



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EVALUACION DE UN DESINFECTANTE CON BASE EN
PEROXIDO DE HIDROGENO EN MEDIO AMBIENTE Y
HUEVOS PUESTOS EN PISO.

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTENISTA

P R E S E N T A :

PMVZ GONZALEZ REYES VICTOR DAVID



ASESORES: M.V.Z. MCV. GABRIELA GOMEZ VERDUZCO.
M.V.Z. MCV. ODETTE URQUIZA BRAVO.

MEXICO, D.F. 2005

m 345.279



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo con mucho cariño y amor a mis Padres; Luz María de Jesús Estela Reyes de González y a Víctor Manuel González López (+), gracias por su tiempo, entrega, ejemplo y la gran herencia que me dejaron. Sabes Papá, yo se que volveremos algún día a estar juntos.

Gracias a Dios, por darme la fuerza, coraje y el vigor necesario para que no se doblegara mi espíritu, sobretodo para poder aceptar todo aquello que no puedo cambiar.

A mis hermanos; Francisco Javier González Reyes, Luis Raúl González Reyes, Manuel Agustín González Reyes y Felipe de Jesús González Reyes quienes con su interés y apoyo incondicional se pudiera formar este sueño.

A todos mis amigos de las diferentes etapas de mi vida, de los cuales aprendí mucho, gracias por esos momentos.

A ese hermosos ser llamado Toska (+) (mascota de la UNAM). Aprendí mucho de ti gordita, estuviste ahí a lo largo de toda mi carrera, tanto en las buenas como en las malas, e hiciste que mis malos y feos momentos se esfumaran. ¡Gracias por existir!

Y muy en especial a ese hermoso ser que toda mi vida espere y que nunca llego, gracias.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: González Reyes Víctor
David
FECHA: 8/Julio/05
FIRMA: González Reyes Víctor D.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, mi alma mater. Que me recibió en su seno y me dio el privilegio y honor de ser Universitario, desde la Preparatoria hasta la Facultad

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, que fue mi casa durante toda mi formación. A su personal Académico como Administrativo que me apoyo. Gracias, de aquí me marchó siendo un profesional.

A los Laboratorios VENCO por la confianza y el apoyo para la realización de esta investigación.

A los Doctores que formaron parte de mi jurado (Dr. Gustavo A. Garcia Delgado, Dr. José Antonio Quintana López, Dr. Alejandro Banda Castro, Dra. Odette Urquiza Bravo y al Dr. Ezequiel Sánchez Ramírez) por su tiempo, su sabiduría y consejos para el perfeccionamiento de este trabajo.

Al Departamento de Producción Animal: Aves, por su infraestructura material y humana que es orgullo de México.

A mis asesores la Dra. Gabriela Guadalupe Gómez Verduzco y la Dra. Odette Urquiza Bravo por la confianza, su tiempo y entrega, y sobretodo por la oportunidad de formar parte de la historia.

A la Q.F.B Carolina Segundo Zaragoza, responsable del Área de Diagnóstico Micológico de la F.M.V.Z., por sus observaciones y participación en la estructuración en la parte de hongos.

A la M.V.Z. MC. Frida Salmerón Sosa, Jefa del Departamento de Genética y Bioestadística, por su apoyo, paciencia y asesoría en la parte estadística de la tesis

Al Dr. Napoleón Nieto Crespo, Dr. Armando Esparza Rodríguez, MVZ. Juan Carlos Grimaldo G y Asunción, por su apoyo entusiasta, esfuerzo y talento.

Y muy en especial a la Técnica responsable del Laboratorio de Bacteriología Rosy Saldívar Hernández que fue mi Jefa, compañera y mi mejor amiga.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
MATERIAL Y MÉTODOS	14
RESULTADOS	17
DISCUSIÓN	20
LITERATURA CITADA	29
CUADROS	34
FIGURAS	38

González Reyes Víctor David. EVALUACIÓN DE UN DESINFECTANTE CON BASE EN PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN MEDIO AMBIENTE Y EN HUEVOS PUESTOS EN PISO. (Bajo la asesoría de: MVZ, MCV DRA. Odette Urquiza Bravo y MVZ, MCV Gabriela Gómez Verduzco).

Con el objeto de medir la eficacia del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en disminuir las cuentas bacterianas y fungales en medio ambiente y en huevos puestos en piso, se efectuaron los siguientes estudios: En una caseta se colocaron seis grupos de medios de cultivo (Tripticasa soya agar (TSA), Manitol sal agar (MSA), MacConkey (McC) y Sabouraud (Sab)). Se abrieron las cajas por 5 minutos, posteriormente se cerraron, constituyendo el grupo "antes de la desinfección". Posteriormente se asperjó con un desinfectante con base en H_2O_2 e inmediatamente se colocaron otros 6 grupos de medios de cultivo (ya descritos), y se expusieron durante 5 minutos denominados como el grupo "después de la desinfección". La superficie de los medios de cultivo donde se observó crecimiento fue lavada con una solución amortiguada de fosfatos (PBS), para posteriormente efectuar diluciones décuples (10^{-1} a 10^{-6}) de cada medio por separado. Para el muestreo de los huevos en forma externa sin desinfección, se colectaron 42 huevos de piso, y posteriormente se realizaron diluciones décuples (10^{-1} a 10^{-6}), depositándose 3 gotas de 20 μ l cada una en cada división de los medios descritos anteriormente (excepto el agar Sabouraud, donde se ocupó un medio por cada dilución). Para el muestreo con desinfección se asperjó el cascarón con el desinfectante, para a continuación efectuar diluciones décuples y sembrar como se describió anteriormente. Para el muestreo interno, los huevos se asperjaron con una solución del desinfectante con base en H_2O_2 , se colectaron 0.5 ml de yema de cada huevo, diluyéndose 1:10 en PBS, estéril para posteriormente con una asa bacteriológica se sembrara por estría continua en los medios antes descritos. Se encontró respecto al muestreo ambiental, que el desinfectante no tuvo una reducción estadísticamente significativa ($p > 0.05$). En los medios de cultivo de Sabouraud en el muestreo de ambiente después de la desinfección, no se apreció reducción del número de colonias fungales después de la aspersión con el H_2O_2 . En el muestreo externo de los huevos, de los dos diferentes tiempos (antes de desinfección comparado con después de la desinfección), en los 3 medios de cultivo (TSA, MSA, MCC) se observó reducción estadísticamente significativa ($p < 0.01$), el medio Sabouraud presentó 37/42 muestras con reducción en el número de colonias fungales, 3/42 muestras mostraron la misma cantidad de colonias y 2/42 medios presentaron mayor cantidad de colonias después de la aplicación del desinfectante. El resultado obtenido del muestreo interno fue: 10/42 Gram positivos (23.80%), 9/42 Gram negativos (21.42%), 1/42 hongo (2.38%) y 22/42 muestras sin crecimiento (52.38%). Se concluye que el desinfectante con base en H_2O_2 no mostró reducción en la carga microbiana en la caseta de aves alojadas en piso con cama y sí fue efectivo en la carga bacteriana y fungal presente en cascarón del huevo de aves.

“Evaluación de un desinfectante con base en peróxido de hidrógeno en medio ambiente y huevos puestos en piso.”

INTRODUCCIÓN.

En México la Avicultura es una actividad de gran importancia, representa el 61.18% de la producción pecuaria del país dividido en producción de pollo 31.34%, huevo 29.65% y pavo 0.19% ⁽¹⁾. La Avicultura es un sector de gran impacto para la sociedad mexicana, ya que de acuerdo con cifras de la Unión Nacional de Avicultores (UNA), el cálculo del valor de la producción de huevo en el 2003 fue de 16 mil millones de pesos, además, de la generación de más de 384 mil empleos: 64 mil directos y 320 mil indirectos, en su mayoría rural ⁽¹⁾.

Nuestro país ocupa el 5to lugar mundial en la producción de huevo y el primer lugar en el consumo de huevo fresco. El estado de Jalisco es el principal productor de huevo en el territorio nacional (ocupando el 43% de la producción nacional) y es en el Distrito Federal la entidad donde más se comercializa huevo fresco. De acuerdo a la UNA, el consumo per cápita de huevo en el año 2003 es de 19 kg ⁽¹⁾ representado en forma directa el 72% de la producción nacional aproximadamente ⁽²⁾.

El huevo es muy importante en la alimentación humana, es el segundo alimento de origen animal, tan sólo superado por la leche en complejidad de nutrientes. Sus principales características son: su alto contenido de nutrientes en densidad y calidad (principalmente proteína altamente digestible), bajo costo, gran variedad de preparaciones como alimento, fácil adquisición y almacenamiento ⁽¹⁾.

De todos los productos alimenticios, el huevo es el que posee las mejores defensas naturales ⁽³⁾, las cuales lo protegen para prevenir gran parte de las agresiones causadas por el medio. Tales características son de tipo físico (cutícula, cascarón, membranas testáceas, y viscosidad de la albúmina) y químico (factores antimicrobianos naturales de la albúmina) ^(3,4), en la que su eficacia dependerá por mucho de la integridad del huevo ⁽⁴⁾.

El huevo de gallina está compuesto por:

1) Cutícula: es una capa externa de glucoproteínas que cubre y sella los poros del cascarón evitando la pérdida de humedad ^(3, 4). Su grosor no es uniforme en toda su superficie, oscilando entre 0.5 y 12.8 μm ⁽⁶⁾. Además, presenta numerosas grietas estrelladas, correspondiendo las mayores a las aperturas de los poros ⁽⁶⁾. Esta membrana impide la penetración de bacterias, hongos, y virus al interior del huevo, ya que obtura los poros del cascarón. El lavado, los golpes, los cambios de temperatura, humedad, la temperatura del ambiente etc., son factores que pueden alterar a la cutícula, provocando pérdida de su integridad, haciendo al cascarón más permeable ^(4, 5, 6, 7).

2) Cascarón: constituye aproximadamente el 11% del peso del huevo; esta formado en un 93.5% por carbonato de calcio, 3.3% de materia orgánica (trazas de sodio y potasio), 1.2% de carbonato de magnesio, 0.5% de fosfato de calcio, así como 1.5% de humedad ⁽⁸⁾. El cascarón esta constituido por: una capa esponjosa, la cual esta debajo de la cutícula. A continuación sigue la capa mamilar o interna, ésta capa presenta una masa proteínica y una matriz mamilar. En la matriz mamilar, hay cristales de calcita orientados aleatoriamente formando una especie de conos que en ocasiones forman masas cohesivas y en otras están separados formando pequeños canales o poros ⁽⁸⁾, un cascarón contiene arriba de 11,000 poros ^(4, 9), los cuales atraviesan las 3 capas del cascarón y sirven como conexión entre ellas, su diámetro oscila entre 20 y 45 μm y están obturados por tapones de cutícula ⁽⁹⁾ el espesor total del cascarón está comprendido entre los 300 y 400 μm ⁽⁹⁾. El cascarón constituye una barrera selectiva que permite el intercambio gaseoso y la evaporación (conservación de agua), proporciona protección mecánica para el embrión, además, de la inhibición del ingreso de gran variedad de agentes infecciosos ^(4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13).

