



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú, Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

**Evaluación de los niveles de excreción de IgA fecal en
ratones inoculados con tres cepas de *Salmonella*
Typhimurium atenuadas de origen cobayo**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Christian Roberto CHANGANAQUÍ RUEDA

ASESOR

Dr. Abelardo Lenin MATURRANO HERNÁNDEZ

Lima, Perú

2021



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Changanaquí C. Evaluación de los niveles de excreción de IgA fecal en ratones inoculados con tres cepas de Salmonella Typhimurium atenuadas de origen cobayo [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2021.

Hoja de metadatos complementarios

Código ORCID del autor	https://orcid.org/0000-0002-3642-1494
DNI o pasaporte del autor	71576310
Código ORCID del asesor	https://orcid.org/0000-0001-8819-7335
DNI o pasaporte del asesor	15725076
Grupo de investigación	SANIGEN – Biotecnología aplicada a la conservación, sanidad y producción animal.
Agencia financiadora	País: Perú Nombre y siglas de la agencia financiadora: Fondo para la Innovación, la Ciencia y la Tecnología (FINCyT) Nombre del programa financiero: Programa de Innovación para la competitividad y Productividad - INNÓVATE Número de contrato: 362 PNICP-PIAP 2014
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	Lugar: Lima, Lima, Perú. Coordenadas geográficas: Latitud: -12.81, Longitud: -76.98.
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2019 - 2020
Disciplinas OCDE	Ciencia veterinaria http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.03.01



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS EN MODALIDAD VIRTUAL
PARA OPTAR EL TÍTULO DE MEDICO VETERINARIO
Autorizado por R.D N° 304-D-FMV-2020**

1. FECHA DE LA SUSTENTACIÓN 13/01/2021

HORA INICIO: 12:00 horas

HORA TÉRMINO: 13:55pm

2. MIEMBROS DEL JURADO

PRESIDENTE: **MV. Mg. Alberto Gustavo Manchego Sayán**

MIEMBRO: **MV. Mg. Siever Miguel Morales Cauti**

MIEMBRO: **MV. Dr. Luis Ramiro Luna Espinoza**

ASESOR: **Blg. Dr. Abelardo Lenin Maturrano Hernández**

3. DATOS DEL TESISISTA

APELLIDOS Y NOMBRES: **CHANGANAQUÍ RUEDA, CHRISTIAN ROBERTO**

CÓDIGO: 13080003

R.R. DE GRADO DE TESISISTA NÚMERO: **N° 013279-2019-R/UNMSM**

TÍTULO DE LA TESIS: **“EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE EXCRECIÓN DE IgA FECAL EN RATONES INOCULADOS CON TRES CEPAS DE *Salmonella* Typhimurium ATENUADAS DE ORIGEN COBAYO”**

4. RECOMENDACIONES

Datos de la plataforma virtual institucional del acto de sustentación:

<https://meet.google.com/kqp-dxmb-qck>

ID: kqp-dxmb-qck

Grabación archivada en:

https://drive.google.com/file/d/1H_tRtqGmqIPMT5W_1HXCIJ8IYoDuQ/view

5. NOTA OBTENIDA: 17 (en números), diecisiete (en letras)

6. PÚBLICO ASISTENTE: (Nombre, apellido y DNI)

Apellidos y Nombres	DNI	Correo electrónico
Luis Changanaquí La Rosa	15643091	dulcypast@gmail.com
Susana Jackelyn Roldán Murillo	72557781	susana.roldan@unmsm.edu.pe
María Angélica Chang Tokumoto	42915159	08080038@unmsm.edu.pe
Miguel Ampuero Bustillos	06645903	aampuerob@unmsm.edu.pe
Hermelinda Rivera Gerónimo	07969704	hriverag@unmsm.edu.pe
Víctor Hugo Castillo Doloriert	40723051	vcastillod@unmsm.edu.pe
Luis Hoyos Sifuentes	41175479	luis.hoyos@unmsm.edu.pe
Miryam Quevedo Urday	40064320	mquevedou@unmsm.edu.pe
Luis Cerro Temoche	41341572	lcerrot@unmsm.edu.pe
Faride Altamirano Zevallos	43695598	faltamiranoz@unmsm.edu.pe
María Angélica Chang Tokumoto	42915159	08080038@unmsm.edu.pe

7. FIRMAS DE LOS MIEMBROS DEL JURADO

 <p>Firmado digitalmente por MANCHEGO SAYAN Alberto Gustavo FAU 20148092282 soft Motivo: Soy el autor del documento Fecha: 05.02.2021 17:01:33 -05:00</p>
Firma
MV. Mg. Manchego Sayán Alberto Gustavo
Apellidos y Nombres
PRESIDENTE

 <p>Firmado digitalmente por MATURRANO HERNÁNDEZ Abelardo Lenin FAU 20148092282 soft Motivo: Soy el autor del documento Fecha: 04.02.2021 15:35:55 -05:00</p>	 <p>Firmado digitalmente por MORALES CAUTI Siever Miguel FAU 20148092282 soft Motivo: Soy el autor del documento Fecha: 04.02.2021 15:17:35 -05:00</p>	
Firma	Firma	Firma
Blg. Dr. Maturrano Hernández Abelardo Lenin Apellidos y Nombres	MV. Mg. Morales Cauti Siever Miguel Apellidos y Nombres	MV. Mg. Luna Espinoza Luis Ramiro Apellidos y Nombres
ASESOR DE LA TESIS	MIEMBRO JURADO	MIEMBRO JURADO




UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Facultad de Medicina Veterinaria
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA



Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria mediante Resolución Directoral N° 0192-EPMV/FMV-2020.

 **UNMSM** Firmado digitalmente por
 ALBERTO GUSTAVO MANCHEGO SAYÁN
 Atribución: Lenguaje FAL 205-4062230-0-0-01
 Fecha: 04.02.2021 10:00:45 (UTC)

PRESIDENTE:
ALBERTO GUSTAVO MANCHEGO SAYÁN

 **UNMSM** Firmado digitalmente por
 ABELARDO LENIN MATURRANO HERNÁNDEZ
 Atribución: Lenguaje FAL 205-4062230-0-0-01
 Fecha: 04.02.2021 10:00:20 (UTC)

MIEMBROS :
ABELARDO LENIN MATURRANO HERNÁNDEZ
ASESOR DE LA TESIS

 **UNMSM** Firmado digitalmente por MORALES
 SIEVER MIGUEL MORALES CAUTI
 Atribución: Lenguaje FAL 205-4062230-0-0-01
 Fecha: 04.02.2021 10:00:00 (UTC)

.....
SIEVER MIGUEL MORALES CAUTI

.....
LUIS RAMIRO LUNA ESPINOZA

San Borja, 25 de enero del 2021

V° B°

 **UNMSM** Firmado digitalmente por SANTIANI
 ACOSTA Alexei Vicent FAL 205-4062230-0-0-01
 Fecha: 05.02.2021 10:00:50 (UTC)

.....
Dr. Alexei Vicent Santiani Acosta
Director
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

Esta tesis se lo dedico a:

- Julia J. una estrella en el cielo que guía mi camino, el amor de mi vida.
- Juana J., por su apoyo incondicional a lo largo de mi vida, por estar siempre conmigo.
- Roberto Ch., el hombre que más admiro en la vida, mi modelo a seguir.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Lenin Maturrano, por darme la oportunidad y confianza para la elaboración y realización de esta tesis.

A Luis y Dennis por el respaldo absoluto a lo largo de esta etapa.

Al equipo de investigación de UBIGEM, por brindarme su apoyo y colaboración en el desarrollo y ejecución de la tesis.

A Raquel, por su apoyo y consejos.

ÍNDICE

RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	xi
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
1. Producción de cobayos y situación actual en el Perú	4
1.1 Problemas Sanitarios	5
2. Salmonelosis.....	6
2.1 Características generales	6
2.2 Patogénesis	6
2.3 Epidemiología	12
2.4 Prevención y Control.....	13
2.5 Vacunas	14
3. Inmunidad de mucosa intestinal	16
3.1 Inmunidad innata.....	16
3.2 Inmunidad adaptativa	18
4. Inmunoglobulina A (IgA).....	18
4.1 Función.....	19
4.2 Síntesis de IgA.....	19
5. Ratón como modelo biológico	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
1. Lugar de ejecución	21
2. Material Experimental y Metodología	22
2.1 Animales.....	22
2.2 Método de crianza	22
2.3 Monitoreo de los animales.....	22
2.4 Cepas atenuadas	24
2.5 Colección de muestras fecales post inmunización	25
2.6 Evaluación de heces post inmunización	26
3. Diseño experimental	29
4. Análisis estadístico	29
5. Consideraciones éticas	30
RESULTADOS	31
DISCUSIÓN	34

CONCLUSIONES.....	38
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	39

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad inmunogénica de tres cepas atenuadas de *Salmonella* Typhimurium de origen cobayo sobre los niveles de excreción de IgA fecal en ratones. El estudio se realizó con un total de 28 ratones hembra de la cepa BALB/c de cuatro semanas de edad divididos en cuatro grupos (7 ratones por grupo): Grupo 1 (Cepa 1), Grupo 2 (Cepa 2), Grupo 3 (Cepa 3) y Grupo Control (PBS). Inoculando 10^9 UFC/100ul de cepa atenuada vía oral por medio de una sonda orogástrica. La cuantificación de IgA fecal, la cual se llevó a cabo mediante la colección de heces los días 1, 9, 15 y 21, fue realizada mediante ELISA *in house* indirecto. Los resultados arrojaron que el Grupo 1 y el Grupo 2 tuvieron actividad inmunogénica sobre los niveles de excreción de IgA fecal en ratones frente al grupo Control, siendo el Grupo 1 quien mostró una mayor respuesta en todo el ensayo. Este experimento nos suministró de valiosa información respecto a las cepas atenuadas para su evaluación como posibles candidatos vacunales con la finalidad de poder realizar futuros ensayos en el cobayo.

