



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

**IDENTIFICACIÓN DE FAGOS ESPECÍFICOS CONTRA SALMONELLA SP. AISLADOS
DE CAVIA PORCELLUS**

Línea de investigación:

Microbiología, parasitología e inmunología

Tesis para optar el título profesional de Licenciada en Biología

Autora:

Rodríguez Torres, María de los Angeles Elizabeth

Asesor:

Guerra Santa Cruz, Alcides
(ORCID: 0000-0002-5130-8190)

Jurados:

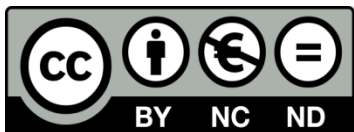
Sáez Flores, Gloria María
Rodrigo Rojas, María Elena
Velarde Vílchez, Mónica Margarita

Lima – Perú

2022

Referencia:

Rodríguez, M. (2022). *Identificación de fagos específicos contra Salmonella sp. aislados de Cavia porcellus*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Federico Villarreal]. Repositorio Institucional UNFV. <http://repositorio.unfv.edu.pe/handle/UNFV/5421>



Reconocimiento - No comercial - Sin obra derivada (CC BY-NC-ND)

El autor sólo permite que se pueda descargar esta obra y compartirla con otras personas, siempre que se reconozca su autoría, pero no se puede generar obras derivadas ni se puede utilizar comercialmente.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

**IDENTIFICACIÓN DE FAGOS ESPECÍFICOS CONTRA SALMONELLA SP.
AISLADOS DE CAVIA PORCELLUS**

Línea de investigación:

Microbiología, parasitología e inmunología

Tesis para optar el título profesional de Licenciada en Biología

Autora:

Rodríguez Torres, María de los Angeles Elizabeth

Asesor:

Guerra Santa Cruz, Alcides
(ORCID: 0000-0002-5130-8190)

Jurados:

Sáez Flores, Gloria María

Rodrigo Rojas, María Elena

Velarde Vílchez, Mónica Margarita

Lima – Perú

2022

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios, me ha permitido seguir adelante y no rendirme. A mis padres: Víctor D. Rodríguez Cruces y Edith Torres Iglesias; mi hermana: Ana María E. Rodríguez Torres, quienes gracias a su apoyo incondicional he podido lograr mis metas, ellos son mi mayor tesoro. A mis seres queridos: mis tíos y tías: María R. Rodríguez, Jenny Torres, Manuel Cámac, José Rodríguez, Toño Torres, Jorge Torres; mis primos: Evelin Cámac, Manu Cámac, Edu Cámac; mis abuelitos: Teodulo Rodríguez, Sofía Cruces, Felipe Torres e Ilma Iglesias, por estar a mi lado cada momento. A Delis C., Rudy V. por sus consejos, apoyo y son siempre el motivo de mis mejores sonrisas. A mis docentes y casa de estudios, por darme los conocimientos y motivación para lograr culminar con éxito mi carrera y estar orgullosa de ser Bióloga.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor de tesis; el Blgo. Alcides Guerra Santa Cruz, quien gracias a él y al gran grupo que lidera en el Laboratorio de Microbiología en la Universidad Ricardo Palma logré realizar mi tesis y me permitieron viajar a Brasil para poder concluirla.

A la Doctora Rosa Estrella Pillman Infanson, por su ayuda incondicional y asesoramiento en la redacción de mi tesis.

Al Santiago Justo Arévalo por su apoyo, ayuda y asesoramiento durante lo largo del trabajo.

A todos los Magísteres y profesores del Instituto de Química, de la Universidad de São Paulo, por todas las enseñanzas brindadas en mi estadía en Brasil.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Descripción y formulación del problema.....	2
1.2 Antecedentes.....	4
1.3 Objetivos.....	8
1.3.1 Objetivos Generales.....	8
1.3.2 Objetivos Específicos.....	8
1.4 Justificación.....	8
II. MARCO TEÓRICO	10
2.1 Bases teóricas sobre el tema de investigación.....	10
2.1.1. Salmonella sp.	10
2.1.1.1. Clasificación taxonómica.....	10
2.1.1.2. Características bioquímicas	11
2.1.1.3. Salmonelosis en cuyes	12
2.1.1.4. Transmisión.....	14
2.1.1.5. Manifestaciones clínicas.....	14
2.1.2. Bacteriófagos.....	16
2.1.2.1. Clasificación de los bacteriófagos.....	18
2.1.2.2. Mecanismos de infección	20
2.1.3. Salud pública.....	23
2.1.4. Fagoterapia.....	24
2.1.4.1. Desafíos de la fagoterapia	25
2.1.4.2. Conservación de fagos.....	27

2.1.5. Microscopio Electrónico (ME).....	28
2.1.6. Microscopio Electrónico de Transmisión (MET).....	29
2.1.7. Microscopio Electrónico de Barrido (SEM).....	30
III. MÉTODO	31
3.1. Tipo de Investigación	31
3.2. Ámbito temporal y espacial	32
3.3. Variables	32
3.4. Población y muestra.....	32
3.5. Instrumentos	33
3.6. Procedimientos	33
3.6.1. Obtención de la muestra.....	33
3.6.2. Aislamiento de fagos	34
3.6.3. Determinación de la presencia de fagos.....	34
3.6.4. Determinación de la especificidad de los fagos frente a cepas de Salmonella.....	35
3.6.5. Multiplicación y conservación de fagos.....	36
3.6.6. Titulación de fagos.....	36
3.6.7. Identificación por microscopía electrónica de transmisión (TEM)	37
3.7. Análisis de datos	38
IV. RESULTADOS.....	39
4.1. Determinación de la presencia de fagos.....	39
4.2. Determinación de la especificidad de los fagos frente a cepas de Salmonella	41
4.3. Titulación de fagos.....	43
4.4. Identificación por microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	44

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	45
VI. CONCLUSIONES	49
VII. RECOMENDACIONES	50
VIII. REFERENCIAS	51
IX. ANEXOS.....	59

Índice de tablas

Tabla 1 Pruebas Bioquímicas de Salmonella sp.	12
Tabla 2 Determinación de la presencia de fagos en los órganos disectados de los cuyes.....	40
Tabla 3 Determinación de la especificidad de los fagos frente a las cepas de Salmonella para las muestras positivas.....	42

Índice de figuras

Figura 1 Taxonomía de Salmonella según Brenner.....	11
Figura 2 Cuy muerto con síntomas de salmonelosis.....	13
Figura 3 Pelo erizado y parálisis de los miembros posteriores.....	15
Figura 4 Aumento de volumen abdominal debido a la ascitis.....	16
Figura 5 Morfología básica de los fagos.....	18
Figura 6 Taxonomía de los bacteriófagos.....	19
Figura 7 Familias y morfotipos básicos de fagos.....	19
Figura 8 Ciclo lítico y lisogénico de un fago.....	20
Figura 9 Ciclo lítico de un fago.....	22
Figura 10 Ciclo lisogénico de un fago.....	23
Figura 11 Componentes principales de un microscopio electrónico	29
Figura 12 Esquema de un Microscopio Electrónico de Barrido (SEM).....	30
Figura 13 Ensayo de gota doble capa agar de 12 muestras positivas.....	39
Figura 14 Las 12 muestras positivas para Salmonella typhimurium.....	41
Figura 15 Esquema de las diluciones sucesivas realizadas a las muestras de fagos.....	43
Figura 16 Calvas obtenidas de las diferentes diluciones de las muestras.....	43
Figura 17 Fotografías tomadas de Microscopia Electrónica.....	44
Figura 18 Partes de un Microscopio Electrónico (ME)	59
Figura 19 Familias de bacteriófagos.....	60
Figura 20 Evaluación de los cuyes	61
Figura 21 Evaluación de los órganos	61
Figura 22 Realización del ensayo en cabina de Bioseguridad.....	62

Figura 23 Membranas con Lisado Fágico	62
Figura 24 Observaciones en el Microscopio Electrónico	63
Figura 25 Pruebas bioquímicas hechas a las muestras de cuy.....	63

Resumen

La finalidad de este trabajo de investigación fue aislar bacteriófagos específicos contra *Salmonella* sp. que se encontraron en cuyes con síntomas de salmonelosis. Para ello se realizaron observaciones de las sintomatologías características presentes en cuyes infectados en un criadero del distrito de Lurín. En el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Ricardo Palma – Perú se trabajó con 25 cuyes muertos, a los cuales se realizaron trabajos de disección; separando: hígado, pulmón, bazo e intestino grueso, se hizo aislamiento y dilución de los bacteriófagos encontrados. La identificación de los bacteriófagos aislados se realizó por microscopía electrónica de transmisión (MET) en el Instituto de Química, de la Universidad de São Paulo - Brasil. En la metodología se utilizó un enfoque cuantitativo, diseño experimental y se usó una ficha de Protocolo de Aislamiento de fagos, que fue validada por un juicio de expertos. Los resultados de los órganos analizados mostraron que se encuentran presentes en 12 cuyes en los órganos: hígado, bazo e intestino grueso; una vez aislados se hizo diluciones y se evaluó la especificidad de los fagos frente a diferentes cepas de *Salmonella* sp., dando para todos los casos ser específicos únicamente para *Salmonella typhimurium*, finalmente se hizo identificación de los mismos mediante microscopía electrónica determinando que todas muestras correspondían a la familia Podoviridae, con este trabajo se desea lograr un tratamiento a futuro por fagoterapia.

Palabras claves: Salmonella sp., cuyes, bacteriófagos, titulación, caracterización.

Abstract

The purpose of this research work was to isolate specific bacteriophages against *Salmonella* sp. that were found in *Guinea pigs* with symptoms of salmonellosis. Observations were made of the characteristic symptoms present in infected *Guinea pigs* in hatcheries in the Lurin district. The work of dissection, isolation and dilution were carried out in the Microbiology Laboratory of the Ricardo Palma University - Peru and the identification by transmission electron microscopy (MET) at the Institute of Chemistry, university of Sao Paulo – Brazil. The methodology used a quantitative approach, experimental design and a Phage Isolation Protocol sheet was used, which was validated by an expert judgment. The results of the analyzed organs showed that they are present in 12 *Guinea pigs* in the organs: liver, spleen and large intestine; once isolated, dilutions were made and the specificity of the phages against different strains of *Salmonella* sp. was evaluated, giving for all cases to be specific only for *Salmonella typhimurium*, finally they were identified by electron microscopy, determining that all samples corresponded to the Podoviridae family, with this work it is desired to achieve a future treatment by phage therapy.

Keywords: guinea pig, *Salmonella* sp., bacteriophages, titration, characterization.

I. INTRODUCCIÓN

El cuy o cobayo (*Cavia porcellus*) mamífero roedor nativo de la región Andina de sudamérica, ha venido contribuyendo en nuestra alimentación hace aproximadamente 2500 a 3600 años hasta nuestros días. Se conoce que su carne es una de las más nutritivas en comparación a otras especies, su fácil manejo, su ciclo reproductivo corto, y su flexibilidad en cuanto a exigencias alimentarias, hacen que esta especie sea una de las favoritas en cuanto a crianza (Flores, 2017).

Su crianza y consumo ha ido ascendiendo de manera progresiva durante los últimos años, logrando exportar en el 2019 un total de 11.6 toneladas (La República, 2020).

Por otro lado, el cuy, junto con otros animales actúan como reservorio de *Salmonella* spp., esta bacteria es un microorganismo zoonótico que producen cuadros infecciosos gastrorresistentes de origen alimentario (Centers for Disease Control and Prevention, 2006). Según la Norma Técnica Sanitaria Peruana 144-2018, la Dirección General de Salud ambiental realizara supervisiones de los alimentos que contenga *salmonella* spp.

Entre los años 2010 al 2012 el Sistema de Vigilancia Epidemiológica, reportó 35 brotes de enfermedades transmitidas por la ingesta de alimentos (ETAs) por año, siendo un 47% de estos positivos para salmonelosis aguda (Ministerio de Salud del Perú, 2012). Se ha reportado que un 38% de viviendas en nuestro país no cuenta con servicio de agua, esto conlleva a presentar un alto nivel de enfermedades de transmisión alimentaria y un gran problema de salud pública.

El propósito de la presente investigación es realizar el aislamiento e identificación (mediante Microscopia Electrónica de Transmisión) de fagos específicos contra *Salmonella* sp.,

encontrados en una población de cuyes con síntomas de salmonelosis, al tener la identificación y estudio de estos fagos podría tomarse como punto de inicio para futuras investigaciones de un tratamiento por fagoterapia.

1.1. Descripción y formulación del problema

La salmonelosis es la enfermedad con mayor porcentaje de muertes en cuyes en nuestra población, originando un cuadro patológico de mortalidad severa, esto origina un déficit en la crianza, producción de ventas y de consumo humano (Balbín, 1990).

Es una enfermedad aguda de distribución mundial con variaciones en la frecuencia de serotipos de un país a otro, con importancia en áreas que no han alcanzado las condiciones de saneamiento e higiene adecuados y no cuentan con medidas de salud pública óptimas. Los más afectados son los niños menores de 5 años y ancianos mayores de 60 años de edad, son los grupos más vulnerables en la población, de no darse un tratamiento antimicrobiano en este grupo de riesgo esta enfermedad podría ser mortal (Uribe y Suárez, 2006).

La excesiva medicación sin orientación clínica produce un impacto ecológico sobre la flora respiratoria e intestinal animal; por lo tanto, el uso irracional del antibiótico elimina la mayoría de la población de bacterias sensibles, dando como consecuencia el crecimiento de la población bacteriana resistente y su posible diseminación posterior (Domenech et al., 2013).

Este problema conlleva también a la evolución de organismos con un tiempo de vida generacional muy corto, estas alteraciones genéticas permiten codificar proteínas que ciertamente ayudan a la bacteria a resistir el efecto de un antibiótico sobre ella. Este panorama motiva la búsqueda de alternativas terapéuticas a la del uso de antibióticos, como por ejemplo el uso de bacteriófagos.

Estudios han demostrado que la salmonelosis es letal para estos animales, Ordaya (2008), realizó un estudio en una granja de crianza comercial de cuyes en el Valle de Mantaro, encontró que las moscas son un riesgo en la transmisión de *Salmonella entérica* en una proporción de 75%, seguidas por las ratas y gorriones (12.5%), y fómites (12.5%).

Los primeros estudios que se hicieron con bacteriófagos estuvieron proyectados en descubrir la naturaleza de las calvas y como provocaba la lisis celular de microorganismos patógenos (Fernández, 2004).

La fagoterapia o “terapia de fagos” es una terapia que utiliza bacteriófagos para tratar infecciones bacterianas patogénicas, las cuales posee diversas aplicaciones en la medicina, ciencia, veterinaria, agricultura, entre otras (Collier, 2008).

La idea de la aplicación terapéutica con bacteriófagos se abandonó después de la introducción de los antibióticos. A pesar de esto, se realizaron pruebas in vitro con bacteriófagos, las cuales permitió a los investigadores diferenciar entre varias especies de bacterias, desarrollando métodos de diferenciación, los cuales son muy útiles actualmente en las investigaciones epidemiológicas (Villalba et al., 2012).

- **Formulación del Problema:**

- **Problema General:**

¿Se puede aislar fagos específicos contra *Salmonella* sp. de *Cavia porcellus* “Cuy” con síntomas de Salmonelosis para lograr un tratamiento por fagoterapia?

- **Problemas Específicos:**

¿Cómo se obtiene los fagos específicos en ciclo lítico en cuyes con signos de Salmonelosis?

¿Cómo determinar la especificidad de los fagos frente a cepas de *Salmonella* sp.?

¿Cómo determinar la concentración de fagos en una muestra?

