



**Universidad Colegio Mayor De Cundinamarca**

Facultad de Ciencias

Programa de Maestría en Microbiología

**Alternativa terapéutica en la industria avícola: uso de aceites  
esenciales sobre *Salmonella* no móviles aisladas de aves de corral**

Lady Maricel Casallas Rodríguez

Bogotá D.C., Colombia

Abril de 2022

**Alternativa terapéutica en la industria avícola: uso de aceites  
esenciales sobre *Salmonella* no móviles aisladas de aves de corral**

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para obtener el título de

**Magíster en Microbiología**  
(Modalidad de Profundización)

**Lady Maricel Casallas Rodríguez**  
Bacterióloga y laboratorista clínica

Directora:

**Gabriela Arévalo Pinzón.,M.Sc. Ph.D**  
Docente Asistente -Universidad Antonio Nariño  
Grupo de Investigación en Biología Funcional y Biomoléculas

Codirectora:

**Ruth Mélida Sanchez Mora.,M.Sc. Ph.D**  
Docente Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca  
Líder del grupo de Biotecnología y Genética-UCMC

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca  
Facultad de Ciencias de Salud  
Programa de Maestría en Microbiología  
Bogotá D.C., Colombia  
Abril de 2022

## **Dedicatoria**

A Dios, a la virgen y a mis padres por ser mi motor y mi fuerza, todo lo que soy es gracias a su esfuerzo y tenacidad gracias por ser mi fuerte de inspiración.

A Ginno “mi cielo” por ser mi apoyo, mi impulso y por darme el coraje de seguir adelante.

Y a mi hermana porque nunca dudo y ha sido siempre mi pedacito de alma.

Este trabajo tiene todo mi corazón y se los dedico con amor.

## **Agradecimientos**

Agradezco a Servet SAS y FIDIC por ser el protagonista de este trabajo y apoyar en el proceso de maestría, en especial al Dr. Jairo Rodríguez, la Dra. Gabriela Arévalo y la Dra. Ruth Mélida Sánchez por su compromiso.

También a la Dra. Loren Firavitoba por esas trasnochadas, los sollozos y las risas en este proceso.

Y no menos importante a tres personas que hicieron parte de este proceso y de mi vida, a Yoto, Katica y Juanito.

A todos mil gracias.

# Tabla de contenido

Lista de Figuras .....	6
Lista de Tablas .....	7
Lista de símbolos y abreviaturas .....	8
Resumen .....	9
Abstract .....	10
<b>1 Introducción .....</b>	<b>11</b>
<b>2 Marco teórico y generalidades .....</b>	<b>14</b>
2.1 Historia.....	14
2.2 Características generales de <i>Salmonella</i> .....	14
2.3 Estructura antigénica.....	15
2.4 Clasificación .....	16
2.5 Epidemiología aviar.....	17
2.5.1 Avicultura en el mundo .....	18
2.5.2 Avicultura en Colombia .....	18
2.5.3 Enfermedades encontradas en las aves de corral.....	20
2.6 Prevalencia de <i>Salmonella</i> en pollo.....	21
2.6.1 Salmonelosis aviar.....	21
2.6.2 Transmisión en aves. ....	22
2.6.3 Signos clínicos.....	22
2.7 Resistencia .....	22
2.7.1 Mecanismo de resistencia.....	25
2.8 Aceites esenciales .....	27
2.9 Composición química .....	28
2.9.1 Terpenos y Terpenoides .....	29
2.9.2 Compuestos Aromáticos.....	29
2.10 Actividad antibacteriana .....	29
<b>3 Objetivos.....</b>	<b>30</b>
3.1 Objetivo general.....	31
3.2 Objetivos específicos .....	31
<b>4 Diseño metodológico .....</b>	<b>31</b>
Fase 1.....	32
4.1 Aislamiento e Identificación de <i>Salmonella</i> . ....	33
Fase 2.....	34
4.2 Prevalencia de <i>salmonella</i> no móvil .....	35

4.3	Descripción y selección de <i>Salmonella</i> no-móviles con diferentes patrones de susceptibilidad y resistencia.....	35
<b>Fase 3.....</b>		<b>36</b>
4.4	Recuperación y mantenimiento de los aislados seleccionados.....	36
4.5	Evaluación de la Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales por el método de difusión en agar frente <i>Salmonella no móvil</i> aisladas de aves de corral con perfiles de resistencia.....	36
4.6	Comprobación de las curvas de calibración de las cepas bacterianas.....	37
4.7	Actividad antimicrobiana contra <i>Salmonella no móvil</i> aisladas de aves de corral con perfiles de resistencia, CMI y CMB.....	38
4.8	Determinación de la actividad hemolítica de los aceites esenciales.....	39
4.9	Cálculo del índice terapéutico (CMH/CMI).....	40
<b>5</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>41</b>
5.1	Prevalencia de <i>Salmonella spp</i> en las muestras analizadas.....	41
5.2	<i>Salmonellas</i> no móviles presentan una elevada resistencia a la Penicilina.....	43
5.3	El aceite de canela tiene características antimicrobianas similares a la ciprofloxacina.....	45
5.4	Bajas concentraciones del aceite de canela son necesarias para inhibir el crecimiento bacteriano de <i>Salmonella no móvil</i> .....	46
5.5	Efecto bactericida del aceite de canela sobre los aislados de <i>Salmonella no-móvil</i> .....	46
5.6	El aceite de canela genera una mínima actividad hemolítica.....	47
5.7	Elevado índice terapéutico de la canela como aceite esencial sugiere una nueva estrategia frente a la <i>Salmonella no móvil</i> aislada de aves de corral con distintos patrones de resistencia.....	48
<b>6</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>55</b>
<b>Anexo A.....</b>		<b>56</b>
<b>Referencias.....</b>		<b>57</b>

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Salmonella y sus antígenos de superficie.....	16
<b>Figura 2.</b> Esquema de Clasificación de Salmonella.....	17
<b>Figura 3.</b> Información Estadística Consumo Per – Cápita.....	19
<b>Figura 4.</b> Antibióticos y su resistencia en la Salmonella spp.....	24
<b>Figura 5.</b> Mecanismos de Resistencia a antibióticos en Salmonella spp.....	27
<b>Figura 6.</b> Esquema Metodológico.....	32
<b>Figura 7.</b> Proceso de siembra, aislamiento y antibiograma para las muestras que ingresan al laboratorio SERVET.....	33
<b>Figura 8.</b> Muestra de órganos tomadas de aves Imagen de muestras tomadas de órganos de aves de corral.....	34
<b>Figura 9:</b> Prevalencia de Salmonella móvil y no móvil entre enero de 2019 y abril de 2021.....	42
<b>Figura 10.</b> Prevalencia Salmonella no móvil entre enero de 2019 y abril de 2021.....	42
<b>Figura 11.</b> Prevalencia de Salmonella no móvil según la línea de explotación comercial de aves de corral en el 2019 y 2020.....	43
<b>Figura 12.</b> Resistencia de Salmonella no móvil en el año 2019, 2020 y los primeros cuatro meses del 2021 frente a diez antibióticos evaluados.....	44
<b>Figura 13.</b> Actividad antibacteriana de aceites esenciales mediante difusión en agar con sensidiscos.....	46
<b>Figura 14.</b> Capacidad hemolítica del aceite de canela.....	48

## Lista de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Principales enfermedades de control en Avicultura.....	21
<b>Tabla 2.</b> Perfiles de Resistencia y susceptibilidad de <i>Salmonella</i> no-móvil a diferentes antibióticos de uso comercial.....	45
<b>Tabla 3.</b> Actividad antimicrobiana del aceite de canela.....	47

## Lista de símbolos y abreviaturas

### Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
μL	Microlitros	10 <sup>-6</sup> L	Volumen
μM	Micro molar	10 <sup>-6</sup> molar.	Peso
mm	Milímetros	0,10 cm	Diámetro

### Abreviaturas

	Definición
AWARe *	Access, Watch and Reserve
BLEE	β-lactamasas de espectro extendido CMH
CMB	Concentración mínima bactericida
CMH	Concentración Mínima Hemolítica
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DDD	Dosis Diaria Media
IT	Índice Terapéutico
NCCLS*	Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico

\*Abreviatura tomada original del idioma ingles

## Resumen

El sector avícola es considerado el más dinámico de las actividades pecuarias, reflejándose en el aumento progresivo anual que tiene el consumo de pollo en Colombia. Sin embargo, esta industria es afectada por distintas enfermedades como la Salmonelosis, producida por la bacteria *Salmonella*. En busca de estrategias que puedan disminuir este impacto, el presente trabajo de investigación evaluó el uso de aceites esenciales sobre el crecimiento de cepas de *Salmonella* no móviles (son patógenos específicos para determinados grupos de animales) con diferentes perfiles de resistencia aisladas de aves de corral. Para abordar este objetivo, se determinó inicialmente, la prevalencia de *Salmonella* no móvil en distintas muestras de aves de corral que ingresaron y fueron procesadas en el laboratorio Servet SAS durante los años 2019-2021. Los resultados mostraron un total de 19,1% (n= 6058) de *Salmonella* presente en aves de corral, siendo el 57,8% (n=127) *Salmonella* no-móviles. La línea comercial más afectada por la *Salmonella* fue la de postura, donde se evidenció un 89,5% (n=89). Posteriormente se evaluaron los diferentes patrones de resistencia sobre las *Salmonella* no móviles mediante la técnica de Kirby Bauer. Los ensayos mostraron que, del total de *Salmonella* no-móviles el 97% presentó resistencia a la penicilina. En busca de tratamientos alternos, se evaluó la capacidad antibacteriana de doce aceites esenciales sobre las *Salmonella* no móviles con distintos perfiles de resistencia. Al evaluar el efecto bacteriano se encontró que el aceite de canela inhibió el crecimiento bacteriano con un halo de inhibición de 23mm. Los ensayos de microdilución en caldo mostraron una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 0,08%; así mismo, se encontró una concentración mínima bactericida de 0,011% (CMB). Los estudios de toxicidad sobre eritrocitos de aves mostraron un 0,9% de hemólisis a una concentración de 7,5%, concentración cien veces más alta que la CMI. A partir de estos resultados se encontró un índice terapéutico del aceite de canela de 96, convirtiendo a este aceite en una posible alternativa terapéutica para el tratamiento de la salmonelosis en aves industria y abre nuevos estudios para evaluar en campo la seguridad de este aceite y su efectividad en la eliminación de *Salmonella* en aves de corral.

**Palabras claves:** *Salmonella*, Aceites esenciales, resistencia antimicrobiana, aves.

## Abstract

The poultry sector is considered the most dynamic of livestock activities, reflected in the annual progressive increase in chicken consumption in Colombia. However, this industry is affected by different diseases such as Salmonellosis, caused by the *Salmonella* bacteria. In search of strategies that can reduce this impact, this research work evaluated the use of essential oils on the growth of non-motile *Salmonella* strains (they are specific pathogens for certain groups of animals) with different resistance profiles isolated from poultry. . To address this objective, the prevalence of non-mobile *Salmonella* was initially determined in different samples of poultry that entered and were processed in the Servet SAS laboratory during the years 2019-2021. The results showed a total of 19.1% (n= 6058) of *Salmonella* present in poultry, being 57.8% (n=127) non-motile *Salmonella*. The commercial line most affected by *Salmonella* was the laying line, where 89.5% (n=89) was evidenced. Subsequently, the different resistance patterns on non-motile *Salmonella* were evaluated using the Kirby Bauer technique. The tests showed that, of the total number of non-motile *Salmonella*, 97% presented resistance to penicillin. In search of alternative treatments, the antibacterial capacity of twelve essential oils on non-motile *Salmonella* with different resistance profiles was evaluated. When evaluating the bacterial effect, it was found that cinnamon oil inhibited bacterial growth with an inhibition halo of 23mm . Broth microdilution assays showed a minimum inhibitory concentration (MIC) of 0.08%; Likewise, a minimum bactericidal concentration of 0.011% (CMB) was found. Toxicity studies on chicken erythrocytes showed a hemolytic effect at a concentration of 7.5%, one hundred times higher than the MIC. These data made it possible to calculate a therapeutic index for cinnamon oil that is 96, making this oil a possible therapeutic alternative for the treatment of salmonellosis in the poultry industry and suggests future studies that will show the safety of this oil and its effectiveness in the elimination of *Salmonella* in poultry.

**Keywords:** *Salmonella*, essential oils, antimicrobial resistance, poultry.

# 1 Introducción

La *Salmonella* es un importante patógeno Gram negativo que causa una amplia gama de enfermedades, entre las cuales se incluyen la fiebre tifoidea, bacteriemia, catarro intestinal e infección sistémica. Actualmente se conocen alrededor de 2600 serovares, algunos serotipos tales como *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovar Pullorum (S. Pullorum) y biovar Gallinarum (S. Gallinarum) son patógenos específicos para determinados grupos de animales, como lo son las aves de corral y rara vez causan enfermedades en humanos. S. Pullorum y S. Gallinarum son bacterias no móviles, específicas del hospedero, agentes causales de la Pullorosis y tifosis aviar, respectivamente. Aunque estas enfermedades fueron erradicadas hace algunos años en muchos países en desarrollo como Estados Unidos y Canadá, es muy común que aún se encuentren latentes en países de América Central, Sudamérica, África y Asia, en los cuales afecta considerablemente la industria avícola (1).

En Colombia, la avicultura es considerada el sector más dinámico de las actividades pecuarias. El sector avícola se caracteriza por ser uno de los motores del Producto Interno Bruto (PIB) Agropecuario del país. Al 12 de Julio del año 2021 se evidenció una producción de 101 millones de toneladas de carne de pollo a nivel mundial y hasta abril del 2021 se evidenció un consumo de 543.387 toneladas de carne de pollo, siendo este el 0,53% del consumo a nivel mundial (2,3). Por lo cual, es importante resaltar que el pollo es una de las proteínas de mayor consumo a nivel mundial, lo cual se denota con un incremento de la producción del mismo de 9 a 132 millones de toneladas entre el año 1961 y el 2019 (4), razón por lo cual, la inocuidad y la calidad de sus derivados es un punto crucial el cual debe ser analizado con cuidado. Las estadísticas del consumo de pollo per cápita posicionan a Brasil como el país número uno a nivel mundial, con un consumo promedio por persona de 64 pollos al año, seguido de Estados Unidos de América, Israel y países bajos; por su parte, Colombia se sitúa en la posición número 27 a nivel mundial, con un consumo per cápita de 34 pollos al año (5).

Diversos estudios científicos muestran una elevada resistencia de *Salmonella* a los antimicrobianos, ya que el uso de antibióticos en cualquier ambiente crea una presión de selección que ayuda a favorecer la supervivencia de patógenos con un grado de resistencia a los

antimicrobianos (6). Es por esto que, los medicamentos antimicrobianos tales como los aminoglucósidos, fluoroquinolonas y  $\beta$ -lactámicos, han sido aplicados en la industria avícola como mecanismo de prevención y control de las infecciones intestinales o sistémicas, dentro de las cuales se encuentran las anteriormente descritas cuyos agentes etiológicos son *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*. Desafortunadamente, el uso indiscriminado de estos antimicrobianos ha contribuido a la aparición y mantenimiento de genes de resistencia en el entorno avícola, lo cual genera pérdidas monetarias en el mismo y de igual forma enciende las alertas en el sistema de salud (7).

Sin embargo, aunque no existen reportes contundentes sobre resistencia de *S. Pullorum* y *S. Gallinarum* frente a los antimicrobianos, países como Corea y Brasil muestran una reducida susceptibilidad a enrofloxacin, ciprofloxacina, norfloxacina y ofloxacina y un incremento en la resistencia a quinolonas y fluoroquinolonas durante el tiempo (8,9). Por tal motivo, surge la necesidad de realizar inicialmente una caracterización epidemiológica y de susceptibilidad antimicrobiana de *Salmonella* no-móviles (entre ellas *S. Pullorum* y *S. Gallinarum*) en granjas colombianas seguido de la búsqueda de nuevas alternativas para combatir o mitigar el uso indiscriminado de antibióticos de forma que genere una solución en la industria aviar. Previos estudios han mostrado que algunos compuestos de los aceites esenciales (AE) presentan efectos antimicrobianos contra diferentes tipos de patógenos (10,11). Por ende, el presente trabajo tuvo como objetivo general la evaluación de distintos aceites esenciales sobre el crecimiento bacteriano de aislados de *Salmonella* no-móvil con diferentes patrones de resistencia obtenidos del análisis e identificación de muestras de aves de distintas granjas de Colombia que ingresaron al laboratorio Servet SAS.

Este estudio mostró la prevalencia de *Salmonella* no-móvil durante los años 2019, 2020 y los primeros cuatro meses del año 2021. Así mismo, se describieron los perfiles de resistencia y susceptibilidad de las *Salmonella* no-móviles, encontrando una marcada resistencia a Penicilina. A partir de estos resultados se seleccionaron cinco perfiles de resistencia y susceptibilidad para ser evaluados frente a la acción de once aceites esenciales. Solo el aceite de canela mostró actividad mediante técnica de difusión en agar y microdilución en caldo. De forma interesante se encontró que el aceite de canela no es citotóxico a la CMI y CMB, lo que sugiere un fuerte potencial del aceite de canela frente a uno de los tipos de *Salmonella* que más afecta a las aves de corral. Futuros estudios son necesarios para determinar su actividad en campo.



