

Instituto Tecnológico de Sonora

Presente.

El que suscribe José Alberto Chávez Partida, por medio del presente manifiesto bajo protesta de decir verdad, que soy autor y titular de los derechos de propiedad intelectual tanto morales como patrimoniales, sobre la obra titulada: "Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales en contra de *Salmonella enteritidis* aislada de cerdos de una granja del sur de Sonora", en lo sucesivo "LA OBRA", misma que constituye el trabajo de tesis que desarrolle para obtener el grado de Médico Veterinario Zootecnista en ésta casa de estudios, y en tal carácter autorizo al Instituto Tecnológico de Sonora, en adelante "EL INSTITUTO", para que efectúe la divulgación, publicación, comunicación pública, distribución y reproducción, así como la digitalización de la misma, con fines académicos o propios del objeto del Instituto, es decir, sin fines de lucro, por lo que la presente autorización la extiendo de forma gratuita.

Para efectos de lo anterior, EL INSTITUTO deberá reconocer en todo momento mi autoría y otorgarme el crédito correspondiente en todas las actividades mencionadas anteriormente en LA OBRA.

De igual forma, libero de toda responsabilidad al EL INSTITUTO por cualquier demanda o reclamación que se llegase a formular por cualquier persona, física o moral, que se considere con derechos de autor sobre los resultados derivados de la presente autorización, o por cualquier violación a los derechos de autor y propiedad intelectual que cometa el suscrito frente a terceros con motivo de la presente autorización y del contenido de la misma obra.

Alberto Chávez Partida

José Alberto Chávez Partida





INSTITUTO TECNOLÓGICO DE SONORA
Educar para Trascender

“Actividad antimicrobiana de los aceites
esenciales en contra de *Salmonella*
enteritidis aislada de cerdos de una
granja del sur de Sonora”

Tesis

Que para obtener el título de
Médico Veterinario Zootecnista

Presenta

José Alberto Chávez Partida

Ciudad, Sonora

Abril 2013

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

Este trabajo está dedicado desde lo más profundo de mi corazón a quienes no por meses si no por años, gracias a su gran esfuerzo, apoyo, dedicación y de la manera más desinteresada cambiaron sus metas por mis metas y sus sueños por los míos. Con un solo objetivo, el de hacer de mí una persona preparada y una persona de bien gracias a mis padres: **ROSARIO CHAVEZ GIL y DOLORES PARTIDA VILLEGAS.**

Agradezco a mis hermanos **Marco Antonio Chávez Partida y Andrés Rosario Chávez Partida** por apoyarme en todo y dedicarme su tiempo a ayudarme. En general gracias a toda mi familia.

Agradezco al doctor **Javier Rolando Reyna Granados** por todo su apoyo y por todos sus consejos ya que sin el este trabajo no fuera sido posible, de igual manera hago mención especial para mis dos revisores el doctor **Javier Arturo Munguía Xochihua** y la doctora **Isabel Angeles De la Llave** gracias por sus revisiones y por sus críticas constructivas para llevar a cabo de la mejor manera este trabajo.

De igual manera agradezco al laboratorio de Diagnósticos Patológicos (DIPA), al doctor **Francisco López Morales** y a la doctora **Concepción Díaz Rayo** por permitirme la entrada y por proporcionarme los medios y la preparación de otros los cuales fueron primordiales para la realización de este trabajo. También agradezco a las personas que colaboran aquí, **Luz Elena Gutiérrez Osorio** por sus consejos y por su apoyo en los antibiogramas, a **Francisco Román (Chitopan Reybags)** por ayudarme a aprender a estriar en las cajas de petri, a **Sadrac Acosta Bauza, Arturo Bedoy y Ángel Aguiar Fafutis** por sus consejos hacia mi trabajo, a **Marcela Campos** por su apoyo para la preparación de el

material para mis pruebas, al **Hermosillo** por sus consejos, a **Ampelia** y **Fernando** por brindarme su apoyo y su amistad.

Además agradezco a todos mis compañeros por preocuparse y por apoyarme con el trabajo, a Efraín (chapo), Luis Icedo, Isabel (chabela), Carlos, Ricardo, Alberto (chispa), Elisa, Diana, Ileana, Virginia, Anahi, Hugo, Fausto, Bruno, Cosme, Diego (ray), Cesar (chicovaca), Ramiro, Abel (pelón), Ignacio (Nacho), Osiel, Juanito, y a todos los de la generación 2007-2012. A mis amigos del pueblo que siempre estuvieron al pendiente Omar Medina, Luis Meza, Marco Meza, Luis Miguel Carrillo, Eduardo Maldonado, José Luis Sandoval, Manuel Muñoz, Lindorfe Morales y a todos en general gracias.

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS.....	v
LISTA DE GRÁFICAS	vi
RESUMEN	vii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 antimicrobianos naturales	2
1.2 Planteamiento del problema	3
1.3 Objetivo	3
1.4 Justificación	4
1.5 Limitaciones del estudio	4
1.6 Hipotesis	4
II. MARCO DE INVESTIGACIÓN	5
2.1 Aceites esenciales	5
2.2 <i>Salmonella enteritidis</i>	6
2.2.1 Características	6
2.2.2 Localización	7
2.2.3 Patogenia.....	7
2.2.4 Virulencia	7
2.2.5 Signos clínicos	8
2.2.6 Lesiones macroscópicas.....	8
2.2.7 Lesiones microscópicas	8
2.2.8 Diagnóstico	9
2.2.9 Prevención y control.....	9
2.3 Control para <i>Salmonella</i>	10
2.4 Resistencia microbiana.....	11
2.5 Resistencia de <i>Salmonella</i>	12

2.6 Extractos de Orégano y Carvacrol como control opcional	13
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
3.1 Localización del sitio experimental	17
3.2 Clasificación del estudio	17
3.3 Material	17
3.3.1 Material biológico	17
3.3.2 Material para aislamiento	18
3.3.3 Material para pruebas bioquímicas y complementarias	18
3.3.4 Material para antibiograma	19
3.3.2 Material para diluciones	19
3.4 Métodos	20
3.4.1 Aislamiento de la bacteria del órgano	20
3.4.2 Antibiograma.....	20
3.4.3 Diluciones y sembrado	21
3.4.3.1 Dilución del aceite en buffer fosfato salino (PBS)	21
3.4.3.2 Dilución de la bacteria en agua peptonada (BPW)	21
3.4.3.3 Diluciones del aceite a .1%,.2%,.3% y grupo control	21
3.4.3.4 Sembrado	22
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
4.1 Resultados	23
4.2 Discusión de resultados de antibiogramas.....	24
4.3 Discusión de Resultados de los aceites de Orégano y Carvacrol	27
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	29
5.1 Conclusiones.....	29
5.2 Recomendaciones.....	30
VI. BIBLIOGRAFÍA	30

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. Panel de antibióticos utilizados en el antibiograma contra <i>S. enteritidis</i> aislada de cerdos	24
--	----

LISTA DE GRAFICAS

Grafica 1. Actividad antimicrobiana del aceite de Orégano en <i>Salmonella enteritidis</i> aislada de cerdos.....	25
Grafica 2. Actividad antimicrobiana del aceite de Carvacrol en <i>Salmonella enteritidis</i> aislada de cerdos.....	26

RESUMEN

José Alberto Chávez Partida. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales en contra de *Salmonella enteritidis* aislada de cerdos de una granja del sur de Sonora. Asesor: Dr. Javier Rolando Reyna Granados