1.2. Antecedentes

Estudios reportados sobre fagoterapia y salmonelosis en *Cavia porcellus*, a nivel internacional tenemos a la investigación de Hernández (2019), tuvo como objetivo aislar y probar la especificidad de bacteriófagos de *Salmonella* spp. a partir de aguas residuales, para la purificación de los bacteriófagos realizó la técnica doble capa (ADC) para obtener placas líticas, se usaron diferentes cepas de referencia de *Salmonella* como controles. Logró aislar 15 bacteriófagos distintos, luego se purificó y bajo pruebas específicas *in vitro* logro identificar que pertenecían a *Salmonella* (ATCC 19430), fue analizado por microscopia electrónica, identificándolo de la familia Siphoviridae.

Reina (2018) en España, en su artículo estudió sobre los bacteriófagos que infectan y parasitan a las bacterias. Pueden presentar un ciclo lítico que determine la lisis de la bacteria infectada. Cada fago es específico de un determinado género o especie bacteriana. El incremento actual en la incidencia de resistencia antibiótica en las bacterias humanas ha favorecido el estudio de los fagos como alternativa terapéutica (fagoterapia). Los estudios previos habían demostrado la eficacia de estos elementos en las infecciones cutáneas e intestinales. Están en marcha diferentes ensayos clínicos para establecer la seguridad, reactogenicidad y eficacia terapéutica de múltiples fagos. Al ser elementos activos, los fagos deben someterse a rigurosos controles de calidad para asegurar la ausencia de efectos indeseables. La lisis bacteriana que provocan es de una magnitud inferior a la provocada por los antibióticos. Como problemas a resolver en el futuro están la posibilidad de utilizar mezclas de varios fagos, establecer la ruta idónea de administración y modificarlos genéticamente para que desactiven los genes de resistencia bacterianos.

Un estudio en España, Chuquizuta y Morales (2017), quiso identificar agentes bacterianos presentes en gazapos muertos de cuyes en una granja de Manchay. Se recolectó 191 cadáveres de gazapos, los cuales fueron procesados en el Laboratorio de Microbiología Veterinaria de la Universidad Científica del Sur; se tomó muestras de hígado, intestino, bazo y pulmón para lograr la identificación, obteniendo como resultado *E. coli* (40.84%) y *Salmonella spp.* (39.27%) entre otros; a nivel de órganos se aisló bacterias en un 32.36% en hígado, 28.46% en intestino, 20.65% en bazo y 18.54% en pulmón; mostrando asociación significativa ($p < 0.05$) entre el diagnóstico bacteriológico de *Salmonella spp.* y *E. coli* frente a los órganos evaluados.

Garcés (2015) en su investigación tuvo como objetivo identificar Enterobacterias en cuyes mediante el uso de la técnica de siembra por agotamiento y su tipificación a partir de pruebas bioquímicas específicas, logrando obtener una incidencia de 36% de Enterobacterias, de acuerdo a sus pruebas bioquímicas, lograron identificar: *Yersinia sp.* 10%, *Echerichia coli* 12%, *Shigella flexneri* 8% y *Salmonella typhimurium* 6%.

La investigación propuesta por García et al. (2015) tuvo como objetivo evaluar el efecto *in vitro* de bacteriófagos frente a *Salmonella enteritidis* en heces frescas de gallinas ponedoras; se realizaron dos pruebas con tres concentraciones de bacteriófagos frente a cepas de *S. enteritidis*, las concentraciones ensayadas fueron: (5×10^7 pfu/mL), y dos diluciones de la misma (1/10 y 1/30), los ensayos fueron realizados en distintos tiempos desde la incubación; 1 minuto, 24h y 7 días. Se logró aislar *Salmonella* en todas las pruebas de 1 minuto, a las 24 horas de igual manera menos en la dilución 1/10 y a partir de 7 días no se logró aislar la bacteria de ninguno de los grupos experimentales, concluyendo que el empleo de bacteriófagos contribuyó a reducir los aislamientos de *Salmonella enteritidis* en las muestras.

Estudios nacionales, como Moya (2019) estudió la prevalencia de Salmonelosis en cuyes procedentes de granjas del centro del poblado de Huacaquito Alto - La Libertad, mediante la técnica de necropsia obtuvo las muestras de hígado y ciego, mediante una serie de pruebas bioquímicas se obtuvo un 27,5% de prevalencia a *Salmonella spp.*, siendo el hígado la principal fuente de infección, concluyendo que el manejo inapropiado, las deficiencias sanitarias e introducción de nuevos ejemplares son factores predisponentes.

Asimismo, Tamariz et al. (2018) su objetivo de este estudio fue estandarizar y validar una prueba de amplificación de fagos para la identificación de salmonelosis para ser aplicada a infecciones de *Cavia porcellus*. Métodos Se aislaron bacteriófagos nativos de caviar infectados y residuos ambientales de instalaciones comerciales de cría de cucarachas. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 se utilizó para detectar, aislar y propagar los bacteriófagos, y para estandarizar un ensayo de amplificación de fagos para detectar *S. Typhimurium* de hisopos rectales de caviar. El ensayo de amplificación de fagos se probó con 2 antivirales agentes, MgSO₄·7H₂O (MAS) y extracto de cáscara de granada (PRE) más sulfato ferroso (PRE – FeSO₄). Resultados El formato de ensayo final elegido utilizó PRE – FeSO₄ y permitió la detección de *S. Typhimurium* en 90 min de cultivo, 5 h de muestras clínicas, con un límite de detección a 10³ pfu; la sensibilidad fue 98,2%, especificidad 98%, valor predictivo negativo (VPN) 96,1% y valor predictivo positivo (VPP) 99,1%.

Marcelo et al. (2017) se basó en identificar mediante la técnica de PCR múltiple la posible existencia de los serovares *Salmonella typhimurium* y Enteritidis en 25 cepas de *Salmonella spp* previamente aisladas de cuyes e identificadas por sus características metabólicas; lográndose identificar todas las cepas como *Salmonella typhimurium*, evidenciándose la amplificación de los cebadores específicos para los genes *invA* y *fliC* pertenecientes al género *Salmonella* y *Salmonella*

typhimurium, respectivamente. Con este estudio se logró establecer mediante una identificación molecular que los 25 cuyes estaban infectados por *Salmonella typhimurium* y Enteritidis.

En un trabajo realizado por Justo et al. (2015) se plantearon determinar la presencia de *Salmonella* en cuyes muertos con síntomas de salmonelosis, lograron su confirmación con pruebas de PCR, obteniendo como resultado 11 cepas pertenecientes al género *Salmonella entérica* y otras 11 no pertenecientes a éste género, logrando una prevalencia del 78.57% de *Salmonella* en las muestras analizadas, determinando que sería necesario realizar experimentos de inecuación en cuyes sanos para corroborar su hipótesis.

Ortega et al. (2015) hizo un trabajo en una granja de cuyes en Huánuco – Perú en donde evaluó la asociación entre casos positivos a aislamiento de *Salmonella* sp. a partir de hisopados vaginales dentro de las 24 horas del parto y la mortinatalidad. Se trabajó con 258 cuyes siguiendo un diseño de Caso-Control, se pareó el tamaño de camada y se usó como covariables al número de parto y galpón de procedencia reproductora. Se determinó que un 8.5% de las reproductoras en el grupo de ‘Caso’ resultaron positivas a *Salmonella* sp, y mediante el análisis de regresión logística se estimó una Odds Ratio de 4.32 (95% de intervalo de confianza, $p < 0.05$) de los casos positivos respecto a los controles. Sus resultados demostraron que *Salmonella* sp. es una de las causas de mortinatalidad en cuyes.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivos Generales

Lograr aislar fagos específicos contra *Salmonella* sp. aislados de *Cavia porcellus* “Cuy” con síntomas de Salmonelosis.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Identificar fagos específicos en ciclo lítico en cuyes con síntomas de Salmonelosis.
- Determinar de la especificidad de los fagos frente a cepas de *Salmonella* sp.

Determinar la concentración de fagos en una muestra.

1.4. Justificación

1.4.1. Justificación teórica

Según la Norma Ministerial N.º 591-2008/MINSA, el criterio microbiológico indica que las Carnes y Productos Cárnicos deben estar exentos de microorganismos capaces de proliferar en el producto no refrigerado ni almacenado. Debe estar libre de Aerobios mesófilos y *Salmonella* sp.

1.4.2. Justificación práctica

Los resultados encontrados en la investigación servirán para impulsar a los criaderos en el uso de la fagoterapia como tratamiento para contrarrestar la salmonelosis. Así mismo, esta investigación se adiciona a evidencias científicas pre existentes sobre esta enfermedad y así junto con el SENASA fomentar campañas a los criaderos de cuyes sobre estrategias de cuidado.

1.4.3. Justificación social

En Lima la crianza y comercialización de cuyes es muy alta, sin embargo, presenta sitios de crianza de procedencia informal que afecta de forma negativa a la productividad y a los bajos niveles de competencia comercial, aquello es provocado por la falta de conocimiento en la crianza tecnificada de los criadores, así mismo la falta de recursos económicos. Teniendo en cuenta estos puntos, la crianza de cuyes estaría siendo amenazada en contraer ciertas enfermedades, principalmente la salmonelosis (Chirinos et al., 2008).

Es importante resaltar que en países de Europa del Este y en la Unión soviética fue muy usada de forma habitual y se consideró su uso como agentes terapéuticos (Sulakvelidze, 2005).

1.5 Hipótesis

El aislamiento y caracterización de fagos específicos contra *Salmonella* sp. podrían convertirse en una segunda opción en el tratamiento de salmonelosis en cuyes.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Bases teóricas sobre el tema de investigación

2.1.1. *Salmonella sp.*

La salmonelosis, indicaron que el género *Salmonella* está incluida en la familia Enterobacteriaceae, está conformado por bacilos gramnegativos, fermentadoras de glucosa, catalasa positiva, oxidasa negativa, generalmente móviles por flagelos peritricos (excepto *S. gallinarum*), anaerobios facultativos, no esporulado y no encapsulado. Para la identificación de especie y subespecie se realizan pruebas bioquímicas tales como: las no fermentadoras de lactosa (para algunas especies), fermentación de glucosa, producción de gas, la no fermentación de sacarosa, no degradación de urea, entre otros. Se desarrollan en una temperatura entre 8 - 45 °C y entre un pH de 4 a 8 según Chauca, Calapuja y Rojas (1994).

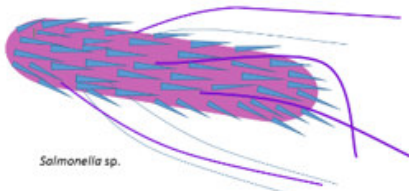
Asimismo, Caballero (2016) indicó que las especies del género *Salmonella* se encuentran distribuidos en la naturaleza, suele encontrarse en el tracto gastrointestinal de mamíferos domésticos y salvajes, son comensales y como patógenos, produciendo así enfermedades en el hombre y los animales; zoonosis.

2.1.1.1. Clasificación taxonómica. Según el sistema de clasificación del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC- Centers for Disease Control and Prevention) el género *Salmonella* tiene dos especies: *S. enterica* y *S. bongori*, por su parte *S. enterica* se divide en seis subespecies, siendo la más conocida *S. enterica*, la que a su vez cuenta con varios serovares, entre ellos: Enteritidis, Typhimurium, Typhi y Choleraesuis, de esta manera tiene la siguiente clasificación taxonómica (Brenner et al., 2000).

Figura 1

Taxonomía de Salmonella según Brenner

Taxonomía de Salmonella	
Dominio:	Bacteria
Filo:	Proteobacteria
Clase:	Gammaproteobacteria
Orden:	Enterobacteriales
Familia:	Enterobacteriaceae
Género:	Salmonella



2.1.1.2. Características bioquímicas. Figueroa y Verdugo (2005) explica que las salmonelas son bacterias anaerobias facultativas, crecen rápidamente en medios enriquecidos; son no fermentadores de lactosa y sacarosa, son fermentadores de glucosa y productoras de sulfuro de hidrogeno (H₂S). Entre otras características bioquímicas se encuentran que: reducen los nitratos, son citrato positivo, ureasa y fenilalanina desaminasa negativas.

Las salmonelas son resistentes a ciertas sustancias químicas (por ejemplo, verde brillante, tetracionato de sodio, desoxicolato sódico) que inhiben otras bacterias entéricas; por tanto, es útil incluir estos compuestos en los medios de cultivo para aislar *Salmonella* (Vadillo et al., 2002).

Entre las pruebas bioquímicas que se pueden realizarse destacan:

Tabla 1*Pruebas Bioquímicas de Salmonella sp.*

Prueba o sustrato	Resultados		Reacción en especies de Salmonella
	Positivo	Negativo	
Glucosa (TSI)	Fondo amarillo	Fondo rojo	+
Lisina decarboxilasa (LIA)	Fondo violeta	Fondo amarillo	+
H ₂ S (TSI, LIA, SIM)	Ennegrecimiento	No Ennegrecimiento	+
Agar urea	Color rosado	Sin cambios de color	-
Prueba de Indol (SIM)	Color rosado en superficie	Color amarillo en superficie	-
Prueba de Voges-Proskauer	Color rojo a rosado	Sin cambios de color	-
Prueba de rojo metilo	Color rojo difuso	Color amarillo difuso	+
Citrato de Simmons	Crecimiento, color azul	Sin crecimiento, sin cambio de color	v
Agar fenilalanina	Sin cambios de color	Color verde	-
O.N.P.G.	Sin cambios de color	Color amarillo	-

Nota. Es positivo cuando el 90% o más positivos en 1 o 2 días; es negativo cuando el 90% o más negativos en 1 o 2 días. Adaptada de *Reacciones químicas de Salmonella sp.*, por Almada, 2017, libro.

2.1.1.3. Salmonelosis en cuyes. La enfermedad más importante que afecta a los cuyes es la salmonelosis, provoca en estos, falta de apetito, anemia, erizamiento del pelaje, diarrea y parálisis de los miembros posteriores, un cuadro patológico de mortalidad severa y abortos en hembras gestantes según Caffer y Terragno(2001).

Según Chauca (2013) para la crianza de cuyes manifiesta que la enfermedad de mayor incidencia en la explotación de cuyes, se encuentra en estado latente y basta una situación de estrés para activarla. Esto es debido la ingestión de alimentos o agua contaminada por insectos o excreciones de roedores silvestres, animales recién llegados a la granja, e incluso puede considerarse al hombre como responsable de la contaminación (Figura 2).

La salmonelosis tiene una gran importancia dentro de la explotación de cuyes según los estudios realizados, por lo que para poder controlar o evitar la diseminación de la patología es muy importante tener en cuenta el serotipo que afecta en las diferentes regiones del país, con lo que se podrá realizar tratamiento eficaces y oportunos (Moya, 2019).

Chauca (2013) explica que los cuyes en su etapa aguda mueren sin mostrar mayor síntoma, en un lapso no mayor a 48 horas. Por otro lado, en la etapa crónica se producen ciertos cambios fisiológicos en el animal, tales como adelgazamiento pronunciado, abdomen inflamado debido a la asciditis, parálisis, diarrea, entre otros.

Figura 2

Cuy muerto con síntomas de salmonelosis



Nota. Tomado de (Granja Camero, 2013)

2.1.1.4. Transmisión. La salmonelosis puede ser propagada de forma directa, aquello se evidencia en la ingesta de alimentos contaminados con heces y/o orina de animales infectados con salmonelosis. Mediante un estudio de Flores (1981), se ha comprobado que en aves se produce una transmisión vertical causando infecciones transováricas, esto quiere decir que el animal transmite a su descendencia la enfermedad que padece, por tanto, se puede afirmar que este tipo de contacto puede afectar a otras especies. También se ha considerado la infección de forma indirecta a través de heridas abiertas, las cuales son puertas de acceso para contraer la enfermedad según Radostits (2002).

