



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Unidad de Posgrado

“Caracterización molecular de cepas de *Salmonella typhimurium* aisladas de cobayos provenientes de granjas de producción”

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biología

Molecular

AUTOR

Guillermo Santos SALVATIERRA RODRÍGUEZ

ASESOR

Abelardo Lenin MATURRANO HERNÁNDEZ

Lima, Perú

2018

DEDICATORIA

A mis abuelos que siempre guían mi camino.
A mis padres por su apoyo incondicional desde siempre.
A mis hermanos y sobrino Mathias que llenan de alegría mis días.
A Mari, Iris, Pame y Sandrita, por su amistad y compartir muchos momentos inolvidables.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Lenin Maturrano mi asesor de tesis. Siempre agradeceré la confianza que depositó en mí desde el primer día. También por darme la oportunidad de realizar la tesis y de integrarme al equipo de laboratorio.

A Rocío Rimac, por su apoyo incondicional durante todo el proceso de realización de la tesis. Y más que eso, una gran amiga.

Al equipo de laboratorio, por su amistad y por hacer cada día de trabajo una alegría.

Al Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad – Innóvate Perú, fuente financiadora del Proyecto «Desarrollo de una vacuna para el control y prevención de la salmonelosis en la producción de cuyes», Contrato N° 362-PNICEP-PIAP2014, y a los propietarios de los centros de crianza de cuyes por brindar las facilidades para realizar el estudio.

CONTENIDO

| | Pág. |
|---|------|
| 1. Introducción..... | 1 |
| 2. Antecedentes..... | 2 |
| 2.1 Género <i>Salmonella</i> | 2 |
| 2.2 Patogenicidad..... | 2 |
| 2.2.1 Estrategia patogénica de <i>Salmonella</i> Typhimurium..... | 2 |
| 2.2.2 Vías de invasión intracelular..... | 3 |
| 2.2.3 Sistema de secreción tipo 3 (T3SS) y proteínas efectoras..... | 4 |
| 2.2.4 Supervivencia intracelular: T3SS-1 y T3SS-2..... | 6 |
| 2.3 Desarrollo de la enfermedad..... | 7 |
| 2.4 Salmonelosis en cobayos..... | 8 |
| 2.5 PCR de elementos repetitivos (rep-PCR)..... | 9 |
| 2.5.1 ERIC PCR..... | 10 |
| 3. Hipótesis y Objetivos..... | 11 |
| 3.1 Hipótesis..... | 11 |
| 3.2 Objetivos..... | 11 |
| 3.2.1 Objetivo principal..... | 11 |
| 3.2.2 Objetivos secundarios..... | 11 |
| 4. Materiales y Métodos..... | 12 |
| 4.1 Lugar de ejecución y periodo de duración..... | 12 |
| 4.2 Descripción del material experimental..... | 12 |
| 4.3 Extracción de ADN bacteriano..... | 12 |
| 4.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)..... | 14 |
| 4.4.1 Detección de serovariedad Typhimurium..... | 14 |
| 4.4.2 Detección de factores de virulencia..... | 15 |
| 4.4.3 ERIC PCR..... | 15 |
| 4.4.4 Análisis de datos..... | 17 |
| 5. Resultados..... | 18 |
| 6. Discusión..... | 22 |
| 7. Conclusiones..... | 26 |
| 8. Referencias bibliográficas..... | 27 |
| 9. Anexos..... | 36 |
| 9.1 Anexo I: Procedencia y fecha de extracción de aislados de <i>Salmonella enterica</i> provenientes de cobayos de producción..... | 37 |
| 10. Productividad científica..... | 39 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Pág. |
|---|------|
| Figura 1. Ensayo de PCR múltiple utilizando los primers para los genes <i>fliC</i> , <i>invA</i> y <i>prof6A</i> | 18 |
| Figura 2. Ensayo de PCR múltiple utilizando los primers para los genes <i>sipB</i> , <i>spvB</i> , <i>spiA</i> y <i>tolC</i> | 19 |
| Figura 3. Ensayo de PCR múltiple utilizando los primers para los genes <i>sitC</i> , <i>lpfC</i> , <i>sifA</i> , <i>sopB</i> y <i>pefA</i> | 19 |
| Figura 4. Dendrograma en el que se muestra los resultados de ERIC-PCR de 80 aislados de <i>Salmonella</i> Typhimurium incluidas en el estudio..... | 21 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Pág. |
|---|------|
| Tabla N°1. Secuencia y tamaño (pb) de primers (F-R) utilizados en la PCR múltiple..... | 14 |
| Tabla N°2. Primers utilizados para la detección de genes de virulencia..... | 16 |

RESUMEN

La salmonelosis es considerada la enfermedad más grave que afecta a los cobayos, causando altas tasas de mortalidad y morbilidad, principalmente por los serovares Typhimurium y Enteritidis. Para que se lleve a cabo la infección, debe existir la expresión de diversos grupos de genes que permitan a la bacteria adherirse, multiplicarse y sobrevivir a las defensas del hospedero. El objetivo del estudio fue caracterizar molecularmente aislados de *Salmonella enterica* provenientes del cepario del Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Se utilizaron 80 aislados, 70 obtenidos de cobayos infectados naturalmente y cinco de clínicamente sanos, procedentes de granjas de producción intensiva ubicadas en Lima y Junín, Perú. Se utilizó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) múltiple para la detección de genes *invA*, *prot6E* y *fliC*, correspondientes al género *Salmonella*, serovar Enteritidis y Typhimurium, respectivamente. También se detectaron los genes de virulencia *tolC*, *sitC*, *spiA*, *sopB*, *lpfC*, *sifA*, *spvB*, *pefA* y *sipB*, necesarios para producir la enfermedad. Finalmente, se evaluó la variabilidad genética mediante la técnica de ERIC-PCR utilizando los primers ERIC1R y ERIC2. Para evaluar la diversidad de los aislados, se realizó el análisis de agrupamiento para generar un dendrograma usando el programa bioinformático NTSYSpc 2.10, empleando el método UPGMA basado en el coeficiente de similitud de DICE. Se identificó la serovariedad Typhimurium y los nueve genes de virulencia en el 100% de los aislados. La evaluación de los perfiles electroforéticos obtenidos por la técnica de ERIC-PCR demostró patrones de bandas de ADN similares con una homogeneidad mayor al 90%, lo que sugiere una dispersión clonal de los aislados. La presencia de cepas de *Salmonella* Typhimurium con una amplia variedad de genes de virulencia constituyen un riesgo potencial para la producción de cobayos y una fuente de contaminación alimentaria o por contacto al humano.

Palabras clave: *Salmonella enterica*, salmonelosis, factor de virulencia, cobayos, diversidad genética

ABSTRACT

Salmonellosis is considered the most serious disease affecting guinea pigs, with high mortality and morbidity rates. *Salmonella* Typhimurium is the serovar commonly involved followed by Enteritidis. The expression of various groups of genes allows *Salmonella* to adhere, multiply and survive the host's defenses. The aim of the study was to characterize 80 isolates of *Salmonella enterica*. 70 were obtained from naturally infected and five from clinically healthy farm-raised guinea pigs from Lima and Junin, Peru. The study was carried out at Molecular Biology and Genetics Section of the Microbiology and Parasitology Laboratory of the School of Veterinary Medicine at the Universidad Nacional Mayor de San Marcos. A Multiplex PCR technique was performed for *invA*, *prot6E* and *fliC* genes detection, corresponding to *Salmonella* genus, Enteritidis and Typhimurium serovars, respectively. Virulence genes were detected by a Multiplex PCR: *toIC*, *sitC*, *spiA*, *sopB*, *lpfC*, *sifA*, *spvB*, *pefA* and *sipB*. Finally, genetic diversity was evaluated by ERIC-PCR technique using ERIC1R and ERIC2 primers. A cluster analysis was performed to generate a dendrogram using the bioinformatic program NTSYSpc 2.10 and the UPGMA method based on the DICE similarity coefficient. Typhimurium serovar was identified in 100% of the isolates. The 9 virulence genes included in the study were present in 100% of the isolates. The evaluation of the electrophoretic profiles obtained by the ERIC-PCR technique showed high homogeneity, with patterns of similar DNA bands with a homogeneity greater than 90%. These results suggest a clonal dispersion of the isolates between. Additionally, the detection of *Salmonella* Typhimurium strains with a wide variety of virulence genes supposes a potential risk for guinea pigs production and a contamination source to humans.

Keywords: *Salmonella enterica*, salmonellosis, virulence genes, farm-raised guinea pigs, genetic diversity

1. INTRODUCCIÓN

La salmonelosis es la enfermedad más grave que afecta a los cobayos causando alta mortalidad y morbilidad (Chauca, 1997). Existen actualmente más de 2610 serovariedades de *Salmonella* reconocidas en todo el mundo, y casi todas son capaces de causar enfermedad en humanos y animales (Guibourdenche *et al.*, 2010). Los principales serovares aislados de cobayos son Typhimurium y Enteritidis (Richardson, 2000) los cuales son los principalmente relacionados a casos de zoonosis (Fardsanei *et al.*, 2016). Para que ocurra la enfermedad, el proceso de infección debe seguir ciertos pasos: adhesión bacteriana, invasión, maduración de vacuola conteniendo a *Salmonella* (SCV), replicación y diseminación sistémica. En todas estas fases, el microorganismo deberá sobreponerse a las defensas del hospedero. Esta adaptación ocurre debido a una coordinada expresión de múltiples genes en respuesta a señales específicas presentes en el hospedero (Majdalani y Gottesman, 2005; Stock *et al.*, 2000). Se han identificado una gran cantidad de genes involucrados en la codificación de factores de virulencia y el rol que juegan en la patogénesis. La detección de genes de virulencia en *Salmonella* es de gran utilidad para conocer el poder patogénico de los aislados, por el riesgo zoonótico que implica.

El método de rep-PCR utiliza primers que hibridan secuencias intergénicas no codificantes dispersos en todo el genoma y se han utilizado satisfactoriamente muchas familias de secuencias repetitivas tales como las secuencias intergénicas de consenso repetitivas de enterobacterias (ERIC), palíndromos repetitivos extragénicos (REP) y secuencias BOX. Estas secuencias han sido utilizadas para la caracterización de *Salmonella* en la distinción de especies, cepas, serovares, etc. (Lupiski *et al.*, 1992; Versalovic *et al.*, 1994; Rampadarath *et al.*, 2015). Una de las aplicaciones actuales para estas técnicas es la identificación de polimorfismos genéticos para determinar variabilidad y delinear relaciones epidemiológicas en la vigilancia y monitoreo de brotes (Lim *et al.*, 2005; Tunung *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008; Prasertsee *et al.*, 2016). El objetivo del estudio fue caracterizar molecularmente cepas de *Salmonella* Typhimurium aisladas de cobayos provenientes de granjas de producción, mediante la detección de genes de virulencia y secuencias repetitivas.

2. ANTECEDENTES

2.1 GÉNERO *Salmonella*

Las bacterias que pertenecen al género *Salmonella* están incluidas en la familia *Enterobacteriaceae*. Son bacilos Gram negativos, móviles por flagelos peritricos (excepto los serovares Gallinarum y Pullorum), no tienen la capacidad de esporular y son anaerobios facultativos. Poseen un diámetro de 0.7 a 1.5 μm y un largo de 2 a 5 μm (Murray *et al.*, 1999; Coburn *et al.*, 2007). La clasificación actual de *Salmonella* es extremadamente compleja y está definida según el esquema de Kauffmann-White (Grimont y Weill, 2007). Su caracterización da como resultado la división del género en dos especies: *S. enterica* y *S. bongori*. A su vez, *S. enterica* se subdivide en 6 subespecies basándose en las diferencias bioquímicas. El género *Salmonella* está a su vez, dividido actualmente por serología en más de 2610 serovariedades (Guibourdenche *et al.*, 2010).

