

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA**  
**COLEGIO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**



**TESIS:**

**“ACTIVIDAD INHIBITORIA DEL EXTRACTO DE AJO (*Allium sativum*)  
CONTRA *Salmonella* spp AISLADA DE HECES DE GALLINAS EN  
PRODUCCIÓN DE HUEVO”**

**Que para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias Agropecuarias**

**PRESENTA:**

Miguel Antonio Cárdenas Contreras

**DIRECTOR DE TESIS:**

Dr. Jesús José Portillo Loera

**CO-DIRECTOR DE TESIS**

Dr. Francisco Gerardo Ríos Rincón

**ASESORES**

Dra. Idalia Enríquez Verdugo

Dr. Ramón Ignacio Castillo López

MC. Carlos Bell Castro Tamayo

ESTA TESIS FUE REALIZADA POR **MIGUEL ANTONIO CÁRDENAS CONTRERAS**,  
BAJO LA DIRECCIÓN DEL CONSEJO PARTICULAR QUE SE INDICA, Y HA SIDO  
APROBADA POR EL MISMO, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL  
GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**  
CONSEJO PARTICULAR

DIRECTOR

---

Dr. Jesús José Portillo Loera

CO-DIRECTOR

---

Dr. Francisco Gerardo Ríos Rincón

ASESORA

---

Dra. Idalia Enríquez Verdugo

ASESOR

---

Dr. Ramón Ignacio Castillo López

ASESOR

---

MC. Carlos Bell Castro Tamayo

CULIACÁN ROSALES, SINALOA, AGOSTO DE 2018



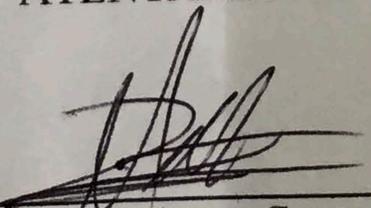
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA**  
**COLEGIO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA CULIACÁN  
FACULTAD DE AGRONOMÍA VALLE DEL FUERTE  
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR  
FACULTAD DE AGRONOMÍA VALLE DEL CARRIZO

En la Ciudad de Culiacán Rosales, Sinaloa, el día 20 de enero del año 2020, el que suscribe Miguel Antonio Cárdenas Contreras, alumno del Programa de Maestría en Ciencias Agropecuarias, con número de cuenta 0437659-5, de la Unidad Académica Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, del Colegio de Ciencias Agropecuarias de la UAS, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dr. Jesús José Portillo Loera y Dr. Francisco Gerardo Ríos Rincón y cede los derechos del trabajo titulado "Actividad inhibitoria del extracto de ajo sobre *Salmonella* spp aislada de heces de gallinas", a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, del Colegio de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Sinaloa, para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales, todo esto en apego al artículo 27 de la Ley Federal de Derechos de Autor.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ATENTAMENTE

  
Miguel Antonio Cárdenas Contreras

## **DEDICATORIA**

### **A mi esposa, Anabel Robledo.**

Dentro de mi recorrido por la vida, me he dado cuenta que encontré destrezas y habilidades que jamás pensé tener, pero lo realmente importante es que en este camino descubrí que siempre obtendré un mejor resultado si lo realizo con la ayuda y compañía perfecta; dentro del desarrollo de esta tesis se presentaron muchos momentos en los cuales pareciera que los deberes y compromisos fueran imposibles de cumplir, pero también entendí, que el apoyo, la ayuda y consejos idóneos, siempre llegan justo en el momento que se necesitan. Por esto y mucho más, quiero dedicar esta tesis a mi esposa, que estuvo apoyándome en cada decisión, que tuvo paciencia, confianza y entrega hacia mí, a ella, le dedico y agradezco infinitamente, porque con su apoyo incondicional, hoy puedo con alegría presentar y disfrutar esta tesis.

### **A mi madre, Mercedes Contreras.**

Por haber confiado siempre en mí, por sus sabios consejos, valores y la motivación constante de superación para ser mejor cada día, pero más que nada, por su amor incondicional, no hay palabras para agradecer todo lo que has hecho por mí. Mamá gracias por el esfuerzo durante tantos años para poder darme una carrera para mi futuro, todo esto, te lo debo a ti, a tus esfuerzos y perseverancia.

### **A mi hija, Ana Victoria “mi chaparrita”.**

En muchos de esos momentos durante el desarrollo de esta tesis, que parecía que el tiempo se hiciera más corto y que había más cosas por hacer, me detuve y pensé en ella, recordando qué si quería lo mejor para ella, debía esforzarme y realizar todos los sacrificios que fueran necesarios. Ella fue mi motivación más importante, ella fue la causante de mi anhelo de salir adelante, ser mejor y culminar con éxito esta tesis, por eso, dedico a ella cada esfuerzo que realicé y agradezco a dios por darme tan hermosa compañía. Gracias a mi hija por hacer de mí, el padre más feliz.

## **AGRADECIMIENTOS**

- Al Dr. Jesús José Portillo Loera, mi director de tesis, que siempre estuvo ahí para ofrecerme orientación, su amistad y compartir sus conocimientos y experiencias en el área de la investigación, que contribuyó en gran medida a mi éxito de hoy.
- Al Dr. Francisco Gerardo Ríos Rincón, codirector de tesis por su amistad y apoyo brindado durante la realización de esta tesis.
- A la Dra. Idalia Enríquez Verdugo, por su amistad y apoyo para la realización de esta tesis y que además me permitieron aprender mucho más que lo estudiado en el proyecto.
- Al Dr. Juan Eulogio Guerra Liera, Ing. Luciano Abelino López Juárez, Dr. Miguel Ángel Gastélum Delgado y al Dr. Jorge Fabio Inzunza Castro de la Facultad de Agronomía en la Universidad Autónoma de Sinaloa, por el apoyo, consejos y amistad que me ayudaron a culminar con éxito esta etapa tan importante en mi formación profesional y personal.
- A todos los profesores y asesores que me guiaron y apoyaron en esta etapa: Carlos Bell Castro Tamayo, Ramón Ignacio Castillo López, Rubén Barajas Cruz, Arnulfo Montero Pardo, Christian de Jesús Urías Castro, Javier Alonso Romo Rubio, Nohemí Castro del Campo y Higinio Cepeda Quintero, gracias por su valioso apoyo.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico durante el programa de Maestría en Ciencias Agropecuarias (CVU716638).
- Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) Unidad Culiacán, especialmente al área de Microbiología del Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria (LANIIA), a todo el personal y alumnos por la buena disposición que siempre mostraron, especialmente a la Dra. Nohelia Castro del Campo, MC. María Belia Contreras Soto y Q.F.B. Célida Isabel Martínez Rodríguez que me brindaron la oportunidad de realizar satisfactoriamente mi estancia de investigación en LANIIA, gracias por todo.
- A mis tíos: Oscar, Armando y Marco Antonio Contreras, porque siempre me impulsan a ser mejor cada día y me apoyan en todo momento desde el inicio de mi formación profesional.
- A Cesar Noé Badilla, Irvin González, Isidro Márquez y Juan Daniel Lira por el valioso apoyo que me brindaron en las actividades de la fase experimental.

## CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
<b>2.1 Panorama de la producción de huevo.....</b>	<b>3</b>
2.1.1 Contenido nutrimental y características físico-químicas del huevo de gallina....	3
<b>2.2 Enfermedades transmitidas por alimentos.....</b>	<b>6</b>
2.2.1 Causadas por bacterias.....	7
2.2.2 Causadas por virus.....	7
2.2.3 Causadas por céstodos y protozoarios.....	7
2.2.4 Causadas por productos químicos.....	7
<b>2.3 Enfermedades transmitidas por el consumo de huevo.....</b>	<b>8</b>
2.3.1 <i>Salmonella</i> spp.....	8
2.3.1.1 <i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>enterica</i> serovariedad Enteritidis (S. Enteritidis).....	15
<b>2.4 Antibióticos promotores del crecimiento en la avicultura.....</b>	<b>19</b>
2.4.1 Aditivos alimentarios.....	20
2.4.2 Resistencia bacteriana.....	21
2.4.2.1 Resistencia a los antibióticos en el género <i>Salmonella</i> .....	22
<b>2.5 Inmunización contra <i>Salmonella</i> Enteritidis.....</b>	<b>23</b>
<b>2.6 Fito bióticos.....</b>	<b>24</b>
2.6.1 Aceites esenciales.....	25
2.6.1.1 Aceites esenciales en productos del género <i>Allium</i> .....	25
2.6.1.1.1 Ajo ( <i>Allium sativum</i> ).....	26
III. HIPÓTESIS.....	29
IV. OBJETIVOS.....	30
<b>4.1 Objetivo general.....</b>	<b>30</b>
4.1.1 Objetivos específicos.....	30
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	31
<b>5.1 Localización del lugar de trabajo.....</b>	<b>31</b>

<b>5.2 Aislamiento e identificación de cepas de <i>Salmonella</i> spp</b> .....	32
5.2.1 Colección de muestras .....	31
5.2.2 Aislamiento bacteriológico.....	33
5.2.3 Identificación bioquímica .....	33
5.2.4 Identificación molecular por PCR .....	34
<b>5.3 Preparación de extractos de ajo (<i>Allium sativum</i>).....</b>	<b>35</b>
<b>5.4 Identificación de resistencia bacteriana en <i>Salmonella</i> spp</b> .....	<b>35</b>
<b>5.5 Pruebas de inhibición <i>in vitro</i> (Método Kirby-Bauer).....</b>	<b>35</b>
<b>5.6 Análisis estadístico .....</b>	<b>36</b>
<b>VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>37</b>
<b>VII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>43</b>
<b>VIII. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>44</b>
<b>IX. ANEXOS.....</b>	<b>57</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	TÍTULO	PÁGINA
1	Frecuencias para los resultados de aislamiento de <i>Salmonella</i> spp en muestras de heces, alimento y huevo de gallina.....	36
2	Diámetro de las zonas de inhibición (mm) del crecimiento de <i>Salmonella</i> spp usando extracto de ajo y antibióticos comerciales (multidisco).....	39

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
1	Corte transversal del huevo y sus componentes.....	5
2	Estrategias que permiten a <i>Salmonella</i> spp cruzar la barrera intestinal, sobrevivir en los tejidos intestinales y diseminarse sistémicamente.....	11
3	Clasificación taxonómica de <i>Salmonella</i> spp.....	13
4	Principales factores de riesgo asociados a la presencia de <i>Salmonella</i> spp en granjas avícolas de gallinas productoras de huevo.....	14
5	Patogénesis de la contaminación del huevo por <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	18
6	Identificación de cepas de <i>Salmonella</i> spp por PCR punto final con la amplificación de un fragmento del gen <i>InvA</i> a 284 pares de bases.....	37

## RESUMEN

### ACTIVIDAD INHIBITORIA DEL EXTRACTO DE AJO CONTRA *Salmonella* spp AISLADA DE HECES DE GALLINAS EN PRODUCCIÓN DE HUEVO

Miguel Antonio Cárdenas Contreras

El uso terapéutico de antibióticos en animales y humanos, y como promotores de crecimiento en animales de granja, generó resistencia bacteriana; por ello, es importante encontrar alternativas. Se ha demostrado que el ajo posee actividad antibacteriana. El objetivo de este estudio fue determinar la actividad inhibitoria *in vitro* del extracto de ajo contra *Salmonella* spp aislada de heces de gallinas en producción de huevo. Se colectaron muestras de heces, huevo y alimento en 3 granjas de gallinas en producción, elegidas por conveniencia. El aislamiento se realizó en agar entérico Hektoen, se caracterizó el metabolismo de la bacteria mediante pruebas bioquímicas y se confirmó el género de la cepa por PCR punto final con la amplificación de un fragmento del gen *InvA* a 284 pb. El extracto de ajo se obtuvo mediante la maceración de 50 g de bulbillos desinfectados en un mortero con pistilo estéril, el producto macerado se filtró con gasa estéril y esterilizó por filtro con membrana de 45 µM. Se midió la actividad inhibitoria por el método Kirby-Bauer, para ello, se sembraron 18 cajas de Petri con *Salmonella* por estría cerrada, luego se colocaron cinco discos de papel filtro (Wattman #1) en cada caja; enseguida las cajas se asignaron bajo el diseño para un factor al azar, tres cajas a uno de los niveles de extracto de ajo en qué consistieron los tratamientos: 0%, 25%, 50%, 75%, 100%, además 3 cajas con antibióticos como testigos negativo y positivo; las cajas se dejaron en reposo 30 min después de haber colocado los discos y se incubaron a 37±1 °C por 18 ± 2h. Se realizó la prueba de Kruskal-Wallis y análisis de la varianza para los valores de inhibición en rangos; la comparación de los rangos se hizo con la prueba de Dunn y la tendencia en la respuesta de inhibición en los porcentajes de extracto de ajo se analizó con polinomios ortogonales (P≤0.05). En el aislamiento se confirmó la presencia *Salmonella* spp en el 70% y 25% de las muestras de heces y contenido del huevo, respectivamente. En la prueba de actividad antimicrobiana, la cepa mostró resistencia a sulfametoxazol/trimetoprima, ampicilina y cloranfenicol y sensibilidad a cefotaxima y amikacina; los resultados de las pruebas de inhibición *in vitro* del extracto de ajo fresco mostraron actividad inhibitoria en todos los niveles de tratamientos, observándose mayor diámetro de inhibición conforme se incrementa la concentración del extracto (P<0.0001). Cefotaxima, amikacina y el extracto de ajo al 100% produjeron halos de inhibición de mayor diámetro (P≤0.05). Los resultados del experimento permiten concluir que la cepa de *Salmonella* aislada es multiresistente a los antibióticos, y el extracto de ajo inhibe *in vitro* su crecimiento.

Palabras clave: *Salmonella*; resistencia a antibióticos; huevo; gallinas; inhibición; ajo.

## ABSTRACT

### INHIBITORY ACTIVITY OF GARLIC EXTRACT AGAINST *Salmonella* spp ISOLATED FROM LAYING HEN EXCRETA FECES

Miguel Antonio Cárdenas Contreras

The therapeutic use of antibiotics in animals and humans, and as growth promoters in farm animals, generated bacterial resistance; therefore, it is important to find alternatives. It has been shown that garlic has antibacterial activity. With this in mind the objective of the present study was to determine the *in vitro* inhibitory activity of garlic extract against *Salmonella* spp isolated from egg producing chicken feces. Egg content and feces samples were collected from 3 chicken farms. Farms were chosen by convenience and isolation was carried out on Hektoen enteric agar, the metabolism of the bacteria was characterized by biochemical tests and the genus of the strain was confirmed by endpoint PCR with the amplification of a fragment of the *InvA* gene at 284 bp. Garlic extract was obtained by macerating 50 g of disinfected bulbs in a mortar with a sterile pestle; the macerated product was filtered with sterile gauze and sterilized by filter with a 45 µM membrane. Inhibitory activity was measured utilizing the Kirby-Bauer method. 18 Petri boxes were sown with *Salmonella* by closed stria, after which five filter paper discs (Wattman #1) were placed in each box; boxes were assigned to a random factor design, three boxes were assigned to each treatment which consisted in 0%, 25%, 50%, 75%, 100%, in addition to the treatments, 3 more boxes contained negative and positive controls; the boxes were left to rest 30 min after the placement of the discs and later incubated at 37±1 °C for 18 ± 2h. The Kruskal-Wallis test and analysis of variance for the values of inhibition in ranks was performed; comparison of ranks was made with Dunn's test and tendency in inhibitory response expressed in percentage of garlic extract was analyzed with orthogonal polynomials (P≤0.05). After isolation the presence of *Salmonella* spp was confirmed in 70% of stool samples and also in 25% of egg content. In antimicrobial activity test, the strain showed resistance to sulfamethoxazole / trimethoprim, ampicillin and chloramphenicol and sensitivity to cefotaxime and amikacin; *in vitro* inhibition tests results of fresh garlic extract showed inhibitory activity in all levels of treatments, showing a greater diameter of inhibition as the concentration of the extract increased (P<0.0001). Cefotaxime, amikacin and 100% garlic extract produced the greater inhibition halo diameters (P≤0.05). The results of the experiment allow us to conclude that the isolated *Salmonella* strain is multiresistant to antibiotics, and that garlic extract inhibits its growth *in vitro*.

Key words: *Salmonella*; resistance to antibiotics; chicken; inhibition; garlic.

## I. INTRODUCCIÓN

En 2016 a nivel mundial habían más de tres billones de aves de corral y una producción aproximada de 73 millones de toneladas de huevo de gallina (Mottet y Tempio, 2017); en 2014, México con 22.8 kg per cápita ocupó el primer lugar mundial en consumo de huevo (UNA, 2014). En 2015 la parvada nacional era de 154 millones de gallinas y una producción de 2'600,000 t de huevo fresco posicionándose el 6<sup>to</sup> lugar en producción a nivel mundial; siendo los principales estados productores: Jalisco (55%), Puebla (15%), Sonora (8%), la Laguna (5%), Yucatán (4%), Sinaloa (3%), Nuevo León (3%) y Guanajuato (2%) (UNA, 2016).

Se estima que cada año 600 millones de personas enferman por ingerir alimentos contaminados y de estas 420 000 mueren (Kopper *et al.*, 2009). *Salmonella* spp responsable del 96% de las zoonosis causadas por el consumo de huevo contaminado (OMS, 2015), estimándose 93.8 millones de casos de salmonelosis a nivel mundial, de las cuales aproximadamente 155 000 resultan en muerte (Majowicz *et al.*, 2010). La salmonelosis puede manifestarse como una infección gastrointestinal media, severa o sistémica y provocar la muerte (Coon *et al.*, 2009). En particular, la contaminación por *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis es mundialmente estudiada por ser el serotipo con mayor prevalencia en infecciones transmitidas por consumo de huevo (Baron *et al.*, 2016). En aves, cuando la respuesta inmune no es suficiente para controlar la colonización, la bacteria se disemina sistémicamente y se establece en ovario, oviducto y ciego donde queda como un reservorio diseminando la bacteria en heces y huevo (Gast *et al.*, 2016; Yoshimura, 2015). Los antibióticos administrados a dosis sub terapéuticas, controlan la población bacteriana, esto permite mayor disponibilidad de nutrientes y mejor salud

intestinal (Díaz *et al.*, 2015; Khumar *et al.*, 2010). Sin embargo, el uso de antibióticos en animales de granja y compañía, provocó resistencia bacteriana (Petrovic *et al.*, 2015), por esta razón, desde 2006 los Antibióticos Promotores de Crecimiento (APC's), están prohibidos en la Unión Europea (EC regulation No. 1831/20031).

