

Actividad antimicrobiana de *Heliotropium angiospermum* Murray frente a cepas de *Salmonella* aisladas de pollo.

Tirado Torres David¹; Arias Hernández Luz Adriana²; Ramírez Vargas Fátima Lizeth²; Venegas Robles Frida Margarita¹; Perea García Jairo¹; Patlán Salazar Candelaria¹; Gómez Gámez María Guadalupe¹; Vázquez Rodríguez Guadalupe¹; Delgadillo Ruiz Eladio¹

¹Departamento de Ingeniería Civil y Ambiental, División de ingenierías, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato

²Departamento de Geomática e Hidráulica, División de ingenierías, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato
d.tirado@ugto.mx¹

Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana de *Heliotropium angiospermum* Murray frente a cepas de *Salmonella* resistentes a antibióticos aisladas de pollo. Actualmente la resistencia a antibióticos está declarada por la Organización Mundial de la Salud como un emergente problema de salud pública, es por ello que se ha generado una búsqueda de antimicrobianos naturales como *Heliotropium angiospermum* Murray capaces de eliminar a microorganismos multiresistentes. 20 muestras de pollo fueron colectadas y procesadas utilizando el método tradicional. El método Kirby-Bauer se empleó para los dendrogramas. Los extractos de *Heliotropium angiospermum* Murray se obtuvieron siguiendo la metodología de Tirado-Torres et al., 2019. El método difusión en disco se utilizó para analizar la actividad antimicrobiana de *Heliotropium angiospermum* Murray. *Salmonella* tuvo una prevalencia de 70%. Ampicilina fue el antibiótico menos eficaz con 100% de resistencia, en contraste ampicacina 70 %. El extracto etanólico presentó mayor efecto inhibitorio con halos de 23 mm. Se encontraron cepas multiresistentes a antibióticos. Los resultados revelan que *Heliotropium angiospermum* Murray puede ser una alternativa para el control de las infecciones causadas por *Salmonella*.

Palabras clave: Multirresistencia; actividad antimicrobiana; patógenos; *Salmonella*.

Introducción

La salmonelosis es transmitida por los alimentos y sigue siendo un problema importante en el sector de la salud pública. Se considera una de las principales enfermedades transmitidas por los patógenos en los alimentos, que aún justifican una investigación continua y amplios esfuerzos de investigación. En consecuencia, existe un cuerpo considerable de literatura científica que cubre todos los aspectos de la biología, epidemiología y ecología de este organismo. Aunque se ha adquirido mucho conocimiento en tiempos relativamente recientes, la salmonelosis es un fenómeno antiguo. Ciertamente, como enfermedad humana, las variantes de *Salmonella* como agentes causales probablemente han existido más allá de la historia registrada. La infección por *Salmonella* se ha encontrado y descrito con frecuencia desde principios del siglo XIX, pero la enfermedad de la fiebre tifoidea ciertamente existía incluso antes del siglo 18 con médicos antiguos como Hipócrates y Galeno caracterizando la enfermedad con síntomas comunes de fiebre prolongada e inconsciencia parcial. Los síntomas de la enfermedad reportados en ese momento eran solo fiebre sin ningún otro síntoma visible, Como resultado, esas enfermedades se clasificaron en un grupo grande con varios subgrupos según la duración de la fiebre como breve, larga o continua.

La especie ahora conocida como *Salmonella* Typhi fue identificada como la causa de la fiebre entérica transmitida por el agua y la leche. En la década de 1930, la importancia de aislar las fuentes ambientales y los portadores humanos fue reconocido por la salud pública oficiales Con esto se aseguró el abastecimiento de agua con la subida del agua cloración y filtración, así como planes de alcantarillado, mientras que los suministros de leche eran mejorados con tratamientos térmicos y pasteurización (Hardy, 2015). Para la protección directa de los humanos, la implementación de programas de vacunación, programas de educación sobre manipulación y protocolos adecuados de los alimentos, y la eliminación adecuada de los desechos ayudaron a disminuir la incidencia de la fiebre tifoidea. (Lancaster, 1990). La salmonelosis ahora se conoce principalmente como una enfermedad transmitida por los alimentos y se vinculó por primera vez al consumo de carne de res a fines de la década de 1880 por Gärtner, quien aisló este bacilo. A principios de la segunda mitad del siglo XX, *Salmonella* apareció en asociación con la harina de pescado latinoamericana formulada como ingrediente en alimentos para aves. y a mediados de la década de 1970 la aparición de *Salmonella*

