

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Caracterización de cepas de *Salmonella* aisladas de iguanas en Galápagos

Mateo Daniel Ordoñez Rivera

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de Ingeniero en Procesos Biotecnológicos

Quito, 04 de mayo de 2020

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

Caracterización de cepas de *Salmonella* aisladas de iguanas en Galápagos

Mateo Daniel Ordoñez Rivera

Nombre del profesor, Título académico Gabriel Trueba, Ph.D.

Quito, 04 de mayo de 2020

© Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Nombres y Apellidos: Mateo Daniel Ordoñez Rivera

Código: 00111007

Cédula de Identidad: 1721252466

Lugar y fecha: Quito, mayo de 2020

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

En la actualidad se conoce que una gran variedad de reptiles son portadores de *Salmonella* y recientes casos de salmonelosis en Galápagos ha provocado una atención especial para la identificación de serovares patógenos que puedan provenir de reptiles como iguanas y conocer si existe transmisión hacia humanos. Desde el punto de vista evolutivo es igualmente interesante su identificación ya que al estar aisladas las iguanas y por ende las bacterias presentan características distintas a las bacterias del continente en términos de resistencia a antibióticos. Para la identificación de los serotipos de *Salmonella* aislados de 76 muestras de heces de iguanas de la isla San Cristobal en Galápagos. Los aislados fueron cultivados en BHI y luego se obtuvo su ADN. El siguiente paso consistió en la amplificación de control interno en donde se hizo una PCR, inicialmente de 1.500pb del gen ribosomal 16S con el fin de revisar la calidad del material genético y observar si se produce inhibición en cuanto a la amplificación. Se elaboró un gel de agarosa mediante electroforesis para poder visualizar los resultados con control positivo. A continuación, se observó una amplificación de 605 pb del gen *invA* que es el responsable de codificar para una proteína de invasión que se encuentra en la isla de patogenicidad 1 de la bacteria y que permite confirmar que existe material genético (ADN) de todos los serovares de *Salmonella*. La metodología usada permitió la identificación de hasta 3 serovares de relevancia clínica. Los resultados obtenidos mostraron serovares capaces de generar enfermedad a humanos con relevancia en la salud.

Palabras clave: *Salmonella*, variedades patógenas, presión selectiva, electroforesis, serovar, medio BHI, isla de patogenicidad.

ABSTRACT

It is currently known that a large variety of reptiles are carriers of *Salmonella* and recent cases of salmonellosis in the Galapagos have caused special attention for the identification of pathogenic serovars that may come from reptiles such as iguanas. From an evolutionary perspective, its identification is equally interesting since, as iguanas are isolated, therefore the bacteria present different characteristics (antibiotic resistance) from the bacteria of the continent. Isolates from 76 fecal samples from the San Cristobal island, Galapagos were analyzed. We cultured the isolates in a BHI medium and then extracted the DNA. The next step consisted of the internal control amplification where a PCR was performed, initially of 1,500bp of the 16S ribosomal gene in order to check the quality of the genetic material and observe if inhibition occurs in terms of amplification. Next, we amplified 605 bp fragment of the *invA* gene, which codes for an invasion protein that is found on pathogenicity island 1 of the bacterium and confirms that the DNA came from of all serovar of *Salmonella*. The methodology used allowed the identification of up to thirty serovars of clinical relevance.

Key words: *Salmonella*, pathogenic varieties, selective pressure, electrophoresis, serovar, BHI medium, pathogenicity island.

