

**UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE  
APURÍMAC**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**ESCUELA ACADEMICO PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA  
Y ZOOTECNIA**



**“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DE  
DIFERENTES NIVELES DE CONCENTRACION  
DE EXTRACTO DE PROPOLEO SOBRE  
*Salmonella sp* DE CUYES (*Cavia porcellus*)-  
ABANCAY 2012”.**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE MEDICO VETERINARIO Y  
ZOOTECNISTA**

**WALTER MEJIA JUAREZ.**

**Abancay, Noviembre de 2013**

**PERU**



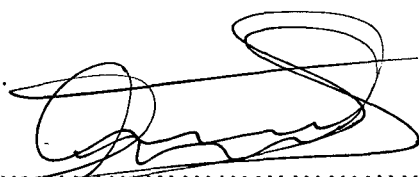
UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURIMAC	
CÓDIGO	MFN
	BIBLIOTECA CENTRAL
FECHA DE INGRESO:	02 SET. 2014
Nº DE INGRESO:	0374



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DE  
DIFERENTES NIVELES DE  
CONCENTRACIONES DE EXTRACTO DE  
PROPOLEO SOBRE *Salmonella sp* DE CUYES  
(*Cavia porcellus*) - ABANCAY 2012.**

**Jurado calificador integrado por:**

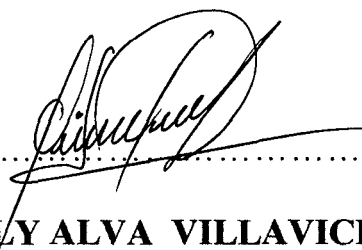


.....  
**M.V.Z. VÍCTOR RAÚL CANO FUENTES.**  
**Presidente**



.....  
**M.V.Z. VALERIANO PAUCARA OCSA**

**Jurado.**

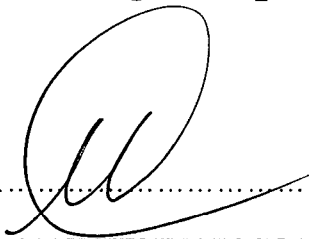


.....  
**M.V.Z. GIZELY ALVA VILLAVICENCIO**  
**Jurado.**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DE  
DIFERENTES NIVELES DE  
CONCENTRACIONES DE EXTRACTO DE  
PROPOLEO SOBRE *Salmonella sp* DE CUYES  
(*Cavia porcellus*) - ABANCAY 2012.**

**Asesores integrado por:**



Mg. M.V.Z. MAX HENRY ESCOBEDO ENRIQUEZ  
Asesor Principal.



M.V.Z. JULIO IVAN CRUZ COLQUE  
Asesor.

**Abancay, Noviembre de 2013.**

**2013**

**“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO  
DE DIFERENTES NIVELES DE  
CONCENTRACIONES DE EXTRACTO DE  
PROPOLEO SOBRE *Salmonella sp* DE  
CUYES (*Cavia porcellus*) - ABANCAY 2012”.**

**UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE  
APURÍMAC**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA  
Y ZOOTECNIA**

**AUTORIDADES**

.....  
DR. ALEJANDRO NARVÁEZ LICERAS  
Rector.

.....  
PH. D. ING. LUCY MARISOL GUANUCHI ORELLANA  
Vicerrectorado académico

.....  
MAG. LILIAM ROCÍO BARCENA RODRÍGUEZ  
Decana de la facultad



## DEDICATORIA

A mis queridos padres Víctor Mejía y Francisca Juárez por su amor, apoyo y cariño incondicionales durante toda mi vida y muy en especial durante los años de mi formación en mi carrera universitaria. Mis triunfos son sus triunfos. A mi pareja Kathy Villafuerte y mi hijo Fernando Sebastián Mejía, que son el centro de mi alegría y triunfo. A mis hermanos Inés, Ramón y Maribel Mejía Juárez por su ayuda y apoyo incondicional.



## **AGRADECIMIENTO**

A mi asesor Mg. M.V.Z. Max Henry Escobedo Enríquez por su constante exigencia en la realización del presente trabajo de investigación, así como por brindarme su amistad y apoyo incondicional durante la elaboración y ejecución.

A mis asesores MVZ Julio Iván Cruz Colque quien en la sección de Microbiología y Laboratorio Clínico me condujo y me apoyó en todo, aun en los peores momentos en que las cosas parecían no salir bien, dándome fuerzas para seguir adelante; también a la Bióloga Gladis Castro quien me dio las facilidades del laboratorio de Biología y Microbiología de la facultad de Ing. Agroindustrial para preparar mis medios de cultivo y ejecutarla, así como me dio la confianza durante mi permanencia en el dicho laboratorio.

A mi amigo MVZ Isaí Ochoa P. quien me ayudo incondicionalmente en todo momento durante la elaboración y ejecución de la presente investigación.

A los docentes de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, quienes me guiaron durante mi formación profesional, siempre los recordaré con mucho cariño.



## RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar la actividad antibacteriana *in vitro* de diferentes niveles de concentraciones de extracto de Propóleo sobre *Salmonella sp* de cuyes (*cavia porcellus*), frente a cinco diferentes concentraciones de extracto de propóleo. El trabajo realizó en el laboratorio de microbiología de la facultad de Ingeniería Agroindustrial de la ciudad de Abancay, empleando un tipo de muestreo no probabilístico por conveniencia. Donde se preparó las diferentes concentraciones de extracto de Propóleo (30%, 15%, 7.5%, 3.75%, 1.87%) y posteriormente se aislaron las cepas de *Salmonella sp* a partir del hisopado anal y órganos como hígado, bazo, e intestinos y luego se procedió a realizar la prueba de sensibilidad bacteriana para medir los halos de inhibición. Los resultados mostraron que todas las soluciones de extracto de propóleo tienen actividad antibacteriana sobre *Salmonella sp*; donde el propóleo al 30% presenta un promedio (12.22 mm) en halos de inhibición, el propóleo al 15% de (9.667 mm), el propóleo al 7.5% de (10 mm), el propóleo al 1.87% de (9.667 mm) y el propóleo al 3.75% presenta un promedio de (8.444 mm) en halos de inhibición. Se concluye que los niveles evaluados en la investigación no mostraron diferencias significativas.

**Palabras claves:** Cuyes, extracto de Propóleos, *Salmonella sp*, actividad antibacteriana.



## ABSTRACT

The present research was conducted in order to determine the *in vitro* antibacterial activity of different levels of concentrations of propolis extract on *Salmonella sp* guinea pig (*Cavia porcellus*). Compared with five different concentrations of propolis extract. The work was carried out in the microbiology laboratory of the Faculty of Engineering of the agro-industrial city of Abancay, using a type of non-probability sampling for convenience. Where was prepared the different concentrations of propolis extract (30 %, 15 %, 7.5 %, 3.75 %, 1.87 %) and was subsequently isolated strains of *Salmonella sp* from the anal swab and organs such as liver, spleen, and intestines and then proceeded to carry out the test bacterial sensitivity to measure the inhibition halos. The results showed that all solutions of propolis extract have antibacterial activity on *Salmonella sp*; where the propolis 30% presents an average (12.22 mm) in inhibition halos, the propolis to 15% of (9,667 mm), the propolis to 7.5 % (10 mm), the propolis to 1.87 % (9,667 mm) and propolis to the 3.75 % presents an average of (8,444 mm) in inhibition halos. It is concluded that the levels evaluated in the research did not show significant differences.

Key words: Guinea pig, Propolis extract, *Salmonella sp* and antibacterial activity.



## ÍNDICE

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEORICO	3
2.1 Antecedentes	3
2.2. Bases Teóricas	9
2.2.1 Propóleo	9
2.2.2 Composición Química	10
2.2.3 Mecanismo de Acción	12
2.2.4 Composición según zona Geográfica	13
2.2.5 Propiedades Antimicrobianas	16
2.2.6 Métodos de extracción de propóleos	20
2.2.7 Toxicología de Propóleo	22
2.2.8 Salmonella en Cuyes	23
2.2.9 Historia	23
2.2.10 Etiología	24
2.2.11 Clasificación y Nomenclatura	25
2.2.12 Descripción del Agente Causal	25
2.2.13 Características Bioquímicas	26
2.2.14 Estructura Antigénica	27
2.2.15 Epidemiología	29
2.2.16 Factores de Virulencia	41
2.2.17 Manifestaciones Clínicas	42
2.2.18 Diagnostico	43
2.2.19 Tratamiento.	44



2.2.20 Aislamiento y caracterización de salmonella sp.	45
2.2.21 Pruebas Bioquímicas.	48
2.3 Marco Conceptual	50
III. MATERIAL Y METODOS	51
3.1 Materiales	51
3.1.1 Cepas Bacterianas para las Pruebas <i>In vitro</i>	51
3.1.2 De Laboratorio	51
3.1.3 De Campo	54
3.2 Métodos	58
3.3Diseño y análisis estadístico	59
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	60
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	64
5.1 Conclusiones	64
5.2 Recomendaciones	65
BIBLIOGRAFÍA	67
ANEXOS	



## TABLAS

	Pág.
TABLA 1. Flavonoides presentes en el propóleo	14
TABLA 2. Pruebas bioquímicas y interpretación	49
TABLA 3. diámetros de halos de diferentes concentraciones de propóleo	62

## FIGURAS

	Pág.
<b>FIGURA 1. Flujograma de Aislamiento e Identificación Bioquímica Salmonella</b>	<b>47</b>
<b>FIGURA2. Diagrama de aislamiento e Identificación de <i>salmonella sp</i></b>	<b>57</b>

## I. INTRODUCCIÓN

La producción de cobayos es una actividad que cada vez cobra más importancia en nuestro país, debido al aumento de la demanda de la carne de esta especie en el mercado nacional e internacional. En este contexto sobresale la salmonelosis enfermedad que causa altos porcentajes de mortalidad y morbilidad en producción de cobayos (Layme, 2010). La salmonelosis, también conocida como la “peste del cuy”, es una enfermedad muy agresiva causada por la *Salmonella*. Esta enfermedad afecta a cuyes de todas las edades pero la mayor susceptibilidad y morbilidad se muestra en los lactantes, con 52.7% de morbilidad. Los adultos expresan hasta 30.65% y los cuyes de recría 19.83% (Chauca, 1997). Es la enfermedad de mayor importancia en la explotación de los cuyes debido principalmente a sistemas de manejo inadecuados. La ruta de infección más común se produce por 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 (Enriquez *et al*, 2004).

*La Salmonella spp*, son bacterias de distribución mundial causantes de enfermedades intestinales que afectan tanto al hombre como a los animales. Que hacen parte de un grupo de microorganismos que se hallan distribuidos ampliamente en la naturaleza, se encuentran en el tracto gastrointestinal de los mamíferos domésticos y salvajes, reptiles, aves e insectos, produciendo en estos una gran variedad de patologías (Vargas *et al*, 2004).

La *Salmonellosis* en el cuy es causada por serotipos del género *Salmonella*, bacilos Gram negativos no esporulados pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. En el Perú, el serotipo aislado con mayor frecuencia es el *serovar typhimurium*, con 95% de incidencia (Layme, 2010; Chauca, 1997). Bajo este concepto el objetivo de esta investigación fue “Determinar la actividad antibacteriana in vitro de diferentes niveles de concentraciones de extracto de propóleos sobre la *Salmonella sp* de cuyes (*Cavia porcellus*)”, estudio que servirá para disminuir el potencial patógeno de estas especies. El uso de propóleo constituye una alternativa en la prevención sobre *Salmonellosis* en *Cavia porcellus*, dado que este producto tiene propiedades antibacterianas gracias a los flavonoides que estas contienen, así como establecer una base en la futura elaboración de un producto aplicable en la práctica, empleando como en este caso un recurso muy abundante en nuestro medio.

## II. MARCO TEORICO

### 2.1 Antecedentes.

Para evaluar el efecto antibacteriano del propóleos a través de la determinación comparativa de la concentración mínima inhibitoria (CMI), todos los extractos de propóleos presentaron actividad antibacteriana frente a las cepas utilizadas; siendo mayor frente a las bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, con valores de CMI entre 0.05 mg/mL y 45mg/mL, que frente a las bacterias Gram negativas: *Salmonella typhimurium*, *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli*, con valores de CMI entre 10 mg/mL y 50 mg/MI (Díaz *et al*, 2000).

Mediante difusión en agar, evaluaron la actividad antimicrobiana y la composición química de propóleos proveniente de Turquía frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, obteniendo resultados positivos para *Staphylococcus aureus*; para *Escherichia coli* obtuvieron una menor inhibición de crecimiento (Velikova *et al*, 2001).

Un estudio en Campeche, México, donde obtuvieron y caracterizaron extractos etanólicos y acuosos de propóleos de diferentes localidades, probando posteriormente su efectividad antimicrobiana sobre las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus pyogenes*. Los extractos presentaron colores que variaron del ámbar claro al café oscuro, encontrándose un rendimiento en sólidos solubles totales superior en los etanólicos que en los acuosos. Se identificaron como metabolitos: lactonas, saponinas, fenoles, triterpenos, taninos, alcaloides, flavonoides, sustancias aminadas y leucoantocianidinas, estas últimas sólo en los extractos acuosos. La efectividad antimicrobiana de los extractos depende del solvente empleado, la procedencia del propóleos y de la especie bacteriana evaluada, siendo los extractos etanólicos los más efectivos, en particular los obtenidos de propóleos procedentes de Hampolol. La especie bacteriana más sensible resultó ser la *Pseudomona aeruginosa* y la *Salmonella typhi* la más resistente (Tolosa y Cañizares, 2002).

La actividad antibacteriana de propóleos de distintas zonas geográficas a pesar de las diferencias en su composición química todas las muestras evaluadas mostraron actividad contra bacterias Gram-positivas. Además en propóleos de zonas templadas los compuestos responsables de dicha actividad son flavonoides y esteres de ácidos fenólicos. Sin embargo los propóleos de origen tropical no contienen tales sustancias, aun así muestran actividad antimicrobiana. El autor concluye que la combinación de diversas sustancias en los propóleos es esencial para su actividad biológica (Kujumgiev *et al*, 1999).

Evaluaron las características fisicoquímicas, y la actividad anti fúngica y antibacteriana del propóleo colectado en el municipio de La Unión (Antioquia, Colombia). Los resultados del análisis físico químico del propóleos fueron: punto de fusión, 67-68 °C; sustancias extractables con hexano, 74,32 ± 0,90%; resinas solubles en etanol, 14,08 ± 2,24%; residuos insolubles, 10,47 ± 0,84%; pérdidas por calentamiento, 1,82 ± 0,32%; cenizas, 0,16 ± 0,01%, y el índice de oxidación, 8,0 ± 3,0 s. Las evaluaciones de actividad antifúngica, contra los hongos *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum*, *Aspergillus sp.* *Penicillium sp.*, y de actividad antibacteriana, contra *Bacillus subtilis* (esporulada), *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella tiphy*, demuestran un efecto moderado del propóleos en la inhibición del crecimiento del microorganismo. El análisis mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM), permitió la detección de ácidos grasos y sus ésteres, esteroides, triterpenos y diterpenos (Palomino *et al*, 2010).

El efecto antibacteriano del propóleo a través de la determinación comparativa de la concentración mínima inhibitoria (CMI), utilizando la técnica de los discos de celulosa y la técnica de difusión en doble capa de agar. Al aplicar el procesamiento estadístico se encontró que no hay diferencias significativas entre las técnicas aplicadas para un nivel de significación de 95%, es decir los 2 métodos empleados en este trabajo para la determinación de la actividad antibacteriana de extractos hidroalcohólicos de propóleos y los valores de CMI tienen el mismo comportamiento. Todos los extractos de propóleos presentaron actividad antibacteriana frente a las cepas utilizadas; siendo mayor frente a las bacterias Gram + : *S. aureus* y *Bacillus subtilis*, con valores de CMI entre 0,05 mg/ml y 45 mg/ml, que frente a las bacterias

Gram - : *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* y *E. coli*, con valores de CMI entre 10 mg/ml y 50 mg/ml; con excepción de la bacteria Gram - : *K. Pneumoniae* que se comportó de forma similar a las bacterias Gram + cuyos valores de CMI estuvieron entre 0.05 mg/ml y 15 mg/ml. Se encontraron diferencias significativas entre los propóleos, así como en la interacción propóleo y microorganismos en los valores obtenidos de los halos de inhibición (Díaz *et al*, 2000).

El efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo (EEP) de Oxapampa - Perú evaluando *in vitro* su acción antibacteriana frente al *S. Mutans* y *S. aureus* para enfrentarlas a las soluciones: Propóleos 10% y 30% y compararlas con los testigos clorhexidina 0,12 y 0,05%, listerine ® y agua destilada. Se evaluó la actividad antimicrobiana mediante el método de Kirby - Bauer. El diseño del estudio fue de tipo experimental *in vitro* y el tamaño muestral fue 16. Para el análisis de los datos se utilizó la prueba t de Student. Se determinó que para el *S. aureus*, el EEP al 30% presentó mayor eficacia con una media de  $11.77 \text{ mm} \pm 0,19$  y se encontró que las dos concentraciones de propóleos a las 24 y 48 horas mostraron diferencia significativa  $p=0,007$ . Además, se determinó que para el *S. mutans*, tanto el EEP al 10% y 30% a las 24 y 48 horas no mostraron diferencia significativa. Se concluye que el EEP al 30% tuvo mayor efecto antibacteriano que el Listerine ® contra el *S. mutans*  $p < 0,001$  e igual en efectividad que la clorhexidina 0,05% frente al *S. aureus* (Tovalino y Contreras, 2010).

Mediante la técnica de difusión radial en doble capa de agar, empleando 13 cepas de microorganismos, extractos etílicos de propóleos fueron evaluados en su capacidad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 65380, *Staphylococcus aureus*

384 ( Hospital San Juan de Dios,1999, Meticilino resistente, MRSA), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12298 *Salmonella cholerae suis* ATCC 14028, *Streptococcus mutans* ATCC 25175 , *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (ESBL), *Escherichia coli* ATCC 31617, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 10145, *Bacillus cereus* ATCC 33018, *Bacillus cereus varmycoides* NCTC2603, *Bordetella bronchiseptica* ATCC 4617, y *Candida albicans* ATCC 10231. Fue evaluado el efecto antimicrobiano de 30 muestras de propóleo de Colombia, involucrando sistemas productivos de 4 zonas biogeográficas (bmh-PM, bh-PM, bs-MB, bh-MB, Según el modelo de Holdridge), se evaluó Extracto Etilico de Propóleo (EEP) en dos concentraciones de solvente al 70% y 96%. Todos los microorganismos fueron susceptibles a alguna de las muestras estudiadas especialmente los microorganismos Gram positivos Los extractos analizados ofrecen resultados bastante variables en cuanto a la actividad antimicrobiana, la cual fue detectada en la mayoría de las muestras de Propóleo aunque algunas muestras resultaran negativas para algunos microorganismos. Entre los microorganismos Gram negativos menor número de muestras son efectivas para inhibir el crecimiento y el efecto. El menor efecto se verifico frente a *Candida albicans* ATCC 10231 (Telmo et al, 2002).

La actividad antimicrobiana de cuatro extractos de propóleos argentinos, cinco colombianos y uno cubano frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175. La actividad bactericida y bacteriostática fue medida por concentración mínima inhibitoria en un rango entre 0.02 y 15 mg/ml. La totalidad de las muestras analizadas presentaron actividad contra *Streptococcus mutans* a concentraciones de 15 a 3.75 mg/ml. Los propóleos que presentaron mayor efecto bactericida fueron el 2 y el 3 (muestras colombianas) luego de 48 horas de incubación. El mejor efecto bacteriostático lo

presentó la muestra 2 (propóleo colombiano) a un periodo de incubación de 24 horas. El 70% de las muestras de propóleo incrementaron su actividad luego de un tiempo de incubación de 48 horas, en relación con el efecto detectado a las 24 horas. A mayor exposición de las bacterias al propóleo, las muestras colombianas mostraron un efecto superior, las argentinas un efecto moderado y las demás muestras (30%), permanecieron estables (Moreno *et al*, 2007).

La actividad antibacteriana in vitro de soluciones de Propóleo Etanólico a diferentes concentración sobre dos bacterias periodontopatógenas frecuentes en la enfermedad Gingivo, donde realizó una prueba piloto con Cepas ATCC *Por phyromona gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum* para comprobar la actividad antibacteriana del propóleo a sus diferentes concentraciones del 5% -15% - 30%. Los resultados mostraron que todas las concentraciones de Propóleo Etanólico presentaron actividad antibacteriana; con promedios para el Propóleo Etanólico al 5% de 17.15 mm, para el Propóleo Etanólico al 15% de 22 mm y en menor diámetro para el Propóleo Etanólico al 30% de 15.9 mm. Donde concluye que el Propóleo Etanólico al 15% presentó una mayor actividad antibacteriana, mientras que al 30% se observó una disminución en esta, debido que a mayores concentraciones de Propóleo este tiende a saturarse y por lo tanto disminuir su actividad antibacteriana (Puente de la Vega, 2010).

La actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y acuosos de propóleos recolectados en la Huasteca Potosina, en México. Se usaron cepas de microorganismos Gram negativos: *Escherichia coli*, *Salmonella Typhi* y *klebsiella pneumoniae*; y microorganismos Gram positivos: *Staphylococcus aureus*,

*Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus agalactiae*. La concentración mínima bactericida (CMB) de cada extracto se determinó con el método de dilución en tubo. La CMB del extracto etanólico fue 0.93 mg ml<sup>-1</sup> para las Gram positivas y 7.5 mg ml<sup>-1</sup> para las Gram negativas; en el extracto acuoso fue 20 mg ml<sup>-1</sup> para Gram positivas y 30 mg ml<sup>-1</sup> para Gram negativas. Los extractos etanólicos del propóleo tienen una actividad antibacteriana significativamente mayor que los extractos acuosos, y esta actividad depende de su procedencia y de la especie bacteriana evaluada (María *et al*, 2011).

## 2.2 Bases Teóricas.

### 2.2.1 Propóleo.

El propóleo es una sustancia natural elaborada por las abejas melíferas (*Apis mellifera*), a partir de los exudados de las cortezas y diversos tejidos de las plantas (Gómez *et al*, 2006). En nuestro país, tenemos una infinidad de plantas que poseen flores, como son las del palto (*Persea americana*), alfalfa (*Medicago sativa*), manzano (*Malus sylvestris*), naranjo (*Citrus aurantium*), algarrobo (*Ceratonia ciliqua*), melocotón (*Prunus persica*), diente de león (*Taraxacum officinale* Weben), eucalipto (*Eucalyptus sp*) (MINAG, 2010). Los materiales colectados son triturados, humedecidos y mezclados con la cera producida por las glándulas cereras y finalmente son transportados hacia la colmena. En estado fresco es resinoso, y cuando ha permanecido durante más de cinco meses en la colmena presenta una estructura quebradiza.

El propóleo se elabora con fines defensivos y satisface alguna de las siguientes funciones: mantener la colmena libre de bacterias y hongos patógenos y actuar como soporte estructural para cubrir rendijas y agujeros con el fin de regular la temperatura del interior de la colmena y evitar la entrada de otros organismos. Al interior de las colmenas los cadáveres de los insectos y pequeños vertebrados intrusos se momifican con propóleo, evitando de esta forma la proliferación de enfermedades infecciosas (Martínez, 2009).

### 2.2.2 Composición Química.

La composición química es insuficientemente conocida todavía. Es una resina de color verde oscuro o carmelita con un agradable sabor de flores de álamo, miel, cera y vainilla, pero también puede tener un sabor amargo (Lemourt, 2007). Contiene una amplia variedad de compuestos químicos; se han identificado más de 300, tales como polifenoles (flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres, aldehídos, alcoholes y cetonas fenólicas), terpenoides, esteroides aminoácidos, y compuestos inorgánicos. Sin embargo, la composición de este producto de la colmena es altamente variable y dependiente de la flora local en el sitio de recolección (De Castro, 2001).

El grupo más importante de compuestos encontrado en propóleo son los denominados fenoles, los cuales, constituyen más del 50% del peso total. Las propiedades médicas del propóleo son atribuidas principalmente a la

presencia de estas sustancias. Más aún, la literatura apunta que algunas de las actividades pueden ser fuertemente relacionadas a los flavonoides, el principal compuesto fenólico del propóleo (Brushi *et al*, 2003).

En líneas generales encontraremos en el propóleo:

- Cera: siempre estará íntimamente mezclada en proporciones relativamente altas (20-30%).
- Resinas y bálsamos aromáticos (40-50%).
- Aceites esenciales (5-10%).
- Polen (4-5%).
- Mezclas mecánicas (tierra y cenizas) (10-30%).

Esto parece ser agregado por las abejas para darle mayor consistencia al producto. El análisis químico del propóleo ha arrojado la presencia de 19 sustancias simples (micro elementos), primordialmente en forma de radicales libres o asociados a formas proteicas, estos son: Aluminio, cobalto, silicio, magnesio, cobre, bario, vanadio, litio, cromo, bismuto, plata, potasio, magnesio, estroncio, calcio, hierro, níquel y zing. De estos microelementos se encuentran en la mayoría, solo trazas, principalmente entre las mezclas mecánicas y los gránulos. La cera y las mezclas mecánicas presentes en el propóleo no tienen actividad terapéutica probada y constituyen en una muestra de propóleos, normalmente alrededor del 50%; el resto corresponderá a la parte biológicamente activa, fracción que se relaciona con los polifenoles de ácidos aromáticos que constituyen los 2/3 de esta cantidad (Lemourt, 2007).

### 2.2.3 Mecanismo de Acción.

El mecanismo de acción del propóleo como agente antibacteriano es realizado por los flavonoides y los compuestos cinámicos que son evidentes en esta sustancia (Neacato, 2005), los cuales actúan como alteradores del potencial de membrana de las bacterias, haciendo que este se disipe y que la bacteria pierda la capacidad de sintetizar ATP, inhibiendo su motilidad e impidiendo el desarrollo de la infección y la patogénesis del microorganismo. Los flavonoides del propóleo hacen interferencia en el metabolismo bacteriano ligando metalo enzimas, como las fosfatasas e inhibiendo algunas de las enzimas que pueden hidrolizar la red de proteoglicanos. Todos los agentes infecciosos, pueden ser eliminados a través del efecto inmuno estimulante de los flavonoides. Además de destruir las células bacterianas y micóticas, contrarrestan el efecto de la propagación de las toxinas bacterianas. Esta condición, favorece la inmovilización y encapsulación de los agentes infecciosos, los cuales serán descompuestos gradualmente por los procesos de restauración y limpieza de los tejidos (Muñoz *et al*, 2011).

La acción antibacteriana del propóleos utiliza varios mecanismos, tales como la formación de complejos streptocócicos pseudomulticelulares, desorganización del citoplasma, de la membrana plasmática, y de la pared celular, bacteriolisis parcial, e inhibición de la síntesis de proteínas. Además se observó una inhibición de la división celular en presencia de propolis, y este hecho sugirió que el propóleos podría actuar inhibiendo



la replicación del DNA a través de la RNA polimerasa e indirectamente afectando la división celular (Takaisikikuni y Schilcher, 1994).

#### 2.2.4 Composición según zona Geográfica.

Se ha demostrado químicamente que los exudados de los árboles de tipo Poplar (*Populus alba*), son el principal recurso de propolis de zonas con clima mediterráneo como la zona norte de Europa, Sudamérica, y oeste de Asia (China). Menos comúnmente, en otras partes del mundo, especies como Bétula, Ulmus, Pinus, Quercus, Sáliz, y Acacia son utilizadas como recurso para el propolis. Se ha demostrado además, que la composición química del género Poplar (*Populus*) incluye principalmente muchos tipos de flavonoides, flavonas y fenoles (Popova *et al*, 2005). A diferencia de los anteriores, en países con clima tropical como Brasil los principales componentes del propóleos son, terpenoides y prenilados, los cuales derivan de ácidos cumarínicos. Esta diferencia ha sido explicada por el diferente origen vegetal de este propolis, el cual, pertenece principalmente al género *Baccharis sp* (Marcucci y Bankova, 1999).

##### 2.2.4.1 Los Flavonoides.

Los Flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes como los rayos ultravioleta y son sintetizados a partir del aminoácido

fenilalanina, que generalmente exhiben brillantes colores como el de los pétalos de las flores, se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, en las plantas superiores y especialmente en aquellas con sistema vascular. Se encuentran en las partes aéreas, en los capullos y hojas jóvenes. Son compuestos fenólicos, responsables de coloración de las flores y de ciertas frutas. La mayoría de las veces emiten fluorescencia cuando son excitados por la luz UV, y se localizan en las células de las plantas verdes. Los flavonoides son usados por los botánicos para clasificación taxonómica. Ellos regulan el crecimiento de las plantas e influyen en otras células biológicas de diversas maneras. Los flavonoides inhiben o destruyen muchas especies bacterianas, inhiben importantes enzimas virales, tales como la transcriptasa reversa y otras diversas proteasas, y además, destruyen algunos importantes protozoos. Poseen actividad antialérgica, antiinflamatoria, antioxidante, antimutagénica y moduladora de actividad enzimática. Además, se puede decir que aportan grandes beneficios para la salud al actuar como agentes quimiopreventivos en cáncer y prevención de ataques al corazón (Havsteen, 2002).

TABLA N° 1. FLAVONOIDES PRESENTES EN EL PROPÓLEO.

GRUPO	COMPUESTO		
Flavonoles	Quercetina	Galangina	Fisetina
Flavononas	Pinocembrina	Naringenina	Herperidina
Flavonas	Apigenina	Acacetina	Crisina

Fuente: Viuda *et al*, 2008.



## Flavonas.

Las flavonas son amarillas y pueden estar en algunas flores, como en la primula, dándoles un color amarillo a sus pétalos, o en frutos, como en la piel de las uvas, son las responsables del color amarillento de los vinos blancos. Hay tres flavonas importantes: la tricetina, presente en el polen de algunas mirtáceas, y también en las podocarpáceas (*Podocarpus* spp.); apigenina, presente en muchas plantas como la camomila, (*Matricariarecutita*) o el espino blanco (*Crataegus laevigata*), da un color marrón marfileño a las flores si se presenta sola; y luteolina, de color amarillo, que incluso sirve para teñir lana y otros tejidos (Castillo *et al*, 2009).

## Flavonoles.

Los flavonoles suelen ser incoloros o amarillos y se encuentran en las hojas y en muchas flores. Los más importantes son tres: quercetina, es el flavonol amarillo del polen de muchas fagáceas (*Quercus* sp.); miricetina, presente en la uva; y kaempferol, está presente en las inflorescencias y las protege de la luz ultravioleta. La fisetina es un flavonol que se extrae de la planta del género *Amphipterygium*. Los flavonoles y las flavonas se unen a azúcares, preferentemente a la posición C3 y con menor frecuencia al C7 del anillo A, de forma que estos compuestos se encuentran comúnmente como O - glicósidos, siendo la D-glucosa el residuo azúcar más frecuente. Otros residuos de

azúcares son la D-galactosa, la L- ramnosa, la L-arabinosa, la D-xilosa, así como el ácido D-glucurónico (Castillo *et al*, 2009). La galangina otro de los componentes, presenta actividad antimutagénica, antioxidante, secuestrador de radicales libres y modulador de actividad de enzimas metabólicas, pero se le destaca principalmente por su capacidad antígenotóxica como un potente agente quimioprotector frente al cáncer. Además posee actividad antibacteriana (Jin *et al*, 2005).

#### Flavanomas.

Las flavanonas son precursores de otros flavonoides más complejos, pero se encuentran como tales en altas concentraciones en los cítricos. Las más importantes son naringenina, presente en el zumo de naranja, limón o pomelo, dándole un sabor amargo; liquiritigenina, presente en el regaliz; y eriodictiol, se presenta en el guisante actuando como quimio atrayente para interactuar con agrobacterias (Castillo *et al*, 2009).

#### 2.2.5 Propiedades Antimicrobianas.

Numerosas propiedades biológicas se han asociado con el propóleo, incluyendo la antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiinflamatoria, antitumoral, antioxidante. Se pueden distinguir innumerables usos para el propóleo en diferentes industrias: farmacéutica (tanto en medicina humana como medicina veterinaria), agrícola, cosmética, y alimentaria (Matsuka, 2000).

a. Antibacteriana.

La actividad antimicrobiana del propóleo estudiada frente a bacterias de interés en medicina, ha mostrado resultados alentadores *in vitro* e *in vivo*, ya que inhibió el crecimiento de bacterias aerobias y anaerobias, tanto Gram positivo como Gram negativo. Sin embargo, se ha señalado que el efecto del propóleo en contra de bacterias Gram positivo y levaduras, es mayor que en bacterias Gram negativas (Drago *et al*, 2000).

b. Antiviral.

Los flavonoides revelan una actividad antiviral bien definida, en particular la apigenina, acacetina y pectolinarigenina que están presentes en las yemas del álamo y del abedul (Neacato, 2005). Los flavonoides del propóleo inducen la producción de Interferones (INFs), estas sustancias tienen varios efectos antivirales, incluyendo el fortalecimiento de la membrana celular, la inducción de las nucleasas que destruyen el genoma viral y la modificación del patrón de la fosforilación del factor de iniciación eucariótico, el cual influye en la transducción de las proteínas y detiene toda la biosíntesis de estas, incluyendo la de los virus (Muñoz *et al*, 2011). También se ha evaluado la actividad antiviral de propóleos sobre ADN y ARN de virus de herpes simples tipo I y tipo II, adenovirus tipo II, virus de estomatitis vesicular y poliovirus tipo II. Encontrando que los propóleos son capaces de inhibir la propagación de virus herpes y

poliovirus, mostrando menor efecto sobre el virus de estomatitis vesicular y adenovirus (Silici y Kutluca, 2005).

c. Antifúngica.