3) Membranas Testáceas, Membranas del cascarón o Membranas Internas del cascarón: son dos membranas adheridas al interior del cascarón soldadas la una con la otra en toda su extensión, salvo en el extremo grueso del huevo donde se separan para constituir la cámara de aire. Están formadas por una red de fibras de queratina y polisacáridos que actúan como filtro, reduciendo así la cantidad de bacterias antes de que puedan llegar a la clara y a la yema ^(6, 8, 12, 13).

4) Albúmina o clara del huevo: constituye aproximadamente el 60% del peso total del huevo ⁽⁸⁾. Su acción protectora se debe a su elevado pH inicial (en la proximidad de 9) además, contiene sustancias que restringen o inhiben totalmente el crecimiento de la flora invasora, como la Lisozima, que es un tipo de proteína no utilizada en la nutrición de las bacterias y que posee la propiedad de lisar las paredes de las bacterias Gram positivas ⁽¹¹⁾, ⁽¹²⁾ con la hidrólisis de enlaces β -1,4-glucosídicos de las bacterias Gram positivas ⁽⁴⁾. La Avidina, que es una sustancia que al combinarse con la biotina, bloquea su acción que es indispensable para el crecimiento de muchos microorganismos; la Conalbúmina (denominada todavía como ovotransferrina), es una sustancia que bloquea la acción de algunos metales (Hierro, Cobre, Zinc) indispensables para el crecimiento de muchos gérmenes (tanto Gram positivos como Gram negativos). Esta acción depende de muchos factores, entre ellos el pH y la propia concentración de hierro. Si ésta es alta, las defensas naturales del huevo disminuyen frente a las infecciones microbianas. Este tipo de inhibición depende también del tipo de microorganismo del que se trate ⁽⁴⁾. La Riboflavina, la cual es la vitamina del complejo B que limita el crecimiento de algunos gérmenes y finalmente la Proteína B, que es una sustancia que inhibe la proteasa fúngica, limitando el crecimiento de hongos ⁽¹³⁾. Otras proteínas con la misma función que la mencionada anteriormente son: la ovostatina (ovomacroglobulina), la cistatina, el ovomucoide y el ovoinhibidor ⁽⁴⁾.

5) Chalazas: constituyen el 2.7% de la albúmina. Están formados por filamentos de mucina entrelazados que se extienden por los polos opuestos de la yema y su función es la de fijar a la yema en el centro del huevo, manteniéndola así lejos del contacto con las paredes del cascarón ^(8, 13).

6) Membrana Vitelina: es una capa fina transparente constituida por pequeñas fibras de composición similar a la albúmina densa, representa casi dos tercios (5 a 8 μ m) del espesor total de la "membrana", juega un papel importante en la protección de la yema contra la transferencia de H₂O procedente de la clara ⁽⁸⁾.

7) Yema: constituye aproximadamente del 30-32% del peso del huevo ^(8, 13, 14). Está compuesta de lípidos, proteínas, vitaminas, minerales, pigmentos y carbohidratos (en poca cantidad). Casi la totalidad de los lípidos del huevo se encuentran en la yema (triglicéridos, fosfolípidos y colesterol) ⁽¹⁴⁾, el contenido total es de 4 a 4.5 g por unidad, de

las cuales 1.5 g son grasas saturadas y el resto insaturada (predominando las monoinsaturadas, que son beneficiosas para el organismo) ⁽¹⁶⁾. Más del 98% de los hidratos de carbono del huevo están en forma de glucosa libre y, aunque no son más del 0.4% del contenido total del huevo, juegan un papel importante como fuente primaria de energía para el embrión ^(14, 16). Otros nutrientes esenciales son los minerales (sodio, potasio, calcio, magnesio, fósforo, hierro, yodo, manganeso, cromo, molibdeno, cobre, zinc y selenio) y las vitaminas, ya sean liposolubles (A, D₃, E y K) o hidrosolubles (Colina, tiamina (B₁), riboflavina (B₂), nicotinamida (B₃), piridoxina (B₆), ácido fólico (B₁₂), ácido pantoténico y biotina) ^(6, 16). La mayoría de las vitaminas se concentran en la yema más que en la albúmina, especialmente en el caso de las vitaminas liposolubles ⁽⁶⁾.

Por otro lado, el huevo contiene dos carotenoides llamados Luteína y Zeaxantina (Xantofilas) que le confieren color a la yema. El color amarillento de la clara se debe a la presencia de riboflavina. En caso de carencia, la albúmina presenta un color más blanquecino ⁽⁶⁾.

En los huevos fértiles, la función principal de la yema es el aporte de nutrientes para el desarrollo del embrión hasta su eclosión y en los huevos de mesa por otro lado, contribuye en la alimentación humana. El contenido energético por huevo es de aproximadamente de 75 kilocalorías ⁽¹⁶⁾.

Las características que ofrece el huevo como estructura, empaque y unidad de producción se han reconocido desde hace mucho entre los avicultores ⁽¹⁷⁾, razón por la cual, actualmente existen mayores exigencias de higiene cuando se crían las aves en condiciones intensivas ^(6, 14), aunque realmente no hay ningún método de producción que evite el contacto definitivo con el excremento de las aves ⁽¹⁸⁾.

Tipos de Instalaciones avícolas para la producción de huevos fértiles

En producción avícola, hay diferentes instalaciones en las que se pueden criar a las aves ^(17, 18, 20, 22), el tipo de instalación dependerá del capital destinado para este fin ^(14, 17). Como por ejemplo: a) sobre piso con cama; este sistema tiene como ventajas su bajo

costo, además; se asemeja el medio natural de la gallina. Las desventajas son: riesgo de postura en el piso, se requiere de mano de obra para conservar la cama en buenas condiciones, hay mayor riesgo de infecciones intestinales (debido a que las aves están en contacto directo con la gallinaza) y no se puede aumentar la densidad de población a más de 5 aves por m². b) sobre tiras de madera o plástico ("slats") o tela de alambre dispuesta en forma horizontal; las ventajas que ofrece este sistema es que proporciona a las aves un ambiente libre de infección, se puede aumentar la densidad de población y es posible obtener un mayor número de huevos limpios. Las desventajas es que baja el índice de fertilidad debido a la tensión en que están sometidas las aves, pérdida de huevos por ruptura al localizarse en el piso (ocasionados por las gallinas al desplazarse de un lado a otro), un costo de material más alto (por requerirse de más material), además que existe problema con la gallinaza (ya que se puede humedecer y por lo tanto favorecer la presencia de amoníaco y moscas). c) tela de alambre dispuesta en declive (sistema "Bresler"); en este sistema se tienen las ventajas de que los huevos ruedan a la canal recolectora lo que facilita su recolección, además de que se les proporciona un ambiente limpio de infección a las aves; las desventajas que se llegan a presentar es que el declive del piso incomoda el apareamiento (hay un incremento en la infertilidad), y se presentan rendimientos irregulares de una parvada a otra, debido al continuo estado de tensión. d) combinación de piso con cama y una o dos terceras partes de piso con rejillas; las ventajas de este sistema son similares al sistema sobre piso con cama, con la adición de que se reducen los problemas de cuidado de la cama, y hay un menor porcentaje de mortalidad (pues se reducen las infecciones bacterianas y las aglomeraciones al dormir), los inconvenientes de este sistema son los problemas por la presencia de moscas y ratas por la acumulación de gallinaza debajo de los slats, además del alto costo (por la construcción de los slats) y finalmente, e) en jaulas de uno o varios pisos; este tipo de instalación es el sistema recomendado para obtener huevos libres de patógenos específicos (HLPE), y posee las siguientes ventajas: mínimo porcentaje de machos (1-2 % en lugar de 8-10%), ahorro en el alimento, aumento en la incubabilidad y se incrementa la producción total, además, el huevo no se contamina con el nido ⁽¹⁷⁾.

La explotación de las aves sobre piso con cama es el sistema más común ⁽²⁰⁾, sin embargo, es el sistema que corre mayor riesgo de contaminación microbial debido a un

manejo inadecuado del material de cama (por el exceso de humedad, la cual se presenta por falla en los bebederos) además del contacto con las heces; esto ocasiona que la gallina transporte en sus patas humedad y heces al nido contaminando la cama del nido con los microorganismos que pudieran estar presentes ^(18, 19, 20).

Para reducir la contaminación bacteriana presente en los huevos, gran parte de las plantas incubadoras sanitizan los huevos incubables; sin embargo, si dicho programa es deficiente puede haber repercusiones negativas ^(18, 22).

Contaminación del huevo y repercusiones

Algunos investigadores consideran que el huevo de gallina es estéril al momento de la puesta ^(4, 11, 13), sin embargo, la industria avícola mundial tanto productora de huevos incubables como aquellos destinados para consumo humano han enfrentado por muchos años el problema de contaminación por diversos agentes que alteran la constitución del huevo, como bacterias, hongos, virus y parásitos ^(6, 17, 23). La contaminación del cascarón se produce habitualmente después de la postura, aún los huevos que se retiran del útero pueden estar cubiertos por muchas bacterias cuando existen infecciones sistémicas ⁽²²⁾. Cuando los microorganismos presentes en la superficie externa del cascarón intentan vencer las barreras defensivas naturales del huevo para penetrar a su interior y, si lo logran, se producen fenómenos de alteración, ya que cuando estos gérmenes alcanzan la yema, encuentran un sustrato rico en nutrientes para su proliferación, produciendo peligros potenciales asociadas a las infecciones tóxico alimentarias ⁽¹¹⁾. La mayoría de los microorganismos no sobreviven mucho tiempo afuera del cuerpo de los animales (excepto algunos patógenos), pero desgraciadamente lo suficiente como para provocar una nueva infección. Las bacterias pueden sobrevivir si están protegidas con materia orgánica y las esporas bacterianas pueden sobrevivir casi indefinidamente en el suelo o protegidos por hendiduras o resquicios del edificio ⁽¹⁸⁾.