TABLA DE CONTENIDO

1.INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 <i>Salmonella</i> spp.....	9
1.2 <i>Salmonella</i> en reptiles.....	11
1.3 <i>Salmonella</i> en Ecuador.....	12
1.4 <i>Salmonella</i> en Galápagos.....	13
2. MÉTODOS.....	14
2.1 Recolección de muestras.....	14
2.1.2 Reactivación bacteriana para <i>Salmonella</i> y cultivo.....	14
2.2 Diagnóstico molecular de <i>Salmonella</i> spp.....	14
2.2.1 Extracción de ADN mediante ebullición.....	14
2.2.3 Dilución del material genético (ADN).....	14
2.2.4 Detección de <i>Salmonella</i>	15
2.2.5 Detección de serovares de <i>Salmonella</i> spp.....	15
2.2.6 Identificación molecular.....	16
3.RESULTADOS.....	17
3.1 Calidad del material genético y detección de <i>Salmonella</i>	17
3.2 Detección de serovares de <i>Salmonella</i> spp.....	17
4. DISCUSIÓN.....	19
4.1 Calidad del material genético.....	19
4.2 Detección de <i>Salmonella</i>	19
4.2.2 Detección de serovares de <i>Salmonella</i> spp.....	19
5. CONCLUSIONES.....	21
6. BIBLIOGRAFIA.....	22
7. FIGURAS.....	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura # 1. Perfiles de amplificación de los primers STM y STY.....	24
---	----

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Salmonella* spp.

Las enfermedades zoonóticas se definen como aquellas que puede transmitirse de animales a humanos en donde su trasmisión puede ir desde mordeduras o rasguños, manipulación de los mismos (fluidos, aerosoles), por vectores o por consumo de alimentos que posean el patógeno (Marlen y otros, 2016). En la actualidad uno de los patógenos más relevantes transmitidos por alimentos es la *Salmonella enterica* con especial atención en países en vía de desarrollo por el impacto en la salud pública. En muchos países del mundo que incluyen países desarrollados de la Unión Europea, Estados Unidos y países en vías de desarrollo como Ecuador, Bolivia entre otros es el patógeno que provoca más enfermedades por vía alimentaria. Existen grupos vulnerables a infecciones por *Salmonella* que son las personas de corta edad y los adultos mayores especialmente. Se conoce que la causa más común para contraer *Salmonella* es la insalubridad y en especial el desconocimiento de las normas de higiene y prevención (Barreto y otros, 2016).

Los casos reportados en Latinoamérica no son muy confiables debido a que el sistema sanitario en muchos países es deficiente y muchas veces es esta la razón por la que las estadísticas muestran datos que reflejan otra realidad. En el caso de la *Salmonella*, Latinoamérica registra el segundo censo más bajo respecto a enfermedades de transmisión por alimentos con 9.000 muertes al año en promedio (Olivo y Sánchez, 2017).

A nivel mundial existe una creciente preocupación por la resistencia a antibióticos donde se incluye la *Salmonella*, siendo un problema con alta relevancia clínica. Es por esta razón que es necesario entender de mejor manera a poblaciones aisladas que no han tenido presión selectiva por parte de los antibióticos para saber su sensibilidad (Sylvester y otros, 2013).

Esta bacteria pertenece a la familia Enterobacteriaceae, se grupa como Gram-negativa y se divide principalmente en las especies *Salmonella entérica* y *Salmonella bongori* las cuales presentan la peculiaridad de ser bacterias intracelulares facultativas y que tienen la capacidad generar enfermedad en humanos. Existe especial atención en la especie *Salmonella entérica* ya que se conoce que tienen alta patogenicidad y se han descubierto más de 2610 serovariedades (Marlen y otros, 2016). En los mamíferos las subespecies de *entérica* son las responsables de causar enfermedad y entre estas serovariedades existe un 90% de similitud en cuanto a su ADN. Para este caso existen diferencias en cuanto a los hospederos y también en la sintomatología clínica de los enfermos. De manera general encontramos con mayor relevancia a los serovares Enteritidis y Typhimurium que causan gastroenteritis en personas, en los ratones se produce una afectación sistémica y las aves son asintomáticas. Otros serovariedades de relevancia clínica son Typhi (tifoidea), que genera únicamente enfermedad en humanos. A nivel mundial las serovariedades Enteritidis y Typhimurium son los agentes causales de enfermedad más identificados (Tomastikova y otros, 2017).