Ante lo mencionado, se encuentra un problema recurrente en los criaderos de cuyes, basados en el mal uso de implementos de trabajo ya que no son suficientes para el control de una posible infección de salmonelosis.

2.1.1.5. Manifestaciones clínicas. La salmonelosis en cuyes se manifiesta de dos formas, la forma aguda y la forma crónica. La forma aguda se presenta como un cuadro septicémico agudo sucediéndose las muertes en un lapso de 24 a 48 horas, en muchos de los casos los animales mueren sin mostrar síntoma alguno, sin embargo, en algunas ocasiones se observa signos como decaimiento, postración, anorexia, adelgazamiento, pelos ásperos y erizados, opistótonos, y parálisis de los miembros posteriores (Figura 3), en ciertas ocasiones también se observa diarrea acompañada de mucus, y en cuyes gestantes se produce el aborto (Evans et al., 2005).

Figura 3

Pelo erizado y parálisis de los miembros posteriores



Nota. Tomada de (Granja Camero, 2013).

En un brote ocurrido en Huancayo, Ameghino (1968) describió signos resaltantes como, marcada postración, erizamiento de pelos y diarrea profusa y maloliente. “En los casos crónicos es notorio un adelgazamiento paulatino, pelaje deslucido y aumento del volumen abdominal debido a la ascitis” (Figura 4) (Dávalos, 1997, p.3).

Estudios realizados en animales de laboratorio incluyendo al cuy, indican que el curso clínico puede variar dependiendo del serotipo infectante, algunos serotipos pueden causar una epizootia explosiva y frecuentemente los sobrevivientes se convierten en portadores asintomáticos, la infección clínica con alta mortalidad es común en animales jóvenes mientras que los adultos se convierten frecuentemente en portadores. Otros síntomas observados son: disminución del número de crías por parto, bajo peso al nacer, conjuntivitis y cianosis (Garmendia et al., 2000).

Figura 4

Aumento del volumen abdominal debido a la ascitis



Nota. Tomada de (Granja Camero, 2013).

2.1.2. Bacteriófagos

Los bacteriófagos o fagos son virus que atacan bacterias y se encuentran en todo ambiente natural. Twort identificó el primer ataque de fagos en Inglaterra en 1915 y los llamó agentes “no retenidos por los filtros”, y en 1917 d’Hérelle los denominó bacteriófagos, que significa en griego antiguo “comedor de bacterias” (Hernández, 2007).

Los fagos son incapaces de desarrollarse por sí mismos, convirtiéndolos en parásitos que desarrollan una vida dentro de células bacterianas y que son liberados luego de producir lisis celular. Los fagos son específicos de un huésped y normalmente atacan a cepas muy relacionadas entre sí.

La complejidad estructural que poseen los fagos se debe a la forma en la que se arreglan las proteínas alrededor del material genético del virus, por lo tanto, se pueden encontrar fagos icosaédricos, helicoidales o filamentosos.

Cabe resaltar que una de las propiedades más asombrosas que poseen los fagos es que han sido llamados, “la forma de vida más abundante y ubicua en la tierra” ya que se calcula que hay alrededor de 1×10^{30} UFP/mL, o más sólo en el agua de mar (Segundo, 2010).

Se han descrito aproximadamente cerca de “5500 bacteriófagos de tipo Caudovirales (fagos con cola) capaces de infectar a una gran diversidad de huéspedes bacterianos” (Ackermann, 2007). Los bacteriófagos son considerados como el sistema biológico más simple y abundante de la naturaleza.

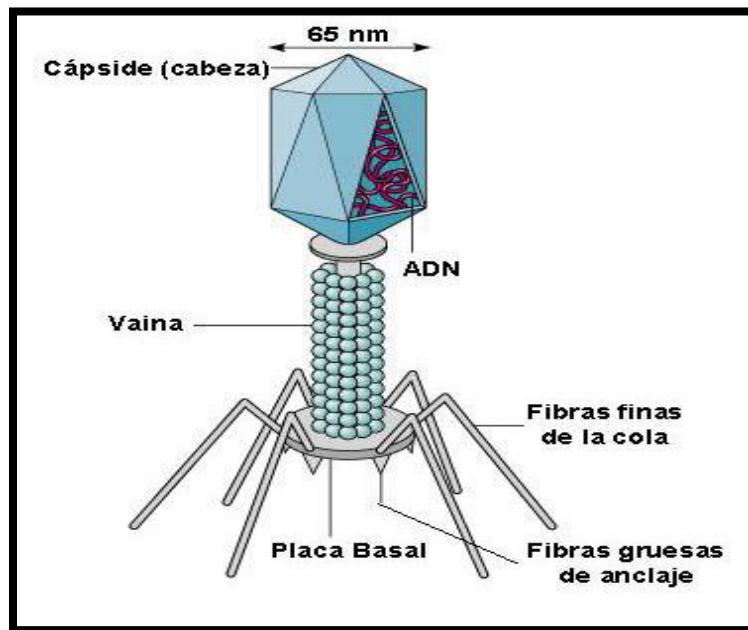
En la época-antibiótica, se tomó notable atención a su posible uso como agentes terapéuticos, la cual llegó a ser muy usada de forma habitual en la Unión Soviética y Europa del Este (Sulakvelidze, 2005). Fueron usados como modelo para investigar muchos aspectos de la Virología; en general como la estructura de los viriones, la morfogénesis, la genética y la replicación. Además, los fagos también han sido tomados como modelo para el estudio de la genética bacteriana y los mecanismos de control de la expresión génica, debido a que los huéspedes bacterianos son fácilmente cultivables y manejables en el laboratorio.

Durante los últimos años se retomaron estudios sobre la fagoterapia clásica, debido a la aparición de patógenos multirresistentes a los antibióticos. Ciertamente se han descubierto fagos capaces de infectar a todos los procariotas descritos hasta el momento y se han adaptado a todos los nichos ecológicos. Los fagos han obtenido un papel importante en el plan ecológico, ya que regulan mediante transferencia genética, la evolución de sus hospedadores y afectando, incluso, los niveles de materia orgánica en la biosfera (Hernández, 2007).

2.1.2.1. Clasificación de los bacteriófagos. Según Neve (1996) los bacteriófagos pueden clasificarse teniendo en cuenta distintos criterios: El Espectro de huéspedes es el conocimiento de un tipo de cepa sensible a un determinado fago, luego tenemos Perfil proteico, en la cual se hace énfasis en las pruebas moleculares, la morfología, realizada a través de la microscopía electrónica.

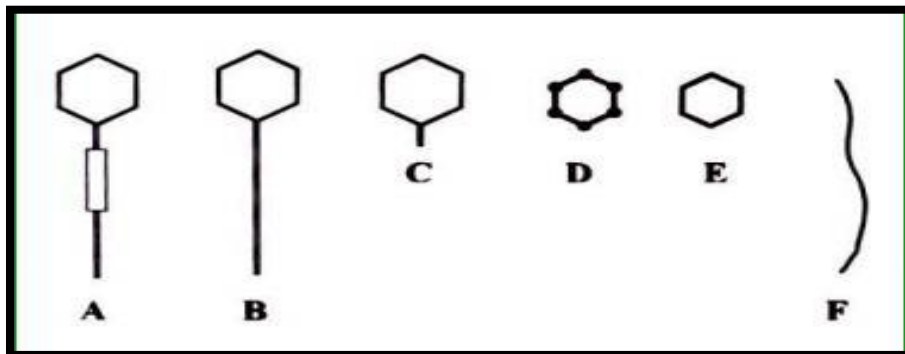
Figura 5

Morfología básica de los fagos

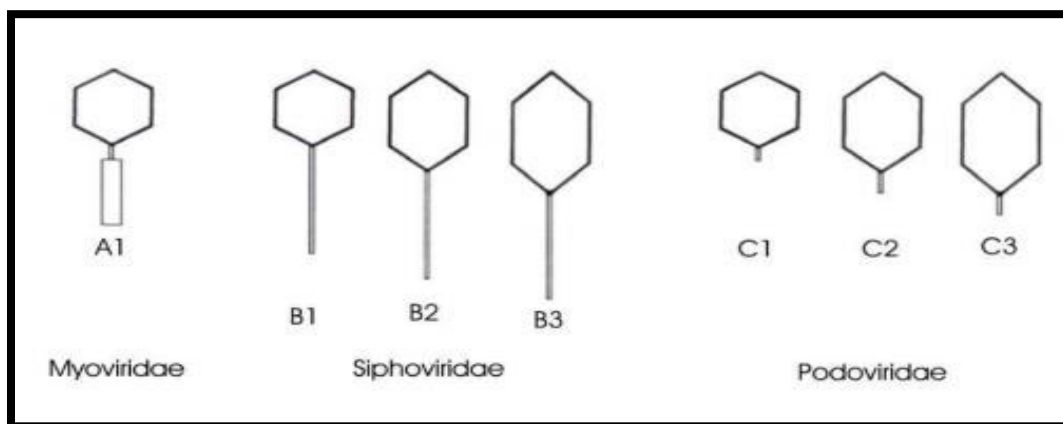


Nota. Tomada de (Norkin, 2010).

Según Bradley (1967) la taxonomía de los bacteriófagos se divide en 6 grupos: Grupo A: conformado por fagos de cabeza hexagonal, Grupo B fagos de cabeza hexagonal; cola larga, sin vaina contráctil, Grupo C: cabeza hexagonal y cola corta, Grupo D: cabeza hexagonal con protuberancias en sus vértices, no posee cola., Grupo E: cabeza hexagonal sencilla, sin protuberancias grandes, Grupo F: posee la forma de un filamento largo y flexible, no posee estructuras adicionales.

Figura 6*Taxonomía de los bacteriófagos**Nota.* Tomada de (Bradley, 1967).

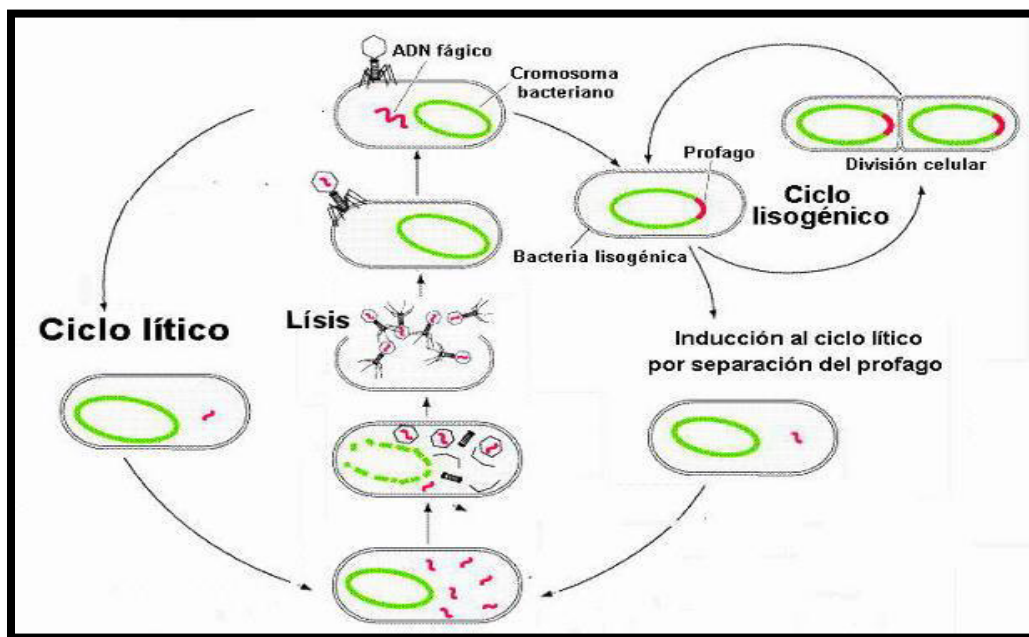
Ackermann (1984) clasificó los tres grupos básicos de Bradley (A, B y C) en las familias Myoviridae, Siphoviridae y Podoviridae, respectivamente (Figura 7).

Figura 7*Familias y morfotipos básicos de fagos**Nota.* Tomada de (Ackermann, 1984).

2.1.2.2. Mecanismos de infección. Los fagos pueden clasificarse en virulentos (líticos) o temperados (lisogénicos), dependiendo el tipo de desarrollo que ocurra dentro de la célula en la que se hospedan. (Figura 8).

Figura 8

Ciclo lítico y lisogénico de un fago



Nota. Tomada de (Neve, 1996).

El Ciclo lítico, cumple una serie de secuencias empezando con:

A. Adsorción o fijación del fago a la pared celular de la bacteria. el ciclo se inicia cuando el fago se fija a través de la adsorción a la superficie (pared celular). Neve (1996) explica que la unión que se da entre el fago y su receptor es del tipo llave-cerradura”, de esta manera explica un anclaje perfecto entre estos.

B. Inyección o penetración del ADN viral. Luego de la adsorción, el ácido nucleico (ADN fágico) es inyectado desde el fago hacia el interior de la célula bacteriana, mientras la

partícula fágica vacía queda en la superficie externa de la bacteria (Neve, 1996). Suele darse el caso que estas dos primeras etapas se den de manera simultánea, esto conlleva ciertas dificultades al establecer la participación de estructuras moleculares en esta o en otra etapa.

C. Eclipse o Biosíntesis de componentes virales. El ADN fágico inyectado en la célula bacteriana es sintetizada (replicación del ADN).

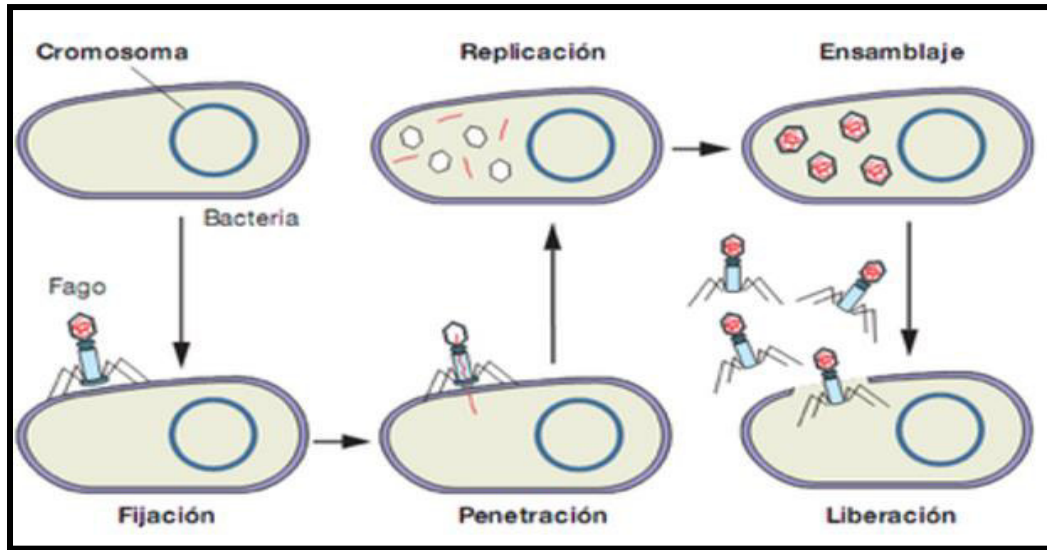
D. Ensamblaje. Figueroa y Verdugo (2005) nos dicen que, durante esta etapa, las proteínas estructurales (capsómeros) se unen y las nuevas moléculas de ADN fágico son empaquetadas en el interior de las cabezas, y “finalmente se obtienen las partículas virales completas” (Neve, 1996, p. 178). El proceso de ensamblaje es de tipo secuencial, y se sintetizan en forma aislada las colas y las proteínas de las cápsidas.