Hadar en parvadas de pavos y posteriormente en pollos se informó sobre parvadas de pollos de engorde. La *S. enteritidis* ha sido un problema importante con una alta frecuencia de infecciones asociadas con los huevos durante tres décadas. (Foster & Spector, 1995). En general, la infección por *Salmonella* se desarrolla en una de las siguientes: la infección sistémica infección conocida como fiebre entérica, una infección intestinal como gastroenteritis, o una infección de la sangre en humanos denominada bacteriemia. El proceso de la salmonelosis comienza con la ingesta de células de *Salmonella* que deben resistir la acidez del estómago con un rango de pH de 1 a 2 durante la digestión y posteriormente la colonización del intestino delgado con la posibilidad de causar una infección sistémica. *Salmonella* es un género diverso de patógenos gastrointestinales que causan un amplio espectro de enfermedades, desde gastroenteritis autolimitada (*Salmonella* no tifoidea [NTS]) hasta fiebre entérica sistémica (*Salmonella* tifoidea [TS]: *Salmonella* enterica serovar Typhi y serovares Paratyphi A, B y C). La salmonelosis es mundial, pero la salmonela tifoidea se encuentra principalmente en el África subsahariana y el sur de Asia, donde la fiebre entérica es endémica, aunque los datos detallados de vigilancia local de las regiones endémicas siguen siendo deficientes. *Salmonella*, pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Hasta la fecha se han identificado más de 2,500 serotipos o serovares diferentes en dos especies, a saber, *Salmonella bongori* y *Samonella enterica*. *Salmonella* es una bacteria omnipresente y resistente que puede sobrevivir durante varias semanas en un ambiente seco y varios meses en agua. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que aproximadamente 1,900 millones de personas en todo el mundo se enferman de diarrea cada año y 715,000 mueren. Según estas estimaciones, aproximadamente un tercio de estas infecciones se transmiten a través de los alimentos. Una mayor proporción de Salmonela (52% de los casos de *Salmonella* no tifoidea y 37% de los casos de *Salmonella* tifoidea) que otros patógenos entéricos se cree que son transmitidos por los alimentos, la mayoría de los cuales son potencialmente prevenibles una vez que se identifican las formas de transporte. Algunas personas con infección por salmonela no tienen síntomas. Una gran parte presenta diarrea, fiebre y calambres abdominales (estomacales) dentro de las 8 a 72 horas siguientes a la exposición. La mayoría de las personas sanas se recupera en unos pocos días o una semana sin tratamiento específico. (OMS, 2018). El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana de extractos acetónicos y etanolicos de hojas, flores, semillas, tallos y raíces de *Heliotropium angiospermum* Murray contra cepas de *Salmonella* multirresistentes aisladas de carne de pollo cruda.

Metodología

Pruebas de susceptibilidad a los antibióticos

Todos los aislamientos de *Salmonella* se examinaron para determinar la sensibilidad a los antibióticos a 12 antibióticos diferentes utilizando el método de difusión en disco en agar Muller-Hinton (Oxoid) con discos disponibles comercialmente (Oxoid) de acuerdo con la Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2014). Se probaron los siguientes agentes antimicrobianos: ampicilina (10 µg/mL); cefalotina (30 µg/mL); cefotaxima (30 µg/mL); ciprofloxacina (5 µg/mL); clindamicina (30 µg/mL); dicloxacilina (1 µg/mL); eritromicina (15 µg/mL); gentamicina (10 µg/mL); penicilina (10 µg/mL); tetraciclina (30 µg/mL); trimetoprima/sulfametoxazol (25 µg/mL); y vancomicina (30 µg/mL). Los resultados se evaluaron después de la incubación a 35°C durante 24 h, mientras que las interpretaciones de la resistencia a los antibióticos se basaron en los criterios del CLSI (CLSI, 2014). Para el control de calidad, se utilizó en el estudio una cepa de referencia de *Salmonella* sp., (ATCC 25923).

