

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGIA



PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA PILA RECOMBINANTE DE UNA CEPA DE
Salmonella AISLADA DE *Cavia porcellus* “CUY” CON SIGNOS DE SALMONELOSIS

SANTIAGO JUSTO ARÉVALO

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA

Asesor: Lic. Alcides Guerra Santa Cruz

Lima, Perú
2021

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGIA



PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA PILA RECOMBINANTE DE UNA CEPA DE
Salmonella AISLADA DE *Cavia porcellus* “CUY” CON SIGNOS DE SALMONELOSIS

SANTIAGO JUSTO ARÉVALO

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA

Asesor: Lic. Alcides Guerra Santa Cruz

Lima, Perú
2021

PÁGINA DE MÉRITO ACADÉMICO

*A todos aquellos que partieron,
y que, como algunas estrellas distantes,
nos siguen iluminando a pesar que su luz ya está extinto*

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por su apoyo incondicional para llevar a cabo mi tesis, a mi madre por estar recordándome lo importante que es terminar las cosas. A mi padre por enseñarme a disfrutar los temas en los que trabajo.

A mis hermanos que recargan mis fuerzas de diversas formas, despejan mi mente y me permiten que cuando me enfoque mi mente este relajada.

A Daniela Zapata Sifuentes por aumentar mi curiosidad en los temas de investigación cuando conversamos de biología y otros temas de ciencia. Por estimular en mí el rebuscar e ir hasta lo más fondo de las preguntas. Y por su compañía en momentos de lejanía familiar.

Al Profesor Shaker Chuck Farah del Instituto de Química la Universidad de Sao Paulo por invitarme a trabajar en su laboratorio, enseñarme técnicas que parecieron inalcanzables en algún momento de mi vida y por darme flexibilidad para llevar a cabo experimentos que no eran directamente relacionados a su línea de investigación.

Al equipo del Laboratorio de Microbiología de la Universidad Ricardo Palma que entre 2013 y 2015 generaron un ambiente académico que nos permitió desarrollar ideas inéditas que siguen mostrando sus frutos con el pasar de los años.

Al Prof. Alcides Guerra Santa Cruz por invitarme a trabajar en su laboratorio y permitir que pudiera desarrollar ideas de investigación con libertad de pensamiento.

Al Sr. Eliazar por permitirnos ingresar y tomar muestras en su criadero ubicado en el centro poblado Picapiedra del distrito de Pachacamac.

A la Dra. Lilia Chauca del Instituto Nacional de Innovación Agraria por donarnos los cuyes Raza Perú y darnos un espacio para poder realizar los experimentos de inoculación en cuyes.

A Carla Saldaña Serrano por apoyarme en el control de los experimentos de inoculación de *Salmonella* en cuyes.

ÍNDICE

I. RESUMEN	1
II. ABSTRACT	2
III. INTRODUCCIÓN	3
3.1 Planteamiento del problema	3
3.2 Justificación de la investigación	4
3.3 Objetivo general	4
3.4 Objetivos específicos	4
IV. MARCO TEÓRICO	5
V. ANTECEDENTES	7
VI. HIPÓTESIS	9
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	9
7.1 Lugar de ejecución	9
7.2 Tipo y diseño de investigación	9
7.3 Operacionalización de variables	9
7.4 Muestreo	10
7.5 Procedimiento y análisis de datos	10
7.5.1 Obtención de muestras de cuyes	10
7.5.2 Aislamiento presuntivo de cepas de <i>Salmonella enterica</i>	10
7.5.3 Identificación molecular de <i>Salmonella enterica</i>	10
7.5.4 Obtención de secuencias del gen <i>pilA</i>	10
7.5.5 Análisis bioinformáticos del gen <i>pilA</i>	11
7.5.6 Inoculación de <i>Salmonella</i> en cuyes	11
7.5.7 Clonación del gen <i>pilA</i>	11
7.5.8 Expresión y purificación de la proteína PilA recombinante	12
7.6 Aspecto ético	12
VIII. RESULTADOS	12
8.1 Aislamiento de presuntas cepas de <i>Salmonella</i>	12
8.2 Identificación molecular de <i>Salmonella enterica</i>	14
8.3 Análisis bioinformático del gen <i>pilA</i>	14
8.4 Inoculación de <i>Salmonella</i> en cuyes	15
8.5 Clonación del gen <i>pilA</i>	17
8.6 Expresión y purificación de PilA recombinante	18
IX. DISCUSIÓN	20
X. CONCLUSIONES	21
XI. REFERENCIAS	22
XII. ANEXOS	26

RESUMEN

Cavia porcellus “cuy” es un roedor andino de gran importancia económica en el Perú y que en los últimos años representa un ingreso económico para pobladores de las regiones andinas. Los sistemas de crianza cada vez mayores vienen surgiendo en el territorio peruano principalmente en la región andina y costera del país. Este crecimiento trae consigo nuevos retos para mantener gran cantidad de especímenes, como el control de enfermedades infecciosas. Entre estas la Salmonelosis causada por *Salmonella enterica subsp. enterica serovar* Typhimurium se ha reportado como uno de los mayores problemas, sin embargo, hasta el momento no se tiene claro si sólo este agente infeccioso es suficiente para causar un brote epidémico o si otros factores deben reunirse para que se generen las altas tasas de mortalidad reportadas.

Así, se planteó como objetivo clonar, expresar y purificar el gen *pilA* de *Salmonella* aislada a partir de *Cavia porcellus* cuyes con signos de salmonelosis como primeros pasos para la elaboración de una vacuna recombinante basada en este gen.

En este trabajo primero se realizó un estudio de identificación de serotipos de *Salmonella* en muestras de órganos de *Cavia porcellus* de un criadero en el centro poblado de Picapiedra en el distrito de Pachacamac, Lima – Perú. Posteriormente, se realizaron ensayos de inoculación de *Salmonella* en cuyes sanos para determinar el grado de patogenicidad de *Salmonella enterica subsp. enterica serovar* Typhimurium en estas condiciones. Finalmente, se clonó, aisló y purificó la proteína PilA de *Salmonella enterica subsp. enterica serovar* Typhimurium como primer paso para el establecimiento de una metodología de producción de dicha proteína para estudios estructurales, funcionales y/o de desarrollo de una vacuna para la prevención de Salmonelosis en *Cavia porcellus*.

Se aislaron once cepas de *Salmonella enterica subsp. enterica serovar* Typhimurium. Posteriormente, se realizó secuenciamiento del gen *pilA* de las once cepas utilizando el método de Sanger. Se encontró que diez de las once cepas tuvieron la mutación I126T no presente en la base de datos de proteínas del NCBI. La inoculación vía oral de *Salmonella enterica subsp. enterica serovar* Typhimurium en cuyes sanos no mostró mortalidad mayor al grupo de cuyes inoculados con caldo estéril, por lo que concluimos que en las condiciones experimental probadas, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar* Typhimurium no es un agente infeccioso letal. Finalmente, se logró clonar, expresar y purificar el gen *pilA* con la mutación I126T que fue más soluble que la variante I126, siendo el primer paso para desarrollar una vacuna recombinante para la prevención de Salmonelosis en *Cavia porcellus* y para estudios estructurales y funcionales.

ABSTRACT

Cavia porcellus "cuy" is an Andean rodent of great economic importance in Peru and that in recent years represents an economic income for inhabitants of the Andean regions. Increasingly breeding systems have emerged in the Peruvian territory, mainly in the Andean and coastal regions of the country. This growth brings with it new challenges to maintain large numbers of specimens, such as infectious disease control. Among these, Salmonellosis is caused by *Salmonella enterica subsp. enterica serovar* Typhimurium has been reported as one of the biggest problems, however, so far it is not clear if this infectious agent alone is enough to cause an epidemic outbreak or if other factors must come together for the high mortality rates to be generated. reported.

Thus, the objective was to clone, express, and purify the *pilA* gene of *Salmonella* isolated from *Cavia porcellus* guinea pigs with signs of salmonellosis as the first steps for the development of a recombinant vaccine based on this gene.

In this work, a study was first carried out to identify *Salmonella* serotypes in samples of organs of *Cavia porcellus* from a hatchery in the town of Picapiedra in the district of Pachacamac, Lima - Peru. Subsequently, *Salmonella* inoculation tests were carried out in healthy guinea pigs to determine the degree of pathogenicity of *Salmonella enterica subsp. enterica serovar* Typhimurium under these conditions. Finally, the PilA protein from *Salmonella enterica subsp. enterica serovar* Typhimurium was cloned, expressed and purified as a first step for the establishment of a production methodology for said protein for structural, functional, and / or vaccine development studies for the prevention of Salmonellosis in *Cavia porcellus*.

Eleven strains of *Salmonella enterica subsp. enterica serovar* Typhimurium were isolated. Subsequently, the *pilA* gene of the eleven strains was sequenced using the Sanger method. Ten of the eleven strains were found to have the I126T mutation not present in the NCBI protein database. Oral inoculation of *Salmonella enterica subsp. enterica serovar* Typhimurium in healthy guinea pigs did not show higher mortality than the group of guinea pigs inoculated with sterile broth, so we conclude that under the experimental conditions tested, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar* Typhimurium is not a lethal infectious agent. Finally, it was possible to clone, express, and purify the *pilA* gene with the I126T mutation that was more soluble than the I126 variant, being the first step to develop a recombinant vaccine for the prevention of Salmonellosis in *Cavia porcellus* and structural and functional studies.

INTRODUCCIÓN:

Cavia porcellus “Cuy” es un roedor nativo de la región andina que ha contribuido a la seguridad alimentaria rural desde tiempo antiguos. Actualmente y desde la aparición de los sistemas comerciales de crianza (hace aproximadamente 45 años) se ha convertido en fuente de ingresos para las poblaciones rurales tanto de la sierra como de la costa de nuestro país (Chauca 1997).

Salmonella es un patógeno con amplia distribución de hospederos incluyendo a *Cavia porcellus* “cuy”. La presencia de esta bacteria en los criaderos reduce la calidad de la carne para comercio y la capacidad reproductiva del cuy. Además, brotes de infecciones agudas de esta bacteria en los sistemas de crianza causan cuantiosas pérdidas a los criadores e incluso el cierre del criadero.

Las vacunas de subunidades son un método eficaz para la prevención de enfermedades infecciosas. A diferencia de las vacunas tradicionales que están compuestas por el agente patógeno debilitado, las vacunas de subunidades utilizan sólo ciertas moléculas del agente patógeno para inmunizar a los individuos.

PilA es una proteína de superficie componente de los sistemas del pilus tipo IV de bacterias gramnegativas, este sistema es importante para la etapa de colonización del patógeno en el hospedero; por lo tanto, si se genera una respuesta inmunológica eficaz y duradera contra esta proteína, la etapa de colonización sería evitada, imposibilitando el desarrollo de la enfermedad.

El presente trabajo tiene como objetivo purificar la proteína PilA de cepas de *Salmonella* aisladas del tejido de bazo, hígado, pulmón o intestino de *Cavia porcellus* “cuy” con signos de salmonelosis como primer paso para la estandarización de una metodología de producción de una vacuna de subunidades basada en esta proteína.

