



**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**

Facultad de Ciencias

Programa de Maestría en Microbiología

**Actividad antibacteriana de péptidos antimicrobianos contra  
aislados de *Salmonella* spp de origen aviar e importancia zoonótica**

**Loren Vanesa Firavitoba Rico**

Bogotá D.C., Colombia

Mayo, 2022

# **Actividad antibacteriana de péptidos antimicrobianos contra aislados de *Salmonella* spp de origen aviar e importancia zoonótica**

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para obtener el título de  
**Magíster en Microbiología**  
**(Modalidad de profundización)**

**Loren Vanesa Firavitoba Rico**

Bacterióloga y laboratorista clínico

Directora:

**Adriana Barreto Santamaría, M.Sc.**

Investigador en Línea de Investigación Receptor-Ligando  
Fundación Instituto de Inmunología de Colombia - FIDIC

Codirectora:

**Gabriela Arévalo Pinzón, M.Sc., Ph.D.**

Docente – Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca  
Coordinador Línea de Investigación Receptor-Ligando  
Fundación Instituto de Inmunología de Colombia – FIDIC

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

## **Dedicatoria**

*A Dios por la vida y el haberme permitido llegar hasta esta etapa de mi vida para seguir  
creciendo como mujer de la ciencia y de la sociedad.*

*A mi familia por ser mi pilar más importante, mi motivación de cada día y darme su  
amor y apoyo incondicional.*

*A cada ser que hizo parte de este proceso y me infundió paciencia y perseverancia en los  
momentos que creí que esto no sería posible.*

## **Agradecimientos**

A Dios por darme su fuerza, su paciencia y valor para poder culminar esta etapa de mi vida.

A mi directora Adriana Barreto Santamaría por sus conocimientos y experiencia, por su constante apoyo, compromiso y dedicación y por el tiempo dedicado para fortalecer mi conocimiento y acompañarme en este último proceso académico de la maestría.

A cada miembro del Laboratorio la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia - FIDIC, por permitirme el desarrollo de este proyecto de investigación en sus instalaciones.

Al laboratorio SERVET por toda su colaboración y aporte en el proyecto de investigación, especialmente al Dr. Jairo Rodríguez por su apoyo incondicional en todo mi proceso académico en la maestría.

A la Dra Maricel Casallas, por su apoyo incondicional, su motivación constante y ser una aliada leal en cada paso dado a nivel profesional y personal.

## Resumen

El aumento de la prevalencia de *Salmonella* spp resistente a múltiples fármacos se ha convertido en un problema de salud pública. Las infecciones por este microorganismo están asociadas a la ingesta de productos alimenticios contaminados, principalmente los de origen animal como las aves de corral. Esta baja inocuidad en los alimentos es consecuencia de la rápida propagación y difícil eliminación de *Salmonella*, lo que pone en riesgo la producción avícola y la salud de todos los consumidores. A esta problemática, se le suma el desarrollo de cepas resistentes, la cual está directamente relacionada con el uso indiscriminado de antibióticos convencionales tanto en terapia humana como en la cría de animales. Por esto, es importante caracterizar los perfiles de resistencia de especies de *Salmonella* de origen aviar capaces de infectar al hombre y evaluar otras estrategias para combatirlas como los péptidos antimicrobianos (PAMs).

En la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia FIDIC, se han desarrollado algunos PAMs, altamente selectivos contra bacterias y con un menor potencial para generar resistencia antimicrobiana en comparación a los antibióticos de uso común.

En este trabajo para la evaluación de la actividad de estos péptidos contra *Salmonella*, se realizó la selección de cepas de *Salmonella* spp de origen aviar e importancia zoonótica con resistencia frente a antibióticos y de cepas ATCC. Estos aislados son provenientes de diferentes granjas avícolas de Colombia y fueron identificados por el laboratorio SERVET SAS. Los PAMs 35409-1, 35409-13 y 41781 desarrollados en la FIDIC fueron evaluados frente a estas cepas de *Salmonella* para determinar su utilidad terapéutica contra este microorganismo.

Los resultados evidencian que, *Salmonella* como patógeno de importancia de salud pública sigue estando presente en la industria avícola, en donde, se encontró que, los cinco aislados analizados presentaron un aumento en la resistencia antimicrobiana en antibióticos que son utilizados como terapia convencional para tratar a la bacteria en la industria avícola, adicional a esto se encontró que tres de estos aislados se identificaron como *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, las cuales son las más importantes en intoxicación alimentaria.

Los tres PAMs tuvieron actividad antimicrobiana sobre *S. Enteritidis* ATCC 13076 y *S. Typhimurium* ATCC 14028, además se determinó que su actividad era de tipo bacteriostático. El PAM 41781 tuvo actividad antibacteriana sobre todos los aislados de *Salmonella* spp móvil de

origen aviar, donde además demostró tener un mecanismo de acción de tipo membranolítico sobre la membrana celular de *Salmonella*.

**Palabras clave:** Resistencia antimicrobiana, sensibilidad, antibiótico, avícola, alternativa antimicrobiana, *Salmonella* spp.

## Abstract

The increasing prevalence of multidrug-resistant *Salmonella* spp has become a public health problem. Infections by this microorganism are associated with the ingestion of contaminated food products, mainly those of animal origin such as poultry. This low food safety is a consequence of the rapid spread and difficult elimination of *Salmonella*, which puts poultry production and the health of all consumers at risk. Added to this problem is the development of resistant strains, which is directly related to the indiscriminate use of conventional antibiotics both in human therapy and in animal husbandry. For this reason, it is important to characterize the resistance profiles of *Salmonella* species of avian origin capable of infecting humans and to evaluate other strategies to combat them, such as antimicrobial peptides (AMPs).

At the Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), some PAMs have been developed, highly selective against bacteria and with a lower potential to generate antimicrobial resistance compared to commonly used antibiotics.

In this work, for the evaluation of the activity of these peptides against *Salmonella*, the selection of strains of *Salmonella* spp of avian origin and zoonotic importance with resistance against antibiotics and ATCC strains was carried out. These isolates come from different poultry farms in Colombia and were identified by the SERVET SAS laboratory. The PAMs 35409-1, 35409-13 and 41781 developed at FIDIC were evaluated against these *Salmonella* strains to determine their therapeutic usefulness against this microorganism.

The results show that *Salmonella* as a pathogen of public health importance continues to be present in the poultry industry, where it was found that the five isolates analyzed presented an increase in antimicrobial resistance in antibiotics that are used as conventional therapy to treat bacteria in the poultry industry, in addition to this it was found that three of these isolates were identified as *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis*, which are the most important in food poisoning.

The three PAMs had antimicrobial activity against *S. Enteritidis* ATCC 13076 and *S. Typhimurium* ATCC 14028, and it was also determined that their activity was bacteriostatic. PAM 41781 had antibacterial activity on all mobile *Salmonella* spp isolates of avian origin, where it also demonstrated a membranolytic-type mechanism of action on the *Salmonella* cell membrane.

**Keywords:** Antimicrobial resistance, sensitivity, antibiotic, poultry, antimicrobial alternative, *Salmonella* spp.



# Contenido

<b>1. Introducción</b> .....	15
<b>2. Marco conceptual y generalidades</b> .....	17
2.1. <i>Salmonella</i> , características generales .....	17
2.1.1. Clasificación taxonómica y nomenclatura de <i>Salmonella</i> .....	17
2.1.2. Patogenicidad y virulencia .....	20
2.1.3. Manifestaciones clínicas .....	21
2.1.4. Aislamiento e identificación microbiológica de <i>Salmonella</i> .....	21
2.1.5. Presencia de <i>Salmonella</i> en productos de pollo y huevos.....	23
2.1.6. Terapia y resistencia antimicrobiana.....	25
2.2. Alternativas terapéuticas contra la resistencia antimicrobiana .....	26
2.3. Péptidos antimicrobianos PAMs .....	27
2.3.1. Propiedades físico químicas .....	28
2.3.2. Clasificación de los PAMs .....	29
2.3.3. Mecanismos de acción de los PAMs.....	31
2.3.4. PAMs desarrollados en la FIDIC .....	33
<b>3. Hipótesis</b> .....	36
<b>4. Objetivos</b> .....	37
4.1. Objetivo general .....	37
4.2. Objetivos específicos.....	37
<b>5. Metodología (Materiales y métodos)</b> .....	38
5.1. Base de datos para análisis estadístico .....	38
5.2. Caracterización de la resistencia antimicrobiana en aislados de <i>Salmonella</i> spp móvil de origen aviar.....	40
5.3. Mantenimiento y conservación de cepas y aislados de <i>Salmonella</i> spp .....	40
5.4. Identificación de aislados de <i>Salmonella</i> spp móvil .....	40
5.4.1. Serotipificación de aislados de <i>Salmonella</i> spp móvil.....	40
5.4.2. Extracción y Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) de los aislados de <i>Salmonella</i> spp móvil .....	41
5.5. Reactivación y curvas de calibración de cepas ATCC y aislados de origen aviar .....	42
5.5.1. Reactivación de cepas .....	42
5.5.2. Curvas de calibración de cepas ATCC y aislados de origen aviar.....	42

5.6.	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los PAMs contra cepas y aislados de <i>Salmonella</i> spp móvil .....	43
5.7.	Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB) de los PAMs contra cepas y aislados de <i>Salmonella</i> spp móvil .....	44
5.8.	Evaluación preliminar del mecanismo de acción de los PAMs .....	44
5.8.1.	Tinción de Gram y microscopía .....	44
5.8.2.	Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	45
<b>6.</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>46</b>
6.1.	Análisis estadístico descriptivo .....	46
6.2.	Selección de aislados de <i>Salmonella</i> spp móvil y perfiles de resistencia .....	48
6.3.	Serotipificación de los aislados de <i>Salmonella</i> spp móvil .....	49
6.4.	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real de los aislados 665, 728 y 828....	49
6.5.	Actividad antimicrobiana de los péptidos antimicrobianos 35409-1, 35409-13 y 41781 sobre las cepas <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 y <i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076 y aislados de <i>Salmonella</i> spp móvil .....	50
6.6.	Actividad bacteriostática de los péptidos antimicrobianos 35409-1, 35409-13 y 41781 .....	50
6.7.	El péptido 41781 tiene un efecto membranolítico sobre <i>Salmonella</i> spp móvil.....	51
<b>7.</b>	<b>Discusión</b> .....	<b>54</b>
<b>8.</b>	<b>Conclusiones</b> .....	<b>58</b>
<b>9.</b>	<b>Perspectivas futuras</b> .....	<b>59</b>
<b>10.</b>	<b>Referencias</b> .....	<b>60</b>

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b>	Estructura celular y antigénica de <i>Salmonella</i> spp .....	19
<b>Figura 2.</b>	Revisión de los porcentajes relativos de los serotipos para aislamientos en pollos, durante los años 1986 a 2004, en Estados Unidos y Europa .....	24
<b>Figura 3.</b>	Serotipos de <i>Salmonella</i> spp aislados de humanos para Colombia, de 1997 a 2010, asociados a aves de corral.....	25
<b>Figura 4.</b>	Clasificación de los péptidos antimicrobianos según su estructura secundaria.....	31
<b>Figura 5.</b>	Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos en bacterias .....	32
<b>Figura 6.</b>	Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos en la membrana bacteriana.....	33
<b>Figura 7.</b>	Esquema general de la metodología .....	38
<b>Figura 8.</b>	Prevalencia de <i>Salmonella</i> sobre el total de muestras ingresadas en 2019 y 2020 en el laboratorio SERVET .....	46
<b>Figura 9.</b>	Distribución de <i>Salmonella</i> spp móvil por explotación comercial.....	47
<b>Figura 10.</b>	Resistencia antimicrobiana de <i>Salmonella</i> spp móvil en los años 2019-2020.....	48
<b>Figura 11.</b>	Cambios morfológicos en <i>Salmonella</i> por acción de los PAMs.....	52
<b>Figura 12.</b>	Microscopía electrónica de barrido de <i>Salmonella</i> spp móvil con y sin contacto con el PAM 41781.....	53

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b>	Especies y subespecies de <i>Salmonella</i> spp y su hábitat usual.....	18
<b>Tabla 2.</b>	Péptidos antimicrobianos selectivos por microorganismos con actividad antibacteriana.....	35
<b>Tabla 3.</b>	Perfiles de resistencia hallados y aislados seleccionados.....	47
<b>Tabla 4.</b>	Serotipificación de los cinco aislados bacterianos de <i>Salmonella</i> spp móvil.....	49
<b>Tabla 5.</b>	Resultado qPCR de los aislados 665, 728 y 828 de <i>Salmonella</i> spp móvil .....	50
<b>Tabla 6.</b>	Actividad antimicrobiana de los péptidos 35409-1, 35409-13 y 41781 sobre los aislados de <i>Salmonella</i> spp móvil .....	50

## Lista de símbolos y abreviaturas

### Símbolos

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
μg	Microgramo	10 <sup>-6</sup> g	Masa
μL	Microlitros	10 <sup>-6</sup> L	Volumen
μM	Micro molar	10 <sup>-6</sup> molar.	Peso
mol	mol	mol	Cantidad de sustancia
mL	Mililitro	10 <sup>-3</sup> L	Volumen

### Abreviaturas

Abreviatura	Definición
CLSI*	Comité de Estándares de Laboratorio Clínico
CDC*	Centros para el Control y Prevención de Enfermedades
CMB	Concentración mínima bactericida
CMH	Concentración Mínima Hemolítica
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CONPES	Consejo Nacional de Política Económica y Social
FDA*	Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos
FENAVI	Federación Nacional de Avicultores
FIDIC	Fundación Instituto de Inmunología
GRs	Glóbulos Rojos
INS	Instituto Nacional de Salud
LBA*	Agar Luria Bertani
LBB*	Caldo de Luria Bertani
LPS	Lipopolisacárido
MHA*	Agar Muller Hinton
MHB*	Caldo de Muller Hinton
MEB	Microscopía Electrónica de Barrido
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAMs	Péptidos antimicrobianos
PCA*	Agar Plate Count

---

qPCR*	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
Rpm	Revoluciones por minuto
RV	Caldo Rappaport-Vasiliadis
SC	Selenito Cistina
SDS*	Dodecil Sulfato De Sodio
<i>S. bongori</i>	<i>Salmonella bongori</i>
SE	<i>Salmonella entérica subsp entérica</i> ser. Enteritidis
<i>S. Enteritidis</i>	<i>Salmonella</i> Enteritidis
<i>S. entérica</i>	<i>Salmonella entérica</i>
SH	<i>Salmonella entérica subsp entérica</i> ser. Heidelberg
SPI*	Islas de patogenicidad de <i>Salmonella</i>
SN	<i>Salmonella entérica subsp entérica</i> ser. Newport
ST	<i>Salmonella entérica subsp entérica</i> ser. Typhimurium
<i>S. Typhimurium</i>	<i>Salmonella</i> Typhimurium
TSI*	Triple Azúcar Hierro
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colonia por mililitro
XLD	Xilosa, Lisina, Desoxicolato

---

\*Abreviatura original en inglés

## 1. Introducción

La creciente y emergente resistencia antimicrobiana representa una seria amenaza para la salud pública mundial (1). Los antibióticos convencionales son cada vez más ineficaces como resultado del desarrollo de la resistencia antimicrobiana (2). En los últimos años, patógenos transmitidos por alimentos como *Salmonella*, se han asociado con un aumento de casos de muertes humanas, un mayor tiempo de permanencia en el hospital y altos costos en el tratamiento por la baja eficacia de la terapia convencional (3). Incluso se estima que, si no se introducen las estrategias adecuadas, este problema continuará creciendo, causando cerca de diez millones de muertes anuales para el año 2050. Por esta razón, los estudios en busca de una posible y eficaz alternativa al tratamiento convencional para las infecciones causadas por microorganismos resistentes a los antibióticos es de gran interés (4).

*Salmonella* es una de las bacterias transmitidas por los alimentos más importantes del mundo y es una de las principales causas de diarrea en niños y adultos, las fuentes de transmisión de *Salmonella* son productos alimenticios contaminados, principalmente los de origen animal como aves de corral, res, cerdo, huevos y productos lácteos, así como el contacto directo con animales infectados (5). El aumento de la prevalencia de *Salmonella* resistente a múltiples fármacos es un problema emergente en todo el mundo, debido a su uso con fines terapéuticos y profilácticos en humanos y en la cría de animales. Los alimentos juegan un papel importante en la transferencia de la resistencia a los antibióticos debido a la presencia de residuos de antibióticos y a la transferencia de genes resistentes de la microbiota de los alimentos a las bacterias patógenas (6).

Estudios realizados, globalmente, han demostrado un aumento en la incidencia de infecciones por *Salmonella*, aproximadamente 94 millones de casos de gastroenteritis registrados anualmente, de los cuales 80,3 millones son de origen alimentario y donde predominan serotipos como *Salmonella entérica subsp entérica* ser. Typhimurium (ST), *Salmonella entérica subsp entérica* ser. Enteritidis (SE), *Salmonella entérica subsp entérica* ser. Heidelberg (SH) y *Salmonella entérica subsp entérica* ser. Newport (SN), que son los serotipos más importantes en salud pública (3).

Estudios realizados en Colombia, demuestran un incremento en la resistencia antimicrobiana de cepas de *Salmonella* aisladas de avícolas. El laboratorio de microbiología del Instituto Nacional de Salud (INS), entidad encargada de hacer vigilancia y control de las enfermedades, en un estudio

realizado desde 1997 a 2010 reportó un aumento de casos de *Salmonella* spp, siendo *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* los dos serotipos reportados más frecuentemente y los de mayor importancia zoonótica y de salud pública (7). Estas cepas, son muy peligrosas y de gran preocupación para la seguridad alimentaria, por lo que es necesario monitorear su resistencia frente a los antimicrobianos, realizar una planificación eficaz de la inocuidad de los alimentos con intervenciones más específicas y continuar en la búsqueda de alternativas para combatir la salmonelosis (6).