2.2 PATOGENICIDAD

Salmonella Typhimurium es un patógeno entérico primario que infecta tanto animales como humanos. La infección inicia con la ingestión de agua o alimento contaminado, permitiendo a las salmonelas alcanzar el epitelio intestinal y ocasionar enfermedad. La infección puede diseminarse después de la invasión del epitelio intestinal e internalización en macrófagos. Para lograr este proceso patogénico, el cromosoma de *Salmonella* compromete muchos mecanismos relacionados a genes de virulencia, los cuales contribuyen de manera secuencial para cumplir su propósito (Fabrega y Vila, 2013).

2.2.1 ESTRATEGIA PATOGENICA DE *Salmonella* Typhimurium

La infección inicia con la ingestión de estos microorganismos en agua y alimentos contaminados. El primer obstáculo por el que debe pasaren el hospedador es el pH ácido del estómago. Para protegerse de este shock ácido, activa una respuesta de tolerancia al ácido (ATR) que le provee una función homeostática que mantiene el pH intracelular más alto que el ambiente extracelular. Por ello, la habilidad de percibir ambientes de bajo pH y de

responder a ese estrés, es crucial para su supervivencia y patogenicidad (Foster y Hall, 1991; Fabrega y Vila, 2013; Ryan *et al.*, 2015). Después de entrar al intestino delgado, las salmonelas deben alcanzar y atravesar la capa de mucus intestinal antes de adherirse a las células del epitelio. El mucus bloquea el contacto entre la monocapa y las bacterias (Hallstrom y McCormick, 2011; Fabrega y Vila, 2013). Sin embargo, Vimal *et al.* (2000) demostraron que *Salmonella* Typhimurium es capaz de unirse específicamente a una mucina de 250 kDa del mucus del tracto intestinal. *Salmonella* se adhiere preferentemente a las células M de las placas de Peyer (PP), aunque también se ha reportado invasión en enterocitos (Takeuchi, 1967; Fabrega y Vila, 2013). Las células M forman parte del GALT (tejido linfoide asociado a intestino) y constantemente transportan bacterias y antígenos del lumen al tejido linfoide adyacente (MacDonald y Monteleone, 2005). En modelos murinos, el pasaje de las bacterias a través de la pared intestinal es iniciado por transocitosis sea por células M o enterocitos, migración basolateral y exocitosis en el espacio intersticial de la lámina propia (Muller *et al.*, 2012). Adicionalmente, se ha reportado la captación directa por fagocito CD18⁺ y CD11b⁺, CD11c⁺, CX₃CR1^{high} (Vásquez-Torres *et al.*, 1999; Muller *et al.*, 2012). Dentro de la lámina propia, *Salmonella* Typhimurium es captada rápidamente por fagocitos y se disemina por los vasos linfáticos a través de los nódulos linfáticos mesentéricos y el torrente sanguíneo al bazo e hígado (Salcedo *et al.*, 2001).

2.2.2 Vías de invasión celular

El ingreso de *Salmonella* a las células del hospedador es crítico para su supervivencia y establecimiento de la enfermedad. *Salmonella* ingresa a las células mediante dos mecanismos claramente diferenciados morfológica y funcionalmente. Uno de ellos, llamado “Trigger”, involucra el ingreso de proteínas efectoras mediadas por un sistema de secreción tipo III codificada por la isla de patogenicidad 1 (SPI T3SS o T3SS-1) y los posteriores rearrreglos considerables en el citoesqueleto celular. El otro mecanismo, llamado “Zipper”, es considerado una entrada mediada por receptores con modificaciones de citoesqueleto menores y se inicia por la interacción entre receptores celulares del hospedador y ligandos específicos de la bacteria (Rosselin *et al.*, 2011). Ambos mecanismos usan las proteínas Rho guanosina trifosfato (RhoGTPasas), logrando manipular

la arquitectura celular e inducir las modificaciones citoesqueléticas (Cossart y Sansonetti, 2004). Una diferencia importante entre ambos mecanismos es que el “Trigger” es formado desde adentro de la célula vía proteínas efectoras transportadas por un TTSS, mientras que el mecanismo “Zipper” es promovido desde el exterior de la célula del hospedador, mediante la activación de receptores celulares (Rosselin *et al.*, 2011).

2.2.3 Sistema de secreción tipo 3 (T3SS) y proteínas efectoras

Salmonella percibe las características externas de pH, tensión de oxígeno y osmolaridad, permitiendo la expresión de genes que codifican para T3SS-1 y su ensamblaje (Rosselin *et al.*, 2011; Rosselin *et al.*, 2012). La unión a la superficie celular es dada por su afinidad al colesterol (Hayward *et al.*, 2005). Este contacto permite la translocación de las proteínas efectoras mediante un T3SS codificado por SP1. Esta translocación es coordinada de una manera precisa asegurando que las proteínas ingresen en el orden correcto al citoplasma de la célula del hospedador, lo que asegura la secreción de las translocasas SipB, SipC y SipD, antes de las proteínas efectoras (Lara-Tejero *et al.*, 2011). La entrada es caracterizada por arreglos en la actina del citoesqueleto en el lugar de contacto con la bacteria lo que permite la internalización en vacuolas.

Salmonella “obliga” a la célula a formar proyecciones citoplasmáticas e internalizarla en un fagosoma modificado conocido como SCV (*Salmonella*-containing vacuole), un compartimento en el cual *Salmonella* puede sobrevivir y replicarse (Finlay *et al.*, 1991; Galán y Zhou, 2000; Galán, 2001; Patel y Galán, 2005). Se han descrito más de 30 proteínas efectoras que pueden translocarse en las células mediante T3SS-1 para inducir la entrada de *Salmonella* a células no fagocíticas. Entre ellos, cinco han sido reconocidos como capaces de manipular la maquinaria citoesquelética (SopE, SopE2, SopB, SipA y SipC) (McGhie *et al.*, 2009). SopE, SopE2 y SopB tienen como molécula diana a RhoGTPasa y promueven la activación de los miembros de la familia Rho Cdc42 y Rac, llevando a la activación de los complejos WASP y Scar/WAVE-Arp2/Arp3 (Arp2/3) que conllevan la remodelación de actina. Estos efectores son clave para la entrada de *Salmonella*. Zhou *et al.* (2001) demostraron que las cepas de *Salmonella* que carezcan de algunos de estos efectores, pueden ingresar a las

células del hospedador de una manera eficiente. Sin embargo, una completa falta de estos tres efectores impide totalmente la remodelación de actina y la entrada de *Salmonella*. SopE y SopE2 funcionan como factor intercambiadores de guanina (GEFs) y catalizan de manera directa la activación de GTPasas. SopB es una fosfatasa de inositol que actúa en los fosfolípidos de membrana del hospedador y funciona directamente activando SGEF y RhoG (Patel y Galán, 2006). Hanisch *et al.* (2011) demostró que SopB también constituye un importante regulador de una vía de entrada adicional, que activa RhoA y miosina II, lo que conduce a formación de fibras de estrés y contractibilidad. SipA y SipC se unen directamente a la actina controlando y localizando la polimerización de actina en el sitio de unión a la bacteria. SipC posee dominios terminales C- y N- que permiten la nucleación de actina (F-actina) y promueve la polimerización y agrupación (Myeni y Zhou, 2010). Según experimentos realizados por Perret y Jepson (2009), se demostró que el efector SipA juega un rol importante en la inducción de los “ruffles” de membrana para la invasión en sinergia con otros efectores como SopB, SopE y SopE2. SipC promueve el reclutamiento del exocisto e incrementa la eficiencia de invasión mediante la expansión localizada de membrana (Braun y Brummel, 2010). La remodelación de actina iniciada por esos cinco factores, promoverá el “ruffling” de membrana en un tiempo aproximado de 10-30 minutos después del contacto, y una vez *Salmonella* es internalizada, la célula retoma su citoarquitectura normal 2-3 horas posteriores a la entrada (Finlay *et al.*, 1991; Galán y Zhou, 2000; Galán, 2001; Kubori y Galán, 2003; Patel y Galán, 2005). *Salmonella* ayuda a recuperar la arquitectura normal mediante la acción de SptP, un efector con actividad GAP que regresa a Cdc42 y Rac1 a un estado no activado. La interacción entre los efectores que actúan como GEFs y GAPs (SopE/SptP) se basa en su vida media posterior a la translocación. SptP muestra una mayor resistencia al sistema de proteosoma-ubiquitina celular, en comparación con SopE (Kubori y Galán, 2003).

Después de la entrada, SopB juega un papel importante en la biogénesis de SCV. Inicialmente, la SCV adquiere los marcadores endosómicos tempranos, los cuales son reemplazados por los tardíos y marcadores lisosomales. Sin embargo, la SCV no se fusiona directamente con los lisosomas, evitando así la destrucción de *Salmonella*. Esto es debido parcialmente a la actividad fosfoinositol fosfatasa de SopB (Rudge *et al.*, 2004). Mediante la reducción de la

concentración local de PI (4,5)P₂, SopB y SopD desestabilizan las interacciones entre citoesqueleto y membrana plasmática, reduciendo la rigidez de membrana y promoviendo así la fisión y el sellado de la SCV futura (Bakowski *et al.*, 2007). *Salmonella* regula la biogénesis de la SCV limitando interacciones con la vía endocítica y particularmente bloqueando la fusión con el lisosoma. Estudios realizados sobre la biogénesis de la SCV determinaron la ausencia o la presencia en niveles no significativos de hidrolasas lisosómicas o receptores de manosa-6-fosfato involucrados en el tráfico de catepsinas (García-del Portillo y Finlay, 1995; Rathman *et al.*, 1997). Durante el progreso de la infección, *Salmonella* utiliza un segundo tipo de T3SS codificado por SPI-2 (T3SS-2), que transporta proteínas efectoras adicionales a través de la SCV permitiendo la supervivencia y replicación (Malik-Kale *et al.*, 2011).

2.2.4 Supervivencia intracelular: T3SS-1 y T3SS-2

La multiplicación bacteriana se inicia 4-6 horas post invasión y es acompañada de la extensión de túbulos ricos en Lamp1 (Sifs – filamentos inducidos por *Salmonella*) en la superficie de las SCV (García-del Portillo *et al.*, 1993). El T3SS-2 es inducido después de la invasión y es requerido para eventos tardíos en la biogénesis de la SCV: replicación y formación de Sifs (Waterman y Holden, 2003). Inmediatamente después de su formación, la SCV sufre cambios y remodelamientos en su membrana. Estos cambios son dados principalmente por el efector de T3SS-1 SopB (Kubori y Galán, 2003). Este efector es requerido para reducir niveles de PI(4,5)P₂ cargado negativamente y fosfatidilserina de las SCV, lo que resulta en la disociación de proteínas Rab y sirve para retrasar la fusión lisosoma-SCV, como se mencionó anteriormente (Rudge *et al.*, 2004; Bakowski *et al.*, 2010). *Salmonella* utiliza un transporte mediado por dineínas a través de los microtúbulos para llegar a la posición yuxtannuclear adyacente al centro de organización de microtúbulos (MTOC). Esta localización es importante para acceder a una fuente de componentes celulares llevados por dineínas por los microtúbulos (Wileman, 2007). El movimiento de la SCV al MTOC, así como el mantenimiento en esa posición, es un proceso multifactorial que involucra efectores T3SS-2: SseF, SseG y SifA, así como efectores T3SS-1: SipA y SopB (Salcedo y Holden, 2003; Abrahams *et al.*, 2006; Wasylanka *et al.*, 2008). Durante las fases tardías de infección (>6 horas), las SCVs se mantienen en la posición

yuxtannuclear (Abrahams *et al.*, 2006). Al mismo tiempo que se mantiene en esa posición, genera una red tubular dinámica mediante el uso de efectores que exhiben actividades cooperativas y antagónicas.