Planteamiento del problema:

Los sistemas de crianza de cuyes atraviesan serios problemas de sanidad ocasionados por las condiciones de crianza que tornan más susceptibles a los cuyes a agentes infecciosos. En la literatura se ha descrito como uno de los mayores problemas a la bacteria *Salmonella* (Asakawa et al. 1954, Guamán 2014, Leguía 1993).

Salmonella causa una enfermedad denominada Salmonelosis que se manifiesta en los cuyes de forma crónica o aguda (Layme 2010, Morales 2012, Ortega et al. 2015, Ramírez 1972). La forma aguda de la enfermedad puede ocasionar índices de mortalidad de hasta el 95 % generando cuantiosas pérdidas económicas a los productores y en algunos casos el cierre definitivo del criadero (Layme 2011).

Por otro lado, la forma crónica de esta enfermedad se muestra principalmente con índices altos de abortos o de muerte prematura de cuyes lactantes (dentro de los primeros 5 días de nacidos) (Layme 2011). Además, la aparición de cepas de *Salmonella* resistentes a antibióticos dificulta el uso de este tipo de tratamiento para el control del mencionado agente patógeno (Zaman et al. 2017).

Existen pocos estudios de la enfermedad causada por *Salmonella* en los cuyes lo que conlleva a la necesidad de generar estrategias de prevención y control de dicha enfermedad.

Justificación de la Investigación:

Cavia porcellus “Cuy” es un roedor nativo de la región andina que ha contribuido a la seguridad alimentaria rural desde tiempo antiguos. Actualmente y desde la aparición de los sistemas comerciales de crianza se ha convertido en fuente de ingresos para las poblaciones rurales tanto de la sierra como de la costa de nuestro país (Chauca 1997).

Desarrollar métodos de prevención de enfermedades infecciosas en la crianza de cuyes permitirá mejorar la calidad del producto lo cual se traducirá en mayores ingresos económicos para los criadores y mejorará las posibilidades de exportación de este recurso.

Un método de prevención efectivo son las vacunas; las vacunas recombinantes o de subunidades utilizan sólo ciertos péptidos o proteínas del agente patógeno, lo que hace imposible la reactivación del mismo (como si puede ocurrir con bacterinas) evitando la dispersión del patógeno dentro del criadero (Desin et al. 2013). Además, un correcto diseño de la o las proteínas utilizadas permite estimular respuestas adaptativas específicas que permiten al sistema inmunológico protegerse de manera apropiada contra el organismo infeccioso (por ejemplo, respuesta vía CMH2 para patógenos extracelulares o vía producción de IgA para organismos que infectan a través de mucosas como la intestinal). Otra ventaja del diseño de las vacunas recombinantes es que si dos o más cepas son las causantes de la infección se pueden encontrar regiones conservadas intraespecie obteniendo una vacuna efectiva contra la mayoría o todas las cepas en cuestión.

El pilus tipo IV es un sistema multiproteico encargado de formar una estructura a manera de apéndice denominado pilus con reconocidas funciones en: Motilidad y adhesión en superficies sólidas, formación de biofilm, patogenicidad, entre otros (Balakrishna et al. 2009). La estructura básica del apéndice es un polímero de proteínas de un solo dominio (PilA) que surge desde la membrana interna bacteriana hacia la superficie ejerciendo sus funciones por su capacidad de elongarse y retraerse (polimerizar y depolimerizar) (Dunger et al. 2016). Las características básicas que debe tener un péptido o proteína para ser considerado candidato a vacuna son tres: potencial inmunógeno, expresión superficial y necesaria para causar la enfermedad (Patarroyo et al. 2011); el dominio proteico PilA cumple estas características.

Por otra parte, las técnicas de producción de proteínas recombinantes permiten estandarizar las metodologías de generación de péptidos o proteínas de manera relativamente rápida y sencilla, y una vez estandarizada la metodología los costos de producción son reducidos en comparación con otras técnicas (Soufi et al. 2015).

Objetivo General:

- Clonar, expresar y purificar el gen *pilA* de *Salmonella* aislada de *Cavia porcellus* “cuy” con signos de salmonelosis.

Objetivos Específicos:

- Aislar cepas de *Salmonella* a partir de cuyes con signos de salmonelosis.
- Determinar la patogenicidad de las cepas con ensayos de inoculación en cuyes sanos.

- Clonar y secuenciar el gen *pilA* de las cepas de *Salmonella* aisladas.
- Expresar y purificar la proteína PilA recombinante.

MARCO TEÓRICO

Cavia porcellus denominado comúnmente como cuy, cobayo, curi, conejillo de indias y en inglés Guinea pig es un mamífero roedor originario de la región andina, se ha estimado que su domesticación se inició hace 2500 a 3600 años por restos de abundantes excretas de cuy encontrados en el templo del Cerro Sechín (Perú). Se han encontrado indicios de alimentación con carne de cuy en los pobladores del período de Paracas Cavernas (700 a 500 a.C); además, en el Período de Paracas Necrópolis casi todas las casas tenían un cuyero (500 a.C – 200 d.C.) (Moreno A 1989). El cuy ha constituido desde esas épocas una importante fuente proteica, se ha estimado que el consumo anual per cápita de cuy en el Perú es de 800 gr. (Andina, 2013). Actualmente viene aumentando la demanda del cuy para la exportación es así que en el año 2000 se exportaron 145 kg de carne de Cuy, pero para el año 2006 las cifras se incrementaron a 7762 kg con un valor total de 56 794 dólares americanos siendo el principal país de destino Estados Unidos (MINAG 2014).

Aunque la distribución del cuy no está restringida al Perú, este presenta la mayor población de cuyes alcanzando aproximadamente 23 millones de animales (MINAG 2003) estando el 92% de la población en la sierra y solo el 6% en la costa. Tanto en Perú como en Ecuador la distribución del cuy es amplia, encontrándose casi en la totalidad del territorio, a diferencia de otros países como Colombia y Bolivia donde la distribución es regional y por lo tanto presentan poblaciones menores (Chauca L 1997).

La producción del cuy se puede clasificar en tres niveles de acuerdo al sistema de crianza (Chauca L 1997): el sistema familiar, el familiar-comercial y el comercial. El sistema familiar se caracteriza por desarrollarse fundamentalmente como sustento para la alimentación de la familia, los cuyes son criados por los miembros de la familia y los alimentan con malezas, residuos de cosecha y residuos de cocina, se crían alrededor de 25 cuyes en este sistema (Zaldivar M et al. 1990). El sistema familiar-comercial nace siempre de los sistemas familiares en áreas rurales cercanas a la ciudad, donde el criador pueda fácilmente comercializar su producto; los productores invierten recursos monetarios para infraestructura, tierra para la siembra de forrajes y mano de obra para el manejo de la crianza, en este sistema se mantienen entre 100 y 500 cuyes. Por último, el sistema comercial se presenta mayormente en empresas agropecuarias, se mantienen áreas de cultivo para la siembra del forraje, se utiliza además alimento balanceado; este sistema mantiene por lo menos 3000 cuyes.

En la crianza del cuy se han reportado diversas enfermedades infecciosas ocasionados por bacterias como *Bordetella bronchiseptica*, *Diplococcus pneumoniae*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Streptococcus pyogenes*, *Pasteurella spp.*, *Escherichia coli*, *Clostridium sp.*, *Shigella sp.*, *Streptococcus zooepidemicus*, y especialmente el género *Salmonella* (Morales S 2012).

Salmonella es un género de bacterias gramnegativas perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, este género está dividido en dos especies *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*, *S. enterica* comprende más de 2500 serotipos que están ordenados en 7 grupos: I, II, IIIa, IIIb, IV, VI y VII. Existe una gran diversidad en este género, se cree que este género evolucionó para adaptarse de sus

hospederos reptiles a mamíferos hace unos 200 millones de años. Actualmente los serotipos de *Salmonella* pueden infectar un amplio rango de hospederos, desde reptiles y aves hasta mamíferos incluyendo humanos (Gamazo C e Irache J 2007).

La literatura ha descrito a *Salmonella* como el principal agente infeccioso en cuyes. Durante largo tiempo se ha observado una gran susceptibilidad a la salmonelosis en los cuyes, de hecho, existen reportes que señalan que hasta el 95% de muertes de la morbilidad general es generada por este agente causal variando los efectos según el estado de desarrollo del cuy (52.70% en adultos y 19.83% en lactantes, Leguía 1993). Sin embargo, es importante resaltar que no se han realizado estudios de inoculación de cepas de *Salmonella* en cuyes sanos para demostrar su patogenicidad y por lo tanto queda en cuestionamiento la patogenicidad real de *Salmonella* en cuyes.

Aunque no existe referencias exactas de cuál es el serotipo causante de la Salmonelosis en los cuyes, se ha reportado presencia de *Salmonella enterica subsp. enterica serovar enteritidis* (Matsuura A et al 2010), *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium* (Guamán M 2014).

La principal vía de infección es la oral a través de alimentos contaminados, esto ocasionado en gran medida por las malas prácticas de manejo, deficiente nivel de bioseguridad que ocasionan presencia de roedores y aves contaminados, ingreso no controlado de personal, estrés en los cuyes (Figuroa I y Verdugo A 2005). Además, se ha determinado que las variaciones de temperatura y humedad predisponen a la aparición de infecciones (Ramírez 1972).

La salmonelosis en cuyes se puede manifestar de dos formas: crónica o aguda, siendo esta última la que mayor mortalidad causa presentándose como un cuadro septicémico agudo que genera muertes en 24 a 48 horas. Los signos más frecuentes son decaimiento, postración, anorexia, adelgazamiento, pelos ásperos y erizados y parálisis de los miembros posteriores; aunque en muchos casos los animales mueren sin mostrar síntoma alguno (Layme 2010). En los casos crónicos se presenta un adelgazamiento paulatino, pelaje deslucido y aumento del volumen abdominal (Evans A 2005).

Actualmente, la mayoría de criaderos realiza el control de la Salmonelosis utilizando antibióticos como Sulfatrimetoprim, enrofloxacin, estreptomycin, amoxicilina, cloranfenicol, fosfomicina. Estos antibióticos son administrados por vía oral a través del alimento balanceado, la aparición de cepas resistentes a antibióticos es un problema que afecta en gran medida el uso de estas metodologías de control. Por lo tanto, se sigue requiriendo de métodos de prevención más efectivos que permitan desarrollar un sistema de crianza con menores índices de morbilidad y mortalidad.

La principal forma de detección molecular de *Salmonella* es detectando el gen *invA*. La proteína InVA forma parte de un complejo multiproteico denominado Sistema de Secrecion tipo III. Este sistema esta conformado por una serie de subcomplejos que en conjunto atraviesan las dos membranas celulares de *Salmonella*. El sistema de secreción tipo III forma un poro y un apéndice a modo de aguja por el que *Salmonella* puede liberar diversas proteínas de virulencia que le permiten colonizar el tracto digestivo del hospedero (Hu B et al. 2017). Se ha demostrado que cepas mutantes en el gen *invA* presentan menor patogenicidad (Galán J et al. 1992). La alta conservación de este gen en el género *Salmonella* y su importancia en la patogenicidad (Galán J y Curtis R. 1991, Ginocchio C et al. 1995) han hecho que la detección de este gen sea el procedimiento más común para la detección

de *Salmonella* patogénica a partir de diferentes muestras (Kasturi K y Drgon T. 2017, Yanestria S et al. 2019, Heymans R et al. 2018).