La inmunización contra *Salmonella* spp, es el método más eficiente para reducir la excreción de bacterias (Gamazo y Iraché, 2007). Sin embargo, no es suficiente para eliminar por completo el microorganismo de los tejidos lo que permite su diseminación (Gast *et al.*, 2015; Dewaele *et al.*, 2012). Por esto, es necesaria la búsqueda de alternativas antimicrobianas que satisfagan las necesidades de la industria y del consumidor (Díaz *et al.*, 2015). Los aceites esenciales de ajo (*Allium sativum*), poseen actividad antibacteriana y funcionan como inmunoestimulante, por lo cual, puede ser una alternativa eficaz para reducir la excreción de patógenos en aves (Mnayer *et al.*, 2014). Curtello *et al.* (2018) concluyen en su investigación que el extracto de ajo es un bacteriostático capaz de inhibir el crecimiento de *Salmonella* spp *in vitro*; en otro estudio realizado por Petropoulos *et al.* (2018) encontraron actividad inhibitoria contra bacterias Gram negativas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *S Typhimurium*, *E. coli*, y *Enterobacter cloacae*, y positivas: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Micrococcus flavus*; Tosun *et al.* (2017) reportan actividad bactericida del extracto de ajo contra *Salmonella* Enteritidis y *Listeria Monocytogenes* inoculada en carne de salmón. El objetivo del presente estudio fue medir la actividad inhibitoria *in vitro* del extracto de ajo (*Allium sativum*) sobre *Salmonella* spp aislada de heces de gallinas en producción de huevo.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Panorama de la producción de huevo

La producción avícola contribuye con la nutrición y seguridad alimentaria, aportando energía, proteína y micronutrientes esenciales para el humano, esto en ciclos cortos de producción y con la habilidad de convertir una gran variedad de alimentos agrícolas y desechos en huevo y carne. La avicultura es el sub sector agropecuario que crece con mayor rapidez y el más eficiente para satisfacer las necesidades de proteína para la población en constante crecimiento, especialmente en países en desarrollo. En 2016 a nivel mundial había más de tres billones de aves de corral y una producción aproximada de 73 millones de toneladas de huevo de gallina (Mottet y Tempio, 2017), en 2014, México es el primer lugar en consumo de huevo con 22.8 kg per cápita (UNA, 2014). En 2015 la parvada nacional era de 154 millones de gallinas y una producción de 2 600 000 t de huevo fresco posicionándose en 6<sup>to</sup> lugar en producción a nivel mundial; siendo los principales estados productores: Jalisco (55%), Puebla (15%), Sonora (8%), la Laguna (5%), Yucatán (4%), Sinaloa (3%), Nuevo León (3%) y Guanajuato (2%) (UNA, 2016). Las proyecciones hacia el 2050, indican un incremento global en la demanda de huevo del 65% (Mottet y Tempio, 2017).

#### 2.1.1 Contenido nutrimental y características físico-químicas del huevo de gallina.

El huevo está compuesto por tres componentes principales (Figura 1): La yema que representa el 31% del peso del huevo, albúmina el 58.5% y cascarón el 10.5% (IEH, 2009; Aburto, 2008). El cascarón es una pared rígida porosa (7 000 a 17 000 poros), formada por carbonato de calcio como principal componente estructural (94%), además de pequeñas cantidades de carbonato de magnesio y fosfato de calcio (Aburto, 2008). El cascarón es la primera barrera de defensa y está revestida internamente por dos membranas llamadas testáceas, que impiden la entrada de microorganismos externos. Cuando el huevo es viejo estas membranas se separan formándose una cámara de aire; el color de la cáscara depende de la raza de la gallina y no influye en su composición química ni su contenido nutrimental, mientras que el grosor del cascarón si está relacionado con la composición dietética del ave (Aburto, 2008). La albúmina está constituida en un 88% por agua, 11% proteínas, 5% carbohidratos y 0.5% minerales, también contiene vitaminas y enzimas que actúan como barreras contra microorganismos

externos. Dentro del grupo de las enzimas presentes en la albúmina del huevo, destaca por su actividad antibacteriana la lisozima también llamada muramidasa, esta enzima es considerada como un elemento importante de la primer línea de defensa contra las infecciones bacterianas (Fuentes, 2013). Se ha demostrado además la presencia de lisozima en líquidos orgánicos, huevos de diversas aves, leche humana, lágrimas, saliva, tejidos de virus, insectos, aves, anfibios, reptiles y mamíferos, además es secretada por leucocitos polimorfonucleares (Carrillo, 2013). De entre todas las fuentes de lisozima, la albúmina del huevo de gallina (*Gallus gallus domesticus*) es quien posee mayor concentración, esta proteína representa el 3.5% del contenido del huevo. Su mecanismo de acción se basa en la disrupción de la pared celular de la bacteria, específicamente hidrolizando enlaces glucosídicos ( $\beta$  1-4) del peptidoglicano de la pared bacteriana, entre el ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina (Carrillo, 2014; Kóse y Denizil, 2013). El pH de albúmina es de 7.6 a 8.5, volviéndose más alcalino con valores hasta de 9.7 a medida que el huevo envejece (Aburto, 2008).

La yema es la porción amarilla del huevo y la tonalidad de su color varía dependiendo de los pigmentos presentes en la dieta del ave, el 65.8% son lípidos, 31.1% proteínas, además es fuente de vitaminas A, D, E, B y minerales (Aburto, 2008). La lecitina es el principal fosfolípido del huevo y los principales ácidos grasos presentes en la yema son oleico, palmítico, esteárico y linoleico, en orden descendente de composición (Aburto, 2008).

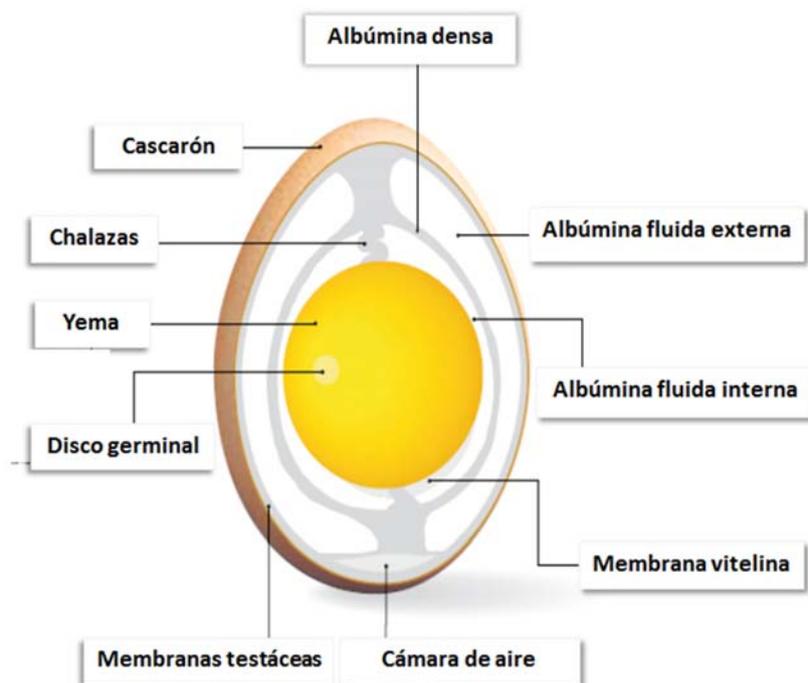


Figura 1. Corte transversal del huevo y sus componentes (Adaptado de IEH, 2009).

**Cascarón:** Es la cubierta exterior del huevo que mantiene su integridad física y actúa como barrera bacteriológica. **Chalazas:** son engrosamientos de albumen con forma de filamentos enrollados que van desde la yema hasta los polos opuestos del huevo y mantienen la yema en el centro del huevo. **Yema:** porción amarilla/anaranjada del huevo y en su interior contiene las principales vitaminas, minerales y lípidos. **Disco germinal:** también conocido como blastodisco, en él inicia la división de las células embrionarias cuando el huevo fue fecundado; las **membranas testáceas:** Son dos y recubren la porción interna del cascarón, ambas rodean el albúmina y protegen al huevo contra la invasión bacteriana. **Cámara de aire:** se forma cuando el contenido del huevo se enfría después de la oviposición generando que la albúmina se contraiga permitiendo la entrada de aire por el polo grueso donde hay mayor concentración de poros en el cascarón, en esta zona se separan las membranas para constituir la cámara de aire. **Membrana vitelina:** rodea la yema, confiere la forma característica e impide que esta se mezcle con la albúmina. **Albúmina densa:** rodea a la yema y es la principal fuente de riboflavina y proteína del huevo. La albúmina fluida es la que se localiza más próximo al cascarón [Figura 1] (Adaptado de IEH, 2009).

El huevo aporta 12.5 g de proteína de alto valor biológico, con una disponibilidad del 94% por cada 100 g de parte comestible, con un perfil de aminoácidos esenciales para el humano: lisina, treonina, metionina, cisteína y triptófano, y aporta solo 150 kcal (Carbajal, 2006). Su alta densidad de nutrientes y su bajo aporte calórico lo hacen un alimento ideal para toda la población, incluyendo ancianos, niños y mujeres gestantes; sus componentes bioactivos juegan un papel importante en la salud y prevención de enfermedades, los ácidos grasos son precursores de prostaglandinas y sustancias reguladoras de la agregación plaquetaria, regulación de la presión arterial y la contracción de vasos sanguíneos; otro componente de importancia nutricional es la colina, necesario en la síntesis de esfingomielina y fosfolípidos de membrana como la fosfatidilcolina, también es precursor del neurotransmisor acetilcolina necesaria para el desarrollo del cerebro, metabolismo de lípidos y colesterol (Carbajal, 2006). La biotina, actúa como un cofactor de enzimas importantes en el metabolismo energético, de ácidos grasos y aminoácidos, además contiene otros componentes no nutricionales como la luteína y zeaxantina, carotenoides con función antioxidante, antimutagénico y anticarcinogénico (FAO, 2015; Carbajal, 2006).

## **2.2 Enfermedades transmitidas por alimentos**

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) son aquellas enfermedades que se originan por la ingestión de alimentos contaminados en cantidades suficientes para afectar la salud del consumidor, existen distintos tipos de ETA's que se clasifican según su origen en microbiológicas, físicas y químicas (Moreno y Alarcón, 2010). Las ETA's microbiológicas se pueden manifestar como infecciones causadas por bacterias, virus, priones, parásitos o toxinas (intoxicaciones), que provocan en conjunto más de 200 enfermedades y afectan con mayor frecuencia a grupos sociales de bajos recursos (Kopper *et al.*, 2009). Pueden causar desde gastroenteritis o intoxicaciones leves hasta manifestaciones clínicas severas e incluso la muerte, son transmitidas por consumo de agua y alimentos contaminados o por contacto con personas y animales infectados (Kopper *et al.*, 2009). Se estima que aproximadamente 550 millones de personas enferman anualmente por ingerir alimentos contaminados, 220 millones de estos casos son niños

menores de cinco años (OMS, 2017). Las ETA's causan 420,000 muertes, de las cuales 125 000 corresponden a niños menores de 5 años (OMS, 2017; Kopper *et al.*, 2009).

2.2.1 Causadas por bacterias. *Salmonella spp*, *Campylobacter spp* y *Escherichia coli* enterohemorrágica son las bacterias que causan con mayor frecuencia ETA's, *Salmonella spp* se asocia principalmente al consumo de huevo y carne de ave, *Campylobacter spp* es transmitido principalmente por el consumo de leche cruda, carne de ave poco cocinada y agua potable contaminada, y *Escherichia coli* enterohemorrágica se asocia al consumo de leche cruda, agua potable contaminada, carne poco cocinada, frutas y hortalizas frescas (OMS, 2015).

2.2.2 Causadas por virus. Norovirus y Hepatitis A son los virus transmitidos por alimentos más comunes a nivel mundial (OMS, 2015). Se transmiten principalmente por la ingestión de alimentos crudos contaminados o poco cocinado, la manipulación de alimentos por personas infectadas suele ser la fuente de contaminación principal (OMS, 2015).

2.2.3 Causadas por céstodos y protozoarios. Los parásitos se transmiten por el consumo de alimentos y agua contaminados o por contacto directo con animales enfermos y suelo contaminado. Los principales parásitos relacionados con ETA's son: *Echinococcus spp*, *Taenia solium*, *Ascaris spp*, *Cryptosporidium spp* y *Entamoeba histolytica* y *Giardia spp* (OMS, 2015).

2.2.4 Causadas por productos químicos. Las sustancias químicas que se utilizan en la agricultura como pesticidas, los antibióticos y aditivos utilizados en la producción pecuaria y las toxinas naturales como las micotoxinas, biotoxinas marinas, glucósidos cianogénicos y toxinas presentes de setas venenosas pueden contaminar los alimentos. Algunos alimentos básicos como el maíz u otros cereales pueden contener elevados niveles de micotoxinas como las aflatoxinas y ocratoxinas. Una exposición prolongada a estas toxinas puede provocar intoxicaciones que van de leves a severas, afectan el sistema inmune, el desarrollo corporal normal y son cancerígenas (OMS, 2015).

Los contaminantes orgánicos persistentes como las dioxinas y los bifenilos policlorados que son subproductos industriales provenientes de la combustión que implican al cloro, se localizan en el ambiente, se acumulan en la cadena alimentaria animal y pueden causar problemas reproductivos, en el desarrollo, dañan el sistema inmunitario, interfiere con el funcionamiento hormonal y causan cáncer (OMS, 2015).

Los metales pesados: como el plomo, el cadmio y el mercurio causan daños neurológicos y renales (OMS, 2015). La presencia de metales pesados en los alimentos se debe principalmente a la contaminación del aire, del agua y del suelo (OMS, 2015).

### **2.3 Enfermedades transmitidas por el consumo de huevo**

Las especies bacterianas *Salmonella* y *Campylobacter*, son los patógenos zoonóticos causantes de gastroenteritis más importantes relacionadas con el consumo de huevo, siendo *Salmonella* el género responsable del mayor número de casos con el 96% (Mollenhorst *et al.*, 2005). Según Majowicz *et al.* (2010) se estimaron a nivel mundial 93.8 millones de casos de gastroenteritis causada por el género *Salmonella*, de las cuales 155 000 resultaron en muerte. Si bien los grandes brotes atraen la atención de las autoridades y medios informativos, entre el 60 y 80% de los casos no se registran como parte de un brote conocido y se clasifican como casos esporádicos o ni siquiera se diagnostican (OMS, 2017).

2.3.1 *Salmonella* spp. La Salmonelosis es una enfermedad causada por bacterias del género *Salmonella* y es considerado un problema de salud pública mundial, con una incidencia de 200 a 500 casos por 100 000 habitantes, se localizan en el intestino de aves, mamíferos y reptiles, en el hombre, el género ocasiona infecciones intestinales y sistémicas. *Salmonella* no es parte de la flora intestinal normal, se adquiere a través de insectos, roedores, aves domésticas y silvestres, mamíferos, el hombre, alimento, medio ambiente y agua contaminados. Coloniza el tracto intestinal, desde donde puede diseminarse sistémicamente y colonizar otros tejidos (OMS, 2017; Herrera y Jabib, 2015; Sánchez y Cardona, 2003). Para el desarrollo de la infección bacteriana se requiere que el patógeno se localice en un medio ambiente adecuado donde pueda invadir, establecerse, multiplicarse y expresar sus factores de virulencia; *Salmonella* posee diferentes mecanismos que le permiten crecer, sobrevivir y diseminarse local y sistémicamente, esto mediante la invasión directa a las células epiteliales y macrófagos, adhesión a células M, captura y diseminación sistémica por células dendríticas y además, tiene la capacidad de evitar la unión del fagolisosoma que le permite sobrevivir y multiplicarse en el interior del macrófago, evadiendo así la respuesta inmune del hospedero [Figura 2] (Figuroa y Verdugo, 2005; Sansonetti, 2004); el proceso infeccioso

involucra la interacción entre el patógeno y el huésped, donde primero la bacteria se adhiere a la cara apical de las células epiteliales del íleon y a las células M que debido a la ausencia de microvellosidades intestinales y glicocalix, representan una puerta de entrada ideal, este mecanismo es posible mediante adhesinas bacterianas que son proteínas localizadas en la fimbria, fibrilla, lipopolisacárido (LPS), flagelo y cápsula, que le permiten reconocer matrices extracelulares como fibrinectina, laminina y plasminógeno presentes en la superficie de la célula hospedera, en el caso de las adhesinas del flagelo y la cápsula en *Salmonella*, su presencia depende del serotipo en cuestión, por ejemplo, solo *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* y *S. Dublin* presentan cápsula, mientras que todos los serotipos de *Salmonella* presentan motilidad excepto *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*; una vez que la bacteria se adhiere a la pared celular, inyecta proteínas efectoras que polimerizan la actina en el citoesqueleto, estimulando que la célula se invagine, este mecanismo es conocido como disparo (*trigger*), inicia cuando la bacteria envía señales mediante la secreción de proteínas identificadas como; sipA, sipB, sipE y sipE2, que interactúan con las células epiteliales para inducir rearrreglos en el citoesqueleto dando lugar a la formación de ondulamiento en la superficie de la célula conocido como *ruffling*, este mecanismo facilita la interacción de la bacteria con la superficie celular (Cárdenas *et al.*, 2014; Figueroa y Verdugo, 2005). *Salmonella* presenta 31 genes involucrados en la invasión que forman la Isla de Patogenicidad 1 [SPI-1], estos genes codifican proteínas involucradas en la translocación de las moléculas efectoras dentro del citoplasma de la célula hospedero denominadas integrasas, transposasas y secuencias de inserción, de esa manera la bacteria tiene acceso a la célula hospedera y después de un periodo de adaptación de 3 o 4 h, puede replicarse dentro de las vacuolas que se forman después de la invasión a las células epiteliales por endocitosis o en el fagosoma que se forma en el macrófago durante la fagocitosis, el medio ambiente dentro de estas vacuolas, se caracteriza por tener pH ácido necesario para la sobrevivencia de la bacteria y concentraciones limitadas  $Fe^{2+}$ , para compensar la falta de este sustrato necesario para el crecimiento del microorganismo, la bacteria secreta proteínas denominadas sideróforos de los cuales se conocen tres tipos; catecoles, hidroxamatos y una combinación de ambos, los cuales quelan (atrapan) hierro procedente de otras células epiteliales lisadas. Las vacuolas que contienen *Salmonella* (SCV por sus siglas en inglés) son espaciales y permiten que los productos

antibacterianos se diluyen y neutralicen por la acción de enzimas secretadas por la bacteria, esto permite que aumente la supervivencia intracelular, además, pueden fusionarse con vesículas que contienen marcadores con la finalidad de crear un microambiente fagosomal que permita su supervivencia; la invasión de *Salmonella* a los tejidos del hospedador provoca citotoxicidad por secreción de endotoxinas que causan la muerte de células vecinas para obtener nutrientes y favorecer la diseminación de la bacteria, por el proceso inflamatorio causado por la apoptosis de células y macrófagos infectados y la destrucción de células M, además induce la fagocitosis en macrófagos no activados para ser transportada al hígado y bazo generando la infección sistémica (Herrera y Jabib, 2015; Cárdenas *et al.*, 2014; Figueroa y Verdugo, 2005).

Dependiendo del serotipo involucrado, factores de virulencia localizados en las islas de patogenicidad, plásmidos y genes endógenos que permiten a *Salmonella* adherirse, invadir, sobrevivir, crecer y diseminarse en el las células del hospedero, el hospedador, cantidad de patógenos involucrados [menos de 100 bacterias] y estado inmunológico del huésped, puede ocasionar desde una infección gastrointestinal media, severa, hasta una septicemia e incluso la muerte (Cárdenas *et al.*, 2014; OMS, 2013; Figueroa y Verdugo, 2005). La salmonelosis en humanos se caracteriza por fiebre, dolor abdominal, diarrea, náuseas y vómitos, los síntomas de la enfermedad aparecen de 6 a 48 h después de la exposición al patógeno (OMS, 2013).