La resistencia bacteriana es un fenómeno creciente caracterizado por la refractariedad que han adquirido algunos microorganismos a los antibióticos de concentración aumentada debido al mal uso de estos. El objetivo fue observar el efecto antimicrobiano que tienen los aceites esenciales de Orégano y Carvacrol contra una bacteria resistente a antibióticos aislada de cerdos en el sur de Sonora. Se utilizó una cepa de *Salmonella enteritidis* resistente a 5 antibióticos (Amoxicilina, Ampicilina, Enrofloxacin, Gentamicina y Lincomicina) y con sensibilidad intermedia a Cefotaxima, Ceftiofur y Ciprofloxacina. Se realizaron cultivos de *S. enteritidis* de (10^8 UFC/ml) en agua peptonada (BPW), los aceites de Orégano y carvacrol se añadieron a diferentes concentraciones de 0.1%, 0.2%, y 0.3%, en solución buferada (PBS), todas las concentraciones de los aceites se le añadieron 100 µl del cultivo de (10^8 UFC/ml) y fueron mezclados y un grupo control (PBS y BPW) con 100 µl del cultivo de (10^8 UFC/ml). Se incubaron en agar tripticosa soya (TSA) a 0 minutos, 1, 3, 5 y 24 horas. a 37°C, y se realizó su enumeración. El aceite de oregano presentó gran actividad antimicrobiana contra la enterobacteria ya que mostró una reducción bacteriana de >2.5 Log CFU/ml inmediatamente (0 min) a una concentración de 0.2% y 0.3%, en la de 0.1% fue reduciéndose gradualmente hasta las 5 horas. En las concentraciones de 0.2% y 0.3% se presentó completa reducción a la hora de aplicación. Finalmente se pudo observar que todas presentaron completa reducción bacteriana a las 24 horas. Por otro lado, el aceite de Carvacrol presentó una gran actividad antimicrobiana mostro una reducción bacteriana > 1.5 log CFU/ml a una concentración de 0.1%, y una reducción >2.5 log CFU/ml al 0.2%; esto en un tiempo menor a un minuto. Al 0.1% se fue reduciendo gradualmente hasta las 3 horas y al 0.2% se redujo por completo en una hora, por otro lado en la concentración de 0.3% hubo una reducción total al cero minuto de su aplicación, y finalmente se pudo observar que todas las concentraciones presentaron completa

reducción a las 5 horas de su aplicación. Estos resultados muestran el efecto antimicrobiano del aceite de Orégano y Carvacrol contra *Salmonella enteritidis* resistente a antibióticos.

I. INTRODUCCIÓN

Las bacterias ocasionan pérdidas en todas las etapas de la producción porcina, la principal es la económica debido al incremento en la tasa mortalidad, retraso en el crecimiento de los cerdos, pobre conversión alimenticia al igual que los costos por medicación. El impacto que se tienen en la producción porcina por pérdidas y retrasos es determinante para garantizar la sustentabilidad, así como también la cantidad y la calidad de los productos y subproductos que llegan al consumidor.

Desde hace 50 años en la industria de los alimentos medicados se han empleado en dosis subterapéuticas, con el fin de tener un mayor rendimiento en el peso y una mejor salud de los cerdos, esta actividad ha sido cuestionada en la actualidad por el creciente temor por una posible generación de genes resistentes en bacterias digestivas, para antibióticos usados en terapéutica humana, lo que causaría un riesgo para la salud pública

Recientemente se han suscitado un gran número de controversias en aspectos de salud pública con el uso de antibióticos como aditivo en los alimentos para animales. Entre los tópicos discutidos se encuentran: la distribución y destino corporal de las drogas empleadas en los alimentos, los periodos convenientes para el retiro de las drogas, la importancia de los residuos en los productos comestibles de origen animal, las posibilidades de resistencia microbiana.

El comité de la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos concluyó que en relación a su estudio, las condiciones actuales son que: "El empleo de antibióticos, especialmente en cantidades estimulantes del crecimiento y subterapéuticas, favorece la selección y el desarrollo de bacterias con resistencia a uno o múltiples antibióticos o que son portadoras del factor R, este que es un plásmido que confiere resistencia a varios antibióticos, además de ser promotor de la conjugación. La resistencia significa que los genes producen proteínas que degradan tales antibióticos de manera que las células que contienen el factor R se multiplican y forman colonias incluso en presencia de concentraciones de esos antibióticos que son letales para estirpes normales (sensibles).

Antimicrobianos naturales

Una gran variedad de antimicrobianos naturales han surgido a partir de microorganismos, plantas y animales, los aceites esenciales extraídos de plantas, hierbas y especies contienen un gran número de sustancias las cuales tienen la capacidad de inhibir el metabolismo de algunas bacterias, levaduras y mohos (Baltasar, 2003).

En 1989 Wilkins y Board reportan más de 1340 plantas como fuentes potenciales de antimicrobianos (Baltasar, 2003). Los compuestos fenolicos que se encuentran

presentes en los extractos o aceites esenciales de algunas hierbas y plantas son los que le proporcionan la actividad antimicrobiana (Rodríguez, 2011).

Los antimicrobianos pueden actuar por lo menos en tres maneras sobre el microorganismo.

- 1.- Interfieren en algunas funciones y procesos metabólicos esenciales
- 2.- Daños en la integridad de las membranas
- 3.- Inhiben la biosíntesis de la pared celular y ácidos nucleicos.

Cada uno de estos puntos son esenciales para el desarrollo celular, de tal modo que cuando uno de estos se ve afectado la velocidad de crecimiento se ve disminuida. Algunos agentes antimicrobianos pueden afectar a muchos tipos de microorganismos mientras que otros solo muestran un espectro inhibitorio, así como unos pueden ser microbicidas y otros solamente actúan como microbiostáticos (Rodríguez, 2011).

1.2 Planteamiento del problema

La resistencia bacteriana es un fenómeno creciente caracterizado por una refractariedad parcial o total de los microorganismos al efecto del antibiótico generado principalmente por el uso indiscriminado e irracional de éstos y no sólo por la presión evolutiva que se ejerce en el uso terapéutico.

1.3 Objetivos

Observar el efecto antimicrobiano que tienen los aceites esenciales de Orégano y Carvacrol, contra bacterias resistentes a antibióticos aisladas de cerdos en el sur de Sonora.

1.4 Justificación

Hay muchas bacterias resistentes debido al mal uso y acompañado de la inadecuada posología de los antibióticos, debido a ese problema muchas bacterias son llevadas a ofrecer resistencia en cualquiera de sus vías. Por lo anterior nace la necesidad de buscar compuestos naturales llámese extractos o aceites esenciales con actividad antimicrobiana efectiva contra aquellos patógenos resistentes. Esto podría beneficiar tanto a la salud animal como a la humana y brindaría información a médicos y farmacéuticos para futura prevención y control de las enfermedades bacterianas.

1.5 Limitaciones del estudio

Una de las limitantes de este trabajo sería la obtención de bacterias resistentes a antibióticos de concentración aumentada debido a que se tienen que hacer aislamientos y antibiogramas previos para seleccionar la cepa más idónea para el trabajo.

1.6 Hipótesis

Los aceites de Orégano y Carvacrol reducirán la carga bacteriana de *Salmonella enteritidis* hasta 1 logaritmo de unidades formadoras de colonias (UFC), en menos de 24 horas.

II. MARCO DE INVESTIGACIÓN

2.1 Aceites esenciales

Según Ramayoni (2007) en la octava edición de Farmacopea Francesa (1965) menciona que son productos de composición general muy complejas que contienen complejos volátiles que se encuentran en los vegetales que son modificados durante su preparación. Se calcula que existen aproximadamente unas 17500 especies aromáticas, se encuentran ampliamente distribuidas en unas 60 familias de plantas donde se encuentran las compuestas, labiadas, lauráceas, mirtáceas, pináceas, rosáceas, rutáceas, umbelíferas etc. La síntesis y almacenamiento de los aceites esenciales en las plantas generalmente están asociados a estructuras histológicamente especializadas las cuales están localizadas sobre o cerca de la superficie de la planta.