En cuanto a la actividad antifúngica y antiviral, se ha reportado que propóleos de distintas zonas geográficas poseen actividad contra *Candida albicans* y el virus de la influenza aviar. La actividad observada en las muestras de propóleos fue similar a pesar de las diferencias en su composición (Drago *et al*, 2000).

d. Anti-inflamatorio.

El tratamiento del dolor de garganta y de una fiebre, son un ejemplo clásico de una cura rápida provocada por los flavonoides. Tanto el dolor, como la fiebre, son el resultado de señales químicas transportadas por vía sanguínea hacia los receptores específicos localizados en las neuronas del cerebro, éste órgano emite la respuesta según el tipo de Prostaglandinas, las cuales tienen la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica. Los compuestos encargados de liberar la alarma son los eicosanoides, formados a partir del ácido araquidónico por una serie de enzimas, especialmente, la ciclooxigenasa, estas enzimas son inhibidas por los flavonoides. La membrana de la célula lesionada activa la fosfolipasa A2 y libera ácido araquidónico, el cual da origen a diversos eicosanoides capaces de inducir la expresión de los genes que codifican

elastasa, colagenasa y otras proteasas. Estas enzimas enclavan proteínas estructurales de la célula en los péptidos, que son muy grandes para atravesar la membrana plasmática, pero suficientemente solubles para extraer agua por osmosis a través de la membrana celular desintegrada, de esta manera hay una lisis celular, trayendo como consecuencia la inflamación del tejido, al estudiar *in vitro* los macrófagos peritoneales de murinos, durante la inflamación aguda *in vivo*, se observó, que el propóleo y su componente activo el éster del ácido fenetil-cafeico, inhiben la producción de eicosanoides por parte de los macrófagos. La quercetina, otro flavonoide del propóleo, inhibe la vía de la lipooxigenasa y que en altas concentraciones este compuesto polifenólico bloquea la vía de la ciclooxigenasa. Pero es difícil predecir cualitativamente la forma como actúa el propóleo en la cascada del ácido araquidónico, tanto *in vitro*, como *in vivo* (Muñoz *et al*, 2011).

e. **Inmunomodulador.**

Los flavonoides del propóleo tienen la capacidad específica de activar los linfocitos T, citotóxicos y las células natural asesinas (Muñoz *et al*, 2011), estimula la inmunidad inespecífica y la específica, tanto inmunidad celular (linfocitos T) como la humoral (linfocitos B) (Ramos y Miranda, 2007). Estos reciben el mensaje proveniente de los macrófagos productores de citoquinas e interleucinas y de otras células, que informan sobre la presencia de antígenos en el cuerpo, los linfocitos T actúan como segunda línea de defensa del sistema inmune, actuando



contra células invasoras, como las cancerígenas, los virus y las células bacterianas. En el mismo sentido, consideran que la actividad antitumoral del propóleo y de algunos de sus componentes, está asociada a su acción inmunomoduladora, principalmente, debido al aumento de la inmunidad antitumoral innata, activando los macrófagos, los cuales pueden producir factores solubles que interfieren sobre la célula tumoral o sobre las funciones de otras células inmunes (Muñoz *et al*, 2011). En ratones infectados con el virus influenza tipo A y tratados con propóleos, se constató un aumento de los linfocitos T, un mayor nivel de fagocitosis y una menor mortalidad, en comparación con animales testigo no tratados (Ramos y Miranda, 2007). Se demostraron que ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*, disminuyen la parasitemia al consumir entre 25 y 50 mg de propóleo por kilogramo de peso vivo, sin presentar efectos tóxicos renales ni hepáticos y sugieren que el propóleo podría actuar directamente en las células T, inhibiendo su diferenciación y consecuentemente el desarrollo de la respuesta inmune adquirida (Muñoz *et al*, 2011).

#### 2.2.6 Métodos de extracción de propóleos.

La extracción en un equipo soxhlet industrial de 300 litros durante 56 horas, alternando 8 horas de extracción a 45°C -50 °C y 16 horas de maceración, tomando muestras a las 24 horas, 48 horas y 56 horas. Como solvente se empleó etanol a 70° y 85°. Determinación de sólidos totales: se tomaron 10 ml de las muestras a los tiempos señalados anteriormente

y se colocó en balanza Sartorius hasta peso constante. Finalizada la extracción, se trasvasó el extracto para un tanque colector enchaquetado para su enfriamiento a 10° C. Posteriormente se sometió a un proceso de centrifugación continua hasta 160 rpm y se determinó el propóleo extraído como porcentaje de sólidos en la muestra. El extracto así obtenido se estandarizó a 5 % de sólidos totales para su posterior uso (Martínez *et al*, 2005).

La solución madre de propóleo se prepara de la siguiente manera: 20 gramos de propóleos para 80 ml de alcohol al 70 % para obtener una solución madre, se diluyó por varios días a una temperatura de 37 a 38° hasta disolver totalmente el propóleo en el alcohol (Ortega y Vanegas, 2006).

Así mismo otro autor describe la preparación de la solución madre de la siguiente manera: obtenido el propóleo libre de impurezas se procedió a mezclar en una proporción de: 300g de propóleo, aforando este peso a 1000g con etanol de 96° de uso interno, sin antiséptico (alcohol potable). - Posteriormente se colocó esta mezcla en vidrio, se los recubrió con papel aluminio, de esta manera se aisló la mezcla de la luz del sol. Durante nueve días se procedió a agitar la mezcla durante quince minutos diarios en tres intervalos de cinco minutos cada uno. Se aseguró que el sedimento que quedó pese de 30 a 33% menos del peso inicial de la masa, de esta manera se aseguró la obtención de un extracto etanólico con la mayor concentración posible (Neacato, 2005).

### 2.2.7 Toxicología de Propóleo.

Un pequeño porcentaje de la población es alérgica al propóleo y a los demás productos apícolas (polen, jalea real, miel, veneno). Teniendo esto en consideración es necesario aplicarles a las pacientes pruebas de alergia provocada antes de comenzar cualquier tratamiento con propóleo. Las reacciones alérgicas al propóleo surgen, por lo general, en personas que son alérgicas a las abejas, o a sus picaduras, así como en personas que padecen de algún tipo de problema alérgico sobre todo en la terapia de afecciones del aparato respiratorio y de cavidad oral, pero su campo de aplicación es más extenso ( Neacato , 2005 ).

Múltiples estudios realizados en el mundo han demostrado la buena tolerancia y la inocuidad de este producto natural administrado por vía oral, no lográndose establecer la dosis letal por su alta tolerancia (Ortega, 2006).

El estudio de irritabilidad dérmica se desarrolló en conejos albinos F1 machos, obteniéndose un índice de irritación primario igual a cero, con el cual se clasifica al producto como no irritante (Pérez *et al*, 2003). Su toxicidad a células animales es baja. Muchos profesionales están incrementando el uso de flavonoides puros para tratar muchas importantes enfermedades, debido a su comprobada habilidad de inhibir enzimas específicas, simular algunas hormonas y neurotransmisores, y eliminar radicales libres (Havsteen, 2002).

### 2.2.8 Salmonella en Cuyes.

### 2.2.9 Historia.

El nombre *Salmonella* se debe a Daniel Elmer Salmon un Médico Veterinario quien fue pionero en investigación de enfermedades bacterianas y en inmunología. En 1885 descubre la primera cepa de *Salmonella* del intestino de un cerdo con cólera porcino, después llamado *Salmonella cholerae suis*, solo dos años después del primer aislamiento de *Salmonella* por Gaffky en 1884, quien cultiva el bacilo tifoideo. Se argumenta que este patógeno debe ser llamado *Smithella*, pues fue Theobald Smith el verdadero descubridor del primer miembro de *Salmonella*. Sin embargo, Daniel Elmer Salmon fue el supervisor y quien escribió "*Thebacterium of swine plague*". Al inicio se asoció esta bacteria con la Peste Porcina Clásica (PPC), pero solo 20 años más tarde que se identificó el agente de la PPC. Antes de 1883, existían múltiples especies de *Salmonella* que fueron taxonómicamente aceptadas, sin embargo, como resultado de experimentos que indican un alto grado de ADN similar, todos los aislados de *Salmonella* fueron clasificados en una sola especie, *Salmonella cholerae suis*. Estas especies fueron posteriormente sub clasificadas dentro de 6 subgrupos basados en ADN similar y rango de hospedadores: *entérica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* *indica*. En 1999, Euzéby propuso la designación "*Salmonella entérica*" como un "especie neotipo" y reemplazan a las especies del genero *Salmonella* de *S. cholerae suis* a *S. entérica*.

Existe más de 2500 serotipos, algunos tales como *typhi* y *paratyphi*, están altamente adaptados a humanos y no tienen ningún otro hospedador natural. Otros, tales como serotipo *typhimurium* y *enteritidis*, tienen un amplio rango de hospedadores y pueden infectar una considerable variedad de animales. Algunos, como el serotipo *cholerae suis* (cerdos), serotipo *dublin* (ganado vacuno y teneros) y serotipo *arizonae* (reptiles), son las más altamente adaptadas a especies animales específicas pero ocasionalmente infectan humanos. *Serovar muenchen* fue aislado de 4 de 5 tortugas infectadas intraperitonealmente en duodeno, yeyuno, íleon y ciego. (Arcos *et al*, 2011).

#### 2.2.10 Etiología.

La salmonelosis en cobayos es causada por serotipos del género *Salmonella*. En nuestro país el serotipo que con mayor frecuencia se aísla de órganos de cobayos muertos debido a esta enfermedad, es la *Salmonella enterica, serovar typhimurium*, en porcentajes que superan al 95 % con relación a otros serotipos. Otros serotipos aislados causante de esta enfermedad son: *S. Enteritidis*, *S. Florida*, *S. Bredeney*, *S. Pomona*, *S. Dublin*, *S. Ochiogu*, *S. Limite* (Layme, 2011).

### 2.2.11 Clasificación y Nomenclatura.

El género *Salmonella* se incluye en la familia *Enterobacteriaceae*, orden *Enterobacteriales*. Actualmente este género se divide en sólo dos especies *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*, tomando en cuenta sus características bioquímicas generales, *Salmonella entérica* se divide a su vez en seis subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtebae* *indica* (Figueroa y Verdugo, 2005). Según el esquema clásico de Kauffman-White basado en antígenos somáticos (O), Flagelares (H) y ocasionalmente capsulares (Vi), las *Salmonellas* se clasifican en más de 2500 serotipos. La fórmula antigénica de una cepa se determina mediante el uso de reacciones antígeno anticuerpo y a partir de dicha fórmula se la clasifica en serovar o serotipo (Figueroa y Verdugo, 2005).

### 2.2.12 Descripción del Agente Causal

Las *Salmonellas* son bacilos Gram negativos, no esporulados, con cápsula sólo en el caso de *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi C* y *Salmonella dublín*, son móviles debido a la presencia de flagelos peritricos a excepción de *Salmonella Gallinarum* y *Salmonella Pullorum* (Layme *et al*, 2011). Este se comporta como patógeno intracelular facultativo. Su hábitat es el aparato gastrointestinal de los animales y el hombre, nunca como microbiota normal. Se encuentra asociada a problemas gastrointestinales, septicémicos y aborto gracias a su capacidad de invasión celular y sobrevivencia intrafagocítica (Figueroa y

Verdugo, 2005). Esta bacteria se encuentra como patógena en el tracto gastrointestinal de mamíferos, reptiles, aves e insectos, causando un amplio espectro de enfermedades en el hombre y los animales (Matsuura *et al*, 2010).

### 2.2.13 Características Bioquímicas.

Las *Salmonellas* son bacterias anaerobias facultativas, crecen rápidamente en medios simples, poseen un metabolismo oxidativo y fermentativo, producen ácido y a menudo gas durante la fermentación de la glucosa u otro hidrato de carbono, además casi nunca fermentan lactosa o sacarosa. Entre otras características bioquímicas se encuentran que: reducen los nitratos a nitritos, utilizan citrato como única fuente de carbono, producen ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S), son ureasa y fenilalanina desaminasa negativas. Las *Salmonellas* 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* (Layme *et al*, 2011). La diferenciación entre las especies y subespecies se realiza tomando en cuenta diferentes propiedades bioquímicas. No fermentan la lactosa, excepto *Salmonella cholerae suis subsp. Arizonae* y *Salmonella cholerae suis diarizonae*, fermentan glucosa con producción de gas, no producen Indol, no degradan la urea, descarboxilan lisina y ornitina. Las *Salmonellas* se desarrollan entre 8 y 45°C y a un pH de 4 a 8; no sobreviven a temperaturas mayores de 70° C.

También hubo aislamiento de *salmonella* Lactosa positiva de animales, como cepas de *S. typhimurium* en aves, bovinos, caninos y cerdos, que dieron altas tasas de mortalidad y morbilidad (Layme *et al*, 2011).

#### 2.2.14 Estructura Antigénica.

La estructura antigénica de la *Salmonella* es similar a la de otras enterobacterias, con dos clases de antígenos principales presentes: Antígenos (O) somáticos y Antígenos (H) flagelares. En algunas cepas se halla un tercer antígeno que se relaciona con la virulencia, este antígeno se denomina Antígeno (Vi) (*Serovar typhi, dublin y paratyphi C*) (Zúñiga, 2006). Estos son usados para serotipificar según el esquema de Kauffman - White.

- ANTIGENO O. Nombrado del alemán *ohnehauch*, que significa sin movimiento, están compuestos por complejos de fosfolípidos y polisacáridos. Son los antígenos de la pared bacteriana. Son termoestables y alcohol-resistente.

- ANTIGENO H. Su nombre deriva del alemán *hauch*, por el halo producido en un medio de cultivo a raíz del movimiento; según este, las *Salmonellas* pueden ser monofásicas, cuando contienen siempre el mismo antígeno flagelar, generalmente específico (*S. typhi, S. paratyphi*), o difásicas. En estos, el antígeno flagelar puede aparecer de forma alternativa en Fase I, llamada también específica y que es característica de cada serotipo o en fase 2, que es menos específica. Una cepa de *Salmonella* solo expresa un tipo de antígeno flagelar en un

determinado momento. Está constituido por una proteína termolábil, la flagelina, cuya composición de aminoácidos es constante para un tipo antigénico determinado. El sistema está de forma que una recombinasa, codificada por el gen *hin*, cataliza la inversión de un fragmento de 993 pb que contiene el promotor del operón *fljBA*. En un sentido el promotor dirige la transcripción de los genes *fljA* y *fljB*, que codifican para la flagelina de segunda clase y para un represor del gen *fliC* (que codifica la flagelina de primera clase). En este caso se expresará la flagelina de segunda clase. Cuando el fragmento se invierte, los genes *fljA* y *fljB* no se expresan, la expresión *fliC* no se reprime y la bacteria produce el antígeno flagelar de primera fase. Esto le ofrece ventajas a las bacterias. Los organismos de una determinada población que consigan cambiar de fase durante el proceso de infección podrán sobrevivir a la respuesta inmune del hospedador ya que, si este se encuentra produciendo anticuerpos frente a la flagelina H1, aquellas bacterias que cambien de fase y produzcan flagelina H2 podrán escapar a la acción de los anticuerpos específicos frente a la primera.

- ANTIGENO Vi. Llamado así por ser el que determina la virulencia de la bacteria, ya que confiere resistencia contra la respuesta inmune celular y humoral del huésped (Zuñiga, 2006), la expresión de este factor depende de al menos dos genes (*ViA* + *ViB*), deben existir ambos en la bacteria para que dicha expresión tenga lugar (Arcos y Mora, 2011).

## 2.2.15 Epidemiología.

### a. Transmisión.

Las *Salmonellas* se propagan por contacto directo e indirecto. Los animales infectados, fuentes de las bacteria, excretan el microbio en cantidades considerables en heces y orina, contaminando así el ambiente que los rodea, principalmente el alimento. Los animales susceptibles se infectan por vía oral al consumir agua o alimento contaminado con material fecal, también se ha observado que la vía aerógena, conjuntival y heridas abiertas constituyen puertas de ingreso para la bacteria (Radostits *et al*, 2002). El equipo e implementos de trabajo empleados en las granjas también juegan un papel importante en la diseminación de la infección. La transmisión vertical se observa en aves, ocurriendo infecciones trans ováricas especialmente con *S. Pullorum*, *S. Gallinarum*, *S. Typhimurium* y *S. Thompson* (Flores, 1981).