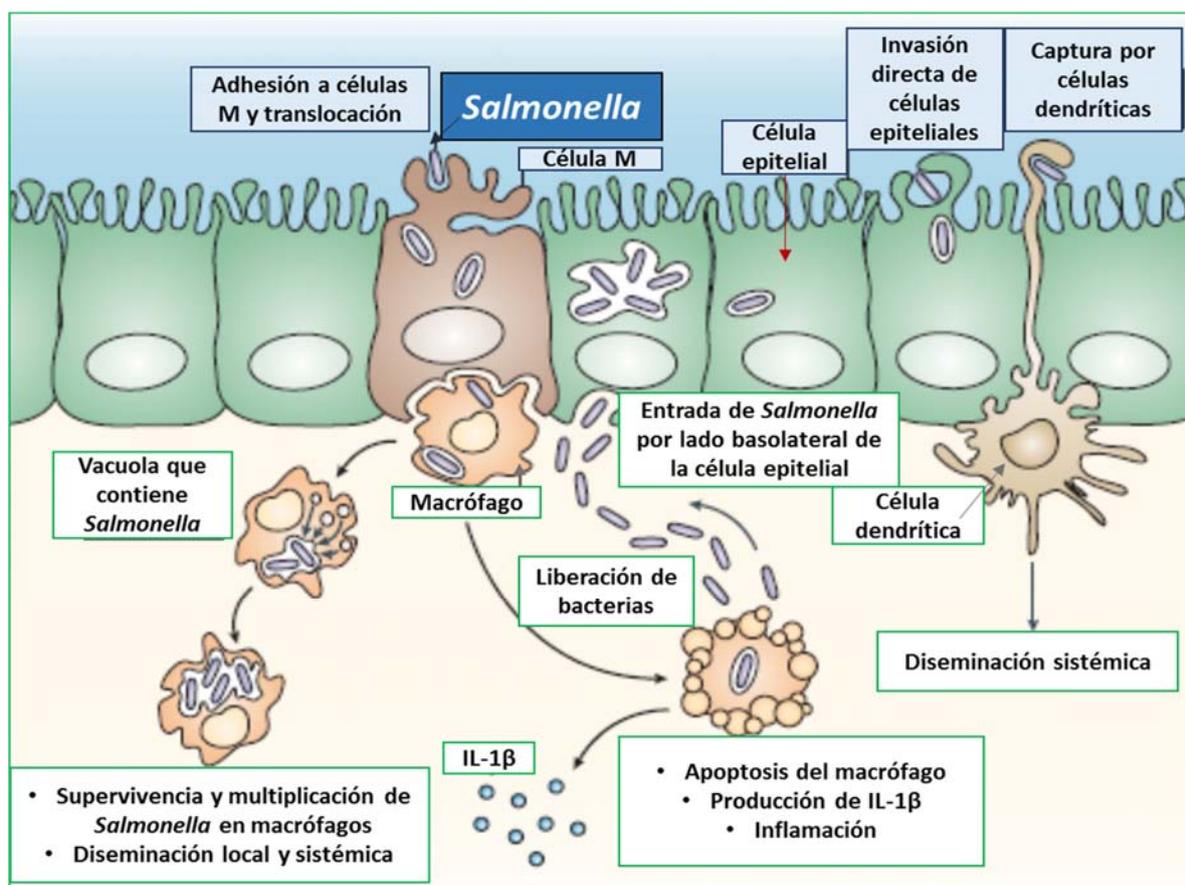


Figura 2. Estrategias que permiten a *Salmonella* spp cruzar la barrera intestinal, sobrevivir en los tejidos intestinales y diseminarse sistémicamente (Sansoneetti, 2004).

Las bacterias del género *Salmonella*, son bacilos Gram negativo, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, miden de 2 a 3 micras de largo por 0.4 a 0.6 micras de ancho, son anaerobios e intracelulares facultativos, móviles debido a la presencia de flagelos peritricos en el caso de la mayoría de las serovariedades, excepto *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*, metabolizan por fermentación y oxidación, produciendo ácido y gas durante la fermentación de glucosa u otros carbohidratos, catalasa positivos, oxidasa positivos y ureasa negativos, reducen nitratos a nitritos, se desarrollan en rangos de pH de 6.6 a 8.2, se inactivan a temperaturas menores a 5.3 °C, se eliminan con temperaturas mayores de 80 °C y cuando se aísla en cultivos agar sangre durante 24 h a 37 °C forman colonias de entre 2 y 3 mm de diámetro, color blanco-gris y textura viscosa (Herrera y Jabib 2015; Ricke *et al.*, 2013; Sánchez *et al.*, 2002).

Existen dos especies en el género *Salmonella*: *S. enterica* en la que se han identificado 2 587 serovariedades y *S. bongori* con 23 serovariedades no patógenas (Figura 3). *S. enterica* se agrupa en 6 subespecies: *S. enterica*, *S. salamae*, *S. arizonae*, *S. diarizonae*, *S. houtebae* y *S. indica* (Gutiérrez *et al.*, 2008). Para el caso de *S. enterica* subespecie *enterica*, se han identificado 1 547 serotipos diferentes, siendo Enteritidis y Typhimurium los dos serotipos de *Salmonella* de mayor importancia en salud pública, por su frecuente transmisión de animales a humanos (OMS, 2017; Rodríguez, 2015; Gutiérrez *et al.*, 2008). Los distintos serotipos de *Salmonella* se encuentran ampliamente distribuidos por la naturaleza, se encuentran como bacterias comensales y como patógenos en el tracto gastrointestinal de aves, mamíferos domésticos y animales silvestres, entre ellos roedores, reptiles, aves e insectos; en el medio ambiente se pueden encontrar en los alimentos, agua, suelo, superficies de trabajo, insectos y en la materia fecal, a partir de allí, ingresan al hombre y otros animales provocando infecciones (Rodríguez, 2015). Desde el punto de vista del hospedador, los miembros de *Salmonella* se pueden clasificar en tres grupos: los que no tienen preferencia por algún hospedero en especial y pueden afectar al hombre y animales; los serotipos adaptados a un hospedero que están restringidos a un pequeño número de huéspedes, sin embargo, se ha demostrado que estos serotipos eventualmente pueden infectar a humanos y a otras pocas especies de animales; los serotipos que presentan restricción de hospedero (específico), *S. Abortusovis*, en ovinos, *S. Abortusequi*, en equinos, *S. Typhisuis* en cerdos (Paratifosis), *S. Gallinarum* en aves (Tifoidea Aviar), *S. Typhi*, *S. Paratyphi A* y *S. Paratyphi C* en humanos (Rodríguez, 2015).

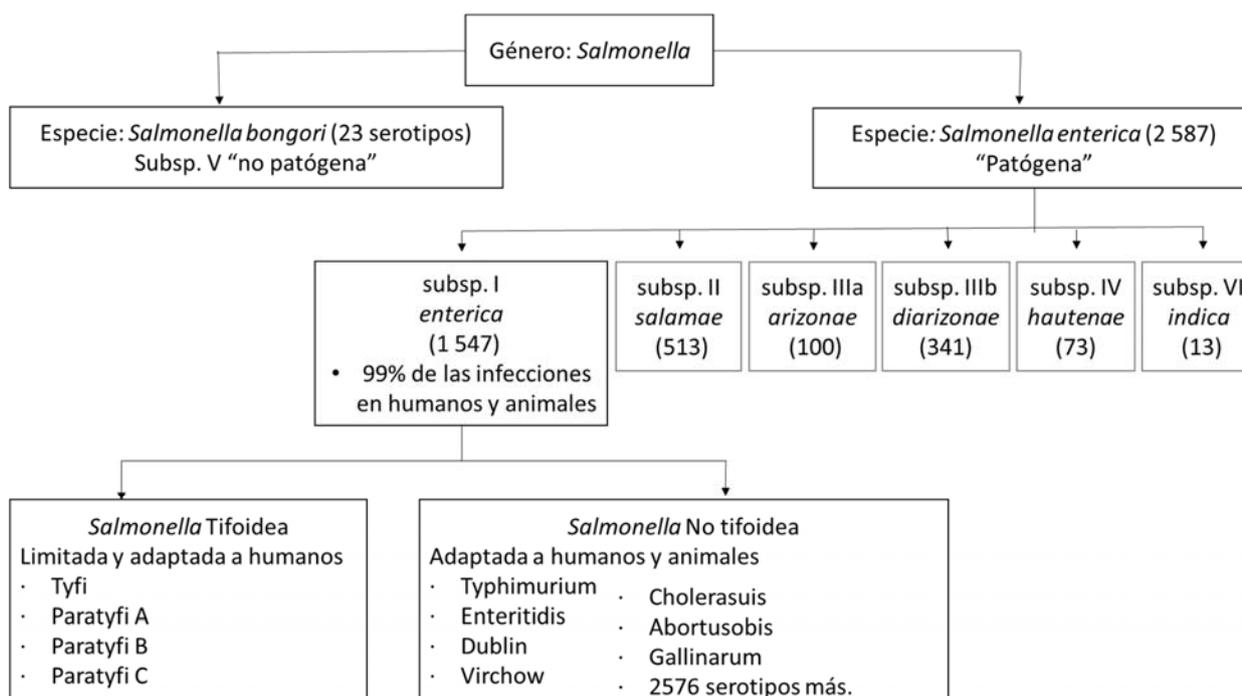


Figura 3. Clasificación taxonómica de *Salmonella* spp (adaptado de Rodríguez, 2015).

Los serotipos de este género bacteriano, se logran diferenciar e identificar por su reacción con antisueros específicos frente a dos antígenos de la pared bacteriana: el antígeno O que refleja la variación de las porciones externas de lipopolisacáridos en la superficie bacteriana y el antígeno H que determina la variación de una proteína del flagelo (flagelina) que codifica dos tipos de antígenos: H1 y H2, con 46 y 115 formas antigénicas diferentes, respectivamente; de tal manera que cada uno de los serotipos tiene una combinación única de los antígenos O, H1 y H2 (Betancor y Jim., 2012). Los métodos tradicionales para la detección de microorganismos como el aislamiento en placa número más probable, a pesar de ser las más utilizadas, requieren mucho tiempo y labor. Actualmente, las técnicas modernas para identificar microorganismos como la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), una técnica de detección molecular, que permite una detección con mayor exactitud, rapidez, sensibilidad, facilidad para la interpretación de resultados y con menos contaminación. Esta técnica consta de las siguientes fases: 1) Desnaturalización: reduce la doble hélice de ADN a cadenas simples, 2) Hibridación: los oligonucleótidos hibridan con las regiones complementarias del ADN patrón y forman cadenas dobles entre

los oligonucleótidos y las secuencias complementarias y 3) Extensión: la enzima ADN polimerasa sintetiza una cadena complementaria (Li *et al.*, 2017; Morales *et al.*, 2016; Pérez *et al.*, 2008; Tenover *et al.*, 1997).

Se han descrito algunos factores de riesgo (Figura 4) asociados a la presencia de *Salmonella* spp en las granjas: El sistema de producción intensivo o en jaula tienen mayor predisposición a la infección debido principalmente a la cantidad de animales por metro cuadrado respecto a los sistemas extensivos o con alojamiento en piso; granjas con programas de vacunación incompletos o sin vacunación; aves de más edad presentan mayor predisposición a contraer infección; el acceso a vehículos contaminados a la granja para el transporte de huevo o insumos; granjas con mayor presencia de vectores como roedores, aves silvestres y moscas, presentan mayor prevalencia de *Salmonella* en aves; unidades de producción que permiten el acceso a visitantes a los galpones presentan mayor probabilidad de contaminación; suministro de agua y alimentos contaminados; crianza de reemplazos portadores del microorganismo; bioseguridad en las unidades de producción y las condiciones climáticas son algunos de los factores que predisponen el ingreso del microorganismo a las instalaciones, aumentando el riesgo de infecciones en animales de producción (Rodríguez., 2015).

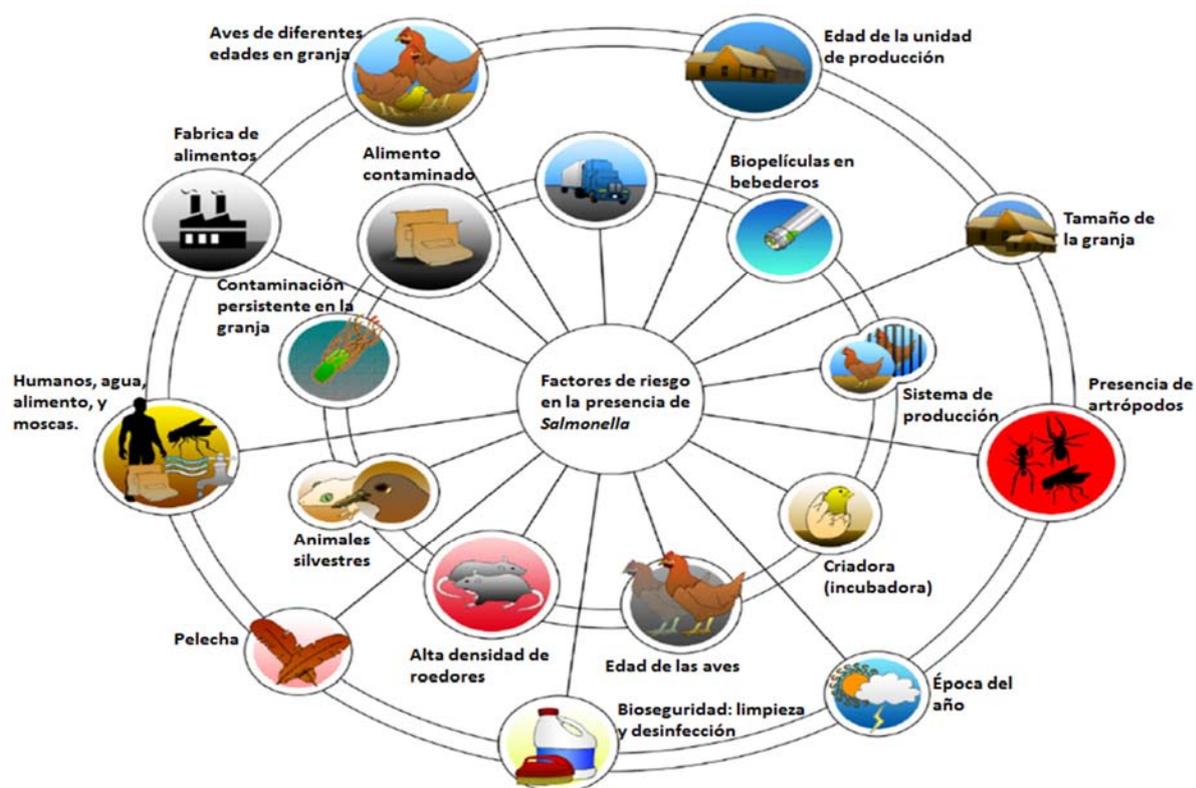


Figura 4. Principales factores de riesgo asociados a la presencia de *Salmonella* spp en granjas avícolas de gallinas productoras de huevo (adaptado de Rodríguez *et al.*, 2015).

2.3.1.1 *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovariedad Enteritidis (*S. Enteritidis*). Es una de las serovariedades que más se estudia mundialmente, por ser el serotipo con mayor prevalencia involucrado en la transmisión de enfermedades por el consumo de huevo (Baron *et al.*, 2016). En 2006, en la Unión Europea (UE) se reportaron un total de 165 023 casos de salmonelosis de los cuales el 62.5% de las cepas aisladas fueron identificadas como *S. Enteritidis* (EFSA, 2007a). También en un estudio realizado en la misma región, *S. Enteritidis* se aisló en las instalaciones del 52.3% de las granjas evaluadas. Según EFSA (2007a) en la UE el 0.8% de los huevos para consumo humano están contaminados con *Salmonella* spp y se estima que más del 90% de las cepas aisladas corresponde a *S. Enteritidis*.

En México, en un estudio realizado por Charles *et al.* (2007) reportan que el serotipo Enteritidis presentó mayor prevalencia de aislamientos en alimentos. Mancera *et al.* (2005)

también en México, aislaron *S. Enteritidis* en el 0.25% de 400 huevos analizados destinados al consumo humano. En Venezuela, Holanda, Bélgica, Estados Unidos y España, entre otros, también se ha reportado la presencia de *S. Enteritidis* como uno de los principales serotipos que se aíslan en alimentos contaminados por *Salmonella* spp (Molina *et al.*, 2010; Collard *et al.*, 2008; Doorduyn *et al.*, 2006; Isaacs *et al.*, 2005; Velge *et al.*, 2005).

Respecto a los otros serotipos de *Salmonella* responsables de salmonelosis, los que se aíslan con mayor frecuencia además de *Enteritidis* son; Typhimurium, Infantis, Virchow, Newport, Hadar, Stanley, Derby, Agona y Kentucky (Gantois *et al.*, 2009; Charles *et al.*, 2007). Respecto a estos últimos serotipos, también son importantes clínicamente, aun los que se aíslan con menos frecuencia, ya que tienen el mismo potencial de causar enfermedad (Charles *et al.*, 2007).

En estudios experimentales se ha demostrado la capacidad de varios serotipos de *Salmonella* spp de invadir tejido reproductivo, sin embargo, la mayoría de estos serotipos no se aíslan en huevos infectados naturalmente (De Buck *et al.*, 2004b). De Buck *et al.* (2004a) buscaron el sitio predominante en el oviducto superior para la invasión y proliferación de *S. Enteritidis*, concluyendo que la bacteria invadió preferentemente las células de la glándula tubular del istmo (lugar de secreción de las membranas del huevo) en comparación con el magno. Se ha demostrado la presencia de *S. Enteritidis* en tejidos reproductivos incluso con ausencia de colonización intestinal (Gantois *et al.*, 2009). Estas investigaciones sugieren que *S. Enteritidis* posee características intrínsecas que le otorgan tropismo hacia los tejidos reproductivos de gallinas y de los componentes del huevo, donde se han identificado dos rutas importantes de contaminación (Gantois *et al.*, 2009). La mayoría de las investigaciones sugieren que la transmisión vertical (Figura 5) es la más importante, esta ruta se caracteriza por la contaminación directa de la yema, albúmina, membranas del cascarón o el cascarón del huevo antes de la oviposición, originado por la infección de los órganos reproductivos con *S. Enteritidis* (Ramírez *et al.*, 2014; Gantois *et al.*, 2009). Al respecto, Wigley *et al.* (2005) observaron que en aves de un día de edad infectados experimentalmente con *S. Pullorum*, los machos mostraban mayor excreción del microorganismo los primeros días posterior a la inoculación, pero al inicio de la madurez sexual se observó un aumento significativo en el aislamiento de *S. Pullorum* en oviducto

de cero bacterias aisladas durante las primeras nueve semanas post inoculación a 2.01 UFC/g durante la semana 18, concluyendo que la infección del aparato reproductor y el aumento del número de microorganismos puede aumentar durante la madurez sexual. La segunda es la horizontal, donde la bacteria presente en el intestino puede traspasar el cascarón durante la oviposición o contaminarse después de la ovoposición por contacto con heces contaminadas (Ramírez *et al.*, 2014; Gantois *et al.*, 2009). Además de las características genéticas y fenotípicas de los serotipos de *Salmonella*, existen otros factores adicionales que incrementan el riesgo de contaminación y la proliferación de *Salmonella* en el contenido del huevo; temperaturas entre 25 y 35 °C y tiempos de almacenamiento superiores a los 12 d favorecen el crecimiento del microorganismo tanto en cáscara como en el interior del huevo, provocando que la cutícula se contraiga y se deshidrate dejando expuestos los poros del cascarón a la presencia de la bacteria (Ramírez *et al.*, 2014).

En aves inmunocomprometidas o animales jóvenes, en estos se requieren al menos de 100 bacterias vivas ingeridas vía oral para provocar infección sistémica rápidamente, esto debido a que el sistema inmunológico es inmaduro (Holt *et al.*, 1999). Pollitas menores de una semana de edad muestran escasa e ineficiente respuesta inmune sistémica, resultando en una respuesta humoral de la mucosa intestinal que no logra controlar la infección, permitiendo que la bacteria pueda establecerse en tejido reproductivo e intestinal (Holt *et al.*, 1999), donde persiste hasta la madurez del ave, diseminándose horizontal y verticalmente (Gast *et al.*, 2015).