E. Lisis o ruptura de la célula huésped. Para finalizar el ciclo lítico se produce la ruptura de la pared o lisis celular, a través de enzimas llamadas lisinas. La liberación de la progenie viral se denomina “período exponencial”; mientras que el número viriones liberados de una célula infectada se denomina número de explosión. Estos nuevos virus poseen toda la capacidad de poder infectar a una nueva célula y realizar un nuevo ciclo lítico (Neve, 1996).

Hernández (2007) estima que, en las condiciones adecuadas, un solo bacteriófago es capaz de producir hasta más de cien viriones en menos de una hora, dando a entender que es posible que se produzcan aproximadamente 10^{24} infecciones a bacterias por segundo.

Figura 9

Ciclo lítico de un fago

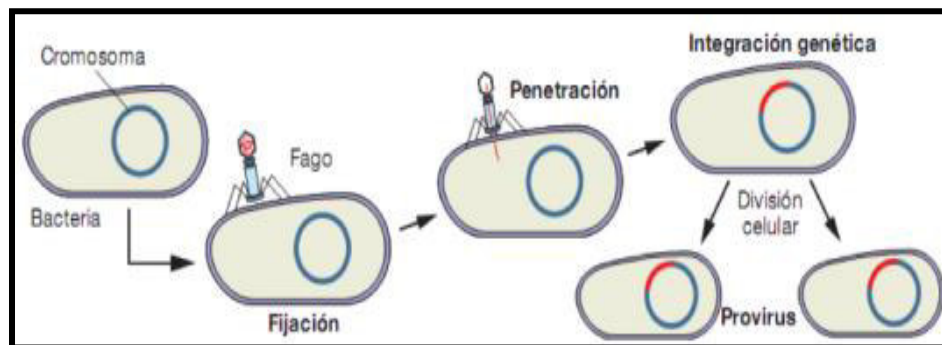


Nota. Tomada de (Hernández, 2007).

El ciclo lisogénico por otro lado es considerado como una vía alternativa de replicación fágica, los mecanismos involucrados en la adsorción del fago a la célula sensible y la inyección del ADN, son similares a los que se producen durante el ciclo lítico, pero por el contrario en este caso el ADN viral se inserta en el cromosoma bacteriano (Neve, 1996).

Figura 10

Ciclo Lisogénico de un fago



Nota. Tomada de (Neve, 1996).

2.1.3. Salud pública

La salmonelosis es una infección que es transmitida por los alimentos, los cuales causan la mayor parte de los brotes que afectan a centenares de personas, esto puede ser causado por cualquiera de los 2500 serotipos que existe hasta hoy, los que se aíslan con mayor frecuencia son *Salmonella enteritidis* y *S. typhimurium*. según Gutiérrez et al. (2000).

Organización Mundial de la Salud y Organización Panamericana de la Salud (2018) originaron una alerta epidemiológica de *Salmonella* serovar Typhi haplotipo H58 en África y en el Sureste asiático, en la cual se detectó una resistencia extendida a los antibióticos: fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera generación; esto produjo un incremento de casos con fiebre tifoidea, que afecta el sistema digestivo a nivel intestinal. Con los datos mencionados la OMS recomendó fortalecer la vigilancia y la capacidad de diagnóstico de laboratorio con el objetivo de favorecer la detección temprana de casos con fiebre tifoidea con resistencia extendida, suministrar un tratamiento adecuado e identificar la fuente de infección.

En 1995, la OMS encontró que 76.1 % de casos reportados correspondieron a *la S. enteritidis*, *S. typhimurium* y *S. typhi*, siendo *S. enteritidis* la más frecuente con 35 países infectados, seguido por *S. typhi* en 12 países y *S.typhimurium* en 8 países (Uribe y Suárez, 2006).

El reservorio de las salmonelosis zoonóticas son los animales. Prácticamente, cualquier alimento de origen animal puede ser la fuente de infección para el hombre, entre los más comunes tenemos a las carnes contaminadas de aves, cerdos y bovinos, el huevo, leche y derivados. Según estudios de Acha y Szyfres (2001) los alimentos de origen vegetal se consideran vectores de salmonelosis en humanos. Los roedores domésticos tales como: hámster, ratones y ratas, son considerados como portadores de *Salmonella* sp. sin que estos muestren síntoma alguno (Meerburg y Kijlstra, 2007).

2.1.4. Fagoterapia

La fagoterapia es también llamado el tratamiento a base de fagos, que permite a través de una dosificación de bacteriófagos el control de bacterias patógenas encontradas en un ser vivo, según lo menciona Sulakvelidze et al. (2001). Este tratamiento obtuvo ciertos resultados favorables en la investigación de D´Herelle en donde realizó ensayos de fagoterapia en Hospital Enfants-Malades de París para el tratamiento de la disentería de un niño de 12 años, encontrando resultados favorables en su recuperación, (Sulakvelidze et al., 2001).

Entre las ventajas que posee la fagoterapia tenemos que los fagos poseen una proliferación de manera exponencial, tienen capacidad mutagénica, al poseer alta especificidad los convierte en cepas específicas. Carlton (1999) Sin embargo, las desventajas pueden ser: la selección estricta de fagos de ciclo lítico para propósitos terapéuticos. Puede darse el caso que las bacterias adquieran resistencia a los bacteriófagos, esto se produce porque su espectro de acción es limitado, este

aspecto se puede minimizar con la administración de tres o más fagos (coctel fágico), esto produce que sea poco probable que la bacteria produzca resistencia a diferentes fagos simultáneamente, (Loc-Carrillo y Abedon, 2011).

No se observaron efectos secundarios o nocivos en humanos, por otro lado, algunos antibióticos permiten con mayor facilidad la adquisición de resistencia bacteriana, (Kutter y Sulakvelidze, 2004).

Barbosa et al. (2013) explica la capacidad mutagénica que poseen los fagos, según estudios esto se produce porque los fagos pueden perder infectividad. Es indispensable el conocimiento científico del comportamiento de los fagos, así mismo realizar una serie de ensayos *in vitro* e *in vivo* para así verificar su eficiencia. Es importante considerar que la fagoterapia ha sido usada en varios países por décadas, demostrando así sus efectos benéficos.

2.1.4.1. Desafíos de la fagoterapia. Romero (2015) explica que la fagoterapia ha sido estudiada y probada por muchos años; sin embargo, hubo aspectos que frenaron su aplicación en Occidente. A pesar de los ensayos y reportes realizados sobre la efectividad de los fagos en varios países, en Occidente aún se requiere de mayores pruebas experimentales que aseguren su eficiencia y seguridad para ser aplicados en humanos.

Estudios realizados por Campillo (2015) explica que uno de los retos que afronta la fagoterapia es el alto nivel de desconfianza que existe en la sociedad, para contraatacar esta dificultad será necesario realizar campañas informativas, sustentando mediante estudios científicos las ventajas y limitaciones que posee la fagoterapia. Reina y Reina (2018) hablo sobre la eliminación del riesgo de conversión lisogénica será determinante para el éxito a largo plazo de la fagoterapia. Para evitarla se deben seleccionar únicamente fagos líticos, con el fin de controlar la posible transferencia de genes que aumenten la virulencia de las cepas bacterianas, y conocer el

genoma de los fagos candidatos a ser usados en fagoterapia para garantizar la ausencia de genes asociados con virulencia y con ciclos lisogénicos; esto último requiere de esfuerzos importantes en la caracterización del gran número de proteínas hipotéticas que resultan de la anotación de los genomas virales.

Existe también el temor por la aparición de mutaciones en los fagos que les permitan infectar otras bacterias benéficas. Wichels et al. (1998) hizo un estudio comparativo entre las tres familias del orden Caudovirales, en donde demostró que un mayor rango de hospedero es aquellos pertenecientes a la familia Myoviridae, los cuales son capaces de infectar diferentes géneros bacterianos, por otro lado, los del rango más estrecho pertenecen a la familia Podoviridae, que en general infectan sólo una cepa de su bacteria hospedera.

Esta información muestra que es posible que un fago infecte más de una especie bacteriana. También se han encontrado fagos silvestres que infectan varias especies de bacterias Gram positivas; aunque se conoce poco sobre los receptores en este grupo de bacterias, se consideran menos diversos que los de las bacterias Gram negativas. Los fagos de Gram positivas se unen en su mayoría a los ácidos teicoicos (Kutter y Sulakvelidze, 2004).

La conservación de los fagos es uno de los principales desafíos metodológicos que se presentan en la actualidad. Estudios como el de Fortier y Moineau (2009), demuestran que los métodos de liofilización y conservación a 4°C, -80°C, son la mejor forma para almacenarlos y conservarlos. Cabe mencionar que aún se requiere investigación para su óptima conservación.

La Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, en la United States Pharmacopeia (USP) en la FDA no especifica los requerimientos que debe cumplir un producto farmacéutico a base de bacteriófagos, quienes producen comercialmente fagos, buscan que sus preparados cumplan con

las exigencias aplicables a los productos biológicos, como pureza y potencial de acción (Segundo et al., 2010).

Es de gran importancia realizar un análisis genómico de los fagos con el fin de descartar la presencia de genes asociados a patogenicidad y a ciclos lisogénicos. Segundo et al. (2010) explica que es importante diseñar cocteles que eviten por el mayor tiempo posible la aparición de bacterias resistentes, y así garantizar el uso de la fagoterapia.

2.1.4.2. Conservación de fagos. Según Pires et al. (2016) el uso de bacteriófagos para biocontrol de patógenos ha tenido un fuerte desarrollo en Occidente en la última década, y este desarrollo plantea la necesidad de contar con técnicas de conservación que permitan el almacenamiento a largo plazo de las formulaciones de fago. El mayor crecimiento en el área de la fagoterapia se ha registrado en el campo de la industria alimentaria, por lo que las técnicas de conservación utilizadas en estos casos deben ser tales que permitan que estas formulaciones puedan ser aplicadas en productos para el consumo.

A. Estabilidad de los lisados de fagos a temperatura ambiente. Cuando se trabaja con bacteriófagos, es muy común mantener los lisados de fago filtrados a temperatura ambiente, ya que, si éstos son manipulados cuidadosamente para evitar la contaminación, los títulos no disminuyen notablemente a corto plazo. Si bien es lógico y esperable que a mayor temperatura los procesos de degradación afecten más a las partículas de fago, el impacto de la temperatura en la velocidad de inactivación de las partículas es un factor que debe conocerse para determinar qué tan estricto debe ser su control durante el almacenamiento a largo plazo (Figuroa y Verdugo, 2005).

B. Liofilización. Según Reina y Reina (2018) es un proceso que consiste principalmente en 2 pasos: la congelación de la muestra y la posterior deshidratación de la muestra

congelada aplicando vacío. Este último paso puede subdividirse a su vez en 2 etapas: el secado primario, que consta de la sublimación del agua congelada, y el secado secundario que es la eliminación del agua adsorbida no congelada. Dado que es escasa la bibliografía que trata específicamente la liofilización de fagos, en este trabajo se ha considerado al fago como una proteína de gran tamaño (por la naturaleza proteica de su estructura) para el análisis de los fenómenos ocurridos durante este proceso.

C. ***La desnaturalización.*** de las proteínas durante la liofilización puede producirse según Pires et al. (2016) en las distintas etapas del proceso por motivos como: estrés por las bajas temperaturas, por el proceso de congelación (formación de cristales dendríticos, saltos de pH y de fuerza iónica o separación de fases) o por el secado (remoción de la esfera de hidratación) (Wang, 2000).

Sulakvelidze et al. (2001) explica que estos efectos pueden minimizarse (o anularse) utilizando estabilizantes que actúen protegiendo a la proteína durante el proceso de congelación (crioprotector) o congelación y secado (lioprotector).

2.1.5. Microscopio Electrónico (ME)

Según estudios de Reyes (2020) los microscopios electrónicos han revolucionado la medicina y las ciencias básicas, alcanza grandes amplificaciones, logrando una resolución de hasta mil veces mayor que el microscopio óptico.

Se puede obtener electrones acelerados con λ asociada bastante menor de 1 Å, por tanto, se puede obtener, teóricamente, resolución atómica. Con las lentes adecuadas se puede transformar los electrones difractados en la imagen real. Además de usarse para difracción e imagen (Montalvo, 2010). Existen dos tipos de microscopios electrónicos: el ME de transmisión y el ME de barrido (scanning).

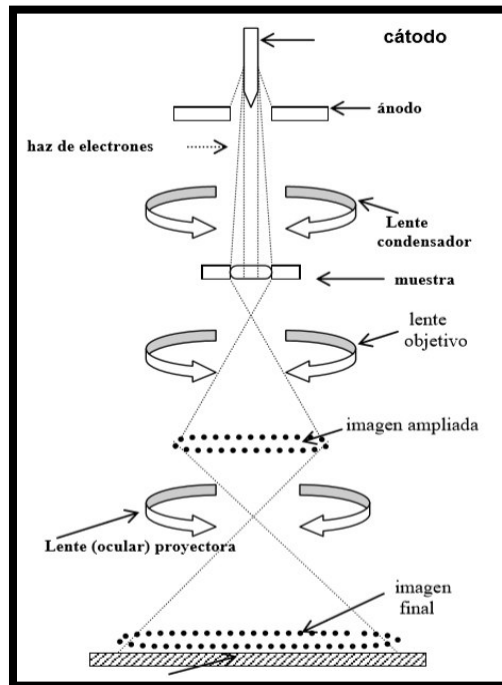
2.1.6. Microscopio Electrónico de Transmisión (MET)

Esta imagen pasa a su vez por una lente proyectora hasta una pantalla de material fluorescente, que brilla al recibir el impacto de los electrones (Reyes, 2020). Por debajo de la pantalla se sitúa una cámara para fotografiar la imagen (Figura 11).

Son muy usadas para este tipo de microscopio electrónico la tinción negativa, microtomía y congelación.

Figura 11

Componentes principales de un microscopio electrónico



Nota. Tomado de (Montalvo, 2010).

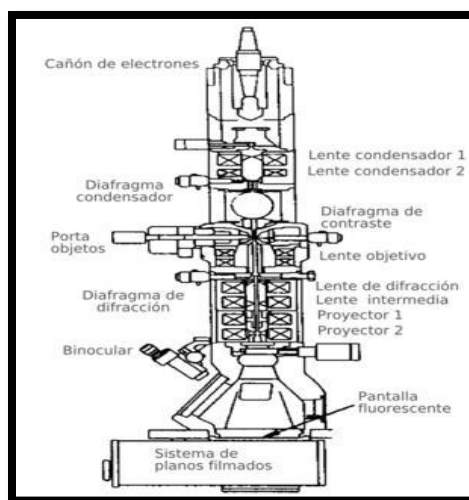
2.1.7. *Microscopio Electrónico de Barrido (SEM)*

Instrumento capaz de brindar diferentes planos de información provenientes de la muestra, esta imagen es entregada por la interacción de un haz de electrones que barre un área determinada sobre la superficie de la muestra, mientras en un monitor visualiza la información que hayamos seleccionado (Reyes, 2020). A diferencia de una imagen óptica, el microscopio de barrido no forma una imagen real al objeto, sino que construye una imagen virtual a partir de alguna de las señales emitidas por la muestra. La imagen se visualiza en un tubo de rayos catódicos donde las bobinas de deflexión del haz están sincronizadas con el barrido del haz de electrones en el microscopio (Ipohorski y Bozzano, 2013).

Al modular la intensidad del haz de los rayos cátodos se obtiene un registro en la pantalla en la cual proporciona una imagen electrónica proporcionada por el microscopio. Es necesario que la muestra sea resistente y pueda conservarse en el entorno de alto vacío del microscopio y que tenga una buena conductibilidad eléctrica.