El desarrollo de una nueva clase de antibióticos se ha vuelto necesario (8), impulsando investigaciones sobre el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos. De hecho, en el año 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS), publicó la primera lista de "patógenos prioritarios" resistentes a los antibióticos, en donde *Salmonella* se encuentra categorizada con prioridad elevada para la investigación y el desarrollo de nuevos antibióticos, con el fin de contrarrestar el aumento gradual de la resistencia a los antimicrobianos en el mundo (9).

Los PAMs como los que se han desarrollado en la Fundación Instituto de Inmunología (FIDIC) son candidatos prometedores, como alternativas a los antibióticos actuales, representando una de las mejores armas para combatir el crecimiento de microorganismos y potencializar el tratamiento ante las infecciones causadas por diferentes patógenos (4). Diversos estudios de estructura - actividad realizados en la FIDIC han conducido al desarrollo de tres candidatos promisorios por su potencial terapéutico contra bacterias Gram-negativas: los péptidos 35409-1, 35409-13 y 41781, estos péptidos antimicrobianos no tienen actividad hemolítica o citotóxica a la concentración mínima a la que inhiben el crecimiento bacteriano, lo que los convierte en candidatos terapéuticos de gran interés. Sin embargo, hasta ahora su utilidad para combatir *Salmonella* spp de origen aviar aún no ha sido evaluada.



## 2. Marco conceptual y generalidades

### 2.1. *Salmonella*, características generales

*Salmonella*, es un género de bacterias Gram-negativas con forma de bastoncillo, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Este género se refiere a patógenos primarios intracelulares que conducen a diferentes manifestaciones clínicas en el desarrollo de la infección en humanos y animales (10). Las bacterias son microorganismos no formadores de esporas, con un diámetro que oscila alrededor de 0,7 a 1,5  $\mu\text{m}$  y una longitud de 2 a 5  $\mu\text{m}$  y tienen movilidad por medio de flagelos peritricos. Su respiración es anaerobia facultativa (10), tienen la capacidad de metabolizar los nutrientes por vías respiratorias y fermentativas, denominadas bacterias quimioorganotróficas y utilizan el citrato como única fuente de carbono. La mayoría de los serotipos de *Salmonella* puede llegar a crecer en una escala de temperatura de 5 a 47°C, sin embargo, su temperatura óptima de crecimiento es 35-37°C, su pH de crecimiento óptimo está entre 6,5 y 7,5 pero puede crecer con valore entre 4-9 (11).

*Salmonella* es una de las enterobacterias de mayor interés a nivel de salud pública y animal, debido a que produce enfermedades en el tracto gastrointestinal y septicemia tanto en el ser humano, como en varias especies animales (12). Una vez *Salmonella* infecta el tracto gastrointestinal, las bacterias se evacuan en las heces, donde puede propagarse por roedores, insectos y diferentes animales, llegando a estar finalmente en aguas contaminadas (12).

#### 2.1.1. Clasificación taxonómica y nomenclatura de *Salmonella*

La siguiente clasificación taxonómica pertenece al microorganismo *Salmonella* spp (13).

**Dominio:** Bacteria

**Filo:** Proteobacteria

**Clase:** Gammaproteobacteria

**Orden:** Enterobacterales

**Familia:** Enterobacteriaceae

**Género:** *Salmonella*

De acuerdo con las propiedades bioquímicas y la relación genómica, el género *Salmonella* consta de dos especies principales, *Salmonella entérica* (*S. entérica*) y *Salmonella bongori* (*S. bongori*), y cada especie contiene múltiples serotipos (11,14–16). Hasta el momento, se han descrito 2600 serotipos pertenecientes a *S. entérica* en todo el mundo, donde la mayoría de estos son capaces de provocar infecciones en el hombre y los animales (3); *S. entérica* se divide en seis subespecies, donde se pueden identificar con un número romano y un nombre respectivo. En la Tabla 1 se especifican las especies y subespecies de *Salmonella* y su hábitat usual. Dentro de las subespecies más importantes está la *S. enterica subsp. enterica* (I) debido a su gran trascendencia en salud pública y salud animal, donde hasta el 2010 se habían identificado alrededor de 1575 serotipos de esta subespecie. De todos, tan solo 100 serotipos tienen importancia debido a que pueden causar enfermedades en diversas especies (11,15,16).

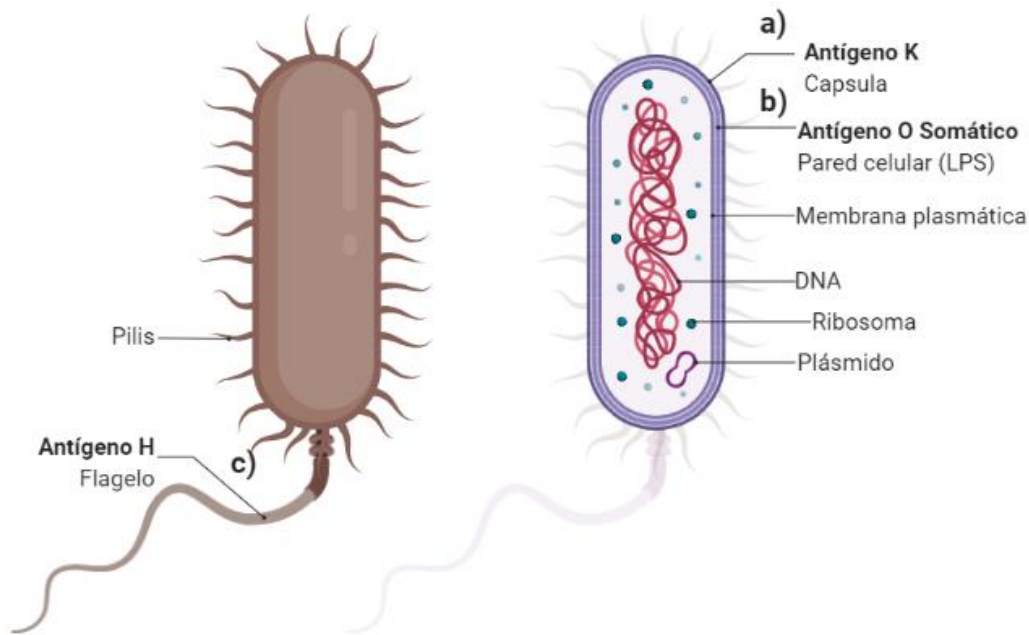
<b>Especie y subespecie de <i>Salmonella</i></b>	<b>Hábitat donde se encuentra</b>
<i>S. entérica subsp. entérica</i> (I)	Animales de sangre caliente
<i>S. entérica subsp. salamae</i> (II)	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. entérica subsp. arizonae</i> (IIIa)	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. entérica subsp. diarizonae</i> (IIIb)	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. entérica subsp. houtenae</i> (IV)	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. entérica subsp. indica</i> (VI)	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. bongori</i>	Animales de sangre fría y ambiente

**Tabla 1.** Especies y subespecies de *Salmonella* spp y su hábitat usual. Tomado y modificado de (11)(15)  
 A causa de la diversidad y cantidad de serotipos encontrados, el Centro Colaborador de Referencia e Investigación en *Salmonella* spp de la OMS y el Instituto Pasteur (París, Francia), son las entidades encargadas de definir y actualizar la clasificación de *Salmonella* basándose en el esquema Kauffmann-White (10,14), donde indican la clasificación del género, en serotipos de acuerdo a la combinación de dos principales determinantes antigénicos, el somático (O) y el flagelar (H). El antígeno somático (O) pertenece a la membrana celular externa de la bacteria, es termoestable y forma parte del componente oligosacárido del lipopolisacárido (LPS). Los antígenos H son

termolábiles, se encuentran presentes en los flagelos bacterianos y hacen parte de la activación de la respuesta inmunitaria del huésped (**Figura 1**)(3).

Por lo general, los serotipos o serovares de *Salmonella* frecuentemente son escritos por su nombre corto. Oficialmente, en la primera cita de un serotipo se da el nombre del género (cursiva), el nombre de la especie (cursiva), la subespecie (cursiva), seguido de la palabra "serotipo y luego el nombre del serotipo "(este escrito en letra normal sin cursivas), por ejemplo, *Salmonella entérica subsp. entérica* serotipo Typhimurium, el cual puede ser abreviado por *Salmonella* Typhimurium o *S. Typhimurium* (7,16,17).

Hasta ahora, las cepas de *Salmonella* pertenecen a más de 50 serotipos basados en el antígeno O y a más de 2500 serotipos (cada serotipo tiene designado una composición única del antígeno somático O y de los antígenos flagelares H)(14). La gran mayoría de los serotipos hacen parte de una sola subespecie que es *S. entérica*, donde se encuentran asociados con el 99% de las enfermedades humanas y animales ocasionados por este microorganismo patógeno (7,14,16,17).



**Figura 1.** Estructura celular y antigénica de *Salmonella* spp. Se representa la estructura celular de *Salmonella* spp, con alguna de sus partes celulares y sus partes antigénicas, a) antígeno K, de capsula, b) antígeno O, somático y c) antígeno H, flagelar. Creación del autor con base a (14)

### 2.1.2. Patogenicidad y virulencia

A pesar de que los diferentes serotipos de *S. entérica* (I), están estrechamente relacionados genéticamente, existe una enorme variación en su virulencia y epidemiología. En el ser humano, se pueden presentar dos tipos de infecciones: (i), una infección generalizada con presencia de fiebre continua, que involucra al sistema fagocítico mononuclear y se caracteriza por las fiebres entéricas o fiebres tifoideas con una temperatura de 40°C, gastroenteritis, diarrea y sudoración profusa, provocada principalmente, por *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi A, B y C y otros serotipos tifoideos. (ii), una infección específica en el tracto digestivo, producida por intoxicaciones alimentarias, la cuál puede ser provocada por la mayoría de los serotipos (no tifoideos) (18,19).

*Salmonella* cuenta con varios mecanismos que le posibilita adherirse a las células epiteliales del intestino delgado y así, logre sobrevivir al pH ácido del estómago, así mismo, es capaz de tolerar bien el estrés oxidativo provocado por el óxido nítrico o el peróxido de hidrogeno, lo que desempeña una función definitiva en la infectividad a nivel celular y de defensa en el microorganismo (20). *Salmonella* es capaz de propagarse dentro de las células intestinales, logrando liberar una endotoxina, donde puede causar daño de la mucosa del intestino delgado y el colon (21), sin embargo, se han venido reportando brotes alimentarios con infecciones a nivel urinario y del apéndice vinculados a *Salmonella*, sugiriendo otros mecanismos de infectividad de este microorganismo a otros tejidos (7,17).

Las variaciones genéticas, o polimorfismos, son particularmente prominentes en dos clases generales de locus: (a) genes que codifican estructuras de superficie como LPS, flagelos y fimbrias, y (b) genes de virulencia específicos que codifican factores que modifican la fisiología de la célula huésped o protegen a las bacterias de los sistemas antimicrobianos del huésped (19).

La virulencia de las cepas de *Salmonella* se asocia tanto con genes cromosómicos como plasmídicos. En el cromosoma bacteriano, existen grandes casetes de genes, llamados islas de patogenicidad (SPI), que codifican casi 60 genes responsables de interacciones específicas con el organismo huésped (22).

### **2.1.3. Manifestaciones clínicas**

*Salmonella* es un patógeno de interés alimentario en todo el mundo. Este microorganismo es responsable de causar una enfermedad llamada salmonelosis, una gastroenteritis caracterizada por presentarse con diarrea, en algunas ocasiones con presencia de sangre, dolor de cabeza, fiebre, dolor abdominal y en algunas circunstancias fatiga, dolor muscular y fatiga. La duración de la enfermedad oscila entre 3 a 20 días, donde todo depende y está directamente relacionado con el estado inmunológico, la edad y la concentración de la bacteria en el organismo. En algunos casos *Salmonella* puede causar bacteremia e infecciones en otros tejidos del organismo (7,17).

Anualmente se presentan más de 1,3 millones de salmonelosis, 26.500 hospitalizaciones y 420 muertes en los Estados Unidos cada año, causadas por *Salmonella* (23,24), el porcentaje de hospitalización oscila entre 20-40%, todo depende del estado inmunológico del huésped, del serotipo y la resistencia antimicrobiana que este tenga (25). En un estudio realizado en Estados Unidos manifestó que en brotes donde el serotipo tenía baja resistencia a los antibióticos el porcentaje de hospitalizados era de un 8%, mientras que al contrario en casos donde las serotipos son multirresistentes el porcentaje aumentaba a 22% (7,17,25). Además, un pequeño número de personas demuestra tener un estado de portador asintomático de bacterias patógenas durante un año después de la desaparición de los síntomas (22).

Por otro lado, los serotipos que son altamente adaptadas a huéspedes animales, tales como *S. Gallinarum* que afectan las aves de corral o *S. Abortusovis* encontrados en las ovejas, solo puede producir síntomas muy leves en humanos. Sin embargo, *S. Choleraesuis*, cuyo huésped principal es el cerdo, también causa una enfermedad sistémica grave en el hombre. Los serotipos ubicuos, como *S. Enteritidis* o *S. Typhimurium*, afectan tanto al hombre como a los animales, causando generalmente infecciones gastrointestinales con menor gravedad que la fiebre entérica. Sin embargo, también tienen la capacidad de producir infecciones similares a la tifoidea en ratones y en humanos o colonización intestinal asintomática en pollos (17).

### **2.1.4. Aislamiento e identificación microbiológica de *Salmonella***

La identificación microbiológica de *Salmonella* está fundamentada en determinar un resultado cualitativo, es decir, detectar la presencia o ausencia del microorganismo en diferentes tipos de matrices o muestras. La técnica consta de cuatro etapas que están determinadas por la especificidad de los medios de cultivos utilizados, los requerimientos nutricionales y el comportamiento

metabólico del microorganismo, la mayoría de los serotipos del género no fermentan la lactosa, lo que ha permitido el desarrollo de una gran variedad de medios selectivos y diferenciales para lograr cultivo, aislamiento y la presunta identificación de *Salmonella* en el laboratorio (3,11).

El aislamiento de *Salmonella* se realiza generalmente de hisopos, órganos, muestras ambientales y alimentos, utilizando el método de cultivo tradicional que implica los siguientes pasos con el fin de mejorar la sensibilidad en la detección final del microorganismo (3).

#### **a) Etapa de pre - enriquecimiento**

El propósito de esta primera etapa es optimizar el rendimiento metabólico de las células de *Salmonella* spp y de la demás microbiota acompañante para permitir un completo crecimiento y desarrollo de los microorganismos. Se elabora a partir de un medio de cultivo nutricional no selectivo como agua peptonada, en incubación durante 18 a 24 horas a 37°C (11).

#### **b) Etapa de enriquecimiento selectivo**

En esta segunda etapa se utilizan medios de cultivo selectivos para *Salmonella* spp como Caldo Rappaport-Vasiliadis (RV) y Selenito Cistina (SC), favoreciendo el crecimiento del microorganismo e inhibiendo el desarrollo de la microbiota acompañante (11). Dependiendo el medio de cultivo utilizado se incuba a una temperatura determinada y a un tiempo específico.

#### **c) Etapa de aislamiento en medios selectivos**

Esta tercera etapa se fundamenta en el uso de medios de cultivo que sean selectivos para *Salmonella* spp, donde los más empleados son agar Xilosa, Lisina, Desoxicolato (XLD), agar Hektoen Entérico o un agar cromogénico para *Salmonella*. El objetivo es poder aislar, diferenciar e identificar las colonias de *Salmonella* spp de acuerdo con sus características morfológicas, bioquímicas y la composición nutricional que le proporcione el medio de cultivo (11). Se incuba a 37°C durante 24 a 48 horas.

#### **d) Pruebas bioquímicas diferenciales**

Esta última etapa se realiza con el objetivo de confirmar colonias sospechosas de *Salmonella* spp. Las pruebas bioquímicas se realizan en simultáneo y las más utilizadas son el agar triple azúcar hierro (TSI), el agar Lisina Hierro, urea, citrato, producción de indol, fermentación de azúcares como dulcitol y arabinosa. Se incuba a 37°C durante 18 a 24 horas y se realiza una interpretación de las reacciones basadas en la actividad metabólica de la bacteria (11).

### 2.1.5. Presencia de *Salmonella* en productos de pollo y huevos

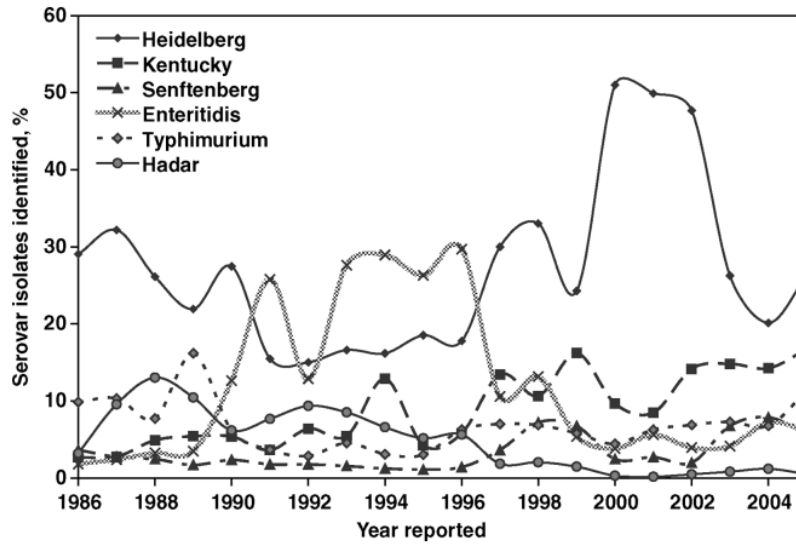
Un gran número de serotipos de *Salmonella* se ha asociado con la carne de aves de corral y los productos de huevo, siendo capaces de colonizar e infectar las aves vivas. La carne y los huevos de aves de corral contaminados, particularmente cuando la bacteria está presente en el contenido del huevo, son vehículos importantes de infecciones por *Salmonella* (7,18).