Palabras clave: Vacuna atenuada, *Cavia porcellus*, inmunogenicidad, inmunoglobulina A, Typhimurium (Fuente: MeSH)

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the immunogenic activity of three attenuated strains of *Salmonella* Typhimurium of guinea pigs origin on the levels of fecal IgA excretion in mice. The study was performed with a total of 28 four-week-old female mice of the BALB / c strain divided into four groups (7 mice per group): Group 1 (Strain 1), Group 2 (Strain 2), Group 3 (Strain 3) and Group (PBS). The quantification of fecal IgA, which was carried out through the collection of feces on days 1, 9, 15 and 21, was performed by indirect *in-house* ELISA. The results showed that Group 1 and Group 2 had immunogenic activity on the levels of excretion of fecal IgA in mice compared to the Control Group, with Group 1 showing a greater response throughout the trial. This experiment provided us with valuable information regarding the attenuated strains for their evaluation as possible vaccine candidates in order to be able to carry out future tests in the guinea pig.

Key words: Attenuated vaccine, *Cavia porcellus*, immunogenicity, immunoglobulin A, Typhimurium (Fuente: MeSH).

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

- Cuadro 1:** Grupos experimentales. Pág. 29
- Cuadro 2:** Media de la D.O por Días y por Grupos y sus Errores Estándares correspondientes. Pág. 32
- Figura 1:** Resultados del ELISA para los niveles de IgA (DO₆₅₀). Pág. 33

INTRODUCCIÓN

El cobayo (*Cavia porcellus*) es un mamífero roedor originario de la zona andina de América del Sur y que en la actualidad cuenta con una población de 17,4 millones aproximadamente según Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI) (2018). El cobayo, debido a su elevado valor nutritivo, contribuye a la seguridad alimentaria de la población rural de escasos recursos (Chauca, 1997; INEI, 2012) pero que en la actualidad también se enfoca en una crianza comercial para abastecer la demanda nacional e internacional de carne, siendo el Perú uno de los principales exportadores de carne de cobayo en Sudamérica.

A pesar del crecimiento continuo de esta actividad pecuaria se ha visto afectada por problemas sanitarios causados por distintas enfermedades infecciosas en donde la

salmonelosis es la de mayor importancia por su alta mortalidad (mayor al 90%) y morbilidad (mayor al 50%) lo que conlleva a fuertes pérdidas económicas. Investigaciones realizadas mencionan que es el serovar Typhimurium el reportado con mayor frecuencia (Zuñiga, 2001; Morales, 2017).

En el aspecto sanitario, el uso de vacunas puede ser importante para prevenir la salmonelosis en cobayos. El uso de cepas atenuadas como candidatos vacunales son convenientes porque simulan una infección sin ocasionar sintomatología clínica, pero suficiente para estimular una respuesta inmune (Chatfield *et al.*, 1989; Simon *et al.*, 2012).

La respuesta inmune de mucosas juega un rol importante frente a los patógenos intestinales, siendo la inmunoglobulina A (IgA) la más abundante en tejidos de la mucosa y responsable de dicha respuesta, siendo reconocida como la primera línea de defensa (He *et al.*, 2007; Brandtzaeg, 2010; Boyaka, 2017).

Simon *et al.*, (2011) señaló que el uso de modelos murinos en ensayos de vacunación con cepas atenuadas es valioso porque permite acelerar el proceso de desarrollo de dichas vacunas. En la misma línea Zhang *et al.*, 1997; Harrison *et al.*, 1997; Heithoff *et al.*, 1999; Curtis *et al.*, 2009 demostraron que ratones susceptibles inmunizados por vía oral con *Salmonella* Typhimurium atenuadas mostraron un alto nivel de protección cuando el ratón fue desafiado subsecuentemente con una cepa patógena de *S. Typhimurium*.

Actualmente, en el Perú no se dispone de información respecto a una vacuna comercial efectiva para la prevención de la salmonelosis en cobayos, por lo que su desarrollo, publicación y comercialización es de imperiosa necesidad. Para ello realizar evaluaciones previas de los candidatos vacunales en animales de experimentación es de suma importancia. Es por tal motivo que tenemos como objetivo evaluar la actividad inmunogénica de tres cepas atenuadas de *Salmonella* Typhimurium sobre los niveles de excreción de IgA fecal en ratones.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Producción de cobayos y situación actual en el Perú

El cobayo es un mamífero roedor nativo de la zona andina de algunos países como Perú, Ecuador, Colombia y Bolivia. Compone un alimento de alto valor nutritivo, y económico en su crianza, que aporta a la alimentación de la población rural de escasos recursos (Chauca, 1997).

En el Perú se localiza la mayor población de cobayos, contando con un aproximado de 12 millones, según el censo nacional agropecuario del 2012, no obstante información publicada por el INEI (2018) indica que se cuenta con más de 17,4 millones de cobayos, esto se debe a su capacidad de adecuación (Chauca, 1997; INEI, 2012) y al potencial

mercado internacional para la carne de cobayo que viene mostrando un crecimiento anual 3,9 en volumen, siendo en la actualidad uno de los mayores exportadores de la carne de cuy en Sudamérica, con una producción anual de 21103 toneladas de carne de cobayo según el Ministerio de Agricultura y Riego del Perú (Minagri) (2019).

1.1 Problemas Sanitarios

El desarrollo de la crianza de los cobayos está limitado por la mortalidad, como consecuencia de la falta de alternativas eficaces en el área de salud animal para prevenir y controlar distintas enfermedades (Chauca, 1997). El cobayo está sometido a distintas condiciones ambientales y es vulnerable frente a distintos agentes patógenos que desencadenan en problemas de salud y cuya repercusión en su productividad es de gran importancia (INIA, 2019). En la misma línea, Morales (2013) menciona que el aumento de la crianza intensiva con base en animales mejorados trajo consigo un incremento en la susceptibilidad del animal frente a factores ambientales, capacidad de adaptación y resistencia a agentes patógenos. El cobayo, como todo animal, puede enfermarse a causa de patógenos bacterianos, virales y parasitarios presentes y que desencadenan el cuadro clínico tras periodos de estrés (INIA, 2019). Cabe destacar que dentro de enfermedades que pueden perjudicar el performance productivo de los cobayos destacan las enfermedades como colibacilosis, neumonías, bronconeumonías, linfadenitis, entre otras. Pero es la salmonelosis una de las enfermedades principales, generando un problema sanitario que causa grandes pérdidas económicas (Morales, 2013). En consecuencia, Morales *et al.* (2007) afirmaron que las pérdidas económicas causadas por esta enfermedad llegan al 53% por morbilidad y al 95% por la mortalidad.

2. Salmonelosis

2.1 Características generales

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, siendo el tracto intestinal de hombres y animales su hábitat principal. Dada la gran capacidad de adaptación, los integrantes de este género logran infectar un extenso rango de hospederos (García, 2011). Son bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos, de 0.7 a 1.5 x 2 a 5 µm de tamaño, no formadores de esporas, generalmente móviles por flagelos peritricos (Calvete, 2015). Más de 2500 serotipos se han descrito, siendo Typhimurium y Enteritidis los aislados frecuentemente en humanos y animales, lo cual repercute en su importancia para la salud pública (Prescott, 2008; Murray, 2009).

2.2 Patogénesis

2.2.1 Biología celular de la invasión de *Salmonella*

Salmonella Typhimurium es un notable patógeno que causa diferentes enfermedades que van desde gastroenteritis hasta una enfermedad sistémica, capaz de infectar a diversos hospederos, incluyendo al humano (Uzzau *et al.*, 2000). La destreza de invadir células epiteliales pertenece a los mecanismos más llamativos en el desarrollo de la patogénesis, en especial las células M de las placas de Peyer en el epitelio intestinal (Jones, 1994). No obstante, Santos *et al.*, (2002) comprobaron que *Salmonella* es capaz de invadir enterocitos e incluso células caliciformes. Curiosamente, Tahoun *et al.* (2012) evidenciaron que *Salmonella* no sólo es capaz de atacar a las células M para su posterior

invasión, sino también de promover rápidamente la diferenciación de enterocitos a células M, lo que indica una mejora en la capacidad de invasión y colonización del agente patógeno, para ello Tahoun *et al.* (2012) explicó que la proteína efectora bacteriana SopB interviene en la llamada “transición epitelial-mesenquimal” que está asociada con una pérdida gradual de marcadores epiteliales y una obtención de marcadores de células M, siendo SopB necesario y suficiente para provocar la diferenciación de células M debido a que activa la vía de señalización Wnt/ β -catenina que induce al sistema RANKL(ligando del receptor activador para el factor nuclear κ B)/RANK, y esto desencadena la activación autocrina del factor de transcripción Slug que juega un papel importante en la regulación de la transición epitelio-mesenquimal y que al final marca la transdiferenciación en células M.

Santos *et al.*, (2015) sugiere que *Salmonella* está altamente adaptada a la invasión de la célula huésped debido a los datos publicados por Reis *et al.*, (2003) en el que se evidenció que el tiempo necesario para que *Salmonella* invada y alcance el ambiente intracelular de las células epiteliales es de unos pocos minutos. Lo que significa que el sistema funcional de secreción tipo III (T3SS) codificado por la isla de patogenicidad (SPI) 2 (T3SS-2) de *Salmonella* no tifoidea es necesario para dar ese rápido paso a través de la capa epitelial, cuyo mecanismo de salida a través de las membranas celulares basales permanece desconocido, pero recientes estudios han evidenciado que para la invasión de éste patógeno a las células epiteliales se requiere un sistema funcional de secreción tipo III (T3SS) codificado por la isla de patogenicidad (SPI)-1 (T3SS-1) cuya expresión está regulada por señales ambientales (osmolaridad, pH, concentración de oxígeno, bilis, concentración de magnesio y ácidos grasos de cadena corta) (Bajaj *et al.*, 1996; Müller *et al.*, 2012). Además, la inducción de la expresión de T3SS-1 en el lumen intestinal que

beneficia a la manifestación de un fenotipo invasivo en este periodo de la infección es producido por un equilibrio entre las señales ambientales. Los sistemas reguladores de dos componentes como BarA/SirA detectan estas señales ambientales y activan el regulador transcripcional de SPI-1 HilA, así como otros reguladores, lo que lleva a la SPI-1 a una regulación ascendente (Altier, 2005). Santos *et al.*, (2015) afirma que el Íleon es probablemente un espacio preferible por *Salmonella* para invasión, diseminación y colonización, debido a que Altier (2005) publicó que hay un mayor tropismo tisular de *Salmonella* no tifoidea en dicho segmento intestinal porque no posee abundantes ácidos grasos biliares y de cadena corta, que actúan como supresores ambientales de la expresión de SPI-1, en comparación con el duodeno.