Figura 12

Esquema de un Microscopio Electrónico de Barrido (SEM)



Nota. Tomado de (Ipohorski y Bozzano, 2013).

III. MÉTODO

3.1. Tipo de Investigación

La investigación cuantitativa se cataloga por la recolección y análisis de datos que generan respuestas a las preguntas de la investigación, además de corroborar las hipótesis que se han formulado previamente. Este estilo de investigación necesita la medición de las variables e instrumentos como el uso de la estadística descriptiva e inferencial que vincula a un tratamiento estadístico, entre otros, (Ñaupas et al., 2014). En la presente investigación se logró la recolección de datos obtenidos de los cuyes durante el ensayo y los análisis realizados para lograr el aislamiento de los fagos.

El diseño fue experimental; es un proceso de control a un objeto o grupo de individuos que se divide en variable independiente en la que determina condiciones, estímulos o tratamientos y en una variable dependiente se observan las reacciones o efectos que se generan, (Arias, 2016).

En este caso se analizaron diferentes órganos que hayan sido afectados por Salmonelosis, luego se analizó el número de fagos obtenidos y así conseguir una dilución óptima logró las características que presentaba cada cuy y así determinar si habían muerto por salmonelosis.

La categoría retrospectiva se fundamenta en la observación del investigador durante el proceso de aplicación en la que se pueda producir algún fenómeno, asimismo el investigador debe identificar los antecedentes de forma retrospectiva en base los resultados según Vásquez (2005). Mediante una recolección de datos se logró determinar la posibilidad de un posible tratamiento contra la salmonelosis en cuyes.

3.2. Ámbito temporal y espacial

Se recolectaron 25 cuyes muertos del criadero “Tayta Cuy” ubicado en el Distrito de Lurín – Lima – Perú, se escogieron porque presentaban síntomas de haber muestro por Salmonelosis, el muestreo fue realizado en los meses de enero y febrero del 2016. Las muestras fueron analizadas y procesadas en el Laboratorio de Microbiología de la universidad Ricardo Palma, con respecto a la identificación de los fagos, fue realizado en el Instituto de Química, de la Universidad de São Paulo.

3.3. Variables

Variable independiente: *Salmonella*: Bacilos Gram negativos anaerobios facultativos; produce Salmonelosis, enfermedad de mayor importancia en la explotación de los cuyes debido principalmente a sistemas de manejo inadecuados, esto es ocasionado principalmente por la ingesta de alimentos o agua contaminada, entre otros.

Variable dependiente: FAGOS: también llamados bacteriófagos, son virus que afectan a las bacterias, se localizan en toda la naturaleza. Éstos son específicos y viven de forma parasitaria dentro de las células bacterianas.

3.4. Población y muestra

3.4.1. Población

Según, Hernández et al. (2014) manifestó que es la totalidad de las unidades que comprende la población de estudio. Se evaluó una población de 25 cuyes muertos, los cuales presentaron fueron escogidos por presentar síntomas de salmonelosis, todos los ejemplares presentaban características similares: pelaje erizado, parálisis en sus extremidades, abdomen inflamado y diarrea.

3.4.2. Muestra

La muestra es un sub conjunto de elementos que tiene la población, López (2004); en el caso de la investigación, se utilizó una muestra de 12 cuyes, todos los ejemplares presentaron fagos en tres de sus órganos evaluados. Asimismo, se consideró en los criterios usados para la inclusión y exclusión de cuyes la presencia o ausencia de fagos.

3.5. Instrumentos

Los instrumentos son los medios materiales que emplea el investigador para recoger y almacenar la información (Hernández et al.,2014). Se utilizará una ficha de recolección de datos, aplicada al estudio; esta ficha es un documento interno de laboratorio que se utiliza con un checklist.

3.6. Procedimientos

3.6.1. Obtención de la muestra

Se recolectaron 25 cuyes muertos del criadero “Tayta Cuy” en el Distrito de Lurín – Lima – Perú, durante los meses de enero y febrero del 2016. Estos cuyes tenían aproximadamente 3 meses de edad; presentaban síntomas de salmonelosis: decaimiento, falta de apetito, pérdida de peso, pelo erizado y parálisis de las patas posteriores. Los cuyes fueron llevados asépticamente en coolers refrigerados a 4° al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma.

En el laboratorio se procedió a disectar los cuyes de manera aséptica, separando la parte terminal del intestino grueso, hígado, bazo y pulmón. Cada órgano fue puesto en una placa petri y lavado con solución salina 0.9% estéril. Se hizo pruebas bioquímicas de los órganos disectados.

Una vez lavados los órganos de cada cuy se cortó un pequeño fragmento de éstos y se guardaron en tubos de ensayo estériles con 5mL de solución salina 0.9% estéril y conservados a una temperatura entre 2°C y 5°C.

3.6.2. Aislamiento de fagos

Con una varilla de vidrio estéril se procedió a homogeneizar los órganos en los tubos de ensayo, se centrifugó a 8000rpm por 3 minutos, de esta manera se obtuvo un sobrenadante (supuestos fagos), luego fueron filtrados con filtros MilliQ de 0.22µm y se colocaron en eppendorfs estériles, éstos fueron conservados a una temperatura de -16°C y -18°C.

3.6.3. Determinación de la presencia de fagos

Para corroborar la presencia de fagos se utilizó el método de gota en agar doble capa. La cepa de *Salmonella typhimurium*, que fue proporcionada por el laboratorio de Microbiología de la Universidad Ricardo Palma fue reactivada en 1.5mL de Caldo Luria, fue incubado por 24 horas a 37°C, luego se procedió a medir el OD del caldo; se preparó 1ml de caldo a OD 600 =1, para ello se trabajó con la siguiente fórmula:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

C₁= Primera concentración

C₂= Segunda concentración

V₁= Primer Volumen

V₂=Segundo Volumen

Posteriormente en un falcon estéril se preparó 10ml de Agar Luria (al 1% de Agar), suplementado con 2mM de CaCl₂ estéril, luego se sirvió el Agar en una placa estéril y se dejó gelificar por unos minutos. En un segundo falcon estéril se preparó 9ml de Agar Luria (al 0.7% de Agar), de igual forma fue suplementado con 2mM de CaCl₂ estéril; a éste falcon se le adicionó el ml a un OD₆₀₀=1 de la cepa preparada anteriormente y se servirá sobre la primera capa de agar ya gelificada.

Una vez que la segunda capa de agar haya gelificado, se le añadió una pequeña alícuota de 20µl de los fagos filtrados anteriormente sobre el medio. Se dejará secar por unos 10 minutos a temperatura ambiente para ser posteriormente incubados a 37°C por 24 horas. La presencia de un espacio ausente de crecimiento bacteriano en el lugar donde se colocó la gota indicaría la presencia de fagos líticos contra *Salmonella typhimurium*.

3.6.4. Determinación de la especificidad de los fagos frente a cepas de Salmonella

Seguidamente se determinó la sensibilidad de varias cepas de *Salmonella* contra el fago aislado; para esto se reactivaron las cepas de Salmonella que se encontraban conservadas en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Ricardo Palma en una placa con Agar XLD a 37 °C por 24 horas, éstas cepas fueron: *Salmonella infantis*, *S. enteritidis*, *S. paratyphi* y *S. typhimurium*; luego con la ayuda de un asa de siembra estéril se sembró en un tubo con 2 ml de caldo Luria estéril; cada tubo fue rotulado con la cepa correspondiente.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se repitió el ensayo para las 4 cepas de *Salmonella*, al final se agregó pequeñas alícuotas de 20µl de los fagos en cada placa para obtener la presencia de calvas.

3.6.5. Multiplicación y conservación de fagos

Se repitió el ensayo para así obtener un stock de filtrado concentrado de aproximadamente 10 mL; para esto se escogió calvas aisladas, de las cuales se hizo un ligero raspado usando un palito de dientes estéril y se incubó en un eppendorf estéril con 1.5mL de caldo Luria con bacteria previamente incubada y ajustada a un $OD_{600} = 1$ por 24 horas. Pasado el tiempo de incubación se filtró con filtros MilliQ de $0.22\mu\text{m}$ y se conservó a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. También se dispuso de una reserva almacenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, adicionando al filtrado glicerol al 15%.

3.6.6. Titulación de fagos

A partir de los fagos conservados se procedió a elaborar diferentes diluciones. Se agregó 1 ml del stock filtrado a un eppendorf estéril, de este mililitro se cogió $100\mu\text{l}$ y se agregó a un nuevo eppendorf completándolo con $900\mu\text{l}$ de caldo luria estéril, de esta manera se obtuvo una dilución 10^{-1} , de éste eppendorf se cogió $100\mu\text{l}$ y se completó con $900\mu\text{l}$ de caldo luria estéril, así se consiguió la dilución 10^{-2} , se continuó realizando las diluciones sucesivas hasta llegar a la dilución 10^{-12} .

Se repitió el ensayo de “Determinación de la presencia de fagos” adicionando $100\mu\text{l}$ de las diluciones sobre las placas con agar doble capa, se sembró con Asa de Drigalsky y se incubó a 37°C por 24 horas. Luego de la incubación se realizó el recuento de placas de lisis y la determinación del título correspondiente (UFP/ ml: unidades formadoras de placas/ ml), calculado de la siguiente manera:

$$\text{Título (UFP/ ml)} = \text{Nro. De placas de lisis} \times \text{fd} \times 10$$

Donde fd= factor de dilución

Una vez obtenida los conteos de las diluciones los eppendorfs se mantuvieron refrigerados a una temperatura de -16°C y -18°C .

3.6.7. Identificación por microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Una vez obtenido un stock de fagos filtrados; en el Laboratório de Regulação da Expressão Gênica em Microorganismos- Universidad de São Paulo- Brasil, se hizo un fijado de los fagos en una membrana y se visualizaron por MET (microscopio electrónico de transmisión).

Para la preparación de la muestra se cogió 200 μl de fagos y se agregó a un eppendorf estéril, a éste se adicionó 50 μl de PEG 8000 al 50% en 1.5M NaCl_2 . Se vortexeó aproximadamente de 3 a 5 minutos, hasta lograr una suspensión homogénea, luego se incubó en un shaker digital giratorio a 4°C por 4 horas. Una vez transcurrido el tiempo se centrifugó a 10 000rpm por 30 min. El sobrenadante obtenido se descartó, el pellet fue resuspendido en 40 μl de Tris pH 8 y se conservó a -20°C .

Para fijar la muestra se cogió una placa Petri con un papel filtro de base, se colocó sobre él un trozo de papel parafilm y se le añadió gotas de 50 μl de PBS 1X.

A una membrana de 3.05mm de diámetro se le agrega 10 μl de la muestra preparada, se deja secar por unos 10 minutos y con la ayuda de una pinza fina se coloca sobre una de las gotas de PBS 1X, la membrana es enjuagada suavemente con un asa de siembra en la gota, luego de esto se retira la membrana de la gota y se le añade 50 μl de PTA 2%, se dejó secar por 5 min y se coloca en una lámina porta objetos.

3.7. Análisis de datos

Para analizar los datos recolectados, se procesó en un laboratorio cada uno de los cuyes y se identificó mediante la especificidad los fagos de la *Salmonella sp.*, en la cual se comprueba que existe una posibilidad de cura y/o tratamientos basados en la fagoterapia. Estos datos serán procesados en un cuadro de Excel para plasmar los resultados encontrados.

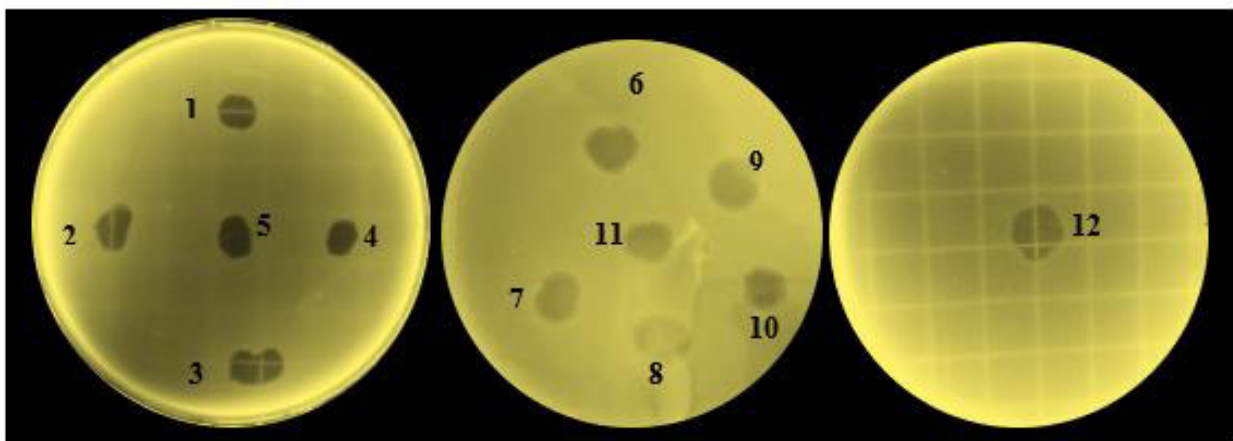
IV. RESULTADOS

4.1. Determinación de la presencia de fagos

Se probó con la Técnica de agar doble capa los órganos disectados de los 25 cuyes; la parte terminal del intestino grueso, hígado, bazo y pulmón; de los cuales se observaron presencia de calvas en 12 cuyes.

Figura 13

Ensayo de gota en doble capa agar de 12 muestras positivas



Nota. Se aprecia las 12 calvas (fagos) que se obtuvieron del intestino grueso de los cuyes.

Tabla 2

Determinación de la presencia de fagos en los órganos disectados de los cuyes

CUY																									
ORGANOS	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	#13	#14	#15	#16	#17	#18	#19	#20	#21	#22	#23	#24	#25
HIGADO	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
BAZO	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
INT. GRUESO	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
PULMON	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

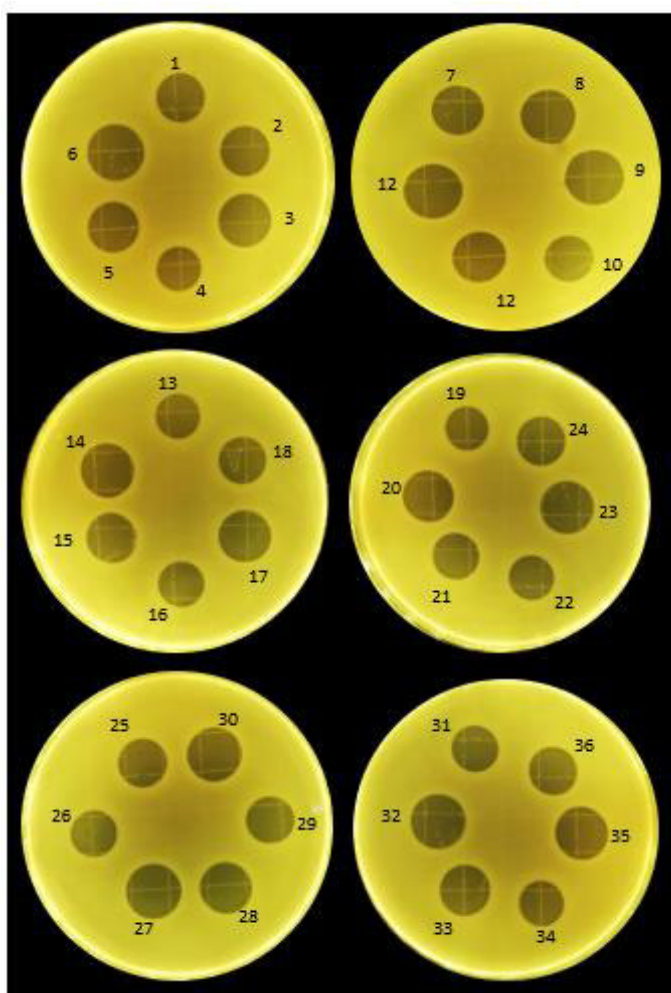
Nota. Se aprecia la presencia de 12 cuyes infectados en los órganos: hígado, bazo, intestino grueso. Dando un total de 36 muestras positivas donde (+) presencia de fagos, (-) ausencia de fagos.