En la industria avícola se pueden encontrar diferentes factores que predisponen al ave a infectarse por *Salmonella*, como lo es la edad de las aves, el serotipo de *Salmonella*, el estrés (provocado por el medio ambiente, la presencia de aditivos alimentarios, como antimicrobianos y/o anticoccidiales), la competencia con la microbiota intestinal y la presencia de un sitio de colonización compatible para *Salmonella* en el organismo del ave). Así mismo, hay varias fuentes potenciales de contaminación por *Salmonella* en una operación avícola integrada, aquí, las aves más pequeñas pueden infectarse por transmisión vertical a través de padres infectados o por transmisión horizontal a través de criaderos, sexado en criaderos contaminados, infección cloacal, equipo de transporte y alimento. Los factores ambientales como el aire, la basura y las instalaciones sucias, y los vectores, como los insectos, los seres humanos y los roedores, son responsables de la contaminación por *Salmonella* en las granjas avícolas (7,18,26).

Las aves de corral pueden llegar a infectarse con diferentes serotipos de *Salmonella*, algunos de estos serotipos como *S. Pullorum* y *S. Gallinarum*, son hospedadores específicos de pollos, mientras que otros, como *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* y *S. Heidelberg*, pueden infectar una amplia variedad de hospedadores. Hay varios serotipos de *Salmonella* comúnmente identificados asociados con pollos en los Estados Unidos, siendo los serotipos más comunes *S. Enteritidis*, *S. Kentucky*, *S. Heidelberg*, *S. Typhimurium* para aislamientos clínicos y *S. Heidelberg*, *S. Kentucky*, *S. Typhimurium*, *S. Senftenberg* y *S. Enteritidis* para aislamientos no clínicos (7,17).

Se ha evidenciado carencia de la información y de notificaciones por las entidades reguladores del mundo, debido a que no se cuenta con información reciente en Colombia y en el mundo, acerca de la prevalencia de *Salmonella* como una enfermedad zoonótica asociadas a las aves de corral. Sin embargo, en un estudio publicado en 2004, los serotipos de *Salmonella* más comunes aislados durante los de 1986 a 2004 se resumen en la **Figura 2**, una revisión de los porcentajes relativos de los serotipos prominentes identificados en los informes del Laboratorio de Servicios Veterinarios Nacionales y de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades para aislamientos

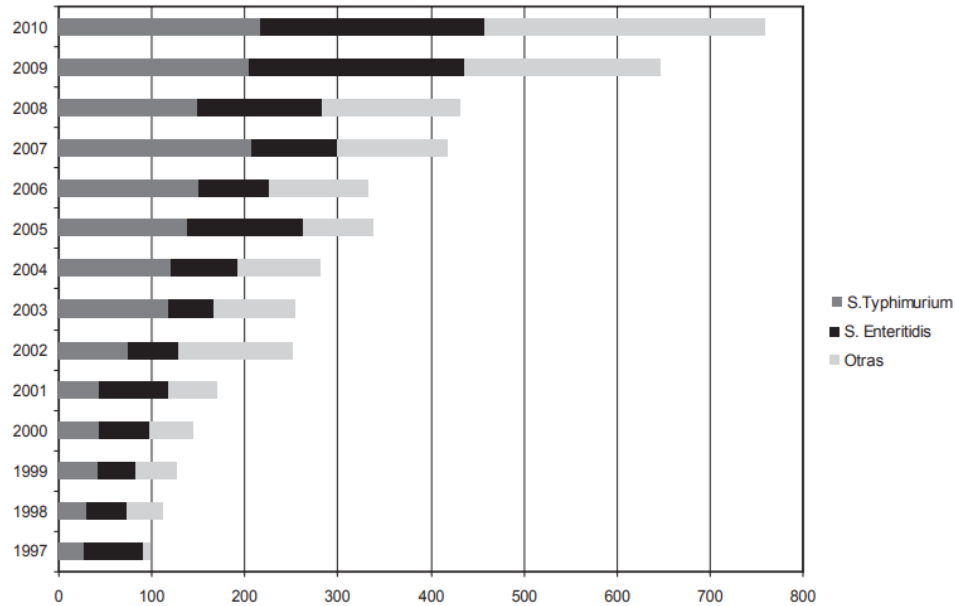
en pollos durante esos años. Los datos presentados a continuación son los porcentajes de todas las *Salmonella* aisladas de pollo, desde principios hasta mediados de la década de 1990, donde *S. Enteritidis* fue el serotipo notificado con más frecuencia en los Estados Unidos, así como en Europa (7).



**Figura 2.** Revisión de los porcentajes relativos de los serotipos para aislamientos en pollos, durante los años 1986 a 2004, en Estados Unidos y Europa. Tomado de (26)

También, en el año 2011 en Colombia, el laboratorio de microbiología del Instituto Nacional de Salud, notificó un estudio realizado entre los años 1997 a 2010, donde se evidencia el incremento de los dos serotipos más frecuentes, *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* (**Figura 3**).





**Figura 3.** Serotipos de *Salmonella* spp aislados de humanos para Colombia, de 1997 a 2010, asociados a aves de corral. Fuente: Instituto Nacional de Salud, 2011. Tomado de (7)

### 2.1.6. Terapia y resistencia antimicrobiana

Generalmente la Salmonelosis es auto-limitante, en años recientes se ha observado un aumento en la aplicación de antibióticos para controlar la enfermedad, donde el antibiótico por elección para adultos son las fluoroquinolonas (7).

El cloranfenicol fue el primer antimicrobiano que resultó eficaz en la fiebre entérica y durante muchos años fue el tratamiento estándar. El tratamiento con cloranfenicol logró la resolución de los síntomas en 4 a 6 días y transformó una enfermedad prolongada, debilitante y potencialmente fatal en una condición tratable con una baja tasa de letalidad. Las desventajas del cloranfenicol son su administración cuatro veces al día y la necesidad de administrarlo durante al menos 2 semanas para reducir el riesgo de recaída de hasta el 10-15% (6). A principios de la década de 1960, se registró la primera incidencia de resistencia antimicrobiana de *Salmonella*, la cual, se trataba de este único antibiótico; desde entonces, el aislamiento de serotipos de *Salmonella* resistentes a uno o más tipos de antibióticos ha aumentado a nivel mundial (3).

Durante los años 70 y 80 las cepas de *Salmonella* mostraron tener una variada susceptibilidad a la ampicilina, tetraciclina y trimetropin sulfato (27). Sin embargo, en los últimos 20 años, se presentaron casos en todo el mundo con resistencia antimicrobiana a ampicilina, trimetropin sulfato, cloranfenicol, aminoglucósidos y sulfonas, relacionada en cierta parte a la facilidad que tiene esta

bacteria en poder traspasar componentes de resistencia como integrones, plásmidos, transposones por medio de la resistencia horizontal (7,27,28).

Cabe resaltar que se ha observado que una gran parte de las cepas de *Salmonella* procedentes de la industria avícola han incrementado su resistencia antimicrobiana (7). La primera isla de genes reportada fue la “*Salmonella* genomic island 1 (SGI1)” encontrada en *S. Typhimurium* TD104, esto debido, a que posee un cluster de genes de resistencia a varios antimicrobianos como ampicilina, sulfonamida, cloranfenicol, streptomycin y tetraciclina. Recientemente se ha detectado que *S. Typhimurium* TD104, también posee un plásmido que contiene el gen ampC (blaCMY), que codifica para un  $\beta$ -lactamasa y es capaz de conferirle resistencia también a ampicilina (28). Adicionalmente, su multi-resistencia es de gran interés, debido a que es capaz de ocasionar infecciones extraintestinales severas en humanos (7,28).

La resistencia de *Salmonella* múltiples antibióticos está definida como la resistencia a los antibióticos tradicionales de primera línea como la ampicilina, el cloranfenicol y el trimetoprim-sulfametoxazol (3). Las cefalosporinas de espectro extendido, fluoroquinolonas y azitromicina se establecieron como alternativas efectivas (29), donde según la lista de las bacterias para las que necesitan nuevos antibióticos de la OMS las fluoroquinolonas ya hacen parte de la lista de antibióticos contra los que *Salmonella* ha desarrollado resistencia (9).

## **2.2. Alternativas terapéuticas contra la resistencia antimicrobiana**

La creciente y emergente situación en salud pública en todo el mundo debido a la resistencia antimicrobiana, ha generado la constante búsqueda de nuevos efectos de los agentes antimicrobianos y/o sus combinaciones en sistemas in vitro e in vivo para su contención (30). La OMS ha manifestado, que la resistencia antimicrobiana es una de las 10 principales amenazas de salud pública a las que se enfrenta la humanidad (31), en esta seria problemática, se requieren más innovaciones e inversiones en investigación y desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos, especialmente los dirigidos contra bacterias gramnegativas críticas, como las enterobacteriáceas resistentes a los antibióticos carbapenémico (31).

Muchas de las tendencias innovadoras que se han estudiado, implican distintas combinaciones entre antibióticos tradicionales o también, el diseño de mezclas entre múltiples antimicrobianos naturales con efectos sinérgicos entre estos. Donde se ha evidenciado que el efecto potencial de

dichas combinaciones puede ser un excelente indicador de que, en un futuro cercano, la terapia antimicrobiana combinada puede ser una solución alternativa para mitigar y/o solucionar la multi-resistencia generada por las bacterias contra los antibióticos tradicionales (30).

Las vacunas y los probióticos han demostrado ser buenos agentes con actividad profiláctica, donde se ha evidenciado que disminuyen la incidencia de infecciones, implicando un ahorro futuro en el uso de antibióticos (32). Los bacteriófagos, son virus que infectan y parasitan a las bacterias, estos pueden presentar un ciclo lítico que genere la lisis de la bacteria infectada. Se han encontrado, fagos específicos para un determinado género o especie bacteriana, sin embargo, al ser elementos activos, los fagos deben someterse a rigurosos controles de calidad para asegurar la ausencia de efectos indeseables y además de esto ninguno se encuentra disponible en el mercado (32,33).

Los PAMs sintéticos, son grandes candidatos debido a que tiene potentes características intrínsecas antimicrobianas, sinérgicas y antagónicas, que presenta con otros mediadores inmunológicos. Debido a su amplio espectro de actividad, un único péptido puede actuar contra bacterias Gram negativas, Gram positivas, hongos, e incluso virus y parásitos, aumentando el interés por investigar la dinámica de estas moléculas (34) Pocos PAM han sido aprobados por la FDA, algunos solo para uso veterinario (32).

### **2.3. Péptidos antimicrobianos PAMs**

Los PAMs son secuencias de aminoácidos (6 a 100 aminoácidos) con actividad contra diferentes microorganismos en el mundo, generalmente presentan carga positiva (+2 a +11), debido a que contienen una parte de residuos de arginina y/o lisina que interactúan con los grupos de cabeza de fosfato cargados negativamente de la membrana bacteriana, (4,35–37) así mismo, los PAMs son las nuevas moléculas antimicrobianas más prometedoras en el mundo, debido a su gran potencial terapéutico. Se originan en todos los dominios de la vida, desde bacterias, hongos y plantas, hasta invertebrados y mamíferos. Desde la década de 1980, se han aislado e identificado de diferentes especies de plantas y animales, péptidos con actividad antimicrobiana, lo que los hace que sean considerados como antibióticos naturales. Muchos de estos péptidos naturales, han sido tomado como moldes para poder desarrollar péptidos sintéticos y mejorar su actividad antimicrobiana (35).

Los PAMs tienen una serie de ventajas potenciales como futuras terapias; además de su actividad antimicrobiana de amplio espectro y la rápida destrucción de microorganismos, algunos PAMs no se ven afectados por los mecanismos clásicos de resistencia a los antibióticos. Es significativo que, dada su propensión a permeabilizar las membranas microbianas diana, la aplicación potencial más prometedora de los PAMs es la mejora de la potencia de los antimicrobianos existentes al facilitar el acceso a la célula microbiana, lo que resulta en efectos terapéuticos sinérgicos. Curiosamente, aunque el papel biológico fundamental de los PAMs es la actividad antimicrobiana, estudios recientes han destacado nuevas funciones alternativas para estas moléculas, incluidas las actividades inmunomoduladoras, la neutralización de endotoxinas, la cicatrización de heridas y las propiedades antineoplásicas (38).

### **2.3.1. Propiedades físico químicas**

Un requisito esencial para cualquier agente antimicrobiano es que tenga toxicidad selectiva para el objetivo microbiano. Varios factores determinan la selectividad de los PAMs sobre los microorganismos; por un lado, las características y la composición de la membrana microbiana, y las características estructurales que las diferencian de las membranas de células animales o humanas. Por otro lado, las características fisicoquímicas de los PAMs como, su estructura secundaria, carga y anfipaticidad (1,35) .

#### **a) Carga**

Se ha informado de la existencia de péptidos con carga negativa (aniónicos), neutra y positiva (catiónicos). Sin embargo, la gran mayoría de los PAMs identificados tienen una carga neta positiva (que oscila alrededor de +6). Los PAMs catiónicos, suelen ser más activos porque son atraídos electrostáticamente por la carga negativa de las membranas microbianas, esto se correlaciona directamente con la potencia y la selectividad del péptido antimicrobiano. Además, un aumento de valor en la carga positiva del péptido puede estar relacionado con la disminución de la toxicidad hacia las células del huésped (39).

#### **b) Secuencia**

La secuencia es la composición de aminoácidos que posee cada péptido antimicrobiano y es fundamental debido a que va a determinar la secuencia estructural y las propiedades fisicoquímicas del PAM. Se ha informado que los PAMs, contienen principalmente lisina, glicina y leucina, así

mismo, la presencia de arginina, o lisina con triptófano ayuda a los péptidos en la inserción a la membrana microbiana (35).

#### **c) Estructura**

Los péptidos antimicrobianos pueden tomar diferentes estructuras secundarias, desde una hélice- $\alpha$ , una lámina- $\beta$  hasta estructuras mixtas. Se sabe que los PAMs con estructura helicoidal suelen presentar mayor actividad en las membranas microbianas, pero también en las membranas de los glóbulos rojos (35)

#### **d) Hidrofobicidad**

La hidrofobicidad en los PAMs se refiere al porcentaje de aminoácidos hidrófobos que estén en su secuencia. La hidrofobicidad le permite a los PAMs sean solubles y se unan a la membrana microbiana y logren dividir la bicapa lipídica. En promedio, los PAMs contienen aproximadamente un 50% de residuos hidrófobos (35,39).

#### **e) Anfipaticidad**

Los PAMs son capaces de tomar estructuras anfipáticas, donde una región es hidrófoba y la otra hidrófila, lo que los hace moléculas activas de membrana. La anfipaticidad se designa como la distribución espacial de aminoácidos hidrófobos y polares que da como resultado una separación más o menos acentuada en la estructura del PAM (35,39).

Esta propiedad es muy importante para la selectividad y actividad antimicrobiana de los PAMs, tanto para los que son  $\alpha$ -hélice y los que son lamina- $\beta$ . En péptidos helicoidales la anfipaticidad ayuda al hundimiento de las regiones hidrófobas en la bicapa de la membrana, que es un paso esencial que conduce a la ruptura de la membrana (35,39)

### **2.3.2. Clasificación de los PAMs**

Los PAMs pueden clasificarse según su estructura, en cuatro clases principales según su estructura secundaria (4).

#### **a) $\alpha$ -helicoidales**

La mayoría, son péptidos lineales no estructurados libres de residuos de cisteína que se pliegan en  $\alpha$ -hélices al entrar en contacto con las membranas o al entrar en contacto con disolventes orgánicos o detergentes como el dodecil sulfato de sodio (SDS) (**Figura 4a**) (4,40,41).

Los péptidos  $\alpha$ -helicoidales son los más abundantes en la naturaleza y se han aislado de diferentes especies como plantas, insectos y mamíferos. Algunos de estos péptidos no son estrictamente  $\alpha$ -helicoidales y pueden poseer un retorcimiento interno y / o un segmento flexible no estructurado en el extremo N y / o C terminal (4,40,41).

Se necesita mínimo de 7-8 aminoácidos de longitud para formar una estructura helicoidal con regiones hidrófobas e hidrófilas separadas las cuales facilitarían la solubilidad del péptido en medios acuosos y a su vez la interacción con las colas hidrófobas de los lípidos de las membranas microbianas (39).