La transcitosis es un conjunto de procesos realizados por las células M que ayuda al progreso de la respuesta inmune mucosal, pero también los deja altamente susceptibles al ataque de diversos patógenos entéricos. *Salmonella* usa a las células M como puertas de ingreso a través del epitelio intestinal; este libre acceso a la adherencia e internalización de *Salmonella* se da gracias a que las células M carece de glicocálix y borde en cepillo en la superficie (Jepson, 1998). Dicho con palabras de Lahiri *et al.*, (2010) las células M son una vía de ingreso a las células dendríticas y macrófagos para el establecimiento de una infección intracelular y una diseminación sistémica de parte de *Salmonella*.

Citando a Lahiri *et al.*, (2010) la adhesión de *Salmonella* a las células M, provoca significativos cambios físicos en la célula, siendo la invasión de *Salmonella* un estímulo que genera, en la superficie apical de las células M, una reorganización del citoesqueleto que trae por consecuencia la internalización bacteriana y la citotoxicidad de las células al no recuperar su citoarquitectura inicial. Luego de la internalización se da el transporte de la bacteria hacia las células linfocíticas subyacentes. Como consecuencia de ello Jones *et*

al., (1994) afirma que tras la destrucción de las células M hay una ruptura de la arquitectura del epitelio asociado al folículo (FAE) que permite una infección a los enterocitos contiguos por parte de *Salmonella*.

2.2.2 Supervivencia intracelular y diseminación tisular

Posterior a la invasión de las células del epitelio intestinal Santos *et al.*, (2002) afirma que *Salmonella* se establece dentro de una vacuola unida a la membrana hasta alcanzar la lámina propia. Posteriormente a la internalización de *Salmonella* en la vacuola, la bacteria padece un considerable cambio en su perfil de expresión genética. En el ambiente intracelular, los genes SPI-1 están reprimidos, mientras que hay un aumento de SPI-2 (Altier, 2005). Teniendo al sistema regulador de dos componentes PhoP/PhoQ como uno de los mecanismos reguladores más importantes debido a que detecta los cambios en el medio ambiente (luz intestinal frente a la vacuola del citoplasma) y es considerado un interruptor genético porque genera un perfil de expresión genética que ayuda a la supervivencia intracelular, mientras reprime el fenotipo invasivo (Altier, 2005). Para la supervivencia intracelular la SPI-2 codifica un sistema de secreción tipo III (T3SS-2), el cual es semejante estructuralmente al T3SS-1, y cuyas proteínas efectoras están principalmente implicados en mecanismos que favorecen la supervivencia y replicación intracelular. Si bien varias publicaciones han descrito que T3SS-1 y T3SS-2 tienen funciones completamente diferentes, se ha demostrado que existen algunas funciones repetidas y superpuestas asignadas a estos dos sistemas (Moest y Méresse, 2013).

Salcedo *et al.*, (2003) afirman que *Salmonella* se encontrará localizada cerca del núcleo y del aparato de Golgi en etapas posteriores en las células del epitelio intestinal.

Y teniendo en cuenta a Salcedo, Swart y Hensel (2012) señalan que un rol importante en la supervivencia intracelular es el desarrollo de filamentos inducidos por *Salmonella* (Sifs) promovidos por dicha bacteria. Como lo expresa Salcedo *et al.*, (2003) las SIF son estructuras membranosas tubulares ensamblado a la vacuola que contiene a *Salmonella* (SCV), lo que le facilita la captación de nutrientes, la movilización de *Salmonella* de una célula huésped a otra y proveen el espacio físico para la replicación bacteriana. No obstante, Schroeder *et al.*, (2011) señala que la red tubular inducida por *Salmonella* contiene otros tres tipos de túbulo: Clasificación de los túbulos de nexina, túbulos de la proteína de membrana transportadora secretora 3 (SCAMP3) inducida por *Salmonella* y túbulos negativos a la proteína de membrana asociada al lisosoma 1 (LAMP1). A su vez, afirma que las diversas proteínas efectoras de *Salmonella* tienen un rol importante en la formación y maduración de la red tubular.

Odendall *et al.*, (2012) refiere que *Salmonella* recluta activamente actina, que sirve como una abundante malla para sostener, de manera estable, el SCV. Mientras que el efector T3SS-2 SteC activa la vía las MAP quinasas MEK y ERK, la quinasa de cadena ligera de miosina (MLCK) y la miosina IIB, lo que conduce a una reorganización del citoesqueleto, cuya importancia radica en mantener la integridad del SCV.

Tam *et al.*, (2008) considera a *Salmonella* como un patógeno intracelular facultativo que ha evolucionado para desarrollar mecanismos que conlleven a evadir los mecanismos bactericidas de los fagocitos. También hace mención que posterior a cruzar los epitelios intestinales, la *Salmonella* encuentra diversos tipos de fagocitos capacitados, que incluyen a los macrófagos, células dendríticas y neutrófilos. En la misma línea de Tam, Santos y Bäumlner (2004) señalan que la *Salmonella* no sobrevive bien en neutrófilos, no obstante,

los macrófagos permiten el crecimiento intracelular de la bacteria en mención. La T3SS-2 funcional es responsable de manera considerable en la supervivencia y la replicación intracelular de la *Salmonella*, cuyas proteínas efectoras son competentes de segregar el SCV del sistema endosómico, impidiendo de forma selectiva la fusión de las fagolisosomas (Swart y Hensel, 2012; Bakowski *et al.*, 2008). A su vez, Swart y Hensel (2012) destacan la capacidad de *Salmonella* de interferir con la habilidad de las células dendríticas para estimular a las células T vírgenes, evadiendo así la inmunidad adaptativa del hospedero.

Si bien Tam (2008) y Santos y Bäumlér (2004) mencionan que los macrófagos y las células dendríticas son reconocidos como células diana para *Salmonella*, Souwer *et al.*, (2012) sugiere que las células B específicas de patógenos ejercen como portadores para la propagación sistémica de *Salmonella*. También menciona que, aunque *Salmonella* no pueda replicarse en las células B sobreviven bien en su ambiente intracelular, incluso señala que las células B excretan automáticamente la *Salmonella* intracelular, lo que se cree es un mecanismo de liberación del patógeno en órganos distantes de la infección como el bazo y el hígado.

Worley *et al.*, (2006) indica que para la diseminación sistémica de *Salmonella* es fundamental el T3SS-2 funcional. También destaca que SseI, un efector secretado por T3SS-2, desempeña un rol significativo en la difusión. En el mismo contexto, McLaughlin *et al.*, (2009) destaca el papel importante de SseI en la persistencia crónica de *Salmonella*. Worley *et al.*, (2006) afirma que SseI obstaculiza el patrón migratorio de los fagocitos intestinales que contienen a la *Salmonella*. Aunado a esto McLaughlin *et al.*, (2009) señala que SseI inhibe la migración de macrófagos y células dendríticas al unir

directamente el motivo IQ del factor huésped que contiene la proteína activadora de GTPasa 1 (IQGAP1) cuya función es regular la migración celular.

2.3 Epidemiología

La *Salmonella* posee una amplia distribución a nivel mundial siendo capaces de provocar alteraciones patológicas en animales y en humanos. Dentro de los serotipos frecuentemente aislados que no están adaptados a un hospedero específico destaca el serotipo Typhimurium, causando peligrosos brotes de salmonelosis en los animales y brotes de gastroenteritis en humanos a nivel mundial (Radostits, 2002). En la misma línea Chero (2015) señaló que *S. Typhimurium* es el patógeno principal en cobayos reproductoras al primer parto en la granja donde realizó el estudio. Así mismo, Díaz (2016) obtuvo únicamente *S. Typhimurium* como resultado de su trabajo usando un protocolo de PCR múltiple como método de detección rápida para *Salmonella Typhimurium* y Enteritidis. Finalmente, Marcelo *et al.* (2017) obtuvo como resultado mediante un PCR múltiple que el 100% de sus cepas trabajadas de *Salmonella spp.* Aisladas de cobayos fueron identificadas como *S. Typhimurium*.

2.3.1 Vías de Transmisión

La *Salmonella* se transmite por contacto directo e indirecto, siendo los animales infectados fuentes de dichos agentes patógenos. Estos agentes patógenos son excretados e infectan directamente a otros animales o de forma indirecta a través de la contaminación del medio ambiente incluyendo alimento y agua. Dicha excreción del agente patógeno aumenta con relación al estrés al que están sometidos los animales (Radostits, 2002).

2.3.2 Prevalencia

La prevalencia de esta enfermedad difiere en gran cantidad entre regiones geográficas, esto depende del clima, la densidad poblacional, entre otras. (Radostits, 2002) y según Ortega *et al.*, (2015) debe ser valorada como una de las causas de mortalidad en los cobayos. En los estudios de prevalencia realizado en cobayos Matsuura *et al.* (2010) observó en su estudio una prevalencia del 61.5% en granjas de crianza familiar-comercial en Áncash. En la misma línea, Telles (2017) encontró una prevalencia del 66,76% en Tacna.

2.3.3 Factores de riesgo ambientales

Se han descrito varios factores de riesgo dentro de los que destacan los alimentos contaminados como la principal fuente de infección, así como la introducción de animales de origen desconocido y el contacto con roedores y aves silvestres, que intervienen como portadores, contaminando el alimento con sus deposiciones (Chauca, 1997). En la misma línea, el estudio realizado por Telles (2017) encontró diversos factores de riesgo asociados a un manejo deficiente y contacto con otras explotaciones como aves y cerdos.

2.4 Prevención y Control

La *Salmonella* puede sobrevivir en ambientes con amplio rango de pH (4.05 – 9.5) y puede multiplicarse en un amplio rango de temperaturas (7 – 48°C) (Fatica y

Schneider, 2011) y en un ambiente cerrado a temperatura ambiental de 25°C se ha demostrado que *Salmonella* puede sobrevivir hasta 5 años en agua esterilizada o en una solución tamponada con fosfato (Liao, 2003). Aunque generalmente, las bacterias gram negativas suelen ser susceptibles a muchos desinfectantes como hipoclorito de sodio al 1%, etanol al 70%, propanol al 70% y glutaraldehído al 2% (CFSPH, 2005) que ayudan con la prevención y control de estas; el control de *Salmonella* por medio de desinfectantes no resulta efectivo porque en los animales portadores no se percibe signo clínico de salmonelosis (Richardson, 2000). Es por ello por lo que Richardson (2000) recomienda, como medida adicional, que los cobayos que aparentemente sanos deben ser trasladados a otros espacios dentro de la granja para evitar un nuevo brote, evitando el uso de esos espacios contaminados. Hoy en día los métodos preventivos basados en desinfectantes están siendo insuficientes para evitar la propagación de la enfermedad, es por ello que en otras actividades pecuarias se viene trabajando con el uso de vacunas como método preventivo (Chandra *et al.*, 2012; Huberman *et al.*, 2019).