### b. Factores de Riesgo de la infección.

La forma más común de introducir la infección en una explotación es a través del alimento, dándose en este caso casi siempre una contaminación durante o tras el proceso de obtención y preparación de estos, aunque la mayoría de piensos pueden encontrarse contaminados, sólo deben considerarse sospechosos determinados piensos o determinados componentes de ellos, entre estos están la hierba fresca y el heno,

principalmente aquellas que provienen de zonas regadas con aguas residuales no tratadas (Stellmacher, 1981).

Los concentrados proteicos de origen animal o vegetal figuran también como sospechosos, muchos de los cuales; como la harina de pescado, carne y huevo pueden contener numerosos serotipos de *Salmonellas*, también la leche entera y la leche en polvo no correctamente preparadas pueden producir infecciones, sobre todo en animales jóvenes (Flores, 1981; Stellmacher, 1981). También son importantes de mencionar las aguas de bebida, especialmente aquellos cursos de agua contaminados con aguas residuales y las aguas estancadas que permanecen así la mayor parte del tiempo (Stellmacher, 1981; Radostits *et al*, 2002).

La introducción de animales portadores en explotaciones pecuarias libres de salmonelosis, es un mecanismo comúnmente involucrado en la diseminación de la infección, esto se puede observar en la ganadería bovina con la introducción de terneros excedentes de granjas de leche, los cuales se venden en ferias ganaderas (Radostits *et al*, 2002).

Los roedores como ratas y ratones tienen un papel importante como transmisores de *Salmonellas*, estos animales pueden llevar la bacteria en el tracto intestinal, frecuentemente sin mostrar signos de enfermedad, contaminando el ambiente y el alimento. Se ha encontrado una alta prevalencia de *Salmonella entérica* serotipo *Enteritidis* en ratones de galpones de aves (Garber *et al*, 2003; Meerburg y Kijlstra, 2007).

Otras formas menos frecuentes de contaminación incluyen insectos (moscas, cucarachas etc.) aves silvestres y larvas de nemátodos previamente infectados por *Salmonella*. Los animales de sangre fría como tortugas, ranas, culebras y lagartos, frecuentemente son portadores y excretores de *Salmonella* (Radostits *et al*, 2002; Villena *et al*, 2008). También se ha demostrado la transmisión de *S. typhimurium* a través del aire. Encontrándose en diversos estudios que la bacteria puede sobrevivir en el aire el tiempo suficiente para representar un peligro de propagación (Flores, 1981; Stellmacher, 1981; Radostits *et al*, 2002).

Las *Salmonellas* son relativamente resistentes a ciertos factores medio ambientales, pueden resistir a la deshidratación durante periodos muy prolongados, se desarrollan en temperaturas de 8 y 45 °C, con concentraciones hídricas de hasta 0.94 y en intervalos de pH de 4 – 8. También son capaces de proliferar en medios con escasez o ausencia total de oxígeno (Radostits *et al*, 2002; Acha y Szyfres, 2003).

Las bacterias en el medio ambiente pueden sobrevivir un promedio de 14 meses, en orina pura puede sobrevivir hasta 5 días pero combinada con heces se ha demostrado que puede sobrevivir hasta 6 años. La bacteria es sensible al calor y no sobrevive a temperaturas superiores a los 70 °C. La pasteurización a 71.1 °C durante 15 segundos es suficiente para destruir las *Salmonellas* en la leche (Radostits *et al*, 2002; Acha y Szyfres, 2003). Un grupo de factores que parece tener una gran influencia sobre la presencia de *Salmonella* en las explotaciones son las características de

producción y manejo de estas, describieron un aumento de la seroprevalencia relacionado con el tamaño de la explotación, de hecho este hallazgo se relacionó con las malas prácticas de limpieza y desinfección realizadas en las explotaciones grandes. Otros factores como animales sometidos a largos viajes, alimentación deficiente y alojados en locales inadecuados influyen en la presencia de Salmonelosis (Flores, 1981; Mejía, 2003). Una de las características epidemiológicas más importantes de las Salmonelosis es su persistencia en los animales. Cuando un animal se infecta con *S. dublin* puede convertirse en un caso clínico o en un portador activo, eliminando constante o intermitentemente bacterias por heces. También se puede convertir en un portador latente en el que la infección persiste en ganglios linfáticos o amígdalas, debido a la capacidad de la bacteria de sobrevivir en fagolisosomas de los macrófagos, sin eliminar *Salmonellas* por heces (Radostits *et al*, 2002). Otra forma de infección es el portador pasivo, en el cual el animal constantemente se infecta de pastos o del suelo del establo, pero la bacteria no invade los tejidos, por lo que la enfermedad desaparece si se aparta el animal del medio contaminado. La importancia de los portadores latentes radica en que pueden convertirse en portadores activos o incluso en casos clínicos si se encuentran sometidos a estrés. Es entonces cuando el propio ganado se convierte en el reservorio de la infección durante largos periodos. Un problema importante a la hora de controlar la infección por *S. dublin* es que los portadores latentes de la enfermedad no se identifican fácilmente mediante cultivo de heces o mediante pruebas serológicas (Radostits *et al*, 2002).

c. Factores de riesgo que predisponen a la enfermedad sintomática.

La infección por *Salmonella* no es una causa suficiente para contraer una Salmonelosis clínica, a excepción de los animales recién nacidos, es por ello que debemos considerar distintos factores, del hospedero, del agente o del entorno, los cuales desencadenan la enfermedad en animales infectados (Stellmacher, 1981; Quinn *et al*, 2002; Radostits *et al*, 2002).

Se acepta que para que la Salmonelosis curse como enfermedad, es necesario la intervención de algún factor desencadenante que genere “estrés” en el animal, como el transporte o movimiento de los animales dentro del criadero o hacia el exterior, el mismo que se acentúa cuando esta práctica se realice en forma inadecuada (Ramírez, 1972; Radostits *et al*, 2002).

La falta de alimentos y de agua es un factor de riesgo frecuente, generalmente en bóvidos como resultado del transporte en distancias largas. En ovejas la enfermedad se suele asociar con la falta de alimentos cuando se agrupan los animales para la vacunación, tratamientos antiparasitarios o en desplazamientos largos. Los cambios bruscos en la dieta, los cuales modifican los componentes del tubo gastrointestinal, como por ejemplo un elevado contenido en ácidos grasos volátiles y un pH bajo, como el que existen cuando un rumiante ha comido abundantemente, es desfavorable para el paso de las *Salmonellas* a través del proventrículo (Radostits *et al*, 2002).

El encierro de muchos animales jóvenes en áreas limitadas conduce a grados elevados de contaminación ambiental y una difusión rápida de la infección, también en animales adultos los brotes son más comunes cuando están estrechamente confinados. Otros factores estresantes son: la preñez, el parto, los periodos de lactación, las vacunaciones con vacunas vivas que producen reacciones sistémicas (Jubb *et al*, 1990; Radostits *et al*, 2002).

La edad es claramente una susceptibilidad a la enfermedad clínica y también algo a la infección. Es menos probable que los animales adultos sufran de infecciones generalizadas o septicémicas como lo hacen los jóvenes. Cuando los animales adultos se infectan es muy probable que ellos se liberen de la enfermedad o que se vuelvan portadores asintomáticos por periodos indefinidos. La mayor susceptibilidad de los animales jóvenes se explica solo parcialmente por su incapacidad de obtener anticuerpos específicos del calostro; no hay ninguna explicación razonable de porqué los animales jóvenes son más susceptibles que los adultos (Jubb *et al*, 1990).

#### 2.2.16 Patogenia.

Durante el proceso infeccioso de *Salmonella* se presenta una interacción hospedero microorganismo, el cual desencadena la enfermedad sintomática si se presentan las condiciones adecuadas. El primer requisito para que se produzca la infección del hospedero por parte de la bacteria



es que se encuentre en las cantidades suficientes; generalmente se requiere una dosis infectiva mínima de  $10^7$  a  $10^9$  bacterias (Layme *et al*, 2011).

Luego de la ingestión oral la bacteria experimenta severos cambios medio ambientales como son: pH ácido, aumento de temperatura, baja tensión de oxígeno y alta osmolaridad. La *Salmonella* responde a estos cambios modulando la expresión de sus genes, para luego colonizar el intestino delgado principalmente a nivel del íleon distal y ciego. Después que la bacteria entra al hospedero y antes de invadir cualquier tipo de célula, la bacteria debe encontrar y adherirse a uno o más tipos de células del tejido intestinal o bien a la matriz extracelular, en caso de tejido dañado, para esto la bacteria cuenta con estructuras llamadas adhesinas, las cuales permiten reconocer moléculas presentes en las células del hospedero llamadas receptores, estos receptores determinan la especificidad del tejido así como la colonización y persistencia bacteriana. De esta manera, esta unión adhesina-receptor determinan los hospederos y el órgano tropismo de la bacteria (Figuroa y Verdugo, 2005). Algunos mecanismos de adhesión pueden involucrar varios tipos de fimbrias o Pili, cuatro de las cuales están genéticamente definidos. Estos incluyen a Fimbria tipo 1 (fim), fimbria codificada por plásmidos (pef), fimbria polar larga (lpf) y fimbria agregativa delgada (agf/csg), algunos estudios sugieren que estas fimbrias tienen un tropismo específico por ciertos tipos celulares o por células de especies animales particulares. Las adhesinas también tienen la capacidad de activar a



linfocitos B y neutrófilos, lo que resulta en una variedad de respuestas biológicas incluyendo proliferación celular y secreción de citocinas (Darwin y Miller, 1999; Sánchez *et al*, 2003; Figueroa y Verdugo, 2005).

La *Salmonella* inicia la invasión en el hospedero a través de enterocitos y células M, células epiteliales especializadas que recubren los nódulos linfáticos de las placas de Peyer del íleon. Las células M constituyen una puerta de entrada ideal para las enterobacterias debido a la ausencia del borde en cepillo así como de glucocálix. La *Salmonella* es capaz de entrar y sobrevivir dentro de las células eucarióticas, esta técnica de invasión presumiblemente asegura un nicho celular protegido para que el microbio se replique o persista (Darwin y Miller, 1999; Santos *et al*, 2003; Figueroa y Verdugo, 2005; Tükel *et al*, 2006).

La *Salmonella* es hábil en explotar las funciones celulares preexistentes del hospedero y usar estas funciones para su propio beneficio, característica de patogenicidad esencial de la bacteria. La *Salmonella* engaña a la célula hospedera en una interacción bioquímica denominada de dos vías o conversación cruzada, lo cual conduce a la respuesta tanto de la bacteria como de la célula hospedera (Sánchez *et al.*, 2003). Las células del hospedero son invadidas por un mecanismo conocido como disparo (*trigger*). La bacteria envía señales a las células epiteliales que inducen rearrreglos del citoesqueleto dando lugar a la formación de ondulamiento (*ruffling*) en su superficie, como respuesta al contacto (Darwin y Miller, 1999; Figueroa y Verdugo, 2005).

La *Salmonella* responde a la presencia de la célula hospedera con la activación de un sistema especializado de secreción de proteínas llamado tipo III (SSTIII) o dependiente de contacto. Este sistema permite secretar e inyectar directamente proteínas de patogenicidad en el citosol de la célula hospedera eucariótica, las proteínas inyectadas frecuentemente reensamblan factores eucarióticos con funcionamiento de señales de transducción y son capaces de interferir con vías de señalización de la célula hospedera.

La redirección de señales de transducción resulta en la reorganización del citoesqueleto de la célula hospedera, estableciendo nichos subcelulares para la colonización bacteriana y facilitando una estrategia patogénica altamente adaptada de líneas de comunicación con la defensa del hospedero (Sánchez y Cardona, 2003; Santos *et al*, 2003; Figueroa y Verdugo, 2005).

El sistema de secreción tipo III dirige la exportación de varias proteínas como ATP asos, proteínas regulatorias y estructurales, formadoras de canales, lipoproteínas, moléculas efectoras para células hospederas, chaperonas etc. Algunas de estas proteínas transitoriamente ensamblan una estructura apendicular llamada invasoma, mientras otras son translocadas en la célula hospedera donde ellas activan o interfieren con las vías de transducción de señales célula-hospedero conduciendo a una variedad de respuestas (Ohl *et al*, 2001; Sánchez y Cardona, 2003; Santos *et al*, 2003).

La respuesta a la bacteria es dependiente del tipo de célula infectada. En células no fagocíticas *Salmonella* induce cambios en la membrana plasmática de la célula hospedera, y profundos rearrreglos del citoesqueleto que se parecen estructuralmente al ruffling de membrana inducido por varios agonistas, como hormonas, factores de crecimiento, activación de oncogenes celulares, etc. El ruffling de membrana es acompañado por micropinocitosis que en últimas conduce a la internalización bacteriana. En macrófagos la *Salmonella* induce efectos citotóxicos caracterizados inicialmente por una rápida inhibición de ruffling de membrana y micropinocitosis, seguido por la muerte celular apoptótica (Sánchez y Cardona, 2003). Se reconocen varias proteínas efectoras involucradas en los rearrreglos del citoesqueleto: SipA, SopE, SopE2 y SopB. La proteína SipA se une a la actina e inhibe la despolimerización de F-actina y activa T-plasmina. SopE se comporta como GEF (guanine exchange factor) en las proteínas RhoGTPasas: CDC42 y Rac induciendo ruffling de la membrana, que permite la internación de *Salmonella*. La proteína SopE2 activa a CDC42, la cual actúa con la familia de proteínas del síndrome de Wiskott-Aldrich (WASP) para activar el complejo Arp2/3, compuesto de 7 subunidades, incluyendo 2 proteínas relacionadas con actina y la proteína p41-Arc. Este complejo inicia la polimerización de actina y ramifica filamentos de actina. SopB tiene actividad de inositol fosfato fosfatasa, también reorganiza el citoesqueleto de actina (Figuroa y Verdugo, 2005).

Existen diferentes propuestas sobre las vías de señalización inducidas por proteínas inyectadas por *Salmonella* que provocan rearrreglos del citoesqueleto de la célula eucariótica e internalización de la bacteria. Una vía es la propuesta por Brett Finlay y colaboradores quienes proponen que la *Salmonella* inyecta en la célula eucariótica las proteínas SopE, SptP transportados por el sistema de secreción tipo II (Sánchez y Cardona, 2003).

La actuación del SSTIII y las proteínas efectoras conduce a la liberación por parte de las células epiteliales, de citoquinas CXC, como la interleucina 8 (IL8), que ejercen una acción quimiotáctica sobre polimorfonucleares neutrófilos (PMN), importantes agentes defensivos de la respuesta inmune inespecífica del hospedador. Una vez invadido el epitelio intestinal, las bacterias se traslocan rápidamente, alcanzando la lámina propia. Aquí su reconocimiento por receptores localizados tanto en la superficie de macrófagos como en la cara interna de las células intestinales, origina la producción de más citoquinas CXC, por ambos tipos de células (Raffatellu *et al*, 2006). Esto provoca la afluencia masiva PMN, señal de identidad de la diarrea inflamatoria causada por los serotipos no específicos de huésped. Los neutrófilos fagocitan a las bacterias, destruyéndola eficazmente (Giannella, 1979; Raffatellu *et al*, 2006). Cabe mencionar que la producción de diarrea por parte de *Salmonella* es un fenómeno complejo que involucran diversos factores de virulencia; demostrándose, además de la inflamación, la participación de

una enterotoxina similar a las enterotoxinas de *Vibrio cholerae* y toxina termolabil de *E. coli* (Zhang *et al*, 2003; Figueroa y Verdugo, 2005).

*Salmonella entérica* por el contrario, posee la capacidad de sobrevivir en el interior de los macrófagos, gracias a la actuación de un segundo SSTIII, codificado por la isla de patogenicidad SPI2, y de otros factores de virulencia. Sin embargo, los macrófagos que han reconocido y fagocitado a las bacterias también liberan IL12, responsable del inicio de la respuesta inmune específica. Esta interleucina actúa sobre los linfocitos T de tipo Th1, que a su vez liberan sustancias, como el interferón  $\gamma$ , que activa a macrófagos, adquiriendo estos la capacidad de destruir a las bacterias que han sobrevivido en su interior (Raffatellu *et al*, 2006).

Las infecciones intestinales por *Salmonella* pueden evolucionar hacia infecciones extraintestinales, esto se relaciona con la incapacidad de los macrófagos de destruir a las bacterias ingeridas. *Salmonella entérica* se dispersa por el organismo, probablemente transportadas por fagocitos, inicialmente por vía linfática y después por vía sanguínea originando así una bacteriemia que puede ser subclínica o sintomática, con riesgo elevado de evolucionar a septicemia (Jubb *et al*, 1990; Benenson *et al*, 2002).