4.2. Determinación de la especificidad de los fagos frente a cepas de Salmonella

Luego se hizo un análisis de espectro hospederos para cada muestra indicando que los fagos obtenidos tanto en las 12 muestras son efectivos únicamente en la cepa de *Salmonella typhimurium* para todos los casos.

Figura 14

Las 12 muestras positivas para Salmonella typhimurium



Nota. Se aprecia la especificidad de las 36 muestras positivas para la cepa de *S. typhimurium*. Del 1-12 corresponden al hígado, del 13-24 al bazo y del 25 al 36 al intestino grueso.

Tabla 3

Determinación de la especificidad de los fagos frente a cepas de Salmonella para las muestras positivas

CEPA DE <i>Salmonella</i>	Muestra N°1	Muestra N°2	Muestra N°3	Muestra N°4	Muestra N°5	Muestra N°6	Muestra N°7	Muestra N°8	Muestra N°9	Muestra N°10	Muestra N°11	Muestra N°12
<i>S. infantis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. enteritidis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. paratyphi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S.</i> <i>typhimurium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Nota. Se aprecia que los 12 cuyes dieron positivos para la cepa de *Salmonella typhimurium* y negativo para *S. infantis*, *S. enteritidis* y *S. paratyphi* donde (+) presencia de calvas, (-) ausencia de calvas.

4.3. Titulación de fagos

Se procedió a hacer la titulación de los fagos para así lograr su multiplicación a partir de una calva aislada, lográndose contar en la dilución 10^{-11} un total de 123×10^{-11} UFP/mL.

Figura 15

Esquema de las diluciones sucesivas realizadas a las muestras con fagos

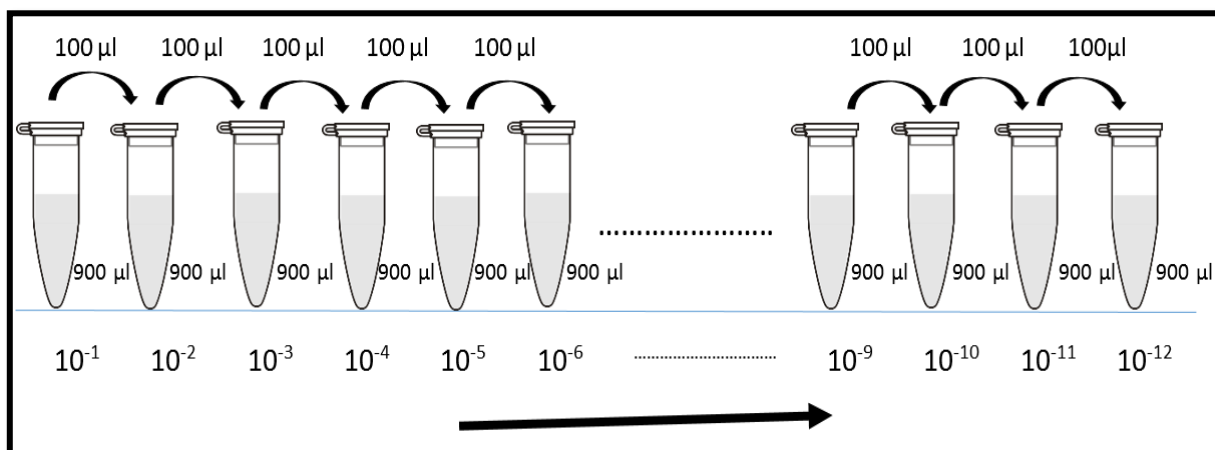
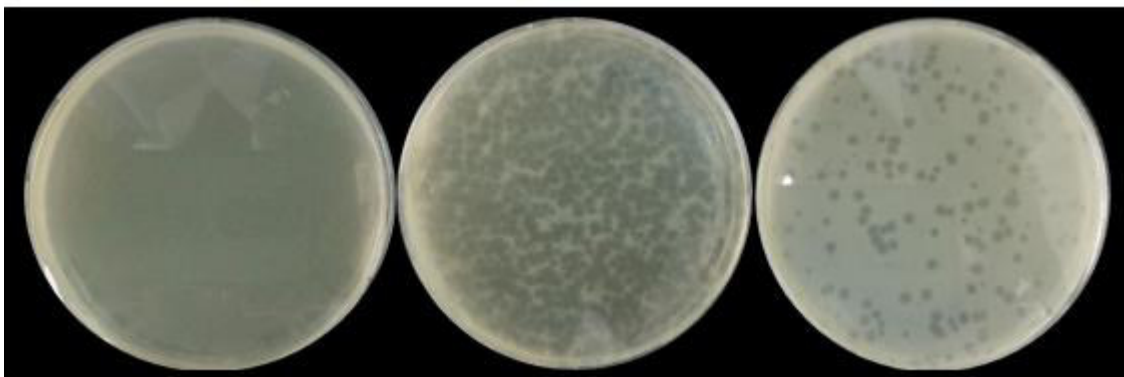


Figura 16

Calvas obtenidas de las diferentes diluciones de las muestras

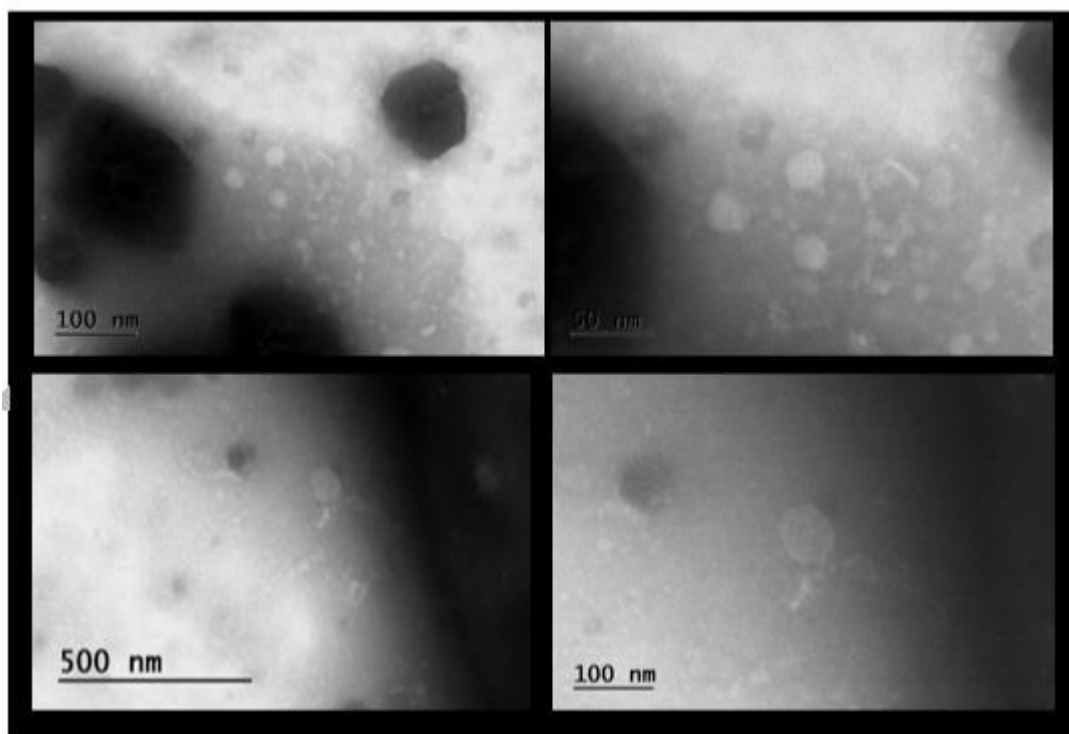


4.4. Identificación por microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Una vez aislado e identificado el espectro hospedero del fago para cada muestra, se procedió a identificarlos por microscopía electrónica de transmisión (MET). Se tomaron fotografías a 500nm, 100nm y 50nm, para cada muestra, se observó que el fago poseía una simetría binal, una cápside pequeña e icosaédrica y una cola helicoidal corta de un diámetro menor al diámetro de la cápside, se realizaron comparaciones de las fotografías obtenidas con las diferentes familias de bacteriófagos ya establecidas, logrando identificar que corresponderían a la familia Podoviridae.

Figura 17

Fotografías tomadas de Microscopia Electrónica



Nota. Se logra divisar los fagos encontrados en las muestras positivas.

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La discusión de los resultados se realizará mediante la triangulación de los antecedentes propuestos, teorías y resultados encontrados en la investigación, lo cual se describirá:

En el objetivo general: Lograr aislar fagos específicos contra *Salmonella* sp. aislados de *Cavia porcellus* “Cuy” con síntomas de Salmonelosis, se encontró que, en una población de 25 cuyes muertos con síntomas de salmonelosis procesados en el laboratorio, en 12 de ellos se evidenció presencia de bacteriófagos en los órganos de: hígado, bazo, intestino grueso.

En un estudio parecido Hernández (2019) obtuvo los mismos resultados donde logró aislar 15 bacteriófagos distintos, después los purificó y realizando pruebas específicas *in vitro* logró identificar que pertenecían a *Salmonella* (ATCC 19430), éstas muestras fueron analizadas por microscopia electrónica, identificando que pertenecían a la familia Siphoviridae.

Por otro lado, Chuquizuta y Morales (2017), identificaron agentes bacterianos presentes en gazapos muertos de cuyes en una granja de Manchay. Se recolectó 191 cadáveres de gazapos, los cuales fueron procesados en el Laboratorio de Microbiología Veterinaria de la Universidad Científica del Sur; se tomó muestras de hígado, intestino, bazo y pulmón para lograr la identificación, se obtuvo como resultado *E. coli* (40.84%) y *Salmonella spp.* (39.27%) entre otros; a nivel de órganos se aisló bacterias en un 32.36% en hígado, 28.46% en intestino, 20.65% en bazo y 18.54% en pulmón; mostrando asociación significativa ($p < 0.05$) entre el diagnóstico bacteriológico de *Salmonella spp.* y *E. coli* frente a los órganos evaluados.

En el objetivo específico 1: Aislar fagos específicos en ciclo lítico en cuyes con síntomas de Salmonelosis. Una vez concretado y corroborado la presencia de fagos, se dispuso a aislar los fagos para lograr su especificidad. Encontrando resultados parecidos en Reina y Reina (2018) en España, en su artículo estudió sobre los bacteriófagos que infectan y parasitan a las bacterias. Pueden presentar un ciclo lítico que determine la lisis de la bacteria infectada. Cada fago es específico de un determinado género o especie bacteriana. El incremento actual en la incidencia de resistencia antibiótica en las bacterias humanas ha favorecido el estudio de los fagos como alternativa terapéutica (fagoterapia). Los estudios previos habían demostrado la eficacia de estos elementos en las infecciones cutáneas e intestinales. Están en marcha diferentes ensayos clínicos para establecer la seguridad, reactogenicidad y eficacia terapéutica de múltiples fagos. Al ser elementos activos, los fagos deben someterse a rigurosos controles de calidad para asegurar la ausencia de efectos indeseables. La lisis bacteriana que provocan es de una magnitud inferior a la provocada por los antibióticos. Como problemas a resolver en el futuro están la posibilidad de utilizar mezclas de varios fagos, establecer la ruta idónea de administración y modificarlos genéticamente para que desactiven los genes de resistencia bacterianos.

Garcés (2015) en su investigación tuvo como objetivo identificar Enterobacterias en cuyes mediante el uso de la técnica de siembra por agotamiento y su tipificación a partir de pruebas bioquímicas específicas, logrando obtener una incidencia de 36% de Enterobacterias, de acuerdo a sus pruebas bioquímicas, lograron identificar: *Yersinia* sp. 10%, *Echerichia coli* 12%, *Shigella flexneri* 8% y *Salmonella typhimurium* 6%.

En el objetivo específico 2: Determinación de la especificidad de los fagos frente a cepas de *Salmonella* sp., se logró realizar comparaciones con diferentes cepas de *Salmonella* que se encontraban conservadas en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Ricardo Palma evidenciando que pertenecían a *Salmonella typhimurium*. Asimismo, estudios realizados por García et al. (2015) tuvo como objetivo evaluar el efecto *in vitro* de bacteriófagos frente a *Salmonella enteritidis* en heces frescas de gallinas ponedoras; se realizaron dos pruebas con tres concentraciones de bacteriófagos frente a cepas de *S. enteritidis*, las concentraciones ensayadas fueron: (5×10^7 pfu/mL), y dos diluciones de la misma (1/10 y 1/30), los ensayos fueron realizados en distintos tiempos desde la incubación; 1 minuto, 24h y 7 días. Se logró aislar *Salmonella* en todas las pruebas de 1 minuto, a las 24 horas de igual manera menos en la dilución 1/10 y a partir de 7 días no se logró aislar la bacteria de ninguno de los grupos experimentales, concluyendo que el empleo de bacteriófagos contribuyó a reducir los aislamientos de *Salmonella enteritidis* en las muestras. Por otro lado, Moya (2019) estudió la prevalencia de Salmonelosis en cuyes procedentes de granjas de La Libertad, mediante la técnica de necropsia obtuvo las muestras de hígado y ciego, mediante una serie de pruebas bioquímicas se obtuvo un 27,5% de prevalencia a *Salmonella spp.*, siendo el hígado la principal fuente de infección, concluyendo que el manejo inapropiado, las deficiencias sanitarias e introducción de nuevos ejemplares son factores predisponentes.

Asimismo, Tamariz et al. (2018) tuvieron como objetivo estandarizar y validar una prueba de amplificación de fagos para la identificación de salmonelosis para ser aplicada a infecciones de *Cavia porcellus*. Se aislaron bacteriófagos nativos de caviar infectados y residuos ambientales de instalaciones comerciales de cría de cucarachas. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 se utilizó para detectar, aislar y propagar los bacteriófagos, y para estandarizar un ensayo de amplificación de fagos para detectar *S. typhimurium* de hisopos rectales de caviar. El ensayo de

amplificación de fagos se probó con 2 antivirales agentes, MgSO₄·7H₂O (MAS) y extracto de cáscara de granada (PRE) más sulfato ferroso (PRE – FeSO₄). Resultando que el formato de ensayo final elegido utilizó PRE – FeSO₄ y permitió la detección de *S. Typhimurium* en 90 min de cultivo, 5 h de muestras clínicas, con un límite de detección a 103 pfu; la sensibilidad fue 98,2%, especificidad 98%, valor predictivo negativo (VPN) 96,1% y valor predictivo positivo (VPP) 99,1%.

En el objetivo específico 3: Determinar la concentración de fagos en una muestra, Marcelo et al. (2017) se basó en identificar mediante la técnica de PCR múltiple la posible existencia de los serovares *Salmonella typhimurium* y Enteritidis en 25 cepas de *Salmonella* spp previamente aisladas de cuyes e identificadas por sus características metabólicas; lográndose identificar todas las cepas como *Salmonella typhimurium*, evidenciándose la amplificación de los cebadores específicos para los genes *invA* y *fliC* pertenecientes al género *Salmonella* y *Salmonella typhimurium*, respectivamente. Con este estudio se logró establecer mediante una identificación molecular que los 25 cuyes estaban infectados por *Salmonella typhimurium* y Enteritidis.