2.3 Desarrollo de la enfermedad

Después de la colonización del intestino e invasión posterior, ocurre una inflamación significativa que incluye infiltración local y difusa de polimorfonucleares (PMN), abscesos en criptas, necrosis epitelial, edema y secreción (Clarke y Gyles, 1987; Finlay *et al.*, 1989). La enterocolitis ocasionada por *Salmonella* Typhimurium en murinos es severa en el íleo caudal, ciego y colon (McCormick *et al.*, 1993). El reclutamiento de neutrófilos ocurre dentro de las primeras tres horas de infección. Durante las 8-10 horas posteriores a la infección, ocurre una migración masiva de neutrófilos y la secreción de exudado rico en proteínas en el lumen intestinal. La diarrea no inicia hasta 8-72 horas después de la colonización bacteriana (Wray y Sojka, 1978; Tsolis *et al.*, 1999). Andrade y Andrade (2003) determinaron los puntos necesarios para el entendimiento de la patogenia de la *Salmonella* desde un punto de vista celular y molecular. Estos incluyen el sistema de secreción tipo III (T3SS), los genes de virulencia codificados por diferentes Sips (proteína de invasión de *Salmonella*) llamados SipA, B, C, D y E, función de los receptores Toll R2 y R4 presentes en la superficie de los macrófagos, las líneas de defensa entre el lumen intestinal y órganos internos, y el rol fundamental de las células endoteliales en la inflamación. Posterior a la invasión e internalización por los procesos descritos anteriormente, las bacterias llegan rápidamente a las células presentadoras de antígenos (APC) ubicadas bajo el epitelio intestinal, siendo parcialmente fagocitadas y neutralizadas. Los fagocitos infectados se agrupan y forman la primera línea de defensa y forman las lesiones patológicas rodeadas de tejido sano. Algunas bacterias escapan esta barrera y llegan a los folículos linfáticos. Los linfocitos salen de los nódulos linfáticos y pueden alcanzar el hígado y bazo mediante el sistema retículo endotelial. En estos órganos las bacterias son usualmente destruidas. Sin embargo, *Salmonella* tiene la capacidad de sobrevivir y multiplicarse en células fagocíticas mononucleares (House *et al.*, 2001). Dependiendo del número de bacterias, la virulencia de las cepas y la respuesta inmune del hospedador, la bacteria puede alcanzar el torrente

sanguíneo. Esta fase se caracteriza por la diseminación del microorganismo a distintos órganos como el hígado, bazo, médula ósea, vesícula biliar y placas de Peyer en el íleo terminal. La compleja patogénesis de *Salmonella* capaz de causar enfermedad sistémica está correlacionada con la presencia de un gran número de factores de virulencia codificados por una gran diversidad de genes (Groisman y Ochman, 1997; Skyberg *et al.*, 2006). *Salmonella* es una bacteria patógena que tiene una gran adaptación al nicho intracelular. Los estudios mencionados han permitido entender el complejo proceso de interacciones entre la bacteria y su hospedador a nivel celular y molecular.

2.4 SALMONELOSIS EN COBAYOS

La salmonelosis es la enfermedad más grave que afecta a los cobayos ocasionando altas tasas de mortalidad y morbilidad (Chauca, 1997). Es una enfermedad que se encuentra ampliamente distribuida en el territorio peruano (Aliaga, 1995). Diversos serovares han sido aislados de cobayos como *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Florida*, *S. Bredeney*, *S. Pomona*, *S. Dublin*, *S. Ochigou* y *S. Limite* (Garmendia *et al.*, 2000). Entre ellos, *Typhimurium* y *Enteritidis* son los serovares aislados en la mayoría de los casos, ambos implicados en casos de zoonosis (Richardson, 2000; Fardsanei *et al.*, 2016). En el Perú, se considera que *S. Typhimurium* está implicada en un 95% de los casos de salmonelosis en cobayos (Ramírez, 1972; Chauca, 1997; Matsuura, 2008).

La forma aguda de la enfermedad se caracteriza por un cuadro septicémico y muerte en 24-48 horas, muchas veces sin la presencia de signos clínicos. Puede observarse: decaimiento, postración, anorexia, opistótonos, parálisis de miembros posteriores, diarrea mucosa y abortos. En la manifestación crónica de la enfermedad se observa un adelgazamiento paulatino, pelaje hirsuto y distensión abdominal (Ramírez, 1972; Bustamante, 1993; Evans, 2005). Se ha reportado la presencia de cepas de *Salmonella Typhimurium* en cobayos clínicamente sanos, lo que amplía la posibilidad de portadores sanos de la enfermedad como diseminadores potenciales de bacterias (Chero *et al.*, 2017).

La transmisión entre cobayos puede ser por contacto directo o indirecto. Los animales infectados excretan la bacteria por las heces y contaminan el ambiente

que los rodea incluyendo el alimento. Los animales se infectan por vía oral al consumir agua o alimentos contaminados. Radostits *et al.* (2002) señalan que las vías de transmisión aerógenas y conjuntivales son plausibles. La manera común de ingreso de *Salmonella* a la granja de producción de cobayos es debido a las malas prácticas de manejo: deficiente nivel de bioseguridad, presencia de roedores y aves, ingreso no controlado de personal y estrés ocasionado por sonidos y variaciones de temperatura y humedad (Ramírez, 1972).

2.5 PCR de elementos repetitivos (rep-PCR)

La reacción en cadena de polimerasa de elementos repetitivos (rep-PCR) se basa en la identificación de patrones de huellas genéticas para la clasificación de aislados bacterianos. El método de rep-PCR utiliza primers que hibridan secuencias intergénicas no codificantes dispersos en todo el genoma. El DNA entre los elementos repetitivos adyacentes es amplificado utilizando una PCR y se pueden producir muchos amplicones, dependiendo de la distribución de estos elementos repetitivos en el genoma. El tamaño de estos amplicones son caracterizados mediante una electroforesis, y los patrones de bandas son comparados para determinar la relación genética entre los aislados bacterianos que son analizados. Se han utilizado satisfactoriamente muchas familias de secuencias repetitivas tales como las secuencias intergénicas de consenso repetitivas de enterobacterias (ERIC), palíndromos repetitivos extragénicos (REP) y secuencias BOX. Estas secuencias han sido utilizadas para la caracterización de bacterias en la distinción de especies, cepas, serotipos, etc. y han resultado ser de mucha utilidad en el estudio de diversidad microbiana (Lupiski *et al.*, 1992; Versalovic *et al.*, 1994; Rampadarath *et al.*, 2015).

2.5.1 ERIC-PCR

Sharples y Lloyd (1990) reportaron elementos repetitivos de ADN altamente conservados localizados en regiones intergénicas del cromosoma de *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium y otras bacterias. Estas unidades repetitivas intergénicas (IRUs) de 124-124 nucleótidos tenían el potencial de formar estructuras loop estables. Se describió que la localización de estas secuencias dentro de regiones intergénicas era variable. Un año más tarde,

Hulton *et al.* (1991) describieron las mismas secuencias intergénicas altamente conservadas, denominándolas secuencias intergénicas de consenso repetitivas de enterobacterias (ERIC) en *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Vibrio cholerae*. Estas secuencias fueron descritas de 126-127pb y restringidas al genoma, ya sea en regiones intergénicas de operones policistrónicos o en regiones no traducidas de marcos de lectura abiertos, y con ubicación variable entre especies. Se han utilizado en los últimos años como una herramienta útil para la genotipificación de *Salmonella*. Saxena *et al.* (2002) utilizaron la técnica de ERIC-PCR para la tipificación molecular de 24 aislados de *Salmonella* correspondientes a las serovariedades Abortusequi, Cholerasuis, Bareilly y Dublin. Encontraron 21 genotipos distintos, lo que demostró el alto poder discriminatorio de la prueba y su utilidad en la tipificación molecular de *Salmonella*. Lee *et al.* (2008) caracterizaron un total de 48 aislados de *Salmonella* Agona y 33 aislados de *Salmonella* Weltevreden mediante ERIC-PCR y lograron diferenciarlas en 7 clusters y 3 cepas independientes. Con este estudio demostraron que la prueba de ERIC-PCR posee una buena capacidad discriminatoria inclusive para subclasificar dentro de una misma serovariedad.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

Los aislados de *Salmonella* Typhimurium obtenidos de cobayos presentan al menos dos genes asociados a virulencia y existe diversidad genética entre ellos.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo principal

Caracterizar mediante técnicas moleculares aislados de *Salmonella* Typhimurium provenientes de cobayos de granjas de producción.

3.2.2 Objetivos específicos

- Detectar los genes asociados a virulencia de los aislados de *Salmonella* Typhimurium identificados.
- Identificar la diversidad genética de los aislados de *Salmonella* Typhimurium.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Lugar de ejecución y periodo de duración

El procesamiento se realizó en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología – Sección de Biología y Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, durante los meses de setiembre a octubre de 2016.

4.2 Descripción del material experimental:

Se utilizaron aislados de *Salmonella* provenientes del cepario del laboratorio. Se analizaron un total de 80 aislados de *Salmonella enterica* obtenidos de cobayos: 70 fueron recuperados de muestras de hígado y vesícula biliar de cobayos diagnosticados con salmonelosis. Los otros 10 fueron recuperados a partir de muestras de hisopado rectal de cobayos clínicamente sanos. Los aislados fueron obtenidos de tres centros de producción intensiva ubicados en los distritos de Huaral y Manchay en Lima Perú, y uno ubicado en Huancayo, Junín-Perú. Las granjas, presentan casos de salmonelosis de manera continua, con un incremento en las estaciones de incremento de temperatura, presentando brotes focalizados.

4.3 Extracción de ADN Bacteriano

Se realizó la extracción de ADN con el kit “GeneJET Genomic DNA Purification Kit” de Thermo Scientific™, según indicaciones del fabricante para bacterias Gram negativas, siguiendo los pasos de lisis nucleica, degradación de RNA, precipitación proteica, lavado con alcoholes y rehidratación del ADN (Thermo Fisher Scientific, 2014).