Para la industria productora de huevos para consumo, la contaminación del producto principalmente por bacterias del género *Salmonella* en las granjas de producción

y durante su transporte y almacenamiento, han sido un peligro potencial de enfermedades gastrointestinales en el ser humano ⁽¹¹⁾. De acuerdo a un sin número de investigaciones, la microflora que contamina el cascarón es heterogénea (destacando las bacterias Gram positivas y Gram negativas), aunque la flora que causa la alteración del huevo es Gram negativa. La microflora del huevo es bastante constante y sus principales representantes pertenecen a los siguientes géneros: *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Proteus*, *Citrobacter* y *Aeromonas*. Entre los hongos: *Mucor*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Thamnidium* y *Sporotrichium* son los más reportados. En huevos rotos predominan: *Pseudomonas*, *Proteus*, *Escherichia coli* y *Alcaligenes* ^(10,11,13).

En la superficie del huevo se pueden encontrar aproximadamente de 300 a 500 microorganismos en el cascarón al pasar éste por la cloaca al momento en que se pone el huevo, aunque sólo algunos son patógenos, son suficientes para producir problemas ⁽²²⁾. Según North (1993), en presencia de una temperatura y humedad adecuada, 15 minutos después que es puesto el huevo, esta cantidad puede incrementarse entre 15,000 y 30,000. En una hora mas tarde, estarán presentes entre 20,000 y 30,000 microorganismos. A los datos antes mencionados podrían agregarse las bacterias que se pueden adherir al cascarón del material con que entran en contacto los huevos recién puestos, como el piso de la cama, material sucio del ponedero y heces ⁽¹⁷⁾. Por ejemplo, la cantidad promedio de microorganismos que se podrían encontrar sobre el huevo al momento de la recolección del ponedero o del piso se muestran como sigue: Huevos limpios 3,000-3,400, Huevos manchados: 25,000-28,000, Huevos sucios: 390,000-430,000, sugiriendo que las altas cantidades de bacterias en el cascarón del huevo son a causa de la materia fecal, conociendo que un gramo de materia fecal contiene aproximadamente de 2 a 6 billones de bacterias ⁽²²⁾.

Por otro lado, los microorganismos localizados en el intestino de los animales contaminan el ambiente y al momento de la puesta, el huevo es contaminado por el contacto con materias fecales a su paso por la cloaca y después en el nido por contacto con el ambiente exterior ⁽¹¹⁾; además, se pueden conjugar otros factores tales como: recolección deficiente (en tiempo y frecuencia), exceso de tierra contaminada (común en

crianza en piso), clasificación, almacenaje inapropiado o envasado para su envío al mercado ^(17, 22).

En la contaminación del huevo, una de las principales rutas de contaminación es a partir del ambiente contaminado. Existe una pobre correlación entre el aspecto del huevo y su grado de contaminación ⁽⁶⁾, esto es: un huevo visiblemente limpio puede tener gran cantidad de bacterias.

Otro factor importante de la contaminación del huevo es el impacto que causa en la industria productora de pollito y pollita. Un porcentaje mayor al 2% de huevo sucio representa pérdidas económicas ⁽¹⁷⁾, ya que una contaminación de los huevos incubables con bacterias u hongos causa pérdidas por mortalidad embrionaria, mortalidad durante las primeras semanas de vida del pollito y un marcado retraso en el crecimiento de las aves ^(17, 23). Muchas granjas de reproductoras pueden tener bacterias en su ambiente. Estudios previos ^(19, 24, 43) han demostrado que la contaminación del huevo incubable resulta en baja incubabilidad, diseminación de procesos infecciosos, mortalidad embrionaria y deterioro en el desarrollo de las aves, por ejemplo: *Pseudomonas* puede encontrarse como habitante normal de suelo o agua de bebida, la cual afecta a aves adultas pudiéndose aislar de heces, por lo que la contaminación del cascarón puede llevarse a cabo por partículas de suelo suspendidas ⁽²⁶⁾ contaminando los huevos incubables, y éstos al trasladarlos a la incubadora provocan los denominados "huevos bomba", causando la eliminación de los huevos cercanos a los que explotaron en la charola del incubador por la contaminación ⁽²³⁾. Otros microorganismos involucrados en la contaminación del huevo incubable son: *Aspergillus fumigatus*, que provoca mortalidades que van del 2% hasta el 87%, acentuado por la contaminación del ambiente (material de cama, nacedora e incubadora) ^(26, 27) o la *Escherichia coli*, que contamina los huevos por contacto de estos con las heces, y representa el 60% de las causas de mortalidad en las primeras semanas de vida por Onfalitis ^(27, 28).

La contaminación del huevo muchas veces proviene del nido ⁽²⁹⁾. Estudios bacteriológicos de cama de reproductores explotadas en piso, han demostrado incontables colonias de *Escherichia coli*, *Proteus* sp, y *Staphylococcus* sp, por ello se recomienda que los huevos localizados en el piso se recojan después de los huevos que

se encuentran en el nido y no se incuben, debido a que los microorganismos antes mencionados pueden atravesar el cascarón por los poros, y en ocasiones llegan a producir mortalidad embrionaria temprana, que a veces provoca que se eliminen los huevos por infértiles ⁽¹⁷⁾.

Estrategias para evitar la contaminación del cascarón del huevo

Una de las herramientas utilizadas en producción para reducir la contaminación del cascarón es el manejo, en dicha práctica se efectúa la recolección, que puede llevarse a cabo en forma manual o mecánica.

Cuando se efectúa de forma manual, la frecuencia de recolección aumenta en las horas de máxima producción; además, depende de la localización geográfica donde se encuentre la explotación. En climas templados y fríos, son suficientes tres recolecciones en la mañana y una en la tarde. En climas calientes, se deberán de efectuar cuatro recolecciones por la mañana y dos por la tarde y colocar los huevos en separadores de plástico limpios e íntegros ^(17, 20). No se recomienda colocar los huevos en baldes o cestos, ya que provocan cuarteaduras o fracturas del cascarón y que favorecerán la penetración bacteriana, además el casetero o personal encargado de la parvada deberá de lavarse y desinfectarse las manos antes de recolectar los huevos ⁽³⁰⁾. La forma mecánica de recolección en gallinas reproductoras involucra la utilización de nidos mecánicos, donde el huevo después de ser ovopositado rueda al fondo del nido y es colectado por una cinta transportadora ⁽²⁰⁾. En ponedoras la recolección automática involucra el siguiente material:

a) Bandas o cintas transportadoras (de yute o plástico), transportan los huevos desde las naves de puesta hasta el almacén central o zona de clasificación. **b) Bandas colectoras de yute, plástico o varillas metálicas recubiertas con caucho plastificado fijadas en sus extremos por cadenas.** El polvo que cae sobre las bandas es limpiado por medio de un soplador de aire a presión, esto evita que los huevos se ensucien; en algunos casos se tienen instalados cepillos que permanentemente mantienen limpias las bandas colectoras de huevo, el mecanismo consiste en que los huevos ruedan en el piso inclinado de la jaula sobre una banda, que los envía a un cuarto de servicio al final de la caseta. En el caso de que utilicen baterías en varios pisos, al final de cada uno de ellos,

suelen ir a parar a un sistema de recolección por rodillos, que los hacen descender hasta un nivel inferior, con lo que se evita el problema de roturas y fisuras, la salida del huevo se realiza por medio de una varilla que protege y sirve de guía para que el huevo se deslice a la mesa de clasificación o almacén. El sistema de recolección automático tiene las siguientes ventajas: hay reducción de mano de obra, bajo riesgo de contaminación (por la mayor frecuencia de recolección), mayor número de huevos limpios, mejor clasificación de los huevos por peso y existe un menor daño en el manejo de los huevos que de la forma convencional; sin embargo, la desventaja es que requiere de una inversión inicial mucho mayor que en los nidos convencionales, además de que se debe tener un mantenimiento frecuente del equipo ⁽⁹⁾.

Desinfección del huevo fértil

La necesidad de desinfectar los huevos fértiles incubables ya estaba por lo menos reconocida desde 1908 cuando Pernot informó del uso del gas formaldehído para controlar la población microbiana ⁽³¹⁾. La desinfección del cascarón impide la invasión microbiana, el cual debe de ser un punto de control importante. Tal procedimiento ha demostrado ser eficaz para reducir la población total de bacterias en el huevo incubable ⁽³²⁾, para ello existen diferentes clases de desinfectantes, los cuales tienen que ser efectivos en el control de la población microbiana, pero no deben de ser tóxicos para el desarrollo del embrión ^(32, 33). Es necesaria la rápida aplicación del desinfectante tan pronto como los huevos hayan sido colectados ⁽³³⁾. Se dice que el huevo tiene que ser desinfectado antes de que cumpla una hora de haber sido puesto, ya que se debe de proteger de la contaminación posterior por penetración bacteriana al retraerse la cámara de aire ⁽²⁰⁾.

En la desinfección del huevo se han empleado una gran cantidad de desinfectantes (Formaldehído, Glutaraldehído, Cuaternarios de Amonio, Peróxido de Hidrógeno, Hidrocloruro de Polihexametilenebiguanida etc.), siendo el primero uno de los más empleados ^(17, 30). Sin embargo, estudios citados por Scott y Swetnam (1993), demuestran la peligrosidad de este producto, ocasionando que en algunos países como Estados Unidos de Norteamérica de uso restringido y considerado por la Agencia de

Protección al Ambiente de este país como un producto altamente tóxico; además, de sospecharse su posible carcinogenicidad ⁽³⁴⁾. Por lo anterior, se abre la expectativa de exploración de nuevas alternativas como el Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2), este desinfectante ofrece la ventaja de que es de rápida evaporación o destrucción (se descompone en H_2O y O_2), no deja olores desagradables y no es peligroso a las personas que lo aplican, sin embargo, se recomienda utilizar las medidas de seguridad pertinentes relacionadas a la utilización de agentes químicos (botas, lentes protectores, mascarilla, ropa de manga larga, guantes, etc.) ^(16, 36).

