Universidad Autónoma de Sinaloa

Colegio de Ciencias Agropecuarias

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Maestría en Ciencias Agropecuarias

TESIS:

"Efecto antibacteriano del extracto de ajo (*Allium sativum*), en patógenos hemolíticos del sistema respiratorio de aves de corral"

Que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Agropecuarias

PRESENTA:

OSCAR ALEJANDRO PATRÓN LÓPEZ

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. IDALIA ENRÍQUEZ VERDUGO

CO-DIRECTORA DE TESIS:
DRA. SOILA MARIBEL GAXIOLA CAMACHO

ASESORES:
DR. CARLOS BELL CASTRO TAMAYO
MC. HIGINIO CEPEDA QUINTERO
MC. DANIEL EDUARDO ZATARAIN

CULIACÁN DE ROSALES SINALOA. AGOSTO DE 2024.

Universidad Autónoma de Sinaloa

Dirección General de Bibliotecas

Repositorio Institucional Buelna

Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International

Dirección General de Bibliotecas
Ciudad Universitaria
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios
C.P. 80010 Culiacán Sin. Méx.
Tel (667) 713 78 32 y (667) 712 50 57
dgbuas@uas.edu.mx

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación es dedicado con mucho cariño y afecto para mi esposa e hija quienes me apoyaron incondicionalmente para que fuese realizado este trabajo de tesis.

A mis padres y hermana que con el apoyo que me han logrado brindar a lo largo de mis estudios he logrado llegar a estudiar un nivel académico de posgrado.

Muchas gracias…….

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Sinaloa por brindarme la oportunidad de pertenecer a tan dicha institución académica, junto con la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y al Colegio de Ciencias Agropecuarias.

A la doctora Idalia Enríquez Verdugo, por haberme ayudado y brindarme un espacio en su laboratorio.

A la doctora Soila Maribel Gaxiola Camacho por ser un pilar de importancia para poder solventar emocionalmente las adversidades pasadas durante el posgrado.

Al doctor Carlos Bell Castro Tamayo por su apoyo y disposición en cualquier momento.

Al Maestro en ciencias Higinio Cepeda Quintero por apoyarme a resolver mis dudas referentes a diversos temas.

Al Maestro en ciencias Daniel Eduardo Zatarain por en todo lo relacionado a los análisis estadísticos.

A todo el equipo del Laboratorio de Bacteriología y Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

ÍNDICE

Índice de Figuras V

Índice de cuadros VI

Resumen VII

ABSTRACT VIII

I. Introducción 1

II. Revisión de Literatura 4

2.1 Enfermedades respiratorias en Aves 4

2.2 Bacterias Gram negativas hemolíticas en aves de corral 5

2.3 *Gallibacterium anatis* 7

2.4 Reimerella anatipestifer 8

2.5 Resistencia antimicrobiana 9

2.6 Biotecnología vegetal 10

2.7 Ajo (*Allium sativum*) 11

2.8 Antecedentes Directos 12

III. Hipótesis 14

IV. Objetivos 15

1. General 15

2. Específicos 15

V. Materiales y Métodos 16

5.1 Muestreo 16

5.2 Aislamiento Bacteriano 16

5.3 Identificación Bacteriana Métodos fenotípicos 16

5.4 Tinción de Gram 16

5.5 Identificación Metabólica (Pruebas Bioquímicas) 17

5.6 Susceptibilidad antimicrobiana 17
5.7 Efecto Inhibitorio del Ajo 18
5.8 Análisis Estadístico 19
VI. Resultados y Discusión 20
6.1 Aislamiento bacteriano 20
6.2 Tinción de Gram 21
6.3 Identificación por Pruebas bioquímicas 21
6.4 Susceptibilidad antimicrobiana 23
6.5 Efecto Inhibitorio del Ajo 25
VII. Conclusiones 29
VIII. Bibliografía 30
IX. Apéndice 44
1. Agar Hierro y Triple Azúcar (TSI). 44
2. Agar Hierro y Lisina (LIA). 44
3. Sulfuro Indol Motilidad (Sim) 44
4. Gelatina Nutritiva. 44
5. Urea 44
6. Bilis Esculina 44
7. Sorbitol 45
8. Caldo Soya Tripticaseína (TSB). 45
9. Agar Müeller-Hinton 45
10. Hipoclorito de Sodio 200 ppm 45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de aislamientos bacterianos provenientes de muestras de aves 20
Figura 2. Tinción de Gram negativa de los organismos aislados, los cuales poseen forma de bacilo. 21
Figura 3. Histograma con curva de normalidad del efecto del ajo en bacterias Gram negativas de aves. 25
Figura 4. Homogeneidad de varianzas entre las cepas aisladas..... 26
Figura 5. Comparaciones de medias por Post-hoc Robusta - Prueba Tukey robusta. 27

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Familia y concentraciones de antimicrobianos utilizados para antibiograma. 18

Cuadro 2. Pruebas bioquímicas realizadas para la identificación de las 3 bacterias aisladas de aves. 22

Cuadro 3. Sensibilidad de antibóticos para Gram negativos (*Gallibacterium anatis* y *Reimerella anatipestifer*). 24

RESUMEN

Oscar Alejandro Patrón López

La avicultura es uno de los principales sectores productores de importancia en el ramo agropecuario, debido a la alta demanda de los productos derivados de las aves como lo es el huevo o la carne de estos, sin embargo, dicha actividad se afecta por las enfermedades respiratorias, ocasionadas por patógenos bacterianos que presentan resistencia a los antibióticos. El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de organismo patógenos presentes en aves de corral, así como su susceptibilidad hacia los antimicrobianos y la actividad inhibitoria del extracto de ajo. Para ello, se obtuvieron muestras de pulmón y tráquea de aves de corral con infección respiratoria, la detección bacteriana se realizó con el aislamiento, identificación colonial, microscópica y pruebas bioquímicas, se determinó la prueba de sensibilidad antimicrobiana con antibióticos y extracto de Ajo al 100%. Se obtuvieron 3 aislados correspondientes a dos tipos de colonias bacterianas hemolíticas con morfología de cocobacilos Gram negativos (*Gallibacterium anatis* y *Riemerella anatipestifer*). *G. anatis*, presentó una alta sensibilidad a aminoglucósidos y baja resistencia a beta lactámicos y quinolonas, R. *anatipestifer* mostró resistencia a todos los antibióticos excepto a quinolonas que mostraron 100% de sensibilidad. El extracto de ajo al 100% presentó sensibilidad en las bacterias con significancia estadística ($P \leq 0.05\%$). Las bacterias aisladas mostraron resistencia y multirresistencia a antibióticos y sensibilidad al ajo, lo que sugiere la implicación para el sector avícola y la salud pública.

Palabras clave: resistencia, susceptibilidad, antibiótico, ajo, bacterias, aves.

ABSTRACT

Oscar Alejandro Patrón López

Poultry farming is one of the main important producing sectors in the agricultural sector, due to the high demand for products derived from birds such as eggs or meat. However, this activity is affected by respiratory diseases caused by bacterial pathogens that are resistant to antibiotics. The aim of the present work was to determine the presence of pathogenic organisms present in poultry, as well as their susceptibility to antimicrobials and the inhibitory activity of garlic extract. For this purpose, lung and trachea samples were obtained from poultry with respiratory infection. Bacterial detection was performed with isolation, colonial identification, microscopic and biochemical tests. Antimicrobial sensitivity test was determined with antibiotics and 100% garlic extract. Three isolates were obtained corresponding to two types of hemolytic bacterial colonies with Gram-negative coccobacilli morphology (*Gallibacterium anatis* and *Riemerella anatipestifer*). *G. anatis* showed high sensitivity to aminoglycosides and low resistance to beta lactams and quinolones; *R. anatipestifer* showed resistance to all antibiotics except quinolones, which showed 100% sensitivity. 100% garlic extract showed sensitivity in bacteria with statistical significance ($P \leq 0.05\%$). The isolated bacteria showed resistance and multi-resistance to antibiotics and sensitivity to garlic, suggesting the implication for the poultry sector and public health.

Palabras clave: resistance, susceptibility, antibiotic, garlic, bacteria, birds.

I. INTRODUCCIÓN

La avicultura es una de las crianzas de mayor importancia en el ramo agropecuario, la cual consiste de exportación y reproducción de aves de corral, sin embargo, dicha actividad se mira afectada principalmente por enfermedades respiratorias, dado el impacto socio económico que produce a la disminución de producción efectiva y el aumento de costos de producción, debido al incremento por el uso de medicamentos para la prevención o cura de dichas enfermedades (Espinosa *et al*., 2011; Colas *et al*., 2011[a]; Colás *et al*., 2011[b]; Bagust, 2013; Ataei *et al*., 2017).

El principal método de control o prevención es el uso de los agentes antimicrobianos, sin embargo, hoy en día la resistencia a dichos agentes, es una problemática sanitaria de mayor importancia, debido al uso indiscriminado que se les ha propiciado (Vanegas-Múnera & Jiménez-Quinceno, 2020), dicho problema es uno de los mayores riesgos sanitarios que se puede enfrentar como sectores productores (Davies & Davies, 2010; Nhung *et al*., 2017; ONU, 2019).

Lo verdaderamente alarmante en los sistemas de producción intensiva es la presencia de problemas respiratorios diagnosticados con etiología simple o múltiple causada por diversos organismos patógenos (virus, bacterias, hongos y agentes inmunosupresores) (Glisson, 1998) y patógenos emergentes con multirresistencia (Nworie *et al*., 2016).

El manejo adecuado de la parvada o el sistema de producción adquieren un papel primordial en la aparición de infecciones respiratorias, pues siempre serán superiores en parvadas donde no existe un manejo apropiado (Colás *et al.,* 2011[b]). La identificación fenotípica bacteriana se basa en las características morfológicas, de desarrollo, propiedades bioquímicas y metabólicas, éstas sirven en la diferenciación de los géneros de las bacterias, puesto que su realización y coste los hace más asequibles, no obstante, en ocasiones se requiere de metodologías complementarias para la identificación de especies (Bou *et al*., 2011; El-Adawy *et al*., 2018).

Debido a la alta incidencia de portadores de bacterias causantes de enfermedades respiratorias en parvadas de gallinas ponedoras y reproductoras de pollos de engorda es sustancial la identificación de los agentes causales, ya que esto significa una distribución extensa de estos microorganismos entre las aves de corral, lo cual ocasiona disminución en la producción de huevos y representa la primera causa de muerte de gallinas ponedoras (Colás *et al*., 2011[b]; Nworie *et al*., 2016; Elbestawy *et al*., 2018).

Un manejo inadecuado, influye en el inicio de la presencia de enfermedades del tracto respiratorio, donde pueden coexistir bacterias como *Mycoplasma* spp., *Escherichia coli, Pasteurella multocida, Ornithobacterium rhinotracheale, Bordetella avium, Avibacterium paragallinarum, Staphylococcus* spp*, Streptococus* spp*, Corynebacterium* spp*,* entre otras (Espinosa *et al*., 2011; De la Cruz, 2016; Singh *et al*., 2016; Nworie *et al*., 2016).

En cuanto a bacterias Gram negativas hemolíticas, se reportó resistencia a los betalactámicos (penicilina y ampicilina), tetraciclina, tilosina, novobiocina, sulfonamida, lincomicina, enrofloxacina, florfenicol, cefotaxima, clindamicina, sulfatiazol, penicilina, norfloxacina y cefalotina en *Gallibacterium anatis* (antes *Mannheimia haemolytica*) (Osuna *et al.*, 2017; El-Adawy *et al*., 2018; Elbestawy *et al*., 2018; Nassik *et al*., 2019; Krishnegowda *et al*., 2020); así mismo, se reportaron que las cepas de *Riemerella anatipestifer* son resistentes a aztreonam, cefepima, oxacilina, penicilina G, ceftazidima, trimetoprima/sulfametoxazol, flumequina, tetraciclina, eritromicina y estreptomicina (Vo *et al*., 2022). Baños y Guillamón (2014), describen que el tratamiento con aceites esenciales o extractos, benefician la manera antimicrobiana, entre los más utilizados se encuentran los del género *Allium.*

Estudios previos han demostrado que la alicina (compuesto antibacteriano del ajo fresco), inhibe significativamente una variedad de agentes infecciosos (Magrys *et al.,* 2021). Mekala *et al.* (2013) reportó que el ajo tiene un amplio espectro de

actividad contra organismos Gram positivos y Gram negativos del sistema respiratorio de aves de corral. El objetivo del presente estudio fue determinar la susceptibilidad al ajo en bacterias Gram negativas hemolíticas resistentes a antibióticos aisladas de tráquea y pulmones de aves de corral.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Enfermedades respiratorias en Aves

En México la producción del sector avícola ha ido en desarrollo cada vez más, de los principales productos que conforman este mercado se encuentra la venta de carne de pollo y la producción de huevo, en el año 2023 México alcanzo una producción de 3.89 millones de toneladas, a lo cual datos de la FIRA (Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura), los señala como históricos, dado al impulso de estados como: Veracruz, Jalisco, Aguascalientes y Querétaro (FIRA, 2019; FIRA, 2024).