El protocolo se desarrolló de la siguiente manera :

1. Se recuperaron aproximadamente 2×10^9 células bacterianas en un tubo de 1,5ml y se centrifugó durante 10 minutos a 5000xg. Se descartó el sobrenadante.
2. Se resuspendió el sedimento en 180µL de solución de digestión. Se añadió 20µL de solución de proteinasa K y se mezcló agitando en un vórtex hasta obtener una suspensión uniforme.
3. Se incubó la muestra a 56 °C durante 30 minutos agitando con un vórtex.
4. Se añadió 20 µL de solución de RNasa A, se mezcló mediante agitación con la ayuda de un vórtex y se incubó la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Se agregó 200µL de solución de lisis a la muestra. Se mezcló completamente agitando en vórtex durante 15 segundos hasta que se obtenga una mezcla homogénea.
6. Se agregaron 400µL de etanol al 50% y se mezcló utilizando un vórtex.
7. Se transfirió el lisado a una columna de purificación de ADN genómico GeneJET insertado en un tubo de recolección. Se centrifugó la columna durante 1 minuto a 6000xg. Se descartó el tubo de recolección y se colocó la columna de purificación de ADN genómico en un nuevo tubo de recolección de 2 ml.
8. Se agregaron 500µL de tampón de lavado I (con etanol añadido) y se centrifugó durante 1 minuto a 8000xg.
9. Se desechó el flujo y se colocó la columna de purificación de nuevo en el tubo de colección.
10. Se añadieron 500µL de solución de lavado II (con etanol añadido) y se centrifugó durante 3 minutos a velocidad máxima ($\geq 12000xg$).
11. Se desechó el tubo de recolección que contenía la solución de flujo y se transfirió la columna de purificación de ADN genómico GeneJET en un tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 ml.
12. Se agregaron 200 µL de tampón de elución, se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó durante 1 minuto a 8000xg.
13. Se almacenó el ADN extraído a -20°C hasta su uso.

4.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

4.4.1 Detección de serovariedad Typhimurium

Se realizó una PCR múltiple para la detección del gen *invA* que permite determinar que el DNA extraído corresponde al género *Salmonella*, y los genes *fliC* y *prot6A* que permiten determinar la serovariedad Typhimurium y Enteritidis, respectivamente (Jamshidi *et al.*, 2010). El protocolo ha sido estandarizado en la Sección de Biología y Genética Molecular de la Facultad (Díaz *et al.*, 2017; Marcelo *et al.*, 2017).

Las secuencias de oligonucleótidos están descritas en la Tabla 1 (Jamshidi *et al.*, 2010). Se trabajó con un volumen de reacción de 15µl que contenía: 2µl de ADN, 7,5µl QIAGEN Master Mix Multiplex, los primers para detección de genes *invA* y *prot6A* en concentración de 1µM y el primer para detección del gen *fliC* en concentración de 0,5µM. Adicionalmente a los aislados, se utilizaron controles: *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 y *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076. Las condiciones de los ciclos fueron 5 minutos a 95°C para una desnaturalización inicial, 35 ciclos de 45 segundos a 95°C para desnaturalización, 45 segundos a 58°C para hibridación, 45 segundos a 72°C para elongación y 7 minutos a 72°C para una elongación final. Para la PCR se utilizó un termociclador Bio-Rad MyCycler.

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis utilizando un gel de agarosa al 1,5%, un marcador de peso molecular de 100 bp y TBE como buffer de corrida, a 100V y 100 mA por 2 horas. El gel fue teñido con bromuro de etidio (1 µg/ml) y se observaron las bandas en el transiluminador UV para obtener una fotografía.

Tabla 1. Secuencia y tamaño (pb) de primers (F-R) utilizados en la PCR múltiple.

| Gen | Cebador | Secuencia Cebador 5' – 3' | Producto (pb) |
|---------------|------------|-----------------------------|---------------|
| <i>invA</i> | S139-F | GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA | 284 |
| | S141-R | TCATCGCACCGTCAAAGGAACC | |
| <i>fliC</i> | Fli15-F | CGGTGTTGCCAGGTTGGTAAT | 559 |
| | Tym-R | ACTCTTGCTGGCGGTGCGACTT | |
| <i>prot6E</i> | Prot6e-5-F | ATATCGTCGTTGCTGCTTCC | 185 |
| | Prot6e-6-R | CATTGTTCCACCGTCACTTTG | |

4.4.2 Detección de factores de virulencia

Se detectaron mediante PCR múltiple, genes asociados a virulencia en *Salmonella*. Los primers utilizados son detallados en la Tabla 2 (Skyberg *et al.*, 2006). Se trabajó con un volumen de reacción de 25µl que contenía: 2,5µl de ADN, 12,5µl QIAGEN Master Mix Multiplex, 2,5µl de primers para detección de genes *spvB*, *sipB*, *sitC*, *lpfC* en concentración de 0,5µM y los genes *toIC*, *spiA*, *sopB*, *sifA*, *pefA* en concentración de 1µM. La PCR múltiple se realizó según Skyberg *et al.* (2006). Se llevaron a cabo dos reacciones: la primera (*spvB*, *spiA*, *sipB*, *toIC*) y la segunda (*sitC*, *lpfC*, *sifA*, *sopB* y *pefA*). Adicionalmente a los aislados, se utilizó el control: *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028. Las condiciones de los ciclos fueron 5 minutos a 95°C para una desnaturalización inicial, 30 ciclos de 30 segundos a 94°C para desnaturalización, 30 segundos a 66.5°C para hibridación, 1 minuto a 72°C para elongación y 10 minutos a 72°C para una elongación final. Para la PCR se utilizó un termociclador Bio-Rad MyCycler.

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis utilizando un gel de agarosa al 1,5%, un marcador de peso molecular de 100 bp y TBE como buffer de corrida, a 100V y 100 mA por 2 horas. El gel fue teñido con bromuro de etidio (1 µg/ml) y se observaron las bandas en el transiluminador UV para obtener una fotografía.

4.4.3 ERIC-PCR

Para detectar la diversidad genética entre las cepas, se utilizó la técnica de ERIC-PCR, empleando los primers ERIC1R: 5'- ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3' y ERIC2: 5' -AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3' (Versalovic *et al.*, 1991). Se trabajó con un volumen de reacción de 15µl que contenía: 2µl de ADN, 7.5µl QIAGEN Master Mix Multiplex y el primer BOXA1R en concentración de 2µM. Adicionalmente a los aislados, se utilizaron los siguientes controles: *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Escherichia coli* y *Pasteurella multocida*, siendo los dos últimos obtenidos del cepario de la Sección de Biología y Genética Molecular del Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la

Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Las condiciones de los ciclos fueron 5 minutos a 95°C para una desnaturalización inicial, 30 ciclos de 3 segundos a 94°C para una primera desnaturalización, 30 segundos a 92°C para una segunda desnaturalización, 1 minuto a 50°C para hibridación, 8 minutos a 65°C para elongación y 8 minutos a 65°C para una elongación final. Para la PCR se utilizó un termociclador Bio-Rad MyCycler.

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis utilizando un gel de agarosa al 1,5%, un marcador de peso molecular de 100 bp y 1000pb, TBE como buffer de corrida, a 100V y 100 mA por 3 horas. El gel fue teñido con bromuro de etidio (1 µg/ml) y se visualizaron las bandas en el transiluminador UV para obtener fotografías.

Tabla 2. Primers utilizados para la detección de genes de virulencia

| Gen | Función | Secuencia (F-R) | Producto |
|------|----------------------------------|----------------------------------|----------|
| tolC | Reconocimiento /Invasión | F-TACCCAGGCGCAAAAAGAGGCTATC | 161 bp |
| | | R-CCGCGTTATCCAGGTTGTTGC | |
| sitC | Captación de Hierro | F-CAGTATATGCTCAACGCGATGTGGGTCTCC | 768 bp |
| | | R-CGGGGCGAAAATAAAGGCTGTGATGAAC | |
| spiA | Supervivencia en Macrófagos | F-CCAGGGGTCGTTAGTGTATTGCGTGAGATG | 550 bp |
| | | R-CGCGTAACAAAGAACCCGTAGTGATGGATT | |
| sopB | Reconocimiento /Invasión | F-CGGACCGGCCAGCAACAAAACAAGAAGAAG | 220 bp |
| | | R-TAGTGATGCCCGTTATGCGTGAGTGTATT | |
| lpfC | Reconocimiento /Invasión | F-GCCCCGCCTGAAGCCTGTGTTGC | 641 bp |
| | | R-AGGTGCGCCGCTGTTTGAGGTTGGATA | |
| sifA | Formación estructura filamentosa | F-TTTGCCGAACGCGCCCCCACACG | 449 bp |
| | | R-GTTGCCTTTTCTTGCGCTTTCCACCCATCT | |
| spvB | Crecimiento en hospedador | F-CTATCAGCCCCGCACGGAGAGCAGTTTTTA | 717 bp |
| | | R-GGAGGAGGCGGTGGCGGTGGCATCATA | |
| pefA | Reconocimiento /Invasión | F-GCGCCGCTCAGCCGAACCAG | 157 bp |
| | | R-GCAGCAGAAGCCCAGGAAACAGTG | |
| sipB | Entrada a células no fagocíticas | F-GGACGCGCCCGGGAAAACTCTC | 875 bp |
| | | R-ACACTCCCGTCGCCGCCTTCACAA | |

4.4.4 Análisis de Datos

En la PCR múltiple se realizó la identificación de las bandas correspondientes a *Salmonella* spp. que fueron de 284 pb y a los serovares Typhimurium y Enteritidis de 559 pb y 185pb, respectivamente.

Para evaluar la diversidad de los aislados, se realizó el análisis de agrupamiento (clusters) para generar un dendrograma usando el programa Bioinformático NTSYSpc 2.10m, empleando para ello el método UPGMA basado en el coeficiente de similitud de DICE. La matriz de distancias se construyó a partir de datos binarios (presencia/ausencia de bandas) obtenidos del análisis de ERIC-PCR. Las distancias genéticas relativas encontradas fueron utilizadas para elaborar un dendrograma e ilustrar las relaciones genéticas calculadas a partir de los datos.

5. RESULTADOS

Se analizaron un total de 80 aislados de *Salmonella enterica* utilizando la técnica de PCR múltiple para la identificación de las serovariedades Typhimurium y Enteritidis. Todos los aislados amplificaron la secuencia *invA* de 284 pb y *fliC* de 559 pb, correspondientes al género *Salmonella* y serovariedad Typhimurium, respectivamente. No se evidenció la amplificación de la secuencia *prot6E* de 185 pb correspondiente a *Salmonella* Enteritidis (Figura 1). El 100% (80/80) de los aislados amplificaron la secuencia *fliC* de 559 pb y fueron identificados como *Salmonella* Typhimurium.

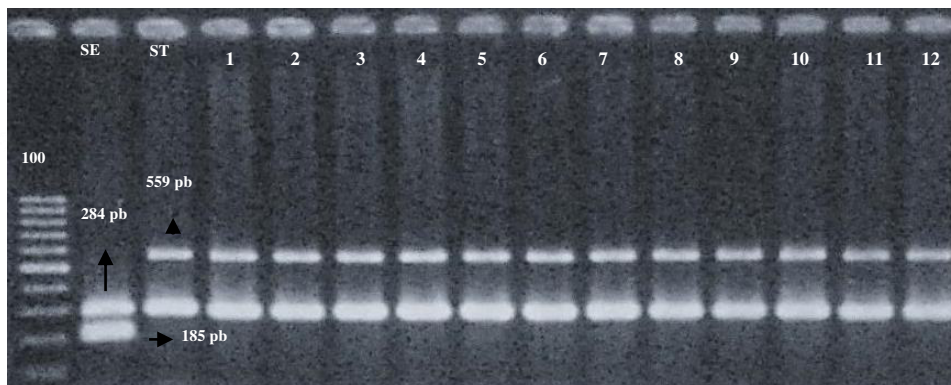


Figura 1. Ensayo de PCR múltiple utilizando 3 primers. Los productos amplificados de 559 pb del gen *fliC* específico para la serovariedad Typhimurium, de 284 pb del gen *invA* específico para género *Salmonella* spp. y de 185 pb del gen *prot6A* específico para la serovariedad Enteritidis. 100= marcador de peso molecular de 100 pb, SE= *Salmonella* Enteritidis, ST= *Salmonella* Typhimurium, 1-12= aislados analizados.

