

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *SALMONELLA* *ENTERICA* A PARTIR DE CUYES CON SIGNOS DE SALMONELOSIS

Santiago Justo Arévalo
Carla Saldaña Serrano
Alcides Guerra Santa Cruz¹

RESUMEN

Desde los tiempos de las culturas antiguas la carne de cuy ha sido considerada como una fuente de alto valor proteico, hasta hace algunos años este alimento solo era consumido por pobladores andinos quienes mantenían pequeños criaderos para su consumo propio. En los últimos años el interés por esta carne ha venido aumentando llegándose a la exportación de la misma y apareciendo los sistemas comerciales de crianza. Actualmente, los sistemas de crianza atraviesan problemas como la falta de tecnificación y las enfermedades infecciosas que diezman a gran parte de la población de cuyes en los criaderos disminuyendo fuertemente los ingresos. Una de estas enfermedades ha sido denominada Salmonelosis, aunque aún no existan archivos publicados que demuestren a bacterias del género *Salmonella* como causantes de la misma. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la presencia de bacterias del género *Salmonella* en cuyes con signos de Salmonelosis. Se tomaron muestras de intestino, bazo, pulmones e hígado de 14 cuyes fallecidos con signos de Salmonelosis; la determinación se realizó por enriquecimiento de las muestras en caldo Selenito, seguido de un aislamiento selectivo en Agar SS y confirmación por PCR de los genes *invA* y *pilA*. Se obtuvieron 11 cepas de *Salmonella enterica* además de otras 11 cepas que no pertenecían al género *Salmonella*. Por lo tanto, aunque se encontró una prevalencia de *Salmonella* en las muestras de 78.57% no se puede concluir que este sea el agente causal de la enfermedad, hace falta realizar experimentos de inoculación en cuyes sanos para comprobar esta hipótesis

Palabras Claves: *Salmonella*, *Cavia porcellus*.

¹ Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma. E-mail: alcides.guerras@urp.pe

ABSTRACT

Since the times of ancient cultures guinea pig meat has been regarded as a source of high protein, until recently this food alone was consumed by Andean peoples who maintained small farms for their own consumption. In recent years, interest in this meat has been increasing arriving to the export of the same and emerging commercial farming systems. Currently, these systems cross problems such as lack of technical modernization and infectious diseases that reduce the population of guinea pigs on farms sharply declining revenues. One of these diseases has been called Salmonellosis, although not yet published files exist that demonstrate that Salmonella bacteria cause it. This study aimed to determine the presence of Salmonella bacteria in guinea pigs with signs of Salmonellosis. Samples of intestines, spleen, lungs and liver of 14 guinea pigs died with signs of Salmonellosis were taken; the determination was performed by enrichment broth selenite samples, followed by a SS agar selective isolation and PCR confirmation of *invA* and *pilA* genes. 11 strains not belonging to the genus Salmonella were obtained. Therefore, although the prevalence of Salmonella in samples was of 78.57% we cannot conclude that this is the causal agent of the disease, we have to make inoculation experiments in healthy guinea pigs to test this hypothesis.

Keywords: *Salmonella*, *Cavia porcellus*.

INTRODUCCIÓN

En restos arqueológicos de la cultura Paracas en la región de Ica – Perú se han hallado evidencias de abundantes excretas pertenecientes a la especie *Cavia porcellus* (Moreno A, 1989), hoy conocido como Cuy en los países andinos, o como Guinea pig en Estados Unidos; estos hallazgos demuestran que desde esos tiempos el cuy ha sido domesticado muy probablemente para consumo humano, actualmente el Perú presenta la mayor población de cuyes domesticados en el mundo llegando a aproximadamente 23 240 846 animales (Chauca L, 1997).

El cuy es una importante fuente proteica para los campesinos del Perú, quienes los crían en sistemas familiares para su consumo, sin embargo en los últimos años ha surgido a partir de estos sistemas familiares, los sistemas comerciales de crianza. Estos sistemas de crianza además de sa-

tisfacer las demandas de la población cercana producen suficientes cuyes para su comercialización en diferentes regiones del país, llegando incluso a la exportación de la carne de cuy que en los últimos años se viene incrementando de manera importante (MINAG, 2014).