El sector avícola es uno de los más importantes en el mundo y en la sociedad mexicana, México ocupa los primeros lugares en la exportación de huevo y presenta un consumo per cápita de 22 kilos, posicionándose como el mayor consumidor a nivel mundial. Sin embargo, la industria avícola se ve afectada por infecciones como la coriza infecciosa cuyo agente etiológico es *Avibacterium paragallinarum* o gallibacteriosis causada por *Gallibacterium anatis*. Estas afectan principalmente a gallinas de postura y pollos de engorde, causando disminución del 10 al 40% en la producción de huevo, impactando directamente en la salud pública y generando pérdidas económicas relevantes (Matias *et al.,* 2024).

Las enfermedades respiratorias plantean una amenaza importante para la salud mundial debido a su alta prevalencia, una amplia gama de mortalidad y morbilidad, la necesidad de tratamientos costosos y el impacto en el rendimiento de las aves. Además, varias de estas infecciones tienen importancia zoonótica, suponen un riesgo para la salud pública y causan un daño económico significativo (Yehia *et al.,* 2023). Estas infecciones respiratorias, generan una gran preocupación para el sector avícola debido a diferentes casos por su inadecuado manejo y la alta mortalidad que estas proveen, es de alarmante atención al momento de presentarse dado que las mayorías de las veces no solo se encuentra con un solo patógeno infeccioso, lo cual se denomina coinfecciones (Roussan *et al*., 2008; Yehia *et al*., 2023; Al-Natour *et al*., 2024).

En el sector avícola, las enfermedades infecciosas, principalmente las del sistema respiratorio, representan uno de los mayores problemas de sanidad animal con niveles de morbilidad y mortalidad entre10 y 50% (Mendoza *et al.,* 2014).

Existen diversos patógenos involucrados en la salud animal, sin embargo, entre los de mayor prevalencia se encuentran algunos virus y bacterias, dentro de los virus de importancia se encuentran: *Coronavirus*, *Herpesvirus*, *Influenza* tipo *A* y por parte de los organismos bacterianos: *Avibacterium paragallinarum, Ornithobacterium rhinotracheale, Pasteurella multocida, Gallibacterium anatis (*antes *M. haemolytica), Mycoplasma gallisepticum* y *Escherichia coli* (De la Cruz-Veliz *et al*., 2018; Mendoza, 2015).

Uno de los patógenos de mayor importancia es *Gallibacterium anatis*, a pesar de ser relacionado como habitante intestinal, en la actualidad se encuentra en aumento los reportes de aislados vinculados a la septicemia (infección en sangre) y la mortalidad de bandadas de pollos y la infección de otros mamíferos (Krishnegowda *et al*., 2020; Van Driessche *et al*., 2020). Actualmente, *Reimerella anatipestifer* (antes *Pasteurella anatipestifer*), se ha detectado que infecta a todas las aves de corral domésticas, incluidos patos, pavos, pollos, faisanes y aves acuáticas; causa septicemia y poliserositis, lo que provoca una disminución en la ganancia de peso y un aumento en la frecuencia de carcasas degradadas, lo que provoca graves pérdidas económicas (Karwanska *et al*., 2023; Chaves, 2013; Yehia *et al*., 2023).

2.2 Bacterias Gram negativas hemolíticas en aves de corral

El sector avícola requiere muchos insumos para mantener su productividad, entre ellos los necesarios para controlar infecciones, algunas de ellas recurrentes por las mismas prácticas productivas o por la evolución natural de los agentes infecciosos. Algunas de las principales infecciones de las aves de granja son producidas por bacterias de la familia Pasteurellaceae (Matias *et al.,* 2024).

El rendimiento de las aves de corral está muy influenciado por las infecciones respiratorias. La composición microbiana de las especies aviares proporciona información que ayuda a comprender el microbioma respiratorio de las aves de corral. También, se ha observado que las infecciones bacterianas relacionadas con el tracto respiratorio pueden representar un porcentaje asombrosamente grande de casos registrados en diferentes naciones en condiciones de campo, este porcentaje es mayor en los países en desarrollo, donde las precauciones de bioseguridad son menos frecuentes, lo que resulta en pérdidas económicas significativas en el sector avícola. Así mismo, podría hacer más difícil la vigilancia sindrómica, durante la inspección de aves de corral infectada, se recomienda diagnosticar otros patógenos que pueden variar según las coinfecciones o el historial de preinfección (Yehia *et al.,* 2023).

Todos los patógenos tienen su mecanismo de inducción de lesiones y enfermedades, conocimiento valioso en la selección adecuada de muestras de elección y métodos de diagnóstico que puedan brindar información para su identificación en aves de corral (Chaves Hernández, 2014).

Una de las características más importantes para identificar a las bacterias hemolíticas como *Gallibacterium anatis biovar haemolytica*, es que producen hemólisis beta alrededor de la colonia bacteriana cuando se le cultiva sobre agar sangre, esto es por la producción de la toxina GtxA (toxina A de *Gallibacterium*) que posee actividad hemolítica en gran variedad de hospederos y efecto leucotóxico en los macrófagos de los pollos; la mayoría de los miembros de la familia Pasteurellaceae expresan toxinas RTX que poseen actividad leucotóxica y hemolítica. La toxina RTX de *G. anatis*, GtxA, posee dos dominios: C-terminal (responsable de la función hemolítica) y N-terminal (necesaria para la actividad hemolítica completa y la actividad leucotóxica (Ojeda, 2020).

Las bacterias Gram negativas generan enfermedades con desenlace fatal en animales y humanos, además infecciones nosocomiales generados por bacilos

Gram negativos que son el reto más importante para los expertos en salud con respecto a la resistencia bacteriana (Oliviera y Weygaert, 2023). *G. anatis* a pesar de ser una bacteria casi exclusivamente de las aves, se ha reportado el aislamiento en un humano y en terneros (Ojeda, 2020).

2.3 Gallibacterium anatis

Gallibacterium anatis biovar haemolytica (G. anatis bv. haemolytica) es la especie más reportada en aves de corral. Es una bacteria Gram negativa, anaeróbica facultativa, con forma de bastón que forma una amplia zona de β-hemólisis alrededor de la colonia en placas de agar sangre. Aunque *G. anatis* es parte de la microbiota del tracto respiratorio superior y el tracto reproductivo inferior de aves sanas, es un patógeno oportunista (Karwanska *et al.,* 2023).

G. anatis es un organismo perteneciente a la familia Pasteurellaceae, con anterioridad era considerado un patógeno colateral, debido que es un habitante comensal, sin embargo, en la actualidad se han reportado diversos estudios haciendo referencia a la patogenicidad o problemática que este patógeno desenvuelve principalmente en el trato respiratorio, provocando una necrosis y obstrucciones viales. Entre las características infecciosas se presenta principalmente como peritonitis y traqueítis, acompañado de secreción nasal e hinchazón, diarrea y emaciación (pérdida de peso) (Nassik *et al*., 2019; Abd el-ghany *et al*.,2023; Bzdil *et al*., 2024). *G. anatis* en abundancia en la fase de crecimiento temprano de las aves de corral puede resultar en un menor peso corporal y disbiosis, y posteriormente afectar el rendimiento de los pollos de engorde, aumentan las tasas de mortalidad y reduce la producción de huevos, causando así graves pérdidas económicas en las industrias avícolas (Ojeda, 2020).

En presencia de diversos factores *G*. *anatis*, puede ser un patógeno nocivo, provocando pérdidas económicas y principalmente reduciendo la eficiencia en la producción de la industria avícola. Entre las principales vías de propagación del patógeno se encuentra el contacto directo entre aves infectadas y sanas, así como

el contacto con huevos contaminados, los factores fundamentales que favorecen la infección por *G*. *anatis*, es la edad, el estrés y principalmente el estado inmunológico (Kursa *et al*., 2023; Kursa *et al.*, 2024).

A pesar de presentar problemática en las especies aviares, *G. anatis* puede también infectar diversas especies de la fauna animal como lo son las ovejas, caballos, cerdos (Driessche *et al*., 2020; Algammal *et al*., 2022). Dicho patógeno tiene una gran importancia zoonótica, debido que existen algunos reportes en los cuales han hecho referencia de aislamientos de *G. anatis* provenientes de seres humanos, los cuales se estiman se habían infectado a través del consumo de alimentos (Kursa *et al.,* 2023; Abd el-ghany *et al*., 2023; Wang *et al*., 2023).

2.4 Riemerella anatipestifer

R. anatipestifer, es una bacteria Gram negativa, inmóvil, con forma de bastón y no esporulada, pertenece a la familia Flavobacteriaceae. Las colonias en agar sangre tienen un diámetro de 1 a 2 mm, son grisáceas, convexas, con forma de gota de rocío y lisas. Las bacterias no crecen en agar Mac-Conkey. Se han identificado alrededor de 21 serotipos, aunque no se ha descrito protección cruzada entre estos serotipos. *R. anatipestifer* está descrito no inducen hemólisis en medios con sangre a las 24 h, sin embargo, existe inducción de hemólisis después de 48 h de incubación en condiciones microaerófilas (Nowaczek *et al.,* 2023).

Infecta a todas las aves de corral domésticas, incluidos patos, pavos, pollos, faisanes y aves acuáticas. La infección afecta a las aves jóvenes, especialmente de 1 a 8 semanas de edad. Provoca altas tasas de mortalidad, septicemia y poliserositis, lo que provoca una disminución en la ganancia de peso y un aumento en la frecuencia de carcasas degradadas, lo que provoca graves pérdidas económicas (Karwanska *et al*., 2023; Chaves, 2013; Yehia *et al*., 2023). Algunos factores predisponentes favorecen la infección y los brotes, como las malas condiciones ambientales y las enfermedades concomitantes (Yehia *et al.,* 2023).

En los últimos años se han publicado varios estudios sobre *R. anatipestifer* causante de septicemia en aves y sus perfiles de susceptibilidad antimicrobiana, el uso extensivo y el abuso, de antibióticos ha llevado a un espectro de resistencia en expansión entre los aislamientos de *R. anatipestifer* (Vo *et al.,* 2022).

2.5 Resistencia antimicrobiana

El surgimiento de resistencia a los agentes antimicrobianos, es una de las principales problemáticas de mayor importancia de salud pública del mundo, debido a que estos agentes son el principal método de control de los patógenos objetivos, derivado a este problema sanitario se ha complicado aún más su control o manejo (Shin *et al.,* 2017, Morehead *et al.,* 2018, Grover *et al.,* 2020).

La resistencia a los antimicrobianos se ha extendido globalmente a la par del consumo de estos medicamentos, cultivando así un riesgo descomunal para la salud mundial, lo cual aumenta la preocupación de la organización mundial de la salud (OMS, 2014; Hou *et al*., 2023).

Los organismos bacterianos poseen diversas formas de adaptación a las condiciones ambientales, como lo es la temperatura o niveles de pH, junto con el aumento de su virulencia lo cual les provee la supervivencia a estos panoramas estresantes, dicha respuesta influye en el desarrollo de la respuesta antagonista a los antibióticos (Dawan y Ahn, 2022).

En todo el mundo, el aumento de la resistencia a los antimicrobianos hace que la selección de una terapia antimicrobiana eficaz para los animales sea cada vez más difícil, lo que pone de relieve la importancia de controlar los perfiles de susceptibilidad fenotípica y genotípica (Karwanska *et al.,* 2023).

Numerosos investigares hacen alusión a buscar nuevas alternativas de control para los patógenos problemas, ya que, al continuar al mismo ritmo con el uso desmedido e irracional de los antibióticos, se estiman pérdidas económicas por al menos 100

billones de dólares y una tasa de muertes por 10 millones de habitantes (de Kraker *et al*., 2016; Roope *et al*., 2019; Murray *et al*., 2022).

2.6 Biotecnología vegetal

Tradicionalmente se han utilizado diversos productos químicos para el control de diversos patógenos como bacterias u hongos, sin embargo, el uso de estos productos sintéticos ha dado lugar a diversos efectos adversos para la salud humana y animal, a lo cual surge la necesidad e importancia del empleo de nuevas técnicas, para desistir de estas prácticas clásicas de control (Achimón *et al*., 2021).