Colecta de material vegetal y preparación de extractos

Los extractos se obtuvieron de especímenes de *Heliotropium angiospermum* Murray, colectados en el municipio de Tierra Blanca, Gto. Las hojas frescas, tallos y semillas se colectaron una sola vez, se limpiaron y lavaron con agua y se secaron en cámara calefactada (Cole Parmer 399553-20, I, USA) a 40°C/24 h. Los extractos se produjeron siguiendo un método previamente descrito (Gutiérrez- Alcántara et al., 2015). Los especímenes se separaron en dos partes, la primera en flores, hojas y semillas, la segunda en tallos y raíces luego, fueron pulverizados utilizando una licuadora eléctrica (Oster BPST02-B00-013, México). Se utilizaron dos disolventes diferentes para estudiar con que disolvente se extrae mejor los metabolitos activos de la planta (acetona y alcohol etílico). Se pesaron alrededor de 100 g de cada separación y se colocaron en frascos de cultivo estériles, después de lo cual se agregaron 900 mL de etanol y a otra muestra 900 mL de acetona, ambos tipos grado reactivo formando un diseño factorial de 2x2x2. Los frascos se sellaron y almacenaron a temperatura ambiente durante 7 días.

Los extractos se filtraron a través de papel de filtro Whatman No. 1, y los respectivos extractos (etanol y acetona) se evaporaron a sequedad bajo presión reducida usando un evaporador rotatorio (BÜCHI, Vacuum AQ3 176 Controller V-800; Flawil, Suiza) a 40°C, dejando solo el extracto concentrado de los constituyentes

de los materiales en polvo. Luego se resuspendió 5 mL de agua destilada y se procedió bajo las mismas operaciones del evaporador por 10 minutos. Por último, cada muestra se aforó a los 5 mL con agua destilada, los extractos se almacenaron a -4°C hasta su uso.

Prueba de Concentración mínima Inhibitoria y actividad antimicrobiana

Se hizo una prueba de microdilución cuantitativa de las muestras y controles para determinar la menor concentración capaz de inhibir el crecimiento de *Salmonella* siguiendo los protocolos del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (Clinical and Laboratory 39 Standards Institute, CLSI). Cada extracto se llevó a diluciones de 20, 30, 50, 100 y 150 $\mu\text{L}/\text{mL}$ en caldo Mueller Hinton; estas diluciones fueron dispensadas en microplacas de 96 pozos a volúmenes de 100 μL . El cultivo de prueba correspondió a la cepa Gram negativa *Salmonella enterica* sp. enterica serovar Typhimurium, ATCC 14028. La cepa fue cultivada en caldo Mueller Hinton por 24 horas y diluida en solución salina hasta concentración 0,5 MacFarland. Se adicionó en pozos correspondientes a la microplaca y se incubó a 37°C por 24 horas. Como soporte de la prueba, en cada corrida de muestras, se utilizó un control de viabilidad de la cepa bacteriana y un segundo control negativo del medio de dilución, Mueller Hinton. Transcurrida la incubación se realizaron subcultivos de cada pozo en agar Mueller Hinton, que fueron incubados a 37°C por 24 horas, para determinar de esta forma el crecimiento o la inhibición de las bacterias. El análisis estadístico de distribución binomial permitió establecer probabilidades de éxito (efecto bactericida) y fracaso (crecimiento de bacterias) para el total de muestras de los extractos obtenidos.

Preparación e inoculación del inóculo. La actividad antibacteriana de extractos acetónicos y etanólicos de de hojas, tallos y semillas de *Heliotropium angiospermum* se probó mediante el método de agar de difusión en disco, como se describió previamente (Gutiérrez- Alcántara et al., 2016), aunque con algunas modificaciones (se cambió el agar Trypticase de Soya por Muller Hinton y penicilina como control positivo). Brevemente, se inocularon cepas de *Salmonella* resistentes a antibióticos aisladas de pollo en tubos con 3 mL de caldo tripticasa soya (TSB, Bioxon, Estado de México, México) y se incubaron a 35°C durante 24 h. Los cultivos se lavaron con solución salina isotónica estéril (0,85 % NaCl) mediante centrifuga a 3,500 rpm durante 20 min, y luego se resuspendieron los sedimentos en agua con peptona estéril a aproximadamente 10^9 CFU/ ml. Se produjo una dilución decimal de estos cultivos lavados usando solución salina isotónica para lograr una concentración final aproximada de 8 log CFU/mL. De la primera dilución de cada cultivo bacteriano lavado se tomó una suspensión de 100 μL , se inoculó en placas Mueller Hinton y se extendió sobre agar. Se colocaron discos de papel de filtro (Whatman No. 5) en la superficie de cada placa de agar. Luego se colocaron alícuotas (10 μL) de cada extracto en cada disco (dosis final por disco: 1 mg de extracto), utilizando solución salina isotónica como control negativo y penicilina como control positivo. Cada prueba se repitió tres veces. Las placas se incubaron durante 24 horas a 35°C y luego se examinaron para determinar la presencia de zonas de inhibición bacteriana alrededor del disco. Se midió el diámetro (mm) de cualquier zona de inhibición resultante y se calcularon los valores de diámetro promedio para cada extracto.