La transmisión de esta bacteria al ser humano es por contaminación fecal que puede ser directa o de manera indirecta mediante la ingestión de alimentos o agua contaminada. Tiene la capacidad de subsistir al pH del estómago, así como también a su osmolaridad elevada en el intestino delgado lo que provoca que se interne en las células del epitelio del íleon resistiendo la fagocitosis y de esta manera siendo capaz de establecerse en el tejido linfoide y los ganglios linfáticos mesentéricos (Tomastikova y otros, 2017).

De esta manera se conoce que los macrófagos son las células blanco durante su diseminación debido al hecho de que la *Salmonella* se instaura en un sector ácido que se conoce como vacuola y es ahí donde evade la lisis que pueden generar distintos componentes lisosomales y de esta forma se multiplica y coloniza regiones como el tejido del intestino u otras partes generando infecciones locales como sistémicas (Tomastikova y otros, 2017).

1.2 *Salmonella* en reptiles

Se conoce que muchos reptiles como las iguanas son reservorios de *Salmonella*. Existen estudios que muestran que aproximadamente el 90% de los reptiles tienen el patógeno en su intestino incluyendo una amplia gama de serovariedades, que incluyen a las serovariedades más comunes que causan enfermedad en el ser humano que son *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*. La forma común en que los reptiles eliminan este patógeno es por las heces, siendo posible eliminar distintas serovariedades en una deposición y generar contaminación tanto del agua como de cultivos (Barreto y otros, 2016). De acuerdo a historias clínicas en distintas veterinarias son raras las manifestaciones sintomáticas en reptiles. Se sabe que el desarrollo de la enfermedad en humanos por otra parte depende de la virulencia de una determinada serovariedad. De esta manera la infección se da principalmente por el contacto directo con los reptiles, así como por medio de los alimentos contaminados (Tomastikova y otros, 2017).

Se han reportado casos de salmonelosis en distintas partes del mundo provenientes de reptiles y con especial impacto en los niños requiriendo hospitalización. En Estados Unidos se han reportado casos de salmonelosis con diferente gravedad transmitidas por reptiles entre estas iguanas, donde el serotipo prevalente es el Marina, así también se han reportado casos en las Indias Occidentales, en República Checa y varios países en donde existe contacto con reptiles como el Ecuador y en especial en las Islas Galápagos (Amadi y otros, 2017).

1.3 *Salmonella* en Ecuador

En el Ecuador las enfermedades por *Salmonella* son comunes y tienden a tener un subregistro, especialmente debido a que la mayoría cursa con síntomas leves y sin tratamiento específico, por lo que no acude al médico y no se genera un reporte. De acuerdo a las estadísticas obtenidas en el ministerio de Salud Pública en el año 2019 desde enero hasta junio se reportaron un total de 963 casos, en su mayoría en el Guayas con 292 (MSP, 2019). De manera General en Ecuador el grupo de edad más afectado va de 21 a 49 años. Es importante comparar con años anteriores ya que existe una disminución de casos desde el 2014 hasta el 2016 pero luego un nuevo incremento hasta el 2019 (MSP, 2019). De acuerdo a la gaceta epidemiológica publicada por el MSP en Ecuador para el 2014 se reportaron un total de 3331 infecciones, en el 2015 decrece a 2727 y en 2016 se reportan 1893 casos (Ministerio de Salud Pública, 2018). A partir del año 2017 vuelve a incrementarse a 2.063 casos y para el 2018 se reportan 2.680 casos (Ministerio de Salud Pública, 2017).

Es importante mencionar que en 2014 se hicieron muchas campañas de higiene y prevención lo que pudo generar esta disminución. El repunte que se produce a partir del 2017 pudo generarse porque se dejó de hacer estas campañas y la disminución genera confianza en las personas y por este mismo hecho una relajación en las medidas de prevención e higiene (Olivo y Sánchez, 2017).

1.4 *Salmonella* en Galápagos

Con los datos actualizados por parte del MSP desde enero hasta junio de 2019 Galápagos ocupa el puesto número 7 a nivel de provincias presentando un total de 34 casos (MSP, 2019). En el año 2017 no se registra ningún caso de salmonelosis en estas Islas y para el 2018 se reportan únicamente 4 casos (Ministerio de Salud Pública, 2017).