Actualmente, la búsqueda de nuevas estrategias para reducir el impacto ecológico ha ido aumentando, por ello ha sido de máxima importancia el reducir el uso de agentes químicos en la producción de alimentos tanto vegetal como animal, una de las principales herramientas utilizadas de estas tecnologías es el uso de productos antimicrobianos derivados de productos vegetales como lo es extracto de ajo o cebolla (Tigrero, 2024; Rodríguez, 2024).

Los aceites esenciales o extractos, son conformados por mezclas naturales, dichas tecnologías pueden ser utilizadas en como conservantes de alimentos, aromatizantes o como agentes de control inhibitorio para patógenos (Bora *et al*., 2020; Zheng *et al*., 2023).

Estos han posicionado como mecanismo de defensa para actividades microbianas, entre las principales ventajas que estos productos promueven es minimizar o mitigar el surgimiento de patógenos infecciosos para los seres vivos como es el caso de las aves de corral. Así mismo, Baños y Guillamón (2014), mencionan en su investigación que el tratamiento con los aceites esenciales o extractos no solo benefician de la manera antimicrobiana, si no también fungen como incrementadores de parámetros productivos. Entre los extractos más utilizados se encuentran los del género *Allium*, el cual se constituye por más de 700 especies,

entre dichas especies se encuentra el ajo y la cebolla, los cuales son los bulbos de mayor consumo (Zhang *et al*., 2020).

2.7 Ajo (*Allium sativum*).

El ajo (*Allium sativum*) es un ingrediente principalmente considerado para la condimentación de diversos alimentos, el cual es un bulbo perteneciente de la familia *liliáceas*, dicha especie ha sido utilizada con distintos fines a lo largo de los años entre la cual resalta el uso terapéutico o antimicrobiano que se le ha venido dando en la actualidad. El fruto de ajo recibe el nombre de bulbo y cada segmento se denomina diente, dicho bulbo contiene aproximadamente entre 10 y 15 dientes, el ajo pose un gran valor nutritivo y rico en vitaminas como C y B, a nivel nacional este producto es cultivado en al menos 21 entidades del país (Ramírez-Concepción *et al*.,2016; Petropoulos *et al*., 2018).

Debido a su composición biológica, el ajo se ha logrado posicionar como uno de los mejores bactericidas de origen biológico, sumándole a ello el bajo impacto ecológico que este genera dado que su residualidad es muy baja o nula (González *et al*., 2017).

La utilización del ajo para limitar o mitigar el crecimiento bacteriano, es por los derivados por su composición química, como lo son los aminoácidos, minerales y vitaminas, de los cuales sobresale la alicina, la cual es un aminoácido azufrado que confiere la producción del olor característico del ajo y sus propiedades antimicrobianas (Ramírez-Concepción *et al*., 2016; Alves *et al*., 2021).

La actividad antibacteriana del ajo se ha atribuido a más de 100 compuestos fitoterapéuticos de azufre presentes en concentraciones variables, además de 17 aminoácidos, enzimas, sales minerales (p. ej., germanio, selenio, fosfatos, calcio y sales de hierro), vitaminas (p. ej., ácido ascórbico, riboflavina, niacina, tiamina, ácido fólico) y valiosos aceites esenciales (Mekala *et al*., 2013; Magrys *et al*., 2020).

El ajo se considera desde hace tiempo la especie vegetal más eficaz en el tratamiento de las infecciones bacterianas, el extracto del bulbo del ajo, especialmente su compuesto alicina (dialil-tiosulfinato), inhibe el crecimiento de muchas especies de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Por lo cual, el ajo es una excelente alternativa a los antibióticos que se utilizan actualmente. Además, los investigadores están intentando encontrar nuevos fármacos debido a la reciente aparición de cepas bacterianas con resistencia a los antibióticos tradicionales y se sugiere que una de las soluciones a este problema es el desarrollo de una combinación de extractos de ajo y antibióticos disponibles en el mercado con sinergismo parcial o completo entre las sustancias (Magrys *et al*., 2020).

La alicina interfiere en la formación de la bicapa fosfolipídica de la pared celular, la síntesis de la membrana celular y también la síntesis de ARN en las bacterias. Por lo tanto, las bacterias no pueden crecer en presencia de alicina y produce un efecto bactericida (Mekala *et al*., 2013).

2.8 Antecedentes Directos

El uso inadecuado de antibióticos ha dado lugar al alarmante fenómeno de la resistencia a los antibióticos. Se ha descrito que las cepas de *Riemerella anatipestifer* son resistentes a una amplia gama de antibióticos, entre ellos, aztreonam, trimetoprima/sulfametoxazol, cefepima, oxacilina, penicilina G, ceftazidima, flumequina, tetraciclina, eritromicina y estreptomicina (Vo *et al.,* 2022). *R. anatipestifer* presenta resistencia natural a varios antibióticos, incluidos aminoglucósidos, macrólidos, cefalosporinas, tetraciclinas, anfenicoles, sulfonamidas y polimixinas; un estudio sobre la resistencia a los antibióticos b-lactámicos revelaron que los aminoglucósidos y los macrólidos no son opciones viables para tratar la infección por *R. anatipestifer*. Si bien los antibióticos cloranfenicol y flufenicol demostraron efectos antibacterianos efectivos contra *R. anatipestifer*, su uso clínico es limitado, particularmente durante el período de puesta de huevos de las aves (Liu *et al*., 2024).

En un estudio de resistencia a antibióticos de *G. anatis bv. haemolytica* fueron resistentes a penicilina, cefotaxima y ciprofloxacino. La mayoría de los aislados fueron resistentes a quinolonas, seguido de sulfonamidas, así como a clindamicina. También registraron resistencia a macrólidos. Así mismo, se observó resistencia a oxitetraciclina. Todos los aislamientos fueron susceptibles a las cefalosporinas, así como meropenem, estreptomicina y colistina (Karwanska *et al*., 2023).

Mekala *et al*. (2013), evaluaron el efecto antibacteriano *in vitro* del ajo contra patógenos avícolas como *Bacillus* spp, *Clostridium* spp, *Staphylococccus* spp, *E. coli*, *Klebsiella* spp, *Pseudomonas* spp, *Pasteurella* spp y *Salmonella* spp, con el extracto al 100% del ajo y enrofloxacina como control, donde detectaron que todas las bacterias fueron sensibles al extracto de ajo y al antibiótico, excepto *E. coli* fue resistente a enrofloxacina.

III. HIPÓTESIS

Las bacterias Gram negativas hemolíticas aisladas del sistema respiratorio de aves de corral presentarán resistencia antimicrobiana a diversos antibióticos y a su vez serán susceptibles al extracto de ajo.

IV. OBJETIVOS

1. General

Determinar la susceptibilidad al ajo en bacterias Gram negativas hemolíticas resistentes a antibióticos aisladas de tráquea y pulmones de aves de corral.

2. Específicos

1. Aislar e identificar morfológicamente bacterias Gram negativas hemolíticas a partir de muestras de órganos de pollo.
2. Determinar el perfil metabólico a través de pruebas bioquímicas de las bacterias aisladas.
3. Identificar la resistencia antimicrobiana de los microorganismos bajo estudio.
4. Detectar la sensibilidad antimicrobiana al extracto de ajo.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Muestreo

Se recolectaron 8 muestras de pulmón y 8 de tráquea de pollas con 9 semanas de edad, las cuales fueron provenientes de una granja con sistema de producción intensiva, posteriormente las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Bacteriología y Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

5.2 Aislamiento Bacteriano

Con ayuda de un bisturí se realizó un corte en los órganos muestreados los cuales presentaban necrosis, continuamente se tomó un pequeño trozo del tejido y se inoculó, se estrió con un asa bacteriológica en cultivo agar sangre, posteriormente las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 h en condiciones anaeróbicas/microaerófilas facultativas (incubadora para anaerobios marca Thermo Scientific con una atmósfera al 5% de CO_2) (Stanchi, 2007).

5.3 Identificación Bacteriana Métodos fenotípicos

Para la identificación bacteriana se observaron las colonias del cultivo utilizando de referencia el tamaño, forma, color y textura de las colonias, junto con la presencia de hemólisis (lísis de glóbulos rojos).

5.4 Tinción de Gram

La identificación microscópica se realizó mediante la tinción de Gram, a lo cual se observaron formas y agrupaciones del organismo aislado. Se colocó una gota de agua estéril en un portaobjeto y se inoculó una colonia bacteriana realizando un frotis o extensión fijándola con flama, continuamente se agregó violeta de genciana por 1 min, al finalizar el tiempo se escurrió el sobrante y se añadió yodo Gram durante 1 min, posteriormente se lavó con alcohol-acetona (1:1), para concluir se cubrió con safranina por 1 min, después se lavó con abundante agua destilada y se dejó secar al aire y se observó bajo microscopio. Para la realización de este ensayo se utilizó un kit de tinción (HYCEL, México) (Kaiser, 2017).

5.5 Identificación Metabólica (Pruebas Bioquímicas)

Para la identificación metabólica del organismo aislado se utilizaron distintas pruebas bioquímicas. Las colonias del organismo fueron inoculadas en Agar hierro triple azúcar (TSI, MCD-LAB, México, Apéndice 1): Se probó la capacidad de fermentar carbohidratos como glucosa, sacarosa y lactosa, presencia de gases y ácido sulfhídrico. Agar lisina hierro (LIA, MCD-LAB, México, Apéndice 2): Se evaluó la descarboxilación de la lisina, fermentación de glucosa con presencia de gases y presencia o no de ácido sulfhídrico. Sulfuro indol motilidad (SIM, CONDALAB, Europa, Apéndice 3): Evaluar motilidad (movilidad), producción de sulfuro de hidrógeno y escindir o dividir el indol, se reveló utilizando el reactivo de Ehrlich. Gelatina nutritiva (CONDALAB, Europa, Apéndice 4): Capacidad de hidrolizar o romper la gelatina. Urea (CONDALAB, Europa, Apéndice 5): Presencia de la enzima ureasa la cual desdobla la urea mediante la alcalinización del medio, Bilis Esculina (BRITANIALAB, Argentina, Apéndice 6): Determinar la presencia de la enzima encargada de hidrolizar la esculina. Sorbitol (MCD-LAB, México, Apéndice 7): Comprobar la presencia de la enzima de fermentadora de glucosa. Catalasa: Es la facultad de un organismo de sintetizar catalasa, la cual hidroliza el peróxido de hidrógeno. Oxidasa: reacciona oxidando el citocromo reduciéndolo a hidrogeno o agua (Bou *et al*., 2011; Afroz *et al*., 2023).

5.6 Susceptibilidad antimicrobiana

La prueba para la resistencia a antibióticos se realizó por triplicado mediante el método de difusión en disco de Kirby-Bauer. Los microorganismos aislados se crecieron en caldo soya tripticaseína (TSB, MCD-LAB, México Apéndice 8) y se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm con una densidad óptica de 0.08 a 0.1, con un patrón de 0.5 McFarland (1.5 x 10^8 UFC/mL). La cepa se sembró en cajas de Petri con agar Müeller-Hinton (Apéndice 9), posteriormente se dejó secar al menos 5 min para la absorción del cultivo en el agar, después se colocó el multidisco impregnado con los antibióticos Gram negativo (PT-35Nmultibac I.D.) (Cuadro 1) y se incubaron 24 h a 37°C (Cepeda-Quintero *et al.*, 2022). La lectura de los halos de inhibición se midió el diámetro de cada uno de los antibióticos con

una regla en mm, se determinó la susceptibilidad o resistencia con base en las recomendaciones del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (CLSI, 2015; CLSI, 2017; CLSI, 2018; ID, 2020; CLSI, 2021).

Cuadro 1. Familia y concentraciones de antimicrobianos utilizados para antibiograma.

Antibiótico	Abreviatura	Familia	Concentración
Cefalotina	CF	Cefalosporinas	30 µg
Cloranfenicol	CL	Anfenicoles	30 µg
Nitrofurantoina	NF	Nitrofuranos	300 µg
Ampicilina	AM	Penicilinas	10 µg
Amikacina	AK	Aminoglucósidos	30 µg
Trimetoprim/ Sulfametoxazol	SXT	Sulfonamida	25 µg
Gentamicina	GE	Aminoglucósidos	10 µg
Netilmicina	NET	Aminoglucósidos	30 µg
Ciprofloxacino	CPF	Fluoroquinolonas	5 µg
Carbenicilina	CB	Penicilinas	100 µg
Norfloxacino	NOF	Fluoroquinolonas	100 µg
cefotaxima	CTX	Cefalosporina	10 µg

5.7 Efecto Inhibitorio del Ajo

Para identificación de la actividad inhibitoria del extracto del ajo, se realizó por triplicado mediante el método de difusión en disco. Los organismos aislados se crecieron en caldo soya tripticaseína (TSA, MCD-LAB, México Apéndice 11) y se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm con una densidad óptica de 0.08 a 0.1, con un patrón de 0.5 McFarland (1.5 x 10^8 UFC/ml). La cepa se sembró en cajas de Petri con agar Müeller-Hinton, posteriormente se dejó secar al menos 5 min para la absorción del cultivo en el agar, después se colocaron 5 discos impregnado con extracto de ajo al 100% y se incubaron 24 h a 37°C (Cárdenas, 2018). Luego se evaluó la actividad midiendo el diámetro de las zonas de inhibición utilizando una regla mm (Mekala *et al*., 2013).