Para que se presente infección oral en aves por *S. Enteritidis*, primero el microorganismo debe superar el microambiente desfavorable que ofrecen los ácidos gástricos, sales biliares del intestino, actividad motora de las mucosas que reduce la adherencia del microorganismo, secreciones de moco además, sustancias inhibitoras del crecimiento de bacterias patógenas; como lisozima, lactoferrina y lactoperoxidasa (Barta y Blanco, 2005), hasta alcanzar íleon distal y ciego que es donde compite con la microflora residente y que también inhibe el crecimiento de patógenos, y así poder adherirse e invadir células epiteliales del intestino donde se enfrenta al tejido linfoide altamente especializado identificado como tejido linfoide asociado a intestino [GALT Gut-Associated Lymphoid Tissue, por sus siglas en inglés] (Berndt *et al.*, 2007); esta, la primer línea de defensa

frente a la invasión de *Salmonella* se encuentra en la mucosa intestinal, donde la interacción entre bacterias y células epiteliales estimulan la secreción de citoquinas proinflamatorias que atraen células del sistema inmune innato; heterófilos del grupo de los granulocitos, macrófagos y células dendríticas inmaduras (Berndt *et al.*, 2007). El macrófago estimulado por la fagocitosis de la bacteria, promueve la liberación de citoquinas; IL-1, IL-12, IL-18, IFN $\gamma$  (Interferón gamma) y TNF $\alpha$  (Factor de Necrosis Tumoral alfa), que provocan la activación de nuevos macrófagos y linfocitos T colaboradores (CD4) que promueven la inflamación, activación de linfocitos T asesinos (CD8) y linfocitos B para la producción de anticuerpos específicos inducen la apoptosis de la célula infectada (Coon *et al.*, 2009; Tizard, 2009; Barua y Yoshimura, 2004). Se ha demostrado la capacidad de *Salmonella* de establecerse y crecer en el interior del macrófago, lo que permite la diseminación sistémica de la bacteria (Gantois *et al.*, 2009). Cualquier alteración en los mecanismos protectores inmunes o no inmunes pueden terminar en la invasión de la bacteria y su establecimiento en ovario, oviducto, hígado, bazo o intestino (Gast *et al.*, 2016; Barta y Blanco, 2005).

En el caso de la pared del folículo ovárico y mucosa del oviducto, estos poseen células y moléculas del sistema de defensa; como macrófagos, moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (CMH II), linfocitos T cooperadores (CD3 y CD4), linfocitos T citotóxicos (CD8), receptores de linfocitos T (TCR), linfocitos B e inmunoglobulinas A (IgA) y Y (IgY), que proporcionan inmunoprotección a las mucosa de los tejidos reproductivos y IgY para los embriones (Yoshimura, 2015; Sheela *et al.*, 2003). La cantidad de estos inmuno componentes celulares se incrementa durante la madurez sexual, estimulado principalmente por el estradiol que influye en el desarrollo de los órganos reproductivos y la formación del huevo, además juega un papel importante de la actividad inmune en el aparato reproductivo de las aves (Yoshimura, 2015).

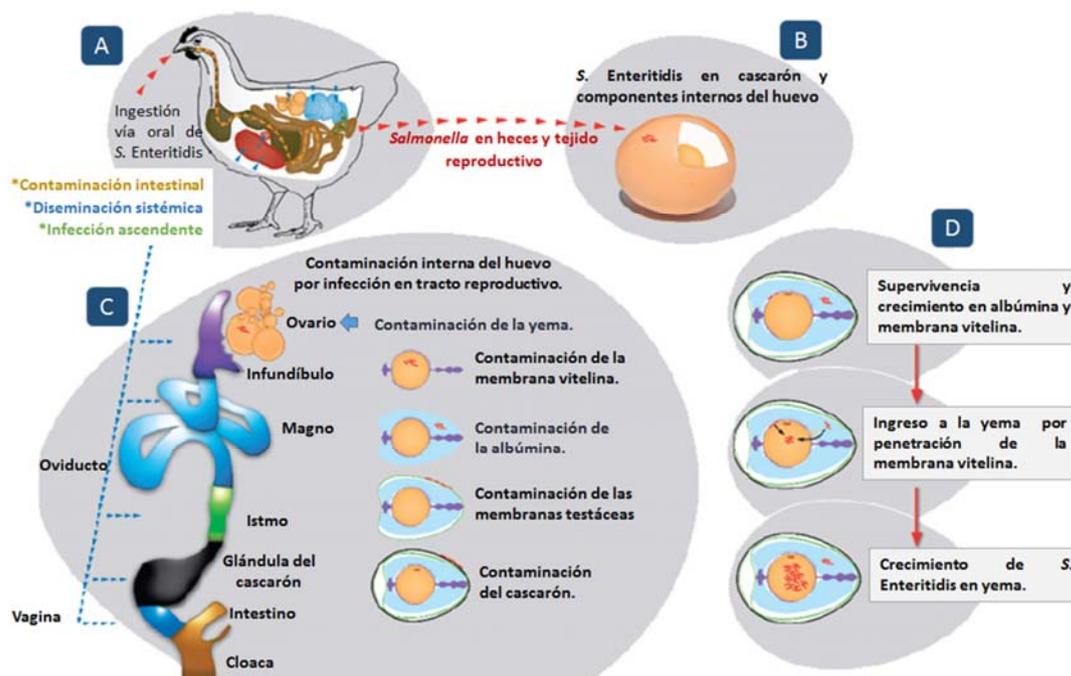


Figura 5. Patogénesis de la contaminación del huevo por *Salmonella* Enteritidis.

A) La bacteria es ingerida vía oral por la gallina y accede al tracto gastrointestinal. Cuando la bacteria coloniza el lumen intestinal está disponible para colonizar las células epiteliales del intestino. Consecuentemente macrófagos son atraídos al sitio de invasión y fagocitan la bacteria, esto permite a la bacteria sobrevivir y multiplicarse en el ambiente intracelular del macrófago. Estos macrófagos infectados, pueden migrar hacia tejido reproductivo sistémicamente, la bacteria también puede colonizar el oviducto, mediante la infección ascendente por la cloaca. B) Ruta de transmisión horizontal por *S. Enteritidis* del huevo; ocasionada por mucosa vagina o heces contaminadas. C) La segunda ruta de transmisión es la vertical, por contaminación directa de la yema, membrana vitelina, albúmina, membranas testáceas y cascara, originada por infección de los tejidos reproductivos; ovario, infundíbulo, magno, istmo y glándula del cascara respectivamente. D) *Salmonella* localizada en la albúmina y la membrana vitelina está disponible para crecer incluso en el ambiente antibacteriano del huevo, y también migra por motilidad hasta llegar a la yema, donde crece extensivamente debido al ambiente nutritivo (Gantois *et al.*, 2009).

## 2.4 Antibióticos promotores del crecimiento en la avicultura

Después de la segunda guerra mundial, el consumo de carne de pollo y huevo aumentó drásticamente, y según la demanda del mercado lo exigía, la industria creció 200% entre 1940 y 1945 (Kumar, 2010). Este incremento en la producción, se atribuye principalmente a la implementación de métodos selectivos de crianza (selección genética), obteniendo animales con una mejor conversión alimenticia, con mayor producción de carne y huevo. Sin embargo, también se les otorga importancia en esta evolución de la producción avícola a los antibióticos promotores del crecimiento (APC's), una práctica que permitía mantener con buena salud a los animales en las granjas y mejorar la productividad (Kumar, 2010). En la década de los 50 los antibióticos se utilizan con el fin de controlar enfermedades en animales y humanos, observándose también que actuaban como promotores del crecimiento en animales sanos (Cota *et al.*, 2014). Algunos de los más utilizados son salinomicina, estreptomycin, penicilina, clortetraciclina, eritromicina, basitracina, tilosina, virginiamicina, neomicina, monensina sódica, flabofosfolipol, doxiciclina y avilamicina entre otros (Kumar, 2010; Torres y Zarazaga, 2002). Su mecanismo de acción incluye la inhibición de la síntesis de proteínas, pared celular, síntesis de ADN y enrollamiento del mismo e inhibe la síntesis de la membrana citoplasmática de la bacteria (Díaz *et al.*, 2015a).

2.4.1 Aditivos alimentarios. Son compuestos químicos producidos por distintos microorganismos (bacterias, hongos) o sintetizados en laboratorio, que varían unos de otros según sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, así como su mecanismo de acción y espectro antimicrobial (Hashemi y Davoodi, 2010). Son utilizados en la industria alimenticia para mejorar la calidad de los alimentos, la conversión alimenticia y la salud de los animales de producción, los antibióticos promotores de crecimiento son administrados a dosis bajas (2.5 a 50 ppm) principalmente en explotaciones avícolas y porcinas, esto se realiza debido a que las dosis subterapéuticas de antibióticos, incrementa la producción animal controlando la población bacteriana, lo que permite mayor disponibilidad de nutrientes de la dieta y mejor salud intestinal, reduciendo la síntesis de toxinas bacterianas que inflaman la mucosa intestinal (Díaz *et al.*, 2015b).

2.4.2 Resistencia bacteriana. La resistencia es el mecanismo por el cual la bacteria puede disminuir la acción de los agentes antibacterianos como mecanismo de adaptación ante la exposición a antibióticos en humanos y animales de producción; entre los factores que predisponen a la aparición de resistencia bacteriana están la implementación de dosis o duración inadecuados de la terapia antimicrobiana, el desconocimiento de los perfiles de sensibilidad de la bacteria a los antibióticos y por otro lado que las bacterias pueden adquirir material genético de otras bacterias, que pueden expresarse fenotípicamente y protegen la bacteria ante la acción de los antibacterianos [impermeabilidad, inactivación, expulsión, desviación y alteración del objetivo] (Rivera *et al.*, 2012). Las infecciones causadas por organismos resistentes a los antibióticos (ORA's) podrían considerarse infecciones emergentes, debido a que su tratamiento es cada vez más limitado y afectan cada vez a más personas en países desarrollados y en vías de desarrollo (Rocha *et al.*, 2015). Los ORA's tienen potencial de afectar a todas las personas del mundo, debido a las modernas rutas de comercio y los altos volúmenes de tráfico aéreo que suceden en el mundo globalizado las enfermedades pueden diseminarse por todo el mundo en pocas horas (Rocha *et al.*, 2015).

El uso de fármacos en la producción animal carecer de regulación, control y supervisión, que favorece el uso inadecuado de medicamentos causando el desarrollo de cepas resistentes tanto patógenas y no patógenas (Cota *et al.*, 2014). La resistencia bacteriana a los antibióticos es un problema que crece en tamaño y tiene la habilidad de afectar la estabilidad de los sistemas de salud del mundo si no se abordan de forma colectiva por todas las naciones y personas (Rocha *et al.*, 2015). Los ORA's causan solamente en Estados Unidos aproximadamente 2 millones de infecciones de las cuales 23 000 resultan en muerte según datos del Centro para la Prevención y Control de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC); con repercusiones económicas que ascienden a los 35 millones de dólares adicionales en gastos de salud (Rocha *et al.*, 2015).

Se han reportado diferentes factores que predisponen la farmacorresistencia; el manejo inadecuado de antibióticos en el tratamiento de afecciones en animales domésticos de compañía y producción, el uso de antibióticos como promotores del crecimiento (APC's) en animales de producción y el manejo de los mismos tipos de antibióticos para el tratamiento en el hombre y los animales (Moreno *et al.*, 2018; Petrovic *et al.*, 2015; Torres

y Zarazaga, 2002). Actualmente es común el aislamiento de microorganismos con diferentes niveles de resistencia a los antibióticos en el medio ambiente y en el entorno clínico (Rocha *et al.*, 2015). La resistencia bacteriana puede clasificarse en tres grupos de acuerdo al nivel de resistencia de la cepa: Multidrogoresistente (MDR); resistente a dos o más antibióticos, extremadamente resistente (XDR); resistente a tres o más antibióticos y panresistentes; resistentes a todos los antibióticos (Moreno *et al.*, 2018).

Se ha reportado resistencia bacteriana a betalactámicos, tetraciclinas, cloranfenicol, trimetoprim, sulfametoxazol, gentamicina y quinolonas, entre otros (Cabrera *et al.*, 2004). La resistencia bacteriana está codificada genéticamente y puede manifestarse por mutaciones en genes endógenos o mutaciones en elementos genéticos móviles identificados como plásmidos, que son sensibles y reaccionan a cambios ambientales pudiendo transferirse incluso genes de resistencia entre bacterias de diferente género, estos mecanismos facilitan el desarrollo de la infección porque permiten la replicación bacteriana en presencia de estos compuestos (Moreno *et al.*, 2018; Frye y Jackson, 2013).

2.4.2.1 Resistencia a los antibióticos en el género *Salmonella*. Estudios realizados en distintas regiones del mundo indican que, en *Salmonella* aislada en alimentos, instalaciones en las unidades de producción y el medio ambiente, existe alta frecuencia de resistencia a los antibióticos. Villagómez *et al.* (2017) identificaron los serotipos y el perfil de resistencia a antibióticos en cepas de *Salmonella* aislada a partir de muestras de alimento balanceado, muestras de granja colectadas durante la recepción y finalización del proceso de crianza y canales de pollo en una empresa avícola integrada en Ecuador. Se aisló *Salmonella* en todas las etapas de la empresa avícola, se identificaron cuatro serotipos de *Salmonella*: Infantis, Liverpool, Amsterdam y Uganda, el serotipo que se aisló con mayor frecuencia fue Infantis, siendo este mismo el que mostró resistencia al mayor número de antibióticos probados, hasta 11 antibióticos diferentes en cepas aisladas en todas las etapas de la empresa avícola.

Cortés *et al.* (2017) evaluaron los patrones de resistencia a antibióticos en cepas de *S. Paratyphi B* var Java, *S. Hvitvingfoss* y *S. Muenster* aisladas en canales de pollo comercializadas en Ibagué, Colombia. Las conclusiones de la investigación indican que los serotipos *S. Paratyphi B* var Java y *S. Muenster* presentaron resistencia a por lo menos diez y siete antibióticos respectivamente, respecto a *S. Hvitvingfoss* este serotipo mostró

resistencia a por lo menos cinco antibióticos. Quesada *et al.* (2016) analizaron la información disponible de reportes sobre resistencia a antibióticos en *Salmonella* spp en cepas aislada en alimentos de origen animal para consumo humano en Brasil, México, Colombia, Argentina y Venezuela, concluyendo que los aislamientos obtenidos en todos los países estudiados presentan con frecuencia resistencia a múltiples antibióticos. Otro estudio donde evaluaron la susceptibilidad antimicrobiana de *Salmonella enterica* aislada de animales y alimentos, en el que observaron resistencia al menos a uno de los antibióticos probados en los nueve serotipos aislados, el 20% de cepas presentó multiresistencia (Junod *et al.*, 2013). Países latinoamericanos como México, Colombia y Brasil reportan que las cepas de *Salmonella* aisladas de carne de pollo muestran altos niveles de resistencias a ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol, trimetoprim-sulfametoxazol, enrofloxacin, ceftiofur, entre otros (Donado *et al.*, 2015, Mattiello *et al.*, 2015; Miranda *et al.*, 2009). En la Unión Europea, los antibióticos promotores del crecimiento están prohibidos desde 2006 (EC regulation No. 1831/20031), mientras que en otros países entre los que figuran Estados Unidos y México, aún se utilizan en industria alimenticia (Díaz *et al.*, 2015b).

## **2.5 Inmunización contra *Salmonella* Enteritidis**

El uso de bacterinas en animales, estimula la respuesta inmune específica, proveyendo protección a los animales inmunizados contra patógenos (Sheela *et al.*, 2013). La inmunización en aves contra *S. Enteritidis* ha mostrado ser efectiva reduciendo la incidencia de infecciones en gallinas y subsecuentemente también la frecuencia de salmonelosis en humanos, las bacterinas se clasifican en tres tipos: atenuadas (microorganismos vivos), inactivadas (microorganismos muertos) y de subunidad (componentes estructurales del microorganismo) (Gamazo y Irache, 2007). Las más utilizadas son las atenuadas porque muestran respuesta celular y humoral más intensa, con respecto a las muertas y las acelulares; pero tienen mayor riesgo de manifestar la sintomatología de la infección en personal encargado de manipular los biológicos y en animales, los efectos negativos de la bacteria viva se manifiestan principalmente en individuos inmunocomprometidos, esto sucede porque algunos componentes estructurales del microorganismo contienen antígenos inmunosupresores o con virulencia residual por

una inactivación incompleta que puede provocar reversión a virulencia (Gamazo y Irache, 2007).

A pesar de la efectividad de la inmunización, esta no es suficiente para eliminar por completo al microorganismo de los tejidos de la gallina, lo que permite su diseminación en las excreciones fecales y el huevo (Gast *et al.*, 2015; Dewaele *et al.*, 2012), por esta razón, además de la inmunización, son necesarias rutinas de desinfección en las instalaciones y bioseguridad para eliminar y evitar la diseminación de la bacteria en las instalaciones, sin embargo, y a pesar de las medidas de bioseguridad, higiene y desinfección en las granjas, la población bacteriana se reduce pero no se elimina completamente, lo que predispone a que la parvada que iniciará el nuevo ciclo se infecte al inicio del periodo productivo (Van immerseel *et al.*, 2005).

En Europa, el sureste del continente tiene el mayor porcentaje de prevalencia en granjas inmunizadas, entre el 5 y 10% de sus granjas presentan infecciones persistentes (Van immerseel *et al.*, 2005). Dewaele *et al.* (2012) En un estudio realizado en seis granjas inmunizadas contra *S. Enteritidis* encontraron una prevalencia en instalaciones del 17.6% al inicio de la postura, 18.5% a mitad del ciclo de postura y 21.4% al final del ciclo de postura, y *S. Enteritidis* se aisló principalmente en piso, bebederos, comederos, cinta para transportar la gallinaza, carretilla para el transporte de huevo, y bandejas para recolectar el huevo. Van immerseel *et al.* (2005) reportan que los pollitos infectados experimentalmente con  $10^2$  UFC de *S. Enteritidis* durante la primera semana de vida, mostraban mayor excreción de bacterias en las primeras cinco semanas post infección y las aves infectadas con dosis de  $10^9$  UFC durante la primera semana de vida mostraban mayor diseminación del patógeno entre la semana 10 y 18. Esto podría deberse a la intensidad en la respuesta inmune generada cuando la cantidad de microorganismos patógenos es mayor.

## **2.6 Fito bióticos**

La utilización de APC's repercute en la salud de los animales y consumidores, por esta razón, es necesaria la búsqueda de alternativas antimicrobianas que comparadas con los antibióticos de síntesis sean menos tóxicos y no dejen residuos (Díaz *et al.*, 2015a). Además, también ha incrementado el interés en el uso de promotores del crecimiento como

los prebióticos y probióticos o su combinación con plantas medicinales que son reconocidas como aditivos (fito bióticos) efectivos para su utilización en la industria avícola (Khan *et al.*, 2012).

Los fito bióticos son sustancias que, de acuerdo a su origen biológico, composición química, pureza y formulación, pueden clasificarse en 4 grupos: 1) Herbales; productos de floración, no leñosos y plantas no persistentes, 2) Botánicas; plantas enteras o procesadas, raíces, hojas y tallos, 3) Aceites esenciales; extractos volátiles de plantas generalmente hidrodestilados y 4) Oleorresinas; extractos en solventes no acuosos (Díaz *et al.*, 2015a).

2.6.1 Aceites esenciales. Los aceites esenciales (AE's) se distinguen por su actividad antibacterial, antioxidante, inmunoestimulante, prebióticos, por incrementar la actividad de enzimas digestivas como tripsina y amilasa, estimula la secreción de moco que contribuye a proteger la mucosa intestinal contra el patógeno, provocando mayor aprovechamiento de nutrientes, mejor absorción intestinal, conversión alimenticia y salud de los animales en producción (Hashemi y Davoodi, 2010). Las características químicas de los AE's varían dependiendo el método de extracción, origen geográfico, genotipo de la planta, temporada de cosecha y tiempo de almacenamiento, lo que puede influir en sus propiedades farmacológicas; su mecanismo de acción se basa en la disrupción de la pared celular bacteriana, modificando la superficie celular y reduciendo su virulencia, estimulando el sistema inmune específicamente activando macrófagos, células dendríticas, linfocitos B y T, protegiendo la mucosa intestinal de la colonización del patógeno y promoviendo el crecimiento de la flora bacteriana benéfica (Díaz *et al.*, 2015a).