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) fue utilizado por primera vez en 1818 por el médico inglés B W. Richardson, es un líquido incoloro que es completamente miscible en el agua ⁽³⁶⁾. De forma natural, está presente en la leche y en la miel ayudando a evitar la descomposición, además, es un residente normal de los tejidos como resultado del metabolismo celular. El Peróxido de Hidrógeno protege de las infecciones por invasión de microorganismos patógenos. En la boca se localiza en las membranas mucosas, actúa como un oxidante poderoso sólo o en combinación con el tiocianato y la peroxidasa en la saliva. A nivel celular se encuentra contenido en los gránulos de los neutrófilos que son vertidos en el fagolisosoma causando la destrucción del agente invasor. Se ha utilizado como un desinfectante para material inanimado de hospitales y consultorios dentales, antiséptico para heridas abiertas, piscinas, alcantarillados y para la esterilización del agua potable usándolo a baja concentración. Según Naguib y Hussein, citados por Block (1991), el Peróxido de Hidrógeno al 0.1% a 54°C por 30 minutos redujeron la cuenta bacteriana total en la leche cruda ("fresca") en 99.999%, y las cuentas de coliformes, estafilococos, salmonela, y clostridios en un 100%. Es considerado tan seguro que ha sido aceptado para usarse en la industria de la alimentación en muchos países, inclusive en los Estados Unidos a través de la Federal Drug Administration (FDA). Una de las mayores nuevas aplicaciones, es en la esterilización de los recipientes para conservar asépticamente alimentos como la leche fresca y jugos de fruta ⁽³⁶⁾.

El H_2O_2 es un fuerte oxidante y corrosivo a muchos metales, a altas concentraciones puede causar irritación de piel, ojos, y membranas mucosas ^(16, 36) por lo

que, como ya se mencionó anteriormente, es necesario utilizar ropa y equipo para su manejo. El riesgo físico y tóxico aumenta conforme se incrementa la concentración, el efecto potencial del H_2O_2 es que es altamente carcinógeno. La solución acuosa oficial del H_2O_2 es del 3% teniendo baja toxicidad. Además, en los productos de degradación del H_2O_2 , agua y oxígeno no dejan residuos tóxicos. Se descompone en presencia de numerosos catalizadores como ácidos, materiales orgánicos oxidables, muchos metales y cuando se calienta a una temperatura de $80^\circ C$ ⁽³⁶⁾.

En la avicultura, el Peróxido de Hidrógeno se ha evaluado a varias concentraciones como desinfectante para usarse en incubadoras, requiriéndose de una concentración del 5% para controlar completamente a patógenos superficiales ⁽¹⁹⁾. En el mecanismo de acción se involucra la reacción del ión súper-óxido con el H_2O_2 , para producir el radical hidroxilo. El radical hidroxilo es un oxidante muy fuerte y es por este mecanismo que el peróxido de hidrógeno, provoca la destrucción de las bacterias ^(36, 37); puede atacar lípidos de la membrana, ADN, y otros componentes celulares esenciales, además, actúa sobre los grupos funcionales sulfhídrico de las enzimas, oxidándolos a grupos disulfuro ^(36, 37).

La industria Avícola ha usado una concentración al 3% de H_2O_2 que es asperjado con éxito en la incubadora durante el período de incubación. En esta concentración el H_2O_2 se ha observado estable y bactericida sin la formación de productos de descomposición ⁽¹⁹⁾.

El peróxido de hidrógeno posee un amplio espectro, es activo contra bacterias, levaduras, hongos, virus, incluso esporas, siendo los microorganismos anaerobios los más susceptibles debido a que éstos no producen catalasa para inactivar al peróxido. El peróxido de hidrógeno puede destruirse fácilmente por calor o las enzimas catalasa y peroxidasa ^(15, 36, 37). Sin embargo, si las medidas antes mencionadas no se llevan a cabo de manera correcta, aunado a un medioambiente de las casetas altamente contaminado, los huevos estarán contaminados también, de ahí la importancia de emplear desinfectantes que sean eficaces en el momento de su aplicación.

Hipótesis:

El desinfectante con base en peróxido de hidrógeno reducirá significativamente la cuenta bacteriana ambiental y la de huevos puestos en piso.

Objetivos.

General:

Evaluar un desinfectante con base en peróxido de hidrógeno en medio ambiente y huevos puestos en piso.

Particulares:

a) Evaluar el microbismo ambiental presente en una caseta de aves reproductoras ligeras antes y después del empleo de un desinfectante con base en peróxido de hidrógeno.

b) Evaluar el grado de contaminación de huevos puestos en piso, mediante muestreo bacteriológico externo e interno, antes y después del empleo de un desinfectante con base en peróxido de hidrógeno.

MATERIAL Y MÉTODOS.

1) Universo de trabajo: El estudio se realizó en una caseta de gallinas reproductoras ligeras estirpe Hy-line W 36 en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (C.E.I.E.P.A.) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (F.M.V.Z.) de la Universidad Nacional Autónoma de México (U.N.A.M.), localizado en la colonia Zapotitlán, Delegación Tláhuac en México D.F., con una altitud de 2,710 metros sobre el nivel del mar. En esta zona predomina el clima templado sub-húmedo (siendo enero su mes más frío y mayo el más caluroso), con una temperatura media anual de 16°. Su precipitación pluvial promedio es de 533.8 mm, siendo los meses de junio a agosto en donde se registran las mayores precipitaciones pluviales ⁽³⁸⁾.

2) Muestreo del ambiente: En una caseta de 7.40 metros por 9.62 metros de largo se colocaron 6 grupos de medios de cultivo distribuidos a una distancia proporcional, esto es: 2.46 metros para los grupos distribuidos a lo ancho y para los grupos distribuidos a lo largo, una distancia de 2.40 metros ^(Fig. 1). Los grupos estuvieron constituidos por: 1 caja de

Petri conteniendo Tripticasa Soya Agar (TSA)^a como ejemplo de medio de cultivo general de bacterias; 1 caja de Petri de Manitol Sal Agar (MSA)^b ejemplo de medio de cultivo para bacterias Gram positivas ⁽⁴⁰⁾; 1 caja de Petri de agar McConkey (McC)^c; ejemplo de medio de cultivo para bacterias Gram negativas y 1 caja de Petri con agar Sabouraud^d, como medio de cultivo para hongos. Las cajas se abrieron al mismo tiempo y permanecieron abiertas durante 5 minutos. Terminado el tiempo, se cerraron y se rotularon con el nombre "antes de la desinfección", es decir, evaluación sin la aplicación del desinfectante ^(Fig. 1).

Posteriormente, se asperjó la caseta con un desinfectante con base en peróxido de hidrógeno^e por medio de un aspersor comercial^f a razón de 5 ml de desinfectante, diluidos en 7.5 litros de agua (dosis recomendada por el fabricante), e inmediatamente se colocaron otros 6 grupos de medios de cultivo descritos anteriormente (TSA^a, MSA^b, McC^c y Sabouraud^d), repitiéndose el procedimiento antes mencionado. El grupo de cajas en esta parte del experimento se rotularon como "después", (después de la aplicación del desinfectante) ^(Fig. 1).

Quantificación Bacteriana y Fungal del ambiente de la caseta

Los grupos antes y después a la utilización del desinfectante se trasladaron al laboratorio^g. En la superficie de las cajas donde se observó crecimiento, está fue lavada con 1 ml de solución amortiguada de fosatos (PBS) estéril, para posteriormente llevar a cabo diluciones décuples (10^{-1} a 10^{-6}) y de cada dilución por separado se sembró 100 μ l en los medios de TSA^a, MSA^b y McC^c incubándose a 37°C por 18 horas, posteriormente se realizó la cuantificación bacteriana de las unidades formadoras de colonias por caja de medio de cultivo ⁽⁴⁰⁾ ^(Fig. 1). En el caso de los hongos (crecimiento de colonias en el medio Sabouraud^d) después de terminado el tiempo de incubación, se determinó las colonias fungales presentes en los platos de Sabouraud mediante la suma de las colonias en el plato de agar multiplicándolo por el factor de dilución para obtener una estimación de la población ⁽³⁹⁾.

^a Acumedia Manufactures, Inc. Baltimore Maryland USA

^b Bioxon, Becton Dickinson de México.

^c Difco Laboratories, Detroit MI 48232-7058 USA.

^d Acumedia Manufactures, Inc. Baltimore Maryland USA.

^e Algibac®, Venco Laboratorios

^f Fogmaster-Tri-jet 6208, The Fogmaster Co. Deerfield Beach Florida USA.

^g Departamento de Producción Animal: Aves, F. M. V. Z.

3) Muestreo de los huevos

Se colectaron 42 huevos puestos en piso provenientes del C.E.I.E.P.A. de la F.M.V.Z. de la U.N.A.M. A todos los huevos se les realizó un muestreo bacteriológico externo e interno de acuerdo a la técnica descrita por Gentry *et. al.*, (1972), con algunas modificaciones, descritas a continuación ⁽⁴⁹⁾.

4) Muestreo Externo sin desinfección: Los huevos se colectaron con guantes desechables y se colocaron en bolsas de plástico estériles. Cada bolsa conteniendo un huevo se rotuló con el número correspondiente a cada huevo para tener un control y efectuar un registro de todos los huevos. En cada bolsa se depositaron 9 ml de PBS estéril, cada huevo fue frotado con las paredes internas de la bolsa para suspender en el líquido todas las partículas presentes que hubiera en la superficie, posteriormente cada huevo fue colocado en una de las esquinas para que el líquido lo cubriera completamente, dejándose reposar durante 5 minutos, finalmente se homogenizó la suspensión con ayuda de una pipeta y para realizar diluciones décuples (1:10) desde 10^{-1} a 10^{-6} por cada huevo. A continuación, se depositaron 3 gotas de 20 μ l cada una en cajas de petri conteniendo TSA^a, MSA^b y McC^c, utilizando dos cajas divididas en tres porciones, en la que cada división correspondió a cada dilución. Para el caso de los hongos, se empleó una caja de agar Sabouraud^d por cada dilución. Las cajas de los medios para bacterias se incubaron a 37° C por 18 horas para finalmente efectuar la cuenta bacteriana de cada medio de cultivo en el que se observó crecimiento, posteriormente se obtuvieron las unidades formadoras de colonias como se mencionó en el apartado de medio ambiente. Los medios de agar Sabouraud^d permanecieron a temperatura ambiente durante 10 días más revisando el crecimiento diariamente ⁽⁴¹⁾, la determinación del estimado del número de colonias fungales se efectuó como se mencionó en el apartado de ambiente ^(Fig. 2).

5) Muestreo Externo con desinfección: Una vez terminado de sembrar las tres gotas de 20 μ l de cada huevo, los huevos se sacaron de las bolsas y se asperjaron con el desinfectante por medio de un atomizador doméstico con capacidad de 250 ml, utilizando la dosis de acuerdo al fabricante, y después se colocaron en separadores de cartón corrugado esterilizados previamente por medio de luz ultravioleta para permitir el secado de los

huevos. Posteriormente, se tomó cada huevo con guantes estériles y se colocó por separado en una bolsa de plástico estéril conteniendo 9 ml de solución PBS estéril cada una, para repetirse el procedimiento descrito anteriormente para el muestreo externo de los huevos ^(Fig. 2).