Para realizar el extracto de ajo, se pesaron 100 g de ajo sin cáscara, se desinfectaron en hipoclorito de sodio a 200 ppm (Apéndice 13), durante 5 min, posteriormente estos fueron macerados, se extrajo el zumo y posteriormente se filtró a través de discos de 0.22 µM (Benkeblia, 2004; Mardani *et al*., 2023).

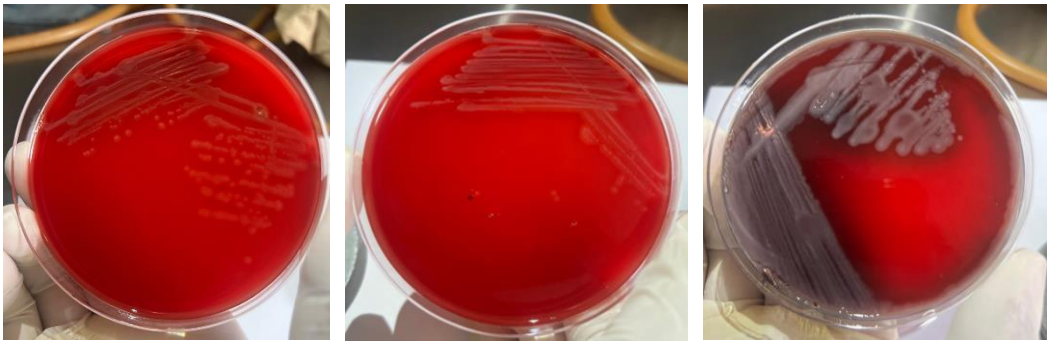
5.8 Análisis Estadístico

Los análisis estadísticos utilizados fueron la prueba de normalidad (Shapiro-Wilk), prueba de homogeneidad (Levene), análisis de la varianza (ANOVA robusto) y prueba post-hoc (Tukey robusto) para comparaciones múltiples. Se consideró con significancia estadística con $p<0.05$. Se utilizó el programa Rstudio (R Core Team, 2024) con el paquete tidyverse (Wickham, 2019) para edición de base de datos, nortest (Gross y Ligges, 2015) para la prueba de normalidad, car (Fox y Weisberg, 2019) para la prueba de homogeneidad y WRS2 (Mair y Wilcox, 2020) para el ANOVA y Tukey robusto.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Aislamiento bacteriano

De las 16 muestras se aislaron 3 bacterias hemolíticas a partir de muestras de pulmón y tráquea, las cuales en placas de agar sangre presentaban colonias circulares 2 de color grisáceas traslucidas y 1 de color grisáceo no translucida, todas presentaban un diámetro entre 1 y 2 mm (las cepas fueron denominas con números consecutivos conforme fueron aisladas, es decir: cepa 1, cepa 2 y cepa 3, como se observa en la Figura 1). Chavez *et al*. (2017) y Matias *et al.* (2024) describieron bacterias aisladas de aves de corral hemolíticas con crecimiento colonial entre 1 a 2 mm grisáceas, transparentes y circulares cuando se realiza el crecimiento en con alto contenido nutrimental y sangre al cabo de 24 h a 37 °C, que forman una amplia zona de β-hemólisis alrededor de la colonia en placas de agar sangre, estas colonias han sido reportadas para el organismo bacteriano *Gallibacterium anatis,* lo cual concuerda con las cepas 1 y 2. Así mismo, Vo *et al.* (2022) y Nowaczek *et al*. (2023), describen las colonias aisladas de aves en agar sangre con un diámetro de 1 a 2 mm, son grisáceas o moco blanco, convexas, con forma de gota de rocío y lisas, redondas, ligeramente húmedas, no hemolíticas a las 24 h y después de 24-48 h de incubación a 37°C presentan hemólisis indicando que perteneces a *Riemerella anatipestifer,* lo cual concuerda con la cepa 3 aislada en este trabajo (Figura 1).



Cepa 1 **Cepa 2** **Cepa 3**

Figura 1. Morfología de aislamientos bacterianos provenientes de muestras de aves

6.2 Tinción de Gram

Las tinciones realizadas a las 3 bacterias aisladas fueron Gram negativas donde se observaron coco-bacilos de color de rojo o rosa intenso, no esporulados (Figura 2), dado que dicho organismo posee una capa de peptidoglicano delgada, lo cual permite teñirse con mayor facilidad de safranina. Karwanska *et al.* (2023) y Matias *et al.* (2024) observaron bacterias Gram-negativa, anaeróbica facultativa, con forma de coco bacilo, lo cual concuerda con las cepas 1 y 2. Así mismo, Vo *et al.* (2022) y Nowaczek *et al*. (2023), describieron Gram negativos a las bacterias aisladas, no forman esporas y tienen forma de varilla regular con extremos redondeados, lo cual concuerda con la cepa 3.

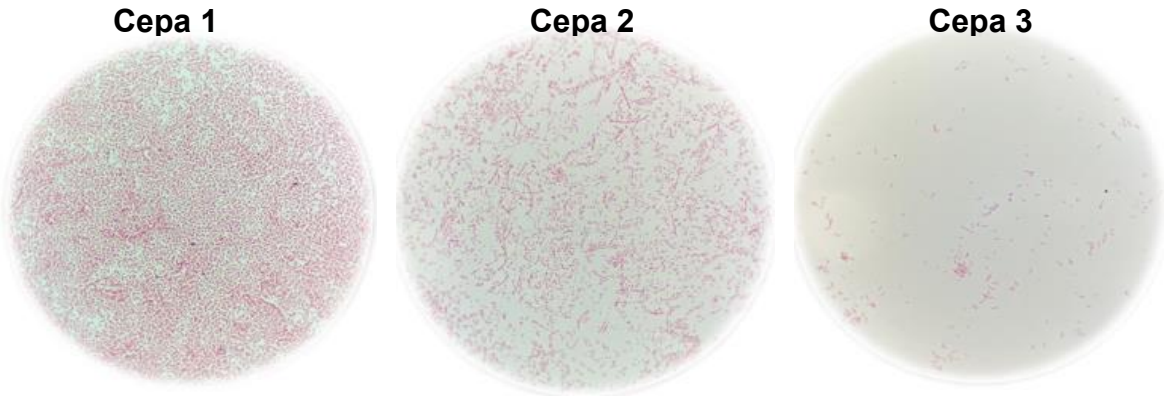


Figura 2. Tinción de Gram negativa de los organismos aislados, los cuales poseen forma de bacilo.

6.3 Identificación por Pruebas bioquímicas

La identificación de las tres bacterias aisladas de aves se realizó al observar su metabolismo al utilizar distintas pruebas bioquímicas como se indica en el cuadro 2, se detectó solo dos organismos *Gallibacterium anatis* (Cepa 1 y 2) y *Reimerella anatipestifer* (cepa 3), los cambios en los distintos medios se compararon con lo descrito por Mendoza *et al.* (2014) y Matias *et al*. (2024), en su identificación de cepas de *G. anatis* por medio de fermentación de carbohidratos; así mismo el Manual Terrestre de la OIE (2022), describe las diferencias en el cambio de pruebas bioquímicas para *G. anatis* y *R. anatipestifer*, destacando el comportamiento de

forma similar a lo observado por las cepas aisladas (1, 2 y 3), sin embargo, es necesario su caracterización genética de cada uno de los organismos o bien confirmar por laboratorio de referencia para su confirmación en los biovariedades o serotipos.

Cuadro 2. Pruebas bioquímicas realizadas para la identificación de las 3 bacterias aisladas de aves.

N°	**Prueba bioquímica**	**Resultado**			**Observaciones**
		Cepa 1	**Cepa 2**	**Cepa 3**	
1	Agar hierro triple azúcar (TSI)	**+**	**+**	**-**	Fermentación de glucosa (cepas 1 y 2), lactosa sacarosa negativas (todas), sin presencia de ácido sulfhídrico y gas. Viraje N/A (Cepas 1 y 2) y N/N (Cepa 3).
2	Agar lisina hierro (LIA)	**+**	**+**	**-**	Fermenta la glucosa (cepas 1 y 2), lisina, sin presencia de ácido sulfhídrico y gas. Viraje A/N (Cepas 1 y 2) y N/N (Cepa 3).
3	Sulfuro indol motilidad (SIM)	**-**	**-**	**-**	El organismo no posee la capacidad de producir ácido sulfhídrico y gas, así mismo no cuenta con movimiento.
4	Gelatina nutritiva	**-**	**-**	**+**	Enzima gelatinasa hidrolisa la gelatina
5	Bilis Esculina	**-**	**-**	**-**	Carece de la enzima encargada de hidrolizar la esculina.
6	Sorbitol	**+**	**+**	**-**	Fermentación de la glucosa
7	Urea	**-**	**-**	**-**	Falta de presencia de la enzima ureasa.
8	Catalasa	**+**	**+**	**+**	Catalasa, enzima involucrada de la destrucción del peróxido de hidrógeno.
9	Oxidasa	**-**	**+**	**-**	Enzima oxidasa, la cual reacciona oxidando el citocromo reduciéndolo a hidrógeno o agua, dependiendo la especie bacteriana

N= neutro, A= ácido

6.4 Susceptibilidad antimicrobiana

La resistencia a los antibióticos es un problema importante y urgente que debe entenderse y abordarse. La prueba de antibiograma reveló que las 2 cepas aisladas pertenecientes al género *G*. *anatis*, presenta una alta sensibilidad a aminoglucósidos y baja resistencia a beta lactámicos y quinolonas, difiriendo a lo descrito por Karwanska *et al*. (2023), resistencia microbiana a penicilinas, quinolonas, aminoglucósidos, beta lactámicos y macrólidos, todos antimicrobianos que se han utilizado durante años en el tratamiento de infecciones humanas y animales, destacando que la resistencia a los agentes antimicrobianos de estas clases está muy extendida entre el género *Gallibacterium* spp. Sin embargo, coincide a los descrito por Mendoza *et al.* (2014) y Cepeda-Quintero *et al.* (2022) donde *G. anatis* presentó resistencia a betalactámicos (ampicilina, FR: ≤ 26 mm; S: ≥ 27 mm), quinolonas (ciprofloxacina, R: ≤ 20 mm, S: ≥ 21 mm; norfloxacina, R: ≤ 16 mm, S: ≥ 17 mm) y sulfonamidas (trimetoprim/sulfametoxazol, R: ≤ 23 mm; S: ≥ 24 mm) con base en los criterios establecidos por CLSI, 2015 e ID, 2020. Esto indica que la variabilidad mostrada de resistencia a antibióticos puede deberse a que son diferentes serotipos, pues las cepas estudiadas de *G. anatis* presentan diversos perfiles de resistencia a los antimicrobianos como se observa en el (Cuadro 3). La cepa 3 correspondiente a *R. anatipestifer* muestran resistencia a todos los antibióticos probados excepto a las quinolonas donde muestra sensibilidad (Cuadro 3), lo cual es indicativo que es un organismo distinto y se tiene que trabajar en su caracterización genética para caracterizar el serotipo; esto es similar a lo descrito por Xihui *et al.* (2023) en su detección de resistencia bacteriana con *R. anatipestifer* pues presentó un alto nivel de resistencia a los antibióticos como a los aminoglucósidos, trimetoprima, lincosamidas, polipéptidos, macrólidos y 80% a quinolonas mientras que la prevalencia de resistencia a ciprofloxacino y levofloxacino fue solo del 9,8%. Estos resultados indican la necesidad de no sólo determinar la resistencia a los antibióticos, sino también buscar los efectos de largo alcance en la propagación y transferencia de genes de resistencia en las bacterias aisladas industrias ganadera y avícola y a los seres humanos.

Cuadro 3. Sensibilidad de antibóticos para Gram negativos (*Gallibacterium anatis* y *Reimerella anatipestifer*).