La septicemia puede transcurrir como infección no localizada, que se manifiesta con fiebre, cuyos síntomas pueden persistir varias semanas e

incluso degenerar en shock séptico, debido a la actuación de la endotoxina a nivel del sistema circulatorio. Además, al diseminarse por el organismo, *S. entérica* puede llegar a colonizar diversos órganos, provocando infecciones locales (Jubb *et al*, 1990; Benenson *et al*, 2002).

#### 2.2.17 Factores de Virulencia.

Para *Salmonella sp.* Se conocen varios factores de virulencia, uno de ellos es la producción de tres toxinas: las enterotoxinas que son sustancias liberadas al intestino y que ocasionan síntomas gastrointestinales como cólico y diarrea, las endotoxinas que hacen parte de la membrana externa de la bacteria y cuya actividad biológica está asociada con los lipopolisacaridos (LPS) y por último, las citotoxinas que están asociadas a la superficie celular, las cuales inhiben la síntesis proteica en la célula hospedadora y pueden estar implicadas en la adherencia a las células epiteliales, constituyendo esta última un segundo factor de virulencia de *Salmonella sp.* También se ha descrito en algunas subespecies de *Salmonella (S. typhimurium)* la formación de pseudópodos en la célula hospedadora, lo que trae como resultado la internalización de la bacteria en vesículas endocíticas; adicionalmente, la producción de adhesinas que incluyen fimbrias codificadas por el plásmido de virulencia, permiten la unión de la bacteria a las microvellosidades de los enterocitos, fimbrias polares largas que se encargan de la unión de la bacteria a las placas de peyer, y las fimbrias agregativas delgadas llamadas curli que también pueden estar implicadas

en la unión a las vellosidades de los enterocitos. Otros factores relacionados con la adherencia son los polisacáridos de superficie celular (o) y el antígeno vi, un polisacárido compuesto de ácido N – acetilglucosaminurónico el cual ayuda a prevenir la fagocitosis y puede proteger la bacteria de las formas reactivas de oxígeno al interior de los fagocitos, las cepas negativas para el antígeno vi son menos infecciosas y virulentas que las positivas para este antígeno. La respuesta de tolerancia al ácido, es otro aspecto importante de la virulencia de la *Salmonella sp* lo que le permite a la bacteria atravesar el ambiente ácido del estómago, requisito necesario para la infección (Pachón, 2009).

#### 2.2.18 Manifestaciones Clínicas.

La Salmonelosis en cobayos se manifiesta de dos formas, la forma aguda y la forma crónica. La forma aguda se presenta como un cuadro septicémico agudo produciendo muerte 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, en ciertas ocasiones también se observa diarrea acompañada de mucus, y en cobayos gestantes se produce el aborto (Ramírez, 1976; Bustamante, 1993; Evans, 2005), 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

(Ramírez, 1976; Bustamante, 1993; Dávalos, 1997; CEA, 2001). Estudios realizados en animales de laboratorio incluyendo al cobayo, 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 (Noonan, 1994; Garmendia *et al*, 2000).

#### 2.2.19 Diagnóstico.

El diagnóstico de la Salmonelosis en cobayos debe ser realizado asociando las manifestaciones clínicas, las lesiones anatomopatológicas encontradas en la necropsia y el aislamiento bacteriano. Los órganos de elección para recuperar la bacteria en animales enfermos son principalmente el hígado y el bazo, pero también se pueden aislar de otros órganos como pulmón, ganglio mesentérico, intestino, útero, vesícula biliar y glándula mamaria (Ramírez, 1976; Bustamante, 1993; Matsuura, 2008). En animales portadores aparentemente sanos, se logró aislar la bacteria de linfonódulos profundos y superficiales, intestino grueso, tracto urinario, ovario y vesícula biliar (Pérez, 1975).

La identificación de la *Salmonella* debe basarse en aislamiento (cultivos), caracterización bioquímica y serotipificación. Para el aislamiento es necesario hacer un preenriquecimiento (agua peptonada, caldo lactosado, etc.) con el objeto de rescatar y vivificar las bacterias, su incubación se hace 37 °C por 24 - 48 horas. Un enriquecimiento selectivo (tetracionato, salmosist, selenito, Rappapert – Vassiliadis, etc) con esto se inhibe el crecimiento de flora competitiva y aumenta su concentración. Es necesario hacer las pruebas bioquímicas de *Salmonella* utilizando TSI, UREA, lisina hierro o sistemas rápidos como el API20E, Minitek. Así como determinar si se trata de una *Salmonella* móvil o inmóvil haciendo las respectivas pruebas. Una vez que se tiene la certeza de que es una *Salmonella* por las características del cultivo, identificación bioquímica, se procede a serotipificarla, para ello se utilizan los antisueros somáticos, flagelares y el capsular o Vi (Botero, 2006).

#### 2.2.20 Tratamiento.

Entre los compuestos antibacterianos de elección para el tratamiento de la Salmonelosis en cobayos se tienen al cloranfenicol, clortetraciclina, estreptomina y nitrofurazona, su comportamiento ha sido demostrado *in vitro* utilizando cepas de *S. typhimurium* provenientes de cobayos enfermos de nuestro medio (Ramirez, 1976). Sin embargo, (Matsuura 2008) encontró una sensibilidad del 100 % a enrofloxacina, sulfatrimetoprim, estreptomina y amoxicilina en cepas de *Salmonella* provenientes de cobayos enfermos.

Algunos esquemas de tratamiento con algunas drogas son las siguientes:

- Enrofloxacin 5-15 mg / Kg. PO, SC, IM cada 12 horas.
- Sulfatrimetropim 15-30 mg / Kg. PO, SC cada 12 horas.
- Estreptomina 2 g / Litro de agua
- Cloranfenicol 0.5 g. / Litro de agua
- Furazolidona 2.4 g. /Litro de agua

Cada uno de ellos administrados durante 5 a 7 días.

En otros estudios realizados en granjas de aves se encontró sensibilidad a amoxicilina, cloranfenicol, ampicilina, ampicilina/sulbactam, cefalotina, imenepem, gentamicina, ciprofloxacino, amikacina y ciprofloxacino. En *Salmonellas* aisladas de humanos y alimentos se encontró sensibilidad a amikacina, gentamicina, kanamicina y ofloxacina en el 100% de los casos (Puig *et al*, 2007).

#### 2.2.21 Aislamiento y Caracterización de *Salmonella sp.*

##### a) Especímenes.

Para el diagnóstico de *Salmonella spp* se pueden usar muestras de materia fecal y fluidos (sangre, orina, bilis y pus de abscesos).

##### b) Materia Fecal

La muestra debe obtenerse en el período agudo de la enfermedad, antes de iniciar el tratamiento con antimicrobianos. Con un hisopo estéril, se recoge una pequeña cantidad de una evacuación espontánea reciente, seleccionando las partes mucosas o sanguinolentas. En caso de no poder

obtener esta muestra, se hace un hisopado rectal. Las muestras que no se pueden procesar dentro de las dos horas, se deben colocar en medio de transporte. Como medio de transporte se usa Cary – Blair, que tiene la ventaja de ser estable hasta 18 meses después de su preparación, cuando las condiciones de almacenamiento son correctas. En este medio de transporte se puede conservar la muestra hasta 5 días, siempre en refrigeración.

c) Sangre.

La muestra se toma en el momento del pico de fiebre. Se siembran 10 ml de sangre en un frasco de hemocultivo de 100 ml (relación 1:10). Se incuba a 35 - 37° C, durante 7 días, haciendo un control (en medio de agar sangre) en 8 horas de incubación y controles periódicos de acuerdo a la turbidez observada. Los hemocultivos son negativos en los síndromes de infecciones transmitidas por alimentos por serovariedades como *S. typhimurium* ó *S. enteritidis*, sin embargo estas serovariedades causan septicemia en los inmunocomprometidos.

d) Abscesos y orina.

El pus y la orina se recogen en recipientes estériles y una alícuota se siembra directamente en los medios de cultivo.

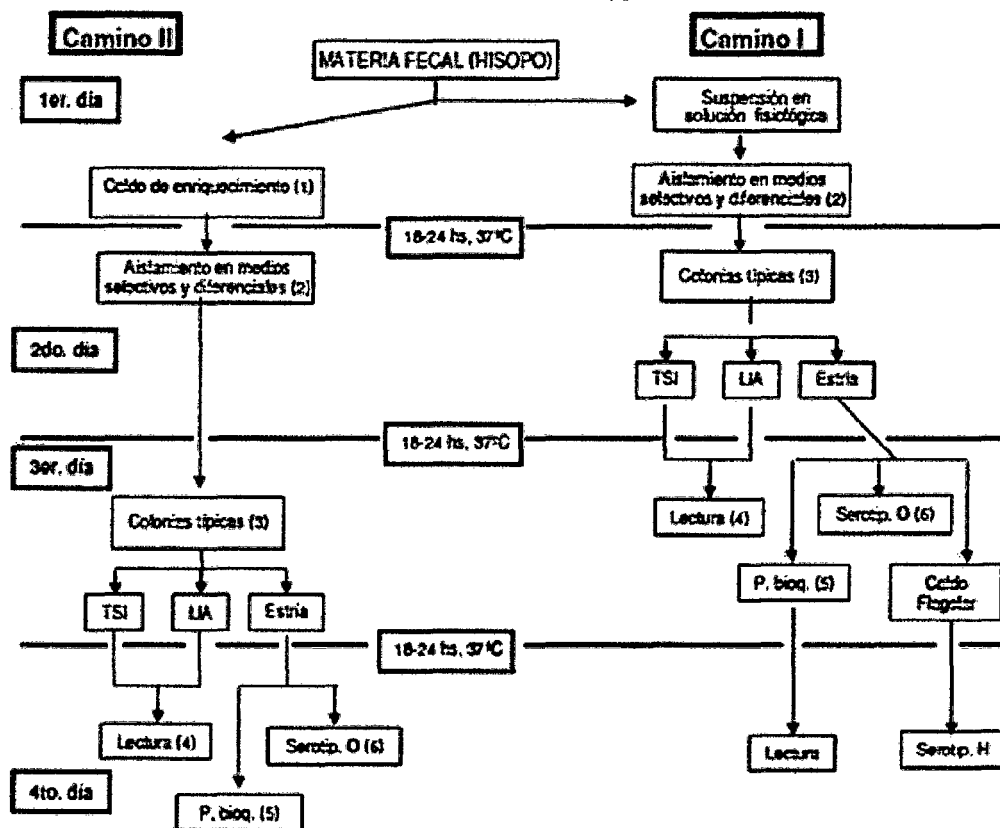


FIGURA N° 1. FLUJOGRAMA DE AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE *SALMONELLA* spp.

- (1) Caldo selenito. (2) Agar Mac Conkey y agar SS, o agar Hektoen, o agar xilosa lisina desoxicolato, o agar verde brillante. (3) Se seleccionan de 2 a 3 colonias. (4) Si TSI y LIA dan resultados compatibles con *Salmonella*, se siembran Pruebas bioquímicas complementarias (P.bioq.) y se realiza la serotipificación (Serotip. O) (5) Pruebas bioquímicas complementarias: RM-VP, decarboxilasas, dulcita, malonato. (6) Serotip: Serotipificación.

TABLA N° 2: CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS EN MEDIOS SELECTIVOS Y DIFERENCIALES.

Medio de cultivo	Selectividad	Aspectos de las colonias
Agar MC	Baja	Incoloras.
Agar EMB	Baja	Incoloras.
Agar SS	Alta	Incoloras con centro negro.
Agar XLD	Alta	Rojas con centro negro.
Agar BGA	Alta	Rosadas Pálidas.

Fuente: Caffer *et al*, 2008.

#### 2.2.22 Pruebas Bioquímicas.

- Agar Hierro Tres Azúcares (TSI).

El medio fue diseñado para determinar la habilidad de las bacterias de fermentar hidratos de carbono y producir sulfuro de hidrógeno (SH<sub>2</sub>). El medio contiene 1 parte (0.1%) de glucosa y 10 partes (1.0%) de lactosa y sacarosa. El indicador de pH es el rojo fenol y el sulfato ferroso pone en evidencia la formación de SH<sub>2</sub>. La producción de SH<sub>2</sub> se manifiesta por un ennegrecimiento del medio.

- Agar Lisina Hierro (LIA).

La descarboxilación de la lisina a cadaverina produce una alcalinización del medio y un viraje al violeta del indicador púrpura de bromocresol. Como la reacción tiene lugar en medio ácido, es necesaria la fermentación previa de la glucosa. Los microorganismos que no

decarboxilan lisina, pero fermentan la glucosa producen un viraje al amarillo en todo el medio. La formación de SH<sub>2</sub> produce una coloración negra debido al sulfuro de hierro producido.

TABLA N° 2: PRUEBAS BIOQUÍMICAS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

Medio	Reacciones/ Enzimas	Resultados	
		Negativos	Positivos
TSI	Producción de ácido (fondo es amarillo y la estria es roja) la producción de ácido es solo a partir de glucosa.	Fondo rojo	Fondo amarillo
TSI	Producción de ácido a partir de lactosa y/o sacarosa.	Estría roja	Estría amarilla
TSI	Producción de gas	No hay burbujas en el fondo	Burbujas de aire en el fondo.
TSI	Producción de H <sub>2</sub> S	No hay color negro	Color negro
LIA	La descarboxilación de la lisina produce una reacción alcalina (color violeta). Los que no descarboxilan la lisina producen una estria alcalina y un fondo ácido (color amarillo).	Botón purpura/ superficie amarilla	Botón purpura/ superficie purpura.
LIA	Producción de H <sub>2</sub> S	No hay color negro	Color negro
UREA	Ureasa	Amarillo	Rosa/Cereza
LDC	Lisina descarboxilasa	Color amarillo/ marrón	Color purpura y color amarillo/ marrón en el medio control.

Fuente: Caffer *et al*, 2008.

### 2.3 Marco Conceptual.

- **Antibacteriano:** Relativo a una sustancia que destruye bacterias o inhibe su crecimiento o reproducción.
- **Antimicrobiano:** Sustancia que impide el desarrollo de los microbios: bacterias hongos protozoos y virus.
- **Anaerobia:** Organismo que se desarrollan en condiciones donde existe una mínima o nula cantidad de oxígeno.
- **Agar:** Es una mezcla compleja de sales de polisacáridos, fundamentalmente, galactósidos. Las grandes moléculas que lo constituyen determinan sus cualidades sobresalientes, como coloides y espesantes, es usados para hacer medios de cultivo.
- **Bacteria:** Microorganismos unicelulares sin núcleo diferenciado, que presentan variedades morfológicas: esféricos (cocos), alargados (bacilos), espirales (espiroquetas) o en forma de coma (vibrios). Generalmente poseen una pared celular.
- **Bactericida:** Que destruye o lisa las bacterias.
- **Bacteriostático:** Que detiene el crecimiento y reproducción de las bacterias
- **Facultativo:** Organismos que subsisten en condiciones aerobias (con oxígeno) o anaerobias (sin oxígeno)
- **Extracto:** Sustancia que se extrae de otra.
- **Inoculo:** Número de bacterias que se pueden encontrar en la lesión o un cultivo.
- **Propóleo:** Sustancia resinosa extraída por las abejas que tiene importante actividad biológica.
- **Inhibición:** Que disminuye el crecimiento o desarrollo.
- **Discos de sensibilidad:** Discos de papel filtro de alta calidad de aproximadamente 6 mm de diámetro, impregnados con cantidades exactas de antibióticos u otros agentes quimioterapéuticos.

### III. MATERIAL Y METODOS.

#### 3.1 Materiales.

##### 3.1.1 Cepas Bacterianas para las Pruebas *In vitro*.

Para realizar la actividad antimicrobiana *In vitro* de las diferentes soluciones de Propóleo se utilizaron cepas bacterianas aisladas de *Cavia Porcellus*.

Gram negativa.

*Salmonella sp.*, Cepa aislada de muestras de hisopado anal y tejidos de cuyes con sintomatología de Salmonelosis.

##### 3.1.2 De Laboratorio.

- a. Dilución de soluciones de extracto de propóleos a diferentes concentraciones.

- Propóleos al 30mg/ml, 15mg/ml, 7.5mg/ml, 3.75mg/ml y 1.87mg/ml.
- Vasos precipitados, capacidad 100 ml.
- Botellas color ámbar, capacidad 100 ml.
- Probetas, capacidad 50 ml y 100 ml.
- Estufa.
- Etiquetas.
- Mortero y pilón.
- Alcohol Etilico a 70°.
- Papel filtro.
- Coladora Pequeña.

b. Aislamiento de *Salmonella sp.*

- Ansas de siembra.
- Placas de Petri Estériles.
- Balanza.
- Estufas a 37°C.
- Mechero bunsen.
- Hisopos estériles.
- Tubos de ensayo con rosca.

c. Cultivo y evaluación antibacteriana.

- Hisopos largos de madera.
- Mechero a gas.

➤ Cámara de flujo.

d. Medios de cultivo.

➤ Agar Muller Hilton.

➤ Caldo de Selenito.