6) Muestreo Interno de los huevos: En este procedimiento, el cascarón de los huevos se desinfectó con alcohol y se retiró con la ayuda de pinzas de disección y tijeras estériles, enseguida se colectaron 0.5 ml de yema con una jeringa estéril, depositándose en tubos de ensayo con 4.5 ml de solución PBS estéril cada uno y se agitaron por medio de un vortex^h para obtener una mezcla homogénea. Inmediatamente, con una asa bacteriológica, se sembró por estría continua en 1 caja de petri conteniendo TSA^a, MSA^b, McC^c y una caja de petri con agar Sabouraud^d. Los medios se incubaron a 37° C por 18 horas para efectuar la lectura como ya se describió anteriormente. En el caso del medio de Sabouraud, después de las 18 horas de incubación, las cajas permanecieron en temperatura ambiente durante 10 días más, revisando diariamente el crecimiento ^{(41) (Fig. 2)}.

Análisis Estadístico: El análisis de los datos de los resultados del muestreo del medio ambiente "antes y después" de la desinfección se comparó por medio de la prueba estadística de Kruskal-Wallis para ver la diferencia entre los medios, y se aplicó la prueba de Wilcoxon para ver la diferencia estadística entre tiempos comparado con los medios. Los datos de los resultados de la aplicación del desinfectante en la superficie del cascarón se analizaron por medio de la prueba estadística de Análisis de varianza. Los datos se transformaron con logaritmo base 2 (\log_2) ⁽⁴²⁾.

RESULTADOS

Resultados de la Evaluación del desinfectante en el ambiente de la caseta

El resultado del análisis de los datos de la carga microbial de los 3 diferentes medios de cultivo empleados muestra que no hubo una diferencia estadística significativa ($P > 0.05$)

^h Vortex-Genie, Model K-550-G, Scientific Industries, Inc, Bohemia N.Y. 11716

entre medios (TSA, MSA y McC) (cuadro 1). En el cuadro 2 se observan los resultados antes y después de la aplicación del desinfectante a base de peróxido de hidrógeno, en los que no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$).

El resultado de la recuperación fúngica de medio ambiente antes y después de la aplicación del desinfectante se muestra en el cuadro 3 y figura 3. El grupo 1 de los medios de cultivo de Sabouraud presentó la misma cantidad de colonias fúngicas antes de la desinfección y posterior a la misma (diferencia de 0). En los grupos 2, 3, 5 y 6, presentaron una mayor cantidad de colonias posterior a la desinfección del ambiente (una diferencia de -6000, -3000, -2000, -4000 respectivamente) comparados con los grupos de medios sin la aplicación del agente desinfectante. Solamente el grupo 4 presentó una reducción en el número de colonias posterior a la aplicación del desinfectante (diferencia de +71000).

Los géneros fúngicos presentes de las muestras obtenidas del ambiente posterior a la desinfección fueron los siguientes: *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Fusarium* y *Aspergillus*.

Resultados del muestreo externo

En el cuadro 4 se muestra el análisis de varianza para la característica cuenta bacteriana (\log_2) antes y después de la desinfección en 3 medios diferentes de cultivos y se encontró diferencia estadística altamente significativa entre los tiempos y entre los medios ($P < 0.01$). El resultado de las medias y su desviación estándar de cada medio se muestra en el cuadro 5. El valor real de la cuenta bacteriana en los 3 medios de cultivo se presenta en el cuadro 6, en el que se muestra que el medio de TSA presenta una mayor cantidad del valor real de la media (3635.10), posteriormente el medio de MSA (120.50) y finalmente el medio de McC con un valor de 12.87, encontrando una diferencia significativa entre medios ($P < 0.01$).

En el cuadro 7 se muestra el resultado de la media y su desviación estándar para la variable del proceso aplicación del desinfectante (antes y después). El valor real de la cuenta bacteriana del cascarón de los huevos obtenido del muestreo antes de la

desinfección versus después de la desinfección se muestra en el cuadro 8, encontrando una reducción estadísticamente significativa de 640.861 ($P < .01$).

Análisis de hongos del muestreo externo

Los datos del resultado del muestreo externo de las 42 muestras de huevos colectados se muestran en el cuadro 9. En 37/42 muestras se observó reducción en el número de colonias fungales tras la aplicación del desinfectante, de las cuales 4/42 muestras (9.52%) eliminaron en su totalidad las colonias fungales, 1/42 muestras (2.38%) se observó una reducción de colonias en un 90%, 2/42 muestras (4.76%) reducción en un 80%, 3/42 muestras (7.42%) reducción en un 70%, 6/42 muestras (14.28%) reducción en un 60%, 3/42 muestras (7.42%) reducción del 50%, 2/42 (4.76%) muestras (4.76%) reducción del 40%, 1/42 muestras (2.38%) reducción del 30%, 0/42 muestras (0%) reducción del 20%, 4/42 muestras (9.52%) reducción del 10%, 9/42 muestras (21.42%) reducción de menos del 10% y finalmente 2/42 muestras (4.76%) presentaron una reducción menor al 1% de la cantidad de colonias fungales posterior a la aplicación del desinfectante.

Solo 3/42 muestras (7.42%) mostraron la misma cantidad de colonias antes y después de la aplicación del desinfectante. Dos de 42 muestras (4.76%) presentaron mayor cantidad de colonias posterior a la desinfección (aumento del 20% y 40%, respectivamente) ^(Figuras 4, 5 y 6).

Los géneros fungales presentes de las muestras obtenidas del muestreo externo posterior a la desinfección: *Penicillium*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Rhizopus* y *Fusarium*.

Resultados del muestreo interno de huevo

De las 42 muestras de yema obtenidas y analizadas, 19 fueron positivas para crecimiento bacteriano (10 bacterias Gram positivas (23.80%) y 9 Gram negativas (21.42%) en una

muestra (2.38%) se observó un hongo (*Penicillium*) y en 22 muestras (52.38%) no se observó crecimiento alguno ^(Figura 7).

DISCUSIÓN

Los sistemas intensivos en la producción avícola, obligan a que exista una alta eficacia a través de la óptima incubabilidad, la viabilidad del pollito y su posterior desarrollo. Dentro de los principales parámetros en una parvada de aves reproductoras se encuentra la incubabilidad y los parámetros de fertilidad, los cuales pueden ser afectados por la contaminación microbiana presente en el cascarón del huevo inherente a la infraestructura de las casetas de alojamiento, en combinación con piso de slats y las fosas de concentración de excretas, lo que puede producir una depresión en la incubación y el parámetro de fertilidad comparada con el potencial genético ⁽³⁶⁾.

Medio Ambiente de la Caseta

Se ha reportado que el ambiente de una caseta avícola con un sistema de alojamiento de piso con cama está muy contaminado con una gran variedad de microorganismos que pueden causar enfermedad en las poblaciones de aves. Estas poblaciones microbianas pueden ser aerotransportadas, extendiéndose fácilmente a lo largo de la caseta por la actividad de los empleados y de las corrientes de aire, contaminando las superficies que pueden estar en contacto el huevo. Se ha establecido una relación directa entre los microorganismos aerotransportados y la cantidad de contaminación que aparece en varias superficies de la incubadora ⁽¹⁸⁾. En investigaciones efectuadas por Ernest y Gardner, citados por Sheldon y Brake (1991), determinaron durante un estudio en la calidad aérea de una planta incubadora, que el 57% de los microorganismos aislados son de tamaño respirable (<5 µm) y pueden aplicarse en el desarrollo de enfermedades aviares epizoóticas ⁽¹⁸⁾. Se ha sugerido por tanto repercusiones en la producción debido a la contaminación del sistema en que las aves son alojadas. En una comparación de la carga microbiana entre el sistema de piso de alambre y el de piso con cama, Quarles y Gentry (1970), reportaron que en 3 casetas con piso con cama evaluadas excedieron las 10,000 bacterias por pie cúbico de aire, mientras que en las casetas que contaban con piso de alambre se obtuvieron conteos de únicamente 2,660, 2,060 y 2,970.

Estas diferencias fueron altamente significativas ($P < 0.01$). Los hongos por pie cúbico de aire variaron ampliamente de caseta a caseta entre ambos tipos de instalaciones, pero las diferencias no fueron significativas (97, 164, 353 en piso con cama y 105, 174, 94 en piso de alambre)⁽⁷⁾, por esta variable se eligió evaluar al H_2O_2 en una caseta con piso de cama del C.E.I.E.P.A. de la F.M.V.Z. En los 6 grupos de los medios de cultivo de TSA, MSA y McC distribuidos en la caseta no se cumplieron los supuestos para hallar una diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) entre las medias mediante la prueba estadística con la variable antes y después de la desinfección, así como no hubo diferencia entre los medios (TSA, MSA y McC). Los resultados fueron debidos posiblemente al tamaño de la muestra de la cual se obtuvieron los datos. En el caso de los medios de Sabouraud se obtuvo un número mayor de colonias fungales en 3/6 muestras después de la aplicación de la desinfección, una posible razón pudo ser que al momento de aplicar el desinfectante la maquina aspersora emitía un ruido que perturbó a las aves, provocando aleteo constante generando brisa dispersando polvo proveniente de la cama haciendo que la posible cantidad de hongos contenidos en polvo y viento se concentrara en mayor cantidad en las cajas de Sabouraud, sumando a esto, hubo fuertes corrientes de aire en la caseta proveniente del exterior, causando que el desinfectante no se distribuyera de forma homogénea y adecuada. Con respecto a lo anterior, en un estudio sobre el efecto de la humedad y la distribución del flujo del aire sobre el ambiente productivo de una parvada de una estirpe de carne, De Rezzende y Mallinson (2001), notaron que el flujo de aire indica que áreas expuestas a altas proporciones de ventilación fueron significativamente asociadas con bajo contenido de humedad, actividad de agua y a las poblaciones de *Escherichia coli* y *Salmonella*. Aunque las prácticas de ventilación variaron considerablemente entre las granjas evaluadas, una correlación parecía existir entre la proporción del movimiento del aire sobre una localización específica de la cama y la concentración del agua en la cama y por lo tanto, de las poblaciones bacterianas y micóticas presentes⁽⁴⁶⁾