#### **b) Lámina $\beta$**

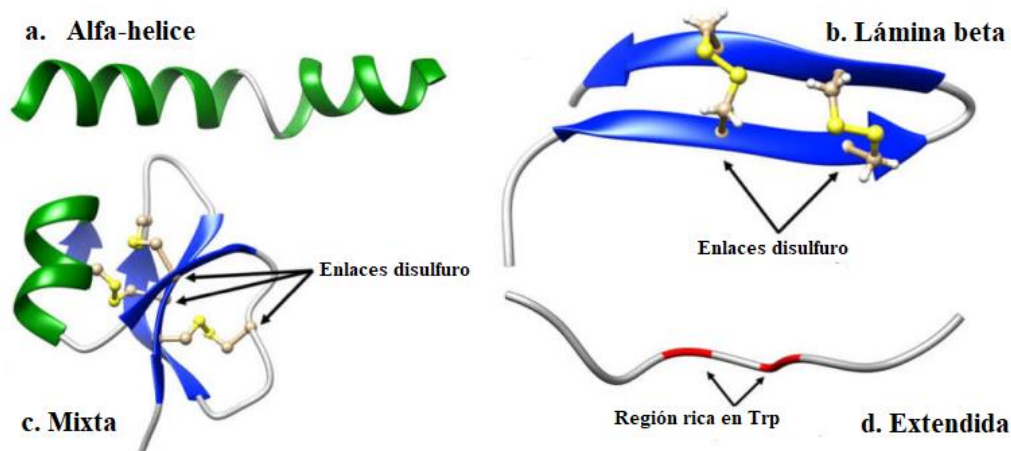
Los PAMs de lámina  $\beta$  consisten en al menos dos cadenas  $\beta$  con muchas estructuras lineales que adoptan una conformación similar a una horquilla  $\beta$ . La mayoría de los miembros de esta familia contienen residuos de cisteína conservados que forman puentes disulfuro crítico, lo que da como resultado una estructura anfipática de hoja  $\beta$  estabilizada (**Figura 4b**). En estos PAMs, la actividad antimicrobiana generalmente se atribuye a los residuos catiónicos y las cadenas laterales hidrofóbicas expuestas en las hojas  $\beta$  antiparalelas (4,40). Los PAMs de hoja  $\beta$  están más estructurados en solución y no sufren ningún cambio estructural determinante cuando se pasa de un entorno acuoso a un entorno de membrana (42).

#### **c) Mixtos**

Esta clase de PAMs contiene una estructura mixta, tanto hélices  $\alpha$  como láminas  $\beta$ , y se dirige fuertemente a las membranas. Los miembros más destacados son las defensinas de plantas e insectos que tienen actividad antifúngica debido a interacciones con esfingolípidos de membrana fúngica (**Figura 4c**) (40).

#### **d) Extendidos**

Estos PAMs tienen una estructura de bobina extendida, son lineales sin residuos de cisteína y contienen una alta proporción de prolina, arginina, glicina, triptófano e histidina (43), carecen de estructuras de hélice  $\alpha$  y lámina  $\beta$  (**Figura 4d**). Muchos de estos PAMs, son ricos en triptófano y tienen segmentos hidrófobos e hidrofílicos en su secuencia. Los péptidos ricos en prolina tienen entre 15 y 39 residuos y por lo general actúan sobre objetivos intracelulares (40).



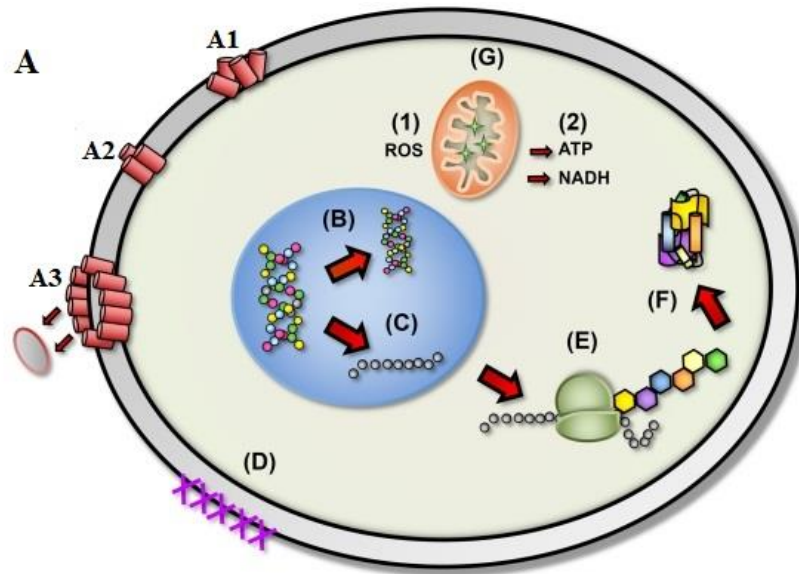
**Figura 4.** Clasificación de los péptidos antimicrobianos según su estructura secundaria. Se representa las cuatro estructuras de los péptidos antimicrobianos. a).  $\alpha$ -helicoidal. b). Lamina  $\beta$ , con una representación de los enlaces disulfuro. c). Mixta, la cual tiene estructura de hélice  $\alpha$  y lámina  $\beta$ . d). Extendidos, con una forma lineal con regiones ricas en triptófano. Tomado y editado de: (40).

### 2.3.3. Mecanismos de acción de los PAMs

La mayoría de los PAMs actúan directamente contra la membrana celular de los microorganismos generando la formación de poros, lo que permite la salida de iones y nutrientes esenciales. Sin embargo, el mecanismo puede variar según el péptido, su secuencia de aminoácidos y la composición de lípidos de la membrana del microorganismo. De modo que, algunos PAMs pueden tener acción intracelular, comenzando con la interacción inicial con la membrana que les permitiría penetrar en la célula para generar efectos como la inhibición de la biosíntesis de la pared celular, de ADN, ARN y/o proteínas. Estas propiedades, combinadas con la amplia gama de actividad y el corto tiempo de contacto requerido para inducir la muerte, han llevado a considerar a los PAMs como candidatos prometedores para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos (**Figura 5**) (38,44).

La interacción preliminar de los PAMs con membranas microbianas, generalmente, se logra a través de las interacciones electrostáticas, es decir, por las cargas presentes de ambas partes, la carga positiva de los PAMs y su atracción electrostática hacia las cargas negativas de las paredes bacterianas (36). Tras esta interacción, los PAMs se acumulan en la superficie y se autoensamblan en la membrana bacteriana después de alcanzar una determinada concentración, generando así, interacciones hidrofóbicas con los lípidos y áreas de desequilibrio en la membrana externa. Una

vez ahí, los PAMs pueden sufrir alteraciones en su estructura y generar daños en la membrana o dentro de la célula (43,45,46)



**Figura 5.** Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos en bacterias. Se esquematiza A. Ruptura de la integridad de la membrana celular por medio de tres modelos. A1) modelo duela del barril, A2) modelo del poro toroidal, A3) modelo de la alfombra, B. Inhibición de la síntesis de ADN, C. Bloqueo de la síntesis de RNA, D. Inhibición de las enzimas determinantes en la unión de proteínas estructurales para la formación de la pared celular, E Inhibición de la actividad de los ribosomas y síntesis de proteínas, F. Inhibición de la actividad de las chaperonas, G. 1. Inhibición de la cadena respiratoria, G2. Ruptura de la membrana mitocondrial. Tomado y editado de (38).

#### a) Modelo de alfombra

En este modelo los PAMs se adsorben en paralelo a la bicapa lipídica, alcanzando una concentración suficiente para cubrir la superficie de la membrana, formando así una especie de alfombra. Aquí se inducen diferentes interacciones que ponen en peligro la integridad de la membrana, produciendo un efecto similar al de un detergente que va a debilitar y desintegrar la membrana microbiana, lo que produce la muerte celular por pérdida del contenido citoplasmático (**Figura 6a**) (43,45).

#### b) Formación de duela de barril

En este modelo los PAMs se ubican inicialmente en paralelo a la membrana, pero finalmente cambian de una orientación perpendicular en la bicapa lipídica, para formar poros en forma de barril. La estructura anfipática permite que la superficie hidrófoba interactúe con los lípidos de la

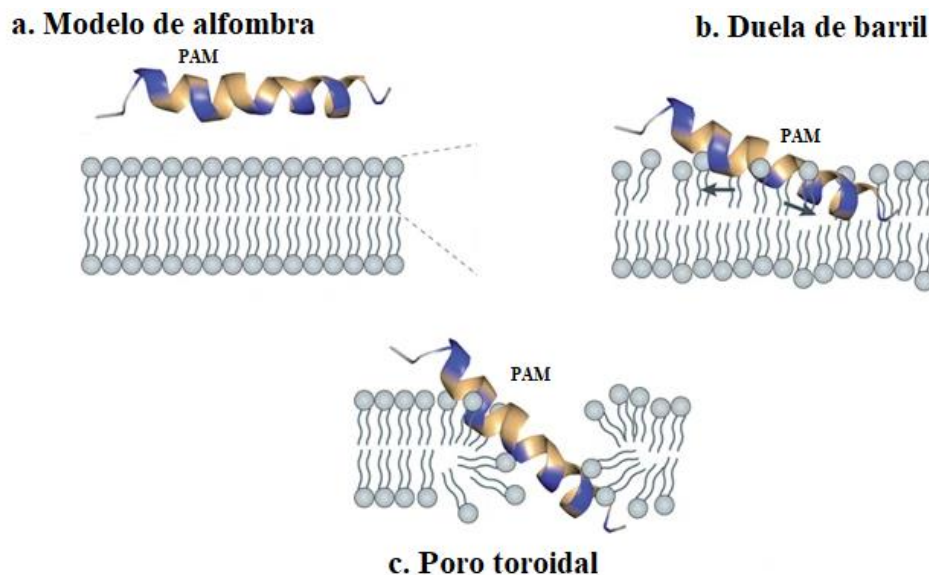


membrana y las regiones hidrófilas, lo que mantiene interacciones péptido-péptido, alterando y generando una pérdida en el equilibrio osmótico y solidez de la membrana (**Figura 6b**) (43,45).

Se produce una estructura anfipática del péptido (helice  $\alpha$  con  $\sim 22$  residuos y/o hoja  $\beta$  con  $\sim 8$  residuos), debido a que las zonas hidrófobas interactúan con los lípidos de la membrana y los residuos hidrófilos forman el lumen de los canales (43).

### c) Formación de poros toroidales

En este modelo los péptidos se insertan perpendicularmente en la bicapa lipídica, induciendo una curvatura local con los poros formados en parte por los péptidos y en parte por el grupo de cabeza de los fosfolípidos. Se denomina poro toroidal por la super molécula de lípido-péptido que se genera de manera dinámica y transitoria, aquí la disposición hidrofóbica e hidrofílica de la bicapa se rompe. Esto proporciona superficies alternativas para que interactúen la cola de lípidos y el grupo de cabeza de lípidos. (**Figura 6c**) (43).



**Figura 6.** Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos en la membrana bacteriana. Se esquematiza los mecanismos de acción de los PAMs. a) Modelo de alfombra. b) Modelo duela de barril. c) Modelo poro toroidal. Tomado y editado: (2,39).

### 2.3.4. PAMs desarrollados en la FIDIC

En la FIDIC, se han llevado a cabo múltiples trabajos de diseño y evaluación de PAMs, con los cuales se han identificado y optimizado péptidos con actividad contra bacterias. Dentro de estos estudios se han investigado principalmente dos secuencias:

1. El péptido *PfRif* o 35409 (RYRRKKKMKKALQYIKLLKE) derivado de la proteína Rifina de *P. falciparum* que tiene actividad contra bacterias *E. coli* desde 25  $\mu\text{M}$ , pero también actividad hemolítica desde 1,56  $\mu\text{M}$  (47).

Debido a la actividad tóxica de estos péptidos antimicrobianos contra glóbulos rojos (GRs), en la FIDIC se han evaluado diversos derivados sintéticos. En 2020 se publicó un estudio cuyo objetivo fue optimizar la secuencia del péptido 35409 para la obtención de péptidos sintéticos cortos (< 20 residuos de longitud) activos y selectivos por bacterias. Al evaluar la actividad biológica y características fisicoquímicas de los derivados, se encontró que el derivado 35409-1, de 17 residuos de longitud, tenía las mejores características terapéuticas ya que tenía una alta selectividad por células bacterianas, estabilidad en presencia de suero humano, actividad contra aislados clínicos multirresistentes de *E. coli*, un poderoso efecto membranolítico y un bajo potencial para inducir resistencia en las bacterias. Pero además, se identificó un segundo candidato de 14 residuos con actividad parcial contra bacterias que no ha sido estudiado a profundidad (péptido 35409-13) (1).

El péptido 1609 (LIKNFLKGKKVRKFGYIYIY) diseñado *de novo* que tiene actividad contra *E. coli* y *S. aureus*, pero también actividad hemolítica a bajas concentraciones (datos no publicados).

De esta secuencia se han evaluado diversos derivados, donde el péptido 41781 fue diseñado e identificado como un candidato promisorio debido a que un estudio realizado en 2020, determinó que el PAM 41781 fue capaz de inhibir el crecimiento bacteriano con una CMI de 12.5  $\mu\text{M}$  sobre *E. coli* 25922, así mismo fue capaz de inhibir el crecimiento de *S. aureus* con una CMI de 50  $\mu\text{M}$ . También se determinó su actividad como un agente bactericida contra *E. coli*, mostró una reducción en su actividad hemolítica con respecto a su péptido madre. El PAM fue evaluado frente a células epiteliales Vero, derivadas del mono *Chlorocebus sp*, donde mostró un bajo potencial citotóxico (48).

De esta manera, el diseño de PAMs ha dado lugar a tres candidatos de interés, los cuales presentan actividad antibacteriana (con valores de CMI menores a 100  $\mu\text{M}$  contra *E. coli*) y que no presentan actividad hemolítica a concentraciones menores o iguales a 200  $\mu\text{M}$ .

<b>Péptido</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Longitud</b>	<b>Carga</b>	<b>% de aa hidrofóbos</b>	<b>Estructura predicha</b>
<b>Derivados del péptido <i>Pf</i>Rif o 35409:</b>					
35409-1	RKKKMKKALQYIKLLKE	17	+8	35	helicoidal
35409-13	KMKKALQYIKLLKE	14	+7	42	helicoidal
<b>Derivado del péptido 1609:</b>					
41781	FLKGKKVRKFGYIYIY	16	+6	37	helicoidal

**Tabla 2.** Péptidos antimicrobianos selectivos por microorganismos con actividad antibacteriana

### **3. Hipótesis**

Los péptidos antimicrobianos 35409-1, 35409-13 y 41781 tienen actividad membranolítica contra *Salmonella* spp de origen aviar

## **4. Objetivos**

### **4.1. Objetivo general**

Determinar la actividad antibacteriana de péptidos antimicrobianos contra *Salmonella* spp móvil de origen aviar e importancia zoonótica.

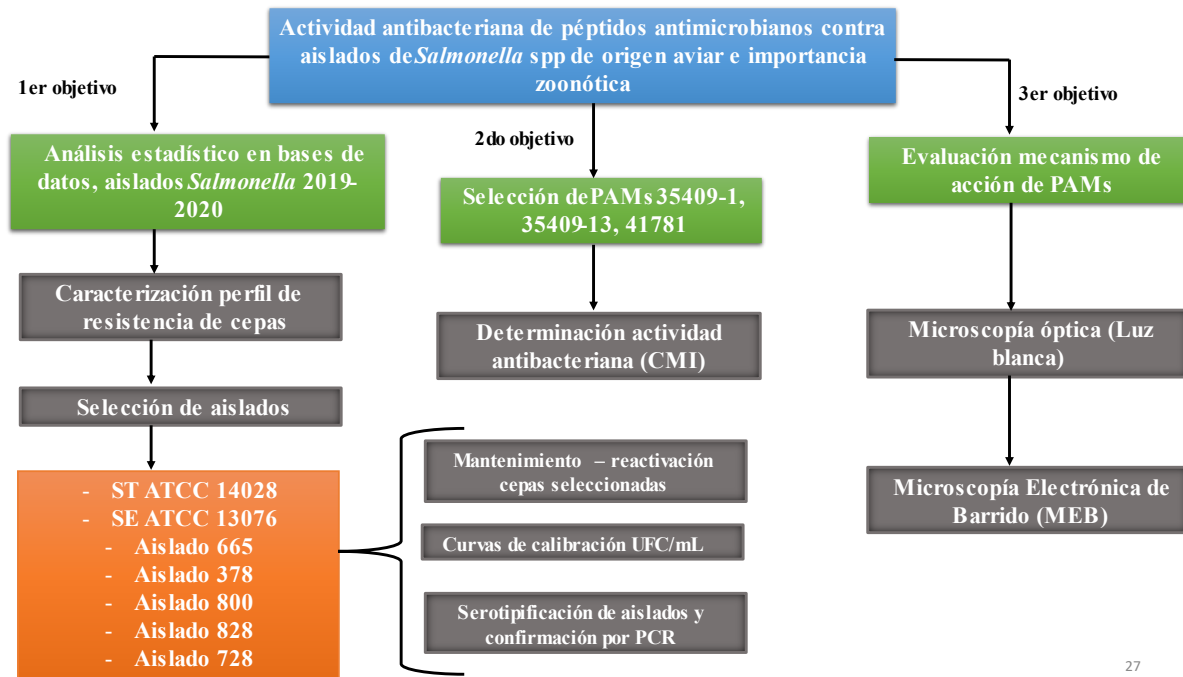
### **4.2. Objetivos específicos**

- Seleccionar cepas y aislados de *Salmonella* spp móvil con importancia zoonótica a partir de aislados bacterianos de aves de corral.
- Determinar la actividad antibacteriana de los PAMs 35409-1, 35409-13 y 41781 contra los aislados seleccionados de *Salmonella* spp
- Evaluar de forma preliminar el mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos contra *Salmonella* spp de origen aviar.