Con los datos mostrados observamos un claro incremento en las islas Galápagos pese a que solo se tiene información oficial hasta mediados del año 2019. De esta manera se ha hecho relevante el estudio en esta zona, donde se sospecha que las infecciones pueden provenir también de reptiles como las iguanas ya que lleva a suponer que pueden existir otras maneras de transmisión que no están siendo atendidas de manera adecuada por las autoridades y que es el resultado de este incremento en las islas. En 2012 se hizo un estudio en Galápagos donde se demostró que el aislamiento, es decir la limitación en la dispersión de las iguanas estructura a las poblaciones bacterianas (Launka, 2012).

En el mismo estudio se evidenció que en el caso de que se produzca transmisión por alimentos las bacterias entéricas pueden dispersarse a mayor distancia, aunque no fue concluyente respecto a la causa, donde se explica que puede ocurrir naturalmente o puede tratarse de una excepción antropogénica. En el estudio se caracterizó a los aislamientos de *Salmonella entérica* de heces de iguanas y se identificó un conjunto de serovares únicos y casi exclusivos siendo indicando que existe una estructuración de acuerdo al gradiente geográfico. De esta manera el estudio concluye en que estas bacterias tienen una limitación en su dispersión de acuerdo a barreras geográficas y en este caso el océano (Launka, 2012)

2. MÉTODOS

2.1. Reactivación bacteriana para *Salmonella* y cultivo

Se reactivó a las bacterias en un medio BHI (Brain heart infusión), para lo cual se usó un hisopo para obtener la mayor cantidad de bacterias de las muestras previamente congeladas y se las cultivó mediante la técnica de estriado para su incubación a una temperatura de 37 ° C por 24 horas (Masato y otros 2011).

2.2 Diagnóstico molecular de *Salmonella* spp

2.2.1 Extracción de ADN mediante ebullición

Usando el proceso mediante ebullición de acuerdo al protocolo de Coll y colaboradores (referencia), se añadió 500µL de agua destilada estéril dentro de un tubo Eppendorf de volumen 1.5 ml y se seleccionó en promedio 6 colonias de *Salmonella* del medio BHI, se procedió a etiquetar el tubo y se lo ubicó dentro del termobloque a una temperatura de 100°C por 10 minutos. Se llevó la muestra a un congelador a -20°C por 24 horas y se repitió el proceso de ebullición y congelación exactamente como ya fue descrito. Finalmente se centrifugó el tubo con 12.000 xg por 5 minutos y se llevó el sobrenadante a otro tubo en una congeladora con las mismas condiciones mencionadas para futuras pruebas (Masato y otros 2011).

2.2.2 Amplificación control interno

Se ejecutó una amplificación mediante PCR del gen ribosomal 16S para conocer la calidad del material genético y conocer si existe inhibición (Masato y otros 2011).

2.2.3 Dilución del material genético (ADN)

Se trabajó con una dilución de ADN de 50 µL y 50 µL de agua estéril (Masato y otros 2011).

2.2.4 Detección de *Salmonella*

Se realizó la amplificación del gen *invA* para verificar presencia de ADN correspondiente a cualquier serovariedades del género *Salmonella* (Kim y otros, 2006).

2.2.5 Detección de serovariedades de *Salmonella spp*

Se usaron los primers STM y STY para la amplificación, de acuerdo al protocolo establecido en “Identificación molecular de cepas de *Salmonella* patógena en carne de pollo y derivados” del Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito. El control positivo consistió en el uso de la cepa *S. Typhimurium* (Kim y otros, 2006).

Tabla 1: Reactivos, concentración y volumen para amplificación STM.