Los sistemas comerciales de crianza de cuyes atraviesan algunos problemas entre los que destacan dos: 1) La falta de tecnificación que en muchos casos evita que la producción de cuyes alcance su máxima eficiencia posible y 2) Las enfermedades infecciosas que al aparecer llegan a diezmar una parte importante de la población de cuyes en el criadero restando cuantiosos ingresos.

Aunque varios autores señalan que uno de los agentes infecciosos de mayor importancia en la crianza de cuyes es *Salmonella*, aún no hay estudios publicados que lo demuestren como agente causal de la enfermedad que produce hasta el 95% de las muertes de la morbilidad general en cuyes (Leguía P, 1993).

Los signos más comunes que produce dicha enfermedad son: parálisis de patas posteriores, pelo erizado, debilidad general y delgadez. A nivel de órganos es común encontrar pústulas blancas en pulmones e hígado así como hepatomegalia.

El presente trabajo tiene como objetivo aislar e identificar cepas de *Salmonella enterica* a partir de cuyes con signos de Salmonelosis como primer paso para la identificación del agente causal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de muestras de cuyes:

Los cuyes recientemente fallecidos con signos de Salmonelosis fueron obtenidos del criadero del Sr. Eliazar ubicado en el centro poblado Pica piedra en el distrito de Pachacamác – Lima – Perú.

Los cuyes fueron trasladados asépticamente 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.

Aislamiento presuntivo de cepas de *Salmonella enterica*:

Las muestras de órganos fueron cortados en trozos de aproximadamente

1cm² y fueron colocados en 3ml de caldo Selenito durante 24 horas a 37°C, al cabo de este tiempo se tomó una asada de los caldos y se estrió sobre la superficie de placas con medio SS, los cuales 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 reaisladas en placas de SS e incubadas de la misma forma. Finalmente las colonias aisladas fueron sembradas en 3 ml de caldo nutritivo incubados por una noche a 37°C y guardados a -20°C en glicerol al 15%.

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 eppendorfs con 50ul 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 gen *invA* y un el gen completo de *pilA*.

Se realizó un PCR múltiple para los dos genes estando la reacción compuesta por los siguientes reactivos: 1x Taq buffer (NH₄)₂SO₄, dNTP 0.2mM, 0.2uM Primers, 0.05u/ul Taq DNA polimerasa, 3mM MgCl₂ y 5ul de muestra de ADN en un volumen final de 25ul.

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.

Se tomaron fotografías y las imágenes fueron analizadas utilizando el programa Imagen.

La presencia de dos bandas una de 438pb (*pilA*) y otra de 285pb (*invA*) señalaban como *Salmonella enterica* a la cepa en estudio.

RESULTADOS

Aislamiento presuntivo de cepas de *Salmonella enterica*:

Se analizaron 13 cuyes, 12 con aproximadamente 6 horas de fallecidos y 1 fallecido 1 hora antes de la disección.

Se observaron 5 tipos de colonias con diferentes características culturales resumidas en la Tabla 1

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

Se aisló un total de 18 cepas que presentaban características culturales de *Salmonella enterica*; otras 4 cepas con diferentes características fueron también aisladas y preservadas.

Tabla 1 Características culturales de las diferentes tipos de colonias encontradas

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

Del total de 22 cepas 7 fueron encontradas en el Bazo, 5 en Intestino, 4 en el Pulmón y 6 en el Hígado. Los datos finales del Ceparío final obtenido se resumen en la Tabla 2.

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

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, las 7 restantes y las 4 que no presentaban características culturales de *Salmonella* dieron negativo para ambos genes. (Figura 1)

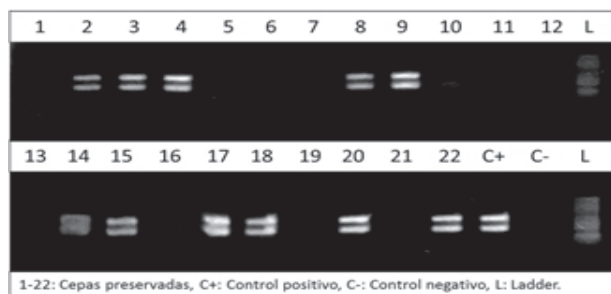


Figura 1. Resultados de la electroforésis del PCR múltiple (*invA*(258pb) y *pilA*(438pb)) de las 22 cepas preservadas obtenidas.