## **2 Marco teórico y generalidades**

### **2.1 Historia**

La *Salmonella* como causante de enfermedad se ha descrito desde la época de Hipócrates, su primera descripción fue desarrollada formalmente en 1659 en Inglaterra gracias a Thomas Willis de Wiltshire con la prevalencia de la fiebre tifoidea. En 1739 John Huxham distinguió dos tipos de fiebre entérica, hoy conocida como fiebre tifoidea gracias a Pierre Louis en 1829 (12). Los estudios de Piedvache en Francia en 1849 y de Murchison en Inglaterra en 1858, mostraron que la fiebre tifoidea es una enfermedad transmisible, la cual ataca a todo tipo de personas sin distinción, y además de que es transmisible tanto por agua como por comida contaminadas (12). Por su parte, William Budd de Devon en 1853 realizó un estudio exhaustivo, proponiendo que la fiebre tifoidea manifiesta auto propagación y por ello todos los casos tendrían un origen ancestral común, y afirmó también que el elemento contagioso propagado entre los individuos está presente en heces o en el contenido intestinal. Debido a estas investigaciones, Sir Almroth Wright en 1898, creó una vacuna basada en antisueros a partir de bacterias muertas, que ayudo significativamente a disminuir la morbilidad de 8.9 a 2.3 por cada 1000 individuos (13).

Actualmente el género *Salmonella* engloba a todos los microorganismos que son capaces de desencadenar la fiebre tifoidea, esta definición fue propuesta por Lignieres en 1900, en honor a Daniel Elmer Salmon, quien gracias a sus investigaciones dio surgimiento a un grupo de bacterias en donde se encontraba la *S. Typhi*, previamente llamada *Eberthella typha* por el bacteriólogo alemán Karl Joseph Ebert (14).

### **2.2 Características generales de *Salmonella***

La *Salmonella* es un microorganismo que se ubica en el orden de Enterobacteriales y la familia Enterobacteriaceae, se caracteriza por ser un bacilo Gram negativo de 0.7-1.5 x 2-5 µm, anaerobios facultativos no encapsulados y no esporulados, quimiorganotrofos, es decir, poseen la capacidad de utilizar químicos y compuestos orgánicos como fuente de carbono; utilizan glucosa y el citrato como fuente de carbono, son lisina y ornitina descarboxilasa positivos y ureasa negativos.

Generalmente es móvil debido a la presencia de flagelos peritricos, aunque *S. Gallinarum* y sus serotipos son no móviles. Así mismo, poseen la capacidad de crecer en medios peptonados o que contengan extracto de carne, tales como el agar McConkey, XLD y Cromogénicos de *Salmonella*. (15).

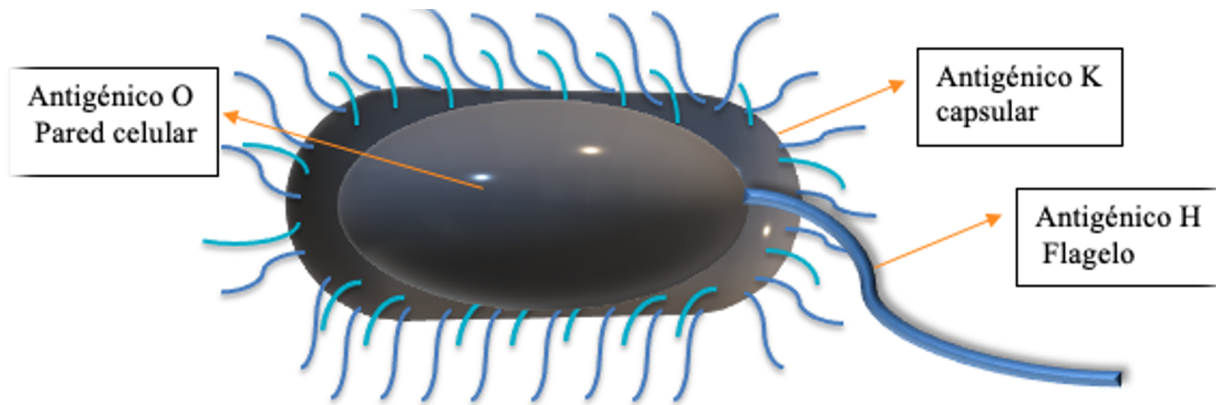
### 2.3 Estructura antigénica

*Salmonella* spp es el grupo más complejo de las enterobacterias, posee más de 2.400 serotipos los cuales se encuentran caracterizados en el esquema realizado por Kauffman White(16). Esta caracterización está determinada por la composición de sus antígenos característicos, como lo son los antígenos somáticos representados con la letra O, los flagelares representados con la letra H y los de superficie Vi representados por la letra k. La *Salmonella* entérica subespecie entérica comprende el 99% de los serotipos que son aislados de muestras clínicas (15).

La estructura antigénica de la *Salmonella* es similar a la de otras enterobacterias, ya que posee dos clases de antígenos principales; los antígenos O, que son antígenos somáticos, se encuentran en la pared bacteriana y se caracterizan por su naturaleza polisacárida, estos son los más usados en la caracterización de los diferentes tipos antigénicos (17). Y los antígenos flagelares H, los cuales se encuentran constituidos por una proteína (flagelina), esta tiene una composición de aminoácidos constante para un tipo antigénico determinado; este antígeno depende de dos genes estructurales H1 y H2 los cuales codifican las proteínas flagelares. Se conoce que la mayoría de las cepas pertenecientes al género *Salmonella* expresan las dos especificidades del antígeno H, sin embargo, existen algunas que pueden expresar una sola, puede ser la fase 1 o la fase 2 por lo cual son denominadas monofásicas. En algunas cepas se puede encontrar un tercer tipo de antígeno conocido como antígeno de superficie, este es el único de este tipo que se conoce en *Salmonella*, esto porque se encuentra en *S. typhi*, *S. paratyphi* y *S. Dublín*; la presencia de este tipo de antígeno hace imposible la aglutinación de los antisueros que se encuentran relacionados con el antígeno O, es por esto que la expresión de este factor depende de al menos dos genes, el ViA + ViB (17).

A través del tiempo se han propuesto varios esquemas de clasificación frente a la nomenclatura y taxonomía de *Salmonella*, la primera identificación de género se dio bajo la clasificación de tres

especies *S. typhi*, *S. choleraesuis* y *S. enteritidis*. Ubicándose en esta última la mayoría de los serovares descritos (17). Con base en esta descripción (Figura 1), se evidencia la importancia de estas estructuras antigénicas pues son las responsables de su clasificación.



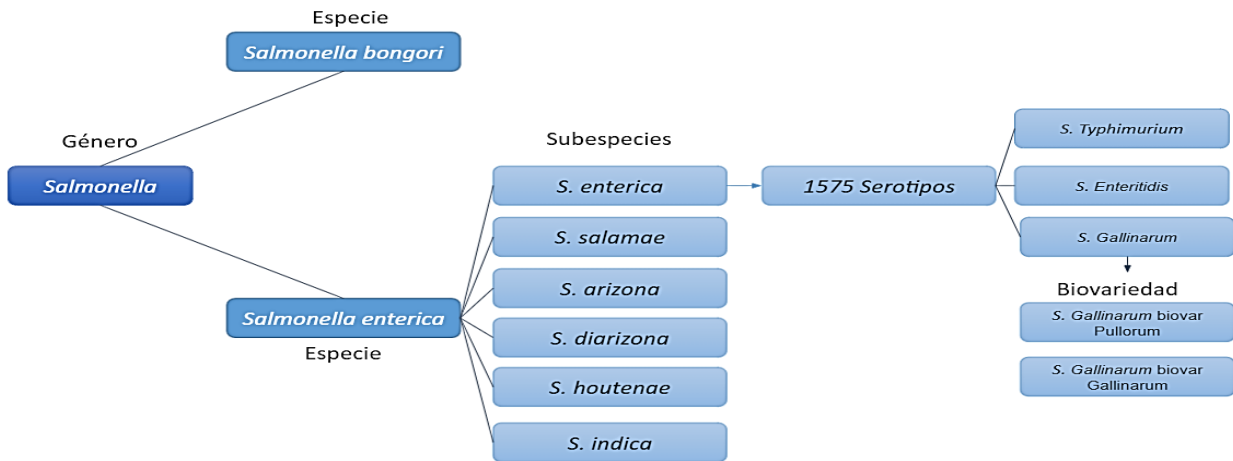
**Figura 1. *Salmonella* y sus antígenos de superficie**

Composición de antígenos característicos de *Salmonella* siendo estos los antígenos somáticos (O), Antígenos flagelares (H), Antígenos capsulares (K).Fuente: figura Propia.

## 2.4 Clasificación

La siguiente nomenclatura fue descrita por *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, en donde se reconocían por métodos serológicos e hibridaciones dos especies la *S. Bongori* y *S. Choleraesui*; esta última especie a su vez se subdivide en 6 subespecies. Sin embargo, para evitar confusiones, se decidió en el XIV Congreso Internacional de Microbiología cambiar el nombre a la especie *S. choleraesui*, por *S. enterica*, ya que no había ningún serotipo con este nombre. La última clasificación disponible del Instituto Pasteur especifica que el género *Salmonella* cuenta con dos especies, *S. enterica* y *S. bongori*; a su vez, la especie *entérica* cuenta con 6 subespecies, *S. enterica subsp. Enterica*, *S. enterica subsp. Houtenae*, *S. enterica subsp. Arizonae*, *S. enterica subsp. Diarizonae*, *S. enterica subsp. Salamae* y *S. enterica subsp. Indica*. Dentro de estas, la subespecie *Entérica* es la más importante en términos de salud pública y/o salud animal, presentando una gran diversidad con 1575 serotipos identificados hasta el 2010. De los cuales alrededor de 100 pueden causar enfermedades en diversas especies (14).

Los serotipos *Enteritidis*, *Typhimurium* y *Heidelberg* son considerados como los más importantes en términos de salud pública (18). Según la clasificación actual, en el serotipo Gallinarum, que es de importancia en la industria aviar, se evidencian dos biovariedades Gallinarum y Pullorum (Figura 1) que son consideradas especie-específica y causan enfermedades severas en aves.



**Figura 2. Esquema de Clasificación de *Salmonella***  
Clasificación actual de *Salmonella* del Instituto Pasteur. Fuente tomada y modificada de (18).

## 2.5 Epidemiología aviar

Con base en la información recolectada por el Invima, se relaciona con la inocuidad las avícolas, donde se evidencia la prevalencia en los productos avícolas en el aislamiento de la *Salmonella* spp. Como se mencionó anteriormente, la *Salmonella enterica* serovar Gallinarum, es el agente causante de la fiebre tifoidea aviar, la cual es una enfermedad septicémica aguda de pollos y otras aves galliformes; es bien sabido que *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* están estrechamente asociados con huevos de aves de corral infectados, específicamente frente a su transmisión de una generación a otra (trans-coriónica). Las infecciones causadas por estos agentes son la principal causa de morbilidad y mortalidad en las aves de corral comerciales, ocasionando importantes pérdidas económicas para los avicultores (19).

### **2.5.1 Avicultura en el mundo**

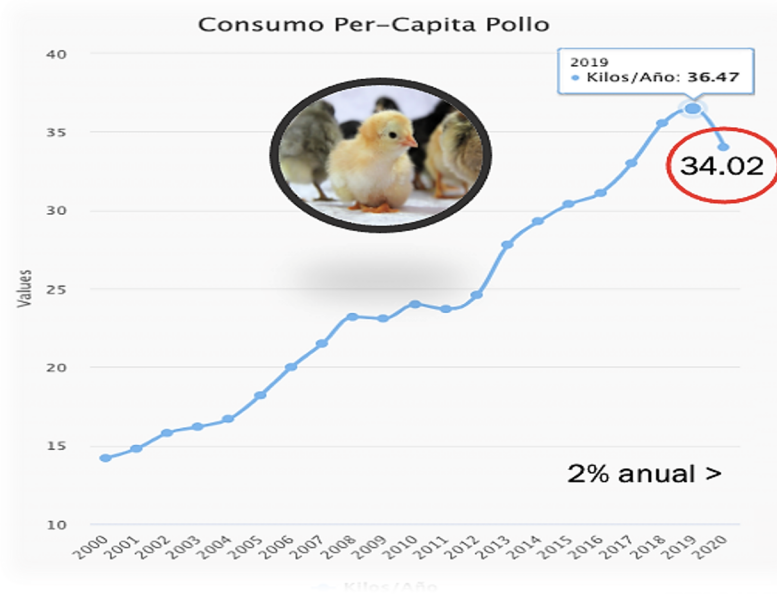
La avicultura en el mundo ha sido creciente alrededor de los años y con esto la demanda de la industria avícola, esto se evidencia por medio del incremento de la producción mundial de carne de aves pasando de 9 a 132 millones de toneladas entre 1961 y 2019, y la producción de huevos aumentó de 15 a 90 millones de toneladas (4).

Esto puede deberse a que la carne de pollo y los huevos son algunas de las fuentes de proteína de calidad y se caracteriza por un bajo costo, siendo así una de las principales fuentes de proteína para millones de personas que viven en la pobreza. La carne de pollo y los huevos proporcionan no solo proteínas de alta calidad, sino también vitaminas y minerales importantes (20). De igual forma, los huevos y la carne de pollo son ricos en treonina, lisina, metionina y triptófano; cabe resaltar que los huevos también son ricos en luteína, el cual disminuye el riesgo de cataratas y degeneración muscular (20).

### **2.5.2 Avicultura en Colombia**

En el 2019 la avicultura tuvo un gran crecimiento en Latinoamérica, ya que mantenía un espacio de tiempo sin poder sobrepasar los 11 mil millones de pollos producidos en Latinoamérica; en el 2019 se evidencio una producción de 12,532.43 millones de aves, datos aportados por la base de datos de empresas líderes avícolas. Estas cifras reflejan un crecimiento del 6.61% frente al año 2018. Por otro lado grandes productores influyeron en los datos positivos de esta industria, ya que países como Argentina mostraron un aumento del 6.4% en comparación con la producción de pollos en el 2018 a 2019, se evidencio que Colombia aumento en 4.07% y otros países de Latinoamérica también vieron alzas productivas (21).

El consumo de pollo en Colombia aumenta de manera exponencial anualmente, tal como se puede evidenciar en la Figura 2, en la cual el Fondo Nacional Avícola (FENAVI) presenta los datos de consumo per-cápita desde el año 2000 hasta el 2020, evidenciando un aumento del consumo entre el 2018 al 2019 del 2,5% (22).



**Figura 3. Información Estadística Consumo Per – Cápita**

Aumento anual del consumo per-Cápita de pollo en Colombia, se evidencian los valores per-cápita vs años evaluados. Fuente: tomada y modificada de (22).

Debido al gran consumo de pollo en Colombia, sus agentes contaminantes son de gran importancia tanto para el área comercial como para la salud del consumidor; es por esta razón que se han realizado diversos estudios e investigaciones para evidenciar la importancia de esta bacteria en el sector agrícola. El informe adelantado por el ICA con FENAVI-FONAV está dirigido al programa para el control de salmonelosis aviar en granjas avícolas desde el 2002, este insta las visitas a 10 granjas, en las cuales se evalúan puntos de riesgo asociados al ingreso de agentes infecciosos como lo es *Salmonella* spp. El resultado demostró en dos de ellas el aislamiento de *Salmonella* perteneciente al grupo C2, y en los casos de incubadoras no se identificó *Salmonella* spp (23).

Cabe resaltar que en Colombia se cuenta con el control del Instituto Colombiano Agropecuario ICA para alcanzar los objetivos de establecer un sistema de diagnóstico, control y erradicación de la Salmonelosis aviar; por medio del programa nacional de control y erradicación de *Salmonella* aviares (*Pullorum* y *Gallinarum*) en aves de corral dentro del territorio nacional, basados en recomendaciones establecidas en el capítulo 10.7 del Código Sanitario, y capítulo 3.3.11 de la OIE (24).

### 2.5.3 Enfermedades encontradas en las aves de corral

Los retos frente a los cuales se ve expuesta la industria avícola se encuentran relacionados con algunas enfermedades infecciosas consideradas como las más importantes debido a la pérdida económica radical ocasionada en el sector; son de tal importancia que a menudo se destina un porcentaje del presupuesto anual desde la producción para su control y/o erradicación (25). Dentro de las principales enfermedades en las aves de corral se encuentran enfermedad de Newcastle, Gumboro, Salmonelosis Aviar, e Influenza Aviar.

- Salmonelosis aviar:

Es causada por microorganismos del género *Salmonella*, los cuales generan un cuadro gastrointestinal el cual puede llevar a la muerte del ave; lo cual genera un sobre costo en la producción por el uso exacerbado de antibióticos para el control del agente. Es una enfermedad considerada zoonótica, por lo que se denomina como una de las patologías de mayor importancia en la industria (25).