## 5. Metodología (Materiales y métodos)

Para el cumplimiento de los objetivos planteados, se realizó la metodología sintetizada en el siguiente esquema:

Figura 7. Esquema general de la metodología



Se representa la metodología en el orden en que se llevó a cabo, dando cumplimiento a cada objetivo planteado. (Del autor)

### 5.1. Base de datos para análisis estadístico

El laboratorio SERVET SAS es un laboratorio especializado en el diagnóstico aviar; el laboratorio proporcionó todos los datos acerca de la identificación microbiológica de los aislados bacterianos obtenidos en los años 2019-2020 de las muestras de aves recibidas de diferentes avícolas de Colombia. Cada reporte contenía información acerca de:

- Identificación interna del laboratorio: Número interno de orden o ingreso designado por el laboratorio, las muestras llegan a SERVET por sintomatología relacionada con alguna patología en un lote de aves o por control interno de la granja avícola.
- La explotación comercial del ave, que se refiere a la clase de explotación avícola según su línea de producción en la industria de aves(49). Aquí se distinguen cinco grupos:

- Ave de engorde: designada a la producción de carne para su consumo humano (49). Para el análisis microbiológico de estas aves se analizan muestras de tejido de sacos aéreos, hígado, tráquea y bazo.
  - Ave de postura: destinada a la producción de huevos para consumo humano (49). Para el análisis microbiológico de estas aves se procesan muestras de tejido de senos nasales, hígado, tráquea y oviducto.
  - Ave de levante: designada para la producción de huevos para su consumo humano, su cría se da desde el día uno hasta las 18 semanas de vida (49). Para el análisis microbiológico de estas aves se procesan muestras de tejido de senos nasales, hígado, tráquea y bazo.
  - Ave reproductora: destinada para la incubación de huevos fértiles. Para el análisis microbiológico de estas aves se procesan muestras de tejido de senos nasales, hígado, tráquea y oviducto.
- c) Edad: Edad del ave tomada en días o semanas.
- d) Lote: Es el grupo de aves de la misma especie y edad bajo el mismo manejo, mantenidas en un mismo ambiente (49).
- e) Fecha de recepción de la muestra en el laboratorio.
- f) Identificación de la cepa aislada, por medio de un diagnóstico microbiológico.
- g) Movilidad de *Salmonella* spp, es la prueba microbiológica para determinar la presencia de flagelos en la bacteria y designar móvil o no móvil a *Salmonella*
- h) Antibiograma, es la prueba de sensibilidad antimicrobiana realizada con el método de difusión en agar para la cepa aislada microbiológicamente, con antibióticos de uso común.

Estos datos fueron recopilados en Excel y se realizó un análisis estadístico descriptivo con el fin de obtener información acerca de los siguientes parámetros:

- Prevalencia de *Salmonella* spp móvil en las granjas analizadas
- Prevalencia de *Salmonella* spp móvil por explotación comercial
- Resistencia de *Salmonella* spp móvil frente a antibióticos de uso común.

## **5.2. Caracterización de la resistencia antimicrobiana en aislados de *Salmonella* spp móvil de origen aviar**

A partir de la base de datos generada, se realizó la caracterización de los perfiles de resistencia de cada aislado de 2019 y 2020. Para esto se usaron los valores estándar de sensibilidad y resistencia para los antibióticos de uso común frente a *Salmonella* spp, valores que se usan de forma rutinaria en el laboratorio SERVET en los antibiogramas realizados (Penicilina 10 µg, Amoxicilina 10 µg, Ciprofloxacina 5 µg, Florfenicol 30 µg, Norfloxacina 10 µg, Enrofloxacina 5 µg, Fosfomicina 50 µg, Trimetoprim / Sulfa 1/25 µg, Tetraciclina 30 µg y Gentamicina 10 µg, antibióticos utilizados en el laboratorio SERVET, de la marca comercial OXOID, los cuales cumplen con las directrices del CLSI) (50).

Luego de esta caracterización para cada aislado, se unificaron los perfiles de resistencia más comunes, como representación de la población de estudio y se seleccionaron cinco aislados, con perfiles de resistencia representativos.

## **5.3. Mantenimiento y conservación de cepas y aislados de *Salmonella* spp**

Los cinco aislados aviares de *Salmonella* spp móvil (378, 728, 828, 800 y 665) fueron suministrados por el laboratorio SERVET SAS. Para su uso en este estudio, éstos fueron descongelados a temperatura ambiente, transferidos a caldo BHI e incubados a 37°C durante 18-24 horas, luego fueron resembrados en agar XLD (medio selectivo para *Salmonella*) e incubados a 37°C por 24-48 horas, con el fin de confirmar un aislamiento microbiológicamente ideal por su crecimiento característico en este medio de cultivo.

Posteriormente, las cepas y aislados se inocularon de forma individual en LBB y congelados con glicerol al 15%, para su almacenamiento a una temperatura de -70°C hasta su uso.

## **5.4. Identificación de aislados de *Salmonella* spp móvil**

### **5.4.1. Serotipificación de aislados de *Salmonella* spp móvil**

Para la identificación de los cinco aislados bacterianos de *Salmonella* spp móvil, se realizó una siembra por agotamiento desde el glicerol, en una caja de Petri de MHA, se incubaron por 24 horas a 37°C.



La serotipificación de *Salmonella*, se realizó en el laboratorio SERVET, mediante pruebas de aglutinación en lámina. Para esto se usaron monovalentes y polivalentes disponibles comercialmente, antisueros somáticos O de superficie, antisueros flagelares H y el antisuero capsular K, este último para la determinación del género bacteriano. Se utilizaron con antisueros monovalentes y polivalentes que están disponibles comercialmente y se realizó mediante pruebas de aglutinación en lámina. La identificación se realizó en primer lugar con la prueba del antisuero Vi (antisuero capsular K), seguido de los antisueros O y por último los antisueros contra los antígenos flagelares H (51). Para la serotipificación de los cinco aislados, se utilizaron los antisueros somáticos, O:4 (Grupo B) específico para *S. Typhimurium* y O:9 (Grupo D) específico para *S. Enteritidis*, debido a que estos dos serotipos son los de importancia zoonótica y salud pública; en cuanto a los antisueros flagelares se utilizaron, H:i (*S. Typhimurium*) y H:G,m (*S. Enteritidis*) (14,52).

En una lámina portaobjetos se rotuló con el antisuero a evaluar junto con la identificación del aislado a serotipificar. Inicialmente, se dispensaron 10 µL del antisuero Vi (antisuero capsular K) y se tomó una asada de la colonia a evaluar a partir del MHA, se homogenizó la mezcla y se esperó por aproximadamente 1 minuto en agitación constante, la formación macroscópica de agregados aglutinados indica una reacción positiva (siguiendo el protocolo elaborado por el Instituto Pasteur y la casa comercial de los antisueros SSI DIAGNOSTICA) (14,53). Posteriormente, se realizó el mismo procedimiento con los antisueros O somáticos (O:4 y O:9) para determinar el serogrupo correspondiente al aislado, *Salmonella* spp solo expresa un antígeno somático en su pared celular (51,54). Se tomó como control negativo la mezcla de 10 µL PBS 1X y 10 µL de cada antisuero para comprobar que no hubiese una reacción autoaglutinante por parte de este, y como control positivo se tomó *S. Typhimurium* ATCC 14028.

#### **5.4.2. Extracción y Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) de los aislados de *Salmonella* spp móvil**

La qPCR se realizó en el laboratorio SERVET con los aislados que por serotipificación evidenciaron un resultado presuntivo para *S. Enteritidis* o *S. Typhimurium*. Para esto, se tomó cada aislado bacteriano de *Salmonella* spp móvil y realizó una siembra por agotamiento desde el glicerol en una caja de Petri con MHA. Estas cajas fueron incubadas por 24 horas a 37°C, se tomaron 2-3 colonias morfológicamente iguales y se inocularon en 3 mL de LBB y se incubó de 18-24 horas a

37°C con agitación (55). Pasado el tiempo se realizó una extracción cruda del ADN, a partir de 1,5 mL de la suspensión bacteriana. Esta se dejó, centrifuga a 10.000 rpm por 10 minutos, luego de esto se descartó el sobrenadante, conservando el pellet. Se re suspendió el pellet con 400 µL de agua ultra pura libre de nucleasas, se procedió a dejar los viales en bloque térmico a una temperatura de 100°C durante 10 minutos para lisar las células bacterianas, luego se llevó a choque térmico a ~4-5°C por 5 minutos y finalmente se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos. La extracción de ADN (sobrenadante) era viable solo por 24 horas en refrigeración.

Para la qPCR se preparó la master mix, la cual, para 1 reacción (1x) contenía 5 µL de enzima Syber Green Master Mix, 0,5 µL de agua ultra pura libre de nucleasas, 0,25 µL de cada Primer (Forward y Reverse, para SE y ST) a una concentración de (25 µM) y 4 µL de la extracción del ADN bacteriano, para un volumen final de 10 µL. Seguido de esto se llevó a correr las muestras en el termociclador Bio-Rad CFX Manager, con el protocolo utilizado en el laboratorio SERVET. Para el control negativo se utilizó agua ultra pura libre de nucleasas y como control positivo se utilizaron cepas ATCC, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 y *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028.

## **5.5. Reactivación y curvas de calibración de cepas ATCC y aislados de origen aviar**

### **5.5.1. Reactivación de cepas**

Para la obtención de los inóculos bacterianos requeridos en los ensayos de actividad antibacteriana, se cultivó un inóculo bacteriano tomado desde el glicerol. Para esto las bacterias, se sembraron por agotamiento en una caja de Petri con agar Luria Bertani (LBA) o agar Muller Hinton (MHA). Cada caja de Petri fue incubada por 18 a 24 horas a 37°C. Posteriormente, de 3-4 colonias morfológicamente iguales fueron inoculadas en 5 mL de LBB, sometiéndolas en agitación constante (280 rpm) por 6 horas a 37°C, asegurando el crecimiento bacteriano hasta una fase logarítmica.

### **5.5.2. Curvas de calibración de cepas ATCC y aislados de origen aviar**

Para realizar los ensayos microbiológicos es necesario conocer y trabajar el mismo inóculo bacteriano en su fase exponencial. Para esto, antes de los ensayos de actividad antibacteriana, se estandarizó una curva de calibración para cada cepa o aislado de estudio. En esta curva se relacionó

la absorbancia de la muestra bacteriana con su concentración en Unidades Formadoras de Colonia por mL (UFC/mL) (56).

Para esto, luego de su reactivación por 6 horas, cada cepa o aislado se lavó 3 veces con PBS 1X, centrifugando a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C, y se resuspendió en 5 mL de PBS 1X estéril. Este inóculo madre fue inicialmente diluido cinco veces de forma serial en dilución 3/5, 270 µL de cada dilución y del inóculo madre fueron transferidos a placa de 96 pozos, y se leyó la absorbancia a 620 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific, Multiskan GO). Luego, las seis muestras obtenidas (inóculo madre y las cinco diluciones) fueron sembradas en una placa de 96 pozos (300 µL) y diluidas serialmente 10 veces en dilución 1/10, para disminuir eficientemente la concentración celular y obtener un volumen final de 270 µL/pozo. Se tomaron 200 µL de las 3 últimas diluciones de la placa para sembrar de forma independiente por profundidad en agar Plate Count (PCA). Luego de esto, las siembras fueron incubadas por 24 horas a 37°C. Pasado el tiempo de crecimiento, se realizó el recuento en placa de cada dilución y se graficó la curva de calibración, poniendo los conteos (UFC/mL) en el eje X y las absorbancias en el eje Y (56).

Estas curvas fueron comprobadas para obtener su porcentaje de variación, para lo cual las bacterias reactivadas y lavadas fueron re suspendidas en PBS 1X estéril alcanzando absorbancias cercanas a 0,20-0,25 UA (punto medio de la curva de calibración). Logrado esto, se diluyó el cultivo serialmente en diluciones 1/10 y se plaquearon 200 µL en APC. Las placas se incubaron por 24 horas a 37°C, se realizó el conteo y se relacionó el valor teórico con el valor experimental de las UFC/mL para determinar el porcentaje de variación de cada curva (56).

## **5.6. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los PAMs contra cepas y aislados de *Salmonella* spp móvil**

Inicialmente, la actividad antimicrobiana de los PAMs 35409-1, 35409-13 y 41781, se determinó sobre dos cepas ATCC de *Salmonella* spp móvil: *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 y *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076; esto con el fin de identificar el potencial de los péptidos para combatir estas especies bacterianas. Posteriormente, la actividad antibacteriana fue evaluada sobre los cinco aislados de *Salmonella* spp móvil que fueron seleccionados. Para esto, se usó el método

estándar de microdilución en caldo del Comité de Estándares de Laboratorio Clínico (CLSI), con el fin de determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los PAMs (57,58).

Inicialmente, en microplacas estériles de 96 pozos, los PAMs fueron diluidos serialmente por duplicado en base 2 en un volumen de 50  $\mu\text{L}$  de MHB (para concentraciones de 100 a 0,2  $\mu\text{M}$  al final del montaje). Posteriormente, una suspensión de cada cepa o aislado reactivado y cultivado por 6 horas, se ajustó a una concentración de  $\sim 1 \times 10^6$  UFC/mL en caldo de Muller Hinton (MHB). Para calcular esta dilución, se usó la ecuación de la curva de calibración para cada cepa o aislado (1).

Finalmente, 50  $\mu\text{L}$  de la suspensión bacteriana ( $\sim 1 \times 10^6$  UFC/mL) fueron adicionados a cada pozo para obtener una concentración final de  $\sim 5 \times 10^5$  UFC/mL en un volumen final de 100  $\mu\text{L}$ . MHB con y sin bacterias se usó como control de crecimiento y esterilidad, respectivamente, se usó Ciprofloxacina como control de inhibición del crecimiento bacteriano. La microplaca se incubó en una cámara húmeda por 18 horas a 37°C, pasado este tiempo se realizó la lectura de las absorbancias a 620 nm (Thermo Scientific, Multiskan GO). Estos ensayos se realizaron tres veces de forma independiente y la CMI se determinó, como la concentración de péptido más baja a la que no se detectó crecimiento bacteriano (1).

### **5.7. Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB) de los PAMs contra cepas y aislados de *Salmonella* spp móvil**

Para la determinación de la CMB, se tomó muestra de cada pozo donde no se detectó crecimiento bacteriano en la placa de la CMI realizada y se plaqueó una estría sobre agar LB. Este agar se incubó de 18 a 24 horas a 37°C, luego de lo cual se verificó el crecimiento de colonias bacterianas. La concentración más baja de péptido en la que no se detectó crecimiento en el agar LB, fue tomada como la CMB. Se realizaron tres réplicas biológicas por duplicado.

### **5.8. Evaluación preliminar del mecanismo de acción de los PAMs**

#### **5.8.1. Tinción de Gram y microscopía**

Los cambios morfológicos en la envoltura de *Salmonella* spp móvil, por acción de los PAMs fueron evaluados inicialmente por microscopía de luz blanca con objetivo de 100 X. Para esto, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 fue cultivada por agotamiento, transferida a medio líquido y crecida por 16 horas en 5 mL de LBB, incubando a 37°C, pasado el tiempo de incubación, se

lavó 3 veces con PBS 1X, centrifugando a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C, se re suspendió en 3 mL de PBS 1X estéril y se preparó la dilución madre a una concentración final de  $\sim 5 \times 10^7$  UFC/mL. Estas bacterias fueron incubadas con 25  $\mu$ M de cada péptido durante 2 horas, posteriormente se hizo tinción de Gram y se observó al microscopio con un aumento de 100 X. Las bacterias tratadas con tetrón (0,02  $\mu$ g/mL) se usaron como control de permeabilización de la membrana.

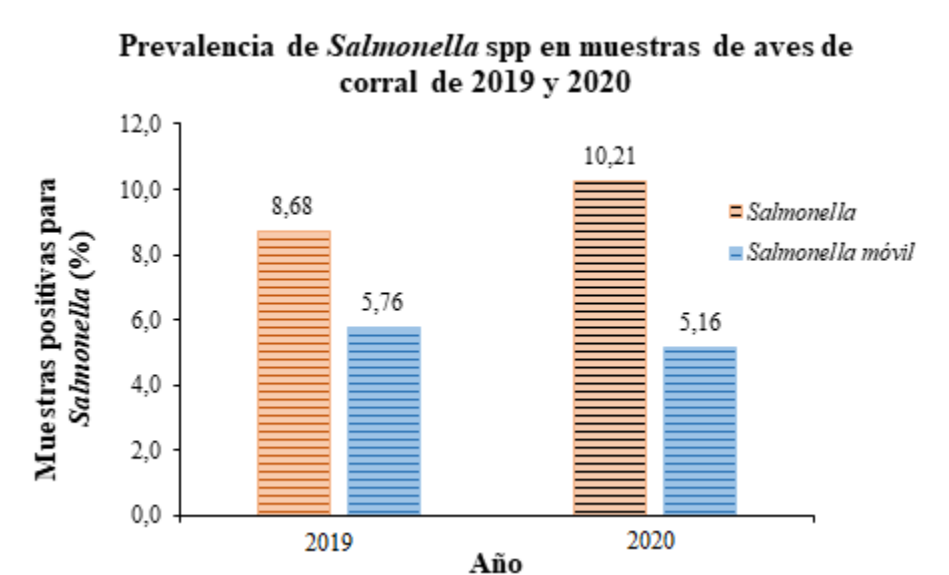
### **5.8.2. Microscopía electrónica de barrido (MEB)**

La acción antibacteriana del péptido 41781 sobre *Salmonella*, fue evaluada mediante microscopía electrónica de barrido. Para esto  $\sim 5 \times 10^7$  UFC/mL, fueron incubadas con 25  $\mu$ M del péptido 41781 en PBS al 1X a 37°C por dos horas. La muestra se lavó dos veces con PBS 1X y se suspendió en glutaraldehído al 2,5 % para fijar las bacterias. Las muestras se deshidrataron gradualmente usando etanol a una concentración del 70% al 100%. Posteriormente, las muestras se montaron en pasadores metálicos (sin membrana de carbono), se secaron al aire y se chaparon en oro con un metalizador Quorum Q150R ES. Las bacterias no tratadas se usaron como control negativo. Las muestras fueron analizadas por FEI Quanta 200 SEM a 25 kV (1).