2.5 Vacunas

Como lo afirma Tizar (2009) la vacunación es, de sobremanera, el procedimiento más eficaz y rentable para controlar enfermedades causadas por diversos agentes infecciosos. Siendo la vacuna un producto cuyo objetivo es de generar inmunidad frente a diversos agentes patógenos induciendo la producción de anticuerpos y, ejerciendo así, un importante efecto en la reducción de la mortalidad (OMS, 2010).

2.5.1 Vacuna viva atenuada contra *Salmonella*

Las vacunas vivas emplean una forma atenuada (o debilitada) del agente patógeno causante de una enfermedad infecciosa. Dentro de sus ventajas, destaca la similitud a una infección natural lo que ayuda a prevenir una posterior enfermedad, para ello crean una fuerte respuesta inmune y de una extensa duración (HHS, 2017).

En el caso de la afección de otras especies por *Salmonella* se han venido trabajando en vacunas con el fin de resolver dicho problema. Puede agregarse que Huberman *et al.*, (2019) evaluaron diferentes programas de vacunación con cepas atenuadas de *Salmonella enteritidis* en gallinas ponedoras con la finalidad de reducir la excreción del agente patógeno, la colonización de órganos y la contaminación de los huevos, demostrando que el uso de una vacuna viva atenuada de *S. Enteritidis*, asociado a medidas de gestión y bioseguridad, puede usarse como una herramienta importante para reducir las infecciones por *S. Enteritidis* en gallinas ponedoras.

De modo similar Chandra *et al.*, (2012) evaluó la respuesta inmune y la eficacia protectora de una vacuna viva atenuada de *Salmonella* que expresaba antígenos de *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis contra el desafío en ratones; concluyendo que los antígenos atenuados de MAP que expresa *Salmonella* es un candidato vacunal conveniente por las ventajas que ofrece, como la facilidad de fabricación, el bajo costo y, sobre todo, el potencial de protección doble frente a MAP y *Salmonella*.

3. Inmunidad de mucosa intestinal

La mucosa intestinal es el componente más importante del tracto intestinal porque en ella se producen la digestión y absorción de nutrientes y es una barrera física que protege a los órganos internos, además, mantiene una interacción constante con microorganismos patógenos (König, 2011). Siendo la superficie mucosa es el principal interfaz corporal entre el hospedero y los antígenos externos como los microorganismos (Fujimoto y Satoshi, 2020).

3.1 Inmunidad innata

Los hospederos han desarrollado diversos sistemas de defensa para evitar la invasión de microorganismos patógenos, siendo el epitelio intestinal, la capa mucoide y las células inmunes quienes juegan un rol fundamental en la primera línea de protección de la superficie mucosa (Ganz, 2003; Peterson *et al.*, 2014; Goto *et al.*, 2016). El sistema de barrera juega un rol fundamental en la protección de la mucosa de los antígenos. En este órgano las células epiteliales monocapa forman una barrera física y química que consisten en componentes no estructurales como los péptidos antimicrobianos (AMPs) producidos por las células de Paneth y el moco producido por las células caliciformes. Ambas barreras proveen protección contra microorganismos enteropatógenos. Las células inmunes que residen en el intestino proporcionan una tercera barrera defensiva, ya sea en estructuras organizadas, como las placas de Peyer y Nódulos linfáticos mesentéricos, o dispersas por todo el epitelio intestinal y la lámina propia (Perez-Lopez *et al.*, 2016) debido a que expresan esencialmente receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) que incluyen Receptores tipo Toll (TLRs), Receptores de Lectina tipo C (CLRs), Receptores de tipo RGI-I (RLRs) y Receptores tipo NOD (NLRs). Estos PRRs

responden cuando la superficie mucosa es expuesta a patógenos, siendo los PRRs quienes proveen funciones clave que regulan la homeostasis de la mucosa (Fujimoto y Satoshi, 2020).

Considerando que dado la identificación de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) el sistema inmune innato inicia su accionar defensivo. Estas acciones inician la inflamación y la consecuente movilización de células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos) que aporta a la destrucción apresurada de los agentes patógenos invasores. Si bien esto podría ser adecuado para defender al organismo, no siempre es suficiente para dar el grado de respuesta inmune esencial que ratifique la resistencia a la infección. Esto requiere de una respuesta más robusta que reconozca una mayor cantidad de moléculas de diversos agentes patógenos y que tenga la capacidad de recordarlo. Esta respuesta adaptativa está a cargo del sistema inmune adquirido (Tizard, 2009).

Por otro lado, cabe mencionar la importancia de las células M que son un conjunto de células epiteliales especializadas, característica de FAE, en la captación de antígenos, siendo la FAE la única región en el tracto gastrointestinal donde se produce la absorción de partículas antigénicas; las células M son muy activas en la fagocitosis y la transcitosis, por lo que captan bacterias y antígenos lumbinales que son enviados a las Células Dendríticas para iniciar respuestas inmunes de la mucosa (Kanaya y Ohno, 2014). Las células M expresan receptores de IgA en su membrana plasmática apical y transportan antígenos unidos a SIgA a las placas de Peyer lo que genera una captación eficiente por parte de las células M (Mantis *et al.*, 2002; Rey *et al.*, 2004).

3.2 Inmunidad adaptativa

La inmunidad adaptativa se caracteriza por una mayor especificidad frente a diversas moléculas ajenas, también tiene una capacidad “memoria” para poder responder de una manera potente frente a una exposición reiterada frente al mismo agente patógeno (Abbas *et al.*, 2012).

Ocurren dos tipos de respuestas inmunitarias adaptativas dependiendo del agente patógeno, llamadas inmunidad humoral e inmunidad celular que está representado por las células T y las células B con su diferenciación en células secretoras de anticuerpos. La inmunidad humoral tiene unas moléculas presentes en el torrente sanguíneo y en las secreciones de las mucosas, que reciben el nombre de anticuerpos, y es el encargado de la defensa frente a microorganismos extracelulares y sus toxinas. La inmunidad celular es ejecutada por las células T y está encargado de la defensa contra microorganismos intracelulares, como virus y algunas bacterias (Abbas *et al.*, 2012; Mestecky, 2020).

4. Inmunoglobulina A (IgA)

La inmunoglobulina A (IgA) es la inmunoglobulina más abundante en los tejidos de la mucosa de los humanos y la mayoría de otros mamíferos, siendo la mayor responsable de la respuesta inmune de la mucosa, reconocida como la primera línea de defensa para proteger el epitelio intestinal de los patógenos y toxinas entéricas. La IgA secretora (SIgA) es la que está presente en las superficies mucosas y consiste en una IgA dimérica unida a través de la cadena J a los componentes secretores (SC). El componente secretor protege al SIgA de la degradación por enzimas proteolíticas microbianas y del

huésped en el tracto gastrointestinal y las secreciones corporales (He *et al.*, 2007; Brandtzaeg, 2010; Boyaka, 2017).

4.1 Función

Las células B foliculares y extrafoliculares produce IgA mucosal a través de vías dependientes de células T (TD) o independientes de células T (TI) (Fagarasan, 2000; Cerutti, 2008; Faragaran *et al.*, 2010; Pabst, 2012). Aunque las vías TD generan IgA monorreactiva con alta afinidad por el antígeno, las rutas TI pueden generar IgA polirreactiva con baja afinidad por el antígeno (Macpherson *et al.*, 2008). La IgA de alta afinidad neutraliza algunos virus, como el rotavirus, y bloquea toxinas producidas por bacterias patógenas, incluida la toxina del cólera (Matson *et al.*, 1993; Bergqvist *et al.*, 2013). Además, la IgA de alta afinidad reduce la motilidad y la invasividad de *Shigella flexneri* y *Salmonella enterica* (Martinoli *et al.*, 2007; Kadaoui y Corthesy, 2007).

4.2 Síntesis de IgA

En el intestino, la IgA se puede generar a través de diversas vías, dentro o fuera de las estructuras foliculares organizadas que pertenecen a los tejidos linfoides asociados al intestino (GALT) y con o sin ayuda de las células T CD4+ (Suzuki *et al.*, 2010). Dos compartimentos funcionales conocidos como sitios inductores y efectores caracterizan la geografía de la producción y función de IgA en el intestino (Macpherson *et al.*, 2008). Los sitios inductivos primarios incluyen las estructuras foliculares organizadas de las placas de Peyer (PP) y los sitios inductivos secundarios son denominados folículos linfoides aislados (ILF) (Hamada *et al.*, 2002) y también se produce IgA en los folículos

de los nódulos mesentéricos (MLN). Suzuki *et al.* (2010) afirma que mientras las PP, los ILF y los MLN funcionan como sitios inductores de IgA, la lámina propia (LP) intestinal sirve como sitio efector de IgA, debido a que apoyan la maduración y supervivencia de los plasmablastos y células plasmáticas productoras de IgA que emergen de las PP y MLN.

5. Ratón como modelo biológico

El ratón es el animal más utilizado para experimentos *in vivo* de medicina y biología siendo el modelo elegido para comprender la reacción de un organismo mamífero frente a diversos agentes patógenos, ya sean parásitos, bacterias y virus, también es utilizado para analizar reacciones inmunológicas, oncológicas, entre otras. Los investigadores valoran al ratón como un modelo animal por su corto tiempo generacional, alta performance reproductiva, económico y sencillo mantenimiento, lo que lo hace un modelo animal casi perfecto, siendo los animales más sofisticados que pueden ser utilizados (Atchley y Fitch, 1991; Benavides y Guénet, 2003)

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Lugar de ejecución

El ensayo experimental se llevó a cabo en el bioterio del Laboratorio de Biología y Genética molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

2. Material Experimental y Metodología

2.1 Animales

Se utilizaron ratones albinos hembras de 4 semanas de edad pertenecientes a la cepa BALB/c adquiridos de Instituto Nacional de Salud (INS).