Análisis estadístico

El diámetro de crecimiento de *Salmonella* se expresó como media del porcentaje de inhibición del crecimiento de tres repeticiones. Las diferencias significativas se calcularon utilizando el programa statistica 8 (StatSoft, Inc., Tulsa, versión 8).

Resultados y discusiones

Resistencia a los antibióticos

Del total de cepas de *Salmonella* analizadas, se identificaron 20 cepas con resistencia a 3 o más antimicrobianos de grupos farmacológicos, de las cuales, el 20% presentó resistencia de 10-12 antibióticos, el 30% de 7-9 antibióticos y el 50% de 3-6 antibióticos (Tabla 1).

Tabla 1. Resistencia a los antibióticos en cepas de *Salmonella* aisladas de carne de pollo

Cepa	Num. de resistencia a antibióticos	Antibióticos a los que mostró resistencia
SP-10 A	12	AK, AM, CB, CF, CFX, CPF, CL, GE, NET, NF, NOF, STX
SP-12 A	11	AK, AM, CB, CF, CFX, CL, GE, NET, NF, NOF, STX
SP-15 A	10	AM, CB, CF, CFX, CL, GE, NET, NF, NOF, STX
SP-15 B	10	AM, CB, CF, CFX, CL, GE, NET, NF, NOF, STX
SP-8 A	9	AM, CB, CF, CFX, CL, GE, NET, NF, STX
SP-4 B	9	AK, AM, CB, CF, CFX, CPF, NET, NOF, STX
SP-4 A	9	AM, CB, CF, CFX, CL, GE, NET, NF, STX
SP-8 B	8	AM, CB, CF, CFX, CL, GE, NET, STX
SP-3 B	8	AM, CB, CF, CFX, GE, NET, NF, STX
SP-6 A	7	AM, CB, CF, CFX, GE, NF, NOF
SP-1 B	6	AM, CB, CF, CFX, CL, NF
SP-13 A	6	AK, AM, CB, CF, CFX, NF
SP-5 A	6	AM, CB, CF, CL, GE, NF
SP-1 A	5	AM, CB, CF, CL, STX
SP-2 A	4	AM, CB, CF, NOF
SP-10 B	3	AM, CB, CF
SP-7 A	3	AM, CB, CF
SP-6 B	3	AM, CB, CF
SP-2 B	3	AM, CB, CF
SP-9 A	3	AM, CB, CF

Susceptibilidad antimicrobiana

Todas las cepas de *Salmonella* aisladas de pollo crudo mostraron resistencia al menos a tres antibióticos. Las 20 cepas mostraron resistencia a ampicilina, carbenicilina y cefalotina. Por el contrario, el 70% mostraron sensibilidad a la amikacina (Tabla 2). Solo el 40% de las cepas presentaron resistencia intermedia a cefotaxima. Del mismo modo, el 20% de las cepas de *Salmonella* presentaron resistencia intermedia a gentamicina, norfloxacin y ciprofloxacino a pesar de ser de diferentes grupos.

Tabla 2. Recuentos de cepas de *Salmonella* que presentan resistencia (R), resistencia intermedia (I) o sensibilidad (S) a 12 antibióticos

Antibiótico	R	I	S
Ampicilina (AM)	20	0	0
Carbenicilina (CB)	20	0	0
Cefalotina (CF)	20	0	0
Cefotaxima (CFX)	12	8	0
Nitrofurantoína (NF)	11	1	8
Gentamicina (GE)	10	5	5
Cloranfenicol (CL)	10	3	7
Sulfametoxazol / Trimetroprima (STX)	10	1	9
Netilmicina (NET)	9	1	10
Norfloxacin (NOF)	7	5	8
Amikacina (AK)	4	2	14
Ciprofloxacino (CPF)	2	5	13

Salmonella tuvo una prevalencia de 70%, de igual manera otros autores han confirmado una alta prevalencia (56.7% y 59.6%) de *Salmonella* en camarón fresco (Rahimi et al., 2013; Hossain et al., 2013). Esta alta incidencia puede ser el resultado de la contaminación durante la producción, y malas prácticas de higiene durante la manipulación, almacenamiento y puntos de distribución y venta. En 2008 se encontró en India una prevalencia de 34.4% de este patógeno en muestras de pollo, en Malasia se encontró un 37.5% de prevalencia (Shabarinath et al., 2007; Kumar et al., 2003). Existen investigaciones donde se mencionan prevalencias de *Salmonella* que van de 1.8% a 5.71%, las cuales son muy inferiores a nuestros resultados (64.1%) (Wan et al., 2009).