## 6. Resultados

### 6.1. Análisis estadístico descriptivo

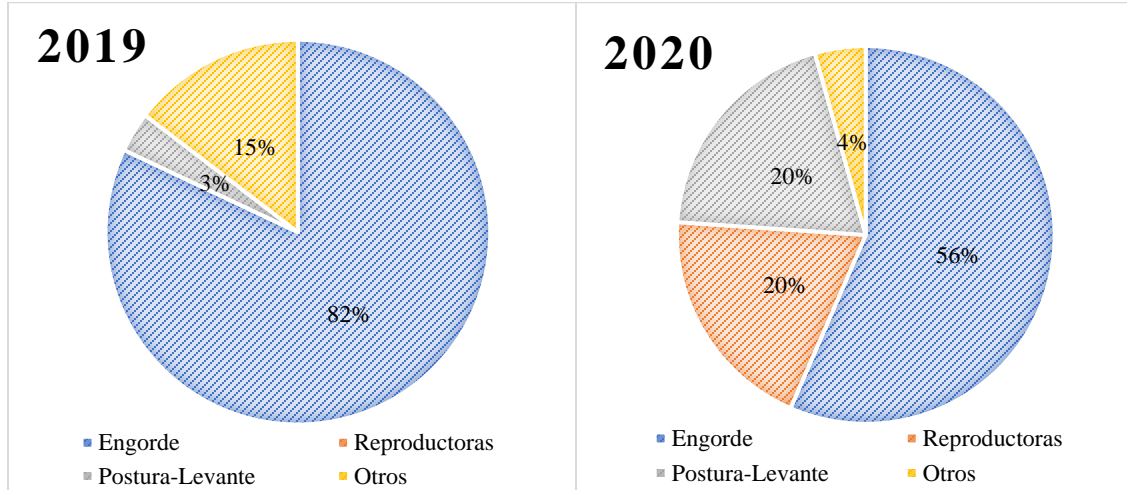
A partir de la base de datos generada, se realizó un compendio de la información más relevante acerca de la prevalencia de *Salmonella* en las avícolas en Colombia, analizadas en el laboratorio SERVET en el 2019 y 2020. En el laboratorio SERVET, las muestras fueron recibidas para evaluar la presencia de microorganismos, su sensibilidad o resistencia antimicrobiana y la identidad de los mismos. En el año 2019 SERVET analizó 1543 muestras, recibidas de diferentes granjas avícolas de Colombia (N=1543), de las cuales se obtuvo 2874 aislados bacterianos. De las muestras recibidas, el 8,68% (n=134) fue positivo para *Salmonella* spp y el 5,76% (n=89) fue positivo para *Salmonella* spp móvil. Así mismo, en el año 2020, SERVET procesó N=891 muestras, de las cuales el 10,21% (n=91) fue positivo para *Salmonella* spp y el 5,16% (n=46) fue positivo específicamente para *Salmonella* spp móvil (**Figura 8**)



**Figura 8.** Prevalencia de *Salmonella* sobre el total de muestras ingresadas en 2019 y 2020 en el laboratorio SERVET. En 2019 el laboratorio SERVET analizó 1543 muestras y en 2020 891 muestras de aves de corral. En la figura se muestran los porcentajes de muestras positivas para *Salmonella* spp y *Salmonella* spp móvil.

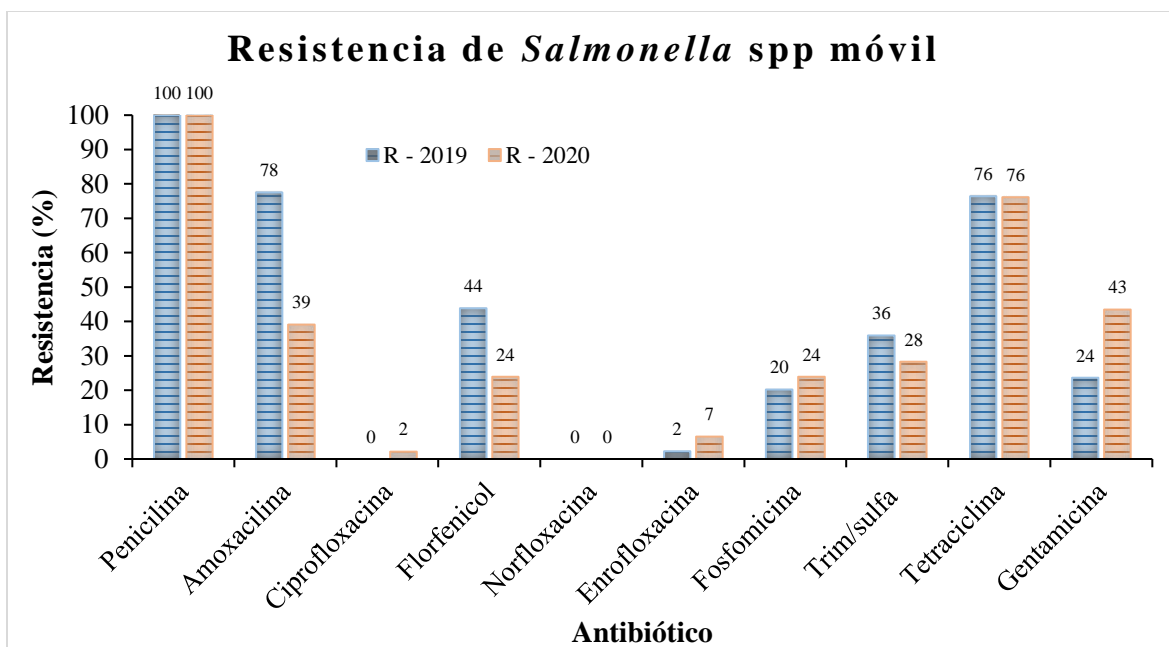
Luego de analizar la prevalencia de *Salmonella* spp y *Salmonella* spp móvil, se evaluó la distribución de estos aislados en aves de acuerdo a su explotación comercial. Al analizar la distribución de *Salmonella* spp móvil por explotación comercial en los años 2019 y 2020, se encontró que este género bacteriano se presenta en mayor proporción (más del 50%).

Adicionalmente, es de resaltar que para 2020, se encontró la presencia de *Salmonella* spp móvil en aves reproductoras (20%), mientras que para 2019 se encontraba ausente en ese tipo de (**Figura 9**).



**Figura 9.** Distribución de *Salmonella* spp móvil por explotación comercial. Se muestra la distribución de *Salmonella* spp móvil según la clasificación de aves de importancia comercial en la industria avícola.

Al caracterizar los perfiles de resistencia y sensibilidad de los aislados, en los años 2019-2020, se evidenció una resistencia generalizada frente a penicilina, y una alta proporción de aislados resistentes frente a tetraciclina. Los resultados del análisis estadístico descriptivo también evidencian, un aumento de 2019 a 2020 en la proporción de aislados resistentes frente a la familia de las fluoroquinolonas como la Ciprofloxacina (aumento de 2%), Enrofloxacin (aumento de 5%) y Fosfomicina (aumento de 4%). También se evidenció un aumento de resistencia en cuanto a la Gentamicina (aumento de 19%). Mientras tanto la resistencia frente a Amoxicilina y Florfenicol se redujo considerablemente (en una proporción  $\geq 20\%$ ) (**Figura 10**).



**Figura 10.** Resistencia antimicrobiana de *Salmonella* spp móvil en los años 2019-2020. Se muestra el porcentaje de aislados de *Salmonella* spp móvil que mostraron resistencia frente a antibióticos de uso común en la en la industria avícola.

## 6.2. Selección de aislados de *Salmonella* spp móvil y perfiles de resistencia

Se seleccionaron aislados representativos para la evaluación de la actividad antibacteriana de los PAMs. Con esta finalidad, todos los aislados de *Salmonella* spp móvil recolectados en 2019 y 2020, fueron clasificados de acuerdo a sus perfiles de resistencia, encontrando cinco perfiles característicos. Un aislados de cada perfil fue tomado para los ensayos posteriores con los PAMs de interés (**Tabla 3**). Luego de la selección de estos aislados, su identidad fue evaluada mediante serotipificación.

Perfil	Cantidad	ID	Explotación de ID	Antibióticos									
				Pen 10µg	Amox 10µg	Cip 5µg	Flor 30µg	Nor 10µg	Enr 5µg	Fos 50µg	TMP/S 1/25µg	Tetr 30µg	Gen 10µg
1	39	378	Engorde	R	R	S	R	S	R	S	S	R	S
2	22	728	Postura	R	R	S	S	S	R	S	S	R	S
3	9	828	Reproductoras	R	R	S	S	R	R	S	S	R	S
4	29	800	Engorde	R	R	S	R	S	R	S	S	R	R
5	31	665	Engorde	R	S	S	R	S	R	S	R	S	S



**Tabla 3.** Perfiles de resistencia hallados y aislados seleccionados. El ID representa el código de identificación del aislado seleccionado para cada perfil de resistencia. La explotación comercial descrita corresponde a la explotación del aislado que fue seleccionado por cada perfil.

### 6.3. Serotipificación de los aislados de *Salmonella* spp móvil

Para establecer la identidad de los aislados seleccionados (aislados 378, 728, 828, 800 y 665) se llevó a cabo por serotipificación con antisueros para la identificación de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*. El antisuero Poly A-S & Vi (capsular-K) fue usado para la identificación del género bacteriano, el cual fue positivo para los cinco aislados bacterianos de *Salmonella* spp, los antisueros somáticos O y los antisueros contra los antígenos flagelares H fueron usados para determinar si algunos de los aislados correspondían a *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Typhimurium. Con estos antisueros fue posible identificar los aislados 665 y 728 como *S. Enteritidis* y el aislado 828 como *S. Typhimurium*. Los aislados 378 y 800 fueron negativos para ambos serotipos de *Salmonella*, se tomaron como *Salmonella* spp móvil, debido a que no dieron ninguna reacción positiva de aglutinación para los antisueros utilizados (**Tabla 4**).

Antisueros/ Aislados	665	728	378	800	828	Control Positivo (ST)	Control negativo (PBS 1X)
<b>Poly A-S &amp; Vi</b>	+	+	+	+	+	+	-
<b>O:4</b>	-	-	-	-	+	+	-
<b>O:9</b>	+	+	-	-	-	-	-
<b>H:i</b>	-	-	/	/	+	+	-
<b>H:G</b>	+	+	/	/	-	-	-
<b>H:m</b>	+	+	/	/	-	-	-
<b>Resultado presuntivo</b>	<i>Salmonella</i> Enteritidis O:9 / H:G,m	<i>Salmonella</i> Enteritidis O:9 / H:G,m	<i>Salmonella</i> spp móvil	<i>Salmonella</i> spp móvil	<i>Salmonella</i> Typhimurium O:4 / H:i	OK	OK

**Tabla 4.** Serotipificación de los cinco aislados bacterianos de *Salmonella* spp móvil

### 6.4. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real de los aislados 665, 728 y 828

El serotipo de los aislados 665, 728 y 828 fue confirmado por PCR en tiempo real. Los resultados obtenidos por qPCR, corresponden y son congruentes con la serotipificación realizada dando una amplificación positiva para *S. Enteritidis* para los aislados 665 y 728 y para *S. Typhimurium* para el aislado 828 (**Tabla 5**). Los aislados 378 y 800 no fueron realizados por qPCR, pues los primers disponibles en SERVET son específicos para *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* únicamente.

	665	728	828	Control positivo (ST ATCC 14028)	Control positivo (SE ATCC 13076)	Control negativo (Agua UP)
<i>S. Typhimurium</i>	-	-	+	+	-	-
<i>S. Enteritidis</i>	+	+	-	-	+	-

**Tabla 5.** Resultado qPCR de los aislados 665, 728 y 828 de *Salmonella* spp móvil

### 6.5. Actividad antimicrobiana de los péptidos antimicrobianos 35409-1, 35409-13 y 41781 sobre las cepas *S. Typhimurium* ATCC 14028 y *S. Enteritidis* ATCC 13076 y aislados de *Salmonella* spp móvil

Inicialmente, la actividad de los péptidos 35409-1, 35409-13 y 41781 fue evaluada contra *S. Enteritidis* ATCC 13076 y *S. Typhimurium* ATCC 14028. Ya que los tres péptidos fueron activos contra ambos serotipos a las concentraciones evaluadas ( $\leq 100 \mu\text{M}$ ), su actividad fue evaluada frente a los aislados aviares seleccionados. Los tres de los péptidos (35409-1, 35409-13 y 41781), mostraron actividad antibacteriana contra *Salmonella* a las concentraciones evaluadas

Péptido	Conc. ( $\mu\text{M}$ )	ST ATCC 14028	SE ATCC 13076	665 (SE)	728 (SE)	378	800	828 (ST)
35409-1	CMI	100	25	50	>100	>100	100	>100
	CMB	100	50	100	>100	>100	>100	>100
35409-13	CMI	100	25	50	>100	>100	100	100
	CMB	100	50	100	>100	>100	>100	>100
41781	CMI	100	50	100	100	100	100	100
	CMB	>100	100	>100	100	>100	>100	>100
Ciprofloxacina ( $\mu\text{g/mL}$ )	CMI	0,032	0,016	0,016	0,016	0,016	0,256	0,016
	CMB	0,032	0,032	0,016	0,016	0,016	0,256	0,016

**Tabla 6.** Actividad antimicrobiana de los péptidos 35409-1, 35409-13 y 41781 sobre los aislados de *Salmonella* spp móvil. La concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) de los péptidos antimicrobianos se expresan en  $\mu\text{M}$ , para el control con ciprofloxacina, estos valores se expresan en  $\mu\text{g/mL}$ .

### 6.6. Actividad bacteriostática de los péptidos antimicrobianos 35409-1, 35409-13 y 41781

Para determinar si la actividad de los péptidos era de tipo bactericida o bacteriostático, se determinó con la concentración mínima bactericida (CMB). En este ensayo se tomaba una estría de la CMI donde no se había detectado crecimiento bacteriano, para posteriormente verificar su

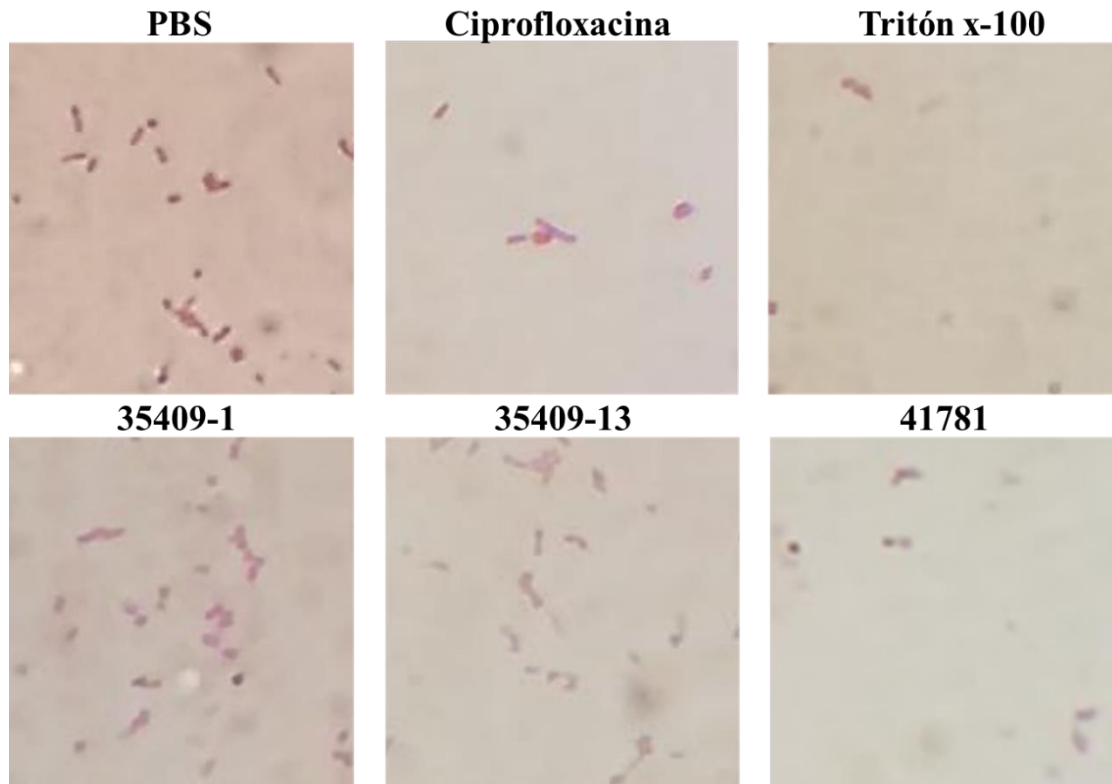
crecimiento de colonias bacterianas. La CMB se determinó como la concentración más baja del péptido en la que mata a las bacterias, es decir, donde no se detectó crecimiento en el agar.

Teniendo en cuenta que la CMI puede tener una desviación de  $\pm 1$  dilución, los péptidos cuyo valor de CMB se mantuvo en ese rango fueron considerados como bacteriostáticos. En consecuencia, los resultados de los tres PAMs sugieren un efecto bactericida contra *S. Enteritidis* ATCC 13076 y *S. Typhimurium* ATCC 14028. Para el caso de los aislados, debido a la CMI obtenida, la cual está sobre el límite de las concentraciones evaluadas (100  $\mu\text{M}$ ), no es posible sugerir una actividad bactericida o bacteriostática para ninguno de los tres péptidos de estudio (**Tabla 6**).

El PAM 35409-1 fue activo contra dos de los cinco aislados y el 35409-13 contra tres de los cinco aislados. Los PAMs 35409-1 Y 35409-13 fueron capaces de inhibir el crecimiento bacteriano del aislado 665 de *S. Enteritidis* con una CMI de 50  $\mu\text{M}$  y el 35409-13 presentó actividad antibacteriana sobre el aislado 800 (serotipo no identificado) con una CMI de 100  $\mu\text{M}$  (**Tabla 6**).