2.2 Método de crianza

Para la crianza de los animales se contó con un sistema de bioseguridad para evitar la contaminación, esto se logró siguiendo las indicaciones del Instituto Nacional de Salud. Los animales fueron colocados aleatoriamente en jaulas metálicas (1 caja por grupo) que tienen unas dimensiones de 40 cm² (piso) x 15 cm (altura) cada una. Cada ratón fue asignado número (del uno al siete) para su identificación y para ello se marcó cada ratón con un plumón indeleble en la base de la cola. Se administró alimentación *ad libitum* a base de alimento peletizado adquirido en el Instituto Nacional de Salud y formulado específicamente para crianza de ratones de laboratorio.

2.3 Monitoreo de los animales

En los días de cuarentena se realizó un monitoreo con el objetivo de corroborar que los animales lleguen sin contaminación cruzada de salmonelosis al inicio del ensayo, para ello se colectaron muestras fecales de cada ratón los días 0 (llegada de los animales),

día 7 y día 14 (día anterior a la inoculación de las cepas atenuadas). Así mismo, a lo largo del estudio se monitoreó a los animales ante la posible presentación de alguna patología.

2.3.3 Toma de muestras

Para la toma de muestras fecales se retiró a cada ratón de su caja metálica y fue colocado en otra caja metálica de iguales condiciones, previamente desinfectada, de unos cinco a diez minutos o hasta observar que el animal había defecado, con el objetivo de obtener muestras fecales frescas y libres de algún contaminante (orina). Cada ratón fue manipulado levantando ligeramente la cola y masajeando suavemente la zona dorso-caudal, esto estimulaba el reflejo de deposición. Para todo lo descrito se utilizó guantes e instrumentos estériles por cada individuo.

2.3.4 Procesamiento de muestras

Las muestras fecales de cada ratón fueron rotuladas según el número de individuo, el grupo al que pertenecían y la fecha. Se obtuvo 2 fecas en promedio, siendo utilizado sólo 1 g en total.

2.3.5 Enriquecimiento Selectivo

Las muestras fecales de cada ratón fueron colocadas en tubos falcon de 50 mL que contenían 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV), se incubó a 42 °C por 24 h.

2.3.5 Aislamiento en Agar Selectivo y Diferencial

Al día siguiente, los tubos con caldo RV fueron homogenizados, luego, haciendo uso de un asa bacteriológica se extrajo una muestra que fue sembrada por agotamiento en estría en agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD), se incubó por 24 h a 37 °C. Para luego observar si había crecimiento de colonias bacterianas compatibles con *Salmonella* spp. Obteniendo como resultado que todas las muestras fueron negativas al monitoreo de *Salmonella* spp.

2.4 Cepas atenuadas

Se utilizaron tres cepas atenuadas, que se mantuvieron en congelación de -80 °C, que previamente se había comprobado que carecían de capacidad patogénica e invasiva, ocasionando la pérdida de su función.

- Cepa 1: El gen atenuado participa en la ruta metabólica para síntesis de aminoácidos esenciales.
- Cepa 2: El gen atenuado participa en la respuesta frente al estrés dentro del hospedero y en la supervivencia en macrófagos.
- Cepa 3: El gen atenuado participa en la capacidad de invasión.

2.4.1 Reactivación de cepas atenuadas y preparación del inóculo.

Las cepas atenuadas mantenidas en congelación (-80 °C) fueron retiradas de la congeladora y, con ayuda de un ansa de siembra, se extrajo una pequeña alícuota que fue colocado en 500 mL de caldo Luria Bertani (LB), dejándose incubar por 18 h. Tras la

incubación, se homogenizó el caldo LB y se dispensó en tubos estériles cónicos de 50 mL. Luego los tubos fueron centrifugados a velocidad media (5000 g) en la centrífuga Mikro 20 – Hettich. Posterior a ello, se descartó el sobrenadante y el material sedimentado fue resuspendido en 2 mL de glucosa al 20% hasta llegar a una concentración de 10^9 UFC/100 μ l de solución. La concentración fue obtenida mediante medición por espectrofotometría en un espectrofotómetro *Genesys 10uv* a 600 nm usando, además, un control de concentración conocida.

2.4.2 Inoculación de las cepas atenuadas

Posterior al periodo de cuarentena se administró 100 μ l de la cepa atenuada con 10^9 UFC/animal vía oral mediante el uso de una sonda orogástrica 18G, 2.5 cm de longitud y 2 mm de diámetro (*Sigma - Aldrich*), siguiendo las recomendaciones descritas en la guía “Manejo y cuidado de animales de laboratorio: Ratón” del Instituto Nacional de Salud (INS, 2008).

2.5 Colección de muestras fecales post inmunización

Las muestras fecales de cada ratón se colocaban, de manera individual en las mañanas colocando cada ratón en una caja metálica desinfectada recogiendo las heces que iban defecando los cuales eran colocados en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL los días 1, 9, 15 y 21, post inoculación de la cepa atenuada, conservando dichas muestras en congelación a -20 °C para su posterior evaluación.

2.6 Evaluación de heces post inmunización

En el laboratorio, las heces que fueron colectadas de cada ratón fueron procesadas mediante extracción de proteínas fecales para, posterior a ello, realizar la medición de IgA contra *Salmonella* Typhimurium mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) *in house* indirecta y, por último, su lectura en un lector de ELISA.

2.6.1 Extracción de IgA

Para la extracción de IgA se colocó 100 mg de heces en un tubo de microcentrífuga que contenía 1 mL de PBS y 50 μ l de un inhibidor de proteasas Sigma Fast™. Luego se colocó en una máquina Vórtex para homogenizar la muestra, luego se colocó en una centrífuga refrigerada a 4 °C y 10000 g por 10 min. Luego se recuperó el sobrenadante y se guardó a -20 °C para su posterior procesamiento.

2.6.2 Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA)

2.6.2.1 Preparación del antígeno total de *Salmonella* Typhimurium para ELISA

Los antígenos para el inmunoensayo fueron preparados usando el protocolo modificado de Ledesma *et al.*, (2017) y Moreno (2018). Para ello se cosechó *Salmonella* Typhimurium, que fue colocada en caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) a 37 °C por 24 h. Luego se colocó en tubos Falcon de 50 mL los cuales fueron centrifugados a 8500 g

por 15 min. Se eliminó el sobrenadante y se realizó tres lavados con buffer fosfato salino (PBS) al pellet residual de los tubos centrifugados, luego se suspendió el pellet en 10 mL de PBS frío para obtener la lisis bacteriana y posteriormente se realizaron tres ciclos de congelación en nitrógeno líquido seguido de descongelación. Las células bacterianas fueron sonicadas en siete pulsos de 10 segundos cada uno, tomando 10 segundos entre pulsos para luego centrifugarlo a 11000 g por unos 30 min a 4 °C, luego separamos el sobrenadante para uso posterior. La totalidad de la proteína de *S. Typhimurium* fue cuantificada usando Qubit™ Thermo Scientific. El producto lisado fue colocado en alícuotas y almacenado a 4 °C hasta su uso respectivo en análisis serológicos.

2.6.2.2 Materiales de ELISA indirecta

Se dispuso PBS a concentración de 0.1 M, el cual fue útil para diluir todos los reactivos. Se usó una solución de Tween 20KPL® diluida en PBS a concentración de 0.05% para el buffer de lavado (PBS-T). El suero problema fue diluido a razón de 1:200 en buffer de dilución, el cual está compuesto de albúmina sérica bovina (BSA) al 3% en PBS 0.1 M. Para las pruebas el anticuerpo conjugado que se usó fue un anticuerpo secundario policlonal de Anti-IgA de ratón concentración final de 1/20000. Mientras que siguiendo las recomendaciones de concentración del fabricante se usó el sustrato cromógeno 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidina (TMB) Sureblue™. Todos los procedimientos fueron realizados en placas de poliestireno de alta afinidad de 96 pocillos Corning®.

2.6.2.3 Procedimiento ELISA indirecto

Para el procesamiento de las muestras se tapizó con 100 µl de proteína total de *Salmonella* Typhimurium procedente de cultivos bacterianos previamente descritos a 35 µg/mL de concentración e incubado a 37 °C por una hora. Posterior a ello, se realizó tres lavados con 200 µl de PBS-T, luego, para bloquear los pocillos se usó 200 µl de BSA 3% a 4 °C durante 16 h, luego se realizaron tres lavados con PBS-T para agregar, por duplicado, las muestras problemas a una concentración de 100 µl/pocillo y a dilución de 1/200, lo descrito previamente se incubó a 37°C por una hora; una vez más se realizaron tres lavados previos a la adición de 100 µl del anticuerpo con HRP a dilución 1/20000. De nuevo se incubó a 37°C por una hora para luego realizar tres lavados más antes de añadir 100 µl de sustrato cromógeno (TMB). Por último, las muestras fueron incubadas por 10 min a temperatura ambiente (Ledezma *et al.*, 2017; Moreno, 2018).

2.6.2.4 Lectura de ELISA

Se midió la densidad óptica mediante una longitud de onda de 650 nm en un lector de lector de microplacas Modelo 680 – Bio-Rad.

3. Diseño experimental

Este proyecto se trabajó con 28 ratones divididos en cuatro grupos (cuadro 1), considerado así por capacidad logística,

Cuadro 1 Grupos experimentales: Grupos experimentales y el número de animales en cada grupo

Grupos	Tipo	Cantidad de animales por jaula
Grupo 1	Cepa Atenuada 1	7
Grupo 2	Cepa Atenuada 2	7
Grupo 3	Cepa Atenuada 3	7
Grupo Control	PBS	7

Los animales, luego de ser adquiridos, fueron llevados al bioterio del Laboratorio de Biología y Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, luego del cual pasaron por un periodo de cuarentena, también llamado adaptación. Al día siguiente del término del periodo de cuarentena, los animales fueron inoculados con las cepas atenuadas vía oral haciendo uso de una sonda orogástrica. Seguidamente comenzó el periodo de evaluación que duró 21 días.

4. Análisis estadístico

En este estudio se realizaron curvas de excreción de IgA durante el tiempo de estudio, cuyos datos obtenidos fueron comparados estadísticamente día por día. Primero se aplicó la prueba de Normalidad Shapiro Wilk, para lo cual, los datos arrojaron un P valor mayor

a 0.05, lo que indica que siguen una distribución normal. Posterior a ello, se aplicó la prueba ANVA, y en los días que arrojaron un valor de P menor al 0.05, se utilizó la prueba de Tukey para las comparaciones múltiples post ANVA con una significancia de 0.05.