Se realizaron dos técnicas de PCR Múltiples para la detección de un total de 9 genes de virulencia. La primera reacción incluyó los genes *spvB*, *spiA*, *sipB* y

tolC y la segunda los genes *sitC*, *lpfC*, *sifA*, *sopB* y *pefA*. El 100% (80/80) de los aislados presentó los 9 genes de virulencia involucrados en el estudio. Los resultados se muestran en las Figuras 2 y 3, respectivamente.

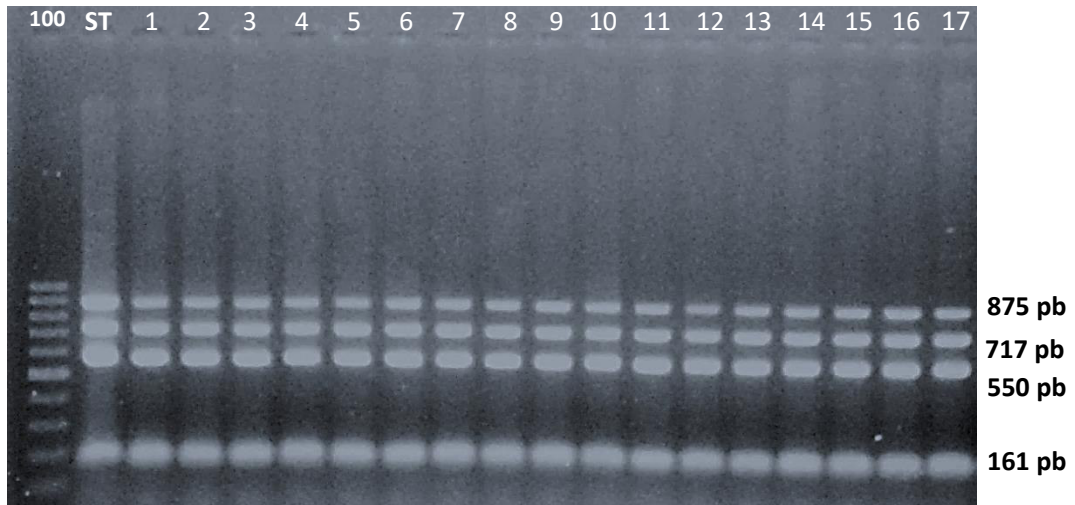


Figura 2. Ensayo de PCR múltiple utilizando 4 primers. Los productos amplificados: *sipB* (875 pb), *spvB* (717 pb), *spiA* (550 pb) y *tolC* (161 pb). 100= marcador de peso molecular de 100 pb, ST= *Salmonella Typhimurium*, 1-17= aislados analizados.

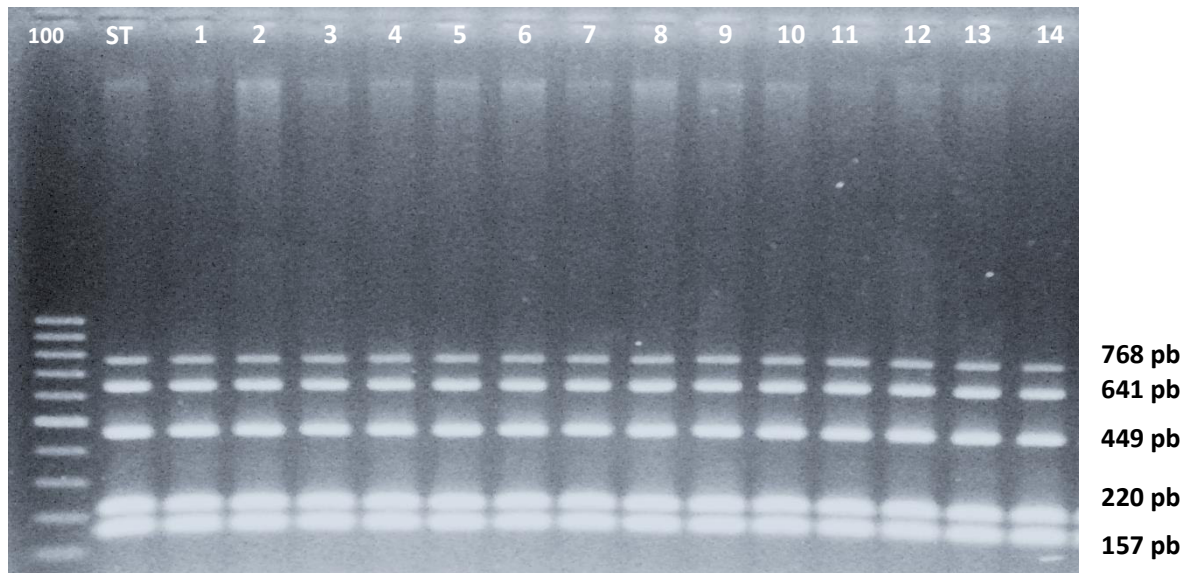


Figura 3. Ensayo de PCR múltiple utilizando 5 primers. Los productos amplificados: *sitC* (768 pb), *lpfC* (641 pb) *sifA* (449 pb), *sopB* (220 pb) y *pefA* (157 pb). 100= marcador de peso molecular de 100 pb, ST= *Salmonella Typhimurium*, 1-14= aislados analizados.

Los aislados de *Salmonella* Typhimurium analizados mediante ERIC-PCR permitieron evidenciar los patrones de las huellas genéticas generadas con el uso de los primers ERIC1R y ERIC2, los cuales mostraron alta homogeneidad entre los aislados. Se presentaron un total de 27 bandas con un tamaño en rangos entre 100 pb y 8000 pb. El diseño de un dendrograma permitió detectar la presencia de sólo un grupo genético, con una similitud mayor al 90% (Figura 4).

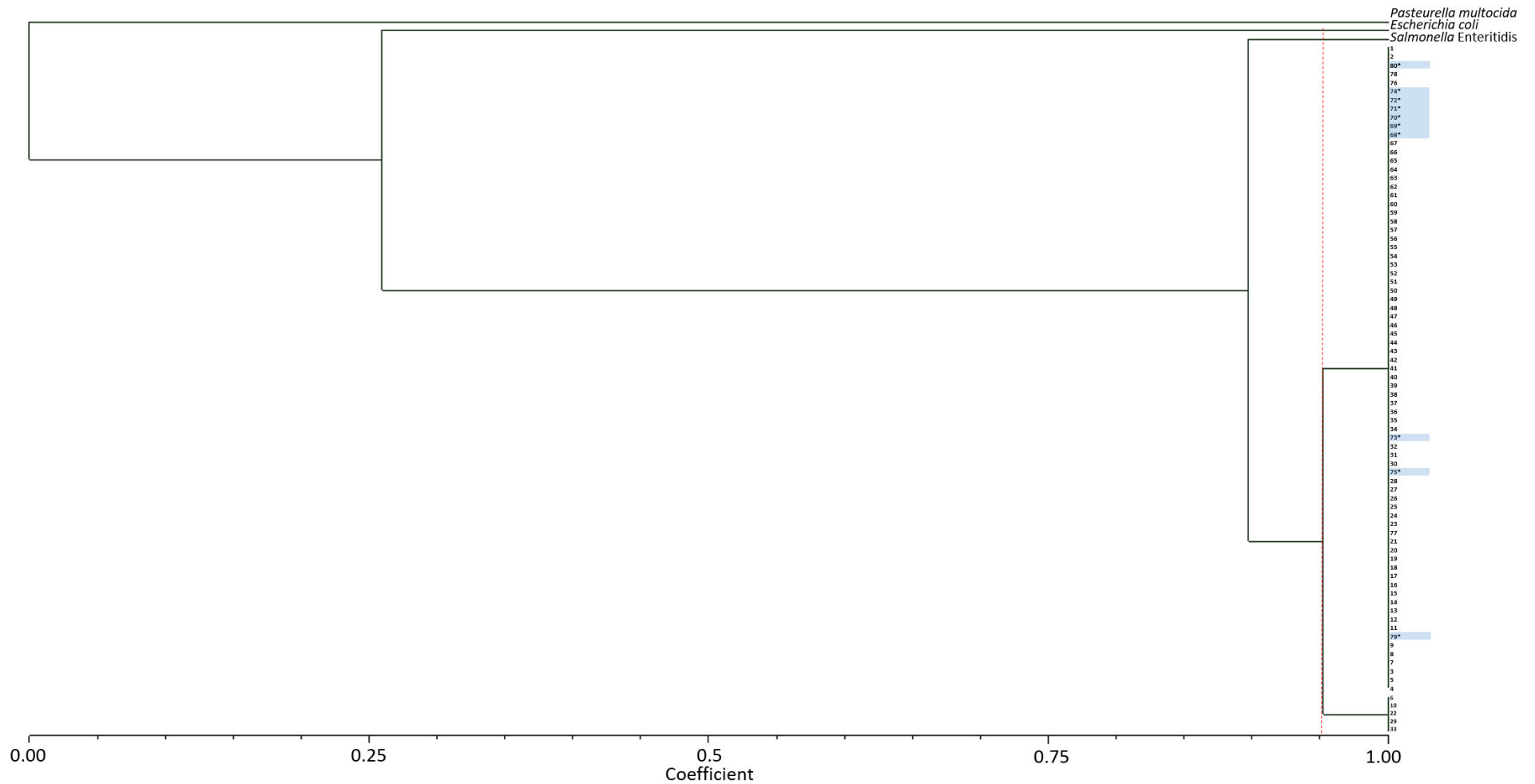


Figura 4. Dendrograma en el que se muestra los resultados de ERIC-PCR de 80 aislados de *Salmonella Typhimurium* incluidas en el estudio, así como de aislados de *Pasteurella multocida*, *Escherichia coli*, *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076 y *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028. La figura indica una similitud mayor al 95% utilizando el coeficiente de DICE entre los aislados. Los números marcados corresponden a las cepas aisladas de hisopado rectal de cobayos clínicamente sanos.

6. DISCUSIÓN

Se caracterizó molecularmente cepas de *Salmonella* Typhimurium aisladas de cobayos provenientes de granjas de producción intensiva, mediante la detección de genes de virulencia y secuencias repetitivas ERIC. La identificación de la serovariedad de las cepas de *Salmonella* mediante los resultados de la PCR múltiple evidenciaron la presencia de *Salmonella* Typhimurium en el 100% de los aislados. Existen diversos estudios que han identificado la presencia de diversas serovariedades en cobayos como Typhimurium, Enteritidis y Abortusequi entre otras. Sin embargo, *Salmonella* Typhimurium es la serovariedad aislada con mayor frecuencia y está asociada a casos clínicos con altas tasas de mortalidad e inclusive con la ocurrencia de casos crónicos en cobayos (Pivnick *et al.*, 1966; Chauca, 1997; Richardson, 2000; Singh *et al.*, 2005; Casart y Falconí, 2016).