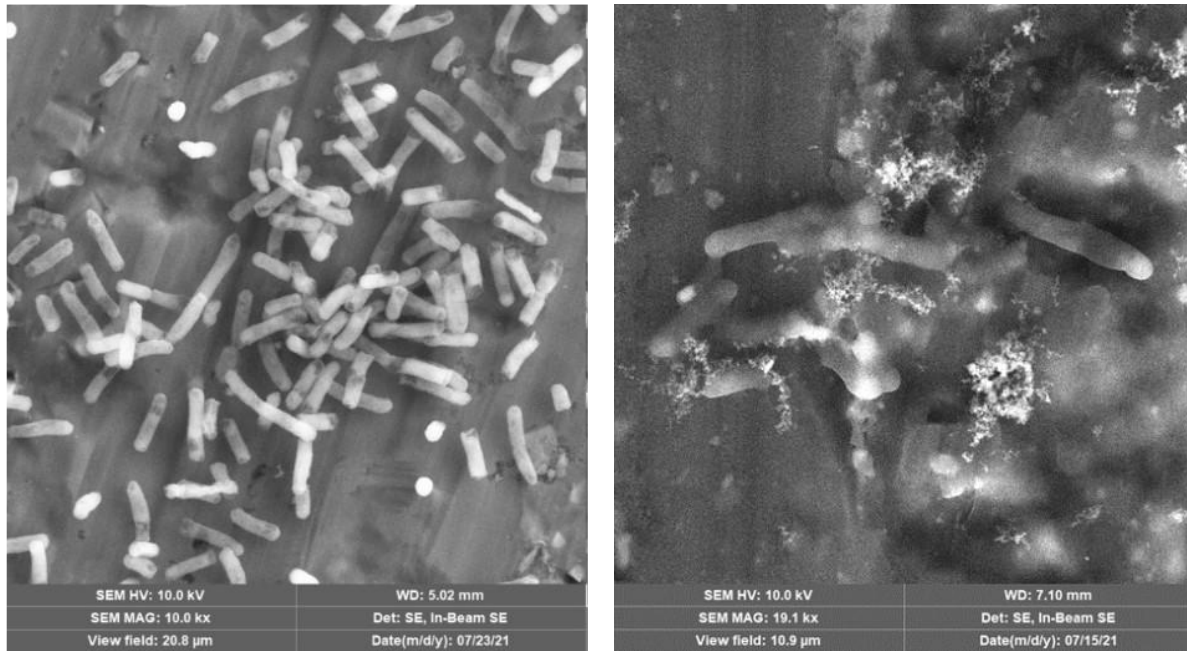
### **6.7. El péptido 41781 tiene un efecto membranolítico sobre *Salmonella* spp móvil**

Para evaluar de forma preliminar el posible mecanismo de acción de los PAMs de estudio contra *Salmonella* spp móvil, estos fueron incubados (Cf 50  $\mu\text{M}$ ) con  $\sim 5 \times 10^7$  UFC/mL de *S. Typhimurium* ATCC 14028 durante 2 horas.



**Figura 11.** Cambios morfológicos en *Salmonella* por acción de los PAMs. Bacterias tratadas con los péptidos fueron sometidas a tinción de Gram y vistas al microscopio óptico de luz blanca con objetivo 100 X1. PBS se utilizó como control de la morfología celular en condiciones normales. Ciprofloxacina se usó como control de filamentación y tritón x-100 como control de lisis celular. En la figura se muestra los cambios de disposición celular que presente la bacteria cuando esta en tratamiento con los tres PAMs 35409-1, 35409-13 y 41781.

Posteriormente, el PAM 41781 fue seleccionado para ser analizado por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) debido a que fue el único péptido con actividad antibacteriana contra todas las cepas y aislados de *Salmonella*. En la **figura 12**, se evidencia la morfología de las membranas celulares de la bacteria sin y con el péptido 41781. La morfología de *Salmonella* spp móvil en condiciones normales, se evidencia en la figura de la izquierda, donde demuestra tener una disposición en forma de bastón o bacilo. En la figura de la derecha se evidencian alteraciones estructurales y conformacionales de la membrana celular de *Salmonella* por acción del PAM 41781.



**Figura 12.** Microscopía electrónica de barrido de *Salmonella* spp móvil con y sin contacto con el PAM 41781. A la izquierda se muestran bacterias de *Salmonella* spp móvil sin tratamiento (control) y a la derecha *Salmonella* spp móvil con tratamiento con el PAM 41781 a una concentración de 50  $\mu$ M. Las bacterias fueron observadas con un aumento de 10.000 X.

## 7. Discusión

En Colombia, según la Federación Nacional de Avicultores (FENAVI) y el Consejo Nacional de Política Económica y Social (CONPES), la avicultura ha venido ocupando el segundo lugar entre las principales actividades de la economía agropecuaria nacional (59,60). Las repercusiones de la presencia de *Salmonella* en aves de corral, representan enormes pérdidas económicas para la industria avícola. Cada vez que en el laboratorio SERVET se identifica la presencia de *Salmonella* en una muestra recibida, la granja avícola debe tomar control inmediatamente, en cuanto a, medidas de gestión de riesgo para la reducción de la presencia de la bacteria en el producto destinado al consumo humano o destino final (61), esto debido a que, un número de galpones completos compuesto por miles de pollos, que hacen parte de ese lote de muestras, no puede salir como producto destinado al consumo humano o debe ser sacrificado por políticas de seguridad alimentaria y esto representa enormes pérdidas a nivel económico.

Sin embargo, las repercusiones de *Salmonella* en aves de corral no solo se limitan a las pérdidas económicas para la industria avícola, también, se ha determinado que, las enfermedades transmitidas por alimentos constituyen un problema a nivel de salud pública, bienestar social, accesibilidad a buenos servicios / tratamientos hospitalarios y nivel de la economía en el mundo. Para lo cual, se ha venido subestimando frecuentemente debido a la dificultad para establecer una relación de causalidad entre las contaminaciones de alimentos y las enfermedades o muertes provocadas por estas (62,63). Sin embargo, uno de los agentes bacterianos que se ha reportado con la generación de diferentes brotes de infección alimentaria en el mundo, es *Salmonella*. Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) estiman que la *Salmonella* causa más enfermedades transmitidas por los alimentos que cualquier otra bacteria. El pollo y todos los productos derivados, son una fuente importante contaminación de este patógeno bacteriano (64).

La relevancia zoonótica de *Salmonella* es una preocupación importante para la salud humana pues es responsable de múltiples hospitalizaciones a causa de diarreas que en algunos casos pueden llevar a la muerte. Sin embargo, las consecuencias de la presencia de estos microorganismos en aves no solo afectan la salud humana, sino que también tiene graves efectos en la industria agrícola. De acuerdo a los resultados obtenidos, se sabe que, a pesar de que la mayoría de granjas avícolas solicitan al laboratorio SERVET determinar la presencia de la bacteria, determinando solo el género bacteriano de *Salmonella* spp, en este estudio se pudo determinar que tres de los cinco

aislados bacterianos de *Salmonella* spp móvil correspondían a *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Typhimurium, aquí, es importante analizar, que en Colombia, no hay un diagnóstico obligatorio para la identificación final de género y especie; lo que demuestra, que no se realiza un seguimiento y control efectivo en las granjas avícolas sobre estas cepas aisladas de origen aviar y de importancia zoonótica y salud pública, puesto que, pasan inadvertidas llegando como producto final para consumo humano, a menos de que la granja avícola decidida eliminar el lote contraminado con *Salmonella* spp móvil.

En los últimos años, para la mayoría de los agentes patógenos como *Salmonella*, ya se ha reportado resistencia a la mayoría de agentes antimicrobianos de uso común, generando infecciones y patogénesis críticas, lo cual ha hecho que su capacidad de generar resistencia sea cada vez más rápida que la capacidad del hombre en crear nuevos tratamientos efectivos (65). Los resultados de este estudio, soportan esta información, revelando resistencia frente a Enrofloxacina y Fosfomicina, antibióticos que son de uso convencional en la industria avícola (**figura 10**). Aún más, cuando la resistencia a Enrofloxacina (último recurso) se hace cada vez más frecuente en aislados provenientes de muestras avícolas (66).

Actualmente, en Colombia no se cuenta con información publicada reciente de la prevalencia de aislados de *Salmonella* provenientes de la industria avícola y/o vinculadas con intoxicaciones alimentarias en los humanos y sus perfiles de resistencia. En este estudio, de acuerdo al análisis estadístico que se realizó, se pudo determinar la prevalencia de *Salmonella* spp móvil y de aislados bacterianos resistentes provenientes de muestras de origen aviar, está directamente correlacionado con la propagación de esta bacteria en las aves hasta el punto final de su consumo y siendo, por lo tanto, una fuente potencial de intoxicación alimentaria. Se determinó que *Salmonella* spp móvil, puede encontrarse en un porcentaje relativamente bajo (5,76 % en 2019 y 5,16 % en 2020). Sin embargo, esto no le resta importancia a la problemática, pues *Salmonella* representa un peligro potencial dentro de la industria de los alimentos. Reportes y cifras de la OMS, indican que *Salmonella* es una de las cuatro principales causas de enfermedades diarreicas a nivel mundial y algunas veces la enfermedad puede ser mortal (67), por lo que se requieren estrategias de control inmediato que ayuden a mitigar la presencia de este microorganismo en los alimentos y más aún en la industria avícola.

Según la OMS, se ha reportado que *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Enteritidis, son los dos serotipos más importantes de *Salmonella* transmitida de animales a seres humanos en la mayor parte del mundo (67); en Colombia, en uno de los últimos informes encontrados por el INS, en el año 2011, determinaron que en el año 2010 el serotipo más importante fue *S. Enteritidis*, seguido por *S. Typhimurium* (7). Por esta razón, estos dos serotipos se convirtieron en los principales objetivos de este estudio con dos cepas ATCC y tres aislados resistentes de origen aviar (*S. Typhimurium* (aislado 828) y *S. Enteritidis* (aislados 665-728)).

De los estudios encontrados en Colombia, acerca de la resistencia de cepas de *Salmonella* aisladas de la industria avícola, se ha observado un aumento en la resistencia frente a los antibióticos. Se ha hallado que Trimetoprim/Sulfa ha incrementado su resistencia antimicrobiana, como también la fosfomicina y enrofloxacin (68,69); así mismo, aislados bacterianos provenientes de aves de postura, han demostrado tener resistencia antimicrobiana, en particular a la tetraciclina y al florfenicol (70). Lo que se llevaría a correlacionar en este proyecto (**Figura 10**), debido a que los resultados en este estudio se halló la resistencia, principalmente frente a Gentamicina y antibióticos como ciprofloxacina, enrofloxacin y fosfomicina, marcándose un nivel de resistencia antimicrobiana, reflejado en los años 2019 y 2020, lo cual es de gran preocupación, debido a que los antibióticos de la familia de las fluoroquinolonas que son la terapia antimicrobiana a elección ante una infección de *Salmonella*.

Un hallazgo importante sobre la distribución de *Salmonella*, en las diferentes líneas de producción de la industria aviar, se encontró que la bacteria estaba presente en mayor proporción a la explotación de engorde, lo que genera gran preocupación, debido a que este tipo de carne, ha ido aumentando su consumo humano como producto final (59). Cada uno de estos hallazgos alertan en una gran proporción en tener medidas mucho más claras, como tener un control a nivel de bioseguridad, gestión del riesgo y prevención, debido a que se encontraron en este estudio cepas de importancia en salud pública como (*Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Typhimurium), con ciertos parámetros de resistencia y que estén presentes en la industria avícola en un alto porcentaje en la recepción de engorde, que hace que se deba tener más control respecto a su mitigación, lo cual da su importancia de buscar nuevas opciones terapéuticas de origen natural para combatir a *Salmonella* de origen aviar, como los PAMs, los cuales no hay reportes que se haya realizado.



Los PAMs utilizado en el estudio, contiene propiedades físico químicas, que los hacen muy buenos candidatos para combatir cepas de patógenos con resistencia antimicrobiana, como lo evidencian, previos estudios de actividad antimicrobiana. En este estudio, *Salmonella* spp móvil proveniente de granjas avícolas, los resultados obtenidos, demuestra que el PAM 41781, fue el que tuvo una mejor actividad antimicrobiana contra las cepas y aislados de *Salmonella*, de tal forma que se comprobó que podía tener un efecto membranolítico sobre la membrana de *Salmonella* móvil por medio de MEB, aquí, los péptidos antimicrobianos membranolíticos pueden ser una alternativa parcial a los actuales agentes antibióticos específicos de diana (71), debido a la interacción directa que tienen con las estructuras de la membrana sin necesidad de proteínas o receptores diana los hace menos susceptibles a una aparición rápida de resistencia bacteriana y los vuelve potencialmente activos contra las cepas resistentes (72,73), partiendo de esto el PAM 41781, puede tener un efecto determinante para alterar la pared celular junto con los LPS.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede decir que se les podría dar otra aplicación a los PAMs evaluados, debido a que pese que tuvieron actividad antimicrobiana frente a las cepas y aislados analizados, se podrían utilizar como conservantes en los alimentos de las aves o también como un elemento activo para desinfectar diferentes áreas o implementos con los que tenga contacto en la industria avícola.

Genera gran expectativa, saber que *Salmonella* spp de importancia zoonótica y salud pública, al ser uno de los microorganismos que presenta grandes márgenes de resistencia en el mundo, presente un grado de sensibilidad importante al entrar en contacto con los péptidos antimicrobianos diseñados y sintetizados químicamente por FIDIC, debido a que se pueden desarrollar otras alternativas terapéuticas que contrarreste esta bacteria. Se logró evidenciar también, la importancia que tiene *Salmonella* a nivel de salud pública y zoonótica, llegando el punto que hay que destacar que este patógeno si no se lleva a programas de medidas de control y prevención, lo seguiremos viendo como protagonista de miles de enfermedades de transmisión alimentaria, puesto que existe entre todas las posibilidades de encontrarse los serotipos de intoxicación alimentaria (*Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Typhimurium) en las granjas avícolas de Colombia.

## 8. Conclusiones

1. *Salmonella* spp móvil sigue siendo un patógeno de importancia de salud pública, en el año 2019 presentó una prevalencia del 5,76% y en el año 2020 del 5,16%, de los cinco aislados analizados presentaron un aumento en la resistencia antimicrobiana en antibióticos que son utilizados como terapia convencional para tratar a la bacteria en la industria avícola.
2. Tres de los cinco aislados se identificaron como *S. Typhimurium* (828) y *S. Enteritidis* (665 y 728), los cuales son las más importantes en intoxicación alimentaria y presentaban resistencia frente diferentes familias de agentes antimicrobianos.
3. Los PAMs 35409-1, 35409-13 y 41781 tuvieron actividad antimicrobiana sobre *S. Enteritidis* ATCC 13076 y *S. Typhimurium* ATCC 14028.
4. El PAM 41781 tuvo actividad antibacteriana sobre todos los aislados de *Salmonella* spp móvil con un valor de CMI de 100  $\mu$ M, donde además demostró tener un mecanismo de acción de tipo membranolítico sobre la membrana celular de *Salmonella* spp móvil.

## **9. Perspectivas futuras**

- 1.** Determinar el mecanismo de acción del PAM 41781 sobre *Salmonella* spp móvil
- 2.** Determinar el serotipo de los aislados 378 y 800 de *Salmonella*
- 3.** Evaluar el sinergismo con el PAM 41781 junto con otra molécula para mejorar su actividad antibacteriana.
- 4.** Mejorar las propiedades físico químicas del PAM 41781, como un candidato ideal con actividad antibacteriana para inhibir cepas resistentes.