Una forma bastante estudiada para el control de la *Salmonella* son las vacunas, sin embargo la mayoría de vacunas producidas actualmente están destinadas a la industria de aves de corral (Desin T et al. 2013) y hasta la fecha son pocos los estudios realizados en cuyes, además resulta interesante recalcar que gran parte de la información acerca de vacunas contra *Salmonella* probadas en cuyes se ha realizado con el objetivo de utilizarlas en otros animales y no en el cuy (el cuy es utilizado como animal modelo). Esto no ha permitido que se desarrollen trabajos continuos enfocados a desarrollar una vacuna ideal para cuyes, en cambio se han probado vacunas contra cepas y serotipos de *Salmonella* de poca importancia para la crianza de cuyes como *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi* (Dima V et al. 1989), *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Dublin* (Cameron C y Fuls W. 1975, Smith W y Halls S. 1966), *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Abortusequi* (Singh B et al. 2005), aunque en algunos casos llegando a una efectividad del 100%.

Las bacterias poseen apéndices filamentosos llamados pilus. Uno de estos pilus está conformado por el llamado sistema de Pilus Tipo IV. Este sistema esta conformado por una plataforma en el citoplasma constituida por unas proteínas comúnmente llamadas PilC. Estas proteínas sirven de anclaje para un complejo de proteínas transmembrana que unen el Pilus tipo IV al peptidoglicano de las bacterias gramnegativas. En la membrana externa se forma un poro conformado por un anillo de unas proteínas llamadas PilQ. Por este poro, es que unas unidades proteicas con capacidad de polimerizarse llamadas PilA son transportadas al exterior de la célula donde el polímero de PilA cumple sus funciones (Craig L et al. 2019).

El polímero de PilA tiene capacidad de retraerse y alongarse gracias a la acción de una ATPasa de retracción (PilT) o una ATPasa de alongación (PilB) respectivamente. La capacidad de retraerse y alongarse del polímero de PilA, además de su capacidad de formar interacciones con superficies sólidas permiten que el sistema de Pilus Tipo IV funcione como un apéndice locomotor. Por otro lado, polímeros de PilA son capaces de interactuar con ADN extracelular lo que permitiría que al momento de retraerse puedan promover la transformación de la bacteria (Dunger G et al. 2016).

Al estar expuesto a la superficie y ser importante para la adhesión al hospedero, el polímero de PilA ha demostrado ser un candidato a vacuna. En efecto, varios estudios han mostrado el potencial inmunogénico de la proteína PilA de diferentes bacterias gramnegativas en diversos modelos animales. Por ejemplo, Ysebaert C et al. (2019) muestran que PilA de *Haemophilus influenzae* genera una respuesta de anticuerpos en *Mus musculus* y *Chinchilla lanígera*; Gholami M et al. 2017 muestran que un complejo de PilA-PilQ de *Pseudomonas aeruginosa* es inmunogénico en *Mus musculus*; y Hang L et al. (2003) muestran que PilA de *Vibrio cholerae* es inmunogénico en humanos.

ANTECEDENTES:

Diversos autores han estudiado los efectos de la inoculación de diferentes especies de *Salmonella* en cuyes. Sin embargo, no se llega a un consenso debido a la falta de una prueba contundente que demuestre el desarrollo de la enfermedad tras la inoculación de *Salmonella* en cuyes sanos. Por ejemplo, Asakawa et al (1954) reportan la aparición de brotes en Japón que causaron la muerte de gran cantidad de cuyes. Mencionan que los análisis bacteriológicos determinaron la presencia de

Salmonella, pero también de *Streptococcus* hemolíticos. Además, realizan ensayos de inoculación de *Salmonella* y aunque la mayoría de los cuyes infectados fallecieron, sus estudios bacteriológicos demostraron la presencia de *Streptococcus* hemolíticos. Ellos concluyen que el brote epidémico fue causado por *Streptococcus* hemolíticos y que la presencia de *Salmonella* fue dada la debilitación del sistema inmunológico causado por *Streptococcus* permitiendo finalmente el desarrollo de *Salmonella*. Por otro lado, una buena cantidad de estudios que concluyen que *Salmonella* es agente patógeno causante de enfermedad en cuyes se basan sólo en análisis bacteriológicos. Layme et al. (2011) realizan un estudio prospectivo con 81 necropsias de cuyes de los que se consiguió aislar *Salmonella*; Ortega et al (2015) asocian el aislamiento positivo de *Salmonella* a partir de hisopados vaginales con la mortinatalidad en una granja de cuyes en Huancayo encontrando que el 91.5 % de muertes (118/129) se debió a causas no infecciosas u otras infecciones diferentes a *Salmonella*, pero extrañamente concluyen que la salmonelosis debe ser considerada como causas de mortinatalidad en cuyes; estos estudios no permiten asociar directamente que la causa de la enfermedad mortal en los cuyes sea *Salmonella*. Probablemente un estudio que sea parcialmente convincente en demostrar la patogenicidad de *Salmonella* en cuyes sea el de Smith y Halls (1966) quienes inoculan oralmente una suspensión acuosa de *Salmonella enterica subsp. enterica serovar* Typhimurium o *Salmonella enterica subsp. enterica serovar* Choleraesuis y determinan una diferencia significativa en el número de muertes de cuyes que no fueron previamente inmunizados con *Salmonella* Dublin de aquellos que fueron inmunizados con *Salmonella enterica subsp. enterica serovar* Dublin. De 22 cuyes no inmunizados inoculados con *Salmonella enterica subsp. enterica serovar* Typhimurium 15 fallecieron, en el caso de los inoculados con *Salmonella* Choleraesuis de 27 cuyes 20 fallecieron. Sin embargo, es importante notar que en 6 cuyes no vacunados y que sobrevivieron al ensayo fue posible aislar *Salmonella* surgiendo la posibilidad que los cuyes no fuesen muertos solo por la presencia de *Salmonella* sino por algún otro efecto posiblemente sinérgico con alguna otra especie bacteriana como descrito por Asakawa et al (1954). Otro tipo de estudios como el de Takeuchi A y Sprinz H (1967) muestran el desarrollo de una enfermedad parecida a la tifoidea incluyendo aparición de lesiones granulomatosas en múltiples órganos, granulomas focales en placas de Peyer y ulceraciones en el intestino en cuyes inoculados con *Salmonella*. Sin embargo, estos cuyes fueron predispuestos a adquirir la enfermedad ya que fueron mantenidos por 4 días sin alimentación y la inoculación fue por tubo estomacal además de la administración de opio intraperitoneal para inhibir los movimientos peristálticos y favorecer el desarrollo infeccioso de *Salmonella*. Por lo tanto, este trabajo pretende aislar *Salmonella* de cuyes fallecidos con aparente infección por *Salmonella* e inocular estas cepas en cuyes sanos esperando el desarrollo de una enfermedad con los mismos signos encontrados en los cuyes de donde se aisló la cepa para confirmar la patogenicidad de las cepas encontradas.

Diversas vacunas han sido probadas para el control de Salmonelosis. Desin et al. (2013) publican una revisión mencionando tres grupos principales de ellas: vacunas vivas atenuadas de *Salmonella*, vacunas inactivadas de *Salmonella* y vacunas de subunidades. Los resultados obtenidos son diversos, pero aún sin tener uno que sobresalga sobre los demás ni uno que muestre una alta efectividad. En el primer grupo, mutantes de *Salmonella* en los genes *aroA*, *cya/crp*, *phoP/fliC*, *lon/cpxR*, *cobS/cbiA*, o en islas de patogenicidad completas SPI-1, SPI-2 han mostrado principalmente capacidad de reducir la colonización en aves de corral. El segundo grupo de vacunas que incluyen vacunas licenciadas con cepas muertas en condiciones bajas de hierro u otras que incluyen varias cepas de *Salmonella* muertas por diferentes métodos han mostrado cierta efectividad en la protección de la infección por esquilado

y reducción de la colonización. Las vacunas de subunidades basadas en extractos crudos de proteínas de *Salmonella enterica subsp. enterica serovar* Enteritidis, FliC, Fimbrias tipo I y proteínas de las islas de patogenicidad SPI-1 o SPI-2 han mostrado pobres efectos beneficiosos en la reducción de la colonización o en el caso de la vacuna de subunidad con Fimbrias tipo I la protección de las cáscaras de huevos y el tracto reproductivo, pero sin mostrar efectos beneficiosos en la colonización. Como ya fue mencionado antes, PilA es conocida como una proteína estructural relacionada a la patogenicidad de varias bacterias, pero creemos que sólo esta proteína no será suficiente para desarrollar una vacuna efectiva, lo que proponemos es estandarizar la purificación de PilA para que posteriormente pueda ser probada en conjunto con otras proteínas obteniendo una vacuna multiepitópica con mayor probabilidad de generar inmunidad prolongada en los organismos objetivo.

HIPÓTESIS:

Si se aísla *Salmonella* a partir de *Cavia porcellus* con signos de salmonelosis será posible clonar, expresar y purificar PilA recombinante de *Salmonella* para su uso como vacuna de subunidades.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Lugar de Ejecución:

Laboratorio de Microbiología – Facultad de Ciencias Biológicas – Universidad Ricardo Palma

Tipo y diseño de Investigación:

Investigación Básica y experimental

Operacionalización de variables:

OPERACIONALIZACION DE LAS VARIABLES					
Objetivos específicos	Variable	Indicador	Escala de medida	Instrumento	Categorización de la variable
Aislar cepas de <i>Salmonella</i> a partir de cuyes con signos de salmonelosis.	Cuyes	Colonias de <i>Salmonella</i>	Presencia	Cultivo Bacteriano	Presencia Ausencia
Determinar la patogenicidad de las cepas con ensayos de inoculación en cuyes sanos.	Cuy inoculado	Temperatura Peso	Grados centígrados Gramos	Termómetro Balanza	Variables cuantitativas
Purificación de la proteína PilA recombinante	Purificación	Banda de proteína	Presencia	Electroforesis	Presencia Ausencia

Muestreo:

Se analizaron 13 cuyes con signos de salmonelosis (erizamiento de pelo, delgadez, respiración acelerada y decaimiento general) obtenidos de criaderos ubicados en el distrito de Pachacamac. Los cuyes fueron transportados al laboratorio de microbiología donde se procedió al aislamiento de *Salmonella* a partir de 4 órganos: Pulmón, hígado, bazo e intestino.

Procedimientos y Análisis de Datos:

1. Obtención de muestras de cuyes:

Los cuyes con signos de Salmonelosis fueron obtenidos del criadero del Sr. Eliazar ubicado en el centro poblado Picapiedra en el distrito de Pachacamac – Lima – Perú. Estos fueron trasladados en coolers refrigerados a 4°C hasta el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma. Una vez en el laboratorio los cuyes fueron disectados en condiciones estériles, separando el bazo, hígado, pulmón e intestino.