La desinfección del ambiente avícola es muy importante para obtener huevo incubable de calidad, dicho ambiente involucra casetas, incubadoras y nacedoras^(19, 29). En un proyecto efectuado por Bayley y Buhr (1996), evaluaron 3 distintos protocolos de desinfección del aire de una incubadora, incluido el H_2O_2 junto con el ozono y la luz

ultravioleta. El tratamiento con H_2O_2 a una concentración de 2.5% se aplicó de 2 formas distintas; primero en 2 grupos de prueba fue distribuido por nebulizaciones 30 segundos cada 5 minutos durante los últimos 3 días de incubación (500/mL en total). Luego en la segunda aplicación se utilizaron otros dos grupos, administrando el desinfectante por microaerosol en spray con una duración de la aspersion de 1 minuto por un tiempo total de 5 minutos (100 mL/h). Después se efectuó un muestreo microbial del aire del incubador. Utilizaron placas de agar por duplicado, los cuales se colocaron por encima de la circulación de aire en los días 19.5, 20.5 y 21.5 de la incubación. Las placas de agar fueron expuestas por dos minutos cada uno. En el resultado del muestreo, estos investigadores observaron que el total de bacterias aeróbicas y enterobacterias fueron reducidas significativamente ($P < 0.05$) a menos de 10 UFC en el tratamiento con peróxido de hidrógeno comparado con el grupo control y entre los otros grupos de desinfectantes (ozono y luz ultravioleta). En esta evaluación, el H_2O_2 al 2.5% fue más efectivo por el rápido movimiento aéreo a través del gabinete, logrando un contacto estrecho con las distintas fuentes de las bacterias al distribirse las gotas del microaerosol, resultando en una destrucción significativa de los microorganismos ⁽⁴⁴⁾. Sin embargo, en el presente estudio, utilizando una caseta de piso con cama el H_2O_2 no redujo la cuenta bacteriana en los medios de cultivos distribuidos en la caseta durante la evaluación de la eficacia en la reducción de la carga bacteriana posterior a la aspersion del desinfectante.

Un factor importante en la utilización del desinfectante es la forma en que éste se aplique. En una investigación realizada por Shane y Faust (1996), evaluaron 4 diferentes desinfectantes incluido el H_2O_2 al 1.5% a través de la aspersion de éstos sobre el cascarón de huevos fértiles incubables contaminados con un inóculo de *Escherichia coli*. El peróxido de hidrógeno logró una completa desinfección de la superficie del cascarón (100%), en contraste con la solución de ortofenol (99.82%), una solución experimental de componentes oxialogénicos (99.52%) y de una solución clorinada (98.65%) en la contaminación por *Escherichia coli*, respectivamente ⁽⁴⁵⁾. Sin embargo estos resultados no coinciden con lo descrito por Cox *et al.*, (1994), donde al evaluar el H_2O_2 al 1.4% junto con otros 12 desinfectantes por medio de una maquina aspersora automática, el peróxido de hidrógeno solamente redujo el 60% de las muestras comparado con el grupo control asperjado con agua ⁽⁴⁶⁾. En otro estudio Cox *et al.*, (1998), variaron la forma de aplicación (método de

inmersión) con un inoculo de *Salmonella* extendido por encima del cascarón del huevo y con diferentes tiempos de secado posterior de la inoculación (1 minuto, 5 minutos, 4 horas y 24 horas), evaluaron al H₂O₂ a dos diferentes concentraciones (0.5% y 1.0%) junto con otros dos desinfectantes. Determinaron que con una alta concentración, el desinfectante fue más efectivo con respecto a la menor concentración para reducir el número de huevos positivos a *Salmonella*. Con el tiempo de 1 minuto de secado, el fenol al 0.78% redujo el número de huevos positivos a *Salmonella* en un 80%, comparado con el grupo control inmerso en agua. El peróxido de hidrógeno al 1% resultó en un 85% de reducción y el hidrocloruro de polihexametilenebiguanida (PHMB) al 0.05% en un 93% de reducción. Sin embargo, conforme el tiempo se prolongaba entre el tratamiento y la inoculación, la efectividad de los tres químicos se reducía. 24 horas (1440 minutos) después de la inoculación, el fenol al 0.78% no redujo la cuenta bacteriana; el H₂O₂ presentó una reducción del 25% (a ambas concentraciones) y el PHMB tuvo únicamente un 12% de reducción ⁽⁴⁵⁾.

Muestreo externo del cascarón

En este estudio utilizando un aspersor comercial con una concentración de peróxido de hidrógeno 1:10,000, se logró reducir significativamente las UFC bacterianas de los huevos colectados de piso ($P < 0.01$). Este resultado coincide con la deducción de Cox *et al.*, (2002) que obtuvieron una significativa eliminación de *Salmonella typhimurium* en un 93% de los cascarones de los huevos fértiles incubables utilizando un aspersor comercial ⁽⁶³⁾. Durante el muestreo externo del cascarón del huevo, algunas muestras del presente estudio mostraron cuentas de 3.4×10^8 en la que la mayor fuente de procedencia fueron las heces. Dicha carga puede estar constituida por una gran diversidad de microorganismos bacterianos Gram positivos, Gram negativos y fungales ^(7, 13, 16). En el estudio realizado por Gentry y Quartes (1971), colectaron huevo de una estirpe leghom, mantenidas en piso de alambre. Los huevos fueron seleccionados basándose en su contaminación total y clasificada como limpios, parcialmente sucios y sucios. Los huevos limpios no tuvieron evidencia visible de la presencia de áreas sucias o de contaminación fecal. Los huevos parcialmente sucios son aquellos que mostraron delgadas líneas como resultado por el contacto con el alambre sucio bajo el área de los nidos. Los huevos sucios fueron aquellos que tenían 2 o más pequeñas áreas manchadas en el cascarón debido al contacto con la materia fecal. El promedio del conteo bacteriano de los huevos limpios fue únicamente de 3.2×10^2 , los

huevos sucios mostraron un porcentaje de conteo de 2.7×10^3 y los huevos clasificados como sucios, que tenían unas pequeñas áreas manchadas por contacto con el excremento, tuvieron un promedio de conteo de 4.1×10^4 demostrando una gran carga bacteriana a pesar de estar alojadas en piso de alambre, que es un sistema en el cual pueden obtenerse un mayor número de huevos limpios ⁽⁷⁾, sugiriéndose que existe una correlación entre el conteo bacteriano del cascarón del huevo y el conteo bacteriano de la caseta ⁽⁴⁹⁾. Por otro lado, Sheldon y Brake (1991), para simular la carga microbial presente en huevos fértiles incubables, utilizaron microorganismos como *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Proteus* spp, *Aspergillus niger*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (seleccionados debido a que estos microorganismos han sido asociados a enfermedades de las aves y/o porque podrían limitar potencialmente la incubabilidad del huevo fértil por la penetración a través del cascarón), con una concentración de 10^6 a 10^7 UFC/mL en el caso de las bacterias y de 10^4 a 10^5 UFC/mL en el caso del hongo utilizado ⁽¹⁶⁾.

Aislamiento de Hongos

En el muestreo externo, se obtuvo una reducción en el número de hongos después de la aplicación del desinfectante a base de peróxido de hidrógeno 1:10,000 en 37 de 42 muestras de cascarón de los huevo (88.02%). Al respecto en estudios acerca de la inactivación microbial, Sheldon y Brake (1991), evaluaron a varios organismos incluido el *Aspergillus niger*. Las esporas de *Aspergillus niger* fueron significativamente más resistentes al H_2O_2 que las células vegetativas de las bacterias, pero estaban significativamente reducidas en un 98.7% después de 35 minutos de exposición al H_2O_2 . La aparente resistencia de las esporas fúngicas al H_2O_2 esta asociado con la resistencia de la cobertura de la spora que rodea el protoplasma ⁽¹⁶⁾.

Cox *et al.*, (2002), mencionaron que una de las características para el éxito en la utilización de un desinfectante es la capacidad de actuar en presencia de materia orgánica. Por lo anterior, el ó los agentes antibacteriales que son usados para desinfectar a los huevos fértiles deben de tener un contacto químico directo ⁽⁴⁸⁾. Al respecto, Brake y Sheldon (1990), mencionan que la limpieza de la superficie del cascarón sugiere el nivel de coliformes presentes. La cantidad de materia presente en la superficie del huevo en el

momento de la desinfección influye directamente en la efectividad del desinfectante ⁽⁶²⁾. En la mayoría de los trabajos de investigación en donde han utilizado huevos limpios de nido, se ha revisado la presencia de fracturas, roturas y deformidades, además, se ha retirado la presencia de todo material de cama, situación que en el presente estudio no se llevó a cabo.

En un estudio sobre el funcionamiento de varios desinfectantes incluido el H₂O₂ en presencia de materia orgánica y contaminación por *Salmonella typhimurium*, el desinfectante a una concentración de 1.4% fue probado por separado con una mezcla con 10 mL de un "enjuague de gallina" (obtenido por agitación una canal en una bolsa con 100 mL con agua estéril); una mezcla del desinfectante con 10 mL de heces de una gallina estirpe leghorn previamente autoclaveadas (una parte excremento y una parte de agua); y desinfectante mezclado con 10 mL huevo fresco. Como resultado se observó que el enjuague y el excremento interfirieron con la acción del H₂O₂, y el inóculo de *Salmonella typhimurium* no fue destruido. El H₂O₂ se inactivo por el excremento seguido posteriormente por el enjuague de ave. El resultado de la recuperación es fácilmente explicable por la carga orgánica que ha vuelto parcialmente inactivo a los químicos, que llevaron a una reducción, pero no a una muerte total de *Salmonella*. Los niveles de contaminantes usados en este estudio fueron considerados altos. La actividad del H₂O₂ no se afectó con la mezcla de huevo ⁽³¹⁾. En muchas ocasiones, la eficacia del desinfectante ante la presencia de materia orgánica se disminuye, posiblemente a que el compuesto puede absorberse por proteínas coloidales, por la formación de compuestos inertes o menos activos o por la unión de compuestos a grupos activos de proteínas extrañas ^(38, 62).