Los aceites esenciales se han utilizado para un sin número de propósitos durante miles de años. Los usos varían desde la fabricación de perfumes, para la

aromatización de bebidas así como para la conservación de alimentos (Hammer et al., 1999).

Varios tipos de extractos de plantas se han venido utilizando con el tiempo para agregar sabor y sazón a los alimentos y bebidas así como a medicinas populares. Numerosas investigaciones han evaluado y llevado a cabo en sus propiedades antimicrobianas. Los extractos de plantas, incluyendo sus aceites esenciales y esencias, se han reconocido que poseen propiedades antimicrobianas frente a bacterias, mohos y levaduras (Kim et al., 2011).

Dentro de los lugares en donde se realiza la función de estos componentes en la célula microbiana están incluidos: la membrana celular, la pared celular también actúan en el deterioro de enzimas metabólicas y en la síntesis de proteínas causando un flujo contrario de protones a través de la bacteria de igual manera actúan en algunos procesos del sistema genético así como aquellos que intervienen en procesos energéticos y síntesis de componentes estructurales (Lambert et al., 2001, Baltasar, 2003).

2.2 *Salmonella enteritidis*

Straw (2006) menciona que su primer aislamiento fue realizado en 1885 por Salmon y Smith y en 1928 Murray, Biester, Purwin y McNutt confirmaron en Iowa que era una de las causas de enteritis infecciosa.

2.2.1 Características

El género de salmonella se ubica dentro del orden enterobacteriales y la familia enterobacteriaceae y sus miembros son gram negativos, anaerobios facultativos, no encapsulados y no esporulados. Se desarrollan entre 8 y 45°C y a un pH de 4 a 8, no

sobrevive a temperaturas mayores a 70°C. La diferencia entre especies y sub especies se realiza tomando en cuenta sus propiedades bioquímicas (Flores, 2003).

2.2.2 Localización

Las salmonellas suelen localizarse en la mucosa del íleon, del ciego y del colon, así como en los ganglios linfáticos mesentéricos de los animales infectados, de igual manera puede producir infecciones latentes estando presente en la vesícula biliar. La enfermedad puede desarrollarse a partir de infecciones subclínicas y latentes de los animales afectados que están sometidos a estrés (Quinn y Markey, 2005).

2.2.3 Patogenia

La bacteria entra por vía oral, después de que el organismo llega al intestino, se presenta un periodo de multiplicación intraluminal posteriormente invadiendo la mucosa intestinal fundamentalmente a nivel del íleon, abarcando también ciego, colon y recto. Una vez estando en intestino invade la mucosa y la submucosa, atraviesa la pared intestinal y aproximadamente en 24 horas se puede identificar en los linfonodos mesentéricos y en 48 horas aproximadamente se puede encontrar en otros órganos (García, 1989).

2.2.4 Virulencia

La virulencia de salmonella se debe a su capacidad para invadir a las células del hospedador, replicarse en ellas y resistir tanto a la digestión de los fagocitos como la destrucción por los componentes plásmidos del complemento (Quinn et al. 2005).

En general la virulencia de la Salmonella patógena está promovida por la adherencia, invasión, citotoxicidad y resistencia a la muerte intracelular, trabajando a menudo en combinación para promover la enfermedad (Straw, 2000).

2.2.5 Signos clínicos

Tras la infección oral tiene un periodo de incubación de 24 a 48 horas hasta que aparece fiebre (40,5-42,0°C), pelo mate y pérdida de apetito (Plonait y Bickhard, 2001).

Los cerdos se observan deshidratados, con pelo hirsuto y bajo peso. El signo inicial es la diarrea acuosa amarillenta, grisácea o verduzca, en principio sin sangre y sin mucosidad, en casos severos puede haber fragmentos de mucosa y generalmente con olor fétido (Straw, 2000).

2.2.6 Lesiones macroscópicas

Las lesiones se limitan al tracto digestivo pudiéndose observar congestión de la mucosa gástrica, acompañado de contenido intestinal mucofibrinoso y en ocasiones hemorrágico, hay tiflitis, colitis catarral, úlceras en válvula ileocecal, proctitis ulcerativa, peritonitis fibrinosa, linfadenitis mesentérica y rectal (Garcia, 1989).

En casos subagudos las lesiones se presentan en el intestino grueso consistiendo en una enteritis difterioide y difusa con ulceración de las placas de Peyer o en folículos linfoides (Chamizo, 1995).

2.2.7 Lesiones microscópicas

Necrosis de los enterocitos de las criptas y de la superficie que varía de focal a difusa. En la lámina propia y en la submucosa se pueden encontrar un gran número de macrófagos y unas cantidades moderadas de linfocitos. Existen numerosos trombos que contienen fibrina, plaquetas y leucocitos (Straw, 2000).

Hipertrofia endotelial, necrosis de la pared de los vasos con gran infiltración de neutrofilos y gran número leucocitos mononucleares, también se han encontrado microgranulomas hepáticos, necrosis hemorrágica de la mucosa gástrica y colónica debido a la trombosis capilar (Garcia, 1989).

2.2.8 Diagnóstico

El diagnostico de Salmonella es confirmado por examen microbiológico e histológico. Por otro lado en los animales vivos, son preferibles grandes alícuotas (10g) de heces o raspados de amígdala faríngea antes que los isopados rectales para su aislamiento (Plonait y Bickhard, 2001).

Un historial de brotes previos en las mismas instalaciones, la edad de los animales afectados y el cuadro clínico puede sugerir a la presencia de un cuadro de salmonelosis, las lesiones encontradas en la necropsia contribuyen al diagnóstico (Quinn et al., 2008).

2.2.9 Prevención y control

Mantener las condiciones adecuadas en la granja por medio de lavados y desinfección periódicas de los edificios y el equipo así como una adecuada eliminación de excretas; evitar el exceso de humedad y la sobrepoblación; no agrupar animales de diferente edad, vigilar que el agua de bebida sea potable de origen confiable y que las condiciones para su almacenamiento y distribución sean higiénicas, el tipo de alimentación debe ser adecuado evitando el uso de antibióticos como promotores de crecimiento, debido a que esta medida provoca la resistencia bacteriana (Garcia, 1989).

El control de la salmonelosis se basa en reducir el riesgo de exposición a la infección mediante la aplicación de una estrategia de reposición interna, compra de animales

de procedencia conocida e impidiendo la contaminación de los piensos y el agua (Quinn et al., 2005).

2.3 Control para Salmonella

Estudios realizados en el estado de Zulia en Venezuela demostraron por el método de difusión en disco (Bauer & Kirby), que de 126 cepas de salmonella aislada de heces de cerdos asintomáticos, el 95% mostro sensibilidad frente a antibióticos como la Ceftriazona, Gentamicina, Apramicina y Colistina (Mejía et al., 2008).

En otro estudio realizado en Antioquia Colombia, se evaluó la susceptibilidad antimicrobiana de *salmonella spp.* Por el método de difuncion en disco (Bauer y kirby) y la Concentración Inhibitoria Minima (CIM), por el método de microdilución en el sistema automático de Vitek, por el primer método el 100% de las cepas evaluadas fueron sensibles a Amoxicilina y Cloranfenicol, por el método de CIM todas la cepas mostraron sensibilidad a la Ampicilina, Ampicilina/Sulbactam, Piperacilina/Tazobactam, Meropenem, Imipem, Cefalotina, Amikacina, Gentamicina, Ciprofloxacina, Trimetoprim/Sulfa (Ruiz et al., 2006).