2. Aislamiento presuntivo de cepas de *Salmonella enterica*:

Las muestras de órganos fueron cortadas en trozos de aproximadamente 1 cm² y fueron colocados en 3 ml de caldo Selenito durante 24 horas a 37 °C, al cabo de este tiempo se tomó una muestra de 50 ul y se estrío sobre la superficie de placas Petri con medio Salmonella – Shigella. Las placas Petri fueron incubados por 24 horas a 37 °C. Al cabo de este tiempo, las colonias que presentaron características culturales de *Salmonella* (circulares incoloras con centro negro en medio ligeramente amarillo) fueron transferidas a placas recién preparadas con medio Salmonella – Shigella e incubadas de la misma forma. Finalmente, una muestra de las colonias aisladas fue inoculada en 3 ml de caldo nutritivo e incubados por una noche a 37 °C. Las cepas fueron almacenadas a -20 °C en glicerol al 15 %.

3. Identificación Molecular de *Salmonella enterica*:

Las cepas fueron reactivadas en medio SS por 24 horas a 37 °C. Se tomaron 3 colonias y se colocaron en tubos de microcentrífuga con 50 ul de agua destilada estéril y fueron calentadas a 90 °C por 5 minutos. Al cabo de este tiempo se centrifugaron las muestras a 10 000 rpm por 3 minutos y se tomó como muestra de ADN el sobrenadante. Para la identificación se utilizaron dos pares de primers: F_invA TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C 3', R_invA 5' GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA 3' y F_pilA 5' ATG GAA AAA CAA CGC GGT TTC 3', R_pilA 5' TTA GTT GGC GTC AAA ACG GAA G 3'; los cuales amplifican un fragmento del ORF *invA* y el ORF completo de *pilA*. Posteriormente, se realizó un PCR múltiple para los genes *invA* y *pilA*. La reacción de PCR estuvo compuesta por los siguientes reactivos: 1x Taq buffer (NH₄)₂SO₄, dNTP 0.2 mM, 0.2 uM primers, 0.05 u/ul Taq DNA polimerasa, 3 mM MgCl₂ y 5 ul de muestra de ADN en un volumen final de 25 ul. El programa de PCR fue el siguiente: Pre-PCR 94 °C por 5', 35 ciclos de 94 °C por 45'', 49 °C por 45'', 72 °C por 1' y finalmente un post-PCR a 72 °C por 10'. Los resultados del PCR fueron analizados en geles de agarosa al 1 %, resueltos en buffer TAE a 100 voltios por 40 minutos y teñidos por 15 minutos en solución de Bromuro de Etidio. La presencia de dos bandas una de 438 pb (*pilA*) y otra de 285 pb (*invA*) indicaron un resultado positivo a la presencia de *Salmonella*.

4. Obtención de secuencias del gen *pilA*:

Los amplicones de *pilA* obtenidos fueron digeridos con las enzimas de restricción NheI y BamHI y ligados en el vector pET28a(+) previamente digerido con las mismas enzimas; las ligaciones fueron

insertadas en *Escherichia coli* DH5alfa y posteriormente se seleccionó las colonias positivas por su crecimiento en antibiótico kanamicina. Las colonias positivas fueron repicadas en caldo Luria e incubadas a 37 °C por 16 horas. Finalmente, se aisló plásmido a partir de estos cultivos, se confirmó la presencia del inserto por ensayo de restricción y se secuenció las regiones del inserto usando el método de Sanger con los mismos primers que los utilizados para la clonación (F_pilA y R_pilA). Para el secuenciamiento primero se amplificó la región de interés en una reacción de PCR conteniendo 1x Taq Buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 25 pmol de cada primer y 1 U de Taq DNA polimerasa en un volumen final de reacción de 25 ul. El programa de PCR fue el siguiente: Pre-PCR 94 °C por 5', 35 ciclos de 94 °C por 45'', 49 °C por 45'', 72 °C por 1' y finalmente un post-PCR a 72 °C por 10'. Posteriormente, el producto del PCR fue utilizado como molde para realizar la reacción de secuenciamiento usando el kit BigDye™ v 3.1. La reacción consistió en 4 ul del molde, 1x buffer de secuenciamiento, 25 pmol del primer forward o reverse y 2 ul de Big Dye en un volumen final de 20 uL. El programa para esta reacción fue una denaturación inicial a 94 °C por 5' seguido de 40 ciclos de 94 °C por 30'', 50 °C por 30'' y 60 °C por 4'. El producto de esta reacción fue precipitado con 80 ul de isopropanol al 70 % usando centrifugación a 4000 rpm a 4 °C por 40'. El sobrenadante fue descartado y la muestra precipitada resuspendida en agua ultrapura fue inyectada en un equipo ABI PRISM® 3130XL.

5. Análisis bioinformáticos del gen *pilA*:

Los resultados del secuenciamiento fueron revisados utilizando el programa ApE. Se realizaron alineamientos utilizando el programa online Clustal Muscle (para ADN) y Clustal Omega (para proteínas). Secuencias utilizadas para la comparación fueron obtenidas de la base de datos KEGG.

6. Inoculación de *Salmonella* en Cuyes:

6 cuyes de raza Perú machos originarios del INIA fueron utilizados en los ensayos de inoculación, estos fueron mantenidos en jaulas individuales de 50 x 20 cm con agua y alimento balanceado *ad libitum*, además, de una ración de 10 gr de chala fresca diaria obtenida de los cultivos de la Universidad Ricardo Palma. Inicialmente, los cuyes se mantuvieron durante 7 días para su adaptación, se les controló una vez al día la temperatura durante todo el experimento. El peso de cada cuy fue anotado el día inicial del experimento, el día de la inoculación y 9 días luego de la inoculación. Adicionalmente, al tercer día de adaptación se les realizó un análisis de heces para confirmar que no sean portadores de *Salmonella*. Luego de los 7 días de adaptación se inoculó a tres de los cuyes (grupo experimental) 2.4×10^{14} unidades formadoras de colonia (UFC) de *Salmonella enterica subsp. enterica serovar* Typhimurium ATCC 14028 en 1 ml de Caldo infusión Cerebro-Corazón (BHI) vía oral. A otros tres cuyes (grupo control) se les inoculó vía oral 1 ml de BHI estéril. Finalmente, luego de 14 días se analizó nuevamente deposiciones de los cuyes para confirmar la presencia de *Salmonella* en el tracto intestinal de los cuyes inoculados.

7. Clonación del gen *pilA*:

Se extrajo ADN genómico de las cepas de *Salmonella* aisladas a partir de cuyes y utilizando como muestra este ADN se amplificó la región codificante de los aminoácidos del 30 al 145 del marco abierto de lectura de *pilA* utilizando primers específicos diseñados en base a las secuencias de cepas de *Salmonella* encontrados en la base de datos NCBI y KEGG. Los primers diseñados contienen secuencias de corte para enzimas de restricción adicionadas en los extremos 5' para permitir los procedimientos de clonación en vectores de expresión pET. Una vez amplificadas las regiones de

interés ests fueron tratadas con las enzimas de restricción correspondientes; el proceso de digestión fue evaluado por electroforesis de agarosa. Una vez confirmado el peso esperado del fragmento este fue purificado a partir del gel de agarosa. Por otro lado, el plásmido de expresión (pET28a(+)) también fue digerido con las mismas enzimas y tras la verificación de los pesos moleculares esperados por electroforesis de agarosa, también fue purificado. Finalmente, los dos fragmentos (el amplicon de *pilA*₃₀₋₁₄₅ y el plásmido linearizado) fueron ligados con ligasa T4 y las ligaciones fueron transformadas en *E. coli* DH5. Clones transformados fueron inoculados en medio Luria para multiplicación del plásmido. Los plásmidos fueron extraídos por lisis alcalina a partir de estos cultivos y se realizaron ensayos de restricción y secuenciamiento por método de Sanger para confirmar la presencia del gen *pilA*. Se utilizó el programa Clustal Omega para realizar alineamientos y comparar la secuencia del gen *pilA* aislado de cuyes con otras secuencias de *pilA* en la base de datos.

8. Expresión y purificación de la proteína PilA recombinante:

Los plásmidos verificados por secuenciamiento fueron utilizados para transformar por shock térmico cepas de *E. coli* BL21(DE3). Los clones obtenidos fueron utilizados para realizar ensayos de expresión. Para esto las cepas fueron incubadas en medio 2xTY hasta alcanzar un OD600 entre 0.6 – 0.8. Una vez que el cultivo alcanza un OD600 entre 0.6 – 0.8 se aadin al medio IPTG hasta una concentración final de 0.5 mM y el medio conteniendo las bacterias se incubó por 18 horas a 18 C. Al cabo de este tiempo, el caldo fue centrifugado para obtener el pellet bacteriano. El pellet fue resuspendido en buffer de lisis (20 mM Tri-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl y 50 mM Imidazol) y sonicado por 30 minutos. El lisado obtenido fue centrifugado a 16 000 rpm, la fracción soluble obtenida se inyectó en una columna HiTrap de 5 ml previamente equilibrada con 300 mM de NiSO₄ y buffer de lisis. Luego de la inyección de la muestra, la columna fue lavada con 100 ml de buffer de lisis y posteriormente, se eluyó la proteína de interés con buffer de elución (20 mM Tri-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl y 500 mM Imidazol). La fracción eluida fue inyectada en una columna Superdex S75 26/600 para cromatografía de exclusión de tamaño previamente equilibrada con buffer de equilibrio (20 mM Tri-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl). Se colectaron fracciones de 5 ml de esta cromatografía, las cuales fueron evaluadas por SDS-PAGE para determinar la pureza de la proteína.

Aspecto tico:

Los experimentos de inoculación en cuyes fueron realizados en el Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA) en coordinación con la Prof. Dra. Lilia Chauca, siguiendo los lineamientos éticos dictados por la Ley N 27265

RESULTADOS:

1. Aislamiento de presuntas cepas de *Salmonella*.

Se analizaron 13 cuyes, 12 con aproximadamente 6 horas de haber muerto y 1 que había muerto 1 hora antes de la disección. Tras los aislamientos en medio SS se observaron 5 tipos de colonias con diferentes características culturales resumidas en la Tabla 1. En total se aisló 18 cepas que presentaban características culturales de *Salmonella enterica*; otras 4 cepas con diferentes características también

fueron aisladas. Del total de 22 cepas 7 fueron encontradas en el bazo, 5 en el intestino, 4 en el pulmón y 6 en el hígado. Los datos finales de las cepas obtenidas se resumen en la tabla 2.

Tabla 1. Características culturales de los diferentes tipos de colonias encontrados.






Forma	Diámetro	Color	Centro	Color del medio	Foto
Circular	2-3 mm	Incolora	Negro grande	Amarillo	
Circular	2-3 mm	Incolora	Negro mediano	Amarillo	
Circular	2-3 mm	Incolora	Negro pequeño	Amarillo	
Circular	2-3 mm	Incolora	Amarillento	Amarillo	
Circular	2-3 mm	Rosada	Rosado	Rosado	

Tabla 2. Resumen del cepario preservado obtenido tras los aislamientos.