Los principales serovares que afectan a la industria son:

- *Salmonella Typhimurium* y *Salmonella Enteritidis*: causan en aves jóvenes disminución en el crecimiento, morbilidad y en algunos casos mortalidad; en aves maduras generan anorexia, diarrea y disminución en la producción de huevos.
- *Salmonella Pullorum*: genera septicemia en aves jóvenes.
- *Salmonella Gallinarum*: se encuentra generalmente en aves adultas en etapa de producción (26).

La tabla 1 presenta un resumen de las principales enfermedades de control encontradas en aves de corral, así como su agente causal, el método de transmisión de estas y la sintomatología presentada por las aves.

**Tabla 1. Principales enfermedades de control en Avicultura**

Enfermedad	Agente	Síntomas
<b>Salmonelosis aviar</b>	S. <i>Typhimurium</i> , S. <i>Enteritidis</i> , S. <i>Pullorum</i> , S. <i>Gallinarum</i> .	<ul style="list-style-type: none"> <li>• En aves jóvenes se evidencia disminución en el crecimiento, alta morbilidad y mortalidad.</li> <li>• En aves maduras se evidencia anorexia y diarrea en algunos casos disminución en la producción (huevo).</li> <li>• S. <i>Pullorum</i> puede causar enfermedad septicémica en aves jóvenes.</li> <li>• S. <i>Gallinarum</i> se evidencia en aves adultas en su períodos de producción.</li> </ul>
<b>Newcastle</b>	Virus familia Paramixoviridae	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Genera un cuadro clínico respiratorio, digestivo y nervioso , este cuadro puede concluir con la muerte de las aves enfermas.</li> </ul>
<b>Bronquitis</b>	virus perteneciente la familia Coronaviridae, género coronavirus	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Causa tos y ruidos respiratorios, disminución en la producción y baja calidad en los huevos.</li> </ul>
<b>Gumboro</b>	Virus de la familia Birnaviridae y al género Avibirnavirus	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Afecta el sistema inmune de las aves, generando inmunodeficiencia aumentando la susceptibilidad a infecciones generadas por el entorno.</li> </ul>

Principales enfermedades de afectación y control en la avicultura de Colombia. Fuente: tabla propia

## 2.6 Prevalencia de *Salmonella* en pollo

Uno de los problemas que enfrenta la avicultura en el mundo es la salmonelosis, la cual origina problemas patológicos que producen principalmente alteraciones en los parámetros zootécnicos de las aves, equivalente a pérdidas en las empresas avícolas (27); es por esto que su estudio es esencial para conocer las formas de control o disminución de sus tasas de incidencia y/o mortalidad.

### 2.6.1 Salmonelosis aviar

Esta enfermedad se encuentra en mayor medida tanto en el periodo de crecimiento como en las parvadas de aves adultas; se caracteriza por una rápida diseminación y por ende una mortalidad aguda, en esta se involucra a la garrapata roja como vehículo de trasmisión de la enfermedad. Por

su parte, la tifosis y pulorosis aviar, causadas por *Salmonella* enterica, subespecie enterica, serovariedad Gallinarum y biotipos Gallinarum y Pullorum, respectivamente, se encuentran distribuidas ampliamente por todo el mundo, en especial en países en vías de desarrollo. (28).

### **2.6.2 Transmisión en aves.**

Con respecto a la transmisión se puede evidenciar dos métodos los cuales son la transmisión horizontal (transmisión de un agente entre miembros de una misma especie que no tienen una relación madre-hijo), esta se produce a través de la vía oral y respiratoria; y la transmisión vertical (transmisión madre a hijo), donde las aves pueden convertirse en portadoras crónicas de ambos organismos y transmitirlo a sus crías, convirtiendo así a los huevos en un factor clave en la epidemiología de la enfermedad. Una forma muy recurrente de la diseminación de la infección es en la ingesta de la bacteria luego de una contaminación ambiental o por fómites, como los alimentos, el agua y la basura, y además se sabe que la *Salmonella* puede sobrevivir en un entorno favorable (28)

### **2.6.3 Signos clínicos**

Dentro de los signos clínicos en pollitos se encuentra la anorexia como principal síntoma, diarrea y deshidratación y en algunos casos la muerte. En aves adultas, la pulorosis genera disminución en la producción y aumento de la mortalidad. La tifosis aviar es considerada un trastorno septicémico agudo que afecta principalmente aves adultas y es de control inmediato en galpones de ponedoras comerciales (24); pues los signos clínicos de esta enfermedad se evidencian como un trastorno septicémico en las aves, con un aumento de la mortalidad y una reducción de la calidad de los huevos eclosionados infectados.

## **2.7 Resistencia**

Tal como se ha resaltado a lo largo del presente trabajo, la *Salmonella* es un importante patógeno en todo el mundo en especial en la industria alimentaria, puesto que se reporta en el mundo

anualmente más de 1.3 billones de contagios por salmonelosis y aproximadamente 3 millones de muertes.

La mayoría de los casos de salmonelosis han sido causados por cepas de *Salmonella* resistentes a los antibióticos, esta resistencia es generada por el uso indiscriminado de antibióticos en la medicina humana y veterinaria así como en la producción animal (29); como se pudo evidenciar en el estudio realizado por Adriana Quesada y colaboradores en 2016 donde se evaluaron estudios realizados en Brasil, México, Colombia, Argentina y Venezuela, mediante aislamientos de *Salmonella* spp los cuales fueron obtenidos principalmente de alimentos de origen aviar, porcinos y vacunos, *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* fueron los serotipos que se aislaron con mayor prevalencia, en 23 de los estudios, *Salmonella* spp fue resistente a más de un antibiótico, como lo son ácido nalidíxico, estreptomina, tetraciclina, cloranfenicol, ampicilina, trimetoprim sulfametoxazol, gentamicina, ciprofloxacina y cefalosporinas (30).

Históricamente se han empleado los antimicrobianos como promotores del crecimiento, específicamente desde 1950, donde se descubrió que pequeñas cantidades subterapéuticas de antibióticos, como la penicilina y la tetraciclina, administradas a los animales en el pienso podrían aumentar el peso de las aves de corral, los cerdos y el ganado vacuno (7). A partir de esta fecha y después de evidenciar la primera resistencia de *Salmonella*, se han aislado cepas con múltiples resistencias en todo el mundo a antibióticos tales como quinolonas y cefalosporinas (**figura 4**) los cuales han sido los antibióticos de primera elección para el tratamiento de seres humanos contra esta enfermedad (31).

Introducción del Antibiótico	Antibióticos Resistentes y mecanismos en <i>Salmonella</i> spp.
Streptomycin (S) 1944	
Cloranfenicol (CL) 1948	
Tetraciclina (TE) 1949	
Neomicina (NM) 1954	
Colistina (CS) 1959	
Ampicilina (AM) 1962	
Acido nalidixico 1967	
Trimetoprim sulfametoxazol (T/S) 1973	1950 Resistencia CL S.Typhi en Inglaterra
Cefalexina (CFT) 1876	1963 Plasmido MDR S.Typhimurium en Alemania
Ciprofloxacina 1980	1965 Plasmido MDR S.Typhimurium en Alemania
	1972 CL Resistencia S.Typhi brote en Mexico
	1972 S.Typhi brote en india (CL,AM)
	1973 S.Typhi brote en vietnam (CL,AM)
	1975 T/S <i>Salmonella</i> resistente en francia (CL,AM)
	1984 MDR, S. Typhimurium DT105 en Reino Unido (AM, CL,S,TE)
	1992 CP resistente S. Typhimurium en Reino Unido
	1992 Plasmido cefotaxima en S. Typhimurium
	2001 <i>Salmonella</i> isla genómica 1 en S. Typhimurium
	2016 CS Resistencia Mediada por gen mcr, en Reino Unido

**Figura 4. Antibióticos y su resistencia en la *Salmonella* spp**

Representación cronológica del despliegue de antibióticos y la resistencia causada a estos en la *Salmonella* spp. Fuente: tomada de (32)

Durante los años 70s y 80s las cepas de *Salmonella* generaron una variada susceptibilidad a la ampicilina, tetraciclina y trimetoprim sulfa. En estos últimos 20 años se ha detectado en todo el mundo resistencia a ampicilina, trimetoprim sulfa, cloranfenicol, aminoglucósidos y sulfonas (23).

Debido a la recurrencia de la *Salmonella* se han generado tratamientos que no se encuentran controlados y se usan los antibióticos de forma indiscriminada, esto genera una resistencia bacteriana a los agentes utilizados. Esta resistencia generada se puede relacionar al potencial que tiene esta bacteria de transferir resistencia horizontal mediada por plásmidos, transposones o integrones; a lo largo del tiempo, la *Salmonella* ha evolucionado y acumulado un gran número de mecanismos que pueden movilizarse en respuesta a diferentes agresiones externas, como lo son en este caso los antibióticos. La resistencia a estos se puede lograr mediante mutaciones en diferentes loci cromosómicos que forman parte de un conjunto básico de genes, como las islas genómicas (32), “*Salmonella* genomic island 1 (SGI1)” es la primera isla de genes reportada por tener un cluster de genes de resistencia a antibióticos, esta fue reportada en la *Salmonella Typhimurium* TD104, ampliamente aislada de humanos y animales productores de alimentos en la mayor parte del mundo desde 1980 (33); estos genes se caracterizan por albergar resistencia múltiple a estreptomycin, espectinomycin, sulfonamidas, cloranfenicol, florfenicol, tetraciclinas y

antibióticos  $\beta$ -lactámicos, y también por transportarse en elementos móviles como los integrones de Clase 1 que se encuentran en el grupo de resistencia a los antibióticos ubicado en el extremo 3' de la isla (32).

Además, la resistencia a los antibióticos puede adquirirse a través de genes de resistencia exógenos transportados por elementos genéticos móviles que pueden diseminarse horizontalmente entre bacterias, como lo son los plásmidos que típicamente codifican tanto para factores de virulencia como para rasgos de múltiple resistencia similares a los de las islas genómicas; estos se pueden transferir horizontalmente y pueden transportar otros elementos móviles como transposones e integrones. Por lo tanto, aumentan la diversidad fenotípica y confieren ventajas de aptitud durante épocas de cambios ambientales, proporcionando así al anfitrión oportunidades para la expansión (34).

Otra forma de resistencia es dada por los integrones, los cuales generan un sistema de recombinación natural que constituyen uno de los mecanismos más eficientes para acumular resistencias antimicrobianas. Su estructura incorpora varios marcos de lectura abiertos en forma de casetes de genes que codifican rasgos relacionados con la resistencia a los antimicrobianos (34); están compuestos por tres partes importantes, un gen que codifica una integrasa (intI), un sitio de recombinación primario (attI) y un promotor para la transcripción de genes capturados (Pc). A estos se les atribuye la responsabilidad de la resistencia a la estreptomycin, la trimetoprima, el sulfafurazol y algunos aminoglucósidos (35).

### **2.7.1 Mecanismo de resistencia**

La resistencia a los antimicrobianos en *Salmonella* está mediada por varios mecanismos (figura 5), el primero de ellos es la inactivación de fármacos, la cual se conoce como la causa más común de resistencia. En este mecanismo, los agentes antimicrobianos se destruyen o inactivan mediante la modificación química por medio de enzimas que catalizan reacciones como la acetilación, fosforilación y adenilación (36); por ejemplo, la acetiltransferasa AAC (6') - Ib-cr que modifica los aminoglucósidos alberga dos sustituciones de aminoácidos en Trp102Arg y Asp179Tyr, lo que

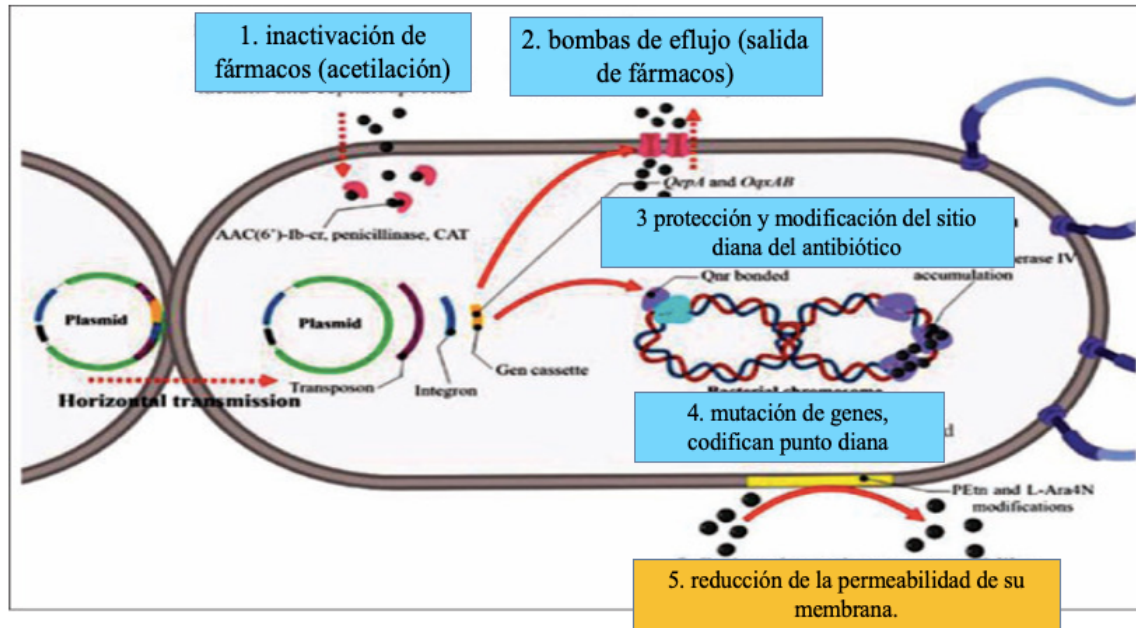
confiere la capacidad de acetilar el nitrógeno no sustituido del anillo de piperazina C7 presente en varias quinolonas (37).

El segundo mecanismo es dado por la capacidad de bombear el fármaco después de que ha ingresado al sistema, utilizando bombas de eflujo; este mecanismo es relativamente inespecífico y puede bombear fármacos diferentes, se sabe que estas bombas de eflujo están codificadas por genes dentro de elementos móviles tales como los plásmidos (36).

El tercer mecanismo se da gracias a que la *Salmonella* puede adquirir resistencia a los antibióticos al proteger el sitio diana del antibiótico, el cual puede ser una enzima o una estructura celular específica. Por ejemplo, la proteína de resistencia a quinolonas codificada por el plásmido (Qnr) actúa como un homólogo de ADN que compite por la unión de la ADN girasa y la topoisomerasa IV, lo cual reduce la posibilidad de que la molécula de quinolona se una a la ADN girasa, protegiendo así a las bacterias de los efectos letales del antibiótico (36).

Un cuarto mecanismo está dirigido en menor medida por la maquinaria cromosómica basada en mutaciones de genes que codifican el punto diana del fármaco, la resistencia a las quinolonas mediada por cromosomas puede resultar de la presión selectiva sobre la población bacteriana debido al uso incontrolado del fármaco; esto genera que se evite la replicación del complejo resultante, lo que explica la acción bacteriostática del fármaco (38).

Un quinto mecanismo registrado está correlacionado con la reducción de la permeabilidad de la membrana celular, evitando así la entrada del fármaco; la alteración se produce cuando las proteínas de la membrana sufren cambios a través de nueva información genética que altera los poros del sistema de transporte de la membrana y así impide el paso de los antibióticos (39).



**Figura 5. Mecanismos de Resistencia a antibióticos en *Salmonella* spp**

Se muestran los 5 mecanismos de resistencia de *Salmonella* spp Fuente: tomada y modificada de(32).

## 2.8 Aceites esenciales

Durante siglos, las plantas se han utilizado con diferentes propósitos, desde el tratamiento de enfermedades por medio de recetas ancestrales, hasta su uso y fabricación industrial como conservantes de alimentos, como elementos indispensables en la producción de perfumes, entre muchas otras aplicaciones. De igual forma, por la gran diversidad biológica y estructural de sus componentes, constituyen una fuente única y renovable para el descubrimiento de nuevos compuestos antibacterianos, antifúngicos y antiparasitarios (40).

Los aceites esenciales son producidos por más de 17.500 especies de plantas de muchas familias de angiospermas, entre las que se encuentran Lamiaceae, Rutaceae, Myrtaceae, Zingiberaceae y Asteraceae; pero solo unas 300 de ellas se comercializan. Los compuestos incluidos en los aceites esenciales se sintetizan en el citoplasma y en los plastidios de las células vegetales a través de las vías del ácido malónico, ácido mevalónico y metil-d-eritritol-4-fosfato (MEP); estos se producen y almacenan en estructuras secretoras complejas, como glándulas, cavidades secretoras y conductos de resina, las cuales están presentes como gotas de líquido en las hojas, tallos, flores y

frutos, cortezas y raíces de las plantas. A pesar de contener dos o tres componentes principales en un nivel de 20 a 70%, los aceites esenciales son mezclas complejas donde los terpenos, terpenoides y fenilpropanoides son la base de su composición; también pueden contener muchos otros compuestos, tales como ácidos grasos, óxidos y derivados del azufre (41).