El ciclo de vida intracelular de *Salmonella* demanda el uso de un conjunto de factores de virulencia codificados por una gran diversidad de genes distribuidos en el genoma y con una coordinación minuciosa entre ellos (Groisman y Ochman, 1997; Skyberg *et al.*, 2006). En el estudio, se utilizaron nueve genes que contribuyen notablemente en la virulencia y desarrollo de la enfermedad de *Salmonella* Typhimurium en modelos murinos. Del total de genes utilizados en el estudio (*spvB*, *sipB*, *sitC*, *lpfC*, *toIC*, *spiA* *sopB*, *sifA*, *pefA*), 6 (*sipB*, *sitC*, *spiA*, *sopB*, *lpfC* y *sifA*) se encuentran en islas de patogenicidad (Janakiraman y Slauch, 2000; Marcus *et al.*, 2000). Los genes *pefA* y *spvB* son llevados por plásmidos (van der Velden *et al.*, 1998). El gen restante *toIC* puede localizarse en cualquier parte del genoma de *Salmonella* (Stone y Miller, 1995). Todos los genes utilizados en el estudio fueron encontrados en el 100% de los aislados, provenientes de animales enfermos y aparentemente sanos. Los resultados sugieren que estos genes de virulencia, y posiblemente las islas de patogenicidad y T3SS con los que están asociados, se encuentran ampliamente

distribuidos en las cepas de *Salmonella* Typhimurium aisladas de cobayos con o sin enfermedad. Inclusive, la alta similitud de genes de virulencia entre las cepas de *Salmonella* Typhimurium aisladas podría indicar que las cepas de *Salmonella* Typhimurium provenientes de cobayos sanos son capaces de causar salmonelosis bajo ciertas condiciones y que la genotipificación basada en genes de virulencia podría ser de utilidad en los protocolos de tipificación de *Salmonella*.

Finalmente, los aislados de *Salmonella* Typhimurium fueron genotipificados mediante el uso de una reacción en cadena de la polimerasa de elementos repetitivos (rep-PCR) conocida como ERIC PCR. Esta técnica hibrida secuencias intergénicas no codificantes dispersas en el genoma, produciendo múltiples amplicones de distinto peso molecular para determinar la relación genética entre los aislados (Lupiski *et al.*, 1992; Versalovic *et al.*, 1994; Rampadarath *et al.*, 2015). La técnica de ERIC PCR es un método capaz de discriminar entre diferentes aislados bacterianos de la misma especie, siendo una útil herramienta epidemiológica y pueden ser utilizada en el seguimiento de la propagación, prevención y control de infecciones y para entender la estructura genética y evolución de poblaciones microbianas (Wang, 1993; Sabat *et al.*, 2013). Durante años se han utilizado los métodos de tipificación fenotípicos tales como el biotipo, serotipo y fagotipo, los cuales han contribuido de manera importante para el entendimiento de la historia natural y epidemiología de infecciones causadas por cepas de especies clínicamente relevantes. Sin embargo, si bien son útiles para propósitos específicos, tienen un gran número de limitaciones prácticas que las hacen inutilizables para estudios exhaustivos de la estructura y dinámica de poblaciones bacterianas, e inclusive para los esfuerzos de control y vigilancia (Van Belkum *et al.*, 2007; Sabat *et al.*, 2013). Es generalmente aceptado que la tipificación fenotípica debe ser apoyada por alguna otra prueba de tipo molecular. A pesar de ello, existen algunos casos como la serotipificación en *Salmonella*, en donde es un requisito muy útil. Sin embargo, el desarrollo, aplicación y control de calidad de pruebas fenotípicas tales como la fagotipificación y la serotipificación son laboriosos y requiere de personal especializado, lo que las hace difícil de mantener niveles de calidad suficientes para satisfacer los actuales estándares de acreditación para laboratorios de microbiología. Por

estas razones, la fenotipificación ha venido siendo reemplazada por la tipificación genotípica o molecular en las dos últimas décadas (Mayer, 1988; Maslow *et al.*, 1993; Botteldoorn *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2014). La aplicación de técnicas moleculares como ERIC PCR para la tipificación de patógenos en estudios provee información epidemiológica confiable para el rastreo de la fuente de infección. El uso de una técnica de ERIC-PCR y el diseño de un dendrograma con base a la presencia o ausencia de bandas demostró una alta homogeneidad de todos los aislados de *Salmonella* Typhimurium del estudio. Existen estudios en los que han comparado la utilidad de ERIC PCR con otras pruebas moleculares de tipificación como RAPD. Nath *et al.* (2010) utilizaron ERIC PCR para genotipificar aislados (n=33) de *Salmonella* obtenidos de pacientes con fiebre tifoidea. Determinaron un buen poder discriminatorio y una reproducibilidad del 100%, en comparación del 40% de reproducibilidad para RAPD reportada en el estudio. Inclusive hay estudios en los que proponen la posibilidad de combinar ambas técnicas. Lin *et al.* (2005) diferenciaron un total de 57 aislados de *Salmonella* spp. mediante ERIC-PCR y RAPD. Utilizando la prueba de ERIC-PCR produjeron un total de 50 patrones genéticos distintos. Combinando los resultados de RAPD y ERIC-PCR lograron diferenciar todos los 57, determinando así que el uso de ambas pruebas sería útil para la diferenciación de *Salmonella* de campo y estudios epidemiológicos. Como se mencionó anteriormente, ERIC PCR no sólo provee información de heterogeneidad u homogeneidad entre aislados, también permite obtener datos epidemiológicos. Por ejemplo, Tunung *et al.* (2007) determinaron la diversidad genética de 24 aislados de *Salmonella enterica* aisladas de alimentos y muestras clínicas mediante ERIC-PCR. Los resultados obtenidos permitieron identificar una correlación entre la prevalencia de serovares y genotipos con la fuente y origen geográfico. En un estudio reciente, realizado por Prasertsee *et al.* (2016) investigaron la relación de aislados de *Salmonella* Rissen, Panama y Stanley procedentes de granjas de cerdos y centros de beneficio en Tailandia. Identificaron un total de 90 aislados y evaluaron la diversidad genética mediante PCR basada en secuencias de elementos repetitivos (rep-PCR). Utilizaron primers ERIC y demostraron su efectividad para discriminar entre aislados de *Salmonella*. Ambas pruebas fueron útiles en la identificación de la fuente de contaminación, mediante la detección de patrones moleculares entre los

aislados. Por ello, los resultados señalan la detección de un solo grupo genético con una similitud total entre las cepas de *Salmonella* Typhimurium aisladas de cobayos, lo que podría sugerir una dispersión clonal entre los centros de producción incluidos en el estudio.

La crianza de cobayos en el Perú se ha incrementado en las últimas décadas debido al aumento de la demanda de carne en el mercado nacional e internacional. Sin embargo, los problemas sanitarios constituyen aún la principal causa de mortalidad y pérdidas económicas. Como se ha mencionado anteriormente, la salmonelosis es la enfermedad que más afecta a la producción de cobayos, con altos índices de mortalidad y morbilidad, que dificultan el control y contención. Por ello, identificar la diversidad genética entre las cepas de *Salmonella* y cuáles son los genes de virulencia implicados en la enfermedad resulta importante para la prevención y control de la enfermedad en la producción de cobayos en el Perú. Es sabido que los animales son el principal reservorio de *Salmonella* y las fuentes de infección más frecuente son los alimentos (Uribe y Suárez, 2006). Por ello, la presencia de genes de virulencia que brinden la capacidad de causar enfermedad demuestra el riesgo potencial que podría presentar como una fuente de contaminación al humano por contacto o como enfermedad de transmisión alimentaria.

7. CONCLUSIONES

1. Todos los aislados fueron identificado como *Salmonella* Typhimurium mediante la técnica de PCR múltiple por la amplificación de los genes *invA* y *fliC*, de 284 pb y 559 pb, respectivamente.
2. Todos los aislados de *Salmonella* Typhimurium presentaron los 9 genes de virulencia *spvB*, *spiA*, *sipB*, *tolC*, *sitC*, *lpfC*, *sifA*, *sopB* y *pefA*.
3. Se evidenció un patrón genético similar con una alta homogeneidad superior al 95% en los aislados de *Salmonella* Typhimurium.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abrahams, G; Muller, P; Hensel, M. Functional dissection of SseF, a type III effector protein involved in positioning the *Salmonella*-containing vacuole. *Traffic* 7. 2006; 950–965.
2. Andrade, DR; Andrade, DR. Typhoid fever as cellular microbiological model. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2003; 45:185–91.
3. Bakowski, MA; Braun, V; Lam, GY; Yeung, T; Heo, WD; Meyer, T; Finlay, B; Grinstein, S; Brumell, J. The phosphoinositide phosphatase SopB manipulates membrane surface charge and trafficking of the *Salmonella*-containing vacuole. *Cell Host Microbe*. 2010; 7, 453–462.
4. Bakowski, MA; Cirulis, JT; Brown, NF; Finlay, BB; Brumell, JH. SopD acts cooperatively with SopB during *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion. *Cell Microbiol*. 2007; 9:2839–2855.
5. Botteldoorn, N; Herman, L; Rijpens, N; Heyndrickx, M. Phenotypic and Molecular Typing of *Salmonella* Strains Reveal Different Contamination Source in Two Commercial Pig Slaughterhouses. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004; 70, 5305-5314.
6. Braun, V; Brumell, JH. Bacterial invasion: entry through the exocyst door. *Curr. Biol*. 2010; 20:R677–R679.
7. Bustamante, J. 1993. Producción de cuyes. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 259 p.
8. Casart Y; Falconí M. 2016. Tipificación molecular de *Salmonella* aislada de cuyes (*Cavia porcellus*) de Loja, Ecuador. *Revista Científica Ecuatoriana*. Vol. 3. 38-42.
9. Chauca, L. 1997. Producción de cuyes (*Cavia porcellus*). Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación - FAO. 78 p.
10. Chero, A; Rosadio, R; Marcelo, G; Díaz, G; Jiménez, R; Castro, Y; Maturrano, L. Identificación Molecular de *Salmonella* Typhimurium en Cuyes al Primer Parto mediante la Técnica de PCR Múltiple. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2017; 28(3), 679-686.

11. Clarke, RC; Gyles, CL. Virulence of wild and mutant strains of *Salmonella* typhimurium in ligated intestinal segments of calves, pigs, and rabbits. Am J Vet Res. 1987; 48: 504–510.
12. Coburn, B; Grassl, GA; Finlay, BB. *Salmonella*, the host and disease: a brief review. Immunol. Cell Biol. 2007; 85:112–118.
13. Cossart, P; Sansonetti, PJ. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. Science. 2004; 304:242-248.
14. Díaz, G; Rosadio, R; Marcelo, G; Chero, A; Jiménez, R; Reyna, I; Maturrano, L. Evaluación de una Técnica de PCR-Múltiple para la Detección Rápida de *Salmonella* Typhimurium y Enteritidis en Cobayos (*Cavia porcellus*) Naturalmente Infeccionados. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 2017; 28(3), 713-722.
15. Evans, AR. Import risk analysis: Domestic guinea pig, *Cavia porcellus*, imported from Australia [Internet], [23 octubre 2017]. 2005; Disponible en: [http:// hintlink.com/guinea_pig/ Nzriskanalysis.pdf](http://hintlink.com/guinea_pig/Nzriskanalysis.pdf).
16. Fardsanei, F; Nikkhahi, F; Bakhshi, B; Zahraei, T; Asfari, I; Soltan, MM. Molecular characterization of *Salmonella* enterica serotype Enteritidis isolates from food and human samples by serotyping, antimicrobial resistance, plasmid profiling, (GTG) 5-PCR and ERIC-PCR. New Microbe and New Infect. 2016;14: 24–30
17. Finlay, BB; Heffron, F; Falkow, S. Epithelial cell surfaces induce *Salmonella* proteins required for bacterial adherence and invasion. Science. 1989; 243: 940–943.
18. Finlay, BB; Ruschkowski, S; Dedhar, S. Cytoskeletal rearrangements accompanying *Salmonella* entry into epithelial cells. J. Cell Sci. 1991; 99:283–296.
19. Foster, JW; Hall, HK. Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella* typhimurium. J. Bacteriol. 1991; 173:5129– 5135.
20. Galán, JE. *Salmonella* interactions with host cells: type III secretion at work. Annu Rev Cell Dev Biol. 2001, 17:53-86.
21. Galán, JE; Zhou, D. Striking a balance: modulation of the actin cytoskeleton by *Salmonella*. Proc Natl Acad Sci USA. 2000; Aug 1;97(16):8754-61.