Muestreo Interno del huevo

Menciona la literatura que un huevo fresco recién puesto está húmedo, caliente y susceptible a la rápida penetración por los microorganismos ⁽⁴³⁾, en relación con esto Padrón (1995) menciona que *Salmonella typhimurium* puede penetrar el cascarón y las membranas internas en un tiempo de 6 minutos posterior a la exposición ⁽⁵⁰⁾. Con relación a los resultados del muestreo interno del huevo a partir del cultivo de yema, 9 de 42 muestras (21.42%) fueron microorganismos Gram positivos (*Staphylococcus* sp.); al respecto, se ha descrito que las bacterias del género *Staphylococcus* poseen la capacidad de

desintoxicarse a través de la producción de la enzima catalasa, ya que esta tiende a inactivar al H_2O_2 ^(36, 37) mecanismo por el cual posiblemente esta cantidad de microorganismos sobrevivió y pudo alcanzar la yema. Sin embargo, Sander y Wilson (1999), utilizaron al *Staphylococcus aureus* en la contaminación del ambiente de una incubadora y huevo fértil incubable, y observaron una reducción significativa en el recuento de bacterias en la planta de incubación cuando fue asperjado con peróxido de hidrógeno al 3% comparada con el grupo control que fue asperjado con agua. Posteriormente en los cultivos de saco vitelino de pollitos de 1 día de edad, la incidencia de contaminación del saco vitelino fue de 35% a 80% sin diferencias significativas entre los grupos control (tratado con agua) y el tratado con H_2O_2 . Tanto los pesos corporales y los pesos de los sacos vitelinos eran numéricamente mayores en los pollitos incubados de huevos tratados con H_2O_2 cuando se compararon con los controles no expuestos, pero esta diferencia no era estadísticamente significativa. Al parecer, de acuerdo a estos investigadores, la cantidad de catalasa producida por el *Staphylococcus aureus* no fue la suficiente como para inactivar al H_2O_2 . Amin y Olson (citados por Sander y Wilson) mencionan que existen varios grados de susceptibilidad al H_2O_2 ⁽²⁴⁾.

Por otro lado, en el presente estudio 6 de 42 muestras (14.28%) fueron positivas para *Escherichia coli*; al respecto, en un trabajo realizado por Shane y Faust (1996), aislaron a *Escherichia coli* del saco vitelino de huevos fértiles incubables inoculados a los 16 días posterior al tratamiento de desinfección del cascarón de huevos tratados con peróxido de hidrógeno al 1.5%, sugiriendo que aunque la invasión del cascarón puede inactivarse rociando la superficie del huevo con un desinfectante (en este caso H_2O_2), la penetración del cascarón por motilidad de la *Escherichia coli* puede ocurrir antes de la aplicación de una solución antibacterial. Los organismos también pueden ser protegidos por los poros durante la desinfección y pueden ser responsables de la subsiguiente infección en el interior del huevo. La presencia de un organismo potencialmente patógeno dentro del saco vitelino de embriones de 16 días de incubación confirmó la penetración del cascarón además de las membranas internas y externas, de aquí la posible razón de la presencia de *Escherichia coli* en saco vitelino ⁽⁹⁶⁾. Board, citado por Padrón (1995), informó de un retraso de 20 días entre la penetración bacteriana del cascarón y multiplicación en el contenido del huevo, quizás porque las membranas del cascarón proporcionan una barrera mecánica

contra la invasión microbiana y/o por el efecto antimicrobial de la albúmina ⁽⁶⁰⁾. Debido a que ésta es rica en lisozima, que es una proteína difícilmente utilizable para la nutrición de las bacterias y que posee la propiedad de lisar las paredes como se ha reportado con las bacterias Gram positivas, a través de la hidrólisis de enlaces β -1,4-glucosídicos ⁽¹³⁾. Por lo anterior, se admite que el hecho de no encontrar bacterias Gram positivas en los huevos es debido a su sensibilidad a la lisozima ⁽⁴⁾. Por otro lado, se menciona que de las membranas testáceas, la membrana interna es la más eficaz debido a la cantidad de lisozima que posee ^(4,13).

Aislamiento de Hongos del muestreo interno

En el muestreo interno a partir de yema, en este estudio solo se aisló un hongo (*Penicillium*) (representando el 2.38%), cuyas esporas posiblemente penetraron antes de la desinfección del cascarón.

Cabe mencionar que en muchos estudios llevados a cabo con el H₂O₂ han coincidido que el peróxido de hidrógeno no afecta el desarrollo del embrión ^(15, 24, 46, 50), sin embargo también han mencionado que el H₂O₂ ha causado una gran pérdida de humedad, la cual no influye en la incubabilidad de los huevos tratados ^(15, 24). Aunque Scott y Swetnam (1993), en una evaluación de agentes desinfectantes para huevo incubable y su relación con el medio ambiente reportaron que los huevos tratados con H₂O₂ al 35.0% tuvieron una pérdida de humedad superior a los tratados con formaldehído y mostraron una apariencia blanquecina, la cual es indicativa de una reacción con el cascarón. La mayor pérdida de humedad fue observada en el grupo de huevos tratados con el H₂O₂ y esta apariencia blanquecina puede indicar que parte del cascarón se está disolviendo, aumentando así la porosidad del mismo y la pérdida de humedad del contenido del huevo, lo que se traduce en una reducción en el número de nacimientos. Una reacción química entre el H₂O₂ y el carbonato de calcio del cascarón puede reducir significativamente la disponibilidad del desinfectante y su efectividad sobre los microorganismos ⁽³⁴⁾. Esto coincide con lo obtenido por Dickens y Whitmore (1997), quienes observaron en una evaluación del efecto de H₂O₂ en la calidad microbiológica de las canales de aves superior a la evisceración que posterior a la aplicación del desinfectante, la piel de las canales

tratadas presentaban una apariencia blanquecina, hinchada y friable. Los autores piensan que estos cambios pudieron ser debidos a la concentración y tiempo de contacto del desinfectante ^(B4).

Conclusiones.

- 1) Con el desinfectante a base de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) empleado en este estudio, no se observó reducción de la carga microbiana del ambiente de una caseta de aves reproductoras estirpe Hy-line W 36 alojadas en piso.
- 2) Se obtuvo aislamiento bacteriano del muestreo externo de 19 de las 42 muestras y un hongo.
- 3) Se observó una diferencia estadísticamente significativa en la cuenta microbiana de los cascarones de los huevos posterior a la aplicación del peróxido de hidrógeno.
- 4) En los hongos se observó una reducción numérica en el número de colonias posterior a la aplicación del desinfectante aplicado en los huevos.

LITERATURA CITADA

- (1) De Anda MC, Tendencias Comerciales del Huevo y de sus productos en México. Memorias del Seminario "Mitos y Realidades sobre el consumo del huevo"; 2003 Febrero 20-21; México (D.F.), Instituto Nacional de Nutrición "Salvador Zubirán", 2003.
- (2) Alonso PF. Producción y Consumo en México de huevo para plato en el período 1990-1999. Jornadas Médico Avícolas; 2002, Febrero 20-22, Ciudad Universitaria, México (D.F.), 2002.
- (3) Stadelman JW, Cotterill JO. Egg Science & Technology, 2th Edition, United States of America, Connecticut: Avi Publishing Company, 1977.
- (4) Board R. and Fuller R. Microbiology of the Avian Egg. United Kingdom; London, Chapman & Hall, 1994.
- (5) Buxadé CA. La gallina ponedora, 2a Edición, España, Madrid, Mundi Prensa, 2000.
- (6) Juli M. Avicultura. 2ª Edición, México, D.F: Hispanoamericana, 1963.
- (7) Quarles CL, Gentry RF, Bressler M. Bacterial contamination in poultry houses and its relationship to egg hatchability. Poultry Sci 1970; 49: 60-66.
- (8) Hernández X. Producción de Huevo para plato. En: Rivera O, Zavala J. Editores. Sistema de Producción Animal II volumen I. División Sistema Universidad Abierta y Educación a Distancia, UNAM-FMVZ, 1999; 89-97.
- (9) Sauveur B. El Huevo para consumo: Bases productivas, España, Madrid, Mundi-Prensa, 1993.
- (10) Jay J. Microbiología Moderna de los Alimentos, 2ª Edición, España, Barcelona, Acribia, 1980.
- (11) Pascual MR. Microbiología Ambiental; Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas, España, Madrid: Díaz de Santos, 1992.
- (12) Peebles ED, Brake JE. The role of the cuticle in water conductance by the eggshell of broiler breeders. Poultry Sci. 1986; 65: 1034-1039.

- (13) Board RG The Microbiology of Egg. In. Stadelman WJ, Cotterill OJ, Editors. Egg Science and Technology, 2th Edition, Connecticut, Avi publishing company, 1977: 49-63.
- (14) Castello JA. La Producción del Huevo, España, Barcelona, Real Escuela de Avicultura, 1989.
- (15) Sheldon BW, Brake J. Hydrogen Peroxide as an alternative hatching egg disinfectant. Poultry Sci. 1991; 70 1092-1098.
- (16) Orendain C. El huevo y la nutrición. Memorias del Seminario "Mitos y Realidades sobre el consumo del huevo"; 2003 Febrero 20-21; México (D.F.), Instituto Nacional de Nutrición "Salvador Zubirán",2003.
- (17) Quintana JA. Avitécnica; Manejo de las Aves Domésticas más comunes, 3ª Edición, México, D. F. Trillas, 1999.
- (18) Sainsbury D. Aves, Sanidad y Manejo, España, Zaragoza: Acribia, 1980.
- (19) Quarles CL, Caveny DD. Effect of air contaminants on quality broilers. Poultry Sci 1979; 58: 543-548.
- (20) Cabriales J. Manejo del Huevo fértil. En: Hernández X, Pérez S, Rivera O, Editores. Mejoramiento Genético. División Sistema Universidad Abierta y Educación a Distancia, UNAM-FMVZ, 1999: 15-23.
- (21) Mokgata RM, Gouws PA, Brözel VS. Mechanisms contributing to hypochlorous acid resistance of Salmonella isolate from a poultry processing plant. J. Appl. Poultry Res. 2002; 92: 566-573.
- (22) North M, Bell, D. Manual de Producción Avícola, 3ª Edición, México, D.F: Manual Moderno, 1993.
- (23) Padrón M. Factores que influyen la Penetración de Bacterias en el Cascarón, Iº Curso de Manejo en la Prevención de Problemas Aviares, México, Ciudad Universitaria, México, D. F: 1989.
- (24) Sander JE, Wilson JL. Effect of hydrogen peroxide disinfection during incubation of chicken eggs on microbial levels and productivity. Avian diseases 1999; 43: 227-233.