Asimismo, estos son las fracciones líquidas volátiles, las cuales generalmente son destilables por arrastre con vapor de agua, las cuales contienen las sustancias características del aroma de las plantas; estas mezclas naturales usualmente están formadas por varios metabolitos secundarios y poseen actividades antifúngicas, antibacterianos y antivirales, incluyendo la actividad sobre cepas con resistencia a antibióticos. Entre las plantas aromáticas, los aceites de las familias Lamiaceae y Verbenaceae son reconocidos por sus propiedades farmacológicas han sido estudiados ampliamente para el tratamiento de afecciones respiratorias y desórdenes gastrointestinales (27).

Los aceites esenciales se clasifican con base en diferentes criterios: consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios (42); puesto que son el producto final del metabolismo secundario de las plantas aromáticas, y se encuentran constituidos por terpenos con actividad y composición variada. Para su obtención, se realiza un proceso de extracción desde las plantas en donde se obtiene un material generalmente líquido y rara vez sólidos o pastosos, la calidad de estos aceites está relacionada con su nivel de pureza y su actividad. Diversas investigaciones han permitido establecer su actividad antibacteriana, antimicótica, antiparasitaria, antiviral e insecticida (43).

## **2.9 Composición química**

Como se mencionó anteriormente, los aceites esenciales son mezclas complejas las cuales pueden contener entre 20 y 60 componentes con diferentes concentraciones; normalmente posee de 2 a 3 componentes principales, los cuales se pueden evidenciar en mayor concentración, aproximadamente en un porcentaje de 20 a 70%. Estos componentes denominados principales, son los determinantes de las propiedades biológicas de los aceites; adicionalmente es necesario resaltar los componentes en los aceites esenciales, como lo son los terpenos, los terpenoides y compuestos aromáticos, los cuales se describirán a continuación (44).

### **2.9.1 Terpenos y Terpenoides**

Los terpenos se presentan gracias a la polimerización enzimática de dos o más unidades de isopreno, las cuales son ensambladas y posteriormente modificadas de diferentes maneras. Son una clase de compuesto orgánico derivado de los isoprenos, el precursor principal de los terpenos es el ácido mevalónico. Al ejercerse un proceso oxidativo o evidenciar una reorganización del terpeno, se referencia la formación de un terpeno (44).

### **2.9.2 Compuestos Aromáticos**

Son derivados de fenilpropano y ocurren con una menor frecuencia frente a los terpenos y terpenoides. Estos compuestos tienen la característica de su aromaticidad, aunque no todos los olores de estos derivados son dulces (44).

## **2.10 Actividad antibacteriana**

Las bacterias Gram positivas y Gram negativas que demuestran sensibilidad a los aceites esenciales presentan el siguiente mecanismo de acción, los lípidos de la membrana celular y mitocondrial introducen el aceite, de forma que alteran la estructura y genera una mayor permeabilidad, generando con esto una fuga de iones y de contenido celular que puede producir la muerte celular bacteriana. Es por esto que se puede obtener un efecto antibacteriano con dosis reducidas de 100 a 200 ppm, dependiendo del aceite; de igual forma existen componentes activos tales como el carvacrol (componente del orégano) y el timol (componente del tomillo) que son capaces de desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram negativas (45).

En diversas investigaciones se ha evaluado la actividad antibacteriana de aceites esenciales en las cuales se han obtenido resultados satisfactorios, tal como lo evidencia Mayra Montero-Recalde y colaboradores en el 2017 quienes concluyen que las cepas de *Salmonella* son sensibles a concentraciones de aceites esenciales de canela bajo una concentración de 50% o superiores (46). Por su parte, Annie Rubio-Ortega y colaboradores en el 2018 demostró la eficiencia antibacteriana

de aceites esenciales de *Ocimum gratissimum* L., *Lippia graveolens* (Kunth) y *Thymus vulgaris* frente a la cepa de *S. Typhimurium* (27).

### **3 Objetivos**

### **3.1 Objetivo general**

Evaluar la actividad de aceites esenciales sobre el crecimiento microbiano de cepas de *Salmonella* no móviles aisladas de aves de corral con distintos patrones de susceptibilidad y resistencia a antibióticos.

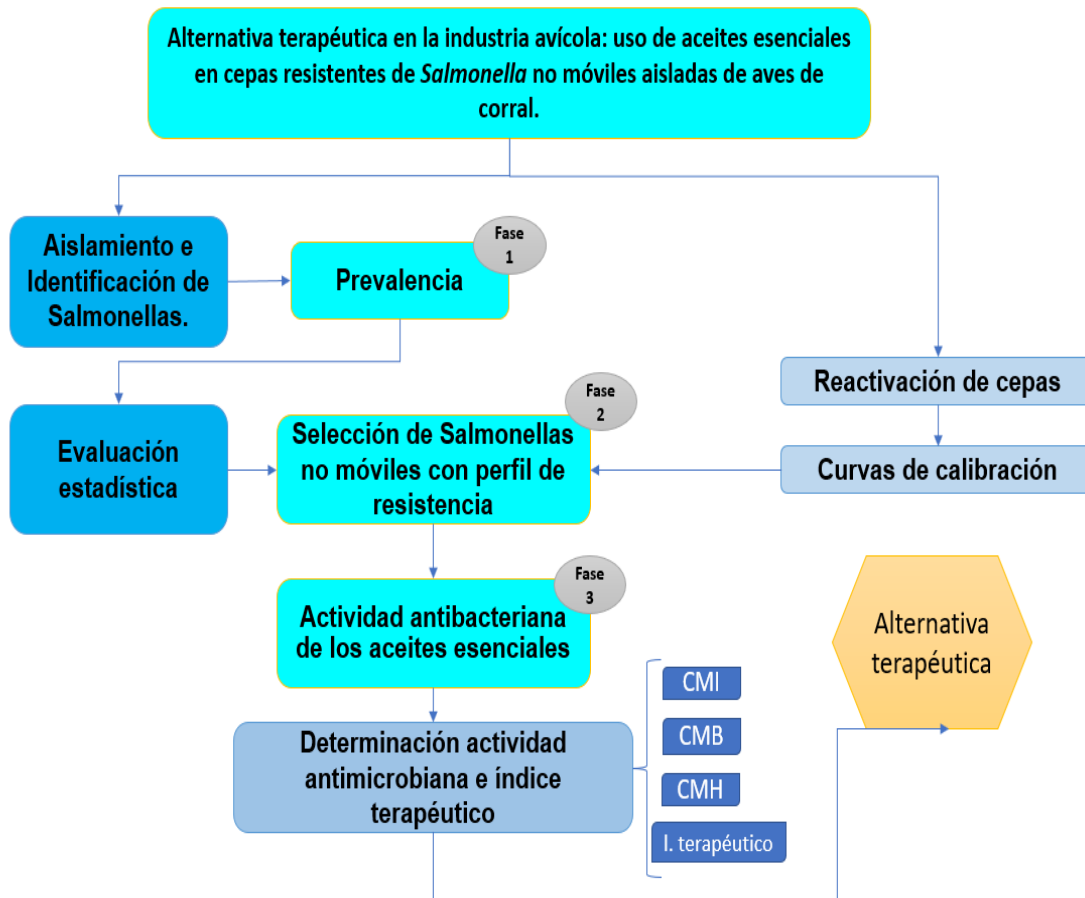
### **3.2 Objetivos específicos**

- Determinar la prevalencia de *Salmonella* no móvil en muestras de aves de corral que ingresaron al laboratorio Servet SAS entre enero de 2019 y abril de 2021.
- Determinar los patrones de susceptibilidad y resistencia de muestras de *Salmonella* no móviles aisladas de aves de corral de Colombia.
- Determinar la actividad antimicrobiana y hemolítica de aceites esenciales sobre *Salmonella* no móviles aisladas de aves de corral de Colombia con distintos patrones de susceptibilidad y resistencia a antibióticos.

## **4 Diseño metodológico**

Con el fin de alcanzar los objetivos planteados, se llevó a cabo una metodología de tres fases principales (Figura 6);

1. FASE 1: Procesamiento, identificación y determinación de la prevalencia de *Salmonella* no móviles en muestras de aves de corral a nivel nacional.
2. FASE 2: Determinación de los patrones de resistencia y susceptibilidad de *Salmonella* no móviles aisladas de aves de corral.
3. FASE 3: Evaluación de actividad antimicrobiana, cálculo de la CMI, CMB y CMH e IT.



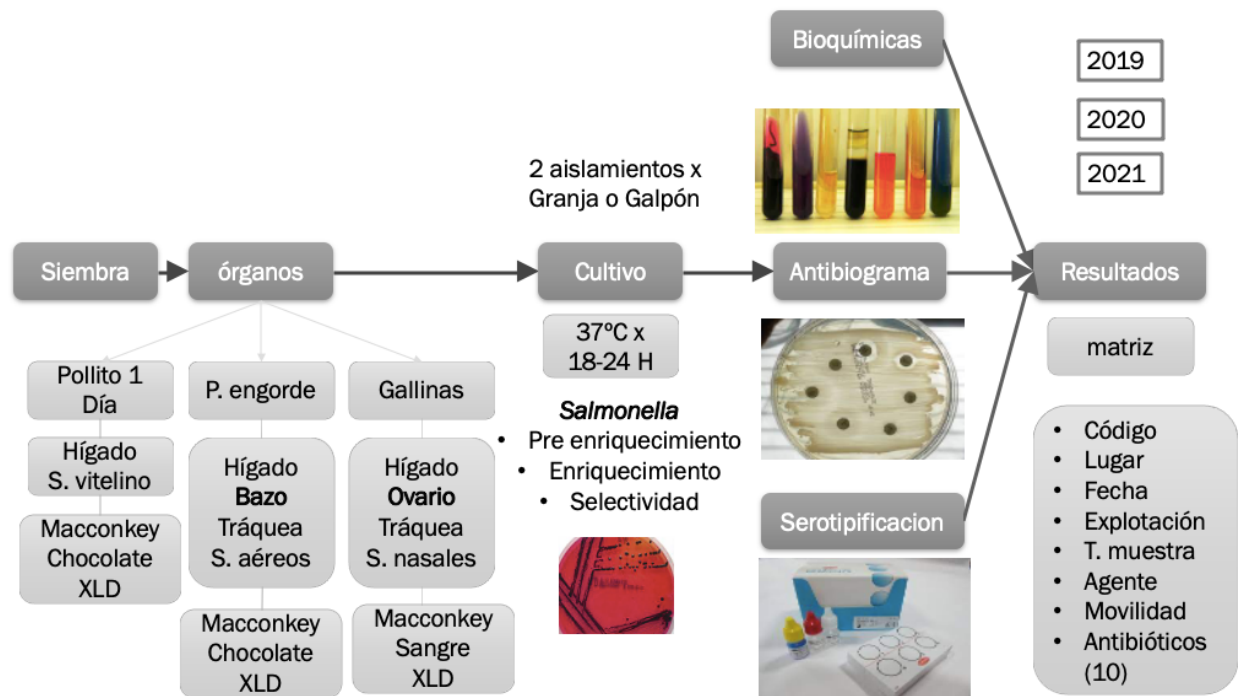
**Figura 6. Esquema Metodológico.**

Se muestran las tres fases de división del proyecto y algunas actividades experimentales y de análisis asociadas a cada fase.

## Fase 1

#### 4.1 Aislamiento e Identificación de *Salmonella*.

Para esta primera fase se analizaron muestras procedentes de diferentes órganos (hígado, bazo, ovario, y saco vitelino) de aves de corral (pollitos, pollo de engorde o gallinas) de 2.952 ingresos de diferentes departamentos de Colombia, recibidas y analizadas en el laboratorio Server SAS en los años 2019, 2020 y de enero-abril de 2021. Las muestras ingresaron al laboratorio para cultivo, identificación bacteriana y antibiograma como se muestra en la figura 7. Para los órganos recibidos se hizo una clasificación y descripción de los signos observados en cada muestra (Figura 8).



**Figura 7. Proceso de siembra, aislamiento y antibiograma para las muestras que ingresan al laboratorio SERVET.**

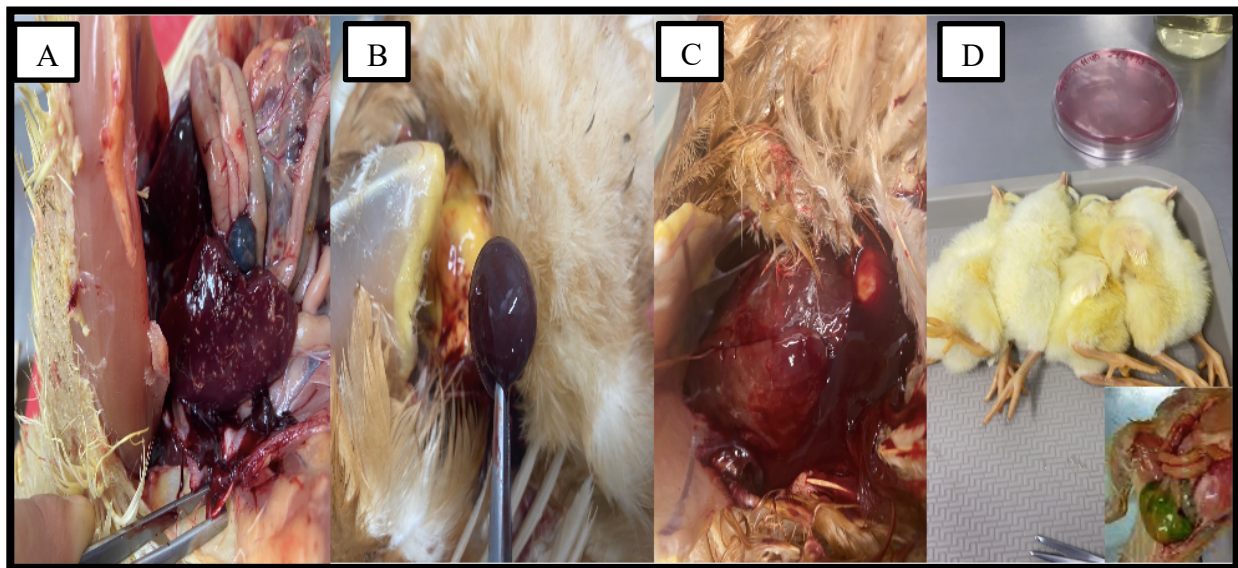
Se muestra el flujograma de siembra de los órganos característicos de cada línea comercial de aves, los cuales son puestos en agares específicos según la línea que corresponda. Una vez se observe crecimiento de microorganismos aislados son seleccionados dos agentes bacterianos que presenten importancia en la industria avícola. A estos microorganismos seleccionados se les realizó antibiograma por la técnica de Kirby Bauer y pruebas bioquímicas para su identificación. Fuente: figura propia.

Para esta la identificación de *Salmonella* se emplearon los parámetros estandarizados en el laboratorio, basados en la siguiente normativa:

- ✓ **ISO 6579:2017** Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.

- ✓ NTC 4574, Microbiología de Alimentos y Alimentos para Animales. Método horizontal para la detección de *Salmonella spp.*
- ✓ OIE, Capítulo 3.9.8 Salmonelosis.

Todos los datos y resultados de las muestras procesadas fueron consignadas en una base de datos en Excel (Anexo A). Esta base contiene código de ingreso de la muestra (generado por el laboratorio), lugar de procedencia, fecha de llegada al laboratorio, línea de explotación comercial, tipo de muestra, agente bacteriano identificado, movilidad o motilidad y perfil de resistencia frente a 10 antibióticos comerciales. Cada código corresponde al ingreso de una línea de explotación de la granja independientemente del número de órganos recibidos. A partir de los datos consignados allí, se elaboraron tablas de frecuencia que nos permitieron obtener el número de *Salmonella* totales aisladas de las muestras procesadas durante los años de observación. Así mismo, se obtuvieron datos de las *Salmonella* no-móviles y frecuencia por la línea de explotación.



**Figura 8. Muestra de órganos tomadas de aves Imagen de muestras tomadas de órganos de aves de corral.**

A: hígado con tamaño aumentado y petequias; B: Bazo con tamaño aumentado y aspecto friable; C: Hígado hemorrágico; D: Saco vitelino con coloración verdosa. Fuente: figura propia.

## Fase 2

## **4.2 Prevalencia de *salmonella* no móvil**

Se evaluó la prevalencia de las *Salmonella* no móvil con la información recolectada en la base de daos realizada en Excel, donde se tomaron los valores totales de las muestras (por año, por la línea de explotación y por perfil de resistencia) comparadas con los datos obtenidos de aislados de *Salmonella* no móvil identificadas. Con estos datos se sacaron promedios de prevalencia de la *Salmonella* no móvil entre enero de 2019 y abril de 2021. Para la línea de explotación se obtuvieron los datos de 2019 y 2020 así como los perfiles de resistencia.