2.6.1.1 Aceites esenciales en productos del género *Allium*. Las especies de *Allium* son el género de interés médico más importante de la familia *Alliaceae*; el género incluye más de 700 especies distribuidas en el mundo, se distinguen por contener como componentes principales, compuestos sulfurados que le otorgan sus características organolépticas y medicinales (Mnayer *et al.*, 2014). El ajo (*Allium sativum*) y la cebolla (*Allium cepa*) son las especies del género *Allium* más consumidas en el mundo, destacando India, China, África y Brasil como los principales consumidores (Vallejo *et al.*, 2008). El continente asiático concentra el 92% del total de la producción mundial de ajo, seguido por Europa y América con el 3% cada uno; en el 2010, la producción total fue de 17 674 893 ton con China como el principal productor con el 77.3% de la producción, seguido por India, Corea, Egipto y

Rusia (Sharifi *et al.*, 2016; ODEPA, 2012). Son de fácil desarrollo y tienen larga vida post cosecha, además del consumo por sus características culinarias, es ampliamente utilizado por sus propiedades antimicrobianas, antioxidantes, antifúngicas, anticancerígenas e inmunoestimulantes (Mnayer *et al.*, 2014; Vallejo *et al.*, 2008).

2.6.1.1.1 Ajo (*Allium sativum*). Al igual que otras plantas, el ajo tiene un sistema de defensa contra insectos y hongos, que se activa cuando sus tejidos sufren algún daño (Block, 1985). Durante el daño tisular, se producen distintos compuestos sulfurados responsables de su defensa, que le otorgan su olor característico y propiedades medicinales. Estos compuestos se producen cuando hay daño tisular y el aminoácido no proteico allina presente en las vacuolas y la enzima aliinasa presente en el citoplasma interactúan y reaccionan formando alicina (diallyl-tiosulfonato) (Vargas *et al.*, 2014; Block, 1985) Esta sustancia posee actividades biológicas como agente antibacterial, antifúngico, antiparasitario, inmunoestimulante, reduce los niveles de colesterol y triglicéridos en sangre, disminuye la presión ocular, inhibe el desarrollo de las células cancerígenas, es hipotensor y antitrombótico (Vargas *et al.*, 2014; Mujica *et al.*, 2013; Amagase *et al.*, 2001; Miron *et al.*, 2000). La composición físico-química del ajo puede variar según el genotipo de la planta, las condiciones de cultivo, almacenamiento y el procesamiento de los bulbos, alterando sus propiedades terapéuticas (Petropoulos *et al.*, 2018).

La alicina representa aproximadamente el 70% del total de tiosulfonatos (compuestos sulfurados) presentes en los AE's extraídos mediante maceración mecánica (Block, 1992; Han *et al.*, 1995). La alicina es un compuesto inestable y según las condiciones de almacenamiento se puede degradar rápidamente a diallyl sulfuro, diallyl disulfuro, diallyl trisulfuro, S-allyl cisteína, S-allylmercaptocisteína, vinyl ditines y ajoene (Arnault *et al.*, 2005). La degradación de la alicina depende de la temperatura y el pH de almacenamiento, siendo 4.5 a 5.0 el pH óptimo para su estabilidad. Valores de pH muy bajos aceleran la degradación de este compuesto sulfurado, principal componente antibacterial del ajo fresco (Arnault *et al.*, 2005).

El mecanismo de acción de los AE's de ajo se basa en la inhibición de la síntesis de ARN bacteriano, generando una disminución de la síntesis de proteínas y enzimas, inhibiendo la replicación del DNA lo que reduce la capacidad del patógeno de producir enfermedad, además, estimulan al sistema inmune activando macrófagos y linfocitos T asesinos,

protegiendo la mucosa intestinal de colonización del patógeno, también promoviendo el crecimiento de la flora bacteriana benéfica, el efecto probiótico se debe al mejorar la disponibilidad de energía por presencia de oligofruktosa, mientras que microorganismos patógenos como *Salmonella* spp, no puede metabolizar éste carbohidrato (Díaz *et al.*, 2015; Samanta *et al.*, 2014; Feldberg y Chang, 1988).

En la industria avícola, el ajo se ha utilizado como promotor del crecimiento natural en pollo de engorda, observándose un mejor desempeño económico y productivo de animales alimentados con dietas suplementadas con ajo, además, reduce el número de coccidias en contenido intestinal de pollos (Massad *et al.*, 2018). En pollos, la deficiencia de colina provoca disminución en el consumo de alimento y subsecuentemente reduce la ganancia de peso, el ajo mostró ser efectivo compensando el efecto de la deficiencia de colina, esto debido a que el consumo de alimento incrementa cuando el alimento es adicionado con el 1% de ajo en polvo (Navidshad *et al.*, 2018). Javed *et al.* (2009) reportan que el consumo de alimento y el peso de la canal en pollos de engorda aumentaron significativamente añadiendo 10 mL/L de extracto acuoso de ajo mezclado con plantas medicinales en el agua de bebida durante 35 días. La inclusión de ajo en polvo en el alimento para pollos vacunados contra Newcastle y Enfermedad infecciosa de la Bursa a dosis de 20 g/kg de alimento, incrementa significativamente los títulos de anticuerpos (Haq *et al.*, 1999). En dos estudios realizados por Peinado *et al.* (2012) en España y Fadlalla *et al.* (2010) en Sudán, utilizaron ajo y un derivado del ajo llamado propil propano tiosulfinato en alimento de aves destinadas para producción de carne, encontrando que la inclusión de ajo en cualquiera de las dos presentaciones, aumentó la cantidad de glóbulos blancos, redujo el número de patógenos intestinales y subsecuentemente la secreción de toxinas bacterianas, mejorando la conversión alimenticia, esto debido a que mejora la salud intestinal que favorece la absorción de nutrientes. Damaziak *et al.* (2017) en Polonia probaron el efecto de la inclusión de ajo en gallinas, reportando que incluir extracto de ajo a dosis de 0.0032% en el alimento de gallinas, incrementa la producción de huevo, el peso y mejora la calidad de la albúmina expresada en unidades Haugh. Canogullari *et al.* (2010) concluyen en su investigación, que la producción de huevo incrementa significativamente añadiendo 1% de ajo en polvo en el alimento para gallinas, sin observar cambios en el peso del huevo, su contenido y el espesor de la cáscara.

El extracto de ajo también ha sido utilizado como un bacteriostático natural, capaz de inhibir el crecimiento de *Salmonella* spp *in vitro*, sin afectar su capacidad inmunogénica, mostrando ser una alternativa útil para la producción de vacunas vivas atenuadas (Curtello *et al.*, 2018).

Estudios *in vitro* han probado el efecto bactericida del extracto de ajo sobre bacterias potencialmente patógenas. Petropoulos *et al.* (2018) en Grecia, midieron la actividad inhibitoria del extracto etanólico de ajo, encontrando mayor actividad inhibitoria contra algunas bacterias Gram negativas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* Typhimurium, *E. coli*, y *Enterobacter cloacae*, y Gram positivas: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Micrococcus flavus*, que el testigo positivo (estreptomina y ampicilina). Tosun *et al.* (2017) en Turquía, probaron la capacidad inhibitoria de los aceites esenciales de ajo en carne de salmón (*Oncorhynchus gorboscha*) inoculada con *S. Enteritidis* y *L. monocytogenes*, reduciendo significativamente el conteo de UFC en la carne tratada con AE's de ajo. Sulaiman *et al.* (2014) reportan actividad inhibitoria del extracto de ajo al 50% sobre *Salmonella* Typhi con halos de inhibición de 40 mm de diámetro. (Hannan *et al.*, 2012) concluyeron que el extracto acuoso de ajo inhibió hasta un 100% el desarrollo de *S. Typhi* (multirresistente "MDR") a dosis de 22 mg/mL.

El huevo es un alimento altamente nutritivo, forma parte de la dieta habitual en el humano. Aporta luteína, vitaminas, minerales, grasas y proteína con alto valor biológico. Sin embargo, algunas gallinas pueden ser reservorio de *Salmonella* spp, aumentando el riesgo de zoonosis. El control de patógenos en la industria avícola se realiza mediante vacunación y APC's en dosis sub terapéuticas, esto reduce el número de patógenos intestinales, mejorando la salud intestinal y la conversión alimenticia. La vacuna reduce considerablemente la excreción de bacterias, pero no elimina completamente el microorganismo de los tejidos y los APC's han provocado resistencia bacteriana. Por esta razón, surgen las restricciones en el uso de antibióticos promotores del crecimiento, que ha incrementado la necesidad de alternativas antimicrobianas naturales para la industria avícola, que permitan mejorar la eficiencia alimenticia y la inocuidad de los alimentos, que no dejen residuos, ni repercutan en la salud del consumidor. Los fito bióticos afectan positivamente el crecimiento y la salud de los animales, actuando como antimicrobiano, inmunoestimulante, mejora la salud intestinal y estimula las secreciones endógenas. En el

caso de los AE's del ajo (*Allium sativum*) han mostrado ser efectivos inhibiendo el crecimiento de algunas bacterias patógenas *in vivo* e *in vitro*, además mejora la eficiencia alimenticia y previene algunas enfermedades.

### III. HIPÓTESIS

*Salmonella* spp está presente en las heces y contenido del huevo de gallinas en producción

El extracto de ajo (*Allium sativum*) inhibe el crecimiento *in vitro* de *Salmonella* spp multirresistente

## **IV. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Determinar la actividad inhibitoria *in vitro* del extracto de ajo (*Allium sativum*) contra *Salmonella* spp aislada de heces de gallinas en producción de huevo.

#### **4.1.1 Objetivos específicos**

Determinar la presencia de cepas de *Salmonella* spp en heces, alimento y huevo de gallina.

Identificar cepas de *Salmonella* spp mediante pruebas bioquímicas.

Identificar cepas de *Salmonella* spp mediante PCR.

Identificar el perfil de resistencia a antibióticos en cepa de *Salmonella* spp.

Determinar el efecto inhibitorio *in vitro* del extracto de ajo (*Allium sativum*) contra *Salmonella* spp aislada de heces de gallinas en producción de huevo.

## V. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 Localización del lugar de trabajo

Las muestras fueron colectadas en granjas avícolas de la periferia de la ciudad de Culiacán, Sinaloa, México (24° 46' 13" LN y 107° 21' 14" LO). La región se caracteriza por tener un clima BS1 (h') w(w)(e), el cual es considerado como clima semiseco, muy cálido, con lluvias en verano, según la clasificación de Köppen y modificada por García (García, 1988); con temperatura promedio anual de 25.9 °C, máxima de 30.4 °C en junio y julio, y mínima de 20.6 °C en enero; la humedad relativa promedio es de 68%, con máxima de 81% en septiembre y mínima de 51% en abril; la precipitación anual promedio es de 688.5 mm (CIAPAN, 2002).

El aislamiento y la fase experimental se realizaron en el Laboratorio de Bacteriología y Micología en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Sinaloa, en Culiacán, Sinaloa, México.

## **5.2 Aislamiento e identificación de cepas de *Salmonella* spp**

5.2.1 Colección de muestras. Para el aislamiento de *Salmonella* spp, se realizó un muestreo por conveniencia en tres granjas para producción de huevo.

En la granja A (intensivo), con alojamiento en jaula de tipo batería, se recolectaron tres muestras de heces (aprox. 50 g cada muestra) de distintas zonas dentro de la granja, cuatro huevos con distintas características y cinco muestras de alimento de 50 g cada una. La granja B, cuenta con cuatro corrales para gallinas con alojamiento en piso de tierra y en uno de ellos las gallinas comparten el corral con gansos, se recolectaron aproximadamente 50 g de heces de cada uno de los cuatro corrales y tres huevos, uno de cada corral con gallinas.

La granja C, cuenta con dos corrales para alojamiento en piso de cemento, uno de ellos con gallos alojados individualmente y sin acceso a praderas, y otro con gallinas y acceso a pradera para pastoreo, se colectaron cinco huevos y tres muestras de heces de 50 g (2 de gallinas y 1 de gallos).

Las muestras fueron colocadas individualmente en recipientes estériles y trasladados inmediatamente al laboratorio donde se almacenaron a 4 °C hasta su procesamiento, en un tiempo no mayor a 24 h.

5.2.2 Aislamiento bacteriológico. Se realizó en tres etapas: la primera etapa fue el pre enriquecimiento, que consistió en la homogeneización de 12.5 g de heces o alimento y 12.5 mL en el caso del huevo en 112.5 mL de agua peptonada amortiguada (BPW por sus siglas en inglés), se dejó reposar 10 min y se mezcló con movimientos circulares hasta disolver la muestra, posteriormente se incubó a  $37 \pm 1$  °C durante  $24 \pm 2$  h. En la segunda fase correspondiente al enriquecimiento selectivo, se transfirieron 0.1 mL del cultivo de pre enriquecimiento a un tubo con 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis (RV) y se incubó a  $42 \pm 1$  °C por  $24 \pm 2$  h para mayor selectividad con *Salmonella* spp. Para la fase de aislamiento en agar selectivo, se tomó una alícuota de 0.01 mL del caldo Rappaport Vassiliadis con ayuda de una micropipeta y se inoculó en agar entérico Hektoen (HK), el inóculo se estrió con un asa bacteriológica, dejó reposar 10 min para la absorción del inóculo en el medio y se incubó a  $35 \pm 1$  °C por  $24 \pm 2$  h. Para la interpretación de los resultados, se tomaron en cuenta las siguientes características: en agar entérico HK, las colonias típicas de *Salmonella* spp son de color azul-verde o azul, con o sin centro negro, pudiendo ser casi totalmente negras y brillantes. Las colonias atípicas pueden ser de color amarillo con o sin centro negro. (Im *et al.*, 2015; NOM-210.SSA1-2014; Zhang *et al.*, 2013; FDA, 2007).

5.2.3 Identificación bioquímica. Las colonias típicas de *Salmonella* spp fueron inoculadas en los medios agar hierro triple azúcar (TSI), agar lisina hierro (LIA), agar citrato de simmons, sulfuro indol motilidad (SIM) y gelatina nutritiva e incubados a  $37 \pm 1$  °C durante 24 o 48 h, esto para caracterizar el metabolismo de la bacteria aislada. En TSI se evaluó la capacidad para fermentar carbohidratos como glucosa, sacarosa y lactosa, en LIA se evaluó la presencia de la enzima: decarboxilasa que metaboliza (descarboxila) la lisina, en citrato de Simmons se comprobó la utilización de citrato de sodio como única fuente de carbono, en SIM se probó la motilidad de las cepas aisladas, su capacidad para producir H<sub>2</sub>S y la producción de indol y en gelatina nutritiva, se evaluó la presencia de enzimas proteolíticas, capaces de hidrolizar la gelatina (Hassan *et al.*, 2015; NOM-210-SSA1-2014). Las colonias con características morfológicas y bioquímicas para el género *Salmonella*, se inocularon en agar base sangre (BAB) para su conservación y se almacenaron a 4 °C.

5.2.4 Identificación molecular por PCR. Se realizó PCR punto final para identificar el género de la cepa que se utilizó para evaluar la actividad antibacteriana. Para la identificación se usaron los siguientes primers: FW 5'-GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA-3' y RV 5'-TCATCGCACCGTCAAAGGAACC-3 donde amplifica un fragmento del gen *invA* a 284 pares de bases del género *Salmonella* (Amin *et al.*, 2015). La extracción de ADN fue mediante la técnica de fenol cloroformo (Sambrook *et al.*, 1989): la cepa se sembró (estría cerrada) en agar entérico Hektoen y se incubó a  $35 \pm 1$  °C durante  $24 \pm 2$  h, después del periodo de incubación al medio de cultivo se agregó 1 mL de PBS (tampón fosfato salino) y con ayuda de un asa bacteriológica se disolvieron las colonias que crecieron en el medio, se tomaron 500  $\mu$ L de la mezcla homogenizada y se colocó en un tubo eppendorf, se agregaron 1000  $\mu$ L de TE (Tris y EDTA) y 100  $\mu$ L de SDS al 20% (dodecil sulfato sódico), se incubó a  $37 \pm 1$  °C durante 1 h. Se tomaron 700  $\mu$ L de la muestra y se agregó la misma proporción de fenol, se agitó por inversión 20 veces y centrifugó a 12 000 rpm durante 2 min. Enseguida, 700  $\mu$ L de sobrenadante se mezclaron con 700  $\mu$ L de cloroformo, se agitó por inversión 20 veces y centrifugó a 12 000 rpm durante 2 min. Se tomó el sobrenadante y se mezcló con 1000  $\mu$ L de etanol absoluto, se homogeneizó por inversión 20 veces y se incubó a -20 °C por 24 h, después del tiempo de incubación se centrifugó a 12 000 rpm por 20 min, se desechó el sobrenadante y se dejó secar el sedimento para posteriormente suspenderlo en 50  $\mu$ L de agua destilada estéril y almacenarlo a -20 °C hasta su utilización. 10  $\mu$ L del producto obtenido (ADN) se probó en gel agarosa al 1% a 100 V por 20 min para observar la integridad del mismo, el gel fue teñido con *gel red* y fotografiadas bajo luz u. v. (Huang *et al.*, 2014). El PCR se realizó en un ThermoMixer C eppendorf con un volumen de la reacción de 10  $\mu$ L que consistirán en: 5  $\mu$ L de master mix, 1  $\mu$ L de solución de trabajo de cada primer, 1  $\mu$ L de DNA y 2  $\mu$ L de agua nano pura estéril. Las condiciones del ciclado consistieron en una fase de desnaturalización a 95 °C por 5 min, seguidos por 34 ciclos a 95 °C, 60 °C, y 72 °C por 1 min cada fase y una fase de extensión final a 72 °C por 5 min. Como testigo positivo y negativo se utilizó ADN de *Salmonella* Typhimurium y *Escherichia coli* respectivamente. La tinción para visualizar los ácidos nucleicos en gel agarosa por electroforesis se realizó con GelRed (Maurischat *et al.*, 2015).

### 5.3 Preparación de extractos de ajo (*Allium sativum*)

Los bulbos de ajo fueron adquiridos en el mercado local, a cada bulbillito se le quitó la hoja de protección para obtener la parte comestible, se lavaron y desinfectaron con agua destilada estéril e hipoclorito de sodio (200 ppm) respectivamente, y posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril para eliminar los residuos de hipoclorito. Luego se maceró en un mortero con pistilo estéril y con ayuda de una gasa estéril el producto macerado se filtró para obtener el extracto al 100%, la mezcla homogeneizada fue esterilizada por filtro con membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  (Hannan *et al.*, 2012). Los extractos se mantuvieron a 4 °C hasta su utilización, un tiempo no mayor a 24 h (Salem *et al.*, 2017).

### 5.4 Identificación de resistencia bacteriana en *Salmonella* spp

Por la resistencia bacteriana de *Salmonella* spp a los antibióticos, se realizó pruebas de inhibición *in vitro* utilizando el método de Kirby-Bauer de difusión en disco. Los multidisco (PT-36 multibac combinado I.D.) que se utilizaron incluían; cloranfenicol [30 mg/disco] (CL), cefotaxima [30 mg/disco] (CFX), amikacina [30 mg/disco] (AK), ampicilina [10 mg/disco] (AM) y sulfas/trimetoprim [25 mg/disco] (SXT). Las pruebas se realizaron por triplicado (Rivera *et al.*, 2013).