- (25) Pacheco GO. Control Microbiológico y Micológico en incubadoras, alimentos y productos biológicos empleados en avicultura. Memorias del V congreso avícola del Istmo Centroamericano; 1980 Noviembre 25-28; Managua (Nicaragua) Nicaragua, Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 1980: 1-6.
- (26) Chute H, Richard J. Aspergillosis. In: Calnek W, Ed. Diseases of Poultry, 10th Edition, Iowa; Iowa State University Press, 1997.
- (27) Francesc L, Roca E, Callis M. Higiene y Patología de las Aves, España, Barcelona: Real Escuela de Avicultura, 1991.
- (28) Barnes J, Gross B. Colibacilosis. In: Calnek W, Ed. Diseases of Poultry, 10th Edition, Iowa; Iowa State University Press, 1997.
- (29) Del Muro CI. Manejo del huevo incubable. Memorias del ciclo de conferencias: Importancia de la incubación en la producción avícola; 1979 Septiembre 7-8; D.F. (México) México, Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 1979: 29-33.
- (30) Rubio M. Bioseguridad en granjas Reproductoras y plantas incubadoras. En: Hernández X, Pérez S, Rivera O, Editores. Mejoramiento Genético. División Sistema Universidad Abierta y Educación a Distancia, UNAM-FMVZ 1999:15-23.
- (31) Bailey JS, Cox NA, Berrang ME. Bactericidal treatment of hatching eggs III. Effect of organic contaminants on efficacy of egg sanitizers. J. Appl. Poultry Res. 2001; 10: 117-120.
- (32) Cox NA, Berrang ME, Buhr RS, Bailey JS. Bactericidal treatment of hatching eggs II. Use of chemical disinfectants with vacuum to reduce Salmonella. J. Appl. Poultry Res. 1999; 8: 321-326.
- (33) Wineland M. Spray Sanitizing Hatching Eggs. PS Facts # 23. 1998 May [cited 2003 Jan1]. Available from URL:<http://angelfire.com/scifi/raydlipino/desinfeccionhuevosfertiles.html>
- (34) Scott TA, Swetnam C. Screening sanitizing Agents and methods of application for hatching eggs I. Environmental and user friendliness. J. Appl. Poultry Res. 1993; 2: 1-6.
- (35) Shane SM, Faust A. Evaluation of sanitizers for hatching eggs. J. Appl. Poultry Res. 1996; 5: 134-138.

- (36) Block SS. Disinfection, Sterilization and Preservation, USA, Philadelphia: Lea & Febiger, 1991.
- (37) Suárez GF, Pérez MJ. Bacteriología General, Principios Químico Biológicos, México, D.F. FMVZ-UNAM, 1990.
- (38) Gobierno del Distrito Federal. Características Geográficas y Demográficas de la Delegación Tláhuac. Delegación Tláhuac.: 1999 [citado 2003 Marzo 21] Tomado de URL: http://www.tlahuac.df.gob.mx/n_delegacion/localizacion.html
- (39) Moreno ME. Manual para la Identificación de hongos en granos y sus derivados, México, D.F: Universidad Nacional Autónoma de México, 1988.
- (40) Gentry RF, Quartes CL. The measurement of bacterial contamination on eggshells. Poultry Sci 1972; 51: 930-933.
- (41) Richard JL, Beneke ES. Mycoses and Mycotoxicoses. In: Graham H, Lawrence H, Domermuth C, Pearson JE. Editors. A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, 3th Edition, Dubuque, Iowa; Kendall/Hunt Publishing, 1989.
- (42) Daniel WW. Bioestadística; Base para el Análisis en Ciencias de la Salud, 4^a Edición, México, D.F: Limusa-Wiley, 2002.
- (43) Cox NA, Bailey JS, Berrang ME. Bactericidal treatment of hatching eggs I. Chemical immersion treatments and Salmonella. J. Appl. Poultry Res. 1998; 7: 347-350.
- (44) Bailey JS, Buhr RJ, Cox NA, Berrang ME. Effect of hatching cabinet sanitation treatments on Salmonella cross-contamination and hatchability of broiler eggs. Poultry Sci. 1996; 75: 191-196.
- (45) De Rezzende EL, Mallison ET, Tablante NL, Morales R, Park A. Effect of Dry litter and airflow in reducing Salmonella and Escherichia coli populations in the broiler production environment. J. Appl. Poultry Res. 2001; 10: 245-251.
- (46) Cox NA, Bailey JS, Berrang ME, Burh RJ, Mauldin JM, Chemical Treatment of Salmonella contaminated fertile hatching egg spray sanitizing machine. J. Appl. Poultry Res. 1994; 3: 26-30.

- (47) Ramnesh N, Joseph SW, Carr LE, Douglass LW, Wheaton FW. Evaluation of chemical disinfectants for the elimination of Salmonella biofilms from poultry transport containers. Poultry Sci. 2002; 81: 904-910.
- (48) Cox NA, Berrang ME, Bailey JS, Stem NJ. Bactericidal treatment of hatching eggs V. Efficiency of repetitive immersions in hydrogen peroxide or Phenol to eliminate Salmonella from hatching eggs. J. Appl. Poultry Res. 2002; 11: 328-331.
- (49) Berrang ME, Frank JF, Buhr RJ, Bailey JS, Cox NA, Mauldin J. Eggshell characteristics and penetration by Salmonella through the productive live of broiler breeder flock. Poultry Sci 1998; 77: 1446-1450.
- (50) Padrón M. Egg dipping in hydrogen peroxide solution to eliminate Salmonella typhimurium from eggshell membranes. Avian Diseases 1995; 3: 627- 630.
- (51) Adler HE, D^aMassa JA. Studies on egg disinfection. Poultry Sci. 1979; 59: 799-806.
- (52) Brake J. Sheldon BW. Effect of a Quaternary Ammonium sanitizer for hatching egg on their contamination, permeability, water loss, and hatchability. Poultry Sci. 1990; 69: 517-525.
- (53) Cox NA, Mouldin Jm, Kamararaj R, Musgrove MT. Ability of hydrogen peroxide and Timsen to eliminate artificially inoculated Salmonella from fertile broiler eggs. J. Appl. Poultry Res. 2002; 11: 266-269.
- (54) Dickens JA. Whittemore AD. Effects of acetic acid and hydrogen peroxide application during defeathering on the microbiological quality of broiler carcasses prior to evisceration. Poultry Sci 1997; 76: 657-660.
- (55) Fueng-li K, Carey JB, Ricke SC. Peroxidase catalyzed chemical dip eggshell surface contamination and hatching. J. Appl. Poultry Res. 1996; 5: 5-13.

Cuadro No 1. Resultados de las medias obtenidas a partir de los tres diferentes medios de cultivo empleados para la cuenta bacteriana del ambiente de una caseta de aves antes y después de la desinfección.

Medio	Media	Desviación estándar
McC	18.416667	29.755192
MSA	17.666667	29.755192
TSA	19.416667	29.755192

Cuadro No 2. Resultados de las medias obtenidas en los 2 diferentes tiempos del ambiente de una caseta de aves muestreados antes y después de la desinfección.

Tiempo	Media	Desviación estándar
Antes	18.027778	31.560147
Después	18.972222	31.560147

Cuadro No 3. Resultados del crecimiento fungal obtenidos en el medio Sabouraud antes y después de la aplicación del desinfectante en el medio ambiente de una caseta de aves.

Grupo	Número de colonias fungales antes de la desinfección	Número de colonias fungales después de la desinfección
1	600	600
2	3000	9000
3	5000	8000
4	80000	9000
5	6000	8000
6	3000	7000

Cuadro No 4. Resultado del análisis de varianza para la característica cuenta bacteriana (\log_2) antes y después de la desinfección del cascarón del huevo en 3 diferentes medios de cultivo empleados.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados
Medio	2	2824.05**
Tiempo	1	956.83**
Error estándar	248	

**Altamente significativo $P(< 0.01)$

Cuadro No 5. Resultados de las medias obtenidas a partir de los tres diferentes medios de cultivo empleados para la cuenta bacteriana del cascarón del huevo muestreado antes y después de la desinfección.

Medio	Media	Desviación estándar
McC	3.69 ^a	±6.06
MSA	6.91 ^b	±6.30
TSA	11.83 ^c	±5.77

a,b,c: Literales distintas indican valores estadísticamente diferentes

Cuadro No 6. Resultados obtenidos del valor real de las medias en los tres diferentes medios de cultivo empleados para la cuenta bacteriana de los huevos muestreados posterior a la desinfección.

Medio	Valor real de la cuenta bacteriana
McC	12.87
MSA	120.50
TSA	3635.10

a,b,c: Literales distintas indican valores estadísticamente diferentes

Cuadro No 7. Resultados de las medias obtenidas en los 2 diferentes tiempos de los medios de cultivo de los huevos muestreados antes y después de la desinfección.

Tiempo	Media	Desviación estándar
Antes	9.42 ^a	±7.28
Después	5.53 ^b	±5.89

a,b: Literales distintas indican valores estadísticamente diferentes

Cuadro No 8. Resultados del valor real obtenidos de los tiempos de los medios de cultivo en la cuenta bacteriana de los huevos muestreados (antes y después de la desinfección).

Tiempo	Valor real de la cuenta bacteriana
Antes	686.969
Después	46.108

Cuadro 9. Presencia del crecimiento fungal en los medios de Sabouraud antes y después de la aplicación del desinfectante sobre la superficie del cascarón.

Muestra(s)	Colonias presentes antes de la aplicación del desinfectante	Colonias presentes después de la aplicación del desinfectante	Reducción de colonias fungales (%)
1	900	500	50%
2	800	500	60%
3	900	600	60%
4	8000	500	-10%
5	900	700	80%
6	1000	500	50%
7	800	600	70%
8	8000	60	-1%

Muestra(s)	Colonias presentes antes de la aplicación del desinfectante	Colonias presentes después de la aplicación del desinfectante	Reducción de colonias fungales (%)
9	900	700	70%
10	800	500	60%
11	800	50	-10%
12	900	600	60%
13	8000	600	-10%
14	1100	70	-10%
15	8000	50	-1%
16	1000	600	60%
17	800	500	60%
18	900	500	50%
19	1000	60	-10%
20	500	600	+20%
21	600	600	0%
22	700	100	10%
23	700	600	80%
24	600	70	10%
25	500	500	0%
26	500	700	+40%
27	8000	400	-10%
28	1000	100	10%
29	900	90	10%
30	8000	200	-10%
31	1000	300	30%
32	900	400	40%
33	9000	400	-10%
34	1000	900	90%
35	9000	8000	80%
36	1100	1100	0%
37	500	200	40%
38	600	40	-10%

Muestra (s)	Colonias presentes antes de la aplicación del desinfectante	Colonias presentes después de la aplicación del desinfectante	Reducción de colonias fungales (%)
39	600	0	100%
40	700	0	100%
41	9000	0	100%
42	300	0	100%

Figura 1: Diagrama de Flujo del Muestreo del ambiente