## **4.3 Descripción y selección de *Salmonella* no-móviles con diferentes patrones de susceptibilidad y resistencia.**

Para la evaluación de la susceptibilidad y resistencia de las *Salmonella* no-móvil a diez distintos antimicrobianos de uso común en la industria avícola, se utilizó la técnica de Kirby Bauer. Brevemente, se tomaron tubos de 3 ml con agua peptonada (Merk) que fueron inoculados con 3 colonias morfológicamente parecidas (obtener turbidez según la escala 5 de Mac Farland). Este inóculo fue plaqueado con un escobillón de forma masiva en placas de agar Mueller Hinton (MHA). Sensidiscos con diferentes concentraciones de antimicrobiano fueron puestos sobre el agar. Fue usado como control negativo sensidisco estéril y una caja de Petri sin inoculación para evidenciar esterilidad. Las cajas fueron incubadas a 37°C durante 18 a 24 horas, pasado este tiempo se realiza la lectura del halo de inhibición del crecimiento y se clasifico la actividad antibacteriana.

Los datos obtenidos allí fueron consignados en la base datos con la letra de S (Sensible), R (Resistente) y M (sensibilidad intermedia) siguiendo la NCCLS.(47)

Con base en la información recolectada, se codificó el perfil de resistencia y susceptibilidad para cada aislado y se agruparon para seleccionar los perfiles más representativos de las *Salmonella* no-móviles aisladas durante 2019-2021. Se obtuvieron y graficaron las tablas de frecuencia de resistencia y susceptibilidad y se determinó cuál de los antibióticos presenta un incremento en las tasas de resistencia en los años evaluados mediante una prueba.

## **Fase 3**

### **4.4 Recuperación y mantenimiento de los aislados seleccionados**

De los perfiles seleccionados en la fase 2, cada aislado fue sembrado en una placa de agar MHA que contenía extracto de carne 2.0 gr/L, hidrolizado de caseína 17.5 gr/L, almidón 1.5gr/L, agar 17 gr/L, pH 7.3, Se incubaron de 18 a 24 horas a 37°C. Pasado este tiempo, se tomaron 3 colonias iguales morfológicamente y se colocaron en 5 mL de caldo LB, en agitación constante (~280 rpm) a 37 °C durante 2 a 8 horas, dando cumplimiento al crecimiento hasta la fase logarítmica.

### **4.5 Evaluación de la Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales por el método de difusión en agar frente *Salmonella no móvil* aisladas de aves de corral con perfiles de resistencia**

Las cepas seleccionadas previamente fueron sembradas en Agar Müller-Hinton y se incubaron a 37 °C durante 24+/- 2 horas. A partir de las colonias seleccionadas, se prepararon las suspensiones bacterianas en NaCl 8,5 mg/mL (solución salina), tomando con el asa bacteriológica de 3 a 4 colonias del microorganismo con el fin de obtener una concentración de inóculo bajo el tubo 0.5 del estándar de McFarland, el cual corresponde a una concentración de  $20 \times 10^8$  ufc/mL, equivalente a una densidad óptica de 0,45 aproximadamente a una longitud de onda de 620 nm en un espectrofotómetro, verificada por conteo de bacterias viables sobre Agar Müller-Hinton.

La sensibilidad de los microorganismos a los aceites esenciales se evaluó por el método de difusión en agar, según la técnica estandarizada en las recomendaciones de NCCLS.(47) A partir de la suspensión realizada se tomó un hisopo de algodón estéril y se introdujo dentro de la suspensión preparada anteriormente, se colocó el hisopo sobre la superficie de placas de Petri con 15-20 mL de agar Müller Hinton previamente servidas realizando una siembra masiva en las mismas. Seguido a esto, se toman seis discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro, ya impregnados con los aceites esenciales, y se disponen de forma equidistante sobre el medio inoculado con las suspensiones bacterianas; en cada caja fueron puestos cuatro sensidiscos con aceites esenciales, un control negativo (sin aceite) y un control positivo que correspondía a un antibiótico conocido (ciprofloxacina). Las placas se incubaron a 37 ° C durante 24 horas, y una vez transcurrido el

tiempo se midió el halo de inhibición del crecimiento y se clasificó la actividad antibacteriana de la siguiente forma:

- Sensible: halo >17 mm
- Moderado: halo entre 17-12 mm
- Resistente: halo < 12 mm

Se seleccionaron solo los aceites que generaron un halo de inhibición sensible (>17mm), cabe resaltar que la evaluación se realizó por triplicado para cada aislamiento.

Se realizó una evaluación de la actividad de los 12 aceites esenciales bajo una dosis de 10 µL (aceites comerciales al 15% diluidos en aceite de ajonjolí) sobre la cepa de *Salmonella* ATCC (13036), y sobre las 5 cepas resistentes a antibióticos seleccionadas. Se marcaron los sensidiscos de 1 a 12 y cada correspondía a un aceite esencial como se especifica en la tabla 2 de resultados. Finalmente fueron seleccionados los aceites cuya sensibilidad fuera >17 mm, se procedió a realizar la evaluación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI), Concentraciones Mínimas Bactericidas (CMB) y Concentraciones Mínimas Hemolíticas (CMH).

#### **4.6 Comprobación de las curvas de calibración de las cepas bacterianas**

Se estandarizaron las curvas de crecimiento y calibración de las cepas *Salmonella Pullorum ATCC 13036*, en donde se relacionó la absorbancia del cultivo con las unidades formadoras de colonia por cada ml de solución (UFC/mL).

Para realizar las curvas de crecimiento se siembran por agotamiento en agar LB las cepas a evaluar, se dejó en incubación toda la noche a 37°C, pasado el tiempo se toman 3 a 4 colonias morfológicamente iguales y se inoculan en 5 ml de caldo LB, se incubaron a 37°C durante 9 horas en agitación (225 rpm), con este inóculo se realizan diluciones, se mide su absorbancia a 620 nm en 270 µL y se siembran 200 µL por profundidad en placas con agar APC, se incubó a 37°C de 18 a 24 horas.

Para verificar el cálculo del inóculo en los ensayos de actividad antimicrobiana de los aceites, se realizó la comprobación de las curvas de calibración de las cepas a utilizar; con este fin, las cinco cepas de *Salmonella* seleccionadas previamente fueron activadas hasta la fase logarítmica. Al cabo de este tiempo, el cultivo fue centrifugado a 3500 rpm por 15 minutos a 4 °C, se decantó el sobrenadante y el pellet fue lavado tres veces y resuspendido con 5 mL de PBS 1X filtrado (8 gr NaCl, 2 gr KCl, 11 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.3) (48); este cultivo fue diluido hasta obtener un valor de absorbancia equivalente a la mitad de la curva de calibración a comprobar (lectura de absorbancia a 620 nm en 270 µL). Luego de obtener este punto de la curva, el cultivo se diluyó en serie en base 10 y se realizaron diluciones que permitieran el conteo en placa; estas placas fueron incubadas por 24 horas y luego del conteo se halló el valor teórico y el valor experimental de las UFC/mL, con los cuales se determinó el porcentaje de variación de cada curva.

#### **4.7 Actividad antimicrobiana contra *Salmonella no móvil* aisladas de aves de corral con perfiles de resistencia, CMI y CMB**

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se evaluó sobre las *Salmonella* no móviles aisladas de aves de corral; de igual forma, la CMI de los aceites esenciales se evaluó utilizando una versión modificada del método de micro dilución en caldo del Comité de Estándares de Laboratorio Clínico (CLSI). Para esto, las cepas de *Salmonella* seleccionadas previamente se sembraron por agotamiento en placas de agar Mueller Hinton, y se siguió el protocolo descrito en la comprobación de las curvas, para obtener un cultivo en fase exponencial, luego se ajustó la suspensión bacteriana a  $\approx 1 \times 10^5$  UFC/mL en medio líquido Mueller Hinton (MHB).

Se utilizó el método estándar de microdilución en caldo (Müller-Hinton + DMSO 3%) para determinar la CMI de los Aceites esenciales; para esto, se inocularon diluciones de aceites esenciales en serie (concentración de 75% a 0,014 %) en placas de 96 pocillos a un volumen final de 100 µl / pocillo, estos se incubaron durante 18 horas a 37°C en una cámara húmeda con aproximadamente  $5 \times 10^6$  UFC / ml de inóculo bacteriano (calculado de la ecuación de la curva de calibración obtenida previamente para cada cepa). La densidad óptica (DO) se midió a 620 nm después de 18 horas de incubación, para esto se empleó un lector de microplacas. Se emplearon bacterias en caldo Müller-Hinton (MHB) como control negativo y los controles positivos fueron bacterias tratadas con antibióticos conocidos (ciprofloxacina y gentamicina). La

concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó como la concentración de aceites esenciales más baja a la que no se detectó crecimiento bacteriano(49).

Así mismo, se determinó la concentración mínima bactericida (CMB), para lo cual se tomaron 10 µL de muestra de cada pozo donde no se detectó crecimiento bacteriano en la placa de la CMI previamente realizada; esta alícuota se sembró en agar LB y se incubó de 18 a 24 horas a 37°C, luego de lo cual se verificó el crecimiento de colonias bacterianas. La concentración más baja de aceites en la que no se detectó crecimiento en el agar LB, fue tomada como la CMB. Se realizaron tres réplicas del crecimiento por duplicado.

#### **4.8 Determinación de la actividad hemolítica de los aceites esenciales.**

La actividad hemolítica de los aceites esenciales se determinó como la cantidad de hemoglobina liberada por la lisis de los eritrocitos de ave. Para esto se obtuvo una muestra de sangre total con anticoagulante y se centrifugó a 1000 × g, durante 5 min a 4 °C; a los eritrocitos obtenidos se les realizaron tres lavados y se resuspendieron en PBS 1x al 5%. La evaluación se realizó en placas de 96 pozos estériles, se tomaron 100 µL de la suspensión de glóbulos rojos y se incubó con 100 µL de los aceites en dilución (PBS 1X + DMSO 3%) seriada partiendo de 7% hasta 0.014 %.

La placa se incubó durante 1 hora a 37 °C, luego se centrifugó a 1000 x g durante 5 min a 4° C y el sobrenadante se transfirió a una nueva placa. La absorbancia de los sobrenadantes se leyó a 540 nm (Thermo Scientific, Multiskan GO); como controles negativos y positivos, se utilizaron glóbulos rojos con PBS 1X (0% de hemólisis) y glóbulos rojos con detergente tritón X-100 al 0.1% (100% de hemólisis) respectivamente(50).

La CMH se determinó como la concentración más baja donde hay hemólisis superior o igual al 1%. Se hicieron tres ensayos independientes por duplicado y el porcentaje de hemólisis se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{((\text{Abs de la muestra} - \text{Abs GRs}))}{((\text{Abs GRs tritón} - \text{Abs GRs}))} * 100$$

#### 4.9 Cálculo del índice terapéutico (CMH/CMI)

El índice terapéutico (IT) se define como la relación entre la dosis a la que un fármaco causa efecto tóxico y la dosis a la que produce el efecto terapéutico. En el caso de los aceites esenciales, se determinó el IT por medio de la división entre la mínima concentración que causa un efecto tóxico sobre los glóbulos rojos de aves y la mínima concentración que genera inhibición total del crecimiento bacteriano. El IT se obtiene con el siguiente calculo:

$$IT = \frac{CMH}{CMI}$$

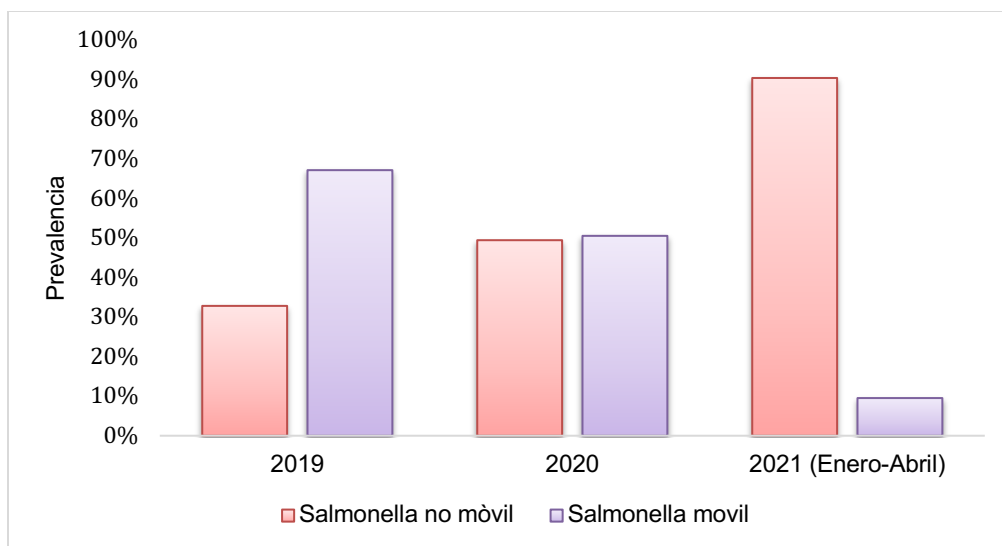
CMH hace referencia a la concentración mínima hemolítica y CMI a la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial frente la *Salmonella*. así, un alto índice terapéutico indica una alta selectividad hacia el microorganismo(51).

## 5 Resultados

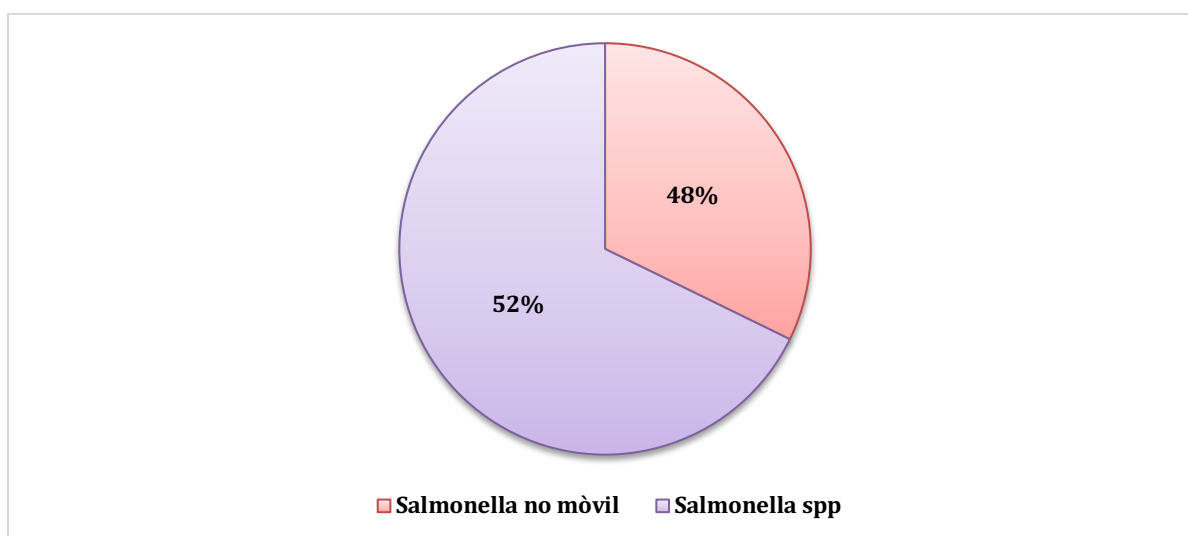
### 5.1 Prevalencia de *Salmonella spp* en las muestras analizadas

La recolección de los datos de los años 2019, 2020 y los primeros 4 meses del año 2021 arrojó un total de 2952 ingresos (provenientes de distintas granjas) de donde se aislaron 6052 aislados bacterianos (los aislados corresponden a los microorganismos encontrados en las muestras enviadas al laboratorio SERVET SAS para prueba de cultivo y antibiograma). Se identificaron 267 *Salmonella spp* durante los 28 meses evaluados con una prevalencia del 19,1%. que se distribuyeron anualmente en un 33.5% (n= 134) para el 2019, 49.5% (n=91) en el 2020 y 90.5 (n=42) para los primeros cuatro meses del año 2021 (Figura 9).

De los 267 aislados de *Salmonella spp*, 127 equivalen a *Salmonella* no-móvil con una prevalencia del 48% (figura 10).