N°de Cepa	Órgano del que procede	invA/pilA	Salmonella enterica
1	Bazo	-/-	NO
2	Intestino	+/+	SI
3	Bazo	+/+	SI
4	Pulmón	+/+	SI
5	Bazo	-/-	NO
6	Bazo	-/-	NO
7	Hígado	-/-	NO
8	Intestino	+/+	SI
9	Hígado	+/+	SI
10	Hígado	-/-	NO
11	Intestino	-/-	NO
12	Bazo	-/-	NO
13	Bazo	-/-	NO
14	Intestino	+/+	SI
15	Hígado	+/+	SI
16	Hígado	-/-	NO
17	Bazo	+/+	SI
18	Hígado	+/+	SI
19	Intestino	-/-	NO
20	Pulmón	+/+	SI
21	Pulmón	-/-	NO
22	Pulmón	+/+	SI

2. Identificación molecular de *Salmonella enterica*.

Se realizó el PCR múltiple a las 22 cepas obtenidas; de las 18 que presentaban características culturales de *Salmonella*, 11 dieron positivo a los dos genes, los 7 restantes y las 4 que no presentaban características culturales de *Salmonella* dieron negativos para ambos genes.

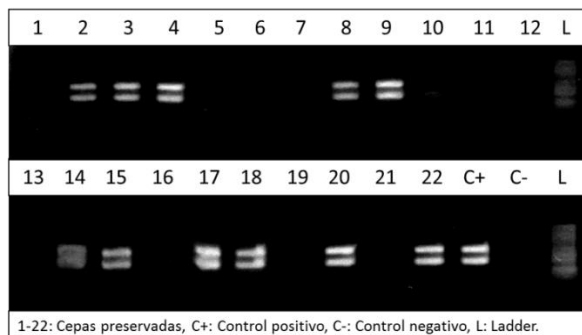


Figura 1. Identificación molecular de *Salmonella enterica* aislada a partir de cuyes. Electroforesis en agarosa de amplicones del PCR múltiple (*invA* (258 pb) y *pilA* (438 pb)) de las 22 cepas preservadas.

3. Análisis bioinformático del secuenciamiento del gen *pilA*.

De las 11 cepas de *Salmonella* obtenidas 1 mostro una identidad de 100 % con el gen *pilA* de *Salmonella enterica subsp. enterica serovar* Typhimurium mientras las otras 10 mostraron la variación de un único nucleótido (99 % de identidad) respecto también al gen *pilA* del serotipo Typhimurium (Figura 2), cuando se analizó la secuencia traducida se observó que esta sustitución no es silenciosa debido a que también modifica la secuencia proteica sustituyendo una isoleucina (I) por una treonina (T) (Figura 3).

```

Sal-Cuyes      ATGGA AAAACAACCGCGTTTCA CGCTTATCGAACTGATGGTCGTTATTGGCATCATCGCC
Sal-Control   ATGGA AAAACAACCGCGTTTCA CGCTTATCGAACTGATGGTCGTTATTGGCATCATCGCC
*****

Sal-Cuyes      ATTTTAAGCGCCATTGGCATTCCGGCTTACCGAACTATCTGCGTAAAGCGGCGTGAAG
Sal-Control   ATTTTAAGCGCCATTGGCATTCCGGCTTACCGAACTATCTGCGTAAAGCGGCGTGAAG
*****

Sal-Cuyes      GATATGTTGCAAA CGTTTGTCCCTACCGTACTGCCGTCGAACTCTGCCCTGTGGAACAT
Sal-Control   GATATGTTGCAAA CGTTTGTCCCTACCGTACTGCCGTCGAACTCTGCCCTGTGGAACAT
*****

Sal-Cuyes      GGTGGGACGAGCACA TCGGATGCGGGCGTCAACGGTATCCCCCTCGCCCGTCATCACCCGT
Sal-Control   GGTGGGACGAGCACA TCGGATGCGGGCGTCAACGGTATCCCCCTCGCCCGTCATCACCCGT
*****

Sal-Cuyes      TATGTTTCGGGCATGAGCGTGGAAAAAGGCGTCATCACGCTTACCGGCCAGGAGACTCTG
Sal-Control   TATGTTTCGGGCATGAGCGTGGAAAAAGGCGTCATCACGCTTACCGGCCAGGAGACTCTG
*****

Sal-Cuyes      AGCGGCTTAGCGTCATCATGACGCCCGCCTGGGACATGCTTAAAGCGCATTACTGECTGG
Sal-Control   AGCGGCTTAGCGTCATCATGACGCCCGCCTGGGACATGCTTAAAGCGCATTACTGECTGG
*****

Sal-Cuyes      ACGCGTAACTGCAATCTCAAAGCGACAGCGCGTTACAACAGGCTTGTGAAATGTCTTC
Sal-Control   ACGCGTAACTGCAATCTCAAAGCGACAGCGCGTTACAACAGGCTTGTGAAATGTCTTC
*****

Sal-Cuyes      CGTTTTGACGCCAACTAA
Sal-Control   CGTTTTGACGCCAACTAA
*****

```

Figura 2. Alineamiento de *pilA* de *Salmonella* aislada de cuyes y de *Salmonella enterica subsp. enterica serovar* Typhimurium. Alineamiento de la secuencia de *pilA* obtenida en 10 de las 11 cepas analizadas (Sal-Cuyes) mostrando la única sustitución respecto al gen *pilA* de una cepa de *S. Typhimurium* LT2 (Sal-

```

Sal-Cuyes      MEKQRGFTLIELMVVIGIIAILLSAIGIPAYQNYLRKAALTDMLQTFVPYRTAVELCALEH
Sal-Control    MEKQRGFTLIELMVVIGIIAILLSAIGIPAYQNYLRKAALTDMLQTFVPYRTAVELCALEH
*****

Sal-Cuyes      GGTSTCDAGVNGIPSPVITRYVSGMSVEKGVITLTGQESLSGLSVIMTPAWDNANGITGW
Sal-Control    GGTSTCDAGVNGIPSPVITRYVSGMSVEKGVITLTGQESLSGLSVIMTPAWDNANGITGW
*****

Sal-Cuyes      TRNCMTQSDSALQQACEDVFRFDAN
Sal-Control    TRNCITQSDSALQQACEDVFRFDAN
*****

```

Figura 3. Alineamiento de Pila de *Salmonella* aislada de cuyes y de *Salmonella enterica subsp. enterica serovar* Typhimurium obtenida en 10 de las 11 cepas analizadas (Sal-Cuyes) mostrando la sustitución de un residuo de isoleucina en *Salmonella enterica subsp. enterica serovar* Typhimurium LT2 (Sal-Control) por una treonina.

4. Inoculación de *Salmonella* en cuyes.

Los promedios de temperaturas medidas diariamente para el grupo control y experimental se muestran en la figura 4, se pudo observar un aumento de la temperatura en el grupo experimental respecto al control entre los días 7 y 11 después de la inoculación; sin embargo, ningún otro signo se manifestó en los cuyes (ni jadeo, ni ojos entrecerrados, ni erizamiento de pelo, ni parálisis de miembros posteriores, ni heces diarreicas); además, luego del día 11 se observa un decaimiento de la temperatura del grupo experimental regresando a niveles similares al del grupo control. Respecto al análisis de los pesos, como se observa en la figura 5, a pesar de observarse que los promedios del grupo control fueron mayores que los del grupo experimental las barras de error (desviación estándar) muestran una superposición señalando que no existe diferencia significativa. Finalmente, el análisis de heces post inoculación (figura 6) mostró presencia de *Salmonella* en el grupo experimental y ausencia en el grupo control.

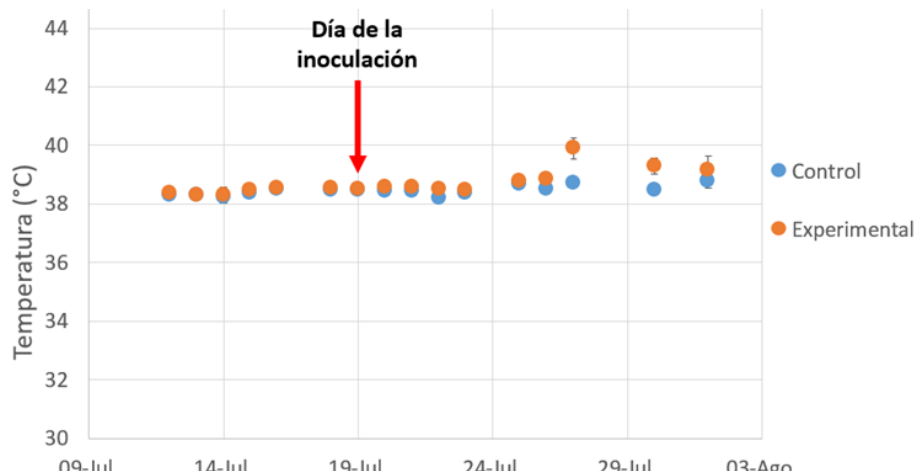


Figura 4. Variación de la temperatura en los cuyes durante los ensayos de inoculación. Promedios de temperaturas por días en el grupo control y experimental. Se observó un aumento de temperatura en el grupo experimental con respecto al grupo control entre los días 26-Jul y 30-Jul. La flecha roja señala el día de la inoculación y las barras de error, las desviaciones estándar.

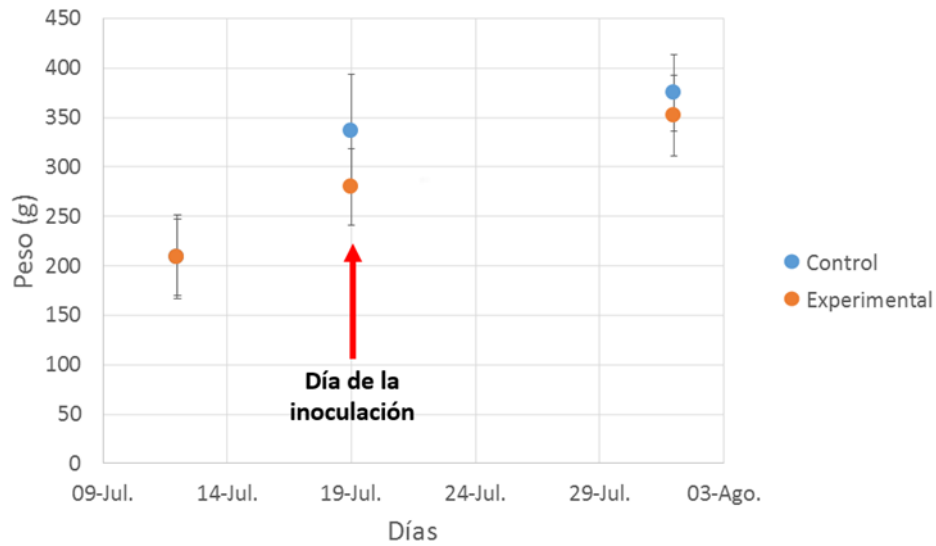


Figura 5. Variación del peso de los cuyes durante los ensayos de inoculación. Promedios de pesos por días en el grupo control y experimental. No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos. La flecha roja señala el día de la inoculación y las barras de error representan las desviaciones estándar.