Concordando con un trabajo realizado por Justo et al. (2015) en donde obtuvieron 11 cepas pertenecientes al género *Salmonella entérica*, logrando una prevalencia del 78.57% de *Salmonella* en las muestras analizadas.

Así también Ortega et al. (2015) la asoció entre casos positivos a aislamiento de *Salmonella* sp. a partir de hisopados vaginales dentro de las 24 horas del parto y la mortinatalidad. Sus resultados demostraron que *Salmonella* sp. es una de las causas de mortinatalidad en cuyes.

VI. CONCLUSIONES

- Se logró aislar fagos específicos contra *Salmonella* sp. de *Cavia porcellus* de una población de 25 cuyes muertos con síntomas de salmonelosis, los cuales fueron procesados en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Ricardo Palma.
- De los 25 cuyes disectados, se lograron aislar 12 cuyes en donde se evidenció presencia de bacteriófagos en los órganos de: hígado, bazo e intestino grueso, esto se logró concretar luego de las respectivas pruebas que se realizaron a cada órgano evaluado.
- Las muestras positivas obtenidas fueron comparadas con diferentes cepas control de *Salmonella* sp. que se encontraban conservadas en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Ricardo Palma evidenciando que todas pertenecían a *Salmonella typhimurium*, esto demuestra la especificidad que poseen los bacteriófagos ante alguna bacteria.
- Mediante la titulación de los bacteriófagos se logró obtener una dilución óptima y así poder contar el número de bacteriófagos en una placa, esto nos lleva a poder obtener a largo plazo un suministro de bacteriófagos específicos para producir un tratamiento basado en la fagoterapia.

VII. RECOMENDACIONES

- Existe una Resolución Ministerial, la cual indica que el MINSA debe realizar evaluaciones periódicas, sin embargo, al no cumplirse éstas, genera que múltiples criaderos infrinjan diversas normas sanitarias, por lo tanto, se hace un llamado a las unidades de prevención de Promoción y Prevención de la Salud a realizar inspecciones de manera periódica y así evitar la comercialización de animales infectados.
- Es importante lograr estandarizar diversos checklist y así probar otras técnicas de aislamiento de bacteriófagos para determinar otras opciones de trabajo.
- Es importante hacer campañas de concientización a la población acerca del consumo de cuyes, éstos poseen un alto contenido proteico, sin embargo, es importante enseñar el dónde y en qué establecimientos consumirlos.
- Se recomienda seguir con las investigaciones sobre la salmonelosis, por ser una enfermedad de riesgo social para la salud pública y lograr que la fagoterapia se convierta en una de las primeras opciones para combatir esta enfermedad.

VIII. REFERENCIAS

- Acha, P. y Szyfres, B. (2001). *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. (3ª ed., vol. 3). Washington, D.C.
- Ackermann, HW., Cantor, E., Jarvis, A., Lembke, J. y Mayo, J. (1984). New Species Definitions in Phages of Gram-Positive Cocci. *Intervirology*, 4(22), 181-190. <https://doi.org/10.1159/000149550>
- Ackermann, HW. (2007). 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology*, 152(2), 227–243. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0849-1>
- Almada, N., Araujo, S., Arias, N., Bernigaud, I., Bueno, D., De Battista, J., Duarte, S., Federico, F., Ferrer, J., Gallinger, C., Gange, J., García, A., Genta, G., Procura, F., Pulido, D., Ré, A., Rodriguez, F. y Soria, M. (2016). *Cama de pollo en Entre Ríos*. INTA.
- Ameghino, EF. (1968). Sobre un brote de salmonelosis en cuyes (*Cavia cobaya*). *Ivita*, 3, 260-261.
- Arias, F. (2016). *El Proyecto de Investigación*. (7ª ed.). Episteme.
- Balbin, N. (1990). *Parámetros productivos y reproductivos de pesos de camada al nacimiento y al destete en cuyes*. [Tesis de pregrado]. Universidad Nacional del Centro del Perú.
- Barbosa, C., Venail P., Holguín, A. y Vives, M. (2013). Co-evolutionary dynamics of the bacteria *Vibrio* sp. CV1 and phages V1G, V1P1, and V1P2: implications for phage therapy. *Environmental Microbiology*, 66(4), 897–905. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0284-2>
- Bradley, D.E. (1967). Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *Bacteriological Reviews*, 31(4), 230-314.

- Brenner, F., Villar, R., Angulo, F., Tauxe, R. y Swaminathan, B. (2000). Salmonella Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(7), 2465-2467. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.7.2465-2467.2000>
- Caballero, R. (2016). *Caracterización fenotípica y genotípica de salmonelosis en Cavia porcellus (cuyes) en las Regiones de Cajamarca, Lima y Moquegua*. [Tesis de pregrado, Universidad Peruana Cayetano Heredia]. Repositorio Institucional UPCH. <https://repositorio.upch.edu.pe/handle/20.500.12866/376?locale-attribute=en>
- Caffer, M. y Terragno, R. (2001). *MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA LA CARACTERIZACION DE SALMONELLA*.
- Campillo, S. (5 de mayo de 2015). *¿Hay esperanza contra las enfermedades resistentes? Así funciona la fagoterapia*. Hipertextual. <http://hipertextual.com/2015/05/fagoterapia>
- Carlton, R. (1999). Phage therapy: past history and future prospects. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 47(5), 267– 274.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2006). Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food-10 States, United States, 2005. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 55(14), 392-395.
- Chauca, F.L., Rojas, S. y Calapuja, A. (1994). *Lactación en cuyes: evaluación de dos densidades de empadre*.
- Chauca, L. (4-6 de diciembre de 2013). Crianza del cuy (*Cavia porcellus*) y su impacto en el desarrollo rural. *XXXVIII REUNION DE LA ASOCIACION PERUANA DE PRODUCCION ANIMAL APPA*, Lima, Perú. <https://hdl.handle.net/20.500.12955/440>
- Chirinos, O., Muro, K., Concha, W., Otiniano, J., Quezada, J. y Ríos, V. (2008). *Crianza y comercialización de cuy para el mercado limeño*. Cordillera S.A.C.

- Chuquizuta, C. y Morales, S. (2017). Identificación de agentes bacterianos aislados de gazapos muertos de cuyes en una granja de crianza intensiva en Lima, Perú. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 18(12), 1-13.
- Collier L. (2008). *Virología humana*. (3ª ed.). McGraw-Hill Interamericana de España.
- Dávalos, R. (1997). Crianza de cuyes. *Revista de Investigación Pecuaria*, 3.
- Domenech, A., Puig, C., Martí, S., Santos, S., Fernández, A., Calatayud, L., Dorca, J., Ardanuy, C. y Liñares, J. (2013). Infectious etiology of acute exacerbations in severe COPD patients. *The Journal of infection*, 67(6), 516-523.
<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2013.09.003>
- Fernández, J., Puchades, Y. y Vispo, N. (2004). Los bacteriófagos en la biología molecular pasada y actual. En N. Vispo (Ed.), *Combinatoria Molecular* (pp. 41-56). Elfos Scientiae.
- Figueroa, I. y Verdugo, A. (2005). Mecanismos moleculares de patogenicidad de Salmonella sp. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 47(1-2), 25- 42.
- Flores, C., Duarte, C. y Salgado, I. (2017). Caracterización de la carne de cuy (*Cavia porcellus*) para utilizarla en la elaboración de un embutido fermentado. *Revista Ciencia y Agricultura*, 14(1), 39-45.
- Fortier, L. y Moineau, S. (2009). Phage production and Maintenance of Stocks, Including expected Stock Lifetimes. En M. Clokie y A. Kropinski (Eds.), *Bacteriophages* (pp. 203-219). Humana Press.
- Garcés, R. (2015). *Incidencia de enterobacterias en cuyes del caserío Acapulco en el catón Mocha*. [Tesis de pregrado, Universidad Técnica de Ambato]. Repositorio Institucional UTA.
<https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/18369>

- García, C., Marín, C., Catalá-Gregori, P. y Soriano, J. (2015). Empleo de bacteriófagos frente a *Salmonella enteritidis* como herramienta de prevención. *Nutrición Hospitalaria*, 31(6), 2740-2742. <https://dx.doi.org/10.3305/nh.2015.31.6.8975>
- Garmendia, M., Selgrad, S. y Alezones, F. (2000). Salmonelosis en animales de laboratorio. *FONAIAP Divulga*, 68, 32-33.
- Granja Camero. (agosto de 2013). *Sanidad en cuyes: Salmonella*. <https://www.somoscuyperu.com/2013/08/sanidad-en-cuyes-salmonella.html>
- Gutiérrez, L., Montiel, E., Aguilera, P. y Gonzáles, M. (2000). Serotipos de *Salmonella* identificadas en los servicios de salud de México. *Salud Pública de México*, 42(6), 490-495.
- Hernández, R. (2019). *Aislamiento y caracterización parcial de bacteriófagos de Samonella spp con potencial aplicación en el biocontrol sobre superficies*. [Tesis doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona]. Repositorio Institucional UAB. <http://hdl.handle.net/10803/667337>
- Hernández, R., Fernández, C. y Baptista, M. (2014). *Metodología de la Investigación*. (6ª ed.). McGraw Hill.
- Hernández, A. (2007). *Aislamiento, caracterización y detección precoz de bacteriófagos de streptococcus thermophilus en la industria láctea*. [Tesis doctoral, Universidad de Oviedo]. Repositorio Institucional UO. <http://hdl.handle.net/10261/5344>
- Ipohorski, M. y Bozzano, P. (2013). Microscopía electrónica de barrido en la caracterización de materiales. *Ciencia e Investigación*, 63(3), 43-53.
- Justo, S., Saldaña, C. y Guerra, A. (2015). Aislamiento e Identificación de *Salmonella entérica* a partir de cuyes con signos de Salmonelosis. *Revista de Ciencias*, 11, 97-104.

Kutter, E. y Sulakvelidze, A. (2004). *Bacteriophages: Biology and Applications*. CRC Press.

La República. (03 de enero de 2020). Minagri: Perú exportó 11.6 toneladas de cuy en el 2019.

<https://larepublica.pe/economia/2020/01/03/minagri-peru-exporto-116-toneladas-de-cuy-en-el-2019/>

López, P. (2004). Población, muestra y muestreo. *Punto Cero*, 9(8), 69-74.

Loc-Carrillo, C. y Abedon, S. (2011). Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*, 1(2), 111-114. <https://doi.org/10.4161/bact.1.2.14590>

Marcelo, G., Rosadio, R., Chero, A., Díaz, G., Ciprian, A. y Maturrano, L. (2017). Identificación de Salmonella Enteritidis y Salmonella Typhimurium en Cuyes mediante la Técnica de PCR Múltiple. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 28(2), 411-417. <https://doi.org/10.15381/rivep.v28i2.13074>

Meerburg, B. y Kijlstra, A. (2007). Role of rodents in transmisión of Salmonella and Campylobacter. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 2774-2781. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3004>

Ministerio de Salud del Perú. (2012). Enfermedades Transmitidas por Alimentos, una importante causa de morbilidad en nuestro País. *Boletín Epidemiológico*, 21(50), 834-835.

Montalvo, C. (agosto de 2010). Microscopia. https://bct.facmed.unam.mx/wp-content/uploads/2018/08/2_microscopia.pdf

Moya, A. (2019). *Prevalencia de salmonelosis en cuyes (Cavia porcellus) procedentes de granjas del centro poblado Huancaquito Alto – Virú – La Libertad*. [Tesis de pregrado, Universidad Privada Antenor Orrego]. Repositorio Institucional UPAO. <https://hdl.handle.net/20.500.12759/5577>

- Neve, H. (1996). Bacteriophages. T. Logan y J. Accolas (Eds.), *Dairy starter cultures* (pp. 157-190). VCH Publishers.
- Norkin, L. (2010). *Virology* (p. 22). ASM Press.
- Ñaupas, H., Mejía, E., Novoa, E. y Villagómez, A. (2014). *Metodología de la investigación*. (4^a ed.). Ediciones de la U.
- Organización Mundial de la Salud y Organización Panamericana de la Salud (10 de octubre de 2018). *Alerta Epidemiológica: Salmonella entérica serovar Typhi haplotipo H58*. <https://www.paho.org/es/documentos/alerta-epidemiologica-10-octubre-2018-salmonella-enterica-serovar-typhi-haplotipo-h58>
- Ordaya, E. (2008). *Potenciales vectores y fómites para la transmisión de Salmonella enterica en la crianza comercial de cuyes en el Valle del Mantaro*. [Tesis de pregrado]. Universidad Nacional Hermilio Valdizán.
- Ortega, G., Jiménez, R., Ara, M. y Morales, S. (2015). La Salmonelosis como Factor de Riesgo de Mortinatalidad en Cuyes. *Revista de Investigación Veterinaria del Perú*. 26(4), 676-681. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v26i4.11203>
- Pires, D., Cleto, S., Sillankorva, S., Azeredo, J. y Lu, T. (2016). Genetically Engineered Phages: a Review of Advances over the Last Decade. *Microbiology and molecular biology reviews*, 80(3), 523-543. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00069-15>
- Reina, J. y Reina, N. (2018). Fagoterapia ¿una alternativa a la antibioticoterapia?. *Revista española de quimioterapia*, 31(2), 101-104.
- Reyes, J. (2020). Breve reseña histórica de la microscopía electrónica en México y el mundo. *Revista interdisciplinaria en nanociencias y nanotecnología*, 13(25), 79-100. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2020.25.69610>

- Romero, J. (2015). Fagoterapia: alternativa para el control de enfermedades bacterianas. *Salmonexpert*, 1, 75-77. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3008.3689>
- Segundo, N., Hernández, E., López, O. y Torres O. (2010). Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas Bacterianas (Fagoterapia). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41(3), 17-26.
- Sulakvelidze, A. (2005). Phage therapy: an attractive option for dealing with antibiotic-resistant bacterial infections. *Drug discovery today*. 10(12), 807-809. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03441-0](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03441-0)
- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z. y Morris, J. (2001). Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3), 649-659. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.3.649-659.2001>
- Tamariz, J., Guevara, V. y Guerra, H. (2018). Rapid detection of salmonellosis due to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in Peruvian commercially bred cavies, using indigenous wild bacteriophages. *Germs*, 8(4), 178-185. <https://doi.org/10.18683/germs.2018.1144>
- Uribe, C. y Suárez, M. (2006). Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar. *Colombia Médica*, 37(2), 151-158.
- Vadillo, S., Mateos, E. y Piríz, S. (2002). Manual de Microbiología Veterinaria. *Mc Graw-Hill*, 1.
- Vásquez, I. (18 de diciembre de 2005). Tipos de estudio y métodos de investigación. *Gestiopolis*. <https://www.gestiopolis.com/tipos-estudio-metodos-investigacion/>
- Villalba, A., Martos, C. y García, M. (2012). *Bacteriófagos y la terapia fágica*. WordPress.
- Wang, W. (2000). Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics*, 203(1-2), 1-60. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(00\)00423-3](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(00)00423-3)