5. Consideraciones éticas

Este proyecto consideró las normas del Comité de Ética y Bienestar Animal (CEBA) de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por lo cual fue aprobado según la constancia expedida con código *CEBA 2020-6*.

RESULTADOS

Las muestras de cada grupo fueron promediadas con el objetivo de tener una medida representativa y los resultados obtenidos mediante la técnica de ELISA en el primer día de evaluación post inoculación muestran una ligera diferencia entre los grupos donde el grupo 1 y el Grupo Control muestran una mayor media de Densidad Óptica frente a la Densidad Óptica de los Grupos 2 y 3, sin embargo, no hubo diferencia estadística ($p>0.05$) (figura 1 y cuadro 2).

En el noveno día de evaluación post inoculación los resultados muestran un marcado aumento de la media de la D.O del Grupo 1, en el cual hubo una diferencia estadística

($p < 0.05$) frente al Grupo 2, pero no hubo diferencia estadística frente al Grupo 3 y al Grupo Control (figura 1 y cuadro 2).

En el decimoquinto día de evaluación post inoculación se evidenció la marcada tendencia en aumento del Grupo 1 en el cual hubo una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) frente al resto de grupos. En ese día también se evidenció una ligera disminución de la media de D.O del Grupo Control y del Grupo 3 con relación al noveno día de evaluación, al mismo tiempo, el Grupo 2 evidenció un ligero aumento de la media de D.O. (figura 1 y cuadro 2).

En el vigésimo primer día de evaluación post inoculación los resultados muestran una marcada tendencia del Grupo 1 y del Grupo 2 frente al Grupo 3 y al Grupo Control, arrojando una diferencia estadística ($p < 0.05$) (figura 1 y cuadro 2).

Cuadro 2. Media de la D.O por Días y por Grupos y sus Errores Estándares correspondientes.

GRUPOS	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo Control	
	D.O	S. E	D.O	S. E	D.O	S. E	D.O	S. E
1	0.398 ^a	0.151	0.271 ^a	0.103	0.280 ^a	0.106	0.385 ^a	0.146
9*	0.537 ^a	0.203	0.304 ^b	0.115	0.369 ^{ab}	0.140	0.348 ^{ab}	0.132
15*	0.682 ^a	0.258	0.414 ^b	0.157	0.320 ^b	0.121	0.410 ^b	0.155
21*	0.887 ^a	0.336	0.678 ^a	0.257	0.322 ^b	0.122	0.338 ^b	0.128

*Promedios de D.O en la misma fila con letras diferentes son estadísticamente diferentes.

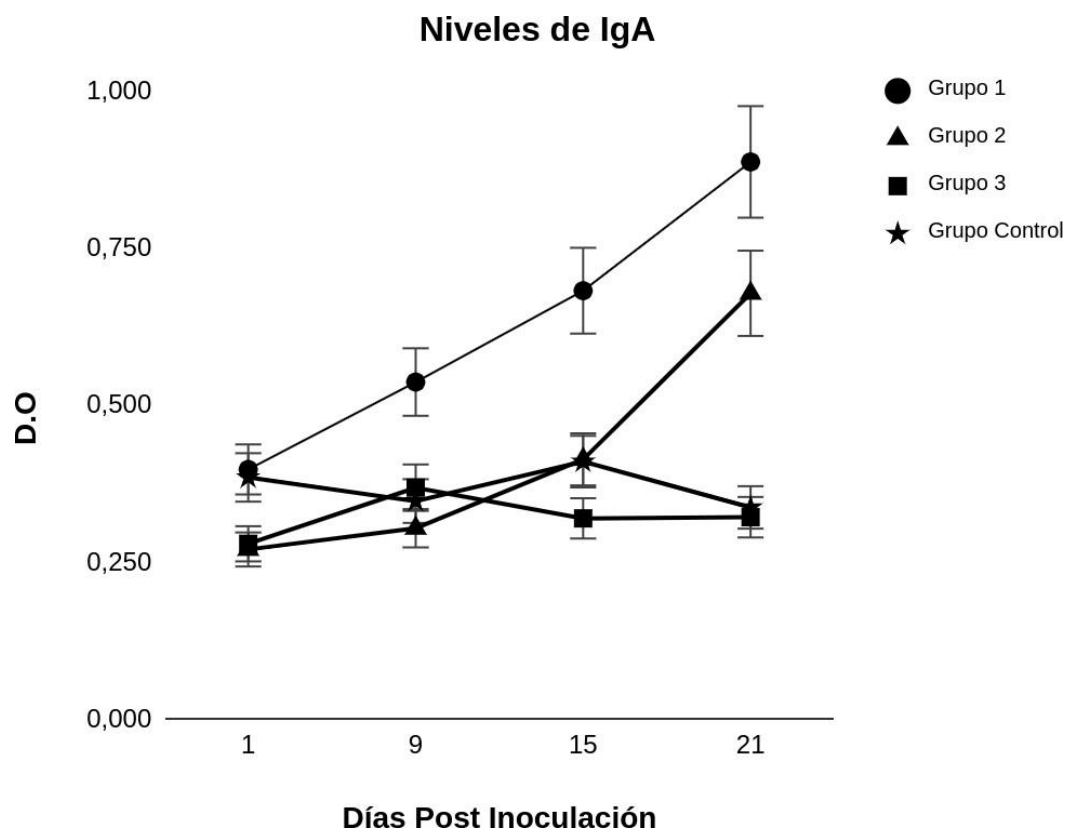


Figura 1. Resultados del ELISA para los niveles de IgA (DO_{650}). Los puntos representan las medias y las barras de error a errores estándares (SE).

DISCUSIÓN

La IgA es el principal anticuerpo secretado en las mucosas y juega un rol fundamental en la protección y regulación homeostática del epitelio de la mucosa intestinal separando el ambiente exterior del interior del cuerpo, lo que se conoce como exclusión inmune que es un proceso que limita el acceso de microorganismos y antígenos lo cual evita que estos patógenos ingresen al organismo y se diseminen en el compartimento sistémico (Corthésy, 2013). Es por ello por lo que el presente estudio tuvo como finalidad evaluar la actividad inmunogénica de tres cepas atenuadas de *Salmonella* Typhimurium de origen cobayo sobre los niveles de excreción de IgA fecal en ratones cuantificados mediante ELISA. En la misma línea Chen *et al.* (2018) demostró que la cepa atenuada de delección Δcrp de *S.* Typhimurium, cuando se administra por vía oral en una dosis única, puede inducir una respuesta inmune protectora, donde los anticuerpos

sIgA de la mucosa son inducidos eficientemente. Los grupos vacunados con las cepas atenuadas mostraron una respuesta significativamente mayor cada semana más allá de la semana 1 en comparación con el grupo control ($P < 0.05$). Los resultados de Chen *et al.* (2018) se asemejan a nuestros resultados, destacando el Grupo 1, en donde cada semana de evaluación se evidencia una tendencia a mayores densidades ópticas relacionado con la excreción de sIgA de la mucosa. De modo similar al Grupo 2, con la diferencia que este grupo recién en la cuarta semana evidencia una diferencia significativa de densidades ópticas frente al Grupo Control, pero no tan marcada como el Grupo 1, estos resultados, que los Grupos 1 y 2 presenten densidades ópticas relacionado con la excreción de IgA mayores frente al Grupo Control, se podrían explicar debido a la naturaleza de la candidata vacunal, al ser una cepa atenuada tiene potencial inmunogénico. Sin embargo, el Grupo 3 difiere a los resultados obtenidos por Chen *et al.* (2018) y al resto de nuestros grupos vacunales, esto podría deberse a una pérdida total en la capacidad de invasión y replicación de la cepa atenuada en el hospedero, lo que conlleva a una nula capacidad inmunogénica, esto porque el gen modificado participa en la invasión y replicación de *Salmonella Typhimurium*.

Niveles altos de IgA también se obtuvieron en el estudio de Haneda *et al.*, (2011) en el cual evaluaron la capacidad protectora de una cepa mutante *slyA* de *S. Choleraesuis* frente a una cepa salvaje de *S. Choleraesuis*. Primero evaluaron la delección del gen *slyA* en *S. Typhimurium* para probar la eficacia, seguridad e inmunogenicidad de su candidata vacunal en ratones, se evaluaron la producción de anticuerpos fecales tipo A obteniendo diferencias significativas a partir de la tercera semana post inoculación del candidato vacunal. Basándose en los datos obtenidos de ese ensayo exitoso construyeron una cepa mutante *slyA* de *S. Choleraesuis* (cepa RF-1) para evaluar su capacidad protectora en cerdos desafiados con una cepa salvaje de *S. Choleraesuis*, por lo que concluyeron que

sus resultados demuestran que su candidata vacunal proporciona protección significativa frente al patógeno en mención. Niveles altos de IgA, comparables con el presente ensayo, también se obtuvo al inmunizar ratones vía oral, utilizando cepas mutantes $\Delta lppAB$ y $\Delta lppAB \Delta msbB$, siendo la cepa mutante $\Delta lppAB \Delta msbB$ la que obtuvo niveles más altos de IgA fecal (Evora *et al.*, 2016).

Por otro lado, la diferencia de D.O. entre el grupo 1 (cepa 1) y el grupo 2 (cepa 2) puede deberse a la naturaleza de los genes modificados, ya que la cepa perteneciente al Grupo 2 es defectuosa en la supervivencia y replicación en las células fagocíticas y es incapaz de generar una respuesta completa al estrés generado por el hospedero, mientras que la cepa perteneciente al Grupo 1 tiene un gen modificado que la hace defectuosa en la síntesis de aminoácidos esenciales provocando un defecto en la pared celular que lo vuelve más sensible e incapaz de replicarse en las células fagocíticas. Haciendo una comparación, se podría decir que la cepa del Grupo 2 tiene mayor grado de atenuación que la cepa del Grupo 1.

Los animales del Grupo Control que fueron inoculados con PBS muestran IgA fecal durante todo el experimento, saliendo negativos a *Salmonella* spp. Durante el monitoreo de cuarentena, esto se podría explicar porque al utilizar proteína total de *Salmonella* Typhimurium en el tapizado en la fase sólida del ELISA, se unen a los pocillos antígenos comunes de distintos patógenos entéricos los cuales reaccionarían con los anticuerpos tipo A circulante en las muestras de los animales del Grupo Control.