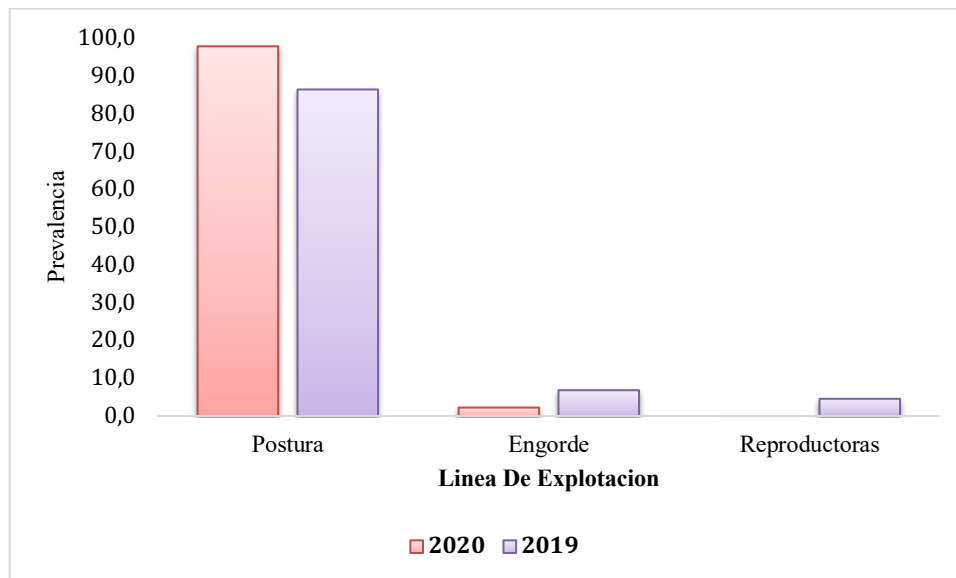


**Figura 9: Prevalencia de *Salmonella* móvil y no móvil entre enero de 2019 y abril de 2021.**



**Figura 10. Prevalencia *Salmonella* no móvil entre enero de 2019 y abril de 2021.**

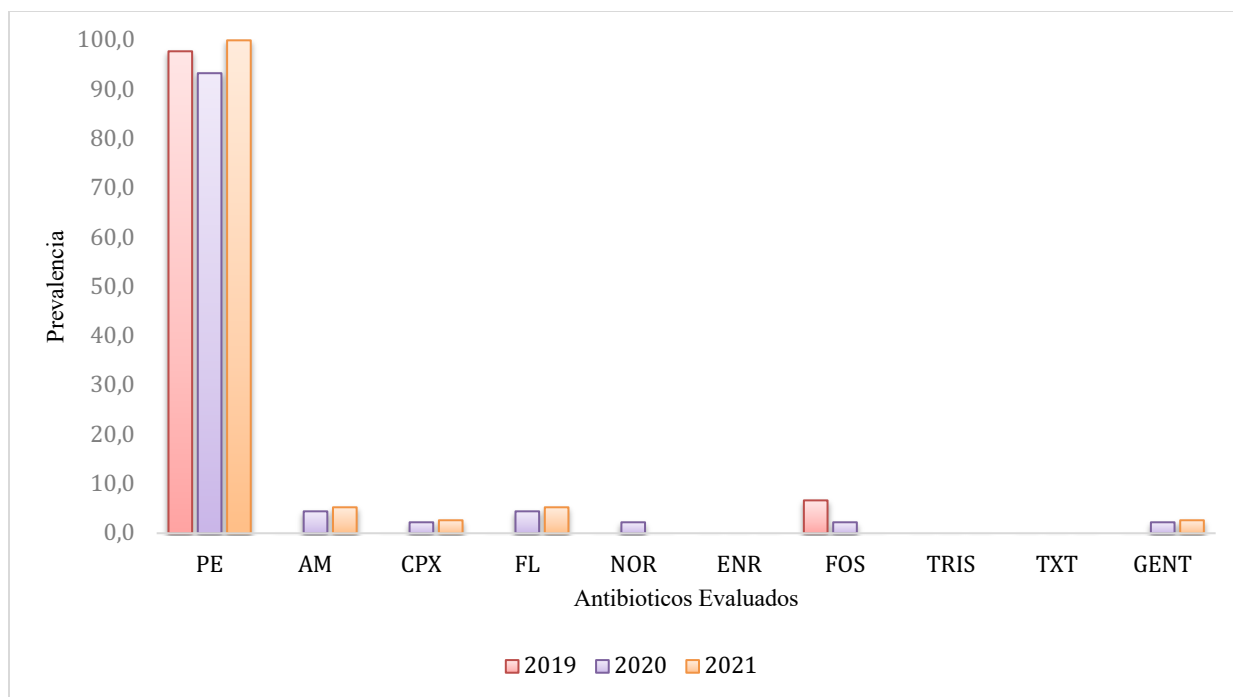
De igual forma, la prevalencia de la *Salmonella* no móvil se evaluó según la línea comercial de las aves de corral que ingresan al laboratorio SERVET SAS en los años 2019 y 2020 (no se tomó 2021 en este punto por falta de información de la línea comercial) obteniendo como resultado en el 2019 la prevalencia de la línea de postura en un 86.36% (n=44) y en el 2020 un 95.7% (n=45) frente a las líneas de engorde y reproductoras (figura 9 y 10). La prevalencia acumulada entre los años evaluados en aves de línea de postura fue del 89.53% (n=89).



**Figura 11.** Prevalencia de *Salmonella* no móvil según la línea de explotación comercial de aves de corral en el 2019 y 2020.

## **5.2 *Salmonellas* no móviles presentan una elevada resistencia a la Penicilina.**

A cada una de las *Salmonella* no-móviles (n=127) se les determinó los perfiles de resistencia frente a 10 antibióticos usados en el laboratorio SERVET SAS y de uso convencional en el tratamiento de avicultores. Como se observa en la Figura 12, cerca del 97% de las cepas identificadas presentaron resistencia a la Penicilina, un antibiótico del grupo de los betalactámicos. Así mismo se detectaron cepas resistentes a Amoxicilina y Florfenicol superior al 4% y de 6.7% a Fosfomicina. Si bien los porcentajes de resistencia a antibióticos diferentes a la penicilina son bajos, debido a la rápida propagación de genes de resistencia en ambientes avicultores, es urgente la evaluación de alternativas terapéuticas que eviten este fenómeno en la avicultura y que logren disminuir los fracasos en la economía avícola.



**Figura 12. Resistencia de *Salmonella* no móvil en el año 2019, 2020 y los primeros cuatro meses del 2021 frente a diez antibióticos evaluados.**

PE (Penicilina 10mcg); AM (Amoxicilina 10mcg); CPX (Ciprofloxacina 5 mcg); FL (Florfenicol 30 mcg); NOR (Norfloxacina 10 mcg); ENR (Enrofloxacina 5 mcg); FOS (Fosfomicina 50 mcg); TRIS (Trimetoprin sulfá 1/25 mcg); TXT (Tetraciclina 30 mcg) Y GENT (Gentamicina 10 mcg). Menos del 5% de las cepas no fueron evaluados con penicilina.

A partir de estos datos, se hizo un análisis de los principales perfiles de resistencia y susceptibilidad, encontrando que los aislados se ubican en cinco perfiles distintos (Tabla 2). Los perfiles de resistencia fueron obtenidos mediante la conversión del perfil resistencia, el cual es completamente cualitativo pues aporta únicamente el dato de si la cepa es resistente o sensible, a un código cuantificable y evaluable; de tal forma que se puede determinar la prevalencia de cada perfil encontrado en los aislados de *Salmonella* no-móvil.

De cada uno de los perfiles se seleccionó al azar un aislado para ser evaluado en los ensayos posteriores. Durante los siguientes ensayos se utilizó como cepa de referencia de *Salmonella* no-móvil: *Salmonella Pullorum* ATCC 13036.

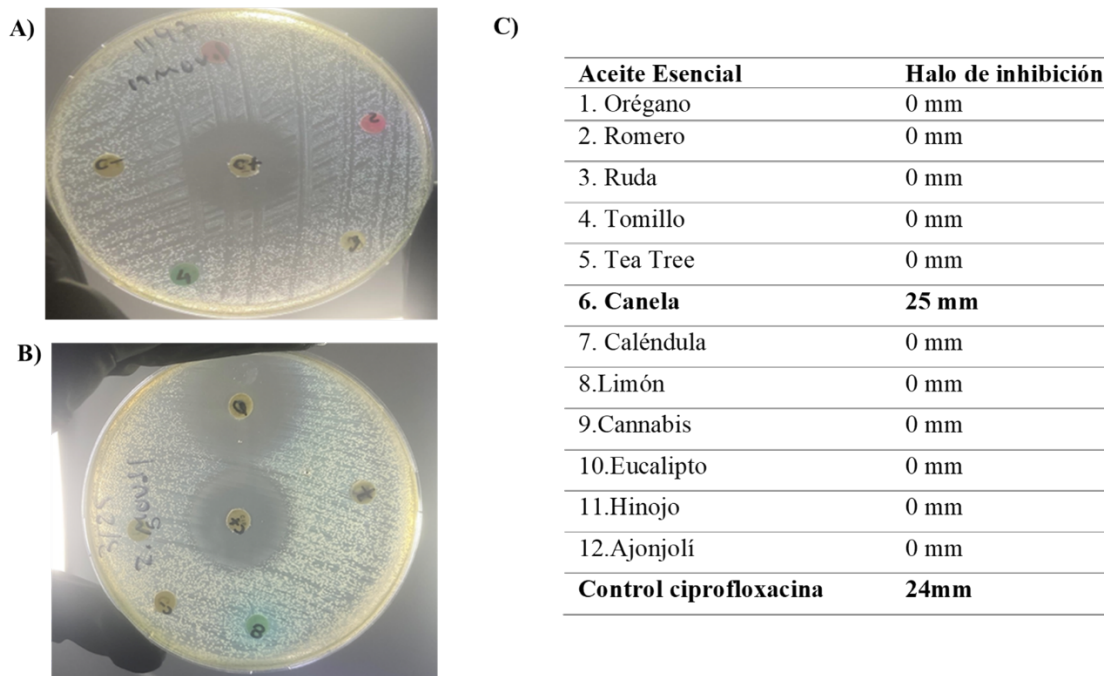
**Tabla 2. Perfiles de Resistencia y susceptibilidad de *Salmonella* no-móvil a diferentes antibióticos de uso comercial.**

Perfil*	PE	AM	CPX	FL	NOR	ENR	FOS	TRIS	TXT	GENT	n
1	R	S	S	S	M	S	M	S	S	S	2
2	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	2
3	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	3
4	R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	2
5	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	118
<b>TOTAL</b>											<b>127</b>

\*Cada perfil corresponde a un grupo de aislados de *Salmonella* no-móvil que presentaban perfiles de resistencia y susceptibilidad parecidos. A partir de esta selección se reactivaron cinco cepas como representantes de cada perfil. R corresponde a resistente, S a sensible y M a moderado.

### **5.3 El aceite de canela tiene características antimicrobianas similares a la ciprofloxacina**

Mediante difusión agar fueron evaluados once aceites esenciales (orégano, romero, ruda, tomillo, tea tree, canela, limón, cannabis, eucalipto, hinojo) y el medio de dilución (aceite de ajonjolí). Estos aceites fueron seleccionados luego de una rigurosa revisión bibliográfica que describen sus propiedades antibacterianas (27, 46). Para el ensayo, diferentes sensidiscos fueron impregnados con cada uno de los aceites como describe en el numeral 4.2 y se evaluaron frente a los cinco aislados seleccionados y a *Salmonella Pullorum* ATCC 13036 (*Salmonella* no-movil). Todos los ensayos fueron montados por triplicado. La figura 13A muestra la actividad antibacteriana de ciprofloxacina (control de inhibición) que mostró un halo promedio de inhibición de 24mm, que está dentro del rango reportado por la norma técnica. Cuando se evaluaron los aceites, solo se encontró actividad antibacteriana para el aceite de canela con un halo promedio de inhibición de 25mm (Figura 13B y C), similar al encontrado con el antibiótico de referencia. No se encontró halo de inhibición para el agente diluyente del aceite (aceite de ajonjolí).



**Figura 13. Actividad antibacteriana de aceites esenciales mediante difusión en agar con sensidiscos.** Lectura en mm de halos de inhibición de cepas de *Salmonella* no móvil con sensidiscos impregnados de aceites esenciales.

#### 5.4 Bajas concentraciones del aceite de canela son necesarias para inhibir el crecimiento bacteriano de *Salmonella* no móvil

Teniendo en cuenta que solo uno de los aceites evaluados presentó actividad antimicrobiana frente a *Salmonella* no móvil, se utilizó la técnica cuantitativa de microdilución en caldo para determinar la mínima concentración de aceite de canela necesaria para inhibir el crecimiento de las bacterias.

*Salmonella* Pullorum ATCC 13036 fue utilizada como cepa de referencia para obtener las curvas de calibración. En la Tabla 4 se muestran los resultados de este proceso, donde se reporta una CMI promedio de 0,08%; lo cual demuestra un alto grado de inhibición el aceite de canela frente las diferentes cepas evaluadas con una baja cantidad de aceite necesario para este efecto inhibitorio.

#### 5.5 Efecto bactericida del aceite de canela sobre los aislados de *Salmonella* no-móvil.

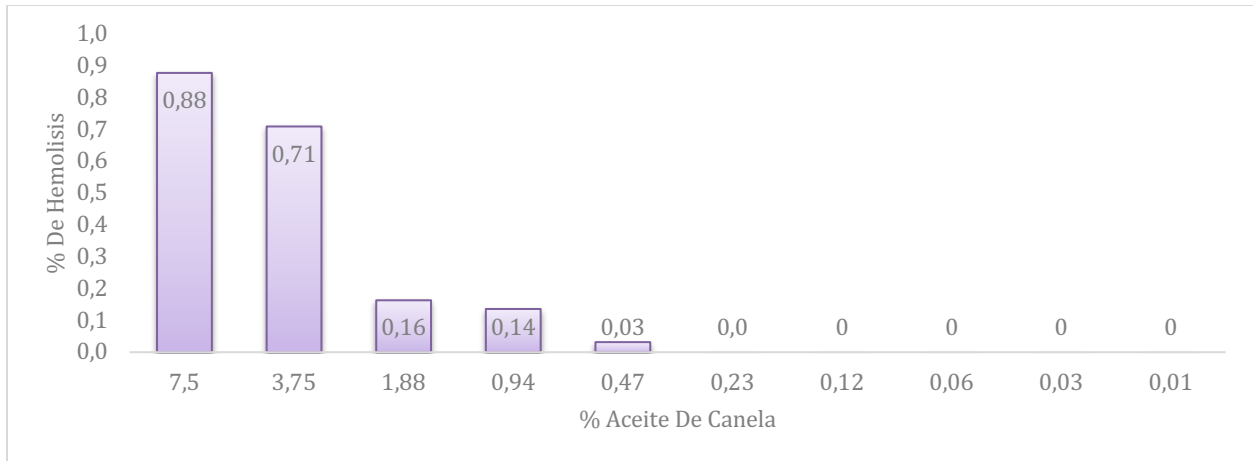
Para determinar si la actividad del aceite esencial de canela es de tipo bactericida se determinó la concentración mínima bactericida (CMB). Para este ensayo se tomó una asada del pozo que no presentara crecimiento en la CMI a un medio de cultivo sólido. La concentración en donde no se observó crecimiento bacteriano se considera como la CMB. La CMB para el aceite de canela contra las cepas de *Salmonella* fue de un promedio de 0,113%, lo que demuestra su efecto bactericida como se evidencia en la Tabla 4.

<b>Antibiótico/ Aceite</b>	<b>CMI</b>	<b>CMB</b>
<b>ATCC 13036</b>	0.12%	0.2%
<b>Cepa 1</b>	0.06%	0.06%
<b>Cepa 2</b>	0.06%	0.12%
<b>Cepa 3</b>	0.06%	0.12%
<b>Cepa 4</b>	0.12%	0.12%
<b>Cepa 5</b>	0.06%	0.06%
<b>Promedio</b>	<b>0,08 %</b>	<b>0,11 %</b>
<b>Control Ciprofloxacina</b>	0,004 µg/mL	0,004 µg/mL

**Tabla 3. Actividad antimicrobiana del aceite de canela**

### **5.6 El aceite de canela genera una mínima actividad hemolítica.**

Ya que se busca una alternativa terapéutica mediante el uso de aceite esencial de canela, es importante evaluar si el aceite tiene efectos tóxicos sobre las células de las aves. Para esto, se llevó a cabo un ensayo de hemólisis con glóbulos rojos de aves partiendo de una concentración de 7.5%. La concentración mínima hemolítica (CMH) es definida como aquella concentración que es capaz de producir más del 1% de hemólisis (52). En nuestro ensayo encontramos que a la concentración máxima evaluada (7.5%) de aceite de canela, el porcentaje de hemólisis fue de aproximadamente 0.9% sugiriendo que la CMH está por encima 7.5%.



**Figura 14. Capacidad hemolítica del aceite de canela.**

El aceite de canela presenta en una concentración de 7.5% una hemolisis cercana a 1% mostrando que su máxima capacidad hemolítica fue de un 0.9%. Fue usado como control positivo Tritón con el 100% de hemolisis Tritón y como control negativo glóbulos rojos de ave con el 0% de hemolisis.

### **5.7 Elevado índice terapéutico de la canela como aceite esencial sugiere una nueva estrategia frente a la *Salmonella* no móvil aislada de aves de corral con distintos patrones de resistencia.**

Luego de determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Hemolítica (CMH), con valores experimentales de 0.08% y 7,5% respectivamente, se procedió a calcular el Índice Terapéutico o IT el cual arrojó un valor de 96.03. Indicando así que el aceite esencial de canela podría ser un candidato ideal para el tratamiento de salmonelosis aviar; esto debido a que su valor cercano al 100 indica una alta selectividad por parte del microorganismo, razón por la cual actuaría de manera efectiva sobre el mismo.