➤ Caldo de Peptona.

➤ Caldo Rappaport.

➤ Agar Mac Conkey.

➤ Agar *Salmonella - Shiguelia* (S-S).

e. Diferenciación Bioquímica.

➤ Agar Triple Azucar Hierro (TSI).

➤ Agar Movilidad Indol Ornitina (MIO).

➤ Agar Hierro Lisina (LIA).

➤ Citrato de Simons.

f. Equipos.

➤ Microscopio compuesto.

➤ Autoclave de acero inoxidable.

➤ Estufa.

➤ Refrigeradora.

### 3.1.3 De Campo.

Para toma de muestras.

- Hisopos estériles.
- Caldos como medio de transporte.
- Envases estériles de vidrio para transporte de tejidos.
- Cooler mediano para transporte de muestra.
- Paños desinfectantes con alcohol.

### 3.1.4 Métodos.

El experimento fue dividido en cuatro etapas.

#### a. Preparación de soluciones de extracto de propóleos.

Recolección de propóleos.

- Se realizó la cosecha del propóleo en apiarios, donde las colmenas son de las abejas del género y especie *Apis mellifera*.
- Seguidamente el propóleo se almacenó en bolsas atóxicas transparentes (que se usan para conservar alimentos).
- Se colocó de manera conjunta en bolsas oscuras alejado de la luz (los principios activos del propóleo se oxidan en presencia de la luz).
- Seguidamente se transportó hacia el laboratorio, donde se eliminaron las impurezas (alas, patas, cuerpos de abejas y porciones ceras, etc).

- Se congeló la masa de propóleo a temperatura de - 20 a - 40° C por 48 horas.

Preparación de la soluciones de extracto propóleos a diferentes concentraciones.

- Se procedió a pulverizar la masa de propóleo (uso de mortero o sistema mecánico).
- Seguidamente se realizó la extracción alcohólica al 70° (se colocó 30 g de propóleo en 70 ml de la solución alcohólica; 15g de propóleo en 85 ml de alcohol etílico; 7.5g de propóleo en 92.5 ml de alcohol etílico; 3.75g de propóleo en 96.25 ml de alcohol etílico y 1.88 g de propóleo en 98.12 ml de alcohol etílico).
- Proceso de maceración fue durante 4 días a 37°C en una estufa.
- Luego se procedió a la filtración del extracto.
- Se estandarizó (cada envase contenga el 30 %, 15%, 7.5%, 3.75% y 1.87% de los principios activos del propóleos que son los aceites esenciales, resinas, bálsamos).
- Se envasó en frascos color ámbar de 100 ml.
- Se conservó en lugar seco y fresco alejado de la luz.

b. Tomas de muestras para aislamiento de *Salmonella sp.*

- La muestra se obtuvo en el período agudo de la enfermedad, antes de iniciar el tratamiento con antimicrobianos.

- Haciendo uso de un hisopo estéril se tomó muestra del ano y luego se colocó la muestra en un tubo contenido con agua peptonada, que se usó como medio de transporte y seguidamente se rotuló el envase con sus respectivos datos.
  - Posteriormente también se tomó muestras de órganos (hígado, bazo e intestinos) de cuyes con sintomatología de Salmonelosis.
  - La muestra obtenida se colocó en un transportador de muestras y fue llevado al laboratorio de microbiología de la Facultad de Ing. Agroindustrial de la UNAMBA.
- c. Cultivo y aislamiento de *Salmonella sp.*

El cultivo bacteriano se realizó de acuerdo a los procedimientos del laboratorio de microbiología de la Facultad de Ing. Agroindustrial de la UNAMBA.

- Las muestras permanecieron en la estufa a 37° C por un tiempo de 24 horas.
- Seguidamente se puso en medio de enriquecimiento selectivo en caldo de Selenito y Caldo Rappaport en la estufa a 37° por 24 horas.
- Luego se procedió al cultivo de la muestra en agar S – S y Mac Conkey.
- Luego se colocó las placas en la estufa por 24 horas a 37°C.
- Posteriormente se realizó la lectura de las placas y seleccionaron las colonias sospechosas.

- Seguidamente se realizó las pruebas complementarias de confirmación en agar TSI, LIA, MIO, citrato de Simons.
- Se realizó la lectura de las pruebas complementarias, e identificó las colonias de *Salmonella sp.*

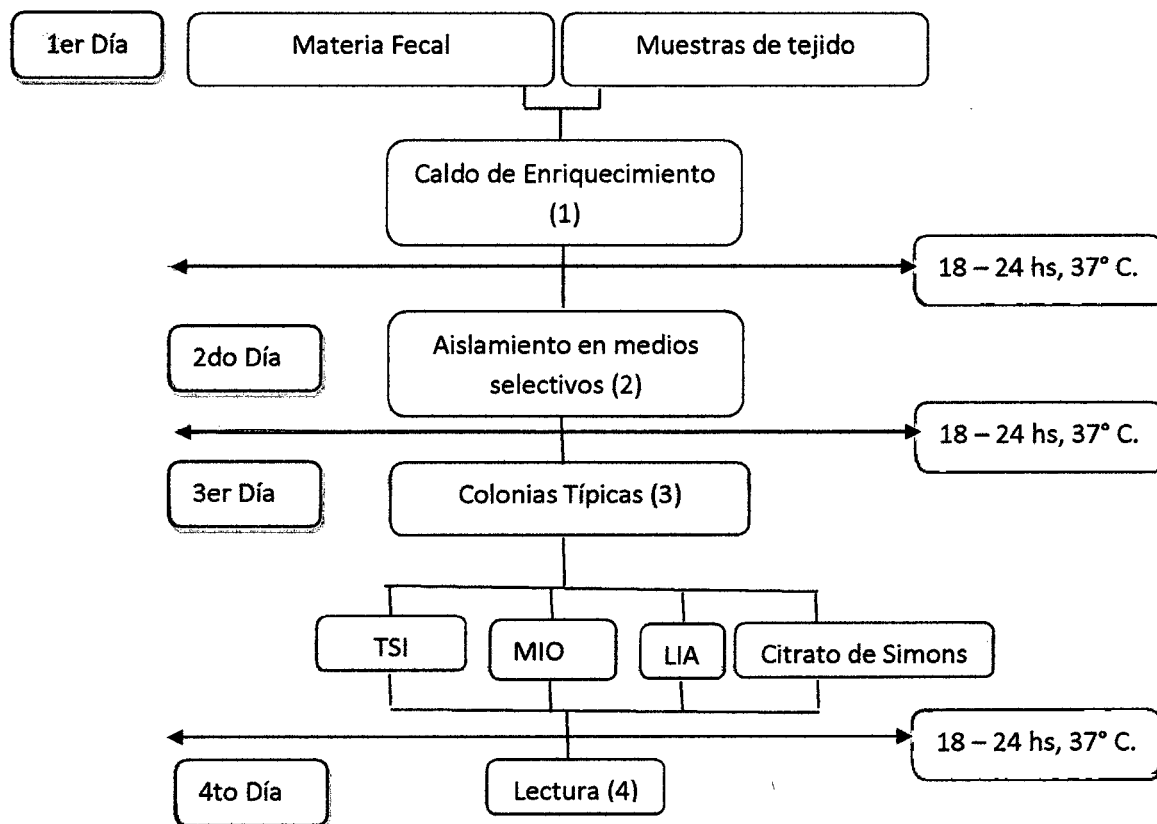


FIGURA N° 2. DIAGRAMA DE AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE *Salmonella sp.*

- (1) Caldo selenito.
- (2) Agar Mac Conkey y agar SS.
- (3) Se seleccionan de 2 a 3 colonias para las pruebas complementarias.
- (4) Si TSI, LIA, MIO, y Citrato de Simons donde dan resultados compatibles con *Salmonella sp.*,

d. Prueba de sensibilidad bacteriana (Kirby Bauer).

- A las colonias de *Salmonella sp* se le realizó la prueba de sensibilidad bacteriana con las diferentes concentraciones de solución de propóleo.
- Se tomó una colonia de las placas con crecimiento de *Salmonella sp*.
- Seguidamente se preparó el inóculo a escala de Mc Farland de 0,5 de turbidez.
- Seguidamente haciendo uso de un hisopo estéril grande se realizó los respectivos cultivos en placas de Agar Muller Hilton.
- Seguidamente se realizó excavaciones al tamaño de discos de sensibilidad (0.5mm).
- Haciendo uso de una tuberculina estéril se colocó 0.3 ml en cada agujero.
- Seguidamente se incubó a 37° C por 24 horas.
- Posteriormente se realizó la respectiva lectura.

3.2 Diseño y análisis estadístico.

Para determinar la actividad bacteriana *in vitro* de las soluciones de propóleo contra *Salmonella sp* se usó un diseño completamente aleatorio (DCA), ya que en este trabajo se trabajó con un solo factor que es el propóleo.

Modelo aditivo lineal.

$$Y_{ij} = \mu + \zeta_i + \varepsilon_{ij}$$

Dónde:

$Y_{ij}$  = Valor de la característica en estudio o variable.

$\mu$  = Media de halos de inhibición.

$\zeta_i$  = Efecto de los diferentes concentraciones de propóleo.

$\varepsilon_{ij}$  = Error experimental.

Se procedió al plan de análisis de datos de acuerdo a la secuencia:

1. Una vez elaborada la base de datos codificada se realizó el respectivo análisis, cruces de variables y pruebas estadísticas.
2. La información recolectada se procesa mediante el paquete estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versión 17 en español.
3. Utilizando además una hoja de cálculo de Microsoft Excel 2010 para la representación gráfica correspondiente.
4. La prueba estadística ANOVA, es el análisis de varianza que nos ayuda a determinar diferencias significativas de una misma solución a diferentes concentraciones.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1 Análisis de los diferentes niveles de concentraciones de propóleo.

Al análisis de Varianza de la actividad antibacteriana *in vitro* de diferentes niveles de concentración de extracto de propóleos sobre *Salmonella sp* de cuyes (*Cavia porcellus*), se comparó los efectos antibacterianos de las diferentes concentraciones de extracto de propóleos al 30%, 15%, 7.5%, 3.75% y al 1.87%, donde todas las concentraciones de extracto de propóleos tienen halos de inhibición sobre *Salmonella sp* en *Cavia porcellus*.

La tabla N° 3 nos muestra los efectos terapéuticos de las diferentes concentraciones de propóleos, donde se analiza que las cinco concentraciones de extracto de propóleos presentan halos de inhibición, el cual nos muestra el mayor diámetro de halo en promedio la concentración del 30%, también los diámetros mínimos para las diferentes concentraciones de propóleo. Por lo tanto

todos presentan actividad antibacteriana sobre *Salmonella sp* en *Cavia Porcellus*. No hay diferencia significativa en cuanto a la actividad antibacteriana de los diferentes concentraciones de extracto de propóleos al 30%, al 15%, al 7.5%, al 3.75% y al 1.87%. Eso nos indica que la capacidad antibacteriana de las diferentes concentraciones de extracto de propóleos es similar. El propóleo al 30% presenta un mayor promedio (12,22 mm) en halos de inhibición y el propóleos al 3,75% presenta el menor promedio (8,44 mm) en halos de inhibición. Se puede observar que los mínimos de halos inhibitorios es igual en todas las concentraciones, mientras que los máximos varían, siendo el de mayor halo inhibitorio el de concentración 1.87% alcanzando a 17mm de diámetro, seguido de la concentración de 30% que alcanzó un halo inhibitorio de 16 mm.

TABLA N° 3: PROMEDIO DEL HALO DE INHIBICIÓN DE LAS SOLUCIONES DE EXTRACTO DE PROPÓLEOS SOBRE *Salmonella sp* EN *Cavia porcellus*

CONCENTRACIONES	PROMEDIO (mm)	MINIMO (mm)	MAXIMO (mm)
PROPOLEO AL 30%	12,22	5	16
PROPOLEO AL 15%	9,667	5	14
PROPOLEO AL 7.5%	10	5	13
PROPOLEO AL 3.75%	8,44	5	13
PROPOLEO AL 1.87%	9,667	5	17

El Figura N° 3: muestra los diámetros de halos en (mm) que alcanzaron los diferentes concentraciones de extracto de propóleos, donde el propóleo al 30% alcanza a 12.22 mm de diámetro promedio siendo superior a las demás concentraciones y el propóleos al 37.5% alcanzo 8.44 mm de diámetro siendo inferior a las demás concentraciones usadas en la investigación, demostrando que el propóleo al 30% tiene mayor efecto antibacteriano en promedio frente a las demás concentraciones.

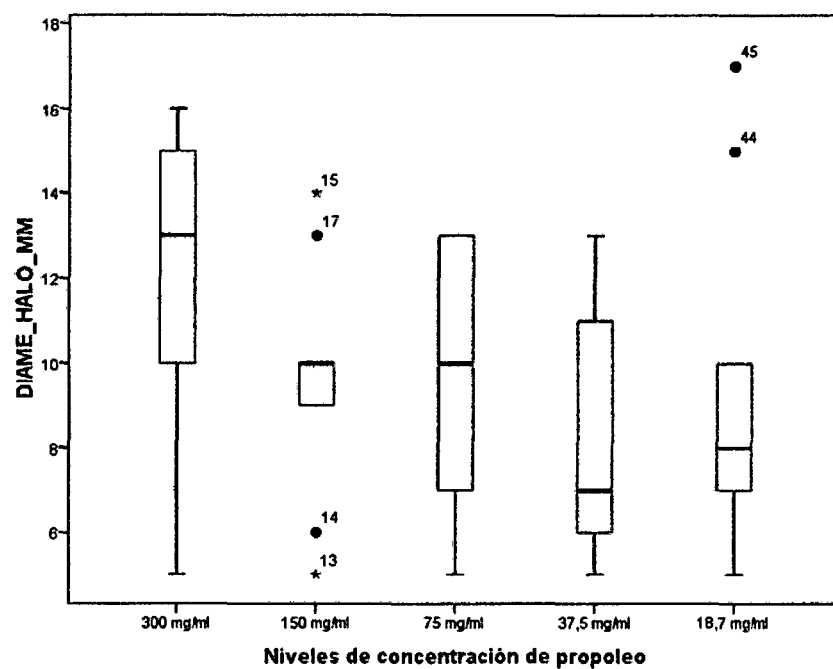


FIGURA N° 3: DISTRIBUCIÓN DEL DIÁMETRO DE HALO DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PROPÓLEOS.

En la presente investigación se demuestra que el propóleo tiene actividad antibacteriana frente a la *Salmonella sp.* Así mismo los resultados demostraron que no existen diferencias significativas con respecto al tamaño de los halos de inhibición en las distintas concentraciones del extracto de Propóleo (30%, 15%, 7.5%, 3.75% y 1.87%); si comparamos con otro estudio realizado, donde

evaluaron la actividad bacteriostática y bactericida de propóleo comercial al 70%, se evidencio su efecto inhibitorio con una CMI 8% y CMB 11% para *Salmonella Paratyphi B*, *Salmonella Typhi*; estos datos coinciden con los resultados obtenidos dela presente investigación (Gil *et al*, 2012). Si comparamos con otros estudios donde trabajaron con concentraciones de 0,02 % a 2,5 % de propóleos turco sobre *Escherichia coli* y *Salmonella typhi* donde demostraron que fue ineficaz y de acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación, se puede analizar que el propóleo Apurimeño tiene actividad bacteriana sobre *Salmonella sp* inclusive desde 1.87%, que es la mínima concentración que se usó en esta investigación, esto se podría deberse a que los propóleos de zonas templadas los compuestos responsables de dicha actividad son flavonoides y esteres de ácidos fenólicos (Erkmen y Ozcan, 2008). Sin embargo los propóleos de origen tropical no contienen tales sustancias, aun así muestran actividad antimicrobiana. Por lo que se afirma que la combinación de diversas sustancias en los propóleos es esencial para su actividad biológica (Kujumgiev *et al*, 1999). Aunque todas las concentraciones ensayadas de soluciones de extracto de Propóleo presentaron actividad antibacteriana frente al crecimiento de *Salmonellas sp*. Otro autor concluye que no implica que a mayor concentración de extracto de Propóleo sea mayor su actividad antibacteriana in Vitro, puesto que a medida que se incrementa la concentración se produce una saturación del propóleo que disminuye su actividad antibacteriana (Calderón, 2010). Tal como se puede evidenciar en las concentraciones de 15% y 1.87% que lograron obtener los mismos resultados, con un promedio en los halos de inhibición de 9.667 mm.

## V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1.1 Conclusiones.

De los diferentes niveles de concentración (30%, 15%, 7.5%, 3.75% y 1.87%) de propóleo se concluye que:

- Todas las soluciones de propóleo tienen actividad antimicrobiana frente a *Salmonella sp* en *Cavia porcellus*.
- El extracto de propóleo en las concentraciones ensayadas al 30% posee actividad antibacteriana mayor frente a la *Salmonella sp* con un promedio en los halos de inhibición de 12.22 mm.
- El extracto de propóleo en las concentraciones ensayadas al 15% posee actividad antibacteriana frente a las *Salmonella sp*. con un promedio en los halos de inhibición de 9.667 mm.

