citado el 10 de febrero de 2024]. Disponible en: <file:///c:/users/hp/downloads/105418-bismuthsulfitagar-span-jan-2009-mk.pdf>
49. Laboratorio m. agar sulfito y bismuto [internet]. mcd. [citado el 10 de febrero de 2024]. Disponible en: <http://file:///c:/users/usuario/downloads/ft%20agar%20sulfito%20de%20bismuto.pdf>

50. Néstor Oscar Stanchi. Inter-medical. microbiología veterinaria. argentina 20 de abril del 2010. capitulo 26. [citado el 10 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://es.studenta.com/content/133437989/microbiologia-veterinaria-xxi-2010-bueno>
51. Bitanialab.com. indol reactivo. [citado el 10 de febrero de 2024]. Disponible en: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_612fb4e643dbf.pdf
52. Linda j. vorvick, md. tinción de gram. [citado el 10 de febrero de 2024]. Disponible en: https://medlineplus.gov/spanish/ency/esp_imagepages/19955.htm
53. Microbiología (tercera edición) e. etest [internet]. sciencedirect.com. [consultado el 18 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/etest>
54. Pdf hue. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/tesis/40435.pdf> [internet]. unirioja.es. 2013 [citado el 7 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/tesis/40435.pdf>
55. Kapital. Antibiogramas. Pruebas de sensibilidad microorganismos [internet]. 2023. [citado el 12 de enero de 2023]; Disponible en: <https://www.kapitalinteligente.es/antibiogramas-pruebas-de-sensibilidadmicroorganismos/>
56. Duran González. Luna Espinoza. Et al. Evaluación de factores de virulencia en cepas de salmonella typhimurium aisladas de cuyes (cavia porcellus) enfermos y sanos. rev investig vet Perú [internet]. 2021 [citado el 2 de mayo de 2022] Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s1609-91172021000500021
57. Gonzales c. evaluación de factores de virulencia de cepas de salmonella spp. aisladas de cuyes (cavia porcellus) enfermos y sanos. lima-perú 2019. [citado el 2 de mayo de 2023]. Disponible en: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/10779/duran_gc.pdf?sequence=1&isallowed=y
58. Andreas Baumler. Renee Solis. Et al. American Society for Microbiology. Synergistic Effect of Mutations in invA and lpfC on the Ability of Salmonella typhimurium To Cause Murine Typhoid. [citado el 16 de agosto de 2024]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC175312/pdf/652254.pdf>
59. Weidong Zhao ,Thomas Moest, et al. Scientific reports (2015). La proteína efectora SifA de *Salmonella* desempeña un doble papel en la virulencia. [citado el 16 de agosto de 2024]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/srep12979>

60. Zerpa González, Aranza. (20221). Virulotipo basado en los genes invA, sopB y sopE de cepas de Salmonella enterica aisladas de alimentos de Michoacán. [citado el 16 de agosto de 2024]. Disponible en: http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB_UMICH/12245
61. Amelia Romero, Alejandra Díaz, et al. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. gob.pe. 2014. [consultado el 14 de febrero de 2024]. Disponible en: [https://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/770dbbbd5adf759505257d4900580fe6/\\$file/herramientasmolecularesaplicadasecolog%c3%ada.pdf](https://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/770dbbbd5adf759505257d4900580fe6/$file/herramientasmolecularesaplicadasecolog%c3%ada.pdf)
62. Thermo scientific tm kit de purificación de adn genómico - extracción y purificación de adn productos bioquímicos y reactivos [internet]. fishersci.es. [consultado el 14 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://www.fishersci.es/shop/products/fermentas-genomic-dna-purification-kit/1057103>
63. Artedimico. qubit 4.0 fluorómetro para cuantificación selectiva de adn, arn y proteínas por fluorescencia - invitrogen - q33226. [consultado el 14 de febrero de 2024]; Disponible en: <https://www.equiposylaboratorio.com/portal/productos/qubit-40-fluorometro-para-cuantificacion-selectiva-de-adn-arn-y-proteinas-por-fluorescencia-invitrogen-q33226>
64. Rojas ac. método: gel de electroforesis agarosa [internet]. conogasi. 2017 [cited 2024 feb 21]. Disponible en: <https://conogasi.org/articulos/metodo-gel-de-electroforesis-agarosa>
65. Electroforesis. [internet]. [Citedo 2024 feb 21]. available from: Disponible en: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/electroforesis>
66. Alvarado m. scielo. caracterización genómica de la capacidad virulenta de una cepa de salmonella typhimurium aislada de cavia porcellus (cuy). lima-perú 2019. [citado el 2 de mayo de 2023]. Disponible en: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/10123/aleman_am.pdf?sequence=3&isallowed=y
67. Bioser. ensayo de detección molecular de salmonella spp (mds). [citado el 7 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://www.bioser.com/productos/ensayo-de-deteccin-molecular-de-salmonella-spp-de-3m-mds-2434p/>
68. Casart et al. tipificación molecular de salmonella aislada de cuyes. ocho de marzo del 2016. [citado el 2 de mayo de 2023]. Disponible en: <file:///c:/users/hp/downloads/19-texto%20del%20art%c3%adculo-83-2-10-20191010.pdf>
69. Gonzalez J. Pereira S.et al. 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): Disponible en:
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s012055522014000100009&lng=en

70. Yaguapaz Cortez AG. Aislamiento y evaluación de la resistencia a los antimicrobianos en salmonella spp, a partir de hisopados rectales y tejidos de cuyes (cavia porcellus) en criaderos de los cantones Pujilí y Latacunga de la provincia de Cotopaxi [Internet]. Edu.ec. febrero de 2023 [consultado el 8 de febrero del 2024]. Disponible en: <https://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/10612>
71. Rivadeneira J. Identificación de los agentes etiológicos en lesiones y ganglios post mortem en la granja cuy andino de la ciudad de Latacunga. 2023