## 10. Referencias

1. Barreto-Santamaría A, Rivera ZJ, García JE, Curtidor H, Patarroyo ME, Patarroyo MA, et al. Shorter antibacterial peptide having high selectivity for e. Coli membranes and low potential for inducing resistance. *Microorganisms* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2020 Nov 1];8(6):1–21. Available from: [/pmc/articles/PMC7356157/?report=abstract](#)
2. Fjell CD, Hiss JA, Hancock REW, Schneider G. Designing antimicrobial peptides: Form follows function [Internet]. Vol. 11, *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Publishing Group; 2012 [cited 2020 Nov 1]. p. 37–51. Available from: [www.nature.com/reviews/drugdisc](#)
3. Jajere SM. A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and adaptation and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Vet World* [Internet]. 2019 [cited 2021 Aug 9];12(4):504–21. Available from: [/pmc/articles/PMC6515828/](#)
4. Angélique L, Frederik WJ, Garmi J, Hester DPL. The potential use of natural and structural analogues of antimicrobial peptides in the fight against neglected tropical diseases [Internet]. Vol. 20, *Molecules*. MDPI AG; 2015 [cited 2020 Nov 2]. p. 15392–433. Available from: [/pmc/articles/PMC6332049/?report=abstract](#)
5. Ketema L, Ketema Z, Kiflu B, Alemayehu H, Terefe Y, Ibrahim M, et al. Prevalence and Antimicrobial Susceptibility Profile of *Salmonella* Serovars Isolated from Slaughtered Cattle in Addis Ababa, Ethiopia. *Biomed Res Int* [Internet]. 2018 [cited 2020 Nov 2];2018. Available from: [/pmc/articles/PMC6247655/?report=abstract](#)
6. Akbar A, Anal AK. Prevalence and antibiogram study of *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* in poultry meat. *Asian Pac J Trop Biomed* [Internet]. 2013 [cited 2020 Nov 2];3(2):163–8. Available from: [/pmc/articles/PMC3627179/?report=abstract](#)
7. Perfil de riesgo Ministerio de la Protección Social República de Colombia.
8. Chen Y, Mant CT, Farmer SW, Hancock REW, Vasil ML, Hodges RS. Rational design of  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides with enhanced activities and specificity/therapeutic index. *J Biol Chem* [Internet]. 2005 Apr 1 [cited 2020 Nov 1];280(13):12316–29. Available from: [/pmc/articles/PMC1393284/?report=abstract](#)
9. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos [Internet]. [cited 2021 Jun 18]. Available from: <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
10. Fàbrega A, Vila J. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: Virulence and regulation [Internet]. Vol. 26, *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology (ASM); 2013 [cited 2020 Nov 16]. p. 308–41. Available from: [/pmc/articles/PMC3623383/?report=abstract](#)
11. Gonzalez Pedraza JB, Sanandres NP, Varela ZS, Aguirre EH, Camacho JV. Aislamiento

- microbiológico de *Salmonella* spp. y herramientas moleculares para su detección. Vol. 30, Salud Uninorte. Universidad del Norte; 2014. p. 73–94.
12. Bogotá DC. Presentado como requisito parcial Para Optar el Título de Microbiólogo Agrícola y Veterinario PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS PROGRAMA PROFESIONAL DE MICROBIOLOGÍA AGRÍCOLA Y VETERINARIA. 2009.
  13. *Salmonella* - Wikipedia, la enciclopedia libre [Internet]. [cited 2020 Nov 16]. Available from: <https://es.wikipedia.org/wiki/Salmonella>
  14. Grimont PAD, Weill F-X. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* ANTIGENIC FORMULAE OF THE *SALMONELLA* SEROVARS 2007 9th edition.
  15. Pulido M. CONCEPTOS BÁSICOS PARA EL CONTROL DE *SALMONELLA* EN LA AVICULTURA COLOMBIANA. FENAVI, editor.
  16. Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B. *Salmonella* Nomenclature. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2000 [cited 2021 Jul 8];38(7):2465. Available from: </pmc/articles/PMC86943/>
  17. HM C, Y W, LH S, CH C. Nontyphoid salmonella infection: microbiology, clinical features, and antimicrobial therapy. *Pediatr Neonatol* [Internet]. 2013 Jun [cited 2021 Jul 8];54(3):147–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23597525/>
  18. Rincón Diana RR. Transmisión de *Salmonella* enterica a través de huevos de gallina y su importancia en salud pública. *Univ Rev IndSantander Salud* [Internet]. 2011 May [cited 2022 Apr 24];43(2). Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0121-08072011000200008](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-08072011000200008)
  19. Fierer J, Guiney DG. Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection [Internet]. Vol. 107, *Journal of Clinical Investigation*. The American Society for Clinical Investigation; 2001 [cited 2020 Nov 16]. p. 775–80. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC199580/>
  20. Humphrey T. *Salmonella*, stress responses and food safety. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2004 Jun [cited 2022 Apr 30];2(6):504–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15152206/>
  21. King N, Lake R, Cressey P. Risk Profile: *Salmonella* (non-typhoidal) in Poultry (whole and pieces). 2011 [cited 2022 Apr 30]; Available from: <http://www.mpi.govt.nz/news-and-resources/publications/>
  22. Chlebicz A, Śliżewska K. Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review [Internet]. Vol. 15, *International Journal of Environmental Research and Public Health*. MDPI AG; 2018 [cited 2020 Nov 16]. Available from: </pmc/articles/PMC5981902/?report=abstract>
  23. *Salmonella* Página de inicio | Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades [Internet]. [cited 2022 Apr 30]. Available from: <https://www.cdc.gov/salmonella/index.html>

24. DRUG-RESISTANT NONTYPHOIDAL SALMONELLA. [cited 2022 Apr 30]; Available from: [www.cdc.gov/salmonella](http://www.cdc.gov/salmonella)
25. Varma JK, Marcus R, Stenzel SA, Hanna SS, Gettner S, Anderson BJ, et al. Highly resistant Salmonella Newport-MDRampC transmitted through the domestic US food supply: A FoodNet case-control study of sporadic Salmonella Newport infections, 2002-2003. *J Infect Dis.* 2006 Jul 15;194(2):222–30.
26. Foley SL, Lynne AM, Nayak R. Salmonella challenges: prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. *J Anim Sci* [Internet]. 2008 [cited 2022 Jan 27];86(14 Suppl). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17911227/>
27. DuPont HL. Antimicrobial Resistance of spp., Typhoid and Nontyphoid. *Antimicrob Drug Resist* [Internet]. 2009 [cited 2022 Apr 30];825–32. Available from: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-60327-595-8\\_11](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-60327-595-8_11)
28. Levings RS, Lightfoot D, Partridge SR, Hall RM, Djordjevic SP. The Genomic Island SGI1, Containing the Multiple Antibiotic Resistance Region of Salmonella enterica Serovar Typhimurium DT104 or Variants of It, Is Widely Distributed in Other S. enterica Serovars. *J Bacteriol* [Internet]. 2005 Jul [cited 2022 Apr 30];187(13):4401. Available from: </pmc/articles/PMC1151792/>
29. Crump JA, Sjölund-Karlsson M, Gordon MA, Parry CM. Epidemiology, Clinical Presentation, Laboratory Diagnosis, Antimicrobial Resistance, and Antimicrobial Management of Invasive Salmonella Infections. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2022 Jan 28];28(4):901. Available from: </pmc/articles/PMC4503790/>
30. De La Fuente-Salcido NM, Villarreal-Prieto M, Ángel M, León D, Patricia A, Pérez G, et al. REVISTA MEXICANA DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana Evaluation of the activity of antimicrobial agents against the challenge of bacterial resistance.
31. Resistencia a los antimicrobianos [Internet]. [cited 2022 Apr 30]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
32. Cárdenas J, Castillo O, De Cámara C, González V. Combatiendo la resistencia bacteriana: una revisión sobre las terapias alternativas a los antibióticos convencionales. *Bol Venez Infectol.* 2018;29.
33. Reina J, Reina N. Fagoterapia ¿una alternativa a la antibioticoterapia? *Rev Española Quimioter* [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2022 Apr 30];31(2):101. Available from: </pmc/articles/PMC6159377/>
34. Guevara Agudelo FA, Constanza Muñoz Molina L, Ospina JN, Mary L, Pulido S, Pinilla Bermúdez G. Institución donde se llevó a cabo el trabajo: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Artículo de revisión.
35. Barreto-Santamaría A, Patarroyo ME, Curtidor H. Designing and optimizing new antimicrobial peptides: all targets are not the same. *Crit Rev Clin Lab Sci* [Internet]. 2019 Aug 18 [cited 2022 Feb 21];56(6):351–73. Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31397205/>
36. Avci FG, Akbulut BS, Ozkirimli E. Membrane Active Peptides and Their Biophysical Characterization. *Biomolecules* [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2021 Aug 25];8(3). Available from: </pmc/articles/PMC6164437/>
  37. Forde E, Devocelle M. Pro-Moieties of Antimicrobial Peptide Prodrugs. *Molecules* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2020 Nov 9];20(1):1210. Available from: </pmc/articles/PMC6272668/?report=abstract>
  38. Peters BM, Shirtliff ME, Jabra-Rizk MA. Antimicrobial peptides: Primeval molecules or future drugs? *PLoS Pathog* [Internet]. 2010 Oct [cited 2020 Nov 1];6(10). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2965748/>
  39. Rončević T, Puizina J, Tossi A. Antimicrobial Peptides as Anti-Infective Agents in Pre-Post-Antibiotic Era? *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Nov 2 [cited 2021 Aug 25];20(22). Available from: </pmc/articles/PMC6887943/>
  40. Bin Hafeez A, Jiang X, Bergen PJ, Zhu Y. Antimicrobial Peptides: An Update on Classifications and Databases. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2022 Apr 9];22(21). Available from: </pmc/articles/PMC8583803/>
  41. Somma A Di, Moretta A, Canè C, Cirillo A, Duilio A. Antimicrobial and Antibiofilm Peptides. *Biomolecules* [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2021 Aug 25];10(4). Available from: </pmc/articles/PMC7226136/>
  42. Kumar P, Kizhakkedathu JN, Straus SK. Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo. *Biomolecules* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2021 Aug 25];8(1). Available from: </pmc/articles/PMC5871973/>
  43. Mishra AK, Choi J, Moon E, Baek KH. Tryptophan-rich and proline-rich antimicrobial peptides [Internet]. Vol. 23, *Molecules*. MDPI AG; 2018 [cited 2020 Nov 10]. Available from: </pmc/articles/PMC6017362/?report=abstract>
  44. Vélez A, Mera C, Orduz S, Branch JW, Vélez A, Mera C, et al. Synthetic antimicrobial peptides generation using recurrent neural networks. *DYNA* [Internet]. 2021 [cited 2021 Aug 26];88(216):210–9. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0012-73532021000100210&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0012-73532021000100210&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
  45. Alberto Téllez G, Castaño JC. Péptidos antimicrobianos Antimicrobial peptides [Internet]. Vol. 14. 2010 [cited 2020 Nov 2]. Available from: [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)
  46. Ra H, Jm O, At S, Jc Z, Para D, Ocampo J. edigraphic.com Historia y filosofía de la medicina ANALES MEDICOS HOSPITAL A B C Dos perspectivas bioéticas sobre clonación de seres humanos. Vol. 48. 2003.
  47. Barreto-Santamaría A, Curtidor H, Arévalo-Pinzón G, Herrera C, Suárez D, Pérez WH, et al. A new synthetic peptide having two target of antibacterial action in *E. coli* ML35. *Front Microbiol* [Internet]. 2016 [cited 2020 Nov 1];7(DEC). Available from: </pmc/articles/PMC5167725/?report=abstract>

48. Gómez Jiménez M. Evaluación de la actividad Antimicrobiana de péptidos cortos derivados del péptido 23688 sobre algunos microorganismos de importancia clínica. [Internet]. [Bogotá]: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; 2020 [cited 2022 Apr 30]. Available from: <https://repositorio.unicolmayor.edu.co/handle/unicolmayor/2867>
49. Instituto Colombiano Agropecuario I. Resolución 3651 de 2014, requisitos para la certificación de granjas avícolas bioseguras de postura y/o levante [Internet]. 3651 Nov 13, 2014 p. 1–31. Available from: <https://www.ica.gov.co/getattachment/b8cb4efd-a1b4-409e-a11d-c81b91f59025/2014R3651.aspx>
50. Clinical And Laboratory Standards Institute (CLSI). M100. 30th ed. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing [Internet]. 2020 Jan [cited 2022 May 7]. Available from: <https://www.nih.org.pk/wp-content/uploads/2021/02/CLSI-2020.pdf>
51. Pachón Cubillos D. Aislamiento, identificación y serotipificación de enterobacterias del género Salmonella en una población de *Crocodylus intermedius* y testudinos mantenidos en cautiverio en la estación de biología tropical Roberto Franco E.B.T.R.B. de la Facultad de Ciencias - Universidad Nacional de Colombia en Villavicencio - Meta [Internet]. [Bogotá D.C.]: Pontificia Universidad Javeriana; 2009 [cited 2022 Apr 30]. Available from: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8199/tesis198.pdf?sequence=1>
52. Liu B, Knirel YA, Feng L, Perepelov A V., Senchenkova SN, Reeves PR, et al. Structural diversity in Salmonella O antigens and its genetic basis [Internet]. Vol. 38, FEMS Microbiology Reviews. Oxford Academic; 2014 [cited 2020 Nov 20]. p. 56–89. Available from: <https://academic.oup.com/femsre/article/38/1/56/510573>
53. Antisuero Salmonella - SSI Diagnostica [Internet]. [cited 2022 May 7]. Available from: <https://ssidiagnostica.com/international/solutions/antisera/salmonella-antisera/>
54. Echeita-Sarrionandia MA, Aladueña AM, Díez R, Arroyo M, Cerdán F, Gutiérrez R, et al. Distribución de los serotipos y fagotipos de Salmonella de origen humano aislados en España en 1997-20. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2005 Mar 1 [cited 2022 May 7];23(3):127–34. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-distribucion-serotipos-fagotipos-salmonella-origen-13072161>
55. Kagambèga A, Hiott LM, Boyle DS, McMillan EA, Sharma P, Gupta SK, et al. Serotyping of sub-Saharan Africa Salmonella strains isolated from poultry feces using multiplex PCR and whole genome sequencing. *BMC Microbiol* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2022 May 1];21(1). Available from: <https://pmc/articles/PMC7814607/>
56. Capítulo 5 Caracterización Microbiológica. 5.1 Microorganismo y medios de cultivo utilizados. 5.1.1. Cepa Bacteriana.
57. Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing of the European Society of Clinical Microbiology E, Diseases I. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2000 Sep 1 [cited 2022 May 7];6(9):509–15. Available from: <http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198743X1463158X/fulltext>
58. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow



- Aerobically. [cited 2022 May 7]; Available from: [www.clsi.org](http://www.clsi.org).
59. El sector avícola en Colombia creció 4,5% en 2018 - FENAVI - Federación Nacional de Avicultores de Colombia [Internet]. [cited 2022 May 8]. Available from: <https://fenavi.org/comunicados-de-prensa/el-sector-avicola-crecio-45-en-2018/>
  60. POLÍTICA NACIONAL DE SANIDAD E INOCUIDAD PARA LA CADENA AVÍCOLA Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial Ministerio de Comercio, Industria y Turismo Ministerio de Hacienda y Crédito Público Ministerio de Protección Social.
  61. "Por medio de la cual se establece el Programa Nacional de Control.
  62. Torrens R, Argilagos B, Cabrera S, Valdés B, Sáez M, Viera G. Las enfermedades transmitidas por alimentos, un problema sanitario que hereda e incrementa el nuevo milenio-The foodborne diseases, a health problem inherited and increased in the new millennium. [cited 2022 May 3]; Available from: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n080815.html>
  63. Inocuidad de los alimentos [Internet]. [cited 2022 May 3]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
  64. La Salmonella y los alimentos | Seguridad alimenticia | CDC [Internet]. [cited 2022 May 3]. Available from: <https://www.cdc.gov/foodsafety/es/communication/salmonella-and-food-sp.html>
  65. Jhong JH, Chi YH, Li WC, Lin TH, Huang KY, Lee TY. dbAMP: an integrated resource for exploring antimicrobial peptides with functional activities and physicochemical properties on transcriptome and proteome data. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2019 Jan 8 [cited 2022 May 3];47(Database issue):D285. Available from: [/pmc/articles/PMC6323920/](https://pmc/articles/PMC6323920/)
  66. Perfil de riesgo Ministerio de la Protección Social República de Colombia.
  67. Salmonella (no tifoidea) [Internet]. [cited 2022 May 3]. Available from: [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))
  68. Vásquez E, Máttar S, Mossos N, Mogollón D, Poutou Piñales BQ MSC RA. Caracterización molecular de cepas colombianas de Salmonella spp. a través del RFLP-IS200. *NOVA* [Internet]. 2005 Jul 1 [cited 2022 May 9];3(3):37. Available from: <https://revistas.unicolmayor.edu.co/index.php/nova/article/view/32/63>
  69. Actualidad sobre la salmonelosis en el sector avícola Fuente: PORTALVETERINARIA [www.albeitar.portalveterinaria.com](http://www.albeitar.portalveterinaria.com) Fecha: 19 de diciembre de 2011 Autores: Miguel Ángel Martín<sup>1</sup>, Carina García<sup>2</sup>, Gema Lopez<sup>1</sup> y Beatriz Muñoz<sup>1</sup> <sup>1</sup>Subdirección General de Sanidad de la Producción Primaria. Dirección General de Recursos Agrícolas y Ganaderos. MARM <sup>2</sup>Gerencia de control de enfermedades. TRAGSATEC. [cited 2022 May 9]; Available from: [www.albeitar.portalveterinaria.com](http://www.albeitar.portalveterinaria.com)
  70. Prueba de sensibilidad antimicrobiana de cepas de salmonella grupo d (móviles e inmóviles) aisladas de ponedoras comerciales en Colombia [Internet]. [cited 2022 May 9]. Available from: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/31667>

71. Fjell CD, Hiss JA, Hancock REW, Schneider G. Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2011 [cited 2022 May 9];11(1):37–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22173434/>
72. Müller AT, Posselt G, Gabernet G, Neuhaus C, Bachler S, Blatter M, et al. Morphing of Amphipathic Helices to Explore the Activity and Selectivity of Membranolytic Antimicrobial Peptides. *Biochemistry* [Internet]. 2020 Oct 6 [cited 2022 May 9];59(39):3772–81. Available from: [/pmc/articles/PMC7547863/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/347547863/)
73. da Cunha NB, Cobacho NB, Viana JFC, Lima LA, Sampaio KBO, Dohms SSM, et al. The next generation of antimicrobial peptides (AMPs) as molecular therapeutic tools for the treatment of diseases with social and economic impacts. *Drug Discov Today* [Internet]. 2017 Feb 1 [cited 2022 May 9];22(2):234. Available from: [/pmc/articles/PMC7185764/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27185764/)
74. Tavares TD, Antunes JC, Padrão J, Ribeiro AI, Zille A, Amorim MTP, et al. Activity of Specialized Biomolecules against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2022 May 7];9(6):1–16. Available from: [/pmc/articles/PMC7344598/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3344598/)
75. Zelezetsky I, Pacor S, Pag U, Papo N, Shai Y, Sahl HG, et al. Controlled alteration of the shape and conformational stability of alpha-helical cell-lytic peptides: effect on mode of action and cell specificity. *Biochem J* [Internet]. 2005 Aug 15 [cited 2022 May 7];390(Pt 1):177–88. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15836439/>