22. Garcia-del Portillo, F; Finlay, BB. Targeting of *Salmonella* typhimurium to vesicles containing lysosomal membrane glycoproteins bypasses compartments with mannose 6-phosphate receptors. *J Cell Biol.* 1995;129:81–97. Ç
23. Garcia-del Portillo, F; Zwick, M; Leung, K; Finlay, B. *Salmonella* induces the formation of filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins in epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993; 90, 10544–10548.
24. Garmendia, MM; Selgrad, S; Alezones, F. Salmonelosis en animales de laboratorio. FONAIAP [Internet], [10 noviembre 2017]. 2000; Disponible en:
<http://www.ceniap.gov.ve/pbd/RevistasTecnicas/FonaiapDivulga/fd68/texto/mgarmendia.htm>
25. Grimont, PAD; Weill, FX. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars, 9th revision World Health Organization Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*, Pasteur Institute, Paris, France. [Internet] [20 de noviembre de 2017]. 2007; Disponible en:
<http://www.pasteur.fr/ip/portal/action/WebdriveActionEvent/oid/01s-000036-089>.
26. Groisman, EA; Ochman, H. How *Salmonella* became a pathogen. *Trends Microbiol.* 1997; 5:343–9.
27. Guibourdenche, M; Roggentin, P; Mikoletit, M; Fields, PI; Bockemuhl, J; Grimont, PAD; Weill, FX. Supplement 2003-2007 (No.47) to the White - Kauffmann-Le Minor scheme. *Res. Microbiol.* 2010; 161, 26-29.
28. Hallstrom, K; McCormick, BA. *Salmonella* interaction with and passage through the intestinal mucosa: through the lens of the organism. *Front. Microbiol.* 2011; Vol.2 Article 88.
29. Hanisch, J; Kolm, R; Wozniczka, M; Bumann, D; Rottner, K; Stradal, TE. Activation of a RhoA/myosin II-dependent but Arp2/3 complex-independent pathway facilitates *Salmonella* invasion. *Cell Host Microbe.* 2011; 9:273–285.
30. House, D; Bishop, A; Parry, CM; Dougan, G; Wain, J. Typhoid fever: pathogenesis and disease. *Curr Opin Infect Dis.* 2001;14:573–8

31. Hulton, C; Higgins, C; Sharp, P. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Molecular Microbiol.* 1991; 5, 825-834.
32. Jamshidi, A; Kalidari, G; Hedayati, M. Isolation and identification of *Salmonella Enteritidis* and *Salmonella Typhimurium* from the eggs of retail stores in Mashhad, Iran using conventional culture method and multiplex PCR assay. *J Food Safety.* 2010; 30: 558-568.
33. Janakiraman, A; Slauch J. The putative iron transport system SitABCD encoded on SPI1 is required for full virulence of *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* 2000; 35:1146–1155.
34. Kubori, T; Galán, JE. Temporal regulation of *Salmonella* virulence effector function by proteasome-dependent protein degradation. *Cell.* 2003; 115:333–342.
35. Lara-Tejero, M; Kato, J; Wagner, S; Liu, X; Galán, JE. A sorting platform determines the order of protein secretion in bacterial type III systems. *Science.* 2011; 331:1188–1191
36. Lee, LH; Cheah, YK; Salleh, NA; Sukardi, ES; Jiun-Horng, ES; Chari-Hoon, EK; Radu, ES. Analysis of *Salmonella Agona* and *Salmonella Weltevreden* in Malaysia by PCR fingerprinting and antibiotic resistance profiling. *Antonie van Leeuwenhoek.* 2008; 94, 377-87.
37. Lim, H; Lee, KH; Hong, C; Bahk, G; Choi, W. S. Comparison of four molecular typing methods for the differentiation of *Salmonella* spp. *International Journal of Food Microbiology.* 2005; 105: 411-418.
38. Lin, T; Lin, L; Zhang, F. Review on Molecular Typing Methods of Pathogens. *Open Journal of Medical Microbiology.* 2014; 4, 147-152.
39. Lupiski, JR; Weinstock, GM. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J Bacteriol.* 1992; 174:4525–9.
40. MacDonald, TT; Monteleone, G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science.* 2005; 307, 1920–1925.
41. Majdalani, N; Gottesman, S. The Rcs phosphorelay: A complex signal transduction system. *Annual Review of Microbiology.* 2005; 59, 379–405.

42. Malik-Kale, P; Jolly, CE; Lathrop, S; Winfree, S; Luterbach, C; Steele-Mortimer O. *Salmonella* – at home in the host cell. *Front. Microbiol.* 2011;2:125
43. Marcelo, M; Rosadio, R; Chero, A; Díaz, G; Ciprian, A; Maturrano, L. Identificación de *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Typhimurium en cobayos mediante la técnica de PCR múltiple. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú.* 2017; 28(2), 411-417.
44. Marcus, S; Brumell L, Pfeifer, I; Finlay, B. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infect.* 2000; 145–156.
45. Maslow, JN; Ellis, J; Mulligan, M; Arbeit, R. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *ClinInfectDi.* 1993; 17: 153–164.
46. Matsuura, SA. Susceptibilidad a antibacterianos in vitro de *Salmonella* enterica aislada de cobayos de crianza familiar-comercial en la provincia de Carhuaz. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ Nacional Mayor de San Marcos. 2008; 65 p.
47. Mayer, LW. Use of plasmid profiles in epidemiologic surveillance of disease outbreaks and in tracing the transmission of antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1988; 1: 228–243.
48. McCormick, BA; Colgan, SP; Delp-Archer, C; Miller, SI; Madara, JL. *Salmonella* typhimurium attachment to human intestinal epithelial monolayers: transcellular signalling to subepithelial neutrophils. *J Cell Biol.* 1993; 123: 895–907.
49. McGhie, EJ; Brawn, LC; Hume, PJ; Humphreys, D; Koronakis, V. *Salmonella* takes control: effector-driven manipulation of the host. *Curr. Opin. Microbiol.* 2009; 12:117–124
50. Muller, AJ; Kaiser, P; Dittmar, KE; Weber, TC; Haueter, S; Endt, K. *Salmonella* gut invasion involves TTSS-2-dependent epithelial traversal, basolateral exit, and uptake by epithelium-sampling lamina propria phagocytes. *Cell Host Microbe.* 2012; 11:19–32.
51. Murray, PR; Baron, EJ; Pfaller, MA; Tenover, FC; Tenover, RH. *Manual of clinical microbiology*, 7th ed ASM Press, Washington, DC. 1999.
52. Myeni, SK; Zhou, D. The C terminus of SipC binds and bundles F-actin to promote *Salmonella* invasion. *J. Biol. Chem.* 2010; 285:13357–13363.

53. Nath, G; Maurya, P; Gulati, AK. ERIC PCR and RAPD based fingerprinting of *Salmonella* Typhi strains isolated over a period of two decades. *Infection, Genetics and Evolution*. 2010; 10: 530–536
54. Patel, JC; Galán, JE. Differential activation and function of Rho GTPases during *Salmonella*-host cell interactions. *J. Cell Biol.* 2006; 175:453–463.
55. Patel, JC; Galán, JE. Manipulation of the host actin cytoskeleton by *Salmonella* all in the name of entry. *Current Opinion in Microbiology*. 2005; 8:10–15
56. Perrett, CA; Jepson, MA. Regulation of *Salmonella*-induced membrane ruffling by SipA differs in strains lacking other effectors. *Cell Microbiol.* 2009; 11:475–487.
57. Pivnick SH. 1966. Establishment of a *Salmonella*-free guinea pig colony. *The Canadian Journal of Comparative Medicine*, vol. 30, pp. 279–281.
58. Prasertsee, T; Khantaprab, N; Yamsakul, P; Santiyanont, P; Chokesajjawatee, N; Patchanee, P. Repetitive sequence-based PCR fingerprinting and the relationship of antimicrobial-resistance characteristics and corresponding genes among *Salmonella* strains from pig production. *Asian Pac J Trop Dis.* 2016; 6(5): 390-395
59. Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. *Tratado de enfermedades del ganado bovino, ovino, caprino y equino*. 9° ed. Madrid: Mc Graw-Hill. 2002; 959p
60. Ramírez, I. Estudio bacteriológico y epidemiológico de un brote infeccioso en cobayos (*Cavia porcellus*). Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ Nacional Mayor de San Marcos. 1972; 62 p
61. Rampadarath, S; Puchooa, B. Repetitive element palindromic PCR (rep-PCR) as a genetic tool to study interspecific diversity in Euphorbiaceae family. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2015; 412–417
62. Rathman, M; Barker, LP; Falkow, S. The unique trafficking pattern of *Salmonella typhimurium*-containing phagosomes in murine macrophages is independent of the mechanism of bacterial entry. *Infect. Immun.* 1997; 65:1475–1485.
63. Richardson, VCG. *Diseases of Domestic Guinea Pigs*. Segunda edición. Blackwell Science. 2000; 144 p.

64. Rosselin, M; Abed, N; Namdari, F; Virlogeux I; Velge, P, Wiedemann, A. The different strategies used by *Salmonella* to invade host cells. 2012; 979-953-307-690-3.
65. Rosselin, M; Abed, N; Virlogeux-Payant, I; Bottreau, E; Sizaret, PY; Velge P. Heterogeneity of type III secretion system (T3SS)-1-independent entry mechanisms used by *Salmonella* Enteritidis to invade different cell types. *Microbiology*. 2011;157:839–847.
66. Rudge, SA; Anderson, DM; Emr SD. Vacuole size control: regulation of PtdIns (3,5) P2 levels by the vacuole-associated Vac14-Fig 4 complex, a PtdIns (3,5)P2-specific phosphatase. *Mol. Biol. Cell*. 2004; 15:24–36.
67. Ryan, D; Pati, NB; Ojha, UK; Padhi, C; Ray, S; Jaiswal, S; Singh, GP; Mannala, GK; Schultze, T; Chakraborty, T; Suar, M. The Acid Tolerance Response of *Salmonella* Typhimurium: Global Transcriptome and 2 Mutagenic Analysis. *Appl. Environ. Microbiol*. 2015.
68. Sabat, AJ; Budimir, A; Nashev, D; Sá-Leão, R; van Dijl, JM; Laurent, F; Grundmann, H; Friedrich, AW. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill*. 2013; 18(4):pii=20380.
69. Salcedo, S; Holden, D. SseG, a virulence protein that targets *Salmonella* to the Golgi network. *EMBO J*. 2003; 22, 5003–5014.
70. Salcedo, SP; Noursadeghi, M; Cohen, J; Holden, DW. Intracellular replication of *Salmonella* Typhimurium strains in specific subsets of splenic macrophages in vivo. *Cell Microbiol*. 2001; 3:587–597.
71. Saxena, MK; Singh, VP; Lakhcharua, BD; Taj, G, Sharma, B. Strain differentiation of Indian isolates of *Salmonella* by ERIC-PCR. *Res Vet Sci*. 2002; 73(3): 313-4.
72. Sharples, G; Lloyd, RG. ERIC an intergene sequence distributed in family enterobacteriaceae. *Nucleic Acid Research*. 1990; 18, 6503– 6508
73. Singh BR, Alam J, Hansda D. 2005. Alopecia induced by salmonellosis in guinea pigs. *Veterinary Record*, vol. 156, pp. 516-518.
74. Skyberg, JA; Logue, CM; Nolan, LK. Virulence genotyping of *Salmonella* spp. with multiplex PCR. *Avian Dis*. 2006; 50:77–81.
75. Stock, AM; Robinson, VL; Goudreau, PN. Two-component signal transduction. *Annual Review of Biochemistry*. 2000; 69, 183–215.