Reactivos	Concentración	Volumen
Buffer de reacción	5X	2.8 µL
MgCl ₂	25 mM	0.8 µL
dNTPs	2 mM	1 µL
Primer STM1 Forward	10 uM	0.3 µL
Primer STM1 Reverse	10 uM	0.3 µL
Primer STM2 Forward	10 uM	0.3 µL
Primer STM2 Reverse	10 uM	0.3 µL
Primer STM3 Forward	10 uM	0.3 µL
Primer STM3 Reverse	10 uM	0.3 µL
Primer STM4 Forward	10 uM	0.3 µL
Primer STM4 Reverse	10 uM	0.3 µL
Primer STM5 Forward	10 uM	0.3 µL
Primer STM5 Reverse	10 uM	0.3 µL
GoTaq polimerasa	5 U/ul	0.15 µL
ADN		1 µL
H ₂ O		1.25 µL
Volumen final		10 µL

Fuente: Manual de microbiología para la identificación de cepas de *Salmonella*, USFQ

Tabla 2: Reactivos, concentración y volumen para amplificación STY

Reactivos	Concentración	Volumen
Buffer de reacción	5X	3.2 µL
MgCl ₂	25 mM	0.8 µL
dNTPs	2 mM	1 µL
Primer STY1 Forward	10 uM	0.08 µL
Primer STY1 Reverse	10 uM	0.08 µL
Primer STY2 Forward	10 uM	0.08 µL
Primer STY2 Reverse	10 uM	0.08 µL
Primer STM6 Forward	10 uM	0.08 µL
Primer STM6 Reverse	10 uM	0.08 µL
Primer STY3 Forward	10 uM	0.3 µL
Primer STY3 Reverse	10 uM	0.3 µL
Primer ST4 Forward	10 uM	0.1 µL
Primer STY4 Reverse	10 uM	0.1 µL
GoTaq polimerasa	5 U/ul	0.15 µL
ADN		1 µL
H ₂ O		1.25 µL
Volumen final		10 µL

Ambas reacciones usan un programa de amplificación igual

Fuente: Manual de microbiología para la identificación de cepas de *Salmonella*, USFQ

Tabla 3: Programa de amplificación del STM – STY

Desnaturalización	94°C por 4 minutos
Alineamiento y templado	35 ciclos de 10 segundos a 98°C
Extensión	30 segundos a 60°C y 72°C durante 30 segundos
Extensión final	72°C durante 5 minutos

Para la visualización de los resultados en cuanto a las reacciones por los primers STM y STY se elaboró un gel de agarosa al 2.5% y se corrió una electroforesis por 3 horas a 80V usando la tinción de bromuro de etidio. Fue necesario usar un marcador de peso molecular de 50 pb para distinguir las bandas de acuerdo a sus diferentes tamaños moleculares (Kim y otros, 2016).

2.2.6 Identificación molecular

Se enviaron los productos obtenidos por PCR para su secuenciación a una empresa en Estados Unidos Biosciences. Estas secuencias fueron analizadas mediante el programa MEGA X. Para la identificación la base fueron las homologías existentes en la base de datos del NCBI usando el programa Basic Alignment Search Tool (BLAST)

3. RESULTADOS

3.1 Calidad del material genético y detección de *Salmonella*

El material genético obtenido mostró buena calidad ya que se obtuvo una amplificación del gen ribosomal 16S de 1500 pb visualizado en un gel de agarosa al 1.5%.

En cuanto a la detección de *Salmonella* se pudo encontrar primeramente una amplificación de 605 pb del gen *invA* que es el responsable de codificar para una proteína de invasión que se encuentra en la isla de patogenicidad 1 de la bacteria y que permite confirmar que existe material genético (ADN) de todos los serovares de *Salmonella*.

3.2 Detección de serovares de *Salmonella spp*

Se identificaron tres serovariedades de *Salmonella* que son Braenderup, Hadar y Bovismorficans de acuerdo al patrón de amplificación de los primers STM y STY y muchas muestras no pudieron ser identificadas.