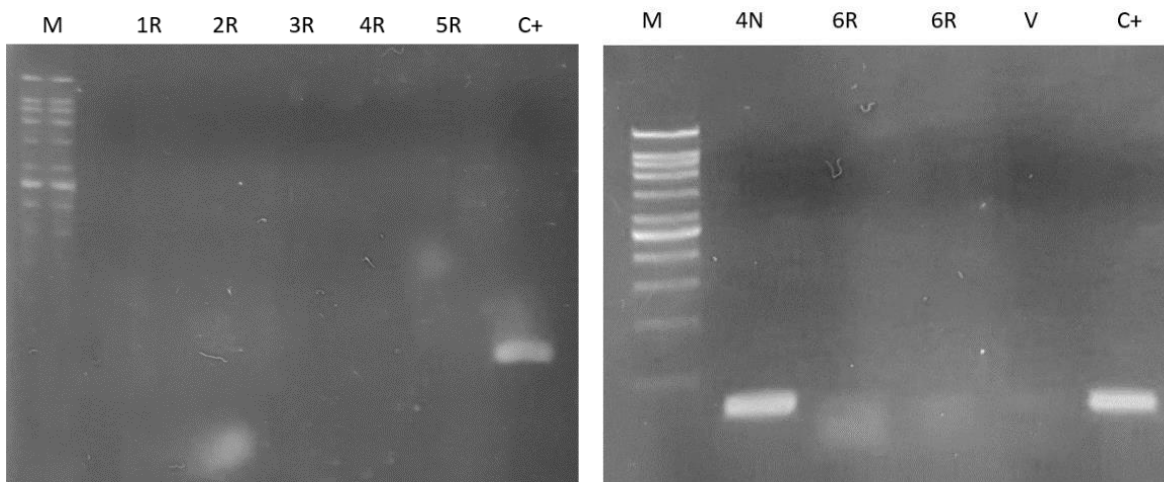


Figura 6. Análisis de presencia de gen *invA* en cepas aisladas de los cuyes después de los ensayos de inoculación. Izquierda: M: marcador de peso molecular; 1R, 2R, 3R, 4R, 5R, 6R cepas con colonias de características diferentes a la esperada para *Salmonella* aisladas de los cuyes del grupo control; 4N: Cepa con colonias de características esperadas para *Salmonella* aisladas de cuyes del grupo experimental; V: Pocillo vacío; C+: control positivo correspondiente a *invA* amplificado a partir de ADN de *Salmonella* ATCC14028. Se observa banda positiva esperada sólo en 4N aislada de cuyes del grupo experimental.

5. Clonación del gen *pilA*.

Para la clonación del gen *pilA* en el vector pET28a(+), primero se realizó un PCR para obtener la región codificante de los aminoácidos del 30 al 145 de *pilA* de las cepas aisladas a partir de cuyes; además, esta amplificación añadió sitios de restricción para las enzimas BamHI y XhoI en los extremos 5' y 3' respectivamente. Posteriormente, el plásmido pET28a(+) y los amplicones obtenidos fueron digeridos con las enzimas mencionadas. La aparición de bandas del peso esperado en gel de agarosa confirmó la correcta amplificación y digestión del amplicón y del plásmido (figura 7). Las bandas con los pesos esperados fueron purificadas del gel y se realizaron reacciones de ligación entre el plásmido y los amplicones. Las ligaciones fueron transformadas en *E. coli* DH5 α y diferentes colonias fueron seleccionadas para realizar PCR de colonia para verificar la presencia del gen *pilA* en las cepas de *E. coli*. Plásmidos aislados a partir de las colonias que dieron positivo al PCR (pET28a(+)-PilA₃₀₋₁₄₅) fueron sometidos a ensayos de restricción con enzimas BamHI y XhoI para confirmar la presencia del inserto del peso esperado en la región objetivo del plásmido. La electroforesis de agarosa de los ensayos de restricción confirmó la presencia de *pilA* en el lugar correcto del plásmido (figura 8). Plásmidos que dieron positivo a estos ensayos fueron finalmente secuenciados para confirmar la ausencia de errores en la secuencia codificante de *pilA*₃₀₋₁₄₅.

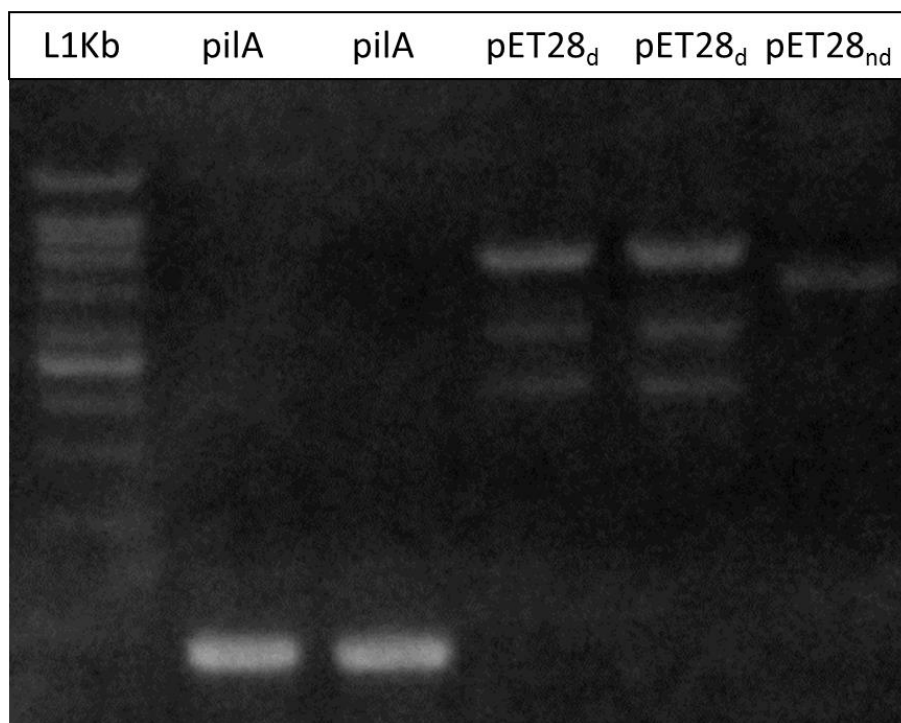


Figura 7. Electroforesis para confirmar la digestión del amplicón *pilA* y del plásmido pET28a(+). L1Kb: Ladder de 1 kb, *pilA*: *pilA* digerido con BamHI y XhoI, pET28_d: pET28a(+) digerido con BamHI y XhoI, pET28_{nd}: pET28a(+) no digerido.

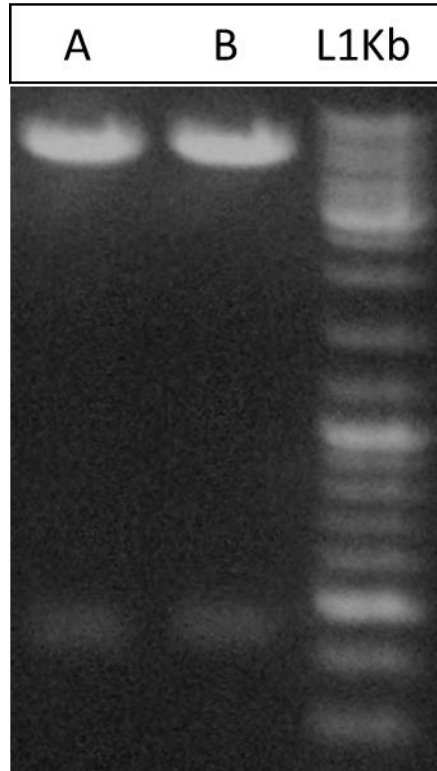


Figura 8. Electroforesis del ensayo de restricción de plásmidos pET28a(+)-PilA₃₀₋₁₄₅. L1Kb: Ladder SM1173, A y B: pET28a(+)-PilA₃₀₋₁₄₅ digerido con BamHI y XhoI.

6. Expresión y purificación de PilA recombinante.

Los plásmidos pET28a(+)-PilA₃₀₋₁₄₅ fueron usados para transformar *E coli* BL21(DE3), cepas transformadas fueron utilizadas para realizar ensayos de expresión de PilA recombinante. Bandas del peso molecular esperado (16 kDa) luego de inducir la expresión a 18 °C por 18 horas con 0.5 mM de IPTG fueron observadas por SDS-PAGE (figura 9). Las bacterias expresando PilA recombinante fueron lisadas por sonicación y se observó la presencia de la banda en la fracción soluble aunque también una buena parte en la fracción insoluble (Figura 9). La fracción soluble fue utilizada para realizar ensayo de cromatografía de afinidad a níquel, luego de la elución con 500 mM de imidazol, se observó PilA parcialmente pura como se muestra en la figura 10 (carril Ni⁺²). Esta fracción fue inyectada en una columna Superdex S75 para purificar aún más la proteína recombinante PilA. Las fracciones obtenidas de esta cromatografía fueron analizadas por SDS-PAGE y se observó la presencia de la banda de PilA pura en las fracciones 10 y 11 (figura 10).

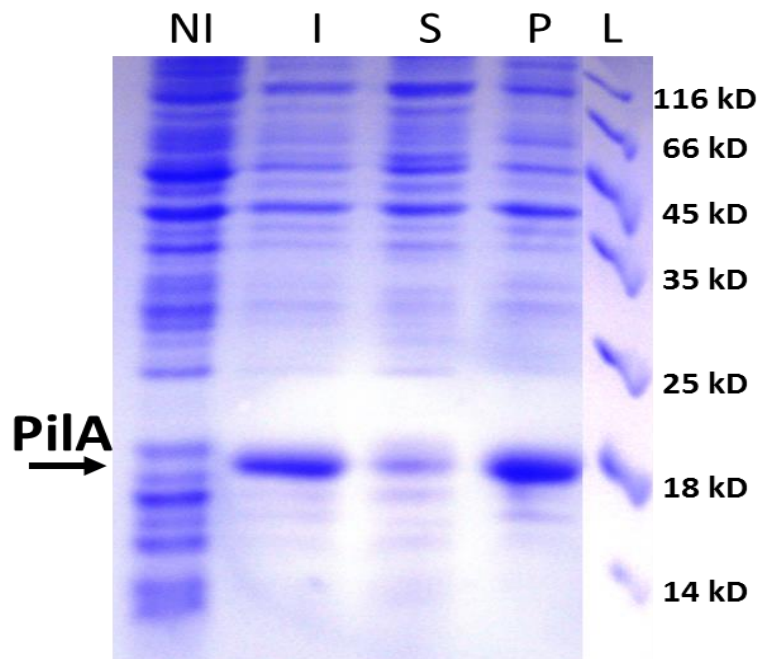


Figura 9. Expresión soluble de PilA₃₀₋₁₄₅ recombinante. NI: No inducido, I: Inducido, S: Sobrenadante, P: Pellet (Fracción insoluble). L: Marcador de peso molecular.