Finalmente, nuestro estudio demuestra que los candidatos vacunales (Grupo 1 y Grupo 2) ofrecen una actividad inmunogénica sobre los niveles de excreción de IgA fecal

en ratones. Siendo el Grupo 1 el de mejor desempeño aparentemente porque muestra una mayor respuesta en comparación con el Grupo 2. Con ello, los resultados de este estudio sirven de base para futuras investigaciones y pruebas en los propios cobayos, siendo éste el animal de interés.

CONCLUSIÓN

Dos de las tres cepas atenuadas (Grupo 1 y 2) tuvieron actividad inmunogénica, incrementando los niveles de excreción de IgA fecal en ratones.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. **[HHS] Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE. UU. 2017.** Tipos de vacunas. [Internet], [28 de febrero 2020]. Disponible en: <https://www.vaccines.gov/es/b%C3%A1sicos/tipos>
2. **[INEI] Instituto Nacional de Estadística e Informática. 2012.** IV Censo nacional agropecuario 2012-sistema de consulta de cuadros estadísticos. Perú: INEI [Internet], [agosto 2014]. Disponible en: <http://censos.inei.gob.pe/cenagro/tabulados/>
3. **[INEI] Instituto Nacional de Estadística e Informática. 2018.** Encuesta Nacional Agropecuaria 2017. [Internet], [04 de enero 2019]. Disponible en: https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1593/
4. **[INS] Instituto Nacional de Salud. 2008.** Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: Ratón. En Instituto nacional de salud (pp. 1–54). [Internet]. [06 de mayo del 2019]. Disponible en: www.ins.gob.pe/insvirtual/images/.../GUIA_ANIMALES_RATON.pdf
5. **[MINAGRI] Ministerio de Agricultura y Riego. 2019.** Potencial del mercado internacional para la carne de cuy. [Internet], [16 de julio 2020]. Disponible en: www.minagri.gob.pe
6. **Abbas A, Lichtman A, Pillai S. 2012.** Inmunología celular y molecular. 7^a ed. Barcelona: Elsevier. 558 p.
7. **Altier C. 2005.** Genetic and environmental control of *Salmonella* invasion. J Microbiol; 43: 85-92.
8. **Atchley W, Fitch W. 1991.** Genes trees and the origins of inbred strain of mice. Science; 254: 554-558. Doi: 10.1126/science.1948030
9. **Bajaj V, Lucas R, Hwang C, Lee C. 1996.** Co-ordinate regulation of *Salmonella* Typhimurium invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated

- by control of *hilA* expression. *Molecular Microbiology* 22(4), 703-714. Doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.d01-1718.x>
10. **Bakowski M, Braun V, Brumell J. 2008.** *Salmonella* containing vacuoles: directing traffic and nesting to grow. *Traffic*; 9: 2022-31. Doi: 10.1111/j.1600-0854.2008.00827. x.
 11. **Benavides F, Guénet J. 2003.** Manual de genética de roedores de laboratorio: principios básicos y aplicaciones. Alcalá: Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio (SECAL)- Universidad de Alcalá; 312.
 12. **Bergqvist P, Stensson A, Hazanov L, Holmberg A, Mattsson J, Mehr R, Bemark M, Lycke N. 2013.** Re-utilization of germinal centers in multiple Peyer's patches results in highly synchronized, oligoclonal, and affinity-matured gut IgA responses. *Mucosal Immunol.* 6 (1): 122 – 35. Doi: 10.1038/mi.2012.56
 13. **Brandtzaeg P. 2010.** Function of mucosa-associated lymphoid tissue in antibody formation. *Immuno Invest*; 39 (4-5):303-355. Doi: 10.3109/08820131003680369.
 14. **Boyaka P. 2017.** Inducing mucosal IgA: A challenge for vaccine adjuvants and delivery systems. *J Immunol.* Jul 1; 199(1):9-16. Doi 10.4049/jimmunol.1601775
 15. **Calvete C. 2015.** Detección y caracterización de *Salmonella* spp. en la cadena productiva porcina. Tesis de Licenciatura. Tandil: Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. 44 p.
 16. **Chandra S, Faisal S, Chen J, Chen T, McDonough S, Liu S, Moreira M, Akey B, Chang C, Chang Y. 2012.** Immune response and protective efficacy of live attenuated *Salmonella* vaccine expressing antigens of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* against challenge in mice. *Vaccine* Vol 31, Issue 1, 242-251 p. Doi: 10.1016/j.vaccine.2012.09.024
 17. **Chatfield S, Strugnell R, Dougan G. 1989.** Live *Salmonella* as vaccines and carriers of foreign antigenic determinants. Butterworth & Co. Publishers. 495–498 p.
 18. **Chauca L. 1997.** Producción de cuyes (*Cavia porcellus*). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación FAO. [Internet], [12 de junio 2019]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/w6562s/w6562s00.html>
 19. **Chen S, Liao C, Zhang C, Cheng X. 2018.** Roles of the *crp* and *sipB* genes of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in protective efficacy and immune responses to vaccination in mice. *Can J Vet Res.*;82(2):102-105.

20. **Chero A. 2015.** Identificación molecular de *Salmonella* Typhimurium y Enteritidis en cobayos reproductoras primerizas clínicamente sanas. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 87 p.
21. **Corthésy B. 2013.** Funciones multifacéticas de la IgA secretora en las superficies mucosas. Frente. Immunol. 4 : 185. Doi: 10.3389 / fimmu.2013.00185
22. **Curtis R, Wanda S, Gunn B, Zhang X, Tinge S, Ananthnarayan V. 2009.** *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains with regulated delayed attenuation *in vivo*. Infect Immun. 77(3):1071-82. Doi: 10.1128/IAI.00693-08
23. **Díaz G. 2016.** Evaluación de una técnica de PCR múltiple para la detección rápida de *Salmonella* Typhimurium y/o Enteritidis en cobayos naturalmente infectados. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 102 p.
24. **Evora T, Kirtley M, Fitts E, Ponnusamy D, Baze W, Andersson J, Cong Y, Tiner B, Sha J, Chopra A. 2016.** Protective immunity elicited by oral immunization of mice *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Braun Lipoprotein (Lpp) and Acetyltransferase (MsbB) Mutants. Front. Cell. Infect. Microbiol. 6:148. Doi: 10.3389/fcimb.2016.00148.
25. **Fatica M, Schneider K. 2011.** *Salmonella* and produce: survival in the plant environment and implications in food safety. *Virulence* 2:573–9. Doi: 10.4161/viru.2.6.17880
26. **Fujimoto K, Satoshi U. 2020.** Innate Immunity at Mucosal Surfaces. En Kiyono H, Pascual D. Mucosal Vaccines. 2^{da} ed. USA: Academic Express. 881-915 p. Doi: 10.1016/B978-0-12-811924-2.00053-5
27. **Ganz T. 2003.** Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. Nat Rev Immunol; 3:710-20. Doi: 10.1038/nri1180
28. **García C. 2011.** Salmonelosis Porcina en España: Prevalencia, factores de riesgo y Resistencia antimicrobiana. Tesis doctoral. León: Universidad de León. 197 p.
29. **Goto Y, Uematsu S, Kiyono H. 2016.** Epithelial glycosylation in gut homeostasis and inflammation. Nat Immunol; 17:1244-51. Doi: 10.1038/ni.3587.
30. **Hamada H, Hiroi T, Hishiyama Y, Takahashi H, Masunaga Y, Hachimura S. 2002.** Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. J Immunol; 168:57-64. Doi: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.1.57>

31. **Haneda T, Okada N, Kikuchi Y, Takagi M, Kurotaki T, Miki T, Arai S, Danbara H. 2011.** Evaluation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and Choleraesuis *slyA* mutant strains for use in live attenuated oral vaccines. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, Vol 34. Issue 5. 399 – 409 p. Doi: doi.org/10.1016/j.cimid.2011.07.001.
32. **Harrison J, Villarreal-Ramos B, Mastroeni P, Demarco R, Hormaeche C. 1997.** Correlates of protection induced by live Aro- *Salmonella* Typhimurium vaccines in the murine typhoid model. Immunology; 90(4): 618-25. Doi: 10.1046/j.1365-2567.1997. 00158.x
33. **He B, Xu W, Santini P, Polydorides A, Chiu A, Estrella J. 2007.** Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A (2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. Immunity; 26(6):812-826. Doi: 10.1016/j.immuni.2007.04.014
34. **Heithoff D, Sinsheimer R, Low D, Mahan M. 1999.** An essential role for DNA adenine methylation in bacterial virulence. Science; 284(5416):967-70. Doi: 1210.1126/science.284.5416.967
35. **Huamán M. 2019.** Manual de Bioseguridad y Sanidad en Cuyes. INIA. Lima, Perú. 90 pp.
36. **Huberman Y, Velilla A, Terzolo H. 2019.** Evaluation of different live *Salmonella* enteritidis vaccine schedules administered during layer hen rearing to reduce excretion, organ colonization, and egg contamination. Poultry Science, Vol. 98, Issue 6, 2422-2431 p. Doi: 10.3382/ps/pez003
37. **Jepson M, Clark M. 1998.** Studying M cells and their role in infection. Trends Microbiol: 6, 359-365.
38. **Jones B, Ghori N, Falkow S. 1994.** *Salmonella* Typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. J Exp Med; 180: 15-23.
39. **Kadaoui K, Corthésy B. 2007.** Secretory IgA mediates bacterial translocation to dendritic cells in mouse Peyer's patches with restriction to mucosal compartment. J Immunol. 179 (11): 7751-7. Doi: 10.4049/jimmunol.179.11.7751.
40. **Kanaya T, Ohno H. 2014.** The Mechanisms of M-cell Differentiation. Bioscience of microbiota, food and health, 33(3), 91–97. Doi: https://doi.org/10.12938/bmfh.33.91