Tabla 4: Serotipos de *Salmonella enterica* subespecie entérica usados en la PCR multiplex en las amplificaciones STM y STY

Muestra	Patrón de Amplificación		Serovar
	STM	STY	
CS5	2,5	0	<i>Braenderup</i>
CS7	2,3,5	1	<i>Sin identificar</i>
CS8	0	0	
CS12	2,5	1	<i>Sin identificar</i>
CS16	3,5	0	<i>Hadar</i>
CS17	5	0	<i>Sin identificar</i>
CS23	2	0	<i>Sin identificar</i>
CS31	2	0	<i>Sin identificar</i>
CS35	2,5	2	<i>Sin identificar</i>
CS36	5	0	<i>Sin identificar</i>
CS52	0	1	<i>Sin identificar</i>
CS55	2,5	0	<i>Braenderup</i>
CS57			
CS58	2,5	2	<i>Sin identificar</i>
CS64	2,3,5	0	<i>Bovismorbificans</i>
CS70	2	1,2	<i>Sin identificar</i>
CS71	2,5	0	<i>Braenderup</i>
CS73			
CS74	0	0	
CS76	2,5	2	<i>Sin identificar</i>

4. DISCUSIÓN

4.1 Calidad del material genético

La evaluación de la calidad del material genético es el paso fundamental en un experimento de caracterización microbiana ya que los resultados nos indican si es adecuado continuar con el experimento o por el contrario es necesario obtener nuevo material genético con el cual seguir la investigación. En este proyecto la amplificación del gen ribosomal 16S de 1.500 pb nos permitió conocer que el material genético (ADN) es de buena calidad, específicamente porque no existió evidencia de su inhibición.

4.2 Detección de *Salmonella*

La amplificación que se visualizó en el gel de agarosa de 605 pb corresponde al gen *invA* y por esta razón podemos confirmar que el material genético proviene de *Salmonella*. Por esta misma razón se confirma que el transporte y almacenamiento de muestras fue manejado correctamente y a temperaturas óptimas. Es igual evidente que la reactivación bacteriana fue efectiva y que el cultivo en el medio BHI y la extracción de ADN fueron ejecutadas de manera adecuada.

4.2.2 Detección de serovares de *Salmonella spp*

Los serovares identificados que se observan en la tabla 4 son Hadar, Braenderup y Bovismorficans los cuales se conoce que causan enfermedad en humanos y en ciertos animales, lo que tiene relevancia clínica. Se conoce que la serovariedad Hadar ha sido aislada en distintos países y que se han hecho ensayos sobre su sensibilidad a antibióticos (Soares y otros, 2007).

En Brasil en 2007 ciertas cepas aisladas mostraron resistencia a antibióticos, pero se mostraron sensibles a antibióticos de tercera generación (Soares y otros, 2007). En cuanto a la serovariedad Braenderup un estudio hecho en Colombia en 2016, de un total de 93 serovariedades identificadas, 9 resultaron predominantes, entre estas Braenderup, las cuales presentaban altos porcentajes de resistencia a antibióticos (Rodríguez, 2016). Respecto a la serovariedad Bovismorficans un estudio hecho en México en 2019 mostró su prevalencia y su resistencia a diversos antibióticos como hacia la penicilina el cloranfenicol, sulfonamidas y a la tetraciclina (Contreras, 2019).

Es importante mencionar que los estudios descritos son a partir de muestras de mamíferos, en especial aves ya que es el mayor foco de contagio, donde se ha venido usando rutinariamente antibióticos para el tratamiento de estas infecciones lo cual ha demostrado generar una presión selectiva para la resistencia microbiana (Contreras, 2019).

En este estudio las muestras analizadas fueron de heces de iguanas, es decir provenientes de un reptil y también fueron tomadas de las islas Galápagos lo que implica un aislamiento geográfico de las iguanas y de las bacterias. Se conoce que el aislamiento geográfico tiene implicaciones evolutivas tanto a largo como a corto plazo y por esa razón se sospecha que estas muestras puedan tener especial sensibilidad a todos los antibióticos usados (Launka, 2012).

5. CONCLUSIONES

Las serovariedades identificadas tienen relevancia clínica y se puede concluir que muchos brotes en Galápagos son producidos por la transmisión directa, es decir con contacto con el animal e indirectamente mediante contaminación del agua y cultivos por heces de iguanas que finalmente son ingeridas por las personas por la alimentación principalmente. Es importante que exista una constante vigilancia sobre brotes de *Salmonella* en el país. La identificación de serovariedades y el monitoreo de la resistencia a antibióticos es necesario ya que permite aportar bases para encontrar mejores tratamientos a las infecciones y también para determinar el foco de contagio y efectuar correctamente campañas de prevención y de higiene.