Ampicilina fue el antibiótico menos eficaz con 100% de resistencia, de igual manera carbenicilina y cefalotina, de igual manera otros investigadores han observado resistencia de 100% (Shah y Korejo, 2012; Zalalen et al., 2011), datos que coinciden con nuestros resultados, sin embargo, se sugiere no prescribir ni automedicarse con este antibiótico, ya que solo se genera gasto económico con poco o nulo beneficio. En contraste amikacina 70%, ciprofloxacino 65% y netilmicina 50%, presentaron mayor actividad antimicrobiana ante *Salmonella*. Hossain et al., 2013, observaron cepas de *Salmonella* sensibles a ciprofloxacino. Se puede

sugerir el uso de las fluoroquinolonas como ciprofloxacina en infecciones leves y severas ocasionadas por *Salmonella*.

Actividad antimicrobiana in vitro de *Heliotropium angiospermum* Murray

La prueba, realizada en este estudio, del efecto de las hojas-flores-semillas y tallos-raíces de *Heliotropium angiospermum* Murray sobre las nueve cepas de *Salmonella* resistentes a los antibióticos aisladas de carne de pollo cruda (previamente seleccionadas por ser multirresistentes a 12 antibióticos) reveló que el 78% de las cepas fueron sensibles a las dos concentraciones seleccionadas del extracto etanólico obtenido de hojas-flores-semillas del espécimen, un porcentaje mayor no significativo se vio para el mismo extracto obtenido de tallos-raíces (Tabla 3). Asimismo, se pudo observar que los extractos acetónicos presentaron menor actividad antimicrobiana frente a las cepas de *Salmonella*, obteniendo solo dos de las nueve cepas sensibilidad a los extractos acetónicos sin mayor significancia a las concentraciones estudiadas.

Tabla 3. Valores de diámetro promedio de los extractos de *Heliotropium angiospermum* Murray a dos concentraciones producido con dos solventes versus cepas de *Salmonella* resistentes a antibióticos

Cepas	Zonas de inhibición (diámetro en mm)							
	Extracto etanólico				Extracto acetónico			
	Hojas, flores y semillas		Tallos y raíces		Hojas, flores y semillas		Tallos y raíces	
	50 µg/mL	100 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
SP-10 A	18.5 ± 0.02	20 ± 0.03	22.5 ± 0.01	21.6 ± 0.03	0	0	18.4 ± 0.03	18.9 ± 0.02
SP-12 A	17.4 ± 0.03	18.8 ± 0.02	20.8 ± 0.03	20.1 ± 0.02	18.4 ± 0.02	19.1 ± 0.03	19.9 ± 0.03	20.1 ± 0.03
SP-15 A	19.4 ± 0.02	19.8 ± 0.03	20.8 ± 0.02	21.2 ± 0.03	0	0	0	0
SP-8 A	17.2 ± 0.01	18.6 ± 0.02	20.3 ± 0.02	20.5 ± 0.03	18.6 ± 0.02	19.8 ± 0.02	0	0
SP-4 A	18.6 ± 0.02	19.3 ± 0.04	20 ± 0.02	20.7 ± 0.02	0	0	0	0
SP-3 B	19.1 ± 0.02	19.8 ± 0.02	21.9 ± 0.03	21.7 ± 0.04	0	0	0	0
SP-2 A	19 ± 0.01	18.2 ± 0.03	19.6 ± 0.04	18 ± 0.02	0	0	0	0
SP-13 A	8 ± 0.02	10 ± 0.02	10.5 ± 0.03	0	0	0	0	0
SP-7 B	5 ± 0.02	7 ± 0.04	23 ± 0.02	23.5 ± 0.03	0	0	0	0