41. **Lahiri A, Lahiri A, Iyer N, Das P, Chakravorty D. 2010.** Visiting the cell biology of *Salmonella* infection. *Microbes and Infection*: 12, 809-818.
42. **Ledesma MM, Díaz AM, Barberis C, Vay C, Manghi MA, Leoni J, Castro MS, Ferrari A. 2017.** Identification of Lama glama as reservoirs for *Acinetobacter lwoffii*. *Frontiers in Microbiology* Vol 8 (Art 278): 1-7. Doi: 10.3389/fmicb.2017.00278
43. **Liao C, Shollenberger L. 2003** Survivability and long-term preservation of bacteria in water and in phosphate-buffered saline. *Lett Appl Microbiol.* **37**:45–50. Doi: 10.1046/j.1472-765X.2003.01345.x
44. **Macpherson A, McCoy K, Johansen F, Brandtzaeg P. 2008.** The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol*; 1:11-22. Doi: 10.1038/mi.2007.6.
45. **Mantis N, Cheung M, Chintalacharuvu K, Rey J, Corthésy B, Neutra M. 2002.** Selective adherence of IgA to murine Peyer's patch M cells: evidence for a novel IgA receptor. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 169(4), 1844–1851. Doi: 10.4049/jimmunol.169.4.1844
46. **Marcelo G, Rosadio R, Chero A, Díaz G, Ciprian A, Maturrano L. 2017.** Identificación de *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Typhimurium en Cuyes mediante la Técnica de PCR Múltiple. *Rev. Inv. Perú*; 28 (2): 411-417. Doi: 10.15381/rivep.v28u2.13074.
47. **Martinoli C, Chiavelli A, Rescigno M. 2007.** Entry route of *Salmonella* Typhimurium directs the type of induced immune response. *Immunity Article*. Vol 27. Issue 6: 975 – 984 p. Doi: 10.1016/j.immuni.2007.10.011
48. **Matson D, O’Ryan M, Herrera I, Pickering L, Estes M. 1993.** Fecal antibody responses to symptomatic and asymptomatic rotavirus infection. *J Infect. Dis.* 167. 577 – 583 p.
49. **Matsuura A, Morales S, Calle E, Ara M. 2010.** Susceptibilidad a antibacterianos *in vitro* de *Salmonella enterica* aislada de cuyes de crianza familiar-comercial en la provincia de Carhuaz, Ancash. *Rev Inv Vet Perú* 21(1): 93-99.
50. **McLaughlin L, Govoni G, Gerke C, Gopinath S, Peng K, Laidlaw G, et al. 2009.** The *Salmonella* SPI2 effector SseI mediates long-term systemic infection by modulating host cell migration. *PLoS Pathog*; 5: e1000671. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000671>

51. **Mestecky J. 2020.** Protective Activities of Mucosal Antibodies. En Kiyono H, Pascual D. Mucosal Vaccines. 2^{da} ed. USA: Academic Express. 881-915 p. Doi: 10.1016/B978-0-12-811924-2.00004-3
52. **Moest T, Méresse S. 2013.** *Salmonella* T3SSs: successful mission of the secret(ion) agents. Curr Opin Microbiol; 16: 1-7. Doi: 10.1016/j.mib.2012.11.006
53. **Morales S, Mattos J, Calle S. 2007.** Efecto de la muña (*Satureja parvifolia*) en la dinámica de la infección por *Salmonella enterica* en cobayos. En: XXX Reunión ALPA. Cusco: Asociación Latinoamericana de Producción Animal.
54. **Morales S. 2013.** Sanidad en Sistemas de Crianza Comercial de Cuyes. XXXVI Reunión Científica Anual de la Asociación de Producción Animal: 38-44.
55. **Morales S. 2017.** Patógenos bacterianos y parasitarios más frecuentes en cuyes de crianza familiar - comercial en tres distritos de la Provincia de Bolognesi, Departamento de Ancash en época de seca. Tesis de Magíster en Sanidad Animal. Lima: Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 72 p.
56. **Moreno G. 2018.** Evaluación de la inmunogenicidad *in vivo* de una proteína recombinante de *Pasteurella multocida* aislada de un brote de neumonía aguda en alpacas (*Vicugna pacos*). Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 87 p.
57. **Müller A, Kaiser P, Dittmar K, Weber T, Haueter S, Endt K, Songhet P, Zellweger C, Kremer M, Fehling H, Hardt W. 2012.** *Salmonella* Gut Invasion Involves TTSS-2-Dependent Epithelial Traversal, Basolateral Exit, and Uptake by Epithelium-Sampling Lamina Propria Phagocytes. Cell Host & Microbe vol 11 (1) 19-32. Doi: 10.1016/j.chom.2011.11.013
58. **Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. 2009.** Microbiología médica. 6^a ed. Barcelona: Elsevier. 894 p.
59. **Odendall C, Rolhion N, Förster A, Poh J, Lamont D, Liu M, et al. 2012.** The *Salmonella* kinase SteC targets the MAP kinase MEK to regulate the host actin cytoskeleton. Cell Host Microbe; 12: 657-68. Doi: 10.1016/j.chom.2012.09.011.
60. **OMS, UNICEF, Banco Mundial. 2010.** Vacunas e inmunización: situación mundial, 3^{ra} ed. Ginebra. 228 p.

61. **Ortega G, Jiménez R, Ara M, Morales S. 2015.** La salmonelosis como Factor de Riesgo de Mortinatalidad en Cuyes. *Rev Inv Vet Perú*, 26(4): 676-681.
62. **Peterson L, Artis D. 2014.** Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol*; 14:141-53. Doi: 10.1038/nri3608.
63. **Perez-Lopez A, Behnsen J, Nuccio S, Raffatellu M. 2016.** Mucosal immunity to pathogenic intestinal bacteria. *Nat Rev Immunol*; 16:135-48. Doi: 10.1038/nri.2015.17
64. **Radostits O, Gay C, Blood D, Hinchcliff K. 2002.** Tratado de enfermedades del ganado bovino, ovino, caprino y equino. 9^a ed. Madrid: Mc Graw-Hill. 959 p.
65. **Reis B, Zhang S, Tsolis R, Bäumlér A, Adams L, Santos R. 2003.** The attenuated *sopB* mutant of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium has the same tissue distribution and host chemokine response as the wild type in bovine Peyer's patches. *Vet Microbiol*; 97:269-77. Doi: 10.1016/j.vetmic.2003.09.019
66. **Rey J, Garin N, Spertini F, Corthésy B. 2004.** Targeting of secretory IgA to Peyer's patch dendritic and T cells after transport by intestinal M cells. *Journal of immunology*, Baltimore, Md.: 1950, 172(5), 3026–3033. Doi: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.3026>
67. **Richardson V. 2008.** Diseases of Domestic Guinea Pigs. 2a. Diseases of Domestic Guinea Pigs. Oxford: Blackwell Science. 153 p.
68. **Salcedo S, Holden D. 2003.** SseG, a virulence protein that targets *Salmonella* to the Golgi network. *EMBO J*; 22:5003-14. Doi: 10.1093/emboj/cdg517
69. **Santos R, Zhang S, Tsolis R, Bäumlér A, Adams L. 2002.** Morphologic and Molecular Characterization of *Salmonella* Typhimurium Infection in Neonatal Calves. *Vet Pathol* 39: 200-215. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00072-X>
70. **Santos R, Bäumlér A. 2004.** Cell tropism of *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol*; 294: 225-33. Doi: 10.1016/j.ijmm.2004.06.029
71. **Schroeder N, Mota L, Méresse S. 2011.** *Salmonella*-induced tubular networks. *Trends Microbiol*; 19: 268-77. Doi: 10.1016/j.tim.2011.01.006.
72. **Simon R, Tennant S, Galen J, Levine M. 2011.** Mouse models to assess the efficacy of non-typhoidal *Salmonella* vaccines: revisiting the role of host innate susceptibility and routes of challenge. *National Institute of Health*, 29(32), 5094–5106 p. Doi: 10.1016/j.vaccine.2011.05.022.Mouse

73. **Souwer Y, Griekspoor A, de Wit J, Martinoli C, Zagato E, Janssen H, et al. 2012.** Selective infection of antigen-specific B lymphocytes by *Salmonella* mediates bacterial survival and systemic spreading of infection. PLoS One; 7: e50667. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050667>
74. **Suzuki K, Kawamoto S, Maruya M, Fagarasa S. 2010.** GALT: organization and dynamics leading to IgA synthesis. Adv Immunol; 107: 153-85. Doi: 10.1016/B978-0-12-381300-8.00006-X.
75. **Swart L, Hensel M. 2012.** Interactions of *Salmonella enterica* with dendritic cells Virulence; 3: 660-7. Doi: 10.4161/viru.22761.
76. **Tahoun A, Mahajan S, Paxton E, Marterer G, Donaldson D, Wang D, Tan A, Gillespie T, O'Shea M, Roe A, Shaw D, Gally D, Lengeling A, Mabbott N, Haas J, Mahajan A. 2012.** *Salmonella* Transforms Follicle-Associated Epithelial Cells into M cells to Promote Intestinal Invasion. Cell Host Microbe; 12:645-56.
77. **Tam M, Rydström A, Sundquist M, Wick M. 2008.** Early cellular responses to *Salmonella* infection: dendritic cells, monocytes, and more. Immunol Rev; 225:140-62. Doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00679. x.
78. **Telles R. 2017.** Factores de riesgo de Salmonelosis en las granjas de cuyes del Valle Viejo de Tacna. Tesis doctoral. Tacna: Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. 179 p.
79. **Tizard I. 2009.** Introducción a la Inmunología Veterinaria. 8^{va} ed. Barcelona: Elsevier. 592 p.
80. **Uzzau S, Brown D, Wallis T, Rubino S, Leori G, Bernard S, Casadeus J, Platt D, Olsen J. 2000.** Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. Epidemiol Infect 125, 229-255.
81. **Willey J, Sherwood L, Woolverton C. 2008.** Prescott, Harley and Klein's Microbiology. 7^a ed. Nueva York: McGraw-Hill. 1222 p.
82. **Worley M, Nieman G, Geddes K, Heffron F. 2006.** *Salmonella* Typhimurium disseminates within its host by manipulating the motility of infected cells. Proc Natl Acad Sci USA; 103:17915-20. Doi: 10.1073/pnas.0604054103
83. **Zhang X, Kelly S, Bollen W, Curtis R. 1997.** 3rd Characterization and immunogenicity of *Salmonella* Typhimurium SL1344 and UK-1 Δ crp and Δ cdt deletion mutants. Infect Immun. 1465(12):5381-7.
84. **Zuñiga J, Tur J, Milocco S, Piñeiro R. 2001.** Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal. Primera edición. Editorial Interamericana. 682p.