Antibiótico	***G. anatis* #1**	***G. anatis* #2**	***R. anatipestifer* #3**	**Resistencia (%)**	**Sensibilidad (%)**	**Literatura citada**
Aminoglucósidos						
Amikacina	**S**	**S**	**R**	33.33	66.66	ID, 2020
Gentamicina	**S**	**S**	**R**	33.33	66.66	ID, 2020
Netilmicina	**S**	**S**	**R**	33.33	66.66	ID, 2020
Betalactámicos						
Ampicilina	**R**	**R**	**R**	100	0	CLSI, 2015
Carbenicilina	**R**	**S**	**R**			ID, 2020
Cefalotina	**S**	**S**	**R**	33.33	66.66	ID, 2020
Cefotaxima	**S**	**S**	**R**	33.33	66.66	ID, 2020; CLSI, 2022
Cloranfenicoles						
Cloranfenicol	**S**	**S**	**R**	33.33	66.66	ID, 2020
Nitrofuranos						
Nitrofurantoína	**S**	**S**	**R**	33.33	66.66	ID, 2020
Quinolonas						
Ciprofloxacina	**R**	**R**	**S**	66.66	33.33	ID, 2020;
Norfloxacina	**S**	**R**	**S**	33.33	66.66	ID, 2020
Sulfonamidas						
Trimetoprim/ Sulfametoxazol	**R**	**R**	**R**	100	0	CLSI, 2015; ID, 2020

R= resistente, S= sensible, ID= Laboratorio Investigación diagnóstica, CLSI= Clinical and Laboratory Standards Institute.

6.5 Efecto Inhibitorio del Ajo

En cuanto a las pruebas de susceptibilidad al extracto de ajo al 100% se observa efecto significativo sobre las bacterias G. anatis y *R. anatipestifer*; cuando los datos se pasaron por la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk (con <50 observaciones) en este caso, 45 observaciones, los resultados del análisis mostraron una $p < 0.05$, lo cual indica una distribución no normal y presenta un sesgo a la derecha. Se realizaron varias trasformaciones, pero ninguna logró normalizar los datos. Posterior a la prueba de normalidad se evaluó la homogeneidad de las varianzas utilizando la prueba de Levene. El resultado fue de $p > 0.05$, lo que sugiere varianzas homogéneas (Figura 3).

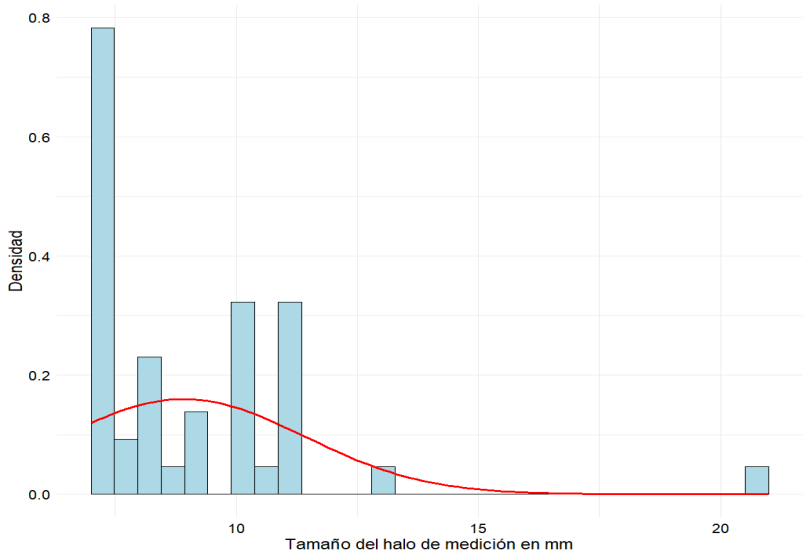


Figura 3. Histograma con curva de normalidad del efecto del ajo en bacterias Gram negativas de aves.

Al cumplir con el supuesto de homogeneidad de las varianzas, se optó por utilizar la prueba de ANOVA robusta. A diferencia del ANOVA tradicional, esta prueba no requiere cumplir con el supuesto de normalidad. Los datos utilizados para la variable dependiente fueron las mediciones de los halos de inhibición (mm) y la variable independiente fueron los tres tipos de bacterias. El valor de $p < 0.05$ indica diferencia significativa en al menos una media de los halos de inhibición es significativamente diferente entre los tipos de bacterias como se observa en la Figura 4.

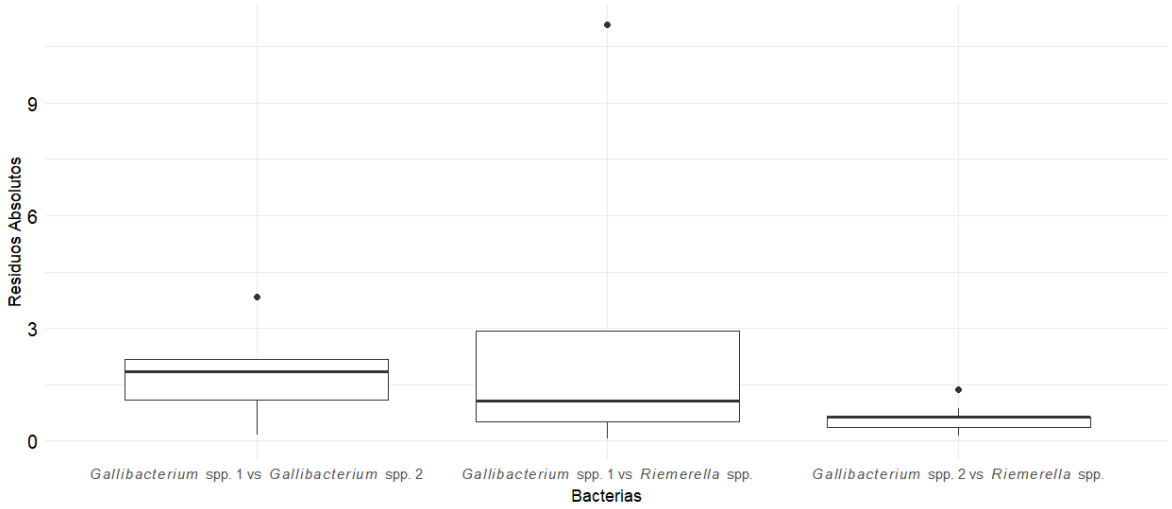


Figura 4. Homogeneidad de varianzas entre las cepas aisladas

Así mismo, se realizó la prueba Post-hoc de Tukey robusta para determinar la diferencia de medias los resultados mostraron lo siguiente: la diferencia entre *Gallibacterium* spp 2 y *Riemerella* spp es estadísticamente significativa ($p < 0.05$, IC 95%: 0.1111, 3.6111); esto indica que hay una diferencia en el tamaño del halo de inhibición entre estos dos grupos, donde *Gallibacterium* spp 2 mostró un tamaño de halo de inhibición mayor. La diferencia entre *Gallibacterium* spp 1 y *Riemerella* spp no es estadísticamente significativa ($p > 0.05$, IC 95%: -2.88889, 1.66667); lo cual, significa que no hay evidencia suficiente para decir que el tamaño del halo de inhibición es diferente entre estos dos grupos de bacterias. Por último, la diferencia entre *Gallibacterium* spp 2 y *Gallibacterium* spp 1 es estadísticamente significativa ($p < 0.05$, IC 95%: -0.1111, 3.1667). Esto indica que hay una diferencia significativa en el tamaño del halo de inhibición entre estos dos grupos, con *Gallibacterium* spp 2 mostrando un tamaño de halo de inhibición mayor.

Por lo tanto, se puede observar en la Figura 5, *Gallibacterium* spp 2 muestra un tamaño de halo de inhibición significativamente mayor en comparación con *Riemerella* spp y *Gallibacterium* spp 1 ($p < 0.05$). *Riemerella* spp no muestra una diferencia significativa en comparación con *Gallibacterium* spp 1 ($p > 0.05$), lo que sugiere que el extracto de ajo tiene un efecto similar en ambos grupos. Por lo tanto, *Gallibacterium* spp 2 es la bacteria más afectada por el extracto de ajo, debido a la

presencia de mayor tamaño de halo de inhibición en comparación con los otros grupos.

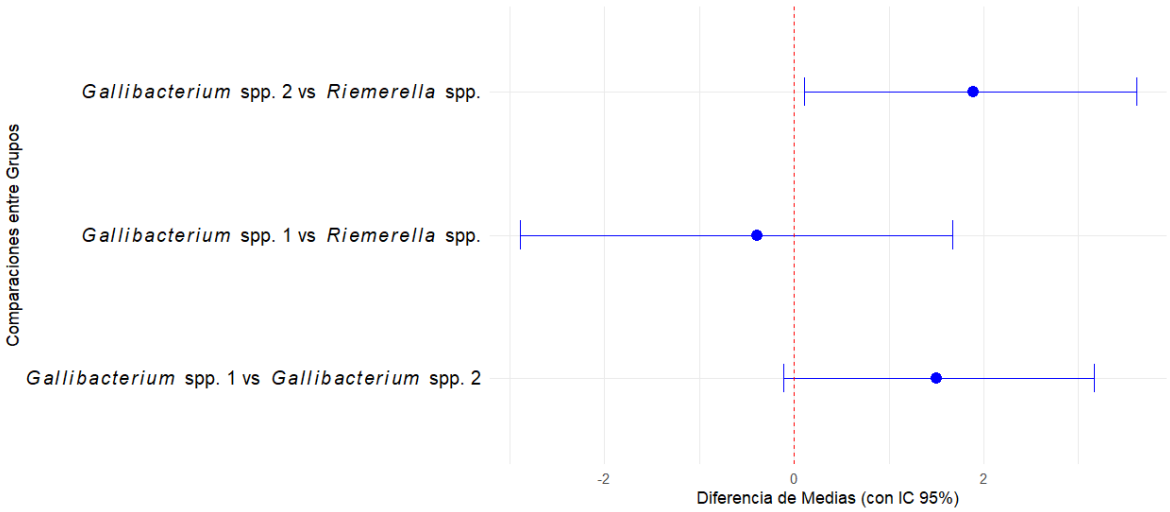


Figura 5. Comparaciones de medias por Post-hoc Robusta - Prueba Tukey robusta.

Un estudio previo en *Pasteurella* spp, descrito por Mekala *et al.* (2013) observaron que la enrofloxaína como el extracto al 100% registraron una zona de inhibición similar indicando que el ajo tiene un amplio espectro de actividad significativa contra este microorganismo Gram negativo, sin embargo, la bacteria no era hemolítica.

La actividad antibacteriana del ajo se ha atribuido a más de 100 compuestos fitoterapéuticos de azufre presentes en concentraciones variables, además de 17 aminoácidos, enzimas, sales minerales, vitaminas y aceites esenciales. Entre ellos se incluyen la alicina y los tiosulfinatos que se forman al triturar la enzima alicinasa inducida por la activación metabólica en el aminoácido alicina (Magrys *et al*., 2020).

Por lo cual, el ajo es una alternativa a los antibióticos que se utilizan actualmente, o bien, debido a la reciente aparición de cepas bacterianas con multirresistencia a los antibióticos, se sugiere la combinación de extractos de ajo y antibióticos disponibles en el mercado con sinergismo parcial o completo para su uso en la prevención de las infecciones respiratorias en aves causadas por bacterias Gram negativas hemolíticas.