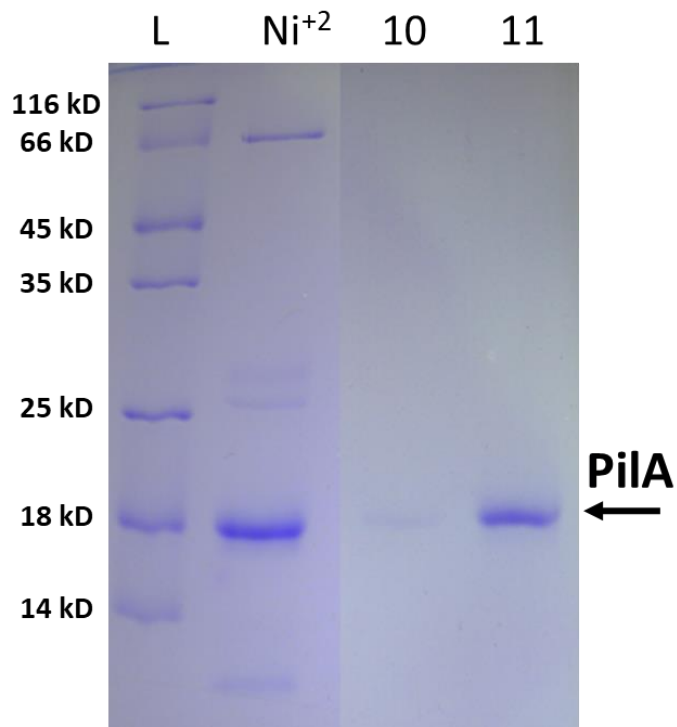


Figura 10. Purificación de PilA₃₀₋₁₄₅ recombinante. L: Marcador de peso molecular, Ni²⁺: Fracción eluida de la cromatografía de afinidad por níquel. 10 y 11: Fracciones de la cromatografía por exclusión de tamaño en la columna Superdex S75.

DISCUSIÓN:

De los 14 cuyes analizados 11 presentaron *Salmonella enterica*. Asumiendo que la muestra es representativa de la población de cuyes en el criadero de Pachacamac analizado, 11 de 14 cuyes representarían el 78.57 % de la población. Así, la tasa de morbilidad por *Salmonella* en este criadero sería de 78.57 %, porcentaje menor al encontrado por Leguía P (1993) quien reportó 95 % de morbilidad por *Salmonella*.

De las 18 cepas aisladas con características culturales de *Salmonella* en medio Salmonella - Shigella, 7 no dieron positivo a los análisis genéticos del gen *invA* ni de *pilA*, indicando que no pertenecen al género *Salmonella*. Además, 4 cepas sin características culturales de *Salmonella* en medio Salmonella - Shigella dieron negativo en las amplificaciones de los genes *invA* y *pilA*. Así, el cálculo de la especificidad y sensibilidad del medio Salmonella - Shigella en este estudio fue de 36.36 % y 100 %, respectivamente. Otro estudio ha determinado la especificidad de este medio para colonias de *Salmonella* de 55 % (Maddocks S et al. 2002) y sensibilidad de 92 % o 100 % (Maddocks S et al. 2002, Ruiz J et al. 1995).

Chero A et al. 2017 utilizan, además del gen *invA*, los genes *prot6E* y *fliC* para la detección específica de *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella enterica subsp. enterica serovar* Typhimurium, respectivamente. A través del método de enriquecimiento en caldo tetrionato seguido por aislamiento selectivo en agar Salmonella - Shigella, Chero A et al. 2017 logran aislar 12 cepas de *Salmonella enterica* de las cuales 10 dieron positivo a *fliC* de *Salmonella enterica subsp. enterica serovar* Typhimurium y ninguno a *prot6E* de *Salmonella* enteritidis. No se logró identificar a que serotipo pertenecían las otras dos cepas o si pertenecían a *Salmonella enterica subsp. enterica serovar* Typhimurium con variaciones en el gen *fliC*. En el presente estudio, se presenta el primer reporte de secuenciación por el método de Sanger del gen *pilA* para determinar el serotipo al cual pertenecen las cepas aisladas.

Los análisis bioinformáticos del gen *pilA* muestran que las cepas aisladas son probablemente una variedad del serotipo Typhimurium. Debido a que el gen *pilA* presenta relativamente baja variabilidad dentro de los serotipos de *Salmonella* una sola sustitución podría suponer la existencia de un serotipo diferente y no descrito hasta el momento (aunque no se puede concluir esto estudiando un solo gen). Además, los análisis en la base de datos del NCBI no mostraron descripción de esta variación; si es una variación que se produjo en este criadero o si tiene un alcance regional mayor es aún una pregunta abierta.

La isoleucina es un aminoácido de cadena lateral hidrofóbica que tendería a estar en el interior de la proteína sin acceso al solvente acuoso. Por otro lado, la treonina es un aminoácido hidrofílico que tendería a estar expuesto al solvente acuoso. La mutación encontrada en el gen *pilA* genera un cambio de una isoleucina por una treonina; esta sustitución puede haber tenido un impacto en la solubilidad de la proteína haciendo que el procedimiento de purificación haya resultado relativamente sencillo en comparación a otras proteínas de este tipo.

Varios reportes mencionan a *Salmonella* como un importante agente infeccioso en los criaderos de cuyes y a *Salmonella enterica subsp. enterica serovar* Typhimurium como uno de los serotipos más importantes; los ensayos de inoculación muestran que *Salmonella enterica subsp. enterica serovar*

Typhimurium inoculada oralmente en altas dosis en cuyes sanos criados en condiciones de laboratorio no ocasionaron una enfermedad grave. Así es necesario incrementar los estudios en esta área, inoculando *Salmonella* en alguna condición donde el sistema inmunológico del cuy este comprometido o parcialmente comprometido para observar el proceso infeccioso en estas condiciones. Por ejemplo, es sabido que condiciones de hacinamiento que incrementan los niveles de estrés en los organismos superiores pueden comprometer al menos parcialmente el sistema inmunológico haciéndolo más susceptible a desarrollar cuadros severos en enfermedades infecciosas.

Al menos 13 homólogos de *pilA* han sido clonados, expresados, purificados y su estructura tridimensional ha sido resuelta por cristalografía, resonancia magnética nuclear o crio-microscopía electrónica. Estos homólogos provienen de diferentes especies, entre ellas *Escherichia coli* (Bardiaux B et al. 2019), *Haemophilus influenzae* (Blais N et al. 2019), *Neisseria gonorrhoeae* (Forest K et al. 2002), *Myxococcus xanthus* (Chang Y et al. 2016), *Pseudomonas aeruginosa* (Wang F et al. 2017). Sin embargo, no se ha reportado la estructura de PilA de *Salmonella*, por lo que nuestros estudios iniciales sirven de base para que como siguiente paso se realicen ensayos de producción de cristales para intentar obtener la estructura tridimensional de esta proteína.

CONCLUSIONES:

De los resultados obtenidos podemos concluir que:

1. Utilizando pruebas moleculares (detección del gen *pilA* y del gen *invA*) en muestras de cuyes procedentes de criaderos del centro poblado de Picapiedra en el distrito de Pachacamac se ha demostrado que existieron bacterias pertenecientes al serotipo Typhimurium de *Salmonella enterica*.
2. Los ensayos de inoculación vía oral de *Salmonella enterica* sv Typhimurium en *Cavia porcellus* no causaron la muerte de cuyes sanos en las condiciones experimentales utilizadas. Esto evidencia que probablemente los reportes de brotes causados por este agente infeccioso sean debido a inmunocompromiso del sistema inmunológico de los cuyes a causa de algún otro factor como podrían ser: hacinamiento, otros agentes infecciosos, mala alimentación, entre otros.
3. El análisis de secuenciación del gen *pilA* detectó una variación de un único nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) en 10 de las 11 cepas aisladas del mencionado criadero. Esta variación genera un cambio a nivel del aminoácido 126, modificándolo de una isoleucina a una treonina, por lo que proponemos llamar a esta variante I126T.
4. Se clonó, expresó y purificó PilA de una variante encontrada en criaderos de *Cavia porcellus* (*Cuy*) del distrito de Pachacamac, Lima – Perú.
5. Los procesos de clonación y purificación de la construcción PilA₃₀₋₁₄₅ de la variante I126T estandarizados en esta tesis sirven de base para proceder con el escalamiento de la purificación para realizar estudios estructurales y funcionales con esta proteína; con el objetivo de evaluar su potencial uso como vacuna.

REFERENCIAS

- Andina. (06/06/2021). ANDINA. Obtenido de <http://www.andina.com.pe/agencia/noticia-consumo-per-capita-carne-cuy-sera-mayor-a-un-kilo-2015-477934.aspx>.
- Asakawa Y, Sakaguchi G, Tajima Y. (1954). Salmonellosis in Guinea Pigs. II. An epizootic outbreak caused by *S. enteritidis* and some other additional species of *Salmonella* associated with hemolytic streptococcus. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, 7(5), 467-471
- Balakrishna A, Saxena A, Yu-Keung H, Swaminathan K. (2009). Structural basis of typhoid: *Salmonella typhi* type IVb pilin (PilS) and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator interaction. *Proteins*, 77, 253-261.
- Bardaux B, Cardoso G, Luna A, Zhen W, Guilvout I, Jollivet C, Nilges M, Egelman E, Izadi-Pruneyre N, Francetic O. (2019). Structure and Assembly of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* Type 4 pilus. *Structure*. 27(7), 1082-1093.
- Blais N, Somers D, Faubert D, Labbé S, Castado C, Ysebaert, Gagnon L, Champagne J, Gagne M, Martin D. (2019). Design and characterization of protein E-PilA, a candidate fusion antigen for nontypeable *Haemophilus influenzae* vaccine. *Infection and immunity*. 87(8), e00022-19
- Chang Y, Rettberg L, Treuner-Lange A, Iwasa J, Sogaard-Andersen L, Jensen G. (2016). Architecture of the type IVa pilus machine. *Science*. 351(6278), 10.1126/science.aad2001
- Chauca L. (1997). Producción de Cuyes (*Cavia porcellus*). Estudios FAO Producción y Sanidad Animal. Citado el 02/09/14. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/w6562s/w6562s00.HTM>
- Chero A, Rosaido R, Marcel G, Díaz G, Jiménez R, Castro Y, Maturrano L. (2017). Identificación Molecular de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium en cuyes al primer parto mediante la técnica de PCR múltiple. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 28(3), 679-686.
- Craig L, Forest K, Maier B. (2019). Type IV pili: dynamics, biophysics and functional consequences. *Nature reviews microbiology*, 17, 429-440.
- Desin t, Koster W, Potter A. (2013). *Salmonella* vaccines in poultry: past, present and future. *Expert Reviews Vaccines*, 12(1), 87-96
- Dunger G, Llontop E, Guzzo C, Farah C. (2016). The *Xanthomonas* Type IV pilus. *Current opinion in Microbiology*, 30, 88-97.
- Evans A. (2005). Import risk Analysis: Domestic Guinea Pig, *Cavia porcellus*, imported from Australia. Draft Reports. Citado el 02/09/14. Disponible en: http://piggyville.com/guinea_pigs/NZriskanalysis.pdf
- Forest K, Dunham S, Koomey M, Tainer J. (2002). Crystallographic structure reveals phosphorylated pilin from *Neisseria*: phosphorine sites modify type IV pilus surface chemistry and fibre morphology. *Molecular Microbiology*. 31(3), 743-752.