## 6 Discusión

La Salmonelosis aviar es causada por la bacteria *Salmonella*, y afecta la industria avícola en especial genera alteraciones el serotipo *Salmonella enterica serovar Gallinarum*, ya que es un patógeno específico para un grupo determinado de animales, como lo son las aves de corral y rara vez causan enfermedades en humanos. Por medio del presente trabajo experimental, se pudo observar la prevalencia de aislamiento de *Salmonella* spp en las diferentes muestras analizadas a partir de aves de corral con la detección del 19.1% (n=6052) de *Salmonella* spp frente el total de aislados bacterianos, confirma la importancia frente la principal causa de morbilidad y mortalidad en las aves de corral comerciales, ocasionando importantes pérdidas económicas para los avicultores (19). En la línea comercial de postura con un 89.5% (n=89) se detectó la prevalencia de *Salmonella* no móvil, afectando la industria en producción de huevos, siendo este la proteína más exequible y económica del mercado; ya que la avicultura en el mundo es uno de los sectores que mayor crecimiento e influencia en el mercado tienen, es necesario desarrollar alternativas para el tratamiento de las enfermedades que más lo aquejan (25).

Como bien es sabido, las principales fuentes de tratamiento contra las diferentes enfermedades bacterianas, virales y/o fúngicas en animales siempre han sido los antibióticos, pues se suministra de forma fácil a los animales en un corto periodo de tiempo y de esta forma se logra erradicar o inhibir el agente causal de las mismas. Sin embargo, el inconveniente real es la generación de resistencia de estos agentes antimicrobianos, a raíz del aumento no solo de la dosis de estos productos químicos, sino el uso de cocteles de los mismos, por lo cual los microorganismos generan variados perfiles de resistencia que impiden la erradicación completa mas no temporal de una o varias enfermedades en la zona de crianza de los animales (53). Es por esto que diversos estudios han buscado evaluar cómo desarrollar alternativas antimicrobiana, ya sea por medio de la síntesis de componentes o la purificación de estos productos naturales tales como los extractos vegetales o sus aceites esenciales de los cuales se han descrito que poseen actividad antioxidante, antibacteriana y anti fúngica (53).

Tal como se describió a lo largo del presente trabajo, se realizaron diversas pruebas para determinar si los aceites esenciales de orégano, romero, ruda, tomillo, tea tree, canela, caléndula, limón, cannabis, eucalipto, hinojo y ajonjolí tenían actividad antibacteriana frente las cepas de *Salmonella* no móvil; los resultados obtenidos al evaluar las 5 cepas de *Salmonella* no móvil seleccionadas con perfiles de resistencia específicos a 10 antibióticos probados, determino que el aceite esencial de canela fue el único que presento valores significativos en las diferentes pruebas evaluadas, como lo fue la difusión en agar, empleando el método de Kirby Baur, donde se obtuvo 25 mm como halo de inhibición en comparación con el control de ciprofloxacina empleado, que fue de 24 mm; de igual forma, la CMI promedio fue de 0.08%, la CMB promedio de 0.11% y la CMH donde se genera menos de 1% de hemolisis, exactamente un 0,9% sugiriendo que la CMH está por encima 7.5% de concentración. La actividad antibacteriana observada por parte del aceite esencial de canela frente a la *Salmonella* no móvil puede deberse a los diferentes mecanismos de acción, como lo sugiere la acción conjunta que presentan los metabolitos secundarios tales como cinamaldehído, cinnamato, ácido cinámico; dentro de los cuales cabe resaltar el daño a la membrana celular (acidificación y denaturación de sus proteínas), alteración del perfil lipídico de la misma (aumento de la porción de ácidos grasos saturados alterando así su permeabilidad selectiva), inhibición de las ATPasas (genera disrupción de la fuerza protón motriz, ocasionando depleción de ATP y previniendo al aumento de la concentración de ATP celular, lo que afecta la tasa de crecimiento celular), de la división celular (alteración de la formación del anillo z esencial para este proceso) de las porinas membranales (disminución de expresión de genes de estas y de transportadores de aminoácidos), la motilidad (regulación genes asociados con la formación del flagelo) y de formación de biofilm (inhibición de la síntesis de exopolisacaridos, y disminución de la señalización entre células por la reducción de la expresión génica), así como, efectos anti quorum sensing asociados a la motilidad y la formación del biofilm (54).

Estudios realizados por Recalde et al en 2017 en donde se evaluaron concentraciones del 10-90% de aceite esencial de canela obtenido por destilación por arrastre de vapor y decantación, sobre cepas de *Salmonella Choleraesuis* y *S. Typhimurium*; los investigadores obtuvieron como resultados halos de inhibición de 21.6 mm para *S. Choleraesuis* y 29.4 mm para *S. Typhimurium* (46). Por su parte, Alzamora et al en 2001, obtuvieron halos de inhibición de 30 mm para *S. Typhimurium* y de 32 mm para *S. Enteritidis* al evaluar el efecto del aceite esencial de canela contra

cepas ATCC de las mismas; sin embargo, Solarte et al en el 2016 evaluó con cepas aisladas de muestras clínicas de *S. Typhimurium* obtuvieron halos entre 15,07 mm a 20,87 mm. Análogamente, Mohammad Haji et al en 2021 estudiaron el efecto del aceite esencial de *Satureja hortensis* contra *E. coli* y *S. Typhimurium* aisladas de aves de corral, obtuvieron como resultado halos de inhibición de 38 y 32 mm respectivamente, los investigadores mencionan que esto puede deberse a la actividad antimicrobiana otorgada al aceite esencial por el timol como principal componente (55). Estos resultados son similares a los obtenidos en el presente trabajo de grado, donde el valor del halo de inhibición promedio fue de 25 mm, cabe resaltar que se evaluó el aceite esencial contra cepas de *Salmonella* no-móvil aisladas de las muestras de la industria avícola, a diferencia de los estudios anteriormente citados donde emplean cepas ATCC o aislados de muestras clínicas de *Salmonella* móvil, u otro aceite esencial el cual, sin embargo también presenta componentes similares al aceite de canela. Esto podría indicar que las diferencias fenotípicas y genotípicas entre la *Salmonella* móvil y la *Salmonella* no-móvil son un factor decisivo para la resistencia frente a agentes antimicrobianos.

Por otra parte, Recalde et al en 2017 también evaluaron la CMI del aceite frente a las cepas de *Salmonella* ATCC o aislados de muestras clínicas, como resultado obtuvieron que a concentraciones del 50, 70, 90% no se obtuvo crecimiento/turbidez en los tubos inoculados y de igual forma al realizar la siembra para determinar la CMB tampoco se obtuvo crecimiento alguno (46). Asimismo, Mohammad Haji et al en 2021 obtuvieron que la CMI del aceite esencial de *S. hortensis* contra *Salmonella* fue de 0.31-0.82  $\mu\text{L}/\text{mL}$  y la CMB fue de 0.625  $\mu\text{L}/\text{ml}$  y determinaron que también presenta efectos en la inhibición de la formación del biofilm con la CMI escogida (56). Cabe resaltar que Fuselli et al 2006 determinaron, mediante el enfrentamiento de cepas bacterianas contra aceites esenciales de canela, que a concentraciones entre 25 y 50  $\mu\text{L}/\text{ml}$  reducen la CMI y CMB; posiblemente por el efecto del cinamaldehído, el cual actúa directamente sobre la membrana celular inhibiendo así el crecimiento bacteriano, y en altas dosis generando muerte celular por lisis de la misma (57). Estos resultados son similares a los obtenidos en el presente trabajo de grado, donde la CMI promedio obtenida fue de 0.08% y la CMB promedio fue de 0.11%; entre los diferentes compuestos del aceite esencial de canela aquellos que contienen fenol, timol o terpenos son los principales causantes del efecto antimicrobiano y sus concentraciones son determinantes para las CMI y CMB, de igual forma, presenta efectos en la formación de los

biofilms al inhibir la formación del mismo por la reducción en la producción de exopolisacáridos y la alteración de la expresión génica asociada al mismo. Esto representaría una gran ventaja para la industria avícola, ya que la formación de biofilms por diversos patógenos se presentan sobre diversas superficies tales como jaulas, comederos, bebederos, camas, transportadoras entre otros, y la inhibición del mismo generaría la reducción de contaminación de los animales por los microorganismos de estos (58).

Cabe resaltar que, como alternativa terapéutica, el aceite de canela presentó un IT de 96.03 lo cual lo hace ideal para el tratamiento de salmonelosis aviar como suplemento a un tratamiento base. Sin embargo, se sabe que la sinergia entre agentes antimicrobianos (aceites y antibióticos) se basa en el principio que se aumenta la actividad antimicrobiana, se reduce la posible toxicidad del compuesto, disminuye los efectos secundarios o adversos, aumenta la biodisponibilidad (tiempo en el que el compuesto activo se encuentra en el organismo actuando) y disminuye la dosis requerida (54). Razón por la cual, *Simitzis y cols* en 2014 emplearon el aceite esencial de canela como aditivo nutricional en la alimentación de una población de corderos, esto para evaluar si generaba algún efecto tanto en la tasa de crecimiento de los mismos como en la calidad/apariencia de su carne o aumentaba la vida útil al encontrarse refrigerada; los investigadores no obtuvieron diferencias significativas entre los resultados del grupo control y el grupo con suplemento dietario, concluyendo que el aceite esencial de canela no afecta las tasas de crecimiento muscular, las características de la carne (pH, color, sabor, aW) ni su calidad, de igual forma, tampoco contribuyó a disminuir recuentos bacterianos en el proceso de descomposición (59). Sin embargo, *Qaid et al* en 2021 evaluaron el efecto de la canela como suplemento dietario para el tratamiento de la coccidiosis en aves de corral, posterior a la evaluación de parámetros nutricionales y de sintomatología clínica, entre aves tratadas y no tratadas concluyeron que al adicionar 6 gr de canela/kg de dieta, la coccidiosis se redujo moderadamente, y mejoró los parámetros corporales evaluados así como la eficiencia de producción de las aves (60). Esto puede deberse a que muchos autores que han empleado aceites esenciales tanto como aditivos nutricionales como alternativa terapéutica antimicrobiana, siguieron que, para obtener los mismos resultados, en los ensayos in vivo se deben emplear concentraciones mayores que las empleadas para los ensayos in vitro, ya que en este último hay mayor disponibilidad de nutrientes y un mecanismo mucho más complejo para procesar los componentes del aceite esencial(61).

Por otra parte, El-Hack y colaboradores en 2020 realizaron una revisión bibliográfica asociada a los efectos del aceite de canela al usarlo como aditivo alimenticio en la industria avícola, principalmente en el rendimiento de las aves, las características de la canal, la calidad de la carne, el impacto hipocolesterolémico, la actividad antioxidante, la inmunidad y los aspectos microbiológicos de las aves; asimismo, Ali *et al* en 2021 en su revisión bibliográfica de este apasionante tema del aceite de la canela y sus múltiples efectos benéficos, resaltan y estudian el potencial de la canela como aditivo alimentario natural (fitoterapéutico) en la salud intestinal general, la digestibilidad de los nutrientes, el perfil bioquímico de la sangre, la expresión génica, el microbiota intestinal y la respuesta inmunitaria al verse afectado por enfermedades o por factores de estrés medioambiental. Ambos grupos de investigadores concuerdan en múltiples puntos con respecto a los beneficios, el efecto y la forma de actuar del efecto de la canela sobre las aves, mencionan que este aceite esencial actúa directamente en el aumento del peso del ave pues contribuye en las tasas de alimentación y de conversión alimentaria, la disminución de los niveles de colesterol de la misma, aumenta la producción de enzimas antioxidantes (contribuyendo así también a la calidad de la carne). Se reportan diversos estudios en los cuales se confirma la actividad antibacteriana del aceite contra agentes como *Parahemolyticus*, *Staphylococcus epidermis*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, esto puede deberse a la composición química del aceite dentro de la cual cabe resaltar la presencia de cinamaldehído, eugenol, borneol, cineol y alcohol benzyl; se reporta que el suplementar la dieta de las aves con dosis de 250- 500mg/kg de peso, 0.5 a 2 g/kg de peso, de aceite de canela aumento el peso final de los mismos, promovió la ganancia de peso en periodos de hasta 35 días y aumento también la tasa de conversión alimentaria, esto debido a que mejora el sistema inmune, regula la flora intestinal, y aumenta la producción de enzimas digestivas. De igual forma, al evaluar parámetros sanguíneos, se reportan efectos benéficos en la disminución de los niveles de colesterol y azúcar, y de la actividad de la aminotransferasa, esto puede deberse a que los componentes del aceite esencial previenen la destrucción de la membrana celular ya sea por producción de ROS o por estrés oxidativo. Por otra parte, diversos estudios confirman el efecto antimicrobiano y biopreservante del aceite de canela sobre el tracto gastrointestinal de los pollos, puesto que reducen e incluso eliminan la población de bacterias patógenas (*E. coli*, *Salmonella spp*, *Campylobacter spp*, *Klebsiella spp*) y aumenta la de

microorganismos benéficos (*Lactobacillus*) al suplementar concentraciones de 300-500 mg de aceite /kg de dieta o específicamente de 500-970g de cinamaldehído/kg de dieta. Todos estos datos y estudios confirman aun mas el potencial terapéutico como alternativa a los antibióticos que presenta el aceite de canela, esto al emplearlo como suplemento dietario para la industria avícola a la cual se le estaría otorgando un estándar espacial en caunto a seguridad alimentaria y sanidad animal (62,63)

Sin embargo, es necesario realizar más estudios empleando el aceite esencial de canela para determinar si existe toxicidad crónica, mutagenicidad o genotoxicidad, e incluso algún efecto carcinogénico en las células de aquellos animales a los cuales se les desee suplementar como aditivo nutricional o como alternativa terapéutica, principalmente frente a las enfermedades que afectan la creciente industria avícola mencionadas anteriormente.

## 7 Conclusiones

A través del presente trabajo de grado se pudo concluir en primera estancia que la prevalencia de *Salmonella* no-móvil en las muestras evaluadas entre enero de 2019 y abril de 2021 fue del 48%, demostrando esto tanto el aumento de este agente en la industria avícola como la importancia del uso o formulación de un tratamiento efectivo y a tiempo para contrarrestar los signos y síntomas, causantes de las pérdidas económicas observadas por las altas tasas de mortalidad. Asociado a esto, se observó que existe una relación entre las *Salmonella* no móviles y las aves pertenecientes a la línea de explotación de postura con un 89.53 % de prevalencia de este agente en esta línea comercial, lo cual puede correlacionarse a la afinidad de esta *Salmonella* con ciertos órganos, tales como el hígado y el ovario.

Se pudo concluir de igual forma que al rededor del 97% de los aislados obtenidos de *Salmonella* no móviles presentaban resistencia a penicilina; sin embargo, los 5 escogidos para el desarrollo del presente trabajo de grado mostraron a su vez perfiles de resistencia a otros antibióticos tales como Penicilina, Florfenicol, Fosfomisina, Amoxicilina y Gentamicina, lo que confirma la creciente ola de las llamadas bacterias multirresistentes. Sin embargo, se observó que el aceite esencial de canela presento un importante efecto antimicrobiano, con un promedio de halo de inhibición de 25 mm frente a los 11 aceites restantes también evaluados; asimismo, la CMI obtenida fue de 0.08 %, la CMB de 0.11 %, la CMH genero un resultado que está por encima 7.5% y el IT fue de 96.03. Todos estos datos confirman que el aceite esencial de canela es un candidato ideal para su uso como tratamiento o alternativa terapéutica frente a las enfermedades causadas por *Salmonella* no móvil, específicamente, en las aves; es necesario realizar estudios posteriores para evaluarlo como suplemento dietario y si presenta algún efecto in vivo en líneas celular de aves.