VII. CONCLUSIONES

La presencia de bacterias patógenas aisladas e identificadas bioquímicamente de pulmón y traquea de aves de corral, están representadas por dos géneros bacterianos Gram negativas y hemolíticos, las cuales fueron *G*. *anatis* y *R*. *anatipestifer*, lo cual indica patógenos respiratorios adquirieron la infección por exposición o dispersión entre los mismos animales o bien con convivio las aves de corral con aves silvestres. La presencia de sensibilidad a aminoglucósidos baja resistencia a beta lactámicos y quinolonas por parte de *G*. *anatis* y la multiresistencia a todos los antibióticos probados excepto quinolonas por *R*. *anatipestifer*, indica la utilización indiscriminada de antibióticos en la producción avícola y su bajo control sanitario; por lo cual la exploración de alternativas a los antibióticos como el ajo (Allium sativum) son excelentes vías para su utilidad de contrarrestar infecciones en estas granjas debido a su susceptibilidad al extracto de ajo al 100%, al observase un efecto significativo sobre las bacterias *G*. *anatis*, sin embargo, es necesario continuar con una exhaustiva búsqueda de control para *R. anatipestifer* debido a la multiresistencia presentada.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. A, K. M., Zavaleta, A. I., Koga, Y., B, J. R., S, A. A., & R, R. T. (2014). Variabilidad Genética De Cepas De Gallibacterium Anatis Aisladas De Aves Comerciales Del Perú Con Infecciones Respiratorias. *Revista De Investigaciones Veterinarias Del Perú*, *25*(2). Https://Doi.Org/10.15381/Rivep.V25i2.8496
2. Abd El-Ghany, W. A., Algammal, A. M., Hetta, H. F., & Elbestawy, A. R. (2023). Gallibacterium Anatis Infection In Poultry: A Comprehensive Review. *Tropical Animal Health And Production*, *55*(6), 383.
3. Achimón, F., Brito, V. D., Pizzolitto, R. P., Sanchez, A. R., Gómez, E. A., & Zygadlo, J. A. (2021). Chemical Composition And Antifungal Properties Of Commercial Essential Oils Against The Maize Phytopathogenic Fungus Fusarium Verticillioides. *Revista Argentina De Microbiología*, *53*(4), 292-303. Https://Doi.Org/10.1016/J.Ram.2020.12.001
4. Algammal, A. M., Abo Hashem, M. E., Alfifi, K. J., Al-Otaibi, A. S., Alatawy, M., Eltarabili, R. M., Abd El-Ghany, W. A., Hetta, H. F., Hamouda, A. M., Elewa, A. A., & Azab, M. M. (2022). Sequence Analysis, Antibiogram Profile, Virulence And Antibiotic Resistance Genes Of Xdr And Mdr *Gallibacterium Anatis* Isolated From Layer Chickens In Egypt. *Infection And Drug Resistance*, *15*, 4321–4334. Https://Doi.Org/10.2147/Idr.S377797
5. Algammal, A. M., Hashem, M. E. A., Alfifi, K. J., Al-Otaibi, A. S., Alatawy, M., Eltarabili, R. M., El-Ghany, W. A. A., Hetta, H. F., Hamouda, A. M., Elewa, A. A., & Azab, M. M. (2022). Sequence Analysis, Antibiogram Profile, Virulence And Antibiotic Resistance Genes Of Xdr And Mdr Gallibacterium Anatis Isolated From Layer Chickens In Egypt. *Infection And Drug Resistance*, *Volume 15*, 4321-4334. Https://Doi.Org/10.2147/Idr.S377797
6. Al-Natour, M. Q., Rohaim, M. A., Naggar, R. F. E., Abdelsabour, M. A., Afify, A. F., Madbouly, Y. M., & Munir, M. (2024). Respiratory Disease Complex

Due To Mixed Viral Infections In Chicken In Jordan. Poultry Science, 103(4), 103565. Https://Doi.Org/10.1016/J.Psj.2024.103565

7. Alves, R. R., De Andrade, B. R. D., Da Costa Silva, A., & Da Silva, M. L. R. B. (2021). Atividade Antimicrobiana Do Extrato De (Allium Sativum, Liliaceae) In Natura E Do Extrato Aquoso Frente Candida Albicans, Staphylococcus Aureus E Streptococcus Pyogenes. Research, Society And Development, 10(7), E10610716206-E10610716206.
8. Ammar Am, El-Aziz Nka, El Wanis Sa, Bakry Nr. 2016. Molecular Versus Conventional Culture For Detection Of Respiratory Bacterial Pathogens In Poultry. *Cellular And Molecular Biology*. 62(2): 52-56. Issn: 1165-158x.
9. Appusamy, Jagadeeswaran. (2013). Evaluation Of In Vitro Antibacterial Effect Of Garlic Against Poultry Pathogens.. Shanlax International Journal Of Veterinary Science. Volume 1. Pp. 12 -14.
10. Ataei S, Bojesen Am, Amininajafi F, Ranjbar Mm, Banani M, Afkhamnia M, Abtin A, Goodarzi H. 2017. First Report Of *Gallibacterium* Isolation From Layer Chickens In Iran. *Archives Of Razi Institute*. 72(2):123-128. Https://Doi.Org/10.22092/Ari.2017.109842
11. Atere Av, Bamikole Am, Oluyege Ao, Ajurojo Oa, Alo Os. 2016. Prevalence And Antibiotic Resistance Of *Pasteurella Multocida* Isolated From Chicken In Ado-Ekiti Metrópolis. *Scientific World*. 4(2):40-42. Https://Doi.Org/10.14419/Ijsw.V4i2.6273
12. Bagust Tj. 2013. Salud De Las Aves De Corral Y Control De Enfermedades En Los Países En Desarrollo. En: Revisión Del Desarrollo Avícola. Editorial Organización De Las Naciones Unidas Para La Alimentación Y La Agricultura (Fao). Pp. 102. Isbn: 978-92-5-308067-0 (Pdf). Http://Www.Fao.Org/3/A-I3531s.Pdf
13. Baños, A., & Guillamón, E. (2014). Utilización De Extractos De Ajo Y Cebolla En Producción Avícola. Selecciones Avícolas, 56(1), 7-9.
14. Benkeblia, N. 2004. Antimicrobial Activity Of Essential Oil Extracts Of Various Onions (*Allium Cepa*) And Garlic (*Allium Sativum*). Lebensm. Wiss. Technol. 37(2004): 263–268. Doi:10.1016/J.Lwt.2003.09.001

15. Bora, H., Kamle, M., Mahato, D. K., Tiwari, P., & Kumar, P. (2020). Citrus Essential Oils (Ceos) And Their Applications In Food: An Overview. *Plants*, *9*(3), 357. Https://Doi.Org/10.3390/Plants9030357
16. Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto Ja, Valdezate 2011. Métodos De Identificación Bacteriana En El Laboratorio De Microbiología. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*. 29(8):601–608. Https://Doi.Org/10.1016/J.Eimc.2011.03.012
17. Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). Métodos De Identificación Bacteriana En El Laboratorio De Microbiología. Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica, 29(8), 601–608. Https://Doi.Org/10.1016/J.Eimc.2011.03.012
18. Braykov Np, Eisenberg Jns, Grossman M, Zhang L, Vasco K, Cevallos W, Muñoz D, Acevedo A, Moser Ka, Marrs Cf, Foxman B, Trostle J, Trueba G, Levy K. 2016. Antibiotic Resistance In Animal And Environmental Samples Associated With Small-Scale Poultry Farming In Northwestern Ecuador. *Msphere* 1(1):E00021-15. Https://Doi.Org/10.1128/Msphere.00021-15
19. Brochu Nm, Guerin Mt, Varga C, Lillie Bn, Brash Ml, Susta L. 2019. A Two-Year Prospective Study Of Small Poultry Flocks In Ontario, Canada, Part 1: Prevalence Of Viral And Bacterial Pathogens. *Veterinary Diagnostic Investigation*. 31(3):327–335. Https://Doi.Org/10.1177/1040638719843577
20. Bzdil, J., Šlosárková, S., Fleischer, P., Zouharová, M., & Matiašovic, J. (2024). Characterization Of Gallibacterium Anatis Isolated From Pathological Processes In Domestic Mammals And Birds In The Czech Republic. *Pathogens*, *13*(3), 237.
21. Cepeda-Quintero, H., Gaxiola, S.., Castro C.B., Portillo, J.J. y Enríquez Verdugo, I. (2022). Identificación Y Resistencia Antimicrobiana De Bacterias De Tráquea De Gallinas Ponedoras. *Abanico Veterinario*, *12*. Https://Doi.Org/10.21929/Abavet2022.26
22. Cerezo Tigrero, D. I. (2024). La Importancia Del Uso De La Biotecnología Vegetal En El Ecuador (Bachelor's Thesis, Babahoyo: Utb, 2024).

23. Clsi (Clinical And Laboratory Standards Institute). 2015. Methods For Antimicrobial Dilution And Disk Susceptibility Testing Of Infrequently Isolated Or Fastidious Bacteria. 3rd Ed. Clsi Guideline M45. Pp. 120. (Isbn 1-56238-917-3 [Print]; Isbn 1-56238-918-1 [Electronic]). Clinical And Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 Usa. Https://Goums.Ac.Ir/Files/Deputy_Treat/Md_Labs_Ef39a/Files/Clsi-M45ed3e-2018(1).Pdf
24. Clsi (Clinical And Laboratory Standards Institute). 2017. Methods For Antimicrobial Susceptibility Testing Of Infrequently Isolated Or Fastidious Bacteria Isolated From Animals,1st Ed. Clsi Supplement Vet06. Pp. 114. (Isbn 1-56238-810-X [Print]; Isbn 1-56238- 811-8 [Electronic]). Clinical And Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 Usa. Https://Clsi.Org/Media/1524/Vet06ed1_Sample.Pdf
25. Clsi (Clinical And Laboratory Standards Institute). 2018. Methods For Dilution Antimicrobial Susceptibility Test For Bacteria That Grow Aerobically. 11th Edition. Clsi Standard M07. Pp. 91. (Isbn 1-56238-836-3 [Print]; Isbn 1-56238-837-1 [Electronic]). Https://Community.Clsi.Org/Media/1928/M07ed11_Sample.Pdf
26. Clsi (Clinical And Laboratory Standards Institute). 2021. Performance Standards For Antimicrobial Susceptibility Testing. 31st Ed. Clsi Supplement M100. Pp. 352. Isbn 978- 1-68440-104-8 [Print]; Isbn 978-1-68440-105-5 [Electronic]). Clinical And Laboratory Standards Institute, Usa. Https://Clsi.Org/Media/3481/M100ed30_Sample.Pdf
27. Colas Cmc, Lamazares Mc, Pérez Gl, Sosa Tim, Abeledo Ma, Merino La, Fuente D, Gómez Áe. 2011ª. Evaluación Epidemiológica De Procesos Respiratorios Bacterianos En Reemplazos De Ponedoras. *Salud Animal*. 33(3):178-183. Issn: 0253-570x. Http://Revistas.Censa.Edu.Cu/Index.Php/Rsa/Article/View/266

28. Colás Cmc, Lamazares Mc, Pérez Gl, Sosa Tim, Abeledo Ma, Merino La, Fuente D, Gómez Áe. 2011[b]. Evaluación Epidemiológica De Procesos Respiratorios Bacterianos En Gallinas Ponedoras. *Salud Animal*. 33(2):69-75. Issn: 0253-570x. Http://Revistas.Censa.Edu.Cu/Index.Php/Rsa/Article/View/247
29. Colas M, Merino M, Santana Y, Miranda Y, Bacallao N, Lobo E, Vega A. 2010. Serological Study Of Agents Associated To Chronic Respiratory Syndrome In Laying Hens. *Biotecnología Aplicada*. 27(3):232-236. Issn 1027-2852. Http://Scielo.Sld.Cu/Scielo.Php?Pid=S102728522010000300006&Script=Sci_Abstract&Tlng=Pt
30. Davies J, Davies D. 2010. Origins And Evolution Of Antibiotic Resistance. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*. 74(3):417-433. Https://Journals.Asm.Org/Doi/10.1128/Mmbr.00016-10
31. Dawan, J., & Ahn, J. (2022). Bacterial Stress Responses As Potential Targets In Overcoming Antibiotic Resistance. Microorganisms, 10(7), 1385. Https://Doi.Org/10.3390/Microorganisms10071385
32. De Kraker, M. E., Stewardson, A. J., & Harbarth, S. (2016). Will 10 Million People Die A Year Due To Antimicrobial Resistance By 2050? Plos Medicine, 13(11). Https://Doi.Org/10.1371/Journal.Pmed.1002184
33. De La Cruz Lm. 2016. Aislamiento Y Caracterización De *Mycoplasma Synoviae* Y Otras Bacterias Asociadas Al Complejo Respiratorio Aviar En Pollos De Engorde De La Provincia Manabí, Ecuador. *Salud Animal*. 38(3):199-199. Issn: 2224-4700. Http://Revistas.Censa.Edu.Cu/Index.Php/Rsa/Article/View/861
34. De La Cruz-Veliz, L., Espinosa, I., Báez, M., & Lobo, E. 2018. *Bordetella Avium* Y *Escherichia Coli* En Pollos De Engorde De La Provincia Manabí, Ecuador. Revista De Salud Animal, 40: 1-8.
35. El-Adawy H, Bocklisch H, Neubauer H, Hafez Hm, Hotzel H. 2018. Identification, Differentiation And Antibiotic Susceptibility Of *Gallibacterium* Isolates From Diseased Poultry. *Irish Veterinary*. 71(1):5. Http://Dx.Doi.Org/10.1186/S13620-018-0116-2