En estudios realizados en la provincia de Carhuaz, Ancash, Perú se evaluó la sensibilidad de *Salmonella entérica* aislada de visceras de cuyos, por el método de difuncion en disco Bauer- Kirby, de las cuales el 100% de las cepas fue sensible a Enrofloxacina, Sulfatrimetoprim, Estreptomicina y Amoxicilina, el 97.5% al Cloranfenicol y Gentamicina, y el 92.5% a Fosfomicina, Los resultados indican que la sensibilidad de *S. enterica* a Enrofloxacina y Sulfatrimetoprim, así como al Cloranfenicol, Gentamicina y Fosfomicina, hacen de estos antibacterianos buenas alternativas para el tratamiento de la salmonelosis (Matsuura et al., 2010).

2.4 Resistencia microbiana

Se entiende por resistencia, el mecanismo mediante el cual una bacteria puede disminuir la acción de los agentes antimicrobianos (Fernandez et al., 2003).

Con el tiempo algunas bacterias han ido creando diferentes mecanismos para resistir la acción de los antibióticos. El primero de estos es por un sistema de expulsión activa del antimicrobiano, una especie de bomba expulsora que utilizan las bacterias para la excreción de productos residuales o tóxicos, con la que puede eliminar además muchos de estos agentes antibacterianos (fig. A). El segundo, consta en disminuir la permeabilidad de la pared bacteriana, con la pérdida o modificación de las Porinas que vienen siendo los canales de entrada a la bacteria (fig. B). El tercero se refiere a la producción de enzimas inactivantes de los antibióticos (fig.C). El cuarto consta en que algunos antibióticos ejercen su efecto sobre las bacterias fijándose a una proteína esencial para la supervivencia de la misma. La resistencia bacteriana se lleva a cabo cuando el germen modifica la proteína Diana, y cambia su función o produce enzimas distintas (fig.D) (Fernandez et al., 2003).

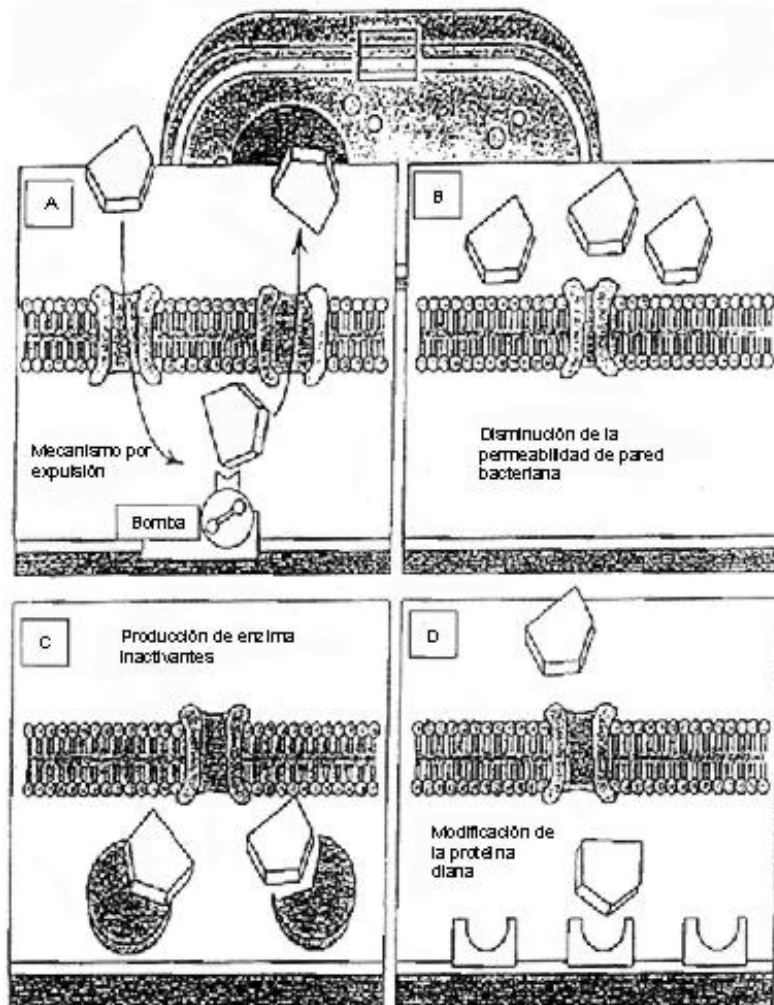


Figura 1 Mecanismos de resistencia (Fernandez et al., 2003).

2.5 Resistencia de salmonella

En estudios realizados en el laboratorio de Microbiología del Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos (INHA) en Cuba por el método de difusión (Bauer-kirby) demostraron que cepas de salmonella obtenidas de brotes, vigilancia y registro sanitario de alimentos mostraron una elevada resistencia contra Tetraciclina, Ampicilina, Carbencilina (Espino et al., 2010).

En otros estudios realizados en el rastro de la ciudad de México, se aislaron 87 cepas de *salmonella spp* de cerdo de las cuales el 25% mostraron resistencia al Cloranfenicol (30 µg), el 17.24% a la Ampicilina (10 µg) y el 62.07% fueron resistentes al Sulfametoxazol (60 µg) (Talavera et al., 2011).

Se realizaron pruebas para evaluar la resistencia de 44 muestras de *Salmonella typhi*, con los principales antimicrobianos utilizados en el tratamiento para la fiebre tifoidea. De las 44 muestras el 22.7% fueron resistentes por lo menos a un antimicrobiano y entre estas muestras se observó que la mayoría presentaron monoresistencia a la Nitrofurantoína o a la Tetraciclina (De oliveira et al., 2010).

Se realizaron investigaciones para probar la resistencia a 10 antimicrobianos en 122 cepas de salmonella aisladas de heces de bovino y linfonodos mesentéricos de bovino. La resistencia se comprobó utilizando el método de difusión en disco descrito por el National Committee For Clinical Laboratory Standard (NCCLS). La resistencia a Tetraciclina (57.4%) fue la más comúnmente detectada, seguida por la Estreptomina (22.1%) y Cloranfenicol (20.5%). Ninguna cepa exhibió resistencia a Cefalotina ni al Ácido nalidíxico (Alaníz et al., 1997).

2.6 Extractos de Orégano y Carvacrol como control opcional

Se realizó un estudio para analizar el aceite esencial de *Origanum compactum* y su capacidad antibacteriana *in vitro* contra un panel de cepas de referencia estándar usando los posos de difusión y los métodos de dilución en caldo. En medio sólido el aceite se encontró muy eficaz frente a todas las cepas excepto a *pseudomona* que mostró resistencia (Bouhdid et al., 2008).

En mas estudios realizados a extractos de plantas por el método de dilución en tubo se determino que el aceite de Orégano tiene una actividad antimicrobiana importante contra algunos agentes patógenos como son *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* serotipo O: 157:H7, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Lactobacillus plantarum*, *Aspergillus niger*, *Geotrichum*, y *Rhodotorula*. Con efecto inhibitorio de 70 a 80 mm aproximadamente a una concentración letal mínima (CLM) inhibitoria de 25 a 50 ppm (Elgayyar et al., 2001).

Los extractos esenciales como el Timol, Eugenol y Carvacrol componentes activos del Oregano, no solo poseen efecto inhibidor contra bacterias sino también contra hongos como se demostró al probar que estos aceites tienen un efecto inhibitorio contra *Aspergillus parasiticus*, incluso a concentraciones bajas de 150 ppm (Ramaswamy y Pillay, 2012).