El extracto etanólico presentó el mayor efecto inhibitorio frente a los aislados de *Salmonella* con halos de inhibición de 23 mm a 15.2 mm. Las cepas SP-10 A, SP-15 A y SP-3 B presentaron diámetros similares a una concentración de 100 µl/mL con el extracto obtenido de hojas-flores-semillas. En la Tabla 3 se puede observar que se presentaron mayores halos de inhibición a una concentración de 50 µl/mL en el extracto etanólico obtenido de tallos-raíces. Los halos de inhibición de este estudio coinciden con una investigación donde se estudió la actividad antimicrobiana de *M.oleifera* sobre *Salmonella typhimurium* y otros patógenos (Ruttarattanamongkol et al., 2015), ellos mostraron halos de 20 a 24 mm. De igual, manera otros investigadores en 2016 encontraron buena capacidad antimicrobiana de *M. oleifera* sobre *Salmonella sp* (20mm) (Manikandan et al., 2016). Los halos obtenidos con el extracto de acetato de etilo fueron de 17mm. Los resultados de este estudio indican que el extracto etanólico tienen más capacidad antimicrobiana que el acetónico, esto puede ser atribuido a que hay mejor solubilidad fotoquímica en etanol que en acetona.

Conclusiones

Las muestras de pollo resultaron altamente contaminadas por *Salmonella*. Se encontraron cepas multirresistentes a antibióticos. Es de suma importancia implementar medidas de higiene en toda la cadena de producción de pollo. Los resultados revelan que *Heliotropium angiospermum* Murray puede ser una alternativa para el control de las infecciones causadas por *Salmonella*.

Referencias

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2014). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Nineteen Informational Supplement. – M100-S19 Wayne, Pa, USA.

Gutiérrez-Alcántara, E.J., Rangel-Vargas, E., Gómez-Aldapa, C.A., Falfan-Cortes, R.N., Rodríguez-Marín, M.L., Godínez-Oviedo, A. (2015). Antibacterial effect of roselle extracts (*Hibiscus sabdariffa*),

sodium hypochlorite and acetic acid against multidrug-resistant *Salmonella* strains isolated from tomatoes. *Letter Applied Microbiology*, 62(1), 177-184.

Gutiérrez-Alcántara, E.J., Gómez-Aldapa, C.A., Román-Gutiérrez, A.D., Rangel-Vargas, E., González-Olivares, L.G., Castro-Rosas, J. (2016). Antimicrobial activity of *roselle hibiscus sabdariffa* calyx extracts on culture media and carrots against multidrug-resistant *Salmonella* strains isolated from raw carrots. *Journal Food Safety*, 35(4), 450-458.

Hossain, S., Nahreen-Khaleque, H., Mazumder, F., Mahub, K.R. (2013). Prevalence of Multidrug Resistant *Salmonella* in Shrimp of Dhaka City. *Microbiology Journal*, 3(1), 21-28.

Kumar, R., Surendran, P.K., Thampuran, N. (2009). Distribution and genotypic characterization of *Salmonella* serovars isolated from tropical seafood of Cochin, India. *Journal of Applied Microbiology*, 10(6), 515-524.

Manikandan, P., Gnanasekaran, A., Julikarthika, P. Arvind Prasanth, D. (2016). Antibacterial Efficacy of *Moringa oleifera* Leaf against Medically Important Clinical Pathogens. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(4), 109-116.

NORMA Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014(<http://dof.gob.mx>)

ONU. (2018). *Salmonella*. [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)). Recuperado 10 de julio de 2022, de [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)).

Procedimientos en Microbiología Clínica. (2022).https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc_procedimientomicrobiologia11.pdf.

Ruttarattanamongkol, K., Petrasch, A. (2015). Antimicrobial activities of *Moringa oleifera* seed and seed oil residue and oxidative stability of its cold pressed oil compared with extra virgin olive oil. *Journal Science Technology*, 37(5), 587-594.

Shabarinath, H., Sanath, S., Kumar, H., Khushiramani, R., Karunasagar, I., Karunasagar, I. (2007). Detection and characterization of *Salmonella* associated with tropical seafood. *International Journal of Food Microbiology*, 114(2), 227-233.

Shah, A.H., Korejo, N.A. (2012). Antimicrobial Resistance Profile of *Salmonella* Serovars Isolated from Chicken Meat. *J. Vet. Anim. Sci.*, 2(1), 40-46.

Zelalem, A., Nigatu, K., Zufan, S., Alemayehu, H., Yirsaw, A., Kassa, T. (2011). Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from lactating cows and in contact humans in dairy farms of Addis Ababa: a cross sectional study. *BMC Infectious Diseases*, 11(22), 1-7.