- El extracto de propóleo en las concentraciones ensayadas al 7.5% poseen actividad antibacteriana frente a las *Salmonella sp* aisladas, con un promedio en los halos de inhibición de 10 mm.
- El extracto de propóleo en las concentraciones ensayadas al 3.75% posee actividad antibacteriana frente a las *Salmonella sp.* con un promedio en los halos de inhibición de 8.444 mm.
- El extracto de propóleo en las concentraciones ensayadas al 1.87% posee actividad antibacteriana frente a las *Salmonella sp.* con un promedio en los halos de inhibición de 9.667 mm.

#### 5.1.2 Recomendaciones.

A las autoridades de la UNAMBA.

- Implementar los laboratorios de microbiología en la Facultad de Medicina Veterinaria Zootecnia a fin de realizar estudios a profundidad acerca del comportamiento del Propóleo así como de otros productos de origen natural.
- Implementar medios de cultivo y equipos de laboratorio para realizar estudios de otras bacterias que son patógenas en nuestro medio.

A los investigadores.

- Se recomienda realizar estudios *in vivo* para el tratamiento de *Salmonella* en *Cavia porcellus*.
- Se recomienda hacer estudios sobre la posibilidad de una acción sinérgica entre compuestos antibacterianos del Propóleo y los distintos fármacos antibacterianos, como tratamiento de Salmonelosis en *Cavia porcellus*.
- Realizar estudios de serotificación de salmonella en nuestro departamento de Apurímac.
- Realizar estudios para determinar las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (MIC) y Concentraciones Mínimas Bactericidas (MBC) del extracto de propóleo de Apurímac
- Realizar pruebas de la susceptibilidad o resistencia de microorganismos, que provoquen enfermedades económicamente importantes en las diferentes especies productivas de animales, frente a extractos de propóleo.
- Realizar el análisis físico químico de los propóleos de las provincias de Apurímac.

## BIBLIOGRÁFICA

1. Ameghino EF. 1968. Sobre un brote de salmonelosis en cuyes (*Cavia cobaya*): 3er Boletín Extraordinario. Lima: IVITA. p 260-261.
2. Arcos A, Mora C. 2011. Determinación de la prevalencia y resistencia antimicrobiana de *salmonella spp* en carne porcina y fomites de 6 plantas de beneficio y 14 expendios del departamento del Tolima. universidad del Tolima facultad de medicina veterinaria y zootecnia Ibagué – Tolima 2011.
3. Brushi M, Franco S, Gremiao M. 2003. Application of an HPLC Method for Analysis of Propolis Extract. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies 26(14): 2399-2409.
4. Bustamante J. 1993. Producción de cuyes. Lima: Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 259 p.
5. Caffer, Terragno, Binsztein. 2008. Manual de Procedimientos Diagnóstico y caracterización de *Salmonella spp*. Departamento Bacteriología Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S. “Dr. Carlos G. Malbrán” Centro Regional de Referencia del WHO Global Salm Surv para América del Sur.
6. Calderón P. 2010. Actividad Antibacteriana in vitro de soluciones de propóleo Etanólico sobre dos bacterias Periodontopatogenas frecuentes en la enfermedad gingivoperiodontal. Hospital militar central, Lima - Puno – Perú. tesis para optar el título de cirujano dentista.
7. Campo M. 2007. Estudio Químico de Propóleos Rojos cubanos. Tesis n opción al título de Doctor en Ciencias Farmacéuticas. Universidad de la Habana. Cuba.
8. Chauca. 1997. Producción de cuyes (*Cavia porcellus*). Food & Agriculture Organization.



9. Chauca L. 1994. Sistemas de Producción de cuyes. En: Crianza de cuyes. Lima: Instituto Nacional de Investigación Agraria - INIA. Serie didáctica. 170 p.
10. Castillo García D, Woolrich Zavaleta Nallely L. 2009. Identificación Química de compuestos fenólicos por cromatografía de HPLC con detector UV de extractos etanólicos de propóleos recolectados en la zona córdoba - orizaba. facultad de ciencias químicas. universidad veracruzana.
11. De Castro S. 2001. Propolis: biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee product. Annual Review of Biomedical Science 3: 49-83.
12. Diaz M, Gil R, Valdes G. 2000. Determinación de la CMI de propóleos cubanos a partir de técnicas diferentes. revista Apiciencia, vol. 2 no 2. issn: 1608-1862.
13. Díaz M, Rodríguez, Valdés G. 2000. Determinación de la CMI de propóleos Cubanos a partir de dos técnicas diferentes. Estación Experimental Apícola (EEA). vol.2 no.2. 1608 – 1862.
14. Drago L, Mombelli B, Vecchi E, Fascina M, Tocalli M, Gismondo M. 2000. In vitro antimicrobial activity of propolis dry extract. J Chemotherapy 12: 390-395
15. Enriquez Baldeon; Rojas Vega. 2004. Normas generales para las crianzas de cuyes. Huancayo – Perú Junio 2004. Ministerio de Agricultura Dirección Regional de Agricultura Junín Dirección de Promoción Agraria.
16. Figueroa O, Verdugo R. 2005. Mecanismos Moleculares de Patogenicidad de *Salmonella sp*; Revista Latinoamericana de Microbiología. vol. 47, no. 1-2 January - March. 2005 april - june. 2005 pp. 25 – 42).
17. Gil M, Perelli A, Riloarbert, Alvarado, Arias Y, Blumenthal E. 2012. Actividad bacteriostática y bactericida de la tintura de propóleos sobre bacterias enteropatógenas. Laboratorio de Diagnóstico Bacteriológico, Dpto. de

Microbiología, Escuela de Ciencias Biomédicas y Tecnológicas, Universidad de Carabobo Venezuela.

18. Gómez A, Gómez D, Arráez A, Fernández A. 2006. Advances of phenolic compounds in product derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41(4): 1220-1234.
19. Havsteen B. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* 96(2-3) 67-202
20. [INEI] Instituto Nacional de Estadística e Informática. 1996. III Censo Nacional Agropecuario. [Internet], [22setiembre 2007]. Disponible en: [www.inei.gob.pe/inei/cenagro1994/](http://www.inei.gob.pe/inei/cenagro1994/).
21. J. Vargas, Nimia Clavo, Salim Máttar. 2004. Detección de *Escherichia Coli* o157:h7 y *Salmonella spp.*, en cerdos del departamento de Cordoba. *MVZ-Córdoba* 2004; 9:(1), 386-392.
22. Jin U, Chung T, Kang S, Suh S, Kim J, Chung K, Gu Y, Suzuki I, Kim C. 2005. Caffeic acid phenyl ester in propolis is a strong inhibitor of matrix metalloproteinase-9 and invasion inhibitor: isolation and identification. *Clin Chim Acta* 362(1-2): 57-64.
23. Kujumgiev, Tsvetkova I, Serkedijieva Y, Bankova V, Cristov R, Popov S. 1999. Antibacterial, Antifungal and Antiviral Activity of Propolis of Different Geographic origin. *J ethnopharmacol* 64: 235-240.
24. L. Carrillo, N. Nastillo y Mauricio. 2011. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de extractos de propóleos de la Huasteca Potosina (México). unidad académica multidisciplinaria zona Huasteca de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. calle Romualdo del campo # 501 fracc. Rafael Curiel. ciudad valles, San Luis Potosí, México (e-mail: maluisa@uaslp.mx).



25. Layme M. 2010. Frecuencia de Lesiones Anatomopatológicas en cobayos con diagnóstico bacteriológico de *Salmonella sp.* remitidos al laboratorio de histología, Embriología y patología Veterinaria de la FMV-UNMSM durante el periodo 2001-2007 Lima-Perú 2010.
26. Lemourt O. 2007. Propóleos y enfermedad de peyronie una nueva alternativa terapéutica. Instituto superior de ciencias médicas de la habana facultad de ciencias médicas “finlay – albarrán. Tesis presentada al grado científico de Dr. en ciencias médicas. Ciudad de la Habana.
27. Marcucci MC, Bankova V. 1999. Chemical composition, plant origin and biological activity of Brazilian propolis. *Current Top Phytochem* 2: 115-123
28. Martínez G. 2009. Caracterización físico-química y evaluación de la actividad anti fúngica de propóleos recolectados en el suroeste antioqueño; maestría en ciencia y tecnología de alimentos facultad de ciencias Agropecuarias; Medellín.
29. Martinez J, Fajardo M, Perez J. 2005. Obtención de tintura de propóleos en las plantas de productos naturales. *Revista CENIC Ciencias Químicas*, Vol. 36, No. Especial, 2005.
30. Matsuka M. 2000. Criteria of propolis in Japan. p. 4. In: *Japan Propolis Conference*. Japan Health Food and Nutrition Food Association. Tokio.
31. Matsuura S, Morales C, Calle E, Ara G. 2010. Susceptibilidad a Antibacterianos *in vitro* de *Salmonella Entérica* aislada de cuyes de crianza familiar-comercial en la provincia de Carhuaz, Áncash revinv vet Perú; 21 ( 1): 93-99.
32. [MINAG] Ministerio de Agricultura del Perú. 2003. Realidad y problemática del sector pecuario - Cuyes. [Internet], [09 enero 2008] Disponible en: [http://www.minag.gob.pe/pecuaria/pec\\_crianza\\_produccion\\_cuyes.shtml](http://www.minag.gob.pe/pecuaria/pec_crianza_produccion_cuyes.shtml).

33. Ministerio de agricultura. 2010. Apicultura buenas prácticas en la producción apícola y gestión en apicultura. Dirección de promoción de la competitividad agraria pag 36 -37. WEB SITE. [www.minag.gob.pe](http://www.minag.gob.pe)
34. Morales S, Mattos J, Calle S. 2007. Efecto de la muña (*Saturejaparvifolia*) en la dinámica de la infección por *Salmonella entérica* en cobayos. En: XXX Reunión Científica Anual Asociación Peruana de Producción Animal. Cuzco - Perú: APPA.
35. Moreno H, Martínez A, Figueroa. 2007. Efecto Antimicrobiano *in vitro* de propóleos Argentinos, Colombianos y Cubano sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. universidad nacional de Colombia Facultad de Odontología. sede Bogotá. Lic. Micr. msc. docente, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia. sede Bogotá. [revistanova@unicolmayor.edu.com](mailto:revistanova@unicolmayor.edu.com)
36. Muñoz R, Linares V, y Narváez S. 2011. Propiedades del Propóleos como aditivo natural funcional en la Nutrición Animal. Biosalud, volumen 10 no. 2, julio - diciembre, 2011. pág. 101 – 111.
37. Neacato S. 2005. Uso De Extractos Etanolicos De Propóleo para el control de *Staphylococcus Aureus* in vitro obtenidos de leche de vacas con mastitis. Tesis para optar el título de Médico Veterinario. Escuela Politécnica del Ejército. Ecuador.
38. Ortega J, Vanegas N. 2006. Utilización de propolina en el control de mastitis bovina en fincas del Municipio de Muy Muy Departamento de Matagalpa. Tesis para optar al Título de Médico Veterinario Managua, Nicaragua. Universidad Nacional Agraria.



39. Pachon C. 2009. Aislamiento, Identificación y Serotipificación de enterobacterias del genero *Salmonella* en una población de *Crocodylus Intermedius* y testudinos mantenidos en cautiverio en la estación de biología tropical Roberto Franco de la facultad de ciencias. programa profesional de microbiología agrícola y veterinaria. Bogotá.
40. Palomino G, Martínez G, García, Gil G, Durango R. 2010. Caracterización Físicoquímica y actividad Antimicrobiana del Propóleos en el Municipio de la Unión (Antioquia, Colombia). Rev. Fac. nal. agr. medellín 63(1): 5373-5383.
41. Palomino García, Lady Rossana, Martínez Galán, Julián Paúl, García Pajón, Carlos Mario, Gil González, Jesús Humberto, Durango Restrepo, Diego Luis. 2010. Caracterización físicoquímica y actividad antimicrobiana del propóleos en el municipio de la unión (Antioquia, Colombia). revista facultad nacional de Agronomía - Medellín, vol. 63, núm. 1, pp. 5373- 5383.
42. Paúl G. 2009. Caracterización Físico-Química y Evaluación de la Actividad Antifúngica de propóleos recolectados en el suroeste antioqueño. universidad nacional de Colombia sede Medellín Facultad de Ciencias Agropecuarias. tesis de maestría en ciencia y tecnología de alimentos Medellín.
43. Pérez M, Rodríguez C, León S, Rodríguez S, Alvares J, Vega J. 2003. Evaluación Toxicología de una Tintura de propóleos. Revista Acta Farm. Bonaerense 22 (1): 6
44. Popova M, Silici S, Kaftanoglu O, Bankova V. 2005. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. Phytomedicine 12(3) 221-228.



45. Ramirez I. 1972. Estudio bacteriológico y epidemiológico de un brote infeccioso en cobayos (*Cavia porcellus*). Tesis Médico Veterinario. Lima: Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 62 p.
46. Ramírez I. 1972. Estudio bacteriológico y epidemiológico de un brote infeccioso en cobayos (*Cavia porcellus*).
47. Ramos A. y Miranda J. 2007. Propolis: A review of its anti-inflammatory and Healing actions. Revista. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis. V.13, n.4, p.679-710.
48. Sifici S, Kutluca S. 2005. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. Journal of Ethnopharmacology 99(1): 69–73.
49. Sifici S, Kutluca S. 2005. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. Journal of Ethnopharmacology 99 (1): 69–73.
50. Takaisikikuni N, Schilcher H.; 1994. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. Planta Med 60: 222-227
51. Telmo Martínez, Judith Figueroa, Nhora Martínez. 2002. Actividad Antimicrobiana de muestras de Propóleo Colombiano. Lic. Micr. msc. Profesor asociado. Universidad Nacional de Colombia e-mail:jfigueroaa@unal.edu.co.
52. Ferragno R, Caffer M, Bruno S, Binsztein N. 2003. *Salmonella*: aislamiento, identificación y serotipificación. En: Manual de Procedimientos. Argentina: Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas - ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”. 46 p.

53. Tolosa L, Cañizares E. 2002. Obtención, Caracterización y Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de Extractos de Propóleos de Campeche. Revista, *Ars Pharmaceutica*, 43:1-2; 187-204. Universidad de Córdoba, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Instituto de Investigaciones Biológicas del trópico. Montería, Córdoba. Correspondencia: [mattarsalim@hotmail.com](mailto:mattarsalim@hotmail.com)
54. Tovalino F, Quispe Contreras. 2010. Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa - Perú sobre cultivos de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). *Rev Estomatol Herediana*. 20(1):19-24.
55. Velikova M, Bakova V, Sorkun K, Popova S, Kujumgiev A. 2001. Chemical Composition and Biological Activity of Propolis from Turkish and Bulgarian Origin. *Mellifera* 1(1): 57-59.

## ANEXOS

REPETICIONES	TRATAMIENTOS CON SOLUCIONES DE PROPÓLEO				
	T 1	T 2	T 3	T 4	T 5
	300 mg/ml	150 mg/ml	75 mg/ml	37,5 mg/ml	18,7 mg/ml
R 1 (Placa 1)	15 mm	9 mm	5 mm	7 mm	7 mm
R2 (placa 2)	5 mm	10 mm	13 mm	6 mm	8 mm
R 3 (Placa 3)	16 mm	10 mm	10 mm	10 mm	8 mm
R 4 (Placa 4)	9 mm	5 mm	10 mm	6 mm	10 mm
R5 (Placa 5)	16 mm	6 mm	6 mm	5 mm	5 mm
R6 (Placa 6)	11 mm	14 mm	7 mm	7 mm	10 mm
R7 (Placa 7)	10 mm	10 mm	13 mm	11 mm	7 mm
R8 (Placa 8)	15 mm	13 mm	13 mm	13 mm	15 mm
R9 (Placa 9)	15 mm	10 mm	13 mm	11 mm	17 mm

TABLA N° 4: ACTIVIDAD BACTERICIDA *in vitro* DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PROPÓLEOS SOBRE *Salmonella sp.*

## ANOVA

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	G.L.	CUADRADO MEDIA	F <sub>c</sub>	P
TRATAMIENTO	68,2222	4	17,056	1,503	0,219
ERROR	453,7788	40	11,344		
TOTAL	522	44			

TABLA N° 5.

i)  $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5$

(Los diámetros promedio de halo para las diferentes concentraciones de propóleo son iguales).