Se demostró que los extractos de el Orégano mexicano (*Lippia berlandieri*) poseen propiedades antifúngicas evaluando sus efectos sobre el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* por medio de las fases de contacto y volátil y en términos de producción de biomasa. De igual manera fue probada su capacidad para desinfectar semillas de tomate infectadas con este mismo hongo en donde también mostro muy buenos resultados en una concentración 0.5% (Cueto et al., 2010).

Existen múltiples estudios sobre la actividad antimicrobiana de los extractos de diferentes tipos de orégano, donde se encontró que los aceites esenciales de las especies del genero *Origanum* presentan una gran actividad contra bacterias gram negativas como *Salmonella entérica* entre otras (Arcila et al., 2004).

Los aceites de hierba de Orégano a concentraciones 2.0% en pruebas de dilución en microcaldo son capaces de inhibir el crecimiento agentes patógenos como *Salmonella entérica* sub especie *entérica* serotipo *typhimurium* (Hammer et al., 1999).

Estudios realizados en la Universidad de Arizona afirman que se inoculó *Salmonella entérica* (106-7 unidades formadoras de colonia (UFC) / ml) en el apio y en las ostras y después fueron tratados con aceite de Cinamaldehído al 1% y Carvacrol 1% respectivamente. Los resultados fueron que el Carvacrol en el apio redujo la población de 1logaritmo (log) en el día 0 y 2,3 logaritmo en el día 3 respectivamente, en las ostras ambos antimicrobianos redujeron alrededor de 5 log en el día 3. En este mismo estudio se tomaron cultivos de *S. enterica* 105 unidades formadoras de colonia (UFC) / ml) los cuales fueron añadidos a concentraciones de (0,1, 0,2, 0,3 y 0,4%) de Carvacrol y Cinamaldehído en solución fosfato salino buferada (PBS), fueron mezclados e incubados a temperatura de 37°C. ambos antimicrobianos inactivaron por completo en las concentraciones de 0,3 y 0,4% en la exposición y en 1 hora al 0.2% (Ravishankar et al., 2010).

En un método mejorado en un ensayo de microplaca se evaluó el nivel de actividad bactericida del Orégano, Carvacrol y otros 94 aceites esenciales. La actividad bactericida (BA50) se define como el porcentaje de la muestra en la mezcla del ensayo que resultó en una disminución del 50% en unidades formadoras de colonia (UFC) respecto a un control. De los cuales el orégano mostro un gran poder inhibidor frente a *S. enterica* (AB50 con valores que van desde 0,045 a 0,14) (Friedman et al., 2002).

Se ha demostrado que los aceites esenciales de Orégano y Carvacrol mostraron eficacia en contra de *Salmonella entérica* en zumos de manzana (Friedman et al., 2004).

Se estudio la actividad antimicrobiana del aceite de *O. vulgare* por el método semicuantitativo de incorporación y de disco difusión en agar donde las bacterias gram negativas *Salmonella typhimurium* y *Salmonella cholerae suis* entre otras mostraron diferentes grados de sensibilidad (Albado et al., 2001).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización del sitio experimental

El estudio se llevó a cabo en Cd. Obregón, Sonora en el municipio de Cajeme. Las coordenadas son 27°29' latitud norte y 109°59 longitud oeste. Con una altitud sobre el nivel del mar de 40 metros (INEGI, 2012).

3.2 Clasificación del estudio

El estudio es experimental y longitudinal (Estévez et al., 2008)

3.3 Material

3.3.1 Material biológico

La bacteria *Salmonella enteritidis* fue obtenida del laboratorio de diagnóstico patológico (DIPA), ubicado en el edificio LV 100 del departamento de ciencias

agronómicas y veterinarias la cual se obtuvo de la válvula ileocecal así como de ciego y colon de cerdo. Se le realizaron las pruebas bioquímicas respectivas para su identificación así como antibiogramas para observar la resistencia de la misma a antibióticos de concentración aumentada. Con el fin de encontrar una bacteria resistente mínimo a 2 antibióticos.

3.3.2 Material para aislamiento

Aislamiento

- Fuente de Gas
- Mechero
- Paleta de Acero
- Tijeras
- Hisopos estériles
- Caldo Tetracionato
- Caldo Selenito
- Asa Bacteriológica
- Agar Verde Brillante
- Agar Salmonella-Shigela (SS)
- Estufa

3.3.3 Pruebas bioquímicas y complementarias

- Triple Sugar Iron (TSI)
- Ac. Sulfhídrico, Indol y Movilidad (SIM)
- Dexcarboxilación del Citrato (Citrato)
- Utilización de urea como fuente de nitrógeno (Urea)
- Malonato
- Arabinosa
- Ramonosa

- Trealosa

3.3.4 Material para antibiograma

- Agar Mueller Hilton
- Caldo TH y TSA
- Sensidiscos de antibióticos
- Vernier para medición de halo inhibitorio
- Hoja de parámetros de antibióticos

3.3.5 Material para diluciones

- Pipeta de vidrio
- Micropipetas
- Puntillas
- Agua Peptonada (BPW)
- Buffer Fosfato Salino (PBS)
- Caldo Trypticase Solla (TSB)
- Tubos de Plástico 15 ml.
- Mechero de Fisher
- Fuente de Gas
- Aceites Esenciales (Orégano y Carvacrol).

3.4 Métodos

3.4.1 Aislamiento de la bacteria del órgano

Primeramente se calentó la espátula de acero hasta que tome un color rojo y se quema la superficie del órgano, posteriormente con unas tijeras se cortó el pedazo previamente quemado, se tomó con una pinza y se pasó por agar mcConkey de la marca Difco de Estados Unidos para posteriormente ser estriada con una asa bacteriológica y colocada en la estufa a 37°C por 24 hrs. De igual manera los trozos cortados fueron introducidos en tubos con caldos Tetracionato y Selenito de la marca Difco de Estados Unidos, que son medios de enriquecimiento de la bacteria, son introducidos en la estufa a 37°C por 24 hrs. Al día siguiente los caldos fueron sacados de la estufa y se realizaron unos pases con hisopos estériles de los caldos al agar Verde Brillante y Salmonella-Shigella de marca Difco de Estados Unidos que son medios especiales para Salmonella, de igual manera fueron incubados a 37°C por 24 horas. A las 24 horas fueron valoradas las colonias morfológicamente así como también se le realizaron pruebas bioquímicas para su identificación (Koneman et al., 2008).

3.4.2 Antibiograma

Para el antibiograma se colocaron de 2 a 3 colonias aproximadamente en caldo Tripticasa solla (TSB), de la marca Difco para suspender la bacteria, el tubo se agitó hasta lograr homogenizar las bacterias en el caldo y observar contra la luz el crecimiento de la misma. Con un hisopo estéril fue tomada la muestra desde el tubo y se colocó en una caja con agar Mueller Hilton marca Difco, en la caja se hizo una especie de cruz con el hisopo y posteriormente fue estriada toda la caja, una vez realizado este procedimiento se procedió a la colocación de los Sensidiscos de la marca OXOID del reino unido y de la marca Becton de estados unidos con antibióticos idóneos para *Salmonella enteritidis*, siempre teniendo la precaución de no colocar antibióticos como la Ampicilina y Amoxicilina juntos, siempre colocándolos de manera encontrada. Una vez colocados todos los sensidiscos en las cajas se incubaron a 37°C por 24 horas, al día siguiente se realizaron las lecturas y

mediciones con el Vernier para determinar la resistencia o sensibilidad de la bacteria (Barry et al., 1991).