### 5.5 Pruebas de inhibición *in vitro* (método Kirby-Bauer)

La actividad antibacteriana del extracto de ajo se midió mediante pruebas de difusión en disco. Las concentraciones de los extractos que se usaron en el experimento fueron: 0, 25, 50, 75 y 100%, el extracto se diluyó con agua nano pura estéril para obtener las concentraciones deseadas (Benkeblia, 2004). A partir de una cepa de *Salmonella* spp identificada mediante PCR, se creció en caldo soya tripticaseína y se leyó en un espectrofotómetro Bandwidth UV-5200 Spectrophotometer a una densidad óptica de 600 nm, para establecer un patrón 0.5 Mc Farland que corresponde a una densidad óptica de 0.08 a 0.1, la concentración en UFC/mL del inóculo se determinó por ensayo y error hasta estandarizar la lectura ideal (Pérez *et al.*, 2008). La cepa se sembró en cajas de Petri con agar Mueller-Hinton (MH) mediante estría cerrada con ayuda de un hisopo estéril. Para las pruebas de difusión en disco, se utilizó un diseño completamente al azar (DCA). Discos de papel filtro (Whatman #1) estéril de 5 mm de diámetro fueron impregnados con las

diferentes concentraciones de los extractos, para el testigo negativo se utilizó agua nanopura estéril para impregnar los discos y el testigo positivo se consideró el antibiograma para bacterias Gram negativas. Se utilizaron cinco discos por caja de Petri; en ambos casos una vez colocados los discos, las cajas se dejaron en reposo 30 min y posteriormente se incubaron a  $37 \pm 1$  °C por  $18 \pm 2$  h. Se midió en milímetros la zona clara alrededor de cada disco (halo de inhibición), esto para obtener los promedios de inhibición de cada tratamiento. Cada prueba se realizó por triplicado (Benkeblia, 2004).

### **5.6 Análisis estadístico**

Los resultados del aislamiento de *Salmonella* se presentan en cuadro de frecuencias. A los resultados de las pruebas de inhibición, se les realizó prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y la prueba de Bartlett para evaluar homocedasticidad de las varianzas (Anexo 2); debido a que no se cumplieron los supuestos, fueron transformados, pero no se logró normalizarlos; por ello, se realizó la prueba de Kruskal-Wallis, donde el estadístico de prueba de ji cuadrada tuvo una probabilidad de 0.0001. Enseguida, se transformaron a rangos con la opción PROC RANK de SAS (SAS, 2002), y a éstos se les aplicó análisis de la varianza para un diseño de un solo factor y los promedios de rangos se compararon con la prueba de Dunn. Además, se probaron para los porcentajes de extracto de ajo, polinomios ortogonales de orden 1, 2, 3 y 4 (Steel y Torrie, 1988). En todos los análisis estadísticos se tuvo como referencia para rechazar la hipótesis nula un valor de alfa igual o menor a 0.05.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En total se analizaron 27 muestras (12 huevos, 10 muestras de heces y 5 muestras de alimento) de las cuales 11 fueron positivas de acuerdo a las características de las colonias en medio de cultivo selectivo y pruebas bioquímicas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Frecuencias para los resultados del aislamiento de *Salmonella* spp en muestras de heces, alimento y huevo de gallina.

Procedencia y Tipo de muestra	n	Muestras positivas	Porcentaje de muestras positivas
<b>Granja A</b>			
Albúmina y yema	4	3	75.00
Heces	3	3	100.00
Alimento	5	1	20.00
<b>Granja B</b>			
Albúmina y yema	3	0	00.00
Heces	4	3	75.00
<b>Granja C</b>			
Albúmina y yema	5	0	00.00
Heces	3	1	33.33
<b>Subtotal</b>			
Albúmina y yema	12	3	25.00
Heces	10	7	70.00
Alimento	5	1	20.00
<b>Total</b>	<b>27</b>	<b>11</b>	<b>40.73</b>

En el presente estudio se aisló *Salmonella* spp en las tres granjas muestreadas, se observó que las muestras de heces presentaron mayor porcentaje de contaminación detectándose un 70% de muestras positivas, en el caso del contenido del huevo (yema y albúmina) se detectó en 3 huevos (25%) y en alimento se detectó una muestra contaminada (20%). Estos resultados son similares a los referidos por García *et al.* (2011) en España, quienes aislaron *Salmonella* en muestras de heces, cascarón y contenido del huevo (albúmina y yema) obteniendo el 92% de muestras de heces positivas y el 34% de cascarones contaminados, en este estudio no se detectaron muestras positivas en el contenido del huevo. Long *et al.* (2017) en China investigaron la distribución de *Salmonella* en dos

granjas avícolas comerciales, encontrando el 100% (granja A) y 92.3% (granja B) de muestras de heces positivas para *Salmonella*, además el 26.1% de huevos analizados superficialmente y el 30.4% de muestras del contenido del huevo (albúmina y yema) evidenciaron contaminación. Otro estudio similar realizado en Colombia por Ramírez *et al.* (2014) cuyo objetivo fue determinar la presencia de *S. Enteritidis* en huevos para el consumo humano en Colombia, encontraron que el 1.74% de 230 muestras de huevo estaban contaminadas con el microorganismo. Los resultados anteriormente citados muestran que el aislamiento de *Salmonella* en granjas donde se alojan aves de postura, generalmente presenta alta frecuencia de contaminación por *Salmonella* en heces y huevo, esto sugiere que existe una alta frecuencia de infecciones en gallinas destinadas a la producción de huevo para consumo humano.

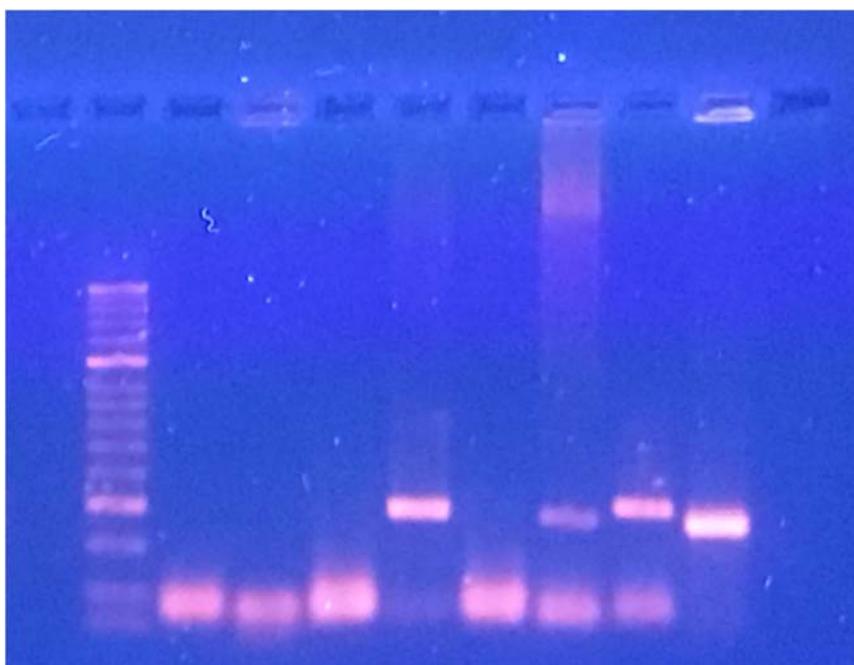


Figura 6. Identificación de cepas de *Salmonella* spp por PCR punto final con la amplificación de un fragmento del gen *InvA* a 284 pares de bases. Carril 1: marcador molecular de 1 kb; carril 2: control negativo [agua nano pura estéril]; carril 3: control negativo [*Staphylococcus aureus*]; carril 4 y 8: ADN de cepas sospechosas aislada de heces; carril 5: cepa sospechosa aislada de alimento; carril 6 y 7: ADN de cepas sospechosas aisladas de albúmina y yema; carril 9: control positivo [*Salmonella* Oranienburg].

En la prueba de susceptibilidad antimicrobiana, la cepa mostró resistencia a sulfametoxazol/trimetoprim, ampicilina y cloranfenicol (cepa multirresistente). La resistencia a los antibióticos puede explicarse por la constante exposición del microorganismo a dosis subterapéuticas o terapéuticas de antibióticos, que son administrados a los animales de las granjas, lo que favorece la expresión de genes relacionados con la resistencia como método de supervivencia de parte de la bacteria.

Los resultados de resistencia a antibióticos que mostró la cepa evaluada en este estudio, coinciden parcialmente con los resultados de Thung *et al.* (2016) que también detectaron resistencia en *Salmonella* spp a ampicilina. Campioni *et al.* (2012) probaron la resistencia bacteriana en 128 cepas de *S. Enteritidis* aisladas de muestras clínicas y alimentos en Brasil, encontrando que el 28.1% de las cepas fue resistente a ácido nalidíxico y 0.8% a sulfametoxazol /trimetoprim. Cabrera *et al.* (2004) refieren en aislamientos clínicos 9% de resistencia a ampicilina, 16% ácido nalidíxico, 5% gentamicina, 9% sulfametoxazol/trimetoprim, 21% tetraciclinas y 8% cloranfenicol. En otro estudio similar realizado por Soumet *et al.* (1999) evaluaron la resistencia bacteriana en tres serotipos de *Salmonella* (*S. Typhimurium*, *S. Kentucky* y *S. Enteritidis*) detectando resistencia en los tres serotipos a gentamicina, tobramicina y amikacina. *S. Kentucky* y *S. Enteritidis* también fueron resistentes a tetraciclina, piperacilina, ciprofloxacina, perfloxacina, minociclina y sulfas/trimetoprim.

6.1 Pruebas de inhibición. Los resultados de las pruebas de inhibición *in vitro* del extracto de ajo fresco, mostraron actividad inhibitoria en todos los niveles de los tratamientos, observándose mayor diámetro de inhibición ( $P < 0.01$ ) conforme se incrementa la concentración del extracto (cuadro 2). La cepa mostró alta sensibilidad a cefotaxima y amikacina (testigos positivos). De todos los tratamientos probados en el experimento, cefotaxima fue quien produjo halos de inhibición de mayor diámetro, seguido por amikacina y extracto de ajo al 100%, sin embargo en la comparación de medias no hubo diferencia estadística entre amikacina y cefotaxima, de igual manera no se observó diferencia significativa entre amikacina y extracto de ajo al 100%, estos resultados pudieran sugerir que la utilización de extracto de ajo en aves destinadas a la producción podría ser una alternativa eficiente para el control de las infecciones producidas por *Salmonella* spp

multirresistente, debido al efecto bactericida que muestra sobre bacterias patógenas en estudios *in vitro*.

Cuadro 2. Diámetro de las zonas de inhibición (mm) del crecimiento de *Salmonella* spp usando extracto de ajo y antibióticos comerciales (multidisco).

Tratamiento	n	Media	D.E.	Mínimo	Cuartil 1	Mediana	Cuartil 3	Máximo
0%	15	0.0	0.0	0	0	0	0	0
25%	15	14.33	0.81	13	14	14 <sup>e</sup>	15	16
50%	15	15.86	0.91	14	15	16 <sup>d</sup>	17	17
75%	15	18.06	0.88	16	18	18 <sup>c</sup>	19	19
100%	15	19.93	1.33	19	19	19 <sup>b</sup>	20	23
Amikacina	3	24.66	2.30	22	22	26 <sup>ab</sup>	26	26
Cefotaxima	3	30.0	0.0	30	30	30 <sup>a</sup>	30	30
Ampicilina	3	0.0	0.0	0	0	0 <sup>f</sup>	0	0
Cloranfenicol	3	0.0	0.0	0	0	0 <sup>f</sup>	0	0
Sulfametoxazol -Trimetoprim	3	0.0	0.0	0	0	0 <sup>f</sup>	0	0

Polinomios ortogonales para los niveles de extracto de ajo

Efecto lineal <0.0001

Efecto cuadrático 0.6017

Efecto cúbico 0.8134

Efecto cuártico 0.1834

Tratamiento 0%, 25%, 50%, 75% y 100% = concentraciones del extracto de ajo.  
D.E.=desviación estándar.

<sup>abcdef</sup> Literales diferentes en columna indican diferencia significativa con la prueba de Dunn para los rangos ( $P \leq 0.05$ ).

El efecto bactericida del extracto acuoso observado en este estudio, concuerda con resultados de otras investigaciones: Salem *et al.* (2017) midieron la concentración mínima inhibitoria del extracto acuoso de ajo fresco y observaron inhibición del crecimiento bacteriano en 13 serovariedades de *S. enterica* en un rango entre 20 y 35 mg/mL. Lawal *et al.* (2016) observaron diámetros de inhibición de 18.67 y 6.78 mm (sin contar el diámetro del disco) a dosis de 160 mg/mL y 120 mg/mL, respectivamente sobre *Salmonella* spp. Hamza (2014) usó extracto acuoso de ajo al 50% para evaluar la actividad inhibitoria sobre *Salmonella* Typhi, con diámetros de inhibición de 20 mm a las 24 h de incubación. Indu *et al.* (2006) midieron la actividad bactericida del extracto acuoso en cepas de *S. Enteritidis* usando discos de 7 mm, con diámetros de inhibición de 29 mm (extracto al 100%), 22 mm (75%), 17 mm (50%), 10 mm (25%), el extracto al 10% no mostró actividad bactericida, en el mismo estudio se midió la actividad inhibitoria sobre *S. Typhimurium*, con menor diámetro de inhibición respecto a *S. Enteritidis* con 25 mm (extracto al 100%), 17 mm (75%) y 12 mm (50%), sobre esta serovariedad, no se observó inhibición a concentraciones del 25% y 10% de extracto de ajo. Los resultados obtenidos en esta investigación mostraron que el extracto de ajo fresco inhibe el crecimiento de *Salmonella* spp multirresistente. Esto pudiera indicar que la inclusión de ajo o extracto de ajo en las dietas de aves en producción podría ser una alternativa eficaz para reducir el número de patógenos causantes de zoonosis.

En contraste a estos hallazgos, García y Herrera, (2007) manifestaron no haber encontrado actividad inhibitoria *in vitro* del extracto de ajo contra *Salmonella* Enteritidis. Resultados que coinciden con otra investigación realizada en Nigeria, donde no encontraron actividad inhibitoria *in vitro*, utilizando extracto acuoso a dosis de 1000 mg/mL sobre *S. Typhi* (Ekwenye y Elegalam, 2005), ambas investigaciones utilizaron técnicas similares a las utilizadas en este estudio. Las discrepancias anteriores, se pueden deber a que la composición química y propiedades farmacológicas del ajo depende de diversos

factores como el origen, el tiempo de almacenamiento y el método utilizado para obtener los extractos (Rivlin, 2001).

## VII. CONCLUSIONES

En el aislamiento, se confirmó la presencia *Salmonella* spp en el 70% de las muestras de heces y el 25% de muestras del contenido del huevo de gallinas en producción.

Los resultados de las pruebas de inhibición *in vitro* confirman que el extracto de ajo (*Allium sativum*) inhibe el crecimiento de *Salmonella* spp multirresistente, aumentando el diámetro de inhibición a medida que se incrementa la concentración del extracto. Estos resultados pudieran sugerir que la utilización de extracto de ajo en animales de producción podría ser una alternativa eficiente para el control de las infecciones producidas por *Salmonella* spp multirresistente.

## VIII. LITERATURA CITADA

- Aburto, A. 2008. El huevo como un aliado en la nutrición y salud. *Rev. Cubana Aliment. Nutr.* 18(2): 4-10.
- Amagase, H., B. Petesch, H. Matsuura, S. Kasuga and Y. Itakura. 2001. Intake of garlic and its bioactive components. *J. Nutr.* 131(3):955–962. Doi: 10.1093/jn/131.3.955S
- Amin, H. S., Abdelrahman A. A. and Abdellrazeq G. S. 2015. Occurrence of multidrug Resistant *Salmonella Enterica* in retail chicken meat and development of a six genes based multiplex PCR as an alternative diagnostic method. *J. Food Safety.* 36: 459-466. Doi.org/10.1111/jfs.12260
- Arnault, I., T. Haffner, M. H. Siess, A. Vollmar. R. Kahane and J. Auger. 2005. Analytical method for appreciation of garlic therapeutic potential and for validation of a new formulation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37: 963–970. Doi: 10.1016/j.jpba.2004.09.032
- Baron, F., F. Nau, C. G. Dubiard, S. Bonnassie, M. Gautier, S. C. Andrews and S. Han. 2016. Egg white versus *Salmonella Enteritidis*! A harsh medium meets a resilient pathogen. *Food Microbiol.* 53: 82-93. Doi: 10.1016/j.fm.2015.09.009.
- Barua, A. and Y. Yoshimura. 2004. Ovarian cell-mediated immune response to *Salmonella enteritidis* infection in laying hens (*Gallus domesticus*). *Poult. Sci.* 83(6):997-1002. Doi: 10.1093/ps/83.6.997
- Benkeblia, N. 2004. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *Lebensm. Wiss. Technol.* 37(2004): 263–268. Doi:10.1016/j.lwt.2003.09.001
- Betancor L. y L. Jim. 2012. *Salmonella* y salmonelosis. Departamento de Bacteriología y Virología, Departamento de Desarrollo Biotecnológico, Facultad de Medicina, U. de la R. Disponible en [http://higiene1.higiene.edu.uy/DByV/Salmonella\\_y\\_salmonelosis.pdf](http://higiene1.higiene.edu.uy/DByV/Salmonella_y_salmonelosis.pdf)
- Block E. 1985. The chemistry of garlic and onions. *Sci. Am.* 252(3): 114-119.
- Block E. 1992. The organosulfur chemistry of the genus *Allium* implications for the organic chemistry of sulfur. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 31(9): 1135-1178. Doi.org/10.1002/anie.199211351
- Cabrera, R., J. Ruiz, F. Marco, I. Oliveira, M. Arroyo, A. Aladuen, M. Usera, T. Jiménez, J. Gascón and J. Vila. 2004. Mechanism of resistance to several antimicrobial agents in *Salmonella* clinical isolates causing traveler's diarrhea. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48(10): 3934–3939. Doi: 10.1128/AAC.48.10.3934-3939.2004

- Campioni, F., A. M. Moratto and J. P. Falcao. 2012. Genetic diversity, virulence genes and antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis isolated from food and humans over a 24-year period in Brazil. *Food Microbiol.* 32: 254-264. Doi.org/10.1016/j.fm.2012.06.008
- Canogullari, S., M. Baylan, Z. Erdogan, V. Duzguner and A. Kucukgul. 2010. The effects of dietary garlic powder on performance, egg yolk and serum cholesterol concentrations in laying quails. *Czech J. Anim. Sci.* 55(7): 286–293. Doi: 10.17221/126/2009-CJAS
- Cárdenas, P. M. E., O. R. Cruz, J. L. Gándara y M. A. Pérez. 2014. Factores de virulencia bacteriana: la inteligencia de las bacterias. *Elementos.* 94: 35-43.
- Carrillo, T. W. I. 2014. Actividad antiproliferativa de la lisozima en su forma nativa y modificada. *SAN.* 15(4): 107-114.
- Carrillo, W. 2013. Lisozima: actividad antibacteriana y alergenicidad. *SAN.* 14(4): 314-326.
- Carbajal, A. A. 2006. Calidad nutricional de los huevos y su relación con la salud. *Revista de Nutrición Práctica.* 10: 73-76.
- Charles, H. G. L., S. C. E. Medina y R. J. Hernández. 2007. Prevalencia de *Salmonella* spp en alimentos en el estado de Tamaulipas durante el año 2005. *Rev. Invest. Clin.* 59(6): 437-443.
- CIAPAN. Guía para la asistencia técnica del Valle de Culiacán. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Forestales y Pecuarias. Culiacán, Sinaloa, México. 92 pp. 2002.
- Codex Alimentarius Commission. 2001. Codex Alimentarius: Food hygiene, basic texts. Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Rome Italy. 2nd ed. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/012/a1552e/a1552e00.htm>. Accesada octubre 13 de 2017.
- Coon, C., K. Beagley and S. Bao. 2009. The role of granulocyte macrophage-colony stimulating factor in gastrointestinal immunity to Salmonellosis. *Scand. Immunol.* 70(2): 106-115. Doi: 10.1111/j.1365-3083.2009.02279.x
- Collard, J. M., S. Bertrand, K. Dierick, C. Ggodard, C. Wildemaue, K. Vermeersch, J. Duculot, F. Van immerseel, F. Pasmans, H. Imberechts and C. Quinet. 2008. Drastic decrease of *Salmonella* Enteritidis isolated from humans in Belgium in 2005, shift in phage types and influence on foodborne outbreaks. *Epidemiol. Infect.* 136: 771–781.
- Cortes, V. D., V. E. Rodríguez y N. Verjan. 2017. Frecuencia de resistencia fenotípica y genotípica a antibióticos en *Salmonella* spp aislada de carcasas de pollo en Ibagué, Colombia. *Rev. Colomb. Cienc. Pecu.* 30 (Supl): 149.