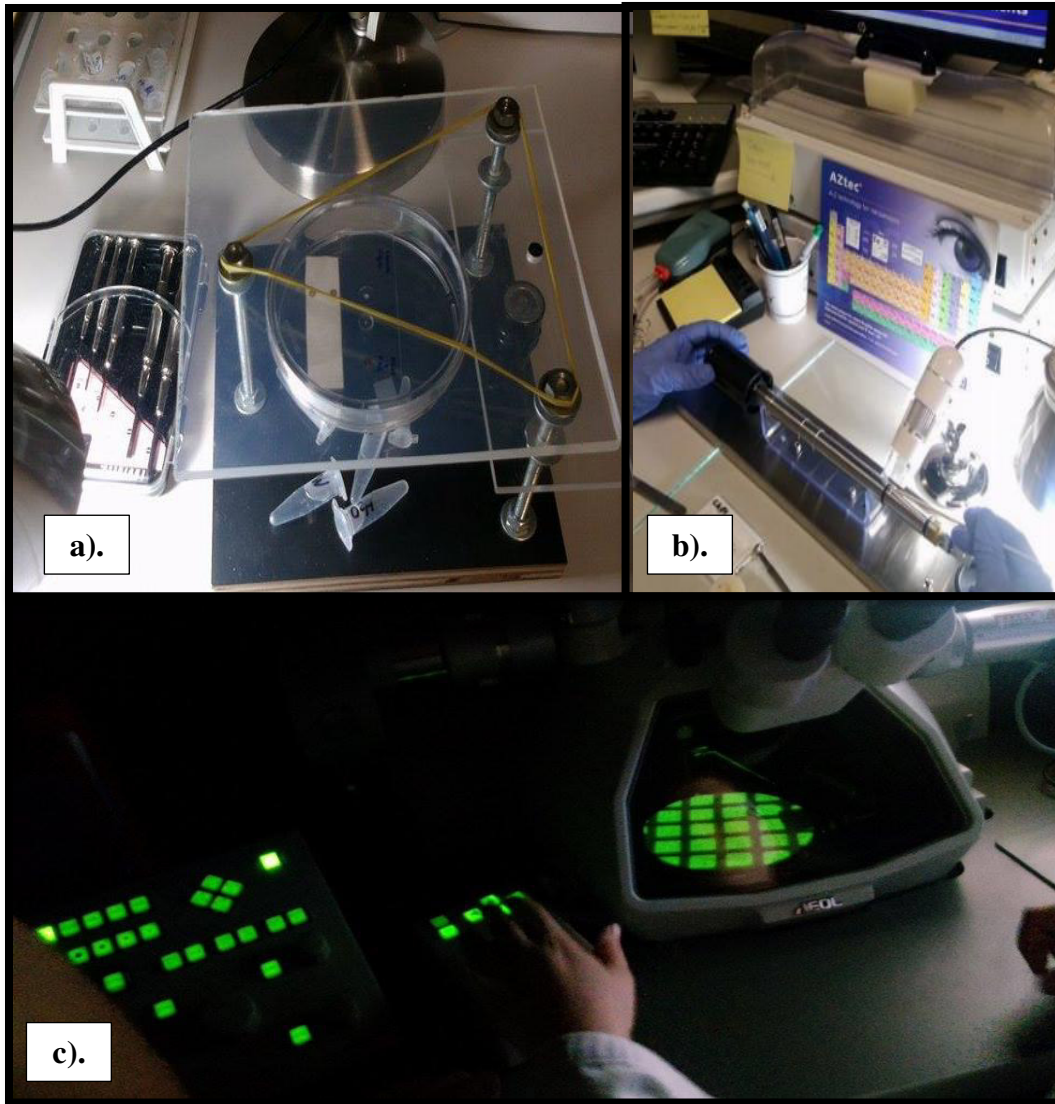
Wichels, A., Biel, S., Gelderblom, H., Brinkhoff, T., Muyzer, G. y Schütt, C. (1998).
Bacteriophage diversity in the North Sea. *Applied and environmental microbiology*, 64
(11), 4128-4133. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.11.4128-4133.1998>

IX. ANEXOS

Anexo A

Figura 18

Partes de un Microscopio Electrónico (ME)



Nota. a.) Lámina con muestra de fagos fijada, b.) Ocular donde se pone la muestra, c.) Mando del microscopio electrónico.

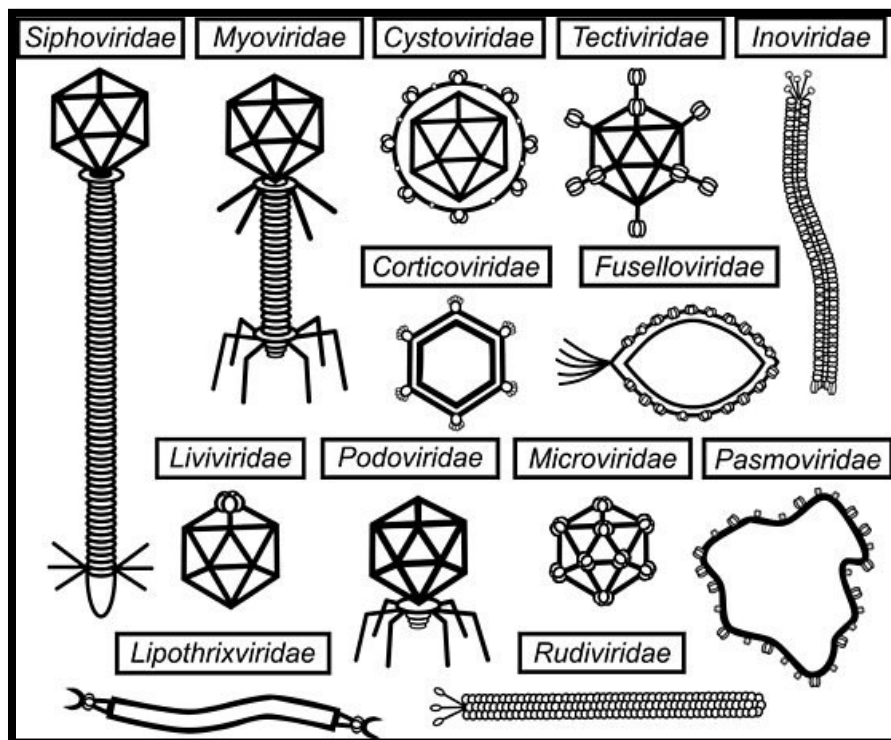
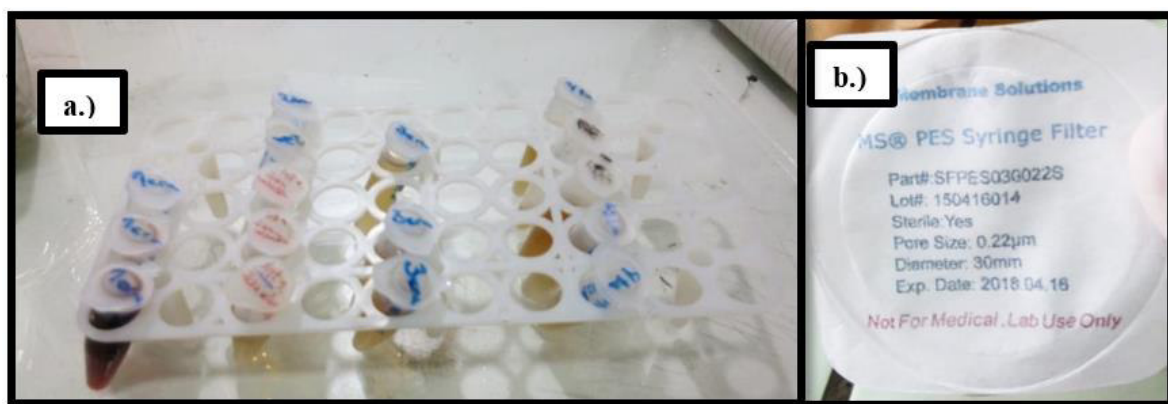
Figura 19*Familias de bacteriófagos*

Figura 20*Evaluación de los cuyes*

Nota. a.) Cuyes de los criaderos y b.) Disección y separación de los órganos de los cuyes.

Figura 21*Evaluación de los órganos*

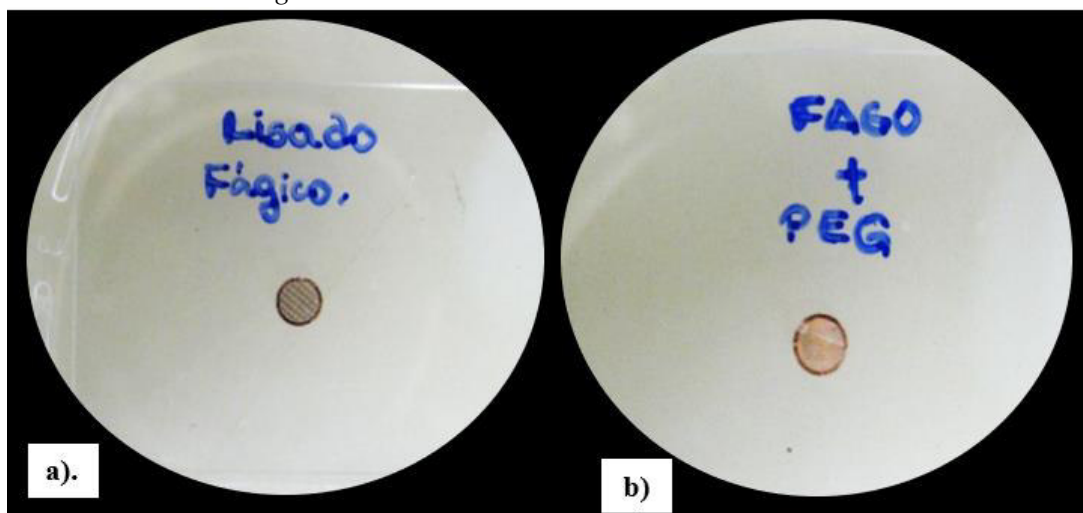
Nota. a.) Tubos eppendorf conteniendo muestras de diferentes órganos de cuyes y b.) Datos del filtro MilliQ de 0.22µm estéril.

Figura 22

Realización del ensayo en cabina de Bioseguridad

**Figura 23**

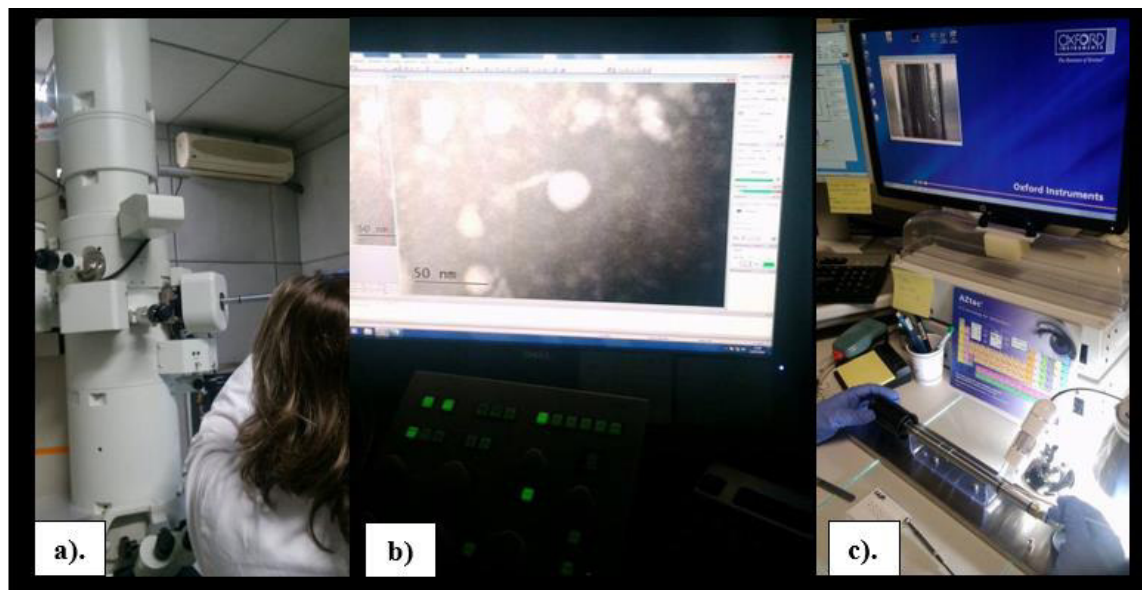
Membranas con Lisado Fágico



Nota. a). Membrana con Lisado Fágico y b). Membrana con Lisado Fágico + PEG.

Figura 24

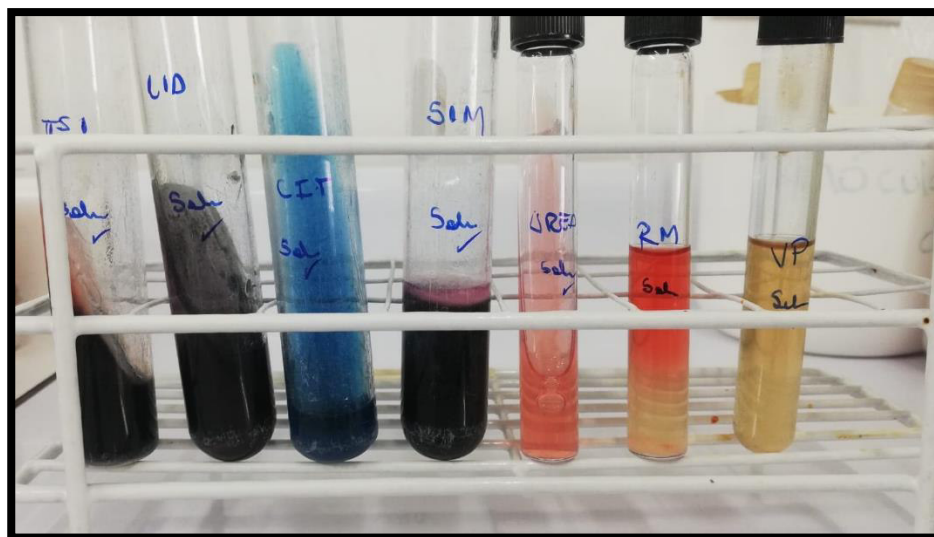
Observaciones en el Microscopio Electrónico



Nota. a). Porta objeto del microscopio electrónico, b y c). Pantalla de visualización.

Figura 25

Pruebas bioquímicas hechas a las muestras de cuy



Anexo B

FICHA DE PROTOCOLO DE AISLAMIENTO

Sr Biólogo(a), le solicito que por medio de esta ficha Ud. marque si cumple con todo el procedimiento en la selección de fagos.

N° de cuy:

FICHA DE AISLAMIENTO	Cumple	No cumple
<p>1. Pre-enriquecimiento en medio no selectivo:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Se toma una porción no mayor a 1g de cada órgano, y se añade en relación de 1:10 con solución salina 0.9% estéril, por separado. - Luego fueron conservados en 5ml de solución salina 0.9% a una temperatura entre 2°C y 5°C. <p>2. Aislamiento en medio no selectivo:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Homogeneizar los órganos en los tubos de ensayo - Centrifugar a 8000rpm por 3 minutos, el sobrenadante fue filtrado con filtros MilliQ de 0.22µm - Conservados a -16°C y -18°C. <p>3. Confirmación de la presencia de fagos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Se usa el método de gota en agar doble capa, con una cepa de Salmonella. <p>4. Especificidad de los fagos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Se enfrenta los fagos aislados ante 4 cepas de Salmonella - Luego se realiza la prueba individual. <p>5. Multiplicación de fagos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Repetir los ensayos necesarios para obtener un stock minio de 10 ml de fagos. <p>6. Conservación de los fagos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mantener el stock se mantuvo a -20 °C y a -80 °C, adicionando al filtrado glicerol al 15%. <p>7. Titulación de los fagos (concentración):</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mediante una serie de diluciones sucesivas se llega a determinar la concentración idónea de los fagos aislados. <p>8. Identificación por microscopia electrónica:</p>		

La Ficha de protocolo de aislamiento contiene 8 pasos para aislar los fagos, a su vez contiene 11 indicadores.

Protocolo de aislamiento e identificación de *Salmonella* spp. según Caffer *et al.*, (2008) con algunas modificaciones.