3.4.3 Diluciones y Sembrado

3.4.3.1 Dilución del aceite en buffer fosfato salino (PBS) (paso 1)

Dilución	(PBS)ml	Aceite (μl)
.1%	5	5
.2%	5	10
.3%	5	15

3.4.3.2 Dilución de la bacteria en agua peptonada (BPW) 10⁹ (paso 2)

BPW	Overnight
9ml	100 (μl)

3.4.3.3 Dilución del aceite a .1, .2, .3, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ y control

Paso 3.- Diluciones en los viales para sembrado

Diluciones	Aceite diluido (paso 1)(μl)	BPW (μl)	Bacteria (paso 2) (μl)
.1%	1000	0	100
-1	700	300	100
-2	800	200	100
-3	900	100	100
.2%	1000	0	100
-1	700	300	100
-2	800	200	100
-3	900	100	100
.3%	1000	0	100
-1	700	300	100
-2	800	200	100
-3	900	100	100
Control	1000 (PBS solo)	0	100
-1	700 (PBS solo)	300	100
-2	800 (PBS solo)	200	100
-3	900 (PBS solo)	100	100

3.4.3.4 Sembrado

El sembrado en las cajas se realizó a diferentes tiempos, al cero minuto que se llevó a cabo de manera inmediata en cuanto hizo contacto la bacteria con el aceite, se tomaron las cajas con agar (TSA) y estas fueron marcadas a la mitad con un marcador permanente con el fin de dividir el espacio, se colocaron 10 microlitros por cada lado de la caja y fueron expandidos con una asa bacteriológica tratando de evitar que se junten ambas partes, estas fueron incubadas a temperatura de 37°C por 24 horas, este procedimiento se repitió a la hora, a las 3 horas, a las 5 horas y a las 24 horas en todas las diluciones. Al pasar el periodo de 24 horas se realizó la numeración (Reyna, 2012).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados

En el estudio de sensibilidad antimicrobiana, *Salmonella enteritidis* presentó resistencia a 5 antibióticos (31.25%) de los 16 utilizados, ellos fueron Amoxicilina, Ampicilina, Enrofloxacin, Gentamicina y Lincomicina, mientras a 3 de ellos (18.75%) presentó sensibilidad intermedia, Cefotaxima, Ceftiofur y Ciprofloxacina y fue sensible a 8 (50%), Amikacina, Apramicina, Ceftriazona, Fosfomicina, Colistina, Kanamicina, Neomicina, Norfloxacina.

TABLA 1. Panel de antibióticos utilizados en el antibiograma contra *Samonella enteritidis* aislada de cerdos

Antibiótico	Diámetro	Sensibilidad
Amoxicilina	No inhibió	Resistente
Ampicilina	No inhibió	Resistente
Amikacina	20 mm	Sensible
Apramicina	18 mm	Sensible
Cefotaxima	20 mm	Sensible intermedio
Ceftriaxona	23 mm	Sensible
Ceftiofur	18 mm	Sensible intermedio
Ciprofloxacina	19 mm	Sensible intermedio
Colistina	19 mm	Sensible
Enrofloxacina	13 mm	Resistente
Fosfomicina	15 mm	Sensible
Gentamicina	20 mm	Resistente
Kanamicina	17 mm	Sensible
Neomicina	17 mm	Sensible
Norfloxacina	18 mm	Sensible
Lincomicina	10 mm	Resistente

Amoxicilina (≤ 13 14-17 ≥ 18), Ampicilina (≤ 13 14-16 ≥ 17), Amikacina (≤ 14 15-16 ≥ 17), Apramicina (≤ 11 12-14 ≥ 15), Cefotaxima (≤ 14 15-22 ≥ 23), Ceftriaxona (≤ 13 14-20 ≥ 21), Ceftiofur (≤ 17 18-20 ≥ 21), Ciprofloxacina (≤ 15 16-20 ≥ 21), Colistina (≤ 8 9-10 ≥ 11), Enrofloxacina (≤ 17 18-22 ≥ 22), Fosfomicina (≤ 12 13-15 ≥ 16), Gentamicina (≤ 12 13-14 ≥ 15), Kanamicina (≤ 13 14-17 ≥ 18), Neomicina (≥ 12 13-14 ≥ 15), Norfloxacina (≤ 12 13-16 ≥ 17), Lincomicina (≤ 11 - ≥ 10).

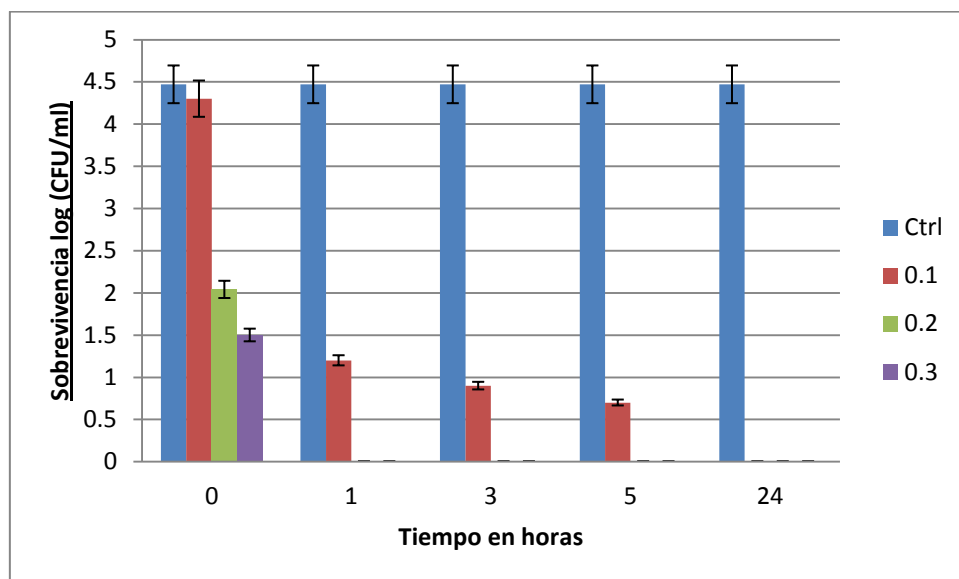
4.2 Discusión de resultados de antibiogramas

Estudios realizados en Zulia Venezuela utilizando 126 sepas de salmonella aisladas de heces de cerdo reportan que el 95% de las cepas mostraron sensibilidad a la Ceftriaxona, Gentamicina, Apramicina y Colistina. Por lo que concuerda y difiere del presente estudio ya que la bacteria utilizada mostro sensibilidad ante Apramicina, Ceftrizona, Colistina y resistencia ante Gentamicina (Mejía et al., 2008).

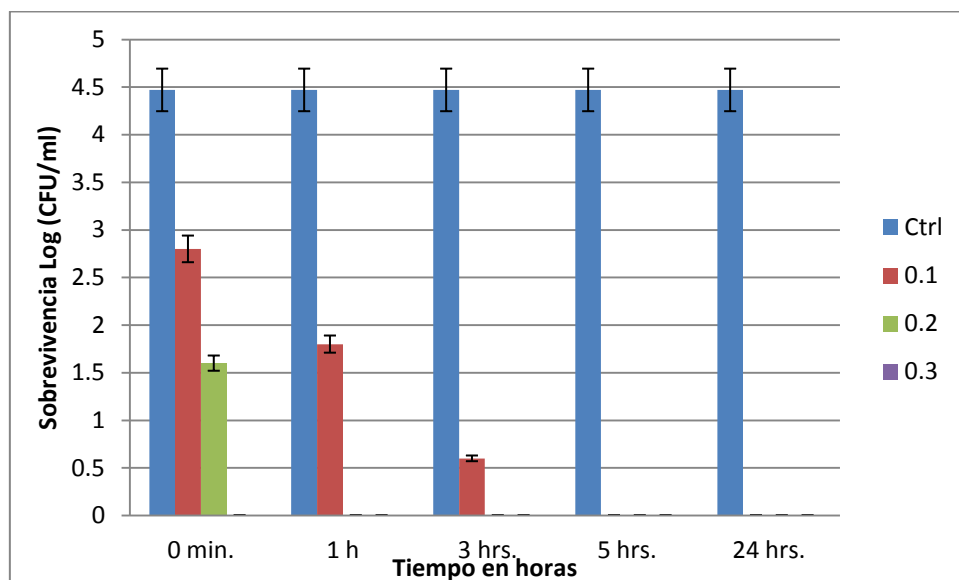
En otros estudios realizados en la ciudad de México donde se utilizaron 87 cepas de *Salmonella spp* aisladas de cerdo se reportó que 15 cepas (17.24%) mostraron resistencia ante la Ampicilina, 22 cepas (25%) al Cloranfenicol y 54 cepas (62.07%) al Sulfametoxazol lo que se asimila al presente trabajo ya que esta salmonella mostro resistencia a Ampicilina, solo que en este estudio los otros 2 fármacos no fueron utilizados (Talavera et al., 2011).