- Cota, R. E., L. Hurtado, E. Pérez y L. Alcántara. 2014. Resistencia a antibióticos de cepas bacterianas aisladas de animales destinados al consumo humano. *RelbCi*. 1(1): 75-85.
- Curtello, S., A. Justiz and H. Asemota. 2018. The use of indigenous plants in the attenuation of a Live-Attenuated *Salmonella* vaccine to protect against poultry. *Immunome Res*. 14(1): 1-3. Doi: 10.4172/1745-7580.1000150
- Damaziak, K., J. Riedel, D. Gozdowski, J. Niemiec, A. Siennicka, and D. Róg. 2017. Productive performance and egg quality of laying hens fed diets supplemented with garlic and onion extracts. *Journal Appl. Poultry Res*. 26(3): 337-349. Doi: 10.3382/japr/pfx001
- De Buck, J., F. Pasmans, F. Van Immerseel, F. Haesebrouck, and R. Ducatelle. 2004a. Tubular glands of the isthmus are the predominant colonization site of *Salmonella* enteritidis in the upper oviduct of laying hens. *Poult. Sci*. 83: 352–358.
- De Buck, J., F. Van Immerseel, F. Haesebrouck and R. Ducatelle. 2004b. Colonization of the chicken reproductive tract and egg contamination by *Salmonella*. *J. Appl. Microbiol*. 97: 233–245, doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02294.x
- Dewaele, I., G. Rasschaert, C. Wildemaewe, H. Van Meirhaeghe, M. Vanrobaeys, E. Graef, L. Herman, R. Ducatelle, M. Heyndrickx and K. De Reu. 2012. Polyphasic characterization of *Salmonella* Enteritidis isolates on persistently contaminated layer farms during the implementation of a national control program with obligatory vaccination: A longitudinal study. *Poult. Sci*. 91(11): 2727–2735. Doi: 10.3382/PS.2012-02218.
- Diaz, S. S., D. D'Sousa, D. Biswas and I. Hanning. 2015a. Botanical alternatives to antibiotics for use in organic poultry production. *Poult. Sci*. 94:1419–1430. Doi.org/10.3382/ps/pev014
- Diaz, S., S. Moscoso, F. Solís, A. Andino and I. Hanning. 2015b. Antibiotic use in poultry: a driving force for organic poultry production. *Food Protection Trends* 35(6): 440–444.
- Doorduyn, Y., W. E. Van Den Brandhof, Y. T. H. P. Van Duynhoven, W. J. B. Wannet and W. Van Pelt. 2006. Risk factors for *Salmonella* Enteritidis and Typhimurium (DT104 and non-DT104) infections in The Netherlands: predominant roles for raw eggs in Enteritidis and sandboxes in Typhimurium infections *Epidemiol. Infect*. 134: 617–626. Doi: 10.1017/S0950268805005406
- Donado, G. P., Byrne B., León M., Castellanos R., Vanegas C., Coral A., Arevalo A., Clavijo V., Vargas M., Romero J., Tafur M., Pérez E. and Smith W. 2015. Prevalence, resistance patterns, and risk factors for antimicrobial resistance in bacteria from retail chicken meat in Colombia. *J. Food Prot*. 78(4): 751–759.

- European Food Safety Authority (EFSA) 2007a. The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2006.
- Fadlalla, I. M. T., B. H. Mohammed and A. O. Bakhiet. 2010. Effect of feeding garlic on the performance and immunity of broilers. *Asian J. Poultry Sci.* 4(4): 183-189. Doi: 10.3923/ajpsaj.2010.182.189
- Feldberg, R. and S. Chang. 1988. In vitro mechanism of inhibition of bacterial cell growth by Allicin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32(12): 1763–1768.
- Figuroa, O. I. M. y Verdugo R. A. 2005. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* spp. *ALAM.* 47(1): 25-42.
- Food and Drug Administration (FDA). 2007. Bacteriological Analytical Manual, capítulo 5: *Salmonella*. New Hampshire U.S.A.
- Frye, J. R. and C. R. Jackson. 2013. Genetic mechanisms of antimicrobial resistance identified in *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. Isolated from U.S. food animals. *Front. Microbiol.* 4(135):1-22. Doi:10.3389/fmicb.2013.00135
- Fuentes, A. 2013. Efecto de la aplicación parenteral de lisozima sobre la producción y calidad del semen de verracos en Venezuela. *FCV-LUZ.* 23(2): 134-138.
- Gamazo, C. and J. M. Irache. 2007. *Salmonella* vaccines. Communicating current research and educational topics and trends in applied Microbiology (A. Méndez-Vilas Editor). Disponible en [http://www.formatex.org/microbio/pdf/Pages 518-524.pdf](http://www.formatex.org/microbio/pdf/Pages%20518-524.pdf). Accesada marzo 15 de 2017.
- Gantois, I., R. Ducatelle, F. Pasmans, F. Haesebrouck, R. Gast, T. J. Humphrey and F. Van Immerseel. 2009. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. *FEMS Microbiol Rev* 33: 718–738. Doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00161.x
- García, C., J. M. Soriano, V. Benítez and P. Catalá. 2011. Assessment of *Salmonella* spp. in feces, cloacal swabs, and eggs (eggshell and content separately) from a laying hen farm. *Poult. Sci.* 90: 1581–1585. Doi: 10.3382/ps.2010-01104
- García, R. R. y F. C. Herrera. 2007. Evaluación de la inhibición del crecimiento de cinco cepas bacterianas patógenas por extractos acuosos de *Allium sativum*, *Allium fistulosum* y *Allium cepa*: estudio preliminar in vitro. *BISTUA.* 5(2): 68-79.
- García, E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarla a las condiciones climáticas de la República Mexicana). Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. 144 pp.

- Gast, R. K., R. Guraya, D. R. Jones, K. E. Anderson and D. M. Karcher. 2016. Colonization of internal organs by *Salmonella* Enteritidis in experimentally infected laying hens housed in enriched colony cages at different stocking densities. *Poult. Sci.* 95(6): 1363–1369. Doi: 10.3382/ps/pew037
- Gast, R., R. Guraya, D. Jones and K. Anderson. 2015. Persistence of fecal shedding of *Salmonella enteritidis* by experimentally infected laying hens housed in conventional or enriched cages. *Poult. Sci.* 94(7): 1650–1656. Doi: 10.3382/ps/pev113
- González, P. J., Pereira S. N., Soto V. Z., Hernández A. E. and Villarreal C. J. 2014. Microbiological isolation of *Salmonella* spp and molecular tools for detection. *Salud Uninorte* 30 (1): 73-94. Doi.org/10.14482/ sun.30.1.4316
- Gutiérrez, C., P. Martínez y C. Apodaca. 2008. Salmonelosis y campilobacteriosis, las zoonosis emergentes de mayor Expansión en el mundo. *Vet. Méx.* 39(1): 81–90.
- Hamza, J. H. 2014. *In vitro* antimicrobial activity of garlic, onion, garlic-onion combination (aquatic and oil) extract on some microbial pathogens in babylon province, Iraq. *J. Pharm Pharm Sci.* 3(8): 65-78.
- Han, J., L. Lawson, G. Han and P. Han. 1995. Spectrophotometric method for quantitative determination of Allicin and total garlic thiosulfinates. *Anal. Biochem.* 25 (1):157–160. Doi:10.1006/abio.1995.1124
- Hannan, A., K. Rauf, M. Ikram, T. Naeem, M. Raja, M. Usman, R. Tahir and M. Saba. 2012. Inhibitory effect of aqueous garlic (*Allium Sativum*) extract against clinical isolates of *Salmonella typhi*. *Afr. J. Microbiol. Res.* 6(21): 4475–4480. Doi: 10.5897/AJMR11.540
- Haq, A. U., K. A. Meraj and S. Rasool. 1999. Effect of supplementing allium sativum (garlic) and Azidirachta indica (neem) leavels in broiler feeds on their blood colesterol, triglycerides and antibody titre. *Int. J. Agr. Biol.* 1(3): 125-127.
- Hashemi, S. and H. Davoodi. 2010. Phyto-genics as new class of feed additive in poultry industry. *J. Anim. Vet. Adv.* 9(17): 2295-2304. Doi: 10.3923/javaa.2010.2295.2304
- Hassan, M. M., S. Esmaeili, A. F. Bagheri, E. Mostafavi and S. T. Zahraei. 2015. Detection of *Salmonella* spp in commercial eggs in Irán. *Iran. J. Microbiol.* 7(1): 50-54.
- Herrera, B. Y. y R. L. Jabib. 2015. Salmonelosis, zoonosis de las aves y una patogenia muy particular. *REDVET* 16(1): 1-19.
- Holt, P. S., R. Gast, R. Porter and H. Stone. 1999. Hyporesponsiveness of the systemic and mucosal humoral immune systems in chickens infected with *Salmonella entérica* serovar *enteritidis* at one day of age. *Poult. Sci.* 78: 1510–1517.

- Huang, Q., L. Baum and W. L. Fu. 2014. Simple and Practical Straining of DNA with GelRed in Agarosa Gel Electrophoresis. *Clin. Lab.* 56: 149-154.
- Im, M. C., J. Jeong, K. Yong-Kuk, J. Ok-Mi, K. Min-Su and L. Young Ju. 2015. Prevalence and characteristics of *Salmonella spp.* Isolated from commercial layer farms in Korea. *Poult. Sci.* 94:1691-1698 Doi: 10.3382/ps/pev137
- Indu, M. N., A. A. M. Hatha, C. Abirosh, U. Harsha and G. Vivekanandan. 2006. Antimicrobial activity of some of the south-indian spices against serotypes of *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila*. *Braz. J. Microbiol.* 37: 153-158. Doi: 10.1590/S1517-83822006000200011
- International Egg Commission (IEC). 2016. The World egg market. Disponible en <https://www.internationalegg.com>. Accesada noviembre 17 de 2017.
- Instituto de Estudios del Huevo (IEH). 2009. El gran libro del huevo. Editorial everest. Madrid, España.
- Isaacs, S., J. Aramini, B. Ciebin, J. A. Farrar, R. Ahmed, D. Middleton, A. U. Chandran, L. J. Harris, M. Howes, E. Chan, A. S. Pichette, K. Campbell, A. Gupta, L. Y. Lior, M. Pearce, C. Clark, F. Rodgers, F. Jamieson, I. Brophy, and A. Ellis. 2005. An International Outbreak of Salmonellosis Associated with Raw Almonds Contaminated with a Rare Phage Type of *Salmonella* Enteritidis. *J. Food Prot.*, 68(1): 191-198
- Javed, M., F. R. Durran, A. Hafeez, R. U. Khan and I. Ahmad. 2009. Effect of aqueous extract of plant mixture on carcass quality of broiler chicks. *J. Agric. Biol. Sci.* 4(1): 37-40.
- Junod, T., J. López y P. Gädicke. 2013. Estudio de susceptibilidad antimicrobiana de *Salmonella enterica* en muestras de origen animal y alimentario. *Rev. Med. Chile.* 141: 298-304.
- Khan, R. U., Z. Nikousefat, V. Tufarrel, S. Naz, M. Javdani and V. Laudadio. 2012. Garlic (*Allium sativum*) supplementation in poultry diets: effect on production and physiology. *World's Poult. Sci. J.* 68(1): 97-103. Doi:10.1017/S0043933912000530
- Kopper, G., G. Calderón, S. Schneider, W. Domínguez y G. Gutiérrez. 2009. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación (FAO). Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico Disponible en <http://www.fao.org/3/a-i0480s.pdf>. Accesado julio 2 de 2017.
- Kóse, K. and Denizil A. 2013. Poly (hydroxyethyl methacrylate) based magnetic nanoparticles for lysozyme purification from chicken egg white. *Artif Cells Nanomed. Biotechnol.* 41: 13-20. Doi: 10.3109/10731199.2012.696067

- Kumar, S., K. Sharadamma and P. Radhakrishna. 2010. Effects of a garlic active based growth promoter on growth performance and specific pathogenic intestinal microbial counts of broiler chicks. *International J. Poult. Sci.* 9 (3): 244-246. Doi: 10.3923/ijps.2010.244.246
- Lawal, B., O. K. Shittu, F. J. Oibiokpa, H. Mohammed and S. I. Umar. 2016. Antimicrobial evaluation, acute and sub-acute toxicity studies of *Allium sativum*. *J. Acute Dis.* 5(4): 296-301. Doi: 10.1016/j.joad.2016.05.002
- Li X., L. Liu, Q. Li, G. Xu and J. Zheng. 2017. *Salmonella* Enteritidis in layer farms of different sizes located in Northern China: On-Farm sampling and detection by the PCR method. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* 19(3): 377-386. Doi.org/10.1590/1806-9061-2016-0318
- Long, M., H. Yu, L. Chen, G. Wu, S Zhao, W. Deng, S. Chen, K. Zhou, S. Liu, L. He, X. Ao, Y. Yan, M. Ma, H. Wang, M. A. Davis, L. Jones, B. Li, A. Zhang and L. Zou. 2017. Recovery of *Salmonella* isolated from eggs and the commercial layer farms. *Gut. Pathog.* 9(74): 1-9. Doi: 10.1186/s13099-017-0223-8
- Majowicz, S., J. Musto, E. Scallan, F. Angulo, M. Kirk, S. O'brien, T. Jones, A. Fazil and R. Hoekstra. 2010. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin. Infect. Dis.* 50(6): 882-889. Doi: 10.1086/650733
- Mancera, M. A., J. V. Navarrete, M. L. Ontiveros, S. D. Valencia, D. López y V. R. Tenorio. 2005. Identificación de *Salmonella* Enteritidis en huevo para consumo en la ciudad de México. *Téc Pecu Méx.* 43(2):229-237
- Massad, M. A., D. Ramamneh. A. Sharafat and N. Hussain. 2018. Effect of using garlic on the economical and physiological characteristics of broiler chickens. *Int J Environ Sci Nat Res.* 10(2): 1-5. Doi: 10.19080/IJESNR.2018.10.555783
- Mattiello, S. P., G. Drescher, V. C. Barth, C. A. Ferreira and S. D. Oliveira. 2015. Characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* strains isolated from Brazilian poultry production. *Anton. Leeuw. Int. G. J.* 108(5): 1227–1238.
- Maurischat, S., I. Szabo, B. Baumman and B. Malorny. 2015. Rapid real-time PCR methods to distinguish *Salmonella* Enteritidis wildtype field isolates from vaccine strains Salmovac SE/Gallivac SE and AviPro SALMONELLA VAC E. *J. Microbiol. Methods.* 112 (5): 92-98. Doi: 10.1016/j.mimet.2015.03.015
- Miranda, J. M., Mondragón A. C., Martínez B., Guarddon M. and Rodríguez J. A. 2009. Prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* from different raw foods in Mexico. *J. Food Prot.* 72(5): 966–971.

- Miron, T., A. Rabinkov, D. Mirelman, M. Wilchek and L. Weiner. 2000. The mode of action of allicin: its ready permeability through phospholipid membranes may contribute to its biological activity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1463(1): 20-30. Doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00174-1
- Mnayer, D., A. Sylvie, F. Tixier, E. Petitcolas, T. Hamieh, N. Nehme, C. Ferrant, X. Fernández and F. Chemat. 2014. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of six essential oils from the *Alliaceae* family. *Molecules* 19(12): 20034-20053. Doi: 10.3390/molecules191220034
- Molina, N., B. Millán y M. Araque. 2010. Indicadores de calidad sanitaria y fenotipificación de *Salmonella enterica* aislada de pollo crudo comercializado en el área urbana de Mérida, Venezuela. *INFECTIO.* 14(3): 174-185.
- Mollenhorst, H., C. J. Van Woudenberg, E. G. M. Bokkers and I. J. M. de Boer. 2005. Risk factors for *Salmonella enteritidis* infections in laying hens. *Poult. Sci.* 84: 1308–1313
- Morales, D. M. C., S. C. Duarte, T. S. A. Bastos, C. L. G. Rezende, N. S. M. Leandro, M. B. Café, J. H. Stringhini and M. A. Andrade. 2016. Detection of *Salmonella* spp by conventional bacteriology and by quantitative polymerase chain reaction in commercial egg structures. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* 18(1): 117-124. Doi.org/10.1590/18069061-2015-0063
- Moreno, G. y A. Alarcón. 2010. Higiene alimentaria para la prevención de trastornos digestivos infecciosos y por toxinas. *Rev. Med. Clín. Condes* 21(5): 749–755. Doi: 10.1016/S0716-8640(10)70596-4
- Moreno, A. M., M. A. Castillo, A. J. Ferrebuz, W. F. Osorio, M. I. Torres y D. P. López. 2018. Resistencia bacteriana en pequeños animales, potencial riesgo para la salud humana. *REDVET* 19(2): 1-24.
- Mottet, A. and G. Tempio. 2017. Global poultry production: current state and future outlook and challenges. *Worlds Poult. Sci. J.* 73(2): 245-256. Doi: 10.1017/S0043933917000071
- Mujica, H., M. Pérez de Camacaro, C. M. E. Sanabria y A. Giménez. 2013. Efecto de la densidad de siembra, fertilización potásica y almacenamiento de los bulbos sobre la concentración de alicina en ajo criollo morado (*Allium sativum* L.) determinada mediante HPLC. *UDO Agr.* 13(1): 128-134.
- Navidshada, B., Z. Maghsoodia, S. Nikbina, V. Vahedia, M. Adibmoradib, F. M. Aghjehgheshlagha and H. Moradi 2018. The compensation effect of dietary garlic on chicken consuming a minimal level of choline. *Italian Journal of Animal Science.* 17(1): 175-179. Doi.org/10.1080/1828051X.2017.1338537

- Norma Oficial Mexicana (NOM-210-SSA1-2014). Bienes y servicios. "Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos" Diario Oficial de la Federación, 26 de junio de 2015.
- Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). 2012. El mercado del ajo. Disponible en <https://www.odepa.gob.cl/odepaweb/publicaciones/doc/5696.pdf> Accesada julio 15 de 2018.
- Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación (FAO). 2013. Revisión del desarrollo avícola. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/019/i3531s/i3531s.pdf>. Accesada diciembre 27 de 2017.
- Organización mundial de la salud (OMS). 2013. *Salmonella* (no tifoidea). Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/es/>. Accesada junio 8 de 2018.
- Organización mundial de la salud (OMS). 2017. *Salmonella* (no tifoidea). Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/es/>. Accesada noviembre 27 de 2016.
- Organización mundial de la salud. (OMS). 2015. Inocuidad de los alimentos Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/es/>. Accesada noviembre 27 de 2016.
- Peinado, M., R. Ruiz, A. Echavarri and L. Rubio. 2012. Garlic derivative propyl propane thiosulfonate is effective against broiler enteropathogens *in vivo*. Poultry Sci. 91(9): 2148–2157. Doi.org/10.3382/ps.2012-02280
- Pérez, C. M., M. M. Sánchez, S. Henao y C. N. M. Cardona. 2008. Estandarización y evaluación de dos pruebas de Reacción en Cadena de la Polimerasa para el diagnóstico de *Salmonella* enterica subespecie enterica en huevos. Arch. Med. Vet. 40: 235-242. Doi.org/10.4067/S0301-732X2008000300003
- Petropoulos, S., A. Fernandes, L. Barros, A. Ciric, M. Sokovic and I. S. Ferreira 2018. Antimicrobial and antioxidant properties of various greek garlic genotypes. Food chem. 245(2018): 7-12. Doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.078
- Petrovic, J., J. Babic, I. Stojanov and M. Velhner. 2015. The change in antimicrobial resistance profile of meat chain associated *Salmonella* in Serbia. Procedia Food Sci. 5: 231 – 234. Doi.org/10.1016/j.profoo.2015.09.059
- Polotsky, Y. U., E. Dragunsky and T. Khavkin. 1994. Morphological evaluation of the pathogenesis of bacterial enteric infections. Crit. Rev. Microbiol. 20(3): 161-208. Doi: 10.3109/10408419409114553
- Quesada, A., G. A. Reginatto, A. Ruiz, L. D. Colantonio y M. S. Burrone. 2016. Resistencia antimicrobiana de *Salmonella* spp aislada de alimentos de origen animal para

consumo humano. Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública. 33(1): 32-44. Doi:10.17843/rpmesp.2016.331.1899

Ramírez, R. Y., D. P. Rincón y J. C. Vargas. 2014. *Salmonella* Enteritidis en huevos de gallina comercializados en Tunja (Colombia). Salud Soc. Uptc. 1(2): 22-27.

Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32003R1831>

Ricke, S. C., C. S. Dunkley and J. A. Durant. 2013. A review on development of novel strategies for controlling *Salmonella* Enteritidis colonization in laying hens: Fiber based molt diets. Poult. Sci. 92(2): 502–525. Doi: 10.3382/ps.2012-02763

Rivera, C. L. G., C. L. H. Ortegón, C. G. Estrada, Y. T. S. Granja y J. M. Núñez. 2013. Aislamiento, identificación y patrón de sensibilidad antimicrobiana de *Salmonella* spp en primates en cautiverio. Rev. Colombiana Cienc. Anim. 5 (1): 131-144

Rivera, C. L. G., P. A. Motta, M. F. Cerón y F. A. Chimonja. 2012. Resistencia de la *Salmonella* a los antimicrobianos convencionales para su tratamiento. Rev. CES Med. Vet. Zootec. 7(1): 115-127.

Rocha, C., N. D. Reynolds y M. P. Simons. 2015. Resistencia emergente a los antibióticos: una amenaza global y un problema crítico en el cuidado de la salud. RPMESP. 32(1): 139-145.

Rodríguez, H. R. 2015. Prevalencia y caracterización molecular de *Salmonella* spp, en granjas avícolas de postura comercial en el departamento de Tolima. Tesis Maestría en Ciencias Pecuarias. Universidad de Tolima. Ibagué, Tolima, Colombia.

Salem, V. W., M. Dina, W. Shibat El-hamed and R. Sayed. 2017. Alterations in virulence and antibiotic resistant genes of multidrug-resistant *Salmonella* serovars isolated from poultry: The bactericidal efficacy of *Allium sativum*. Microb. Pathog. 108: 91-100. Doi.org/10.1016/j.micpath.2017.05.008

Samanta, I., S. N. Joardar, P. K. Das, T. K. Sar, S. Bandyopadhyay, T. K. Dutta and U. Sarkar. 2014. Prevalence and antibiotic resistance profiles of *Salmonella* serotypes isolated from backyard poultry flocks in West Bengal, India. 2014. J. Appl. Poult. Res. 23(1): 536–545. Doi.org/10.3382/japr.2013-00929

Sambrook, J., E. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2d Edition, Cold spring harbor laboratory press.

Sánchez, J. M. y Cardona C. N. 2003. Mecanismo de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. Asociación Colombiana de Infectología. 7: 22-29.

- Sánchez, S, C. L. Hofacre, M. D. Lee, J. J. Maurer and M. P. Doyle. 2002. Animal sources of salmonellosis in humans. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 221(4): 492-497. Doi.org/10.2460/javma.2002.221.492
- Sansonetti, P. 2004. War and peace at mucosal surfaces. *Nature.* 4: 953-964. Doi: 10.1038/nri1499
- Sas Institute Inc. (2002). *The SAS System for Windows 9.0.* Cary, N.C. USA.
- Sharifi, R. J., D. Mnayer, G. Tabanelli, Z. Z. Stojanović, M. Sharifi, Z. Yousaf, L. Vallone, W. N. Setzer and M. Iriti. 2016. Plants of the genus *Allium* as antibacterial agents: from tradition to pharmacy. *Cell. Mol. Biol.* 62 (9): 57-68. Doi: 10.14715/cmb/2016.62.9.10
- Sheela, R. R., U. Babu, J. Mu, S. Elankumaran, D. A. Bautista, R. B. Raybourne, R. A. Heckert and W. Song. 2003. Immune Responses against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection in virally immunosuppressed chickens. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10(4): 670-679. Doi: 10.1128/CDLI.10.4.670-679.2003.
- Soumet, C., G. Ermel, V. Rose, P. Drouin, G. Salvat and P. Colin. 1999. Identification by multiplex PCR based assay of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis strains from environmental swabs of poultry houses. *Lett. Appl. Microbiol.* 29: 1-6. Doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00559.x
- Steel, R. G. D. y J. H. Torrie. 1988. *Bioestadística principios y procedimientos.* Segunda Edición. Editorial Mc Graw - Hill. México.
- Sulaiman, F. A., M. O. Kazeem, A. M. Waheed, S. O. Temowo, I. O. Azeez, F. I. Zubair, T. A. Adeyemi, A. Nyang and O. S. Adeyemi. 2014. Antimicrobial and toxic potential of aqueous extracts of *Allium sativum*, *Hibiscus sabdariffa* and *Zingiber officinale* in wistar Rats. *J. Taibah Univ. Sci.* 8(2014): 315-322. Doi.org/10.1016/j.jtusci.2014.05.004
- Tenover, F. C., Arbeit R. and Goering R. V. 1997. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Infect Control Hosp. Epidemiol.* 18 (6): 426-439. Doi.org/10.2307/30141252
- Thung, T. I., N. A., Mahyudin, D. F. Basri, C. W. Wan Mohamed Radzi, Y. Nakaguchi, M. Nishibushi and S. Radu. 2016. Prevalence and antibiotic resistance of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium in raw chicken meat at retail markets in Malaysia. *Poult. Sci.* 95: 1888-1893.
- Tizard, I. R. 2009. *Introducción a la Inmunología Veterinaria.* Octava edición. ELSEVIER. España.
- Torres, C. y M. Zarazaga. 2002. *Antibióticos como promotores del crecimiento en animales*

¿vamos por buen camino? Gac. Sanit. 16(2): 109-112.

- Tosun, S. Y., D. U. Alakavuk, S. Ulusoy and N. Erkan. 2017. Effects of essential oils on the survival of *Salmonella* Enteritidis and *Listeria monocytogenes* on fresh atlantic salmon (*Salmo salar*) during storage at  $2 \pm ^\circ\text{C}$ . J. Food Saf. 38 (1): 1-6. Doi.org/10.1111/jfs.12408
- Unión Nacional de Avicultores. 2014. UNA. Crecerá la avicultura Mexicana en el 2015. Disponible en <http://www.una.org.mx/index.php/component/content/category/15panorama>. Accesada 23 de noviembre de 2016.
- Unión Nacional de Avicultores. 2016. UNA. 52° Congreso nacional de avicultura en Huatulco. Disponible en <http://www.una.org.mx/index.php/component/content/category/14comunicados>. Accesada 27 noviembre de 2016.
- Vallejo, J. R., D. Peral y M. C. Carrasco. 2008. Las Especies del género *Allium* con interés medicinal en extremadura. Med. Natur. 2(1): 2–6.
- Van immerseel, F., Methner U., Rychlik I., Nagy B., Velge P., Martin G., Foster N., Ducatelle R. and Barrow P. 2005. Vaccination and early protection against non-host specific *Salmonella* serotypes in poultry: exploitation of innate immunity and microbial activity. Epidemiol. Infect. 133(6): 959–978. Doi: 10.1017/S0950268805004711
- Vargas, L., Mamani J., Álvarez E., Rebollo M. and Romero R. 2014. Función antimicrobiana de la alicina de ajo en cultivos de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. Rev. Cient. Cienc. Med. 17(1): 26-28.
- Velge, P., A. Cloeckeaertb and Paul Barrowc. 2005. Emergence of *Salmonella* epidemics: The problems related to *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. Vet. Res. 36: 267–288. Doi: 10.1051/vetres:2005005
- Villagómez, E. S., M. Logacho y C. Vinueza. 2017. Presencia y resistencia a los antimicrobianos de serovariedades de *Salmonella enterica* aisladas en una empresa avícola integrada del Ecuador. REMCB. 38(1): 11-24. Doi: 10.26807/remcb.v38i1.17
- Wigley, P., S. D. Hulme, C. Powers, R. K. Beal, A. Berchieri, A. Smith and P. Barrow. 2005. Infection of the reproductive tract and eggs with *Salmonella enterica* serovar Pullorum in the chicken is associated with suppression of cellular immunity at sexual maturity. Infect. Immun. 73(5): 2986-2990.
- Yoshimura, Y. 2015. Avian  $\beta$ -defensins expression for the innate immune system in hen reproductive organs. Poult. Sci. 94(4): 804-809. Doi: 10.3382/ps/peu021

Zhang, G., E. W. Brown and T. S. Hammack. 2013. Comparison of different preenrichment broths, egg: preenrichment broth ratios, and surface disinfection for the detection of *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Enteritidis in shell eggs. *Poult. Sci.* 92(11): 3010-3016. Doi: 10.3382/ps.2013-03022

## **IX. ANEXOS**

### **Anexo 1. Preparación de medios**

#### **A.1.1 Agua peptonada amortiguada (BPW)**

Para 1 L, rehidratar 25.5 g del medio y aforar a 1 L con agua destilada, reposar de 10 a 15 min, agitar frecuentemente hasta su completa disolución. Verificar el pH final a  $7.2 \pm 0.2$ . Distribuir en volúmenes requeridos y esterilizar en autoclave (15 lb) a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 min.

#### **A.1.2 Caldo Rappaport Vassiliadis (RV)**

Para 1 L, rehidratar 42.5 g del medio y aforar a 1 L con agua destilada. Reposar de 10 a 15 min Verificar el pH a  $5.2 \pm 0.2$ , calentar ligeramente agitando hasta su completa disolución. Distribuir en volúmenes requeridos y esterilizar a  $115^{\circ}\text{C}$  (10 lb) durante 15 min

#### **A.1.3 Agar entérico Hektoen (HK)**

Para 1 L, rehidratar 76 g del medio en 1L de agua destilada. Mezclar bien y ajustar el pH a  $7.5 \pm 0.2$ . Calentar la mezcla hasta ebullición agitando frecuentemente para disolver completamente el polvo. No esterilizar en autoclave, enfríe a  $45\text{-}50^{\circ}\text{C}$  y utilice inmediatamente.

#### **A.1.4 Caldo de soya Trypticaseína (TSB) (BD Bioxon, México)**

Para 1 L; rehidratar 30 g del medio en polvo y aforar a 1 L con agua destilada. Mezclar bien y ajustar el pH a  $7.3 \pm 0.2$ . Calentar ligeramente con agitación para disolver completamente el polvo. Esterilizar a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 min

## **Anexo 2. Preparación de primers**

### **A.2.1 *InvA***

Para preparar la solución stock del primer *InvA* R a 100  $\mu\text{M}$  (100 pmol/ $\mu\text{L}$ ). Al contenido liofilizado (832  $\mu\text{g}$ ) del primer (Alpha DNA) se le adicionaron 1247  $\mu\text{L}$  de agua nanopura estéril (grado inyectable). Para preparar la solución stock del primer *InvA* F a 100  $\mu\text{M}$  (100 pmol/ $\mu\text{L}$ ). Al contenido liofilizado (754  $\mu\text{g}$ ) del primer (Alpha DNA) se le adicionaron 943  $\mu\text{L}$  de agua nanopura estéril (grado inyectable).

Para preparar la solución de trabajo a 10  $\mu\text{M}$  (10 pmol/ $\mu\text{L}$ ). Se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de la solución stock y se adicionaron 90  $\mu\text{L}$  de agua nanopura estéril (grado inyectable) y usar o almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **Anexo 3. Preparación de gel agarosa**

#### **A.3.1 Gel agarosa al 1% para PCR**

Agregar 1 g de agarosa (Promega) a 100 mL de buffer TAE 1X, calentar en una placa agitando frecuentemente hasta disolver completamente la agarosa (solución cristalina). Dejar solidificar en cámara de electroforesis.

#### **A.3.2 Tinción GelRed**

Para preparar la solución de trabajo de la tinción GelRed, se diluyó 1  $\mu$ L de GelRed en 999  $\mu$ L de agua nanopura (grado inyectable).

## Anexo 4. Análisis estadístico (The SAS System for Windows 9.0)

### A.4.1 Prueba de normalidad

#### Extracto de ajo 0% (A)

Tests para normalidad			
Test	--Estadístico--	-----P-valor-----	
Shapiro-Wilk	#11 X .	Pr < W	.
Kolmogorov-Smirnov	D .	Pr > D	.
Cramer-von Mises	W-Sq .	Pr > W-Sq	.
Anderson-Darling	A-Sq .	Pr > A-Sq	.

#### Extracto de ajo 25 % (B)

Tests para normalidad			
Test	--Estadístico--	-----P-valor-----	
Shapiro-Wilk	#11 X 0.880839	Pr < W	0.0488
Kolmogorov-Smirnov	D 0.258454	Pr > D	<0.0100
Cramer-von Mises	W-Sq 0.185161	Pr > W-Sq	0.0071
Anderson-Darling	A-Sq 0.960453	Pr > A-Sq	0.0116

#### Extracto de ajo 50 % (C)

Tests para normalidad			
Test	--Estadístico--	-----P-valor-----	
Shapiro-Wilk	#11 X 0.881425	Pr < W	0.0498
Kolmogorov-Smirnov	D 0.224565	Pr > D	0.0409
Cramer-von Mises	W-Sq 0.137311	Pr > W-Sq	0.0319
Anderson-Darling	A-Sq 0.795845	Pr > A-Sq	0.0311

#### Extracto de ajo 75 % (D)

Tests para normalidad			
Test	--Estadístico--	-----P-valor-----	
Shapiro-Wilk	#11 X 0.838636	Pr < W	0.0120
Kolmogorov-Smirnov	D 0.269933	Pr > D	<0.0100
Cramer-von Mises	W-Sq 0.189624	Pr > W-Sq	0.0061
Anderson-Darling	A-Sq 1.046055	Pr > A-Sq	0.0070

**Extracto al 100 % (E)**

## Tests para normalidad

Test	--Estadístico--	-----P-valor-----
Shapiro-Wilk	#11 X 0.725965	Pr < W 0.0005
Kolmogorov-Smirnov	D 0.291175	Pr > D <0.0100
Cramer-von Mises	W-Sq 0.318658	Pr > W-Sq <0.0050
Anderson-Darling	A-Sq 1.783633	Pr > A-Sq <0.0050

**Amikacina (F)**

## Tests para normalidad

Test	--Estadístico--	-----P-valor-----
Shapiro-Wilk	#11 X 0.75	Pr < W <0.0001
Kolmogorov-Smirnov	D 0.384815	Pr > D 0.0786
Cramer-von Mises	W-Sq 0.090445	Pr > W-Sq 0.0965
Anderson-Darling	A-Sq 0.487767	Pr > A-Sq 0.0584

**Cefotaxima (G)**

## Tests para normalidad

Test	--Estadístico--	-----P-valor-----
Shapiro-Wilk	#11 X .	Pr < W .
Kolmogorov-Smirnov	D .	Pr > D .
Cramer-von Mises	W-Sq .	Pr > W-Sq .
Anderson-Darling	A-Sq .	Pr > A-Sq .

**Cloranfenicol (H)**

## Tests para normalidad

Test	--Estadístico--	-----P-valor-----
Shapiro-Wilk	#11 X .	Pr < W .
Kolmogorov-Smirnov	D .	Pr > D .
Cramer-von Mises	W-Sq .	Pr > W-Sq .
Anderson-Darling	A-Sq .	Pr > A-Sq .

**Ampicilina (I)**

## Tests para normalidad

Test	--Estadístico--		-----P-valor-----	
Shapiro-Wilk	#11 X	.	Pr < W	.
Kolmogorov-Smirnov	D	.	Pr > D	.
Cramer-von Mises	W-Sq	.	Pr > W-Sq	.
Anderson-Darling	A-Sq	.	Pr > A-Sq	.

**Sulfametoxazol/trimetoprim (J)**

## Tests para normalidad

Test	--Estadístico--		-----P-valor-----	
Shapiro-Wilk	#11 X	.	Pr < W	.
Kolmogorov-Smirnov	D	.	Pr > D	.
Cramer-von Mises	W-Sq	.	Pr > W-Sq	.
Anderson-Darling	A-Sq	.	Pr > A-Sq	.

**A.4.2 Prueba de homogeneidad de las varianzas; Bartlett**

## Procedimiento GLM

Test de Bartlett para la homogeneidad de la varianza INHIB

Fuente	DF	Chi-cuadrado	Pr > ChiSq
TRAT	4	8.5205	0.0743

**A.4.3 Prueba de Kruskal-Wallis**

## Test de Kruskal-Wallis

Chi-cuadrado	85.3307
DF	9
Pr > Chi-cuadrado	<.0001

Sistema SAS

08:49 Monday, July 19, 2018 24

#### A.4.4 Análisis de la varianza (ANDEVA)

Procedimiento GLM

Variable dependiente: INHIB

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	9	6584.188889	731.576543	865.77	<.0001
Error	80	67.600000	0.845000		
Total correcto	89	6651.788889			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	INHIB Media
0.989837	6.969797	0.919239	13.18889

#### A.4.5 Prueba de Bonferroni (Dunn)

Tests T Bonferroni (Dunn) para RNKINHIB

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	80
Error de cuadrado medio	30.51417
Valor crítico de t	3.38332
Diferencia significativa mínima	11.82
Media armónica de tamaño de celdas	5

NOTA: Los tamaños de las celdas no son iguales.

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Bon Agrupamiento	Media	N	TRAT
A	89.000	3	G
A			
B A	85.333	3	F
B			
B	75.800	15	E
C	62.567	15	D

D	45.967	15	C
E	33.800	15	B
F	12.500	15	A
F			
F	12.500	3	H
F			
F	12.500	3	I
F			
F	12.500	3	J

#### A.4.6 Polinomios ortogonales (extracto al 0, 25, 50, 75 y 100 %)

Contraste	DF	Contraste SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Efecto lineal	1	32017.81500	32017.81500	933.31	<.0001
Efecto cuadrático	1	9.42976	9.42976	0.27	0.6017
Efecto cúbico	1	1.92667	1.92667	0.06	0.8134
Efecto cuártico	1	61.92857	61.92857	1.81	0.1834

#### A.4.7 Contrastes

Contraste	DF	Contraste SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
0 vs demas	1	25311.26533	25311.26533	767.28	<.0001
25+50+75+100 vs CFX+AK	1	5808.73333	5808.73333	176.08	<.0001
50+75+100 vs CFX+AK	1	3502.76144	3502.76144	106.18	<.0001
75+100 vs CFX+AK	1	1617.00139	1617.00139	49.02	<.0001
100 vs CFX+AK	1	553.71905	553.71905	16.79	0.0001
CFX vs AK	1	20.16667	20.16667	0.61	0.4368