76. Stone, B; Miller, VL. *Salmonella* enteritidis has a homologue of tolC that is required for virulence in BALB/c mice. Mol. Microbiol. 1995; 17: 701–712.
77. Takeuchi, A. Electron microscop studies of experimental *Salmonella* infection Penetration in to the intestinal epithelium by *Salmonella typhimurium*. Am. J. Pathol. 1967; 50:109 –136.
78. Thermo Fisher Scientific. Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit. User guide. 2014. [Internet]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K0721>
79. Tsolis, RM; Adams, LG; Ficht, TA; Baumler, AJ. Contribution of *Salmonella typhimurium* virulence factors to diarrheal disease in calves. Infect Immun. 1999; 67: 4879–4885.
80. Tunung, R; Chai, LC; Usha, M. Characterization of *Salmonella enterica* isolated from street food and clinical samples in Malaysia. ASEAN Food J. 2007; 14, 161-73.
81. Uribe, C; Suárez, MC. Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar. Colomb Med. 2006; 37(2): 151-158.
82. Van Belkum, A; Tassios, PT; Dijkshoorn, L; Haeggman, S; Cookson, B; Fry, NK. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. Clin Microbiol Infect. 2007; 13Suppl 3:1-46.
83. Van der Velden, A; Baumler, A; Tsolis, R; Heffron, F. Multiple fimbrial adhesins are required for full virulence of *Salmonella typhimurium* in mice. Infect. Immunol. 1998; 66: 2803–2808.
84. Vázquez-Torres, A; Jones-Carson, J; Baumler, AJ; Falkow, S; Valdivia, R; Brown, W. Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. Nature. 1999; 401:804–808.
85. Versalovic, J; Koeuth, T; Lupski, J. Distribution of repetitive DNA sequence in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genome. NucleicAcidResearch. 1991; 19(24), 6823–6831
86. Versalovic, J; Schneider, M; de Bruijn, FJ; Lupski, JR. Genomic fingerprinting of bacteria using the repetitive sequence based polymerase chain reaction. Methods Mol Cell Biol. 1994; 5(1):25–40.
87. Vimal, DB; Khullar, M; Gupta, S; Ganguly, NK. Intestinal mucins: the binding sites for *Salmonella Typhimurium*. Mol. Cell. Biochem. 2000; 204, 107–117

88. Wang, TS. Whittam, C; Berg, M; Berg D. RAPD (arbitrary primer) PCR is more sensitive than multilocus enzyme electrophoresis for distinguishing related bacterial strains. *Nucleic Acids Res.* 1993; 21:5930–5933.
89. Wasylnka, J; Bakowski, M; Szeto, J; Ohlson, M. Trimble, W. S., Miller, S. I., and Brumell, J. H. Role for myosin II in regulating positioning of *Salmonella*-containing vacuoles and intracellular replication. *Infect. Immun.* 2008; 76, 2722–2735.
90. Waterman, S; Holden, D. Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. *Cell. Microbiol.* 2003; 5, 501–511.
91. Wileman, T. Aggresomes and pericentriolar sites of virus assembly: cellular defense or viral design? *Annu. Rev. Microbiol.* 2007; 61, 149–167.
92. Wray, C; Sojka, WJ. Experimental *Salmonella typhimurium* infection in calves. *Res Vet Sci.* 1978; 25: 139–143.
93. Zhou, D; Chen, LM; Hernandez, L; Shears, SB; Galán, JE. A *Salmonella* inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization. *Mol Microbiol.* 2001; 40(6): 1461.

9. ANEXOS

10.1 Anexo I. Procedencia y fecha de extracción de aislados de *Salmonella enterica* provenientes de cobayos de producción.

| ID | CÓDIGO CAJA | ÓRGANO DE AISLAMIENTO | DEPARTAMENTO | FECHA EXTRACCIÓN |
|----|-------------|-----------------------|--------------|------------------|
| 1 | 1T2H | HÍGADO | LIMA | 08/09/2016 |
| 2 | 5A1H | HÍGADO | LIMA | 08/09/2016 |
| 3 | 1C2H | HÍGADO | LIMA | 08/09/2016 |
| 4 | 2T1UP | ÚTERO | LIMA | 08/09/2016 |
| 5 | 1M3H | HÍGADO | LIMA | 08/09/2016 |
| 6 | 2H2I | INTESTINO | LIMA | 08/09/2016 |
| 7 | 1M7H | HÍGADO | LIMA | 08/09/2016 |
| 8 | 5HMI | INTESTINO | LIMA | 08/09/2016 |
| 9 | 3L2H | HÍGADO | LIMA | 08/09/2016 |
| 10 | 5J4H | HÍGADO | LIMA | 08/09/2016 |
| 11 | 5J1H | HÍGADO | LIMA | 08/09/2016 |
| 12 | 4B2V | VESÍCULA | LIMA | 08/09/2016 |
| 13 | 4T1H | HÍGADO | LIMA | 08/09/2016 |
| 14 | 5N1H | HÍGADO | LIMA | 08/09/2016 |
| 15 | 3H1P | PULMÓN | LIMA | 08/09/2016 |
| 16 | 2H1H | HÍGADO | LIMA | 08/09/2016 |
| 17 | 3L1P | PULMÓN | LIMA | 08/09/2016 |
| 18 | 5B2H | HÍGADO | LIMA | 09/09/2016 |
| 19 | 1M4H | HÍGADO | LIMA | 09/09/2016 |
| 20 | 1O1H | HÍGADO | LIMA | 09/09/2016 |
| 21 | 5J5H | HÍGADO | LIMA | 09/09/2016 |
| 22 | 4J5H | HÍGADO | LIMA | 09/09/2016 |
| 23 | 5J2H | HÍGADO | LIMA | 09/09/2016 |
| 24 | 4B3H | HÍGADO | LIMA | 09/09/2016 |
| 25 | 5B4H | HÍGADO | LIMA | 09/09/2016 |
| 26 | 4B6H | HÍGADO | LIMA | 09/09/2016 |
| 27 | 4B2.1H | HÍGADO | LIMA | 09/09/2016 |
| 28 | 4H1H | HÍGADO | LIMA | 09/09/2016 |
| 29 | 2S3H | HÍGADO | LIMA | 09/09/2016 |
| 30 | 1L1.2H | HÍGADO | LIMA | 09/09/2016 |
| 31 | 2F2H | HÍGADO | LIMA | 09/09/2016 |
| 32 | 2G2H | HÍGADO | LIMA | 09/09/2016 |
| 33 | 2M5H | HÍGADO | LIMA | 09/09/2016 |
| 34 | 3L3H | HÍGADO | LIMA | 09/09/2016 |
| 35 | 1T1H | HÍGADO | LIMA | 15/09/2016 |
| 36 | 4J1H | HÍGADO | LIMA | 15/09/2016 |
| 37 | 4A2H | HÍGADO | LIMA | 15/09/2016 |
| 38 | 4A1H | HÍGADO | LIMA | 15/09/2016 |

| | | | | |
|----|---------|-----------------|-------|------------|
| 39 | 4M1H | HÍGADO | LIMA | 15/09/2016 |
| 40 | 5B3H | HÍGADO | LIMA | 16/06/2016 |
| 41 | 5F1H | HÍGADO | LIMA | 16/06/2016 |
| 42 | 4B5H | HÍGADO | LIMA | 16/06/2016 |
| 43 | 1L1.1H | HÍGADO | LIMA | 16/06/2016 |
| 44 | 4M4H | HÍGADO | LIMA | 16/06/2016 |
| 45 | 4H3H | HÍGADO | LIMA | 16/06/2016 |
| 46 | CP1528a | HÍGADO | LIMA | 21/09/2016 |
| 47 | CP1504a | BAZO | LIMA | 21/09/2016 |
| 48 | CP1531 | HÍGADO | LIMA | 21/09/2016 |
| 49 | CP1503a | HÍGADO | LIMA | 21/09/2016 |
| 50 | CP1503 | HÍGADO | LIMA | 21/09/2016 |
| 51 | CP1504a | HÍGADO | LIMA | 21/09/2016 |
| 52 | CP1528a | HÍGADO | LIMA | 21/09/2016 |
| 53 | CP1555 | HÍGADO | LIMA | 21/09/2016 |
| 54 | CP1536 | BAZO | LIMA | 21/09/2016 |
| 55 | CP1549 | HÍGADO | LIMA | 21/09/2016 |
| 56 | CP1537 | HÍGADO | LIMA | 21/09/2016 |
| 57 | CP1540 | HÍGADO | LIMA | 21/09/2016 |
| 58 | CP1556 | HÍGADO | LIMA | 21/09/2016 |
| 59 | CP1541 | HÍGADO | LIMA | 21/09/2016 |
| 60 | CP1545 | BAZO | LIMA | 21/09/2016 |
| 61 | CP1553 | BAZO | LIMA | 21/09/2016 |
| 62 | CP1543 | HÍGADO | LIMA | 21/09/2016 |
| 63 | CP1544 | HÍGADO | LIMA | 21/09/2016 |
| 64 | CP1546 | HÍGADO | LIMA | 21/09/2016 |
| 65 | CP1552 | BAZO | LIMA | 21/09/2016 |
| 66 | CP1554 | VESÍCULA | LIMA | 21/09/2016 |
| 67 | CP1550 | BAZO | LIMA | 22/09/2016 |
| 68 | 21CRB | HISOPADO RECTAL | LIMA | 22/09/2016 |
| 69 | 21G2S | HISOPADO RECTAL | LIMA | 22/09/2016 |
| 70 | 13GRS | HISOPADO RECTAL | LIMA | 22/09/2016 |
| 71 | 16R | HISOPADO RECTAL | LIMA | 22/09/2016 |
| 72 | CP30ES | HISOPADO RECTAL | LIMA | 22/09/2016 |
| 73 | 21CRA | HISOPADO RECTAL | LIMA | 22/09/2016 |
| 74 | 3ORG2 | HISOPADO RECTAL | LIMA | 22/09/2016 |
| 75 | CP21ER | HISOPADO RECTAL | LIMA | 22/09/2016 |
| 76 | CU/H 16 | HÍGADO | JUNÍN | 22/09/2016 |
| 77 | CU/H 01 | HÍGADO | JUNÍN | 22/09/2016 |
| 78 | CU/H 11 | HÍGADO | JUNÍN | 22/09/2016 |
| 79 | Cynthia | HISOPADO RECTAL | LIMA | 23/09/2016 |
| 80 | Melly | HISOPADO RECTAL | LIMA | 23/09/2016 |

10. PRODUCTIVIDAD CIENTÍFICA

Publicación de un artículo científico en la Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, generada durante la ejecución de la Maestría en Biología Molecular.

- Salvatierra, G.; Rimac, R.; Cher, A.; Reyna, I.; Rosadio, R.; Maturrano, L. Resistencia antimicrobiana y genotipificación de cepas de *Salmonella* Typhimurium aisladas de cuyes (*Cavia porcellus*) provenientes de granjas de producción intensiva de la ciudad de Lima, Perú. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 2018; 29(1), 319-327.