En otro trabajo similar realizado en Carhuaz, Ancash, Perú donde fue evaluada una *Salmonella entérica* aislada de vísceras de cuyos, se reportó que la cepa mostró sensibilidad ante Enrofloxacin, Sulfatrimetroprim, Estreptomicina, Amoxicilina, Cloranfenicol, Gentamicina y Fosfomicina lo cual coincide con el presente estudio en donde se mostró sensibilidad ante Estreptomicina y Fosfomicina pero difiere ya que mostró resistencia Amoxicilina, Enrofloxacin y Gentamicina (Matsuura et al., 2010).

Grafica No. 1 Actividad antimicrobiana del aceite de Orégano contra *Salmonella enteritidis* aislada de cerdos



Grafica No. 2 Actividad antimicrobiana del Carvacrol contra *Salmonella enteritidis* aislada de cerdos



El aceite de oregano presentó gran actividad antimicrobiana contra *S. enteritidis*, ya que muestra una reducción bacteriana de >2.5 Log CFU/ml inmediatamente a una concentración de 0.2% y 0.3%, al 0.1% fue reduciéndose gradualmente hasta las 5 horas. En las concentraciones de 0.2% y 0.3% se presentó completa reducción a la hora de aplicación, finalmente se pudo observar que todas concentraciones se redujeron por completo a las 24 horas. Por otro lado, el aceite de Carvacrol presentó una gran actividad antimicrobiana contra *S. enteritidis*, ya que mostró una reducción bacteriana > 1.5 log CFU/ml a una concentración de 0.1%, y una reducción >2.5 log CFU/ml a una concentración de 0.2%; esto en un tiempo menor a un minuto. Al 0.1% se fue reduciendo gradualmente hasta las 3 horas y al 0.2% se redujo por completo en una hora, por otro lado en la concentración de 0.3% presentó completa reducción al cero minuto de su aplicación y finalmente se pudo observar que todas presentaron completa reducción a las 5 horas de su aplicación.

4.3 Discusión de resultados de los aceites de Orégano y Carvacrol

El mecanismo de acción del aceite de Orégano y Carvacrol en bacterias propuesto por Lambert en el 2001 se basa en la pérdida de la integridad de la membrana celular lo que permite un incremento en la permeabilidad perjudicando la homeostasis del PH y la concentración de iones. En el 2004 Arcilia et al. Menciona que el aceite de Orégano y sus componentes tienen efecto contra bacterias gram (-) como son *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* entre otras. Dicha acción se basa en un efecto sobre los fosfolípidos en la capa externa de la membrana celular bacteriana, provocando cambios en la composición de los ácidos grasos. En el 2009 Meléndez et al. También menciona que el Carvacrol posee un grupo OH y la presencia de un sistema deslocalizado de electrones los cuales son los requisitos importantes para la actividad antimicrobiana de este compuesto contra algunas bacterias gram (+) como *Bacillus cereus*. Por otra parte Reyna en el 2012 menciona que el aceite de Orégano aparte de afectar la membrana bacteriana también produce una coagulación del citoplasma y de las vesículas de las membranas, también menciona que el aceite de carvacrol tienen un mecanismo de acción basado en la afección del ATP intracelular así como un incremento en la permeabilidad citoplasmática de los protones y por consiguiente la disipación de gradientes iónicos conduciendo a la lesión y la muerte.

Se realizó un trabajo similar al presente en la universidad de Arizona en Estados Unidos donde utilizó *Salmonella enterica* resistente a dos antibióticos a una concentración de 10^5 unidades formadoras de colonia (UFC) / ml.) Los cuales fueron añadidos a concentraciones de (0,1, 0,2, 0,3 y 0,4%) de Carvacrol y Cinamaldehído, donde se reportó que ambos antimicrobianos inactivaron por completo en concentraciones de 0.3 y 0.4% en un tiempo menor a 1 minuto de la exposición al aceite y en 1 hora al 0.2%, lo que coincide con nuestro estudio ya que el aceite de Carvacrol inactivó por completo a la bacteria en un tiempo menor a 1 minuto y al 0.2%. en un tiempo de 3 horas. De igual manera ellos también realizaron otro estudio con estos mismos aceites los cuales consistieron en inocular con *S. enterica* a 10^{5-7}

UFC/ml.) muestras de alimentos como las ostras y el apio tratados con ambos aceites al 1% dando como resultado inactivación de todos los patógenos en 1 hora excepto a *S. newport* en el Cinamaldehido y en el Carvacrol se redujo toda la población al día cero. Lo que demuestra la gran actividad antimicrobiana de estos aceites (Ravishankar et al., 2010)

Se realizó un estudio donde utilizó aceite de Orégano al igual que el presente en el cual además de *Salmonella entérica* también se utilizaron otros agentes patógenos como son *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas veronii* biogrupo *sobria*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* y *Staphylococcus aureus* obteniendo excelentes resultados a una concentración $\leq 2.0\%$ lo que demuestra la gran actividad antimicrobiana que posee el aceite de Orégano (Hammer et al., 1999).

El aceite de Orégano mexicano (*Lippia berlandieri*) posee propiedades no solo contra algunos serotipos de salmonella y otras bacterias gram (-) y gram (+) sino también contra hongos como *Fusarium oxysporum* en concentraciones de 0.5% (Cueto, 2010).

Estudios realizados con *S. enteritidis*, utilizando aceites de terpenos de naranja y de esencia de naranja, han demostrado muy buenos resultados dando una concentración inhibitoria mínima (CIM) del 1% en el aceite de terpenos de naranja y una inhibición que oscilaba desde 0.125 al 0.5% en el aceite de esencia de naranja. (O'Bryan et al., 2008)

V. CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusión

El Carvacrol presentó completa reducción antimicrobiana a las 3 horas posteriores a su aplicación en todas sus concentraciones, mientras el aceite de Orégano lo mostró en menos de 24 horas. Se demostró que los aceites de Orégano y Carvacrol poseen una gran actividad antimicrobiana contra *Salmonella enteritidis*.

5.2 Recomendaciones

El uso de este tipo de aceites tiene un futuro promisorio por lo que se deberían realizar estudios a mayor profundidad, Por lo cual se recomienda realizar estudios para evaluar la proporción (mg/ml) en que se encuentran los compuestos activos de estos aceites, de igual manera probarlos *in vivo* ya sea infectando ratones o muestras de alimento de origen animal para evaluar el efecto que tienen y si es recomendable utilizarlos en animales de producción.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Alaniz R., Ríos M., Rosas B., Juan A. (1997). Resistencia a antimicrobianos de cepas de salmonella aisladas de fuentes animales. Vet. Mex., 28 (3), 215-220.
- Albado E., Saez G., Grabiell S. (2001). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (Orégano). Rev. Med. Hered 12 (1), 16-19.
- Arcila C. C., Loarca G., Lecona S., González E. (2004). El Orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. Archivos latinoamericanos de nutrición, 54 (1).