6. BIBLIOGRAFIA

Amadi, V., Hariharan, H., Arya, H., Matthew, V., Thomas, R., Pinckney, P., Sharma, R., Johnson, R., Serovars and antimicrobial resistance of non-typhoidal *Salmonella* isolated from non-diarrhoeic dogs in Grenada, West Indies, *Veterinary Medicine and Science*, **4**, 1, (26-34), (2017).

Barreto, M., Castillo, M., Retamal, P. (2016). *Salmonella* entérica: una revisión de la trilogía agente, hospedero y ambiente, y su trascendencia en Chile. *Revista chilena de infectología*, **33** (5), 547-557. 25/04/2020, de www.sochinf.c.

Contreras, M. B., Medrano-Félix, J. A., Ibarra-Rodríguez, J. R., Martínez-Urtaza, J., Chaidez, Q. C., & Castro-del Campo, N. (2019). The last 50 years of *Salmonella* in Mexico: Sources of isolation and factors that influence its prevalence and diversity. *Revista bio ciencias*, **6**(spe), e540. Epub 14 de noviembre de 2019. <https://dx.doi.org/10.15741/revbio.06.nesp.e540>

Fundación Charles Darwin (FCD) y WWF-Ecuador. (2018). Atlas de Galápagos, Ecuador: Especies Nativas e Invasoras. Quito, FCD y WWF-Ecuador.

Jonathan Mermin, Bruce Hoar and Frederick J. Angulo
Pediatrics March 1997, **99** (3) 399-402; DOI: <https://doi.org/10.1542/peds.99.3.39>

Kim, S., J. G. Frye, J. Hu, P. J. Fedorka-Cray, R. Gautom, and D. S. Boyle. (2006). “Multiplex PCR-Based Method for Identification of Common Clinical Serotypes of *Salmonella* Enterica Subsp. Enterica.” *Journal of Clinical Microbiology* **44** (10): 3608–15. doi:10.1128/JCM.00701-06.

Launka EW, Cruz Bedon L, Mackie RI. (2012). *Salmonella* Strains Isolated from Galápagos Iguanas Show Spatial Structuring of Serovar and Genomic Diversity. *PLoS ONE* **7**(5): e37302. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037302>.

Masato, A., Kusumoto, K., Iwata, T. (2011). “Rapid Identification of *Salmonella* Enterica Serovars, Typhimurium, Choleraesuis, Infantis, Hadar, Enteritidis, Dublin and Gallinarum, by Multiplex PCR.” *Journal of Microbiological Methods* **85** (1): 9–15. doi:10.1016/j.mimet.2011.02.002.

Marilyn C. Erickson, Overview: Foodborne Pathogens in Wildlife Populations, Food Safety Risks from Wildlife, 10.1007/978-3-319-24442-6_1, (1-30), (2015).

Ministerio de Salud Pública. (2018). Gaceta Epidemiológica Semanal No.52. 01/05/2018, de MSP Sitio web: <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2013/02/GACETA-GENERAL-S52.pdf>

Ministerio de Salud Pública. (2017). Gaceta Epidemiológica Semanal.52. 2017, de MSP Sitio web: <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2013/02/Gaceta-General-SE52.pdf>

MSP. (2019). Enfermedades Transmitidas por Agua y Alimentos. 30/04/2020, de MSP Sitio web: https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/10/ETAS-SE-38_2019.pdf

Soares, C., Almeida, M., Torres, N., Festivo, M., Costa, Renata Garcia, Reis, Eliane Moura Falavina dos, & Rodrigues, Dália dos Prazeres. (2007). Salmonella Hadar phage types isolated from different sources of foodchain in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(4), 620-623. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000400008>