$H_1: \mu_i \neq \mu_j$

(Al menos uno de los diámetros promedios de halo para las diferentes concentraciones es diferente).

ii) Nivel de significancia:  $\alpha = 0,05$ .

iii) El cuadro de análisis de varianza (ver anexo).

iv) Determinando la región crítica:

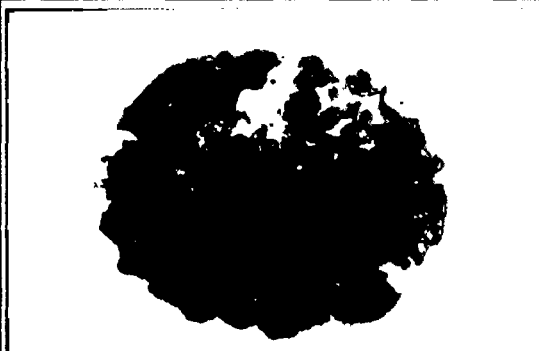

La región crítica para nuestros datos, dado que:  $F_{(4,40)} = 2,606$ .

$RC = [2,606; \infty >$

v) Decisión: Dado que el valor de  $F_c = 1,503 \notin RC = [2,606; + \infty >$ , aceptamos la hipótesis nula ( $H_0$ ) y rechazamos la hipótesis alterna ( $H_1$ ), lo que nos indica que todas las concentraciones de propóleo tienen el mismo diámetro promedio de halo, lo que nos permite concluir que todas las concentraciones de extracto de propóleos tienen la misma actividad

antibacteriana in vitro sobre *Salmonella sp* en cuyes, con un nivel de significancia de 0,05.

FIGURAS.

	
<p>Figura 1: Propóleo recién recolectado.</p>	<p>Figura 2: Pesado de propóleo para su preparación.</p>


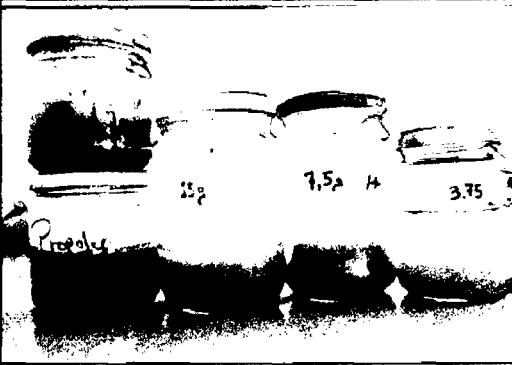
	
<p>Figura 3: Molido de propóleo</p>	<p>Figura 4: Preparación de propóleo a diferentes concentraciones para su maceración.</p>



Figura 5: Envasado de propóleo.



Figura 6: preparado de propóleo al 30%.

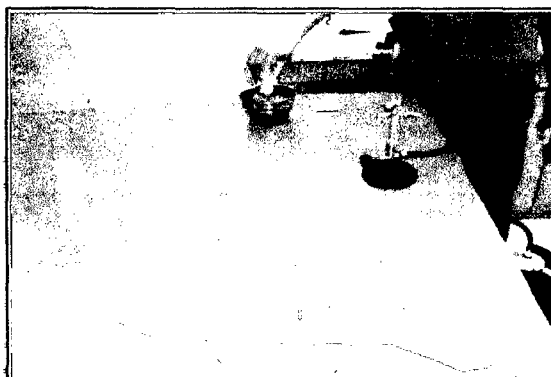


Figura 7: Preparación de materiales para su respectivo esterilización.

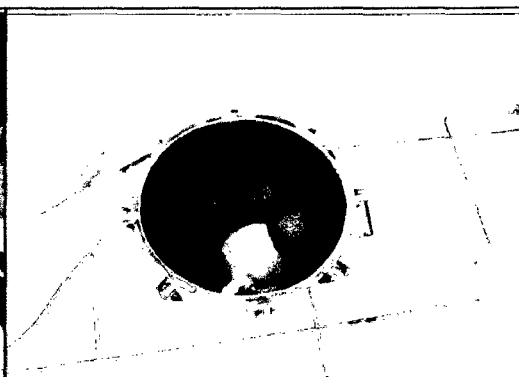
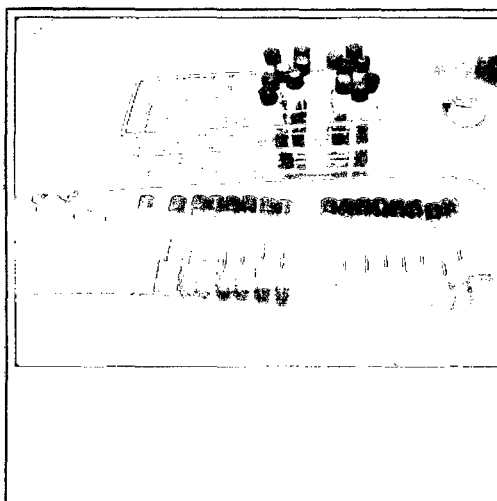
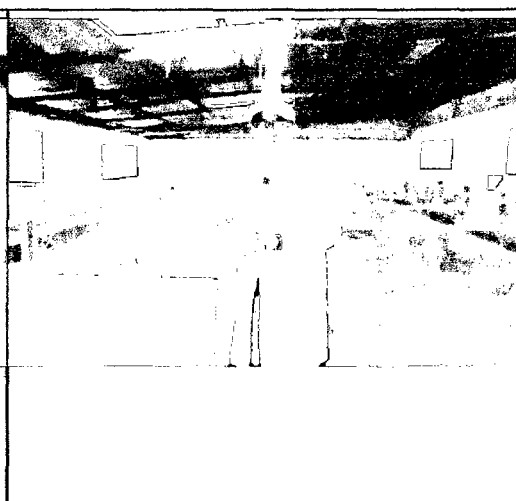




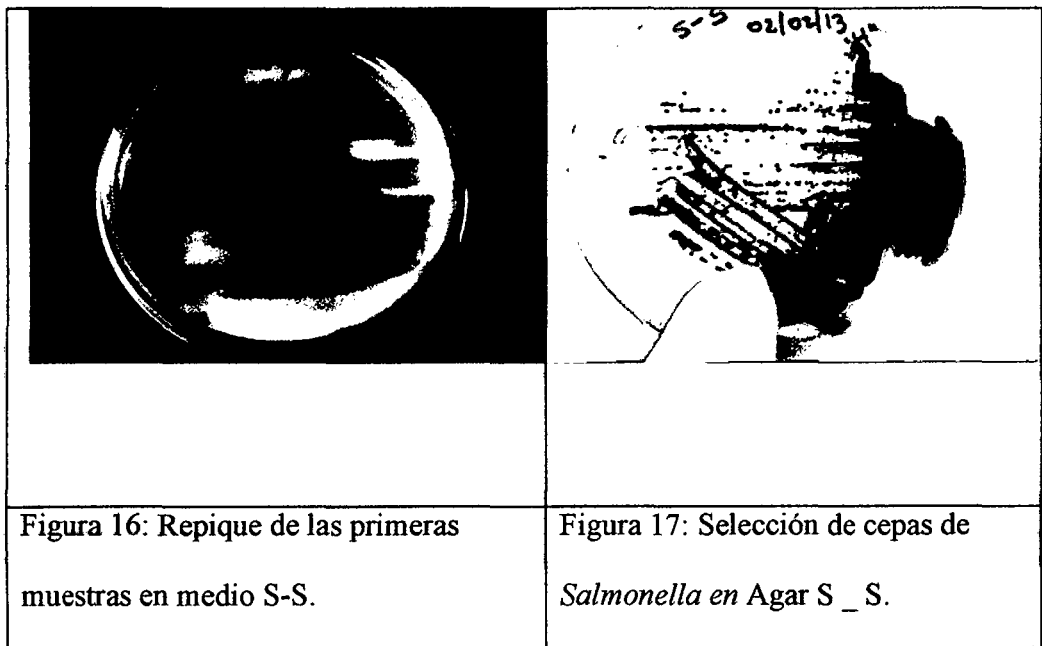
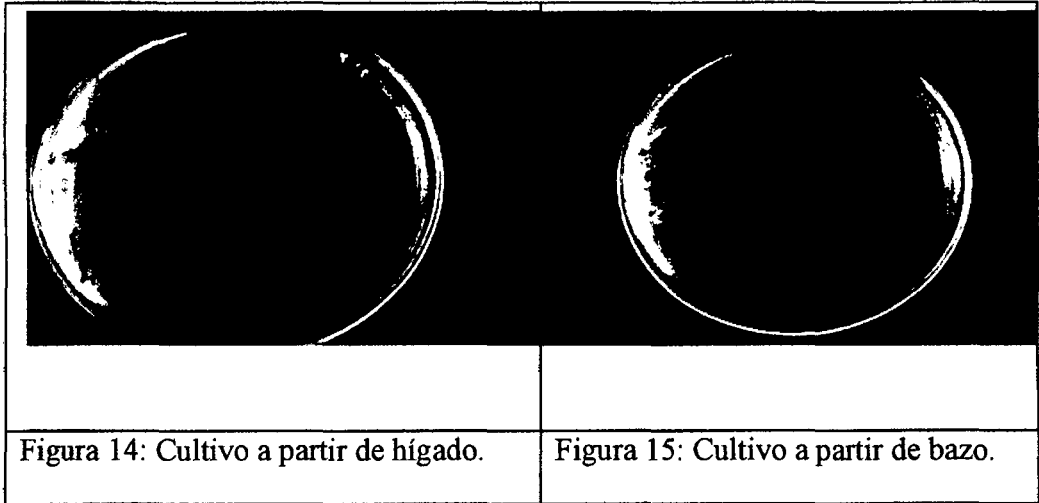
Figura 8: Autoclavado de materiales.



<p>Figura 9: Materiales para preparar medio de cultivo Mac Conkey.</p>	<p>Figura 10: Medios de cultivo listos para plaquear.</p>

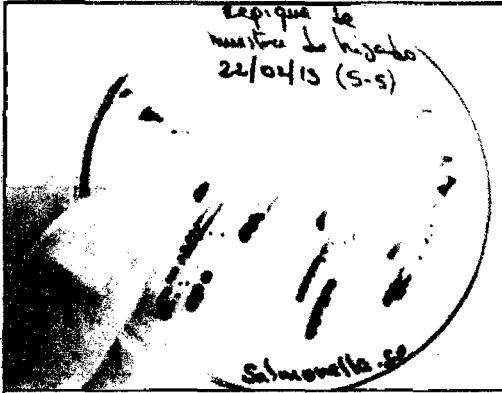

<p>Figura 11: Medios de cultivo plaqueados y rotulados.</p>	<p>Figura 12: Preparación de medios de cultivo para la diferenciación bioquímica.</p>

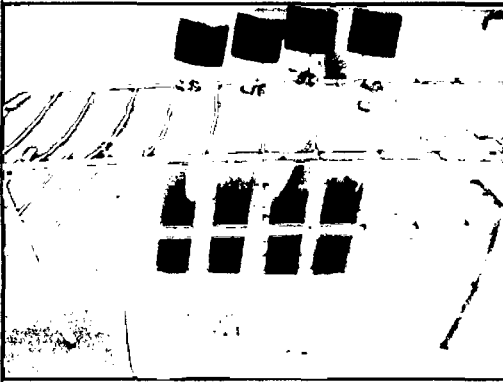
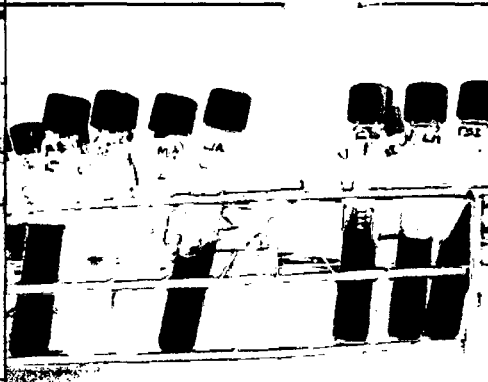
	
<p>Figura 13: Tubos con listos para la diferenciación bioquímica.</p>	<p>Figura14: Cuyes para sacar hisopado anal.</p>


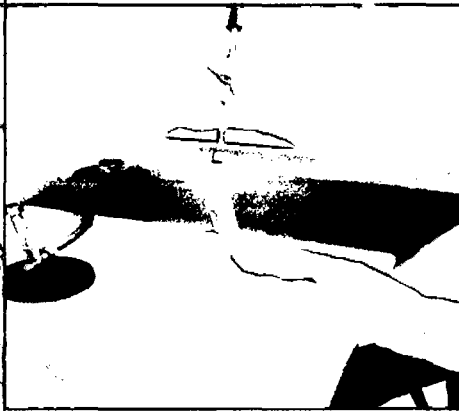
	
<p>Figura 12: Hisopado anal de cuy con síntomas de salmonelosis.</p>	<p>Figura 13: Hígado y bazo de cuy con <i>Salmonelosis</i></p>



	
<p>Figura 18: Repique de cepas de <i>Salmonella</i> en medio S-S.</p>	<p>Figura 19: Selección de cepas de <i>Salmonella</i>.</p>

	
<p>Figura 20: Selección cepas de <i>Salmonella</i> que entraran a la diferenciación bioquímica</p>	<p>Figura 21: Momento de repique de <i>Salmonella</i> en Agar S-S.</p>

	
<p>Figura 20: Diferenciación bioquímica con medios de TSI, LIA, MIO.</p>	<p>Figura 20: otras pruebas de diferenciación bioquímica.</p>

	
<p>Figura 21: Extracción de colonias de salmonella para preparación del inóculo.</p>	<p>Figura 22: Homogenización del inóculo para las pruebas <i>in vitro</i>.</p>

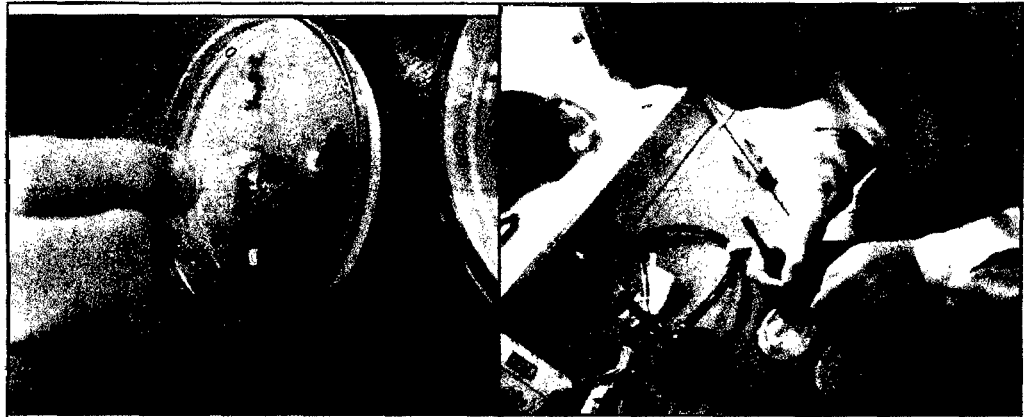


Figura 23: Excavación de placas de Muller Hiltoon.

Figura 24: Rotulado de placas de Muller Hiltoon

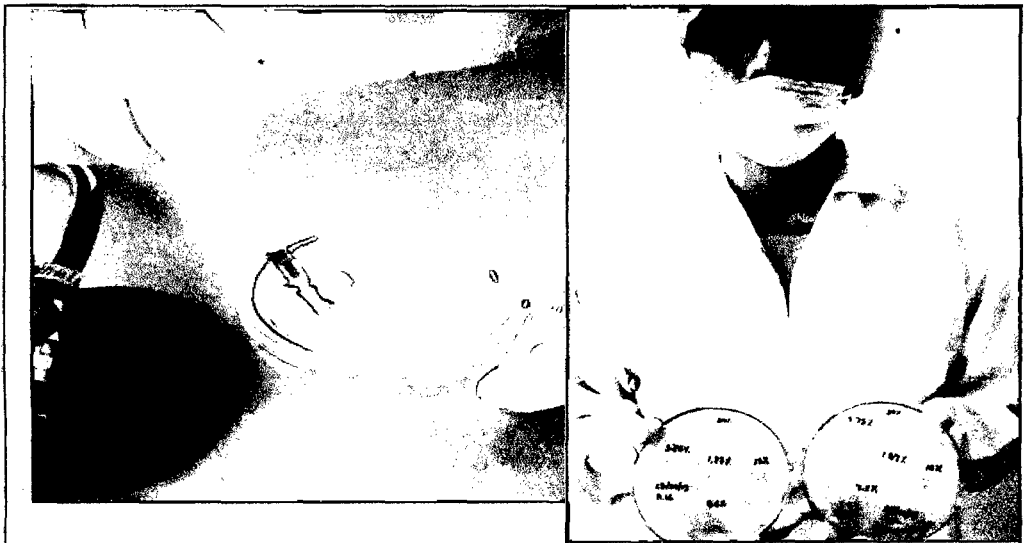


Figura 25: Solución de propóleo en prueba.

Figura 26: Resultados después de 24 horas.