DISCUSIÓN

De los 14 cuyes analizados, a partir de 11 se pudo aislar una cepa de *Salmonella enterica* de los órganos en estudio, esto representa que el 78.57% de la morbilidad general del criadero de cuyes estaría infectado por este agente, Leguía P (1993) señala que hasta el 95% de las muertes de la morbilidad general estaría ocasionada por esta bacteria. De 7 cuyes se obtuvieron cepas que aunque presentaban características culturales de *Salmonella* no dieron positivo a los análisis genéticos del gen *invA*, indicando que no pertenecen a la especie *Salmonella enterica*; para determinar si pertenecían a la especie *Salmonella bongori*, especie de *Salmonella* que no presenta la isla de patogenicidad 2 (SPI-2) en la cual se encuentra el gen *invA* (Chan K et al, 2002), se utilizó la amplificación del gen *pilA* dando también resultados negativos lo que confirmó que estas cepas no pertenecían al género *Salmonella*. Se ha demostrado en varios estudios que la especificidad del medio SS para determinar colonias de *Salmonella* esta entre 17% y 55% después de un enriquecimiento en Selenito (Ruiz J et al. 1995, Maddocks S et al. 2002), en este trabajo la especificidad del medio SS fue de 61.11%. Finalmente ninguna de las cepas que presenta-

ban características culturales diferentes a la de *Salmonella* dio positivo a los genes, demostrando un buen nivel de especificidad del método utilizando el gen *invA* como lo describe Rahn K et al (1992), para el caso del gen *pilA*, a nuestro conocimiento este es el primer reporte en el que se utiliza este gen como herramienta para determinar el género *Salmonella* y la primera vez que se propone un PCR múltiple para discriminar entre la presencia de las dos especies de *Salmonella*, *S. enterica* y *S. bongori*.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran que los cuyes con signos de salmonelosis (parálisis de patas posteriores, pelo erizado, debilidad general y delgadez) presentan un porcentaje elevado de presencia de *Salmonella* (78.57%); sin embargo también se han encontrado cepas bacterias no pertenecientes al género *Salmonella*, por lo cual no podemos concluir que el agente causal de los mencionados signos es *Salmonella*. Es necesario continuar los estudios para determinar el agente causal de esta enfermedad.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Departamento de Investigación de la Universidad Ricardo Palma por el apoyo financiero para el desarrollo de este trabajo, además a la empresa ALBATER S.R.L. por los contactos con los criaderos de cuyes y al Sr. Eliazar por su amabilidad al permitirnos entrar en sus instalaciones de crianza y donarnos las muestras.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chan K, Baker S, Kim C, Detweiler C, Dougan G, Falkow S. 2002. Genomic Comparison of *Salmonella enterica* Serovars and *Salmonella bongori* By use of an *S. enterica* Serovar Typhimurium DNA Microarray.
2. Chauca L. 1997. Producción de Cuyes (*Cavia porcellus*). Estudios FAO Producción y Sanidad Animal. Citado el 16/09/15. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/w6562s/w6562s00.HTM>
3. Leguía P. 1993. Enfermedades infecciosas y Parasitarias en Cuyes. Primer Curso Regional de Reproducción en Cuyes. La Molina – Perú.
4. 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. 2999-3003.M
5. MINAG 2014. Sector Agrario: Cuyes. Departamento de Agricultura. Citado el 16/09/15. Disponible en: <http://www.minag.gob.pe/portal/sector-agrario/pecuaria/situacion-de-las-actividades-de-crianza-y-produccion/cuyes?limitstart=0>
6. Moreno A. 1989. Producción de Cuyes. Universidad Nacional Agraria La Molina. Departamento de Producción Animal. Lima- Perú. 132pág.
7. Rahn K, De Grandis S, Clarke R, McEwen S, Galán J, Ginocchio C, Curtiss R, Gyles C. 1992. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of Salmonella. Molecular and Cellular Probes. 6: 271-279.
8. Ruiz J, Nuñez M, 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. 686-688.