36. Elbestawy Ar, Ellakany Hf, El-Hamid Hsa, Bekheet Aa, Mataried Ne, Nasr Sm, Amarin Nm. 2018. Isolation, Characterization, And Antibiotic Sensitivity Assessment Of *Gallibacterium Anatis Biovar Haemolytica*, From Diseased Egyptian Chicken Flocks During The Years 2013 And 2015. *Poultry Science.* 97(5):1519–1525 Http://Dx.Doi.Org/10.3382/Ps/Pey007
37. Espinosa I, Colas M, Vichi J, Báez M, Martínez S. 2011. Isolation And Identification Of *Ornithobacterium Rhinotracheale* From Laying Hens In Farms Of La Habana Province. *Salud Animal*. 33(1):38-43. Issn: 2224-4700.Https://Www.Researchgate.Net/Publication/228483199
38. Fira. 2019. Panorama Agroalimentario: Carne De Pollo. Dirección De Investigación Y Evaluación Económica Y Sectorial, 2:3-21.
39. Fira. 2024. Panorama Agroalimentario: Carne De Pollo. Dirección De Investigación Y Evaluación Económica Y Sectorial, 2:3-21.
40. Fox J, Weisberg S (2019). An R Companion To Applied Regression , Third Edition. Sage, Thousand Oaks Ca. <Https://Socialsciences.Mcmaster.Ca/Jfox/Books/Companion/>.
41. Glendinning L, Mclachlan G, Vervelde L. 2017. Age-Related Differences In The Respiratory Microbiota Of Chickens. *Plos One.* 12(11):E0188455. Https://Doi.Org/10.1371/Journal.Pone.0188455
42. Glisson Jr. 1998. Bacterial Respiratory Diseases Of Poultry. *Poultry Science* 77(8):1139–1142. Https://Doi.Org/10.1093/Ps/77.8.1139
43. González. Maza, M., Guerra Ibañez, G., Maza Hernández, J., & Cruz Dopico, A. (2017). Revisión Bibliográfica Sobre El Uso Terapéutico Del Ajo. *Revista Cubana De Medicina Física Y Rehabilitación, 6*(1). Recuperado De Https://Revrehabilitacion.Sld.Cu/Index.Php/Reh/Article/View/161/167
44. Gross J, Ligges U (2015). Nortest: Tests For Normality. R Package Version 1.0-4, <Https://Cran.R-Project.Org/Package=Nortest>.
45. Grover, A., Chandra, S., Prithvi, P. P. R., Srija, K., & Jauhari, S. (2020). Antimicrobial Resistance: Call For Rational Antibiotics Practice In India. Journal Of Family Medicine And Primary Care, 9(5), 2192. Https://Doi.Org/10.4103/Jfmpc.Jfmpc_1077_19

46. Hernández, A. C. (2014). Poultry And Avian Diseases. En Elsevier Ebooks (Pp. 504-520). Https://Doi.Org/10.1016/B978-0-444-52512-3.00183-2
47. Hitchener, G. (2021,). *Infección Por Riemerella Anatipestifer En Aves De Producción*. Manual De Veterinaria De Msd. Https://Www.Msdvetmanual.Com/Es/Avicultura/Infecci%C3%B3n-Por-Riemerella-Anatipestifer-Nueva-Enfermedad-Del-Pato-Serositis-Infecciosa-Infecci%C3%B3n-Por-Pasteurella-Anatipestifer/Infecci%C3%B3n-Por-Riemerella-Anatipestifer-En-Aves-De-Producci%C3%B3n
48. Hou, J., Long, X., Wang, X., Li, L., Mao, D., Luo, Y., & Ren, H. (2023). Global Trend Of Antimicrobial Resistance In Common Bacterial Pathogens In Response To Antibiotic Consumption. *Journal Of Hazardous Materials*, *442*, 130042. Https://Doi.Org/10.1016/J.Jhazmat.2022.130042
49. Http://Www.Cellmolbiol.Org/Index.Php/Cmb/Article/View/799/409
50. Id (Investigación Diagnóstica). 2020. Laboratorio De Reactivos Para Diagnóstico. Abel Gutiérrez. Http://Quimex.Com.Mx/Wp-Content/Uploads/2021/01/Multibac-Multidiscos- Antibiogramas.Pdf
51. Jinia Afroz, Md. Al Masud, Esrat Jahan, Ajoy Chowdhury, Md. Fakruddin, & Md. Asaduzzaman Shishir. (2023). Multi-Antibiotic Resistant Citrobacter Freundii In Eggs: A Silent Public Health Threat. *Microbial Bioactive*, *6*(1). Https://Doi.Org/10.25163/Microbbioacts.61910a
52. Jorgensen Jh, Ferraro Mj. 2000. Antimicrobial Susceptibility Testing: Special Needs For Fastidious Organisms And Difficult-To-Detect Resistance Mechanisms. *Clinical Infectious Diseases*. 30(5):799–808. Issn 1058-4838. Https://Doi.Org/10.1086/313788
53. Karwańska, M., Wieliczko, A., Bojesen, A. M., Villumsen, K. R., Krzyżewska-Dudek, E., & Woźniak-Biel, A. (2023). Isolation And Characterization Of Multidrug Resistant Gallibacterium Anatis Biovar Haemolytica Strains From Polish Geese And Hens. Veterinary Research, 54(1). Https://Doi.Org/10.1186/S13567-023-01198-2
54. Krishnegowda Dn, Dhama K, Mariappana Ak, Munuswamya P, Yatoob Mi, Tiwaric R, Karthikd K, Bhatte P, Reddy Mr. 2020. Etiology, Epidemiology,

Pathology, And Advances In Diagnosis, Vaccine Development, And Treatment Of *Gallibacterium Anatis* Infection In Poultry: A Review. *Veterinary Quarterly*. 40(1):16–34. Https://Doi.Org/10.1080/01652176.2020.1712495

55. Krishnegowda, D. N., Dhama, K., Mariappan, A. K., Munuswamy, P., Yatoo, M. I., Tiwari, R., Karthik, K., Bhatt, P., & Reddy, M. R. (2020). Etiology, Epidemiology, Pathology, And Advances In Diagnosis, Vaccine Development, And Treatment Ofgallibacterium Anatisinfection In Poultry: A Review. *Veterinary Quarterly*, *40*(1), 16-34. Https://Doi.Org/10.1080/01652176.2020.1712495
56. Kursa, O., Tomczyk, G., Sieczkowska, A., & Sawicka-Durkalec, A. (2024). Antibiotic Resistance Of *Gallibacterium Anatis* Biovar *Haemolytica* Isolates From Chickens. *Journal Of Veterinary Research*, *68*(1), 93–100. Https://Doi.Org/10.2478/Jvetres-2024-0007
57. Kursa, O., Tomczyk, G., Sieczkowska, A., & Sawicka-Durkalec, A. (2023). Prevalence, Identification And Antibiotic Resistance Of *Gallibacterium Anatis* Isolates From Chickens In Poland. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, *12*(8), 992. Https://Doi.Org/10.3390/Pathogens12080992
58. Liu, J., Hao, D., Ding, X., Shi, M., Wang, Q., He, H., Cheng, B., Wang, M., Wang, Q., Xiang, Y., & Chen, L. (2024). Epidemiological Investigation And B-Lactam Antibiotic Resistance Of Riemerella Anatipestifer Isolates With Waterfowl Origination In Anhui Province, China. Poultry Science, 103490. Https://Doi.Org/10.1016/J.Psj.2024.103490
59. Magryś, A., Olender, A., & Tchórzewska, D. (2021). Antibacterial Properties Of Allium Sativum L. Against The Most Emerging Multidrug-Resistant Bacteria And Its Synergy With Antibiotics. Archives Of Microbiology, 203(5), 2257-2268. Https://Doi.Org/10.1007/S00203-021-02248-Z
60. Mair P, Wilcox R (2020). “Robust Statistical Methods In R Using The Wrs2 Package.” Behavior Research Methods , *52*. Doi:10.3758/S13428-019-01246-W <Https://Doi.Org/10.3758/S13428-019-01246-W>.
61. Mardani, N., Jahadi, M., Sadeghian, M., Keighobadi, K., & Khosravi-Darani, K. (2023). Antimicrobial Activities, Phenolic And Flavonoid Contents,

Antioxidant And Dna Protection Of The Internal And Outer Layers Of Allium Cepa L. From Iran. Nfs Journal, 31, 93-101. Https://Doi.Org/10.1016/J.Nfs.2023.03.003

62. Matias Vera, S. A., Sánchez Alonso, M. P., Negrete Abascal, E., & Vázquez Cruz, C. (2024). Las Aves De Granja Requieren Vacunarse Para Mantener La Producción De Alimentos Con Alto Valor Nutricional A Bajo Costo. *Rd-Icuap*, *10*(Especial), 150-163. Https://Doi.Org/10.32399/Icuap.Rdic.2448-5829.2024.Especial.1346
63. Mendoza, K., Rodríguez, J., Koga, Y & Alvarado, A. 2015. *Gallibacterium Anatis*: Un Patógeno Aviar Importante. Actualidad Avipecuaria, 6: 2-3.
64. Morehead, M. S., & Scarbrough, C. (2018). Emergence Of Global Antibiotic Resistance. Primary Care: Clinics In Office Practice, 45(3), 467–484. Https://Doi.Org/10.1016/J.Pop.2018.05.006
65. Murray, C. J. L., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A., Mcmanigal, B., … Naghavi, M. (2022). Global Burden Of Bacterial Antimicrobial Resistance In 2019: A Systematic Analysis. The Lancet, 399(10325), 629–655. Https://Doi.Org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0
66. Nassik S, Tallouzt S, Karbach N, Touzani C, Bidoudan Y, Aamarine N, Hess C. 2019. First Report Of Isolation Of *Gallibacterium Anatis* From Layer Chickens In Morocco With Decrease In Laying Performance. *Avian Diseases*. 63(4):727–730. Https://Doi.Org/10.1637/Aviandiseases-D-19-00119
67. Nassik, S., Tallouzt, S., Karbach, N., Touzani, C., Bidoudan, Y., Aamarine, N., & Hess, C. (2019). First Report Of Isolation Of Gallibacterium Anatis From Layer Chickens In Morocco With Decrease In Laying Performance. *Avian Diseases*, *63*(4), 727-730.
68. Nhung Nt, Chansiripornchai N, Carrique-Mas Jj. 2017. Antimicrobial Resistance In Bacterial Poultry Pathogens: A Review. *Frontiers In Veterinary Science*. 4:126. Https://Doi.Org/10.3389/Fvets.2017.00126

69. Nowaczek, A., Dec, M., Stępień-Pyśniak, D., Wilczyński, J., & Urban-Chmiel, R. (2023). Characterization Of Riemerella Anatipestifer Strains Isolated From Various Poultry Species In Poland. Antibiotics, 12(12), 1648. Https://Doi.Org/10.3390/Antibiotics12121648
70. Nworie A, Elom Mo, Gideon Ia, Azi So, Okekpa Si, Ukwah Bn, Usanga Vu, Okon Un, Chinwe E, Olayinka Bo, Onaolapo Ja, Ehinmidu Jo. 2016. Multi-Drug Resistant *Staphylococcus Aureus* From Poultry Farms In Ebonyi State, Nigeria. *Micro Biology, Genetics And Monocular Biology*. 2(3):1-11.Https://Www.Researchgate.Net/Publication/329589615
71. Nworie A, Elom Mo, Gideon Ia, Azi So, Okekpa Si, Ukwah Bn, Usanga Vu, Okon Un, Chinwe E, Olayinka Bo, Onaolapo Ja, Ehinmidu Jo. 2016. Multi-Drug Resistant *Staphylococcus Aureus* From Poultry Farms In Ebonyi State, Nigeria. *Micro Biology, Genetics And Monocular Biology*. 2(3):1-11. Https://Www.Researchgate.Net/Publication/329589615
72. Ojeda Vásquez, A. (2020). Importancia De Gallibacterium Anatis En Gallus Gallus.
73. Onu (Organización De Las Naciones Unidas). 2019. Se Avecina Una Crisis “Desastrosa” De Enfermedades Resistentes A Los Medicamentos. España. 7 P. Https://News.Un.Org/Es/Story/2019/04/1455011
74. Osman Km, Amer Am, Badr Jm, Saad Asa. 2015. Prevalence And Antimicrobial Resistance Profile Of *Staphylococcus* Species In Chicken And Beef Raw Meat In Egypt. *Foodborne Pathogens And Disease*. 12(5):406-413.Http://Dx.Doi.Org/10.1089/Fpd.2014.1882
75. Osuna Chávez, Reyna Fabiola, Molina Barrios, Ramón Miguel, Munguía Xóchihua, Javier Arturo, Hernández Chávez, Juan Francisco, López León, José Benito, Acuña Yanes, Martín, Fernández Martínez, Víctor Arturo, Robles Mascareño, Jorge, & Icedo Escalante, Jesús Gabriel Adrián. (2017). Resistencia Antimicrobiana De Gallibacterium Anatis Aisladas De Gallinas De Postura Comercial En Sonora, México. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, *8*(3), 305-312. Https://Doi.Org/10.22319/Rmcp.V8i3.4506