## Anexo A

Numero	Codigo	Lugar geografico	Fecha	Explotacion	Tipo de muestra	Patogeno	Movilidad	Penicilina 10 mcg	Amoxicilina 10 mcg	Ciprofloxacina 5 mcg	Florfenicol 30 mcg	Norfloxacina 10 mcg	Enrofloxacina 5 mcg	Fosfomicina 50 mcg	Trimetoprin sulfa 1/25	Tetraciclina 30 mcg	Gentamicina 10 mcg
1	7689	NA	2019-01-10	postura	HIGADO	Salmonella spp	NO	R	S	S			S	S	S	S	
2	7796	GIRON	2019-01-23	postura	H-OV-T-MO	Salmonella spp	NO	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
3	7875	EDEN	2019-02-01	engorde	TRAQUEA	Salmonella spp	NO	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S
4	7916	FABIPOLO	2019-02-04	engorde	BAZO-HIGADO	Salmonella spp	NO	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5	7956	NA	2019-02-07	levante	B-H-T	Salmonella spp	NO	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6	8013	NA	2019-02-12	postura	B-H-O-T	Salmonella spp	NO	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
7	8025	AV RR DEL ORIENTE	2019-02-14	postura	OVARIO	Salmonella spp	NO	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8	190034	NA	2019-02-19	postura	H-O-SN	Salmonella spp	NO	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
9	190027	NA	2019-02-20	postura	OV-SN	Salmonella spp	NO	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
10	190081	NA	2019-02-26	postura	B-H-O-T-MO	Salmonella spp	NO	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
11	190096	AMERIVET	2019-02-26	postura	B-H-O-T-MO	Salmonella spp	NO	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
12	190235	AV SAN CARLOS	2019-03-07	postura	H-OV-SN-T	Salmonella spp	NO	R	S	S	S	S	S	S	S	S	
13	190294	NA	2019-03-12	postura	OVARIO	Salmonella spp	NO	R	S	S	S	S	S	R	S	S	
14	190303	NA	2019-03-12	postura	H-OV-B-T	Salmonella spp	NO	R	S	S	S	S	S	R	S	S	
15	190370	NA	2019-03-18	levante	H-OV-SN-T	Salmonella spp	NO	R	S	S	S	S	S	S	S	S	

## Referencias

1. Tollefson L, Miller MA. Antibiotic Use in Food Animals: Controlling the Human Health Impact [Internet]. Vol. 83, journal of aoac international. 2000. Available from: <http://www.fda.gov/cvm>
2. comportamiento del credito para el sector avicola: relacion productores de FENAVI-FINAGRO [Internet]. [cited 2020 Oct 22]. Available from: <https://www.finagro.com.co/sites/default/files/informe-fenavi-v2.pdf>
3. United States Department of Agriculture Foreign Agricultural Service Livestock and Poultry: World Markets and Trade Philippines Pork Imports Expected to Reach Record Levels. 2021;
4. Producción | Producción y productos avícolas | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [Internet]. [cited 2021 Sep 28]. Available from: <http://www.fao.org/poultry-production-products/production/es/>
5. Consumo Per cápita Mundo - Pollo - FENAVI - Federación Nacional de Avicultores de Colombia [Internet]. [cited 2021 Aug 22]. Available from: <https://fenavi.org/estadisticas/consumo-per-capita-mundo-pollo/>
6. RUIZ B JDSMC and UC. Susceptibilidad antimicrobiana in vitro de cepas de Salmonella spp. en granjas de ponedoras comerciales del departamento de Antioquia [Internet]. 2006 [cited 2020 Oct 22]. p. 297–305. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0120-06902006000300006&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0120-06902006000300006&lng=en&nrm=iso)
7. Marshall BM, Levy SB. Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health. Clin Microbiol Rev [Internet]. 2011 Oct [cited 2021 Sep 30];24(4):718. Available from: <http://pmc/articles/PMC3194830/>
8. Penha RAC, Ferreira JC, Kanashiro AMI, Darini AL da C, Berchieri A. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* Gallinarum and *Salmonella* Pullorum isolated from ill poultry in Brazil. Ciência Rural [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2021 Aug 12];46(3):513–8. Available from: <http://www.scielo.br/j/cr/a/LMcQJf3J63wzvDVmc4cn3wn/?lang=en>
9. Lee YJ, Kim KS, Kim JH, Tak RB. Salmonella gallinarum gyrA mutations associated with fluoroquinolone resistance. <http://dx.doi.org/10.1080/0301945042000195759> [Internet]. 2010 Apr [cited 2021 Aug 12];33(2):251–7. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0301945042000195759>
10. Emilio Argote-vega F, Jimena Suarez-montenegro Z, Elizabeth Tobar-delgado M, Angel Perez-alvarez J, Mauricio Hurtado-benavides A, Delgado-ospina J. Evaluation of the inability capacity of essential oils in Staphylococcus aureus and Escherichia coli Capacidade de avaliação inibitório de óleos essenciais em Staphylococcus aureus e Escherichia coli.
11. WT L, EJ V, SA B. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. Crit Rev Microbiol [Internet]. 2014 Feb [cited 2021 Aug 22];40(1):76–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23445470/>
12. Carlos Adelantado Faura. la salmonella, de actualidad desde siempre - Google Libros [Internet]. [cited 2020 Oct 22]. Available from: [https://books.google.com.co/books?id=Uor\\_5EEcboIC&printsec=frontcover&dq=salmonella&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjqlPutjsnsAhVLw1kKHRtoBacQ6AEwAHoECAAQAg#v=onepage&q=salmonella&f=false](https://books.google.com.co/books?id=Uor_5EEcboIC&printsec=frontcover&dq=salmonella&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjqlPutjsnsAhVLw1kKHRtoBacQ6AEwAHoECAAQAg#v=onepage&q=salmonella&f=false)
13. Yoshikawa TT, Herbert P, Oill P-LA, Yoshi-Kawa TT, Guze LB, Yoshikawa T. Specialty Conference salmonellosis.
14. Flores Aguilar LE. caracterización fenotípica y genotípica de estirpes de salmonella choleraesuis aislada de ambientes marinos [Internet]. [cited 2020 Oct 22]. Available from: [https://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/Tesis/Basic/flores\\_al/Antec.pdf](https://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/Tesis/Basic/flores_al/Antec.pdf)
15. Velasquez CG, MacKlin KS, Kumar S, Bailey M, Ebner PE, Oliver HF, et al. Prevalence and

- antimicrobial resistance patterns of Salmonella isolated from poultry farms in southeastern United States. *Poult Sci.* 2018 Jun 1;97(6):2144–52.
16. Grimont PAD, Weill F-X. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella antigenic formulae of the salmonella serovars 2007 9th edition.
  17. Parra M, Durango J, Mattar S. microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por Salmonella. *Rev MVZ Córdoba* [Internet]. 2002 Jul 1 [cited 2020 Nov 17];7(2):187–200. Available from: <https://revistamvz.unicordoba.edu.co/article/view/521>
  18. Pulido Landinez M. conceptos basicos para el control de salmonella en la avicultura colombiana. 2018.
  19. Arora D, Kumar S, Jindal N, Narang G, Kapoor PK, Mahajan NK. Prevalence and epidemiology of Salmonella enterica serovar Gallinarum from poultry in some parts of Haryana, India. *Vet World* [Internet]. 2015 [cited 2021 Aug 24];8(11):1300. Available from: </pmc/articles/PMC4774741/>
  20. Revisión del desarrollo avícola. [cited 2021 Nov 15]; Available from: [www.fao.org/publications](http://www.fao.org/publications)
  21. Industria Avícola - April 2020 - Fuerte crecimiento de la avicultura latinoamericana en 2019 [Internet]. [cited 2020 Oct 22]. Available from: <https://www.industriaavicola-digital.com/industriaavicola/april2020/MobilePagedArticle.action?articleId=1573912#articleId1573912>
  22. Información estadística - FENAVI - Federación Nacional de Avicultores de Colombia [Internet]. Estadísticas. [cited 2020 Oct 22]. Available from: <https://fenavi.org/informacion-estadistica/>
  23. UERIA M de la PSIN de S, Perfil. Perfil de riesgo Salmonella spp. (no tifoideas) en pollo entero y en piezas. 2011.
  24. ICA. Resolución 3714 del 2015. 2015.
  25. asistente P, asociado P, Andrés Jaimes-Olaya J, Patricia Gómez Ramírez A, Claudia Marcela Álvarez Espejo D, Soler Tovar D, et al. Las enfermedades infecciosas y su importancia en el sector avícola.
  26. Mdegela RH, Yongolo MGS, Minga UM, Olsen JE. Molecular epidemiology of Salmonella gallinarum in chickens in Tanzania. *Avian Pathol* [Internet]. 2000 [cited 2021 Nov 15];29(5):457–63. Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=cavp20>
  27. Rubio-Ortega A, Travieso-Novelles M del C, Riverón-Alemán Y, Martínez-Vasallo A, Peña-Rodríguez J, Espinosa-Castaño I, et al. Actividad antibacteriana de aceites esenciales de plantas cultivadas en Cuba sobre cepas de Salmonella enterica. *Rev Salud Anim* [Internet]. 2018 [cited 2020 Oct 23];40(3). Available from: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0253-570X2018000300004&script=sci\\_arttext&tlng=en](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0253-570X2018000300004&script=sci_arttext&tlng=en)
  28. manual terrestre de la OIE [Internet]. pulorosis y tifosis aviar. 2018 [cited 2021 Aug 24]. p. 2. Available from: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/3.03.11\\_Pulorosis\\_tifosis\\_aviar.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.03.11_Pulorosis_tifosis_aviar.pdf)
  29. M B, M C-R, P R. [Salmonella enterica: a review or the trilogy agent, host and environment and its importance in Chile]. *Rev Chilena Infectol* [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2021 Sep 30];33(5):547–57. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28112339/>
  30. Quesada A, Reginatto GA, Ruiz Español A, Colantonio LD, Burrone MS. Resistencia antimicrobiana de Salmonella spp aislada de alimentos de origen animal para consumo humano. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* [Internet]. 2016 Feb 12 [cited 2020 Oct 23];33(1):32. Available from: <https://rpmesp.ins.gob.pe/index.php/rpmesp/article/view/1899>
  31. AE K, JR A, MJ S, TA M, JJ K. Human multidrug-resistant Salmonella Newport infections, Wisconsin, 2003–2005. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2007 [cited 2021 Sep 30];13(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18217570/>
  32. Castro-Vargas RE, Herrera-Sánchez MP, Rodríguez-Hernández R, Rondón-Barragán IS. Antibiotic resistance in Salmonella spp. isolated from poultry: A global overview. *Vet World* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2021 Sep 30];13(10):2070. Available from: </pmc/articles/PMC7704309/>

33. Levings RS, Lightfoot D, Partridge SR, Hall RM, Djordjevic SP. The genomic island SGI1, containing the multiple antibiotic resistance region of *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104 or variants of it, is widely distributed in other *S. enterica* serovars. *J Bacteriol* [Internet]. 2005 Jul [cited 2020 Oct 22];187(13):4401–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15968049/>
34. Silva C, Wiesner M, Calva E. The Importance of Mobile Genetic Elements in the Evolution of *Salmonella*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance and Host Adaptation. *Salmonella - A Divers Superbug* [Internet]. 2012 Jan 20 [cited 2021 Sep 30]; Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/26459>
35. I R, MR R, B G, KL H. Potential international spread of multidrug-resistant invasive *Salmonella enterica* serovar enteritidis. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2012 Jul [cited 2021 Sep 30];18(7):1173–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22709653/>
36. JM M, CA A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2016 May [cited 2021 Sep 30];4(2):464–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27227291/>
37. S C, P P, M H, JL C, G I. Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? *J Med Microbiol* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2021 Sep 30];66(5):551–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28504927/>
38. Ugboko H, Nandita D, De N. Mechanisms of Antibiotic resistance in *Salmonella typhi* Evaluation of Empirical Functions and Fate of Isomaltose View project Drug Discovery From Indigenous medicinal Plants View project Mechanisms of Antibiotic resistance in *Salmonella typhi*. *Artic Int J Curr Microbiol Appl Sci* [Internet]. 2014 [cited 2021 Sep 30];3(12):461–76. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/321491731>
39. YY L, Y W, TR W, LX Y, R Z, J S, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2021 Sep 30];16(2):161–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26603172/>
40. Sakkas H, Papadopoulou C. Antimicrobial activity of basil, oregano, and thyme essential oils [Internet]. Vol. 27, *Journal of Microbiology and Biotechnology*. Korean Society for Microbiology and Biotechnology; 2017 [cited 2021 May 25]. p. 429–38. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27994215/>
41. Wińska K, Mączka W, Łyczko J, Grabarczyk M, Czubaszek A, Szumny A. Essential Oils as Antimicrobial Agents—Myth or Real Alternative? *Molecules* [Internet]. 2019 Jun 5 [cited 2021 Oct 4];24(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3306612361/>
42. Martínez A. universidad de antioquia aceites esenciales. 2001.
43. *Anales de la Facultad de Medicina*. 2001 [cited 2020 Oct 23]; Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=37962208>
44. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils - A review [Internet]. Vol. 46, *Food and Chemical Toxicology*. Food Chem Toxicol; 2008 [cited 2021 May 25]. p. 446–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17996351/>
45. Dan Zekaria laboratorios Calier. Los aceites esenciales una alternativa a los antimicrobianos [Internet]. [cited 2021 Oct 6]. Available from: [https://www.wpsa-aeca.es/aeca\\_imgs\\_docs/wpsa1182855355a.pdf](https://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/wpsa1182855355a.pdf)
46. Montero-Recalde M, Jessica Revelo I, Avilés-Esquivel D, Edgar Valle V, Guevara-Freire D. Antimicrobial effect of cinnamon essential oil (*Cinnamomum zeylanicum*) on salmonella strains [Internet]. Vol. 28, *Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2017 [cited 2020 Oct 23]. p. 987–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v28i4.13890>
47. Stephen J. Cavalieri ... [et al.]; editora coordinadora MBC. Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana [Internet]. 2005 [cited 2022 Apr 3]. Available from: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2005/susceptibilidad-antimicrobiana-manual-pruebas-2005.pdf>

48. Evaluación de la actividad antibacteriana y citotóxica de péptidos derivados de la secuencia Pfrif (321-340): ryrkkkmmkalkyikllke [Internet]. [cited 2022 Apr 3]. Available from: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/76529>
49. CLSI: Methods for dilution antimicrobial susceptibility... - Google Académico [Internet]. [cited 2022 Apr 3]. Available from: [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=Methods+for+Dilution+Antimicrobial+Susceptibility+Tests+for+Bacteria+That+Grow+Aerobically&author=CLSI&publication\\_year=2012](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Methods+for+Dilution+Antimicrobial+Susceptibility+Tests+for+Bacteria+That+Grow+Aerobically&author=CLSI&publication_year=2012)
50. Joshi S, Bisht GS, Rawat DS, Kumar A, Kumar R, Maiti S, et al. Interaction studies of novel cell selective antimicrobial peptides with model membranes and E. coli ATCC 11775. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2010 Oct [cited 2022 Apr 3];1798(10):1864–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20599694/>
51. Martha E, Jiménez G. Evaluación de la actividad antimicrobiana de péptidos cortos derivados del péptido 23688 sobre algunos microorganismos de importancia clínica.
52. López-Mata MA, Valbuena-Gregorio E, Quihui-Cota L, Morales-Figueroa GG, Ruiz-Cruz S, Campos-García JC, et al. Efecto de Microemulsiones de Aceites Esenciales Sobre el Eritrocito Humano y Bacterias Patógenas Effect of Microemulsions of Essential Oils on Human Erythrocyte and Pathogens Bacteria.
53. Hammer KA, Carson CF, Riley T V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol* [Internet]. 1999 Jun 1 [cited 2022 May 3];86(6):985–90. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2672.1999.00780.x>
54. Vasconcelos NG, Croda J, Simionatto S. Antibacterial mechanisms of cinnamon and its constituents: A review. *Microb Pathog*. 2018 Jul 1;120:198–203.
55. Montero-Recalde M, Revelo J, Avilés-Esquivel D, Valle E, Guevara-Freire D. Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial de Canela (*Cinnamomum zeylanicum*) sobre Cepas de Salmonella Antimicrobial effect of cinnamon essential oil (*cinnamomum zeylanicum*) on salmonella strains. *Rev Inv Vet Perú* [Internet]. 2017 [cited 2022 May 3];28(4):987–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v28i4.13890>
56. Seyedtaghiya MH, Fasaei BN, Peighambari SM. Antimicrobial and antibiofilm effects of satureja hortensis essential oil against escherichia coli and salmonella isolated from poultry. *Iran J Microbiol* [Internet]. 2021 Feb 10 [cited 2021 May 2];13(1):74–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33889365/>
57. Gende LB, Principal J, Maggi MD, Palacios SM, Fritz R, Eguaras MJ. Extracto de Melia azedarach y aceites esenciales de Cinnamomun zeylanicum, Mentha piperita y Lavandula officinalis como control de Paenibacillus larvae. *Zootec Trop*. 2008;26(2):151–6.
58. Slobodníková L, Fialová S, Rendeková K, Kováč J, Mučaji P. Antibiofilm Activity of Plant Polyphenols. *Molecules* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2022 May 3];21(12). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27983597/>
59. Goliomytis M, Tsourekis D, Simitzis PE, Charismiadou MA, Hager-Theodorides AL, Deligeorgis SG. The effects of quercetin dietary supplementation on broiler growth performance, meat quality, and oxidative stability. *Poult Sci*. 2014 Aug 1;93(8):1957–62.
60. Qaid MM, Al-Mufarrej SI, Azzam MM, Al-Garadi MA. Anticoccidial effectivity of a traditional medicinal plant, *Cinnamomum verum*, in broiler chickens infected with *Eimeria tenella*. *Poult Sci* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2022 Jun 27];100(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3481149/>
61. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. [cited 2022 May 3]; Available from: [www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro](https://www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro)
62. Abd El-Hack ME, Alagawany M, Abdel-Moneim AME, Mohammed NG, Khafaga AF, Bin-Jumah M, et al. Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) Oil as a Potential Alternative to Antibiotics in Poultry. *Antibiot* 2020, Vol 9, Page 210 [Internet]. 2020 Apr 26 [cited 2022 Jun 27];9(5):210. Available from: <https://www.mdpi.com/2079-6382/9/5/210/htm>
63. Ali A, Ponnampalam EN, Pushpakumara G, Cottrell JJ, Suleria HAR, Dunshea FR. Cinnamon: A Natural Feed Additive for Poultry Health and Production—A Review. *Anim* 2021, Vol 11, Page

2026 [Internet]. 2021 Jul 7 [cited 2022 Jun 27];11(7):2026. Available from:  
<https://www.mdpi.com/2076-2615/11/7/2026/htm>