(Baltasar, 2003). *Mezclas de antimicrobianos naturales y sintéticos para inhibir el crecimiento bacteriano*. Tesis de maestría publicada en línea. Universidad de las Américas Puebla Escuela de Ingeniería Departamento de Ingeniería Química y Alimentos. Consultada miércoles 20 de junio del 2012 en http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/mca/baltazar_f_e/portada.html.

Barry A.L., Tronsberry C., Hausler W. J., Herrmann K. L., Isenberg H. D., Shadomy H.J. (1991). *Manual of clinical microbiology* (5 ed.). Washinton D.C.: ASM Press.

Bouhdid, S., Skali, S. N., Idaomar, M., Zhiri, A., Baudoux, D., Amensour, M., Abrini J. (2008). Antibacterial and antioxidant activities of *Origanum compactum* essential oil. *African Journal of Biotechnology*, 7 (10), 1563-1570.

Cueto M. C. (2010). Propiedades antifúngicas del aceite esencial de Orégano Mexicano (*lippia berlandieri*) contra *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. *Revista Mexicana de Micología*, 31, 29-35.

Chamizo E. (1995). *Patología especial y diagnostico de las enfermedades de los animales domesticos*. Mexicali Baja California: Tomas Di Bella.

De Oliveira C., De Paula F., De Melo C., Souza L., Lopez L. (2010). Resistencia antimicrobiana de *Salmonella typhi* identificadas en el Estado de Pará, Brasil, *Rev Pan-Amaz Saude*, 1 (2), 61-65.

Elgayyard M., Draughon F., Golden D., Mount J. (2001). Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *Journal of Food Protection*, 64 (7), 1019-1024.

Espino M., Puig Y., Leyva V., Martino T., Méndez D., Soto P., Ferrer Y. (2010). Resistencia a los antimicrobianos en cepas de *Salmonella spp.* y

- Escherichia coli* aisladas de alimentos. Cuba 2004-2007, *Rev Panam Infectol*, 12(2), 30-36.
- Estévez J., Martínez M., Seguí M. (2008). Epidemiología aplicada (2 ed.). España: Ariel.
- Fernandez F., Ponce, I., López, J., Machado, C. (2003). Resistencia bacteriana. *Rev. Cubana. Med. Milit.*, 44-48.
- Flores A., Escolástica L. (2003). *Caracterización fenotípica y genotípica de estirpes de Salmonella choleraesuis aisladas de ambientes marinos*. Tesis de licenciatura publicada en línea. Universidad Nacional Mayor de San Marcos Lima Perú, Departamento Académico de Microbiología y Parasitología. Consultada miércoles 12 de septiembre en http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/Tesis/Basic/flores_al/T_completo.pdf.
- Friedman M., Henika P., Mandrell R. (2002). Bactericidal Activities of Plant Essential Oils and Some of Their Isolated Constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*, *Journal of Food Protection*, 65 (10), 1545-1560.
- Friedman M., Henika P., Levin C., Mandrell R. (2004). Antibacterial Activities of Plant Essential Oils and Their Components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in Apple Juice, *J. Agric. Food Chem*, 52 (19), 6042–6048.
- Garcia O.(1989). Enfermedades de los cerdos (1 ed.). México: Trillas.
- Hammer K., Carson C., Riley T. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 985-990.
- INEGI. (2012, Noviembre). Instituto nacional de estadística y geografía. Retrieved Noviembre 18, 2012, from <http://www.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/default.aspx?ENT=26>

- Kim S.Y., Kang D.H., Kim J.K., Ha Y.G., Hwang J.Y., Kim T., Lee S.H. (2011). Antimicrobial activity of plant extracts against salmonella typhimurium, escherichia coli o157:h7, and *listeria monocytogenes* on fresh lettuce. *Journal of Food Science* , 76, 41-46.
- Koneman E., Allen S., Washington C., William M., Procop G., Schrenckenberger P., Woods G. (2008). Diagnostico Microbiológico, Texto y Atlas en Color (6 ed.). Buenos Aires Argentina.: Panamericana.
- Lambert R.J., Skandamis P.N., Coote P.J., Nychas G.J. (2001). A Study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of Orégano Essential Oil, Thymol and Carvacrol. *Journal of Applied Microbiology* , 463-462.
- Matsuura A., Morales S., Calle S., Ara M. (2010). Susceptibilidad a antibacterianos in vitro de *salmonella enterica* aislada de cuyes de crianza familiar-comercial en la provincia de Carhuaz, Áncash, Rev Inv Vet Perú, 21 (1), 93-99.
- Mejía W., Calatayud D., Zapata D., Quintero A., Sánchez D., Mateu E. (2008). Sensibilidad a los antimicrobianos de cepas de salmonella aisladas en granjas porcinas del estado Zulia, Revista Científica, FCV-LUZ, 18, (6), 674 – 681.
- Meléndez N., Rodríguez R., González C., Silva R., Nevárez G. (2009) Orégano mexicano, Cienciacierta, 20.
- O ´Bryan C., Crandall P., Chalova V., Ricke S. (2008). Orange essential oils antimicrobial activities against *Salmonella spp.* *J Food Sci.* 73(6):64-7.
- Plonait H., Bickhard K. (2001). Manual de Enfermedades del Cerdo (2 ed.). Zaragoza Esp: Acribia.

- Quinn P., Markey B. (2005). Elementos de Microbiología Veterinaria. Zaragoza España: Acribia.
- Quinn P., Markey B., Carter M., Donnelly W., Leonard F. (2008). Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias. Zaragoza España: Acribia.
- Ramayoni. (2007). *Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores del crecimiento*. Tesis doctoral publicada en línea. Universidad autónoma de Barcelona departamento de sanidad y anatomía animal. Facultad de veterinaria. Consultada viernes 22 de junio en <http://www.tdx.cat/handle/10803/5606>.
- Ramaswamy K., Pillai P. (2012). Effect of naturally occurring antimicrobials and chemical preservatives on the growth of *Aspergillus parasiticus*. *J. Food. Sci. Technol*, 49 (2), 228–233.
- Ravishankar S., Zhu L., Reyna J., Law B., Joens L., Friedman M. (2010). Carvacrol and Cinnamaldehyde inactivate antibiotic-resistant *Salmonella enterica* in buffer and on celery and oysters. *Journal of Food Protection* , 73, 234.
- Reyna J. R. (2012). *Control of foodborne pathogenic bacteria using natural plant antimicrobials*. Tesis doctoral inédita, University of Arizona, Arizona U.S.A.
- Rodríguez E. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Revista de sociedad, cultura y desarrollo sustentable* , 7 (1), 152-170.
- Ruiz J., Suarez M., Uribe C. (2006). Susceptibilidad antimicrobiana in vitro de cepas de *Salmonella spp.* en granjas de ponedoras comerciales del Departamento de Antioquia, *Revista Colombiana Ciencias Pecuarias*, 19 (3), 297-305.

Straw B. (2000). *Enfermedades del cerdo tomo 1* (8 ed.). Buenos Aires Republica Argentina: Inter-Medica.

Straw B. (2006). *Diseases of swine* (9 ed.). Iowa USA: Blackwell Publishing.

Talavera M., Valera J. A., Reyes N. E., Lagunas S., Valladares B., Alonso M. U., Velázquez V. (2011). Resistencia antibiótica de genotipos de cepas de *Salmonella spp.* de cerdos sacrificados en rastros del Estado de México. *Vet. Méx.*, 42 (4), 269-276.