- Figuerola I y Verdugo A. (2005). Mecanismos Moleculares de Patogenicidad de *Salmonella* sp.. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 47, 25-42.
- Galán J, Ginocchio C, Costeas P. (1992). Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of InvA to members of a new protein family. *Journal of bacteriology*, 174(13), 4338-4349.
- Galán J y Curtiss R. (1991). Distribution of the *invA*, *-B*, *-C*, and *-D* genes of *Salmonella typhimurium* among other *Salmonella* serovars: *invA* mutants of *Salmonella typhi* are deficient for entry into mammalian cells. *Infection and immunity*, 59(9), 2901-2908.
- Gamazo C e Irache J. (2007). *Salmonella* Vaccines. *Trends in applied Microbiology*, SN, 518-524.
- Gholami M, Chirani A, Razavi S, Falak R, Irajian G. (2017). Immunogenicity of a fusion protein containing PilQ and disulphide turn region of PilA from *Pseudomonas aeruginosa* in mice. *Letters in Applied Microbiology*, 65, 439-445.
- Ginocchio C y Galán J. (1995). Functional conservation among members of the *Salmonella typhimurium* InvA family of proteins. *Infection and immunity*, 63(2), 729-732.
- Guamán M. (2014). Determinación del Género y Especie de *Salmonella* en Cuyes Mestizos en Diferentes Sistemas de Crianza en la Comunidad de Oñacapac del Cantón Saraguro. Tesis para obtener el Título de Médico Veterinario Zootecnista. Universidad Politécnica Salesiana. Cuenca – Ecuador.
- Hang L, John M, Asaduzzaman M, Bridges E, Vanderspurt C, Kirn T, Taylor R, Hilman J, Progulsk-Fox A, Handfield M, ryan E, Calderwood S. (2003). Use of *in vivo*-induced antigen technology (IVIAT) to identify genes uniquely expressed during human infection with *Vibrio cholerae*. *PNAS*, 100(14), 8508-8513.
- Heymans R, Vila A, van Heerwaarden A, Jansen C, Castelijn G, van der Voort M, Biesta-Peters E. (2018). Rapid detection and differentiation of *Salmonella* species, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis by multiplex quantitative PCR. *PLoS ONE*, 13(10), e0206316.
- Hu B, Lara-Tejero M, Kong Q, Galan J, Liu J. (2017). In situ Molecular architecture of the *Salmonella* type III secretion machine. *Cell*, 168, 1065-1074.
- Kasturi K y Drgon T. (2017). Real-Time PCR method for detection of *Salmonella* spp. in environmental samples. *Applied and environmental microbiology*, 83(14), e00644-17.
- Leguía P. (1993). Enfermedades infecciosas y Parasitarias en Cuyes. Primer Curso Regional de Reproducción en Cuyes. La Molina – Perú.
- Layme A. (2010). Frecuencia de Lesiones Anatomopatológicas en Cobayos con Diagnóstico Bacteriológico de *Salmonella* sp. Remitidos al Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria de la FMV-UNMSM durante el período 2001-2007. Tesis para obtener el Título de Médico Veterinario. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima – Perú.
- Maddocks S, Olma T, Chen S. (2002). Comparison of CHROMagar *Salmonella* Medium and Xylose-Lysine-Desoxycholate and *Salmonella*-*Shigella* agars for isolation of *Salmonella* strains from stool samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(8), 2999-3003

- Matsuura A, Morales S, Calle S, Ara M. (2010). Susceptibilidad a Antibacterianos in vitro de Salmonella enterica aislada de Cuyes de Crianza Familiar-Comercial en la Provincia de Carhuaz-Áncash. *Revista de Investigación Veterinaria del Perú*, 21(1), 93- 99.
- MINAG. (2014). Sector Agrario: Cuyes. Departamento de Agricultura. Citado el 02/09/14. Disponible en: <http://www.minag.gob.pe/portal/sectoragrario/pecuaria/situacion-de-las-actividades-de-crianza-yproduccion/cuyes?limitstart=0>
- MINAG. (2008). Sector Agrario: Cuyes. Departamento de Agricultura. Citado el 02/09/14. Disponible en: <http://www.minag.gob.pe/situacion-de-las-actividades-decrianza-yproduccion/cuyes-39.html>
- Morales S (2012). Patógenos Oportunistas por Transmisión Fecal-Oral en Cuyes Reproductores Introducidos al Distrito de San Marcos. *Científica*, 9(1), 33-38.
- Moreno A. (1989). Producción de Cuyes. Universidad Nacional Agraria La Molina. Departamento de Producción Animal. Lima – Perú. 132pág.
- Ortega G, Jiménez R, Ara M, Morales S. (2015). La salmonelosis como Factor de Riesgo en Mortinatalidad en Cuyes. *Revista de Investigación Veterinaria del Perú*, 26(4), 676-681.
- Patarroyo M, Bermúdez A, Patarroyo M. (2011). Structural and immunological principles leading to chemically synthesized, multiantigenic, multistage, minimal subunit-based vaccine development. *Chemical reviews*, 111, 3459-3507.
- Ramírez I. (1972). Estudio Bacteriológico y epidemiológico de un brote infeccioso en cobayos (*Cavia porcellus*). Tesis para obtener el Título de Médico Veterinario. Universidad Mayor de San Marcos. Lima – Perú.
- Ruiz J, Núñez ML, Díaz J, Lorente I, Pérez J, Gómez J. (1996). Comparison of five plating media for isolation of *Salmonella* species from human stools. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(3), 686-688
- Smith W, Halls S. (1966). The immunity produced by a rough *Salmonella dublin* variant against *Salmonella typhimurium* and *Salmonella choleraesuis* infection in guinea-pigs. *The Journal of Hygiene*, 64(3), 357-359.
- Soufi L, Hoseini-Alfatemi S, Sharifi-Rad M, Iriti M, Sharifi-Rad M, Hoseini M, Shafiri-Rad J. (2015). Recombinant proteins in *Escherichia coli*: Optimizing production strategies. *American-Eurasian Journal of agriculture and environmental sciences*, 15(11), 2149-2159.
- Takeuchi M, Sprinz H. (1967). Electron-microscope studies of experimental Salmonella infection in the preconditioned guinea pig. *The American Journal of Pathology*, 51(1), 137-161.
- Wang F, Coureuil M, Osinski T, Orlova A, Altindal T, Gesbert G, Nassif X, Egelman E, Craig L. (2017). Cryoelectron microscopy reconstructions of the Pseudomonas aeruginosa and Neisseria gonorrhoeae type IV pili at subnanometer resolution. *Structure*. 25(9), 1423-1435.
- Yanestria S, Rahmaniar R, Wibisono F, Effendi M. (2019). Detection of *invA* gene of *Salmonella* from milkfish (*Chanos chanos*) at Sidoarjo wet fish market, Indonesia, using polymerase chain reaction technique. *Veterinary world*, 12(1), 170-175.

- Ysebaert C, Denoel P, Weynants V, Bakaletz L, Novotny L, Godfroid F, Hermand P. (2019) A protein E-PilA fusion protein shows vaccine potential against nontypeable *Haemophilus influenzae* in mice and chinchillas. *Infection and immunity*, 87(8), e00345-19.
- Zaldivar A, Gamarra M, Florian A. (1990). Determinación de la Capacidad de Carga para Cuyes (*Cavia porcellus* L.) machos reproductores. 12ava Reunión ALPA. Campinas – Brasil. 177pág.
- Zaman S, Hussain M, Nye R, Mehta V, Mamun K, Hossain N. (2017). A review on antibiotic resistance: Alarm bells are ringing. *Cureus*, 9(6), e1403.

ANEXOS:

1.- Muestras de órganos de cuyes.



Bazo de cuy



Hígado de cuy

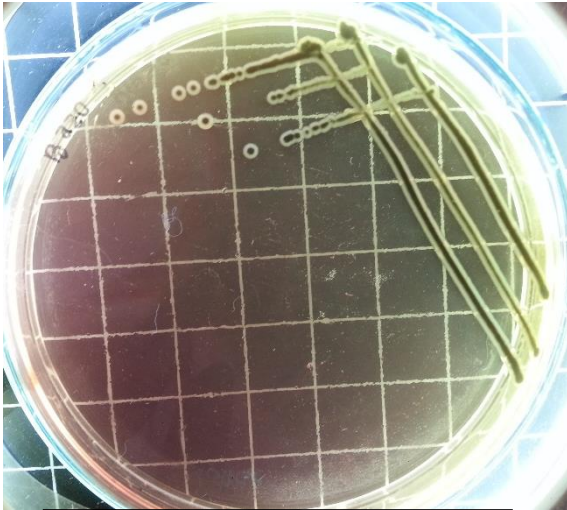


Pulmón de cuy

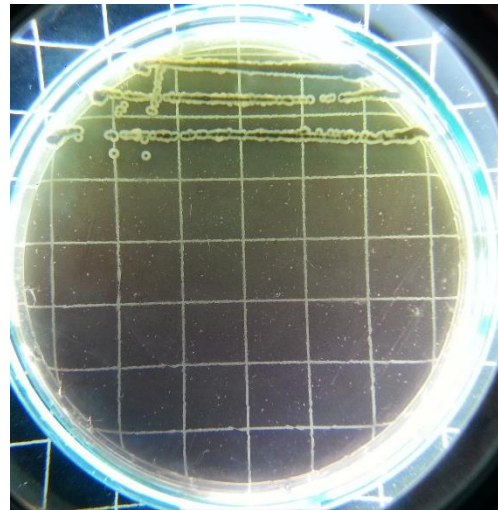


Cuy post-mortem

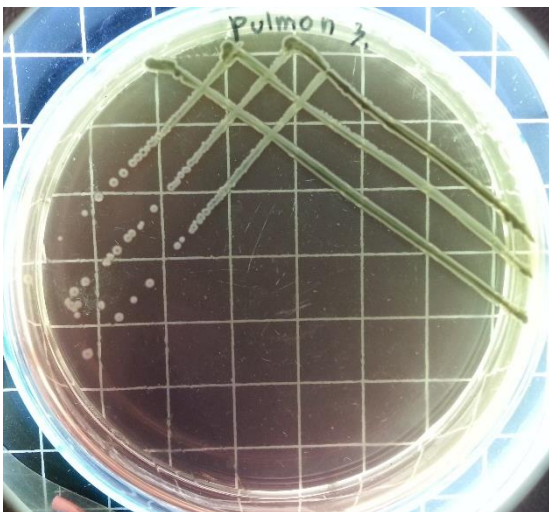
2.- Placas de Cultivo Salmonella-Shigella mostrando colônias com características culturais de *Salmonella*.



Cepa 1



Cepa 14



Cepa 12



Cepa 21