Olivo, C., Sánchez, V. (2017). ANÁLISIS DE LA TENDENCIA DE INFECCIONES DEBIDAS A SALMONELLA EN LOS ÚLTIMOS DOS AÑOS EN LA ZONA 3, COTOPAXI Y TUNGURAHUA. 28/04/2020, de UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD Sitio web:<http://repositorio.unemi.edu.ec/bitstream/123456789/3624/1/AN%20C3%81LISIS%20DE%20LA%20TENDENCIA%20DE%20INFECCIONES%20DEBIDAS%20A%20SALMONELLA%20EN%20LOS%20C3%9ALTIMOS%20DOS%20A%20C3%91OS%20EN%20LA%20ZONA%203%20CANO%20Y%20SANCHEZ.pdf>

Rodríguez, E., Díaz, P., Morena, J., Bautista, A., Montaña, L., Realpe, M., Gasperab, A. Magdalena Wiesnera,. (2016). Vigilancia por laboratorio de Salmonella enterica en casos clínicos humanos en Colombia 2005 a 2011. Elsevier, Vol. 35. Núm. 7., 417-425 . 02/05/2020, De <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-vigilancia-por-laboratorio-salmonella-enterica-S0213005X16300088>

Sylvester, V., Amadi, R., Pinckney, C., N. L. Macpherson J. S. McKibben R. Bruhl-Day R. Johnson H. Hariharan. (2013). Prevalence, Serovars and Antimicrobial Susceptibility of Salmonella spp. from Wild and Domestic Green Iguanas (*Iguana iguana*) in Grenada, West Indies.

Tomastikova, Z., Barazorda, R., Knotek, Z., R. Karpiskova. (2017). Prevalence and characteristics of Salmonella species isolated from captive reptiles in the Czech Republic. *Veterinarni Medicina*, 62, 2017 (08), 456–469. 20/05/2020, De VETMED

7. FIGURAS

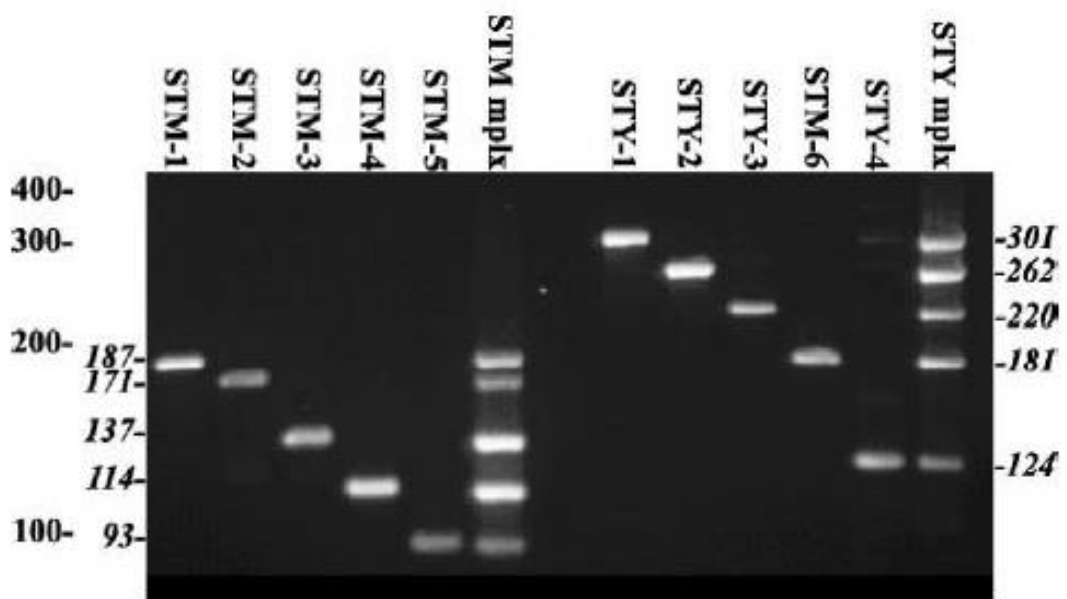


Figura 1: Perfiles de amplificación de los primers STM y STY