76. Osuna Crf, Molina Brm, Munguía Xja, Hernández Cjf, López Ljb, Acuña Ym, Fernández Mva, Robles Mj, Icedo Ejga. 2017. Resistencia Antimicrobiana De *Gallibacterium Anatis* Aisladas De Gallinas De Postura Comercial En Sonora, México. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*. 8(3):305-312.Http://Dx.Doi.Org/10.22319/Rmcp.V8i3.4506
77. Palmieri, N., Hess, C., & Hess, M. (2024). Gwas And Comparative Genomics Reveal Candidate Antibiotic Resistance Genes In The Avian Pathogen Gallibacterium Anatis For Six Widespread Antibiotics. Veterinary Microbiology, 290, 109995. Https://Doi.Org/10.1016/J.Vetmic.2024.109995
78. Petropoulos, S., A. Fernandes, L. Barros, A. Ciric, M. Sokovic And I. S. Ferreira 2018. Antimicrobial And Antioxidant Properties Of Various Greek Garlic Genotypes. Food Chem. 245(2018): 7-12. Doi.Org/10.1016/J.Foodchem.2017.10.078
79. R Core Team. 2024. R: A Language And Environment For Statistical Computing . R Foundation For Statistical Computing, Vienna, Austria. <Https://Www.R-Project.Org/>.
80. Ramírez-Concepción, H. R., Castro-Velasco, L. N., & Martínez-Santiago, E. (2016). Efectos Terapéuticos Del Ajo (Allium Sativum). *Revista Salud Y Administración*, *3*(8), 39-47.
81. Rodríguez Hernández, M. (2024). Empleo De Técnicas Biotecnológicas En El Cultivo Del Ajo (Allium Sativum L.). *Cultivos Tropicales*, *45*(3), Https://Cu-Id.Com/2050/V45n3e02. Recuperado A Partir De Https://Ediciones.Inca.Edu.Cu/Index.Php/Ediciones/Article/View/1784
82. Roope, L. S., Smith, R. D., Pouwels, K. B., Buchanan, J., Abel, L., Eibich, P., ... & Wordsworth, S. (2019). The Challenge Of Antimicrobial Resistance: What Economics Can Contribute. Science, 364(6435), Eaau4679. Doi: 10.1126/Science.Aau4679
83. Roussan, D. A., Haddad, R., & Khawaldeh, G. (2008). Molecular Survey Of Avian Respiratory Pathogens In Commercial Broiler Chicken Flocks With Respiratory Diseases In Jordan. *Poultry Science*, *87*(3), 444-448. Https://Doi.Org/10.3382/Ps.2007-00415

84. Shin, E. (2017). Antimicrobials And Antimicrobial Resistant Superbacteria. The Ewha Medical Journal, 40(3), 99. Https://Doi.Org/10.12771/Emj.2017.40.3.99
85. Singh Sv, Singh Br, Sinha Dk, Kumar Orv, Vadhana Ap, Bhardwaj M, Dubey S. 2016. *Gallibacterium Anatis*: An Emerging Pathogen Of Poultry Birds And Domiciled Birds. *Veterinary Science And Technology*. 7(3):324. Issn: 2157-7579.Http://Dx.Doi.Org/10.4172/2157-7579.1000324
86. Stanchi O. 2007. Capítulo 37. Microbilogía Veterinaria. Primera Edición. Intermedica S.A.I.S.I.
87. Van Driessche, L., Vanneste, K., Bogaerts, B., De Keersmaecker, S. C. J., Roosens, N. H., Haesebrouck, F., De Cremer, L., Deprez, P., Pardon, B., & Boyen, F. (2020). Isolation Of Drug-Resistant Gallibacterium Anatis From Calves With Unresponsive Bronchopneumonia, Belgium. *Emerging Infectious Diseases*, *26*(4), 721–730. Https://Doi.Org/10.3201/Eid2604.190962
88. Van Driessche, L., Vanneste, K., Bogaerts, B., De Keersmaecker, S. C. J., Roosens, N. H., Haesebrouck, F., De Cremer, L., Deprez, P., Pardon, B., & Boyen, F. (2020). Isolation Of Drug-Resistant Gallibacterium Anatis From Calves With Unresponsive Bronchopneumonia, Belgium. *Emerging Infectious Diseases*, *26*(4). Https://Doi.Org/10.3201/Eid2604.190962
89. Vanegas-Múnera Jm, Jiménez-Quinceno Jn. 2020. Resistencia Antimicrobiana En El Siglo Xxi: ¿Hacia Una Era Postantibiótica? *Facultad Nacional De Salud Pública*. 38(1):E337759. Https://Revistas.Udea.Edu.Co/Index.Php/Fnsp/Article/View/337759
90. Vo, T., Dang, V., Le, D., & Nguyen, T. (2022). Identification, Serotyping And Antimicrobial Susceptibility Of Riemerella Anatipestifer Isolated From Ducks In Vietnam. Open Veterinary Journal, 12(3), 391. Https://Doi.Org/10.5455/Ovj.2022.V12.I3.13
91. Wang, H., Wu, F., Han, H., Zhao, J. Y Mao, L. 2023. Un Caso De Diarrea Humana Causada Por Gallibacterium Anatis : Informe De Un Caso. En

Proceso De Publicación, Research Square, Doi: Https://Doi.Org/10.21203/Rs.3.Rs-3134681/V1 .

92. Wickham H, Averick M, Bryan J, Chang W, Mcgowan Ld, François R, Grolemund G, Hayes A, Henry L, Hester J, Kuhn M, Pedersen Tl, Miller E, Bache Sm, Müller K, Ooms J, Robinson D, Seidel Dp, Spinu V, Takahashi K, Vaughan D, Wilke C, Woo K, Yutani H (2019). “Welcome To The Tidyverse.” Journal Of Open Source Software , *4*(43), 1686. Doi:10.21105/Joss.01686 <Https://Doi.Org/10.21105/Joss.01686>.
93. World Health Organization: Who. (2014). El Primer Informe Mundial De La Oms Sobre La Resistencia A Los Antibióticos Pone De Manifiesto Una Grave Amenaza Para La Salud Pública En Todo El Mundo. *Organizacion Mundial De La Salud*. Https://Www.Who.Int/Es/News/Item/30-04-2014-Who-S-First-Global-Report-On-Antibiotic-Resistance-Reveals-Serious-Worldwide-Threat-To-Public-Health
94. World Organisation For Animal Health. (2022,). *Acceso En Línea Al Manual Terrestre - Omsa - Organización Mundial De Sanidad Animal*. Omsa - Organización Mundial De Sanidad Animal. Https://Www.Woah.Org/Es/Que-Hacemos/Normas/Codigos-Y-Manuales/Acceso-En-Linea-Al-Manual-Terrestre/
95. Xihui, Z., Yanlan, L., Zhiwei, W., Zheyu, P., Zhenshu, S., Cheng, L., Jianbiao, L., Shengliang, C., Lanying, P., & Yubao, L. (2023). Antibiotic Resistance Of Riemerella Anatipestifer And Comparative Analysis Of Antibiotic-Resistance Gene Detection Methods. Poultry Science, 102(3), 102405. Https://Doi.Org/10.1016/J.Psj.2022.102405
96. Xihui, Z., Yanlan, L., Zhiwei, W., Zheyu, P., Zhenshu, S., Cheng, L., Jianbiao, L., Shengliang, C., Lanying, P., & Yubao, L. (2023b). Antibiotic Resistance Of Riemerella Anatipestifer And Comparative Analysis Of Antibiotic-Resistance Gene Detection Methods. *Poultry Science*, *102*(3), 102405. Https://Doi.Org/10.1016/J.Psj.2022.102405

97. Yang K, Kruse Rl, Lin Wv, Musher Dm. 2018. Corynebacteria As A Cause Of Pulmonary Infection: A Case Series And Literature Review. *Pneumonia.* 10(1):1-8.Https://Doi.Org/10.1186/S41479-018-0054-5

98. Yehia, N., Salem, H. M., Mahmmod, Y., Said, D., Samir, M., Mawgod, S. A., Sorour, H. K., Abdelrahman, M. A., Selim, S., Saad, A. M., El-Saadony, M. T., El-Meihy, R. M., El-Hack, M. E. A., El-Tarabily, K. A., & Zanaty, A. M. (2023). Common Viral And Bacterial Avian Respiratory Infections: An Updated Review. *Poultry Science*, *102*(5), 102553. Https://Doi.Org/10.1016/J.Psj.2023.102553

99. Yehia, N., Salem, H. M., Mahmmod, Y., Said, D., Samir, M., Mawgod, S. A., Sorour, H. K., Abdelrahman, M. A., Selim, S., Saad, A. M., El-Saadony, M. T., El-Meihy, R. M., El-Hack, M. E. A., El-Tarabily, K. A., & Zanaty, A. M. (2023). Common Viral And Bacterial Avian Respiratory Infections: An Updated Review. Poultry Science, 102(5), 102553. Https://Doi.Org/10.1016/J.Psj.2023.102553

100. Zhang, X., Sun, Z., Cai, J., Wang, J., Wang, G., Zhu, Z., & Cao, F. (2020). Effects Of Dietary Fish Meal Replacement By Fermented Moringa (Moringa Oleifera Lam.) Leaves On Growth Performance, Nonspecific Immunity And Disease Resistance Against Aeromonas Hydrophila In Juvenile Gibel Carp (Carassius Auratus Gibelio Var. Cas Iii). Fish & Shellfish Immunology, 102, 430–439. Https://Doi.Org/10.1016/J.Fsi.2020.04.05

101. Zheng, L., Guo, H., Zhu, M., Xie, L., Jin, J., Korma, S. A., Jin, Q., Wang, X., & Cacciotti, I. (2023). Intrinsic Properties And Extrinsic Factors Of Food Matrix System Affecting The Effectiveness Of Essential Oils In Foods: A Comprehensive Review. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition*, 1-34. Https://Doi.Org/10.1080/10408398.2023.2184767

IX. APÉNDICE

1. Agar Hierro y Triple Azúcar (TSI).

Suspender 64.6 g/L en agua destilada, mezclar y ajustar pH según las instrucciones del fabricante. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución, hervir durante un minuto y vaciar en tubos de rosca estériles. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min. Dejar enfriar a una temperatura entre 45-50 °C, dejar solidificar en posición inclinada.

2. Agar Hierro y Lisina (LIA).

Suspender 33 g/L en agua destilada, mezclar y ajustar pH según las instrucciones del fabricante. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Dispensar en tubos, tapar y esterilizar en autoclave a 121°C (15 lb) durante 15 min. Enfriar en posición inclinada.

3. Sulfuro Indol Motilidad (Sim).

Suspender 30 g/L en agua destilada, mezclar y ajustar pH según las instrucciones del fabricante. Disolver calentando con agitación frecuente. Hervir durante un minuto hasta disolver por completo. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave a 121 ° C durante 15 min.

4. Gelatina Nutritiva.

Suspender 128 g/L en agua destilada, mezclar y ajustar pH según las instrucciones del fabricante. Disolver por calentamiento con agitación frecuente. Hervir durante un minuto hasta disolver por completo. Dispensar en tubos y esterilizar en autoclave a 121 º C durante 15 min.

5. Urea.

Suspender 3,87 g/100 ml de agua destilada sin calentar. Cuando el polvo se disuelve, esterilizar por filtración. Dispensar cantidades de 0,5 a 2 ml en tubos estériles pequeños. Se pueden usar volúmenes más grandes pero las reacciones serán más lentas. No esterilizar en autoclave. No hervir el medio.

6. Bilis Esculina

Suspender 64,5 g del polvo en 1 litro de agua destilada, mezclar y ajustar pH según las instrucciones del fabricante. Dejar reposar 5 minutos. Calentar a ebullición hasta

su completa disolución. Distribuir en tubos u otros recipientes apropiados y esterilizar en autoclave a 121 ºC durante 15 minutos.

7. **Sorbitol**

Suspender 50 g del medio en un litro de agua destilada, mezclar y ajustar pH según las instrucciones del fabricante. Calentar con agitación constante hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para su completa disolución. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a una temperatura entre 45-50°C y vaciar en placas de Petri estériles.

8. **Caldo Soya Tripticaseína (TSB).**

Suspender 30 g/L de agua destilada, mezclar y ajustar pH según las instrucciones del fabricante. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un min. Dispensar en tubos y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

9. **Agar Müeller-Hinton**

Suspender 38 g/L de agua destilada, mezclar y ajustar pH según las instrucciones del fabricante. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min. Dejar enfriar a una temperatura entre 45-50°C y vaciar en placas de Petri estériles.

10. **Hipoclorito de Sodio 200 ppm**

Diluir 3.68 mL de cloralex® [2.5%] en agua destilada estéril y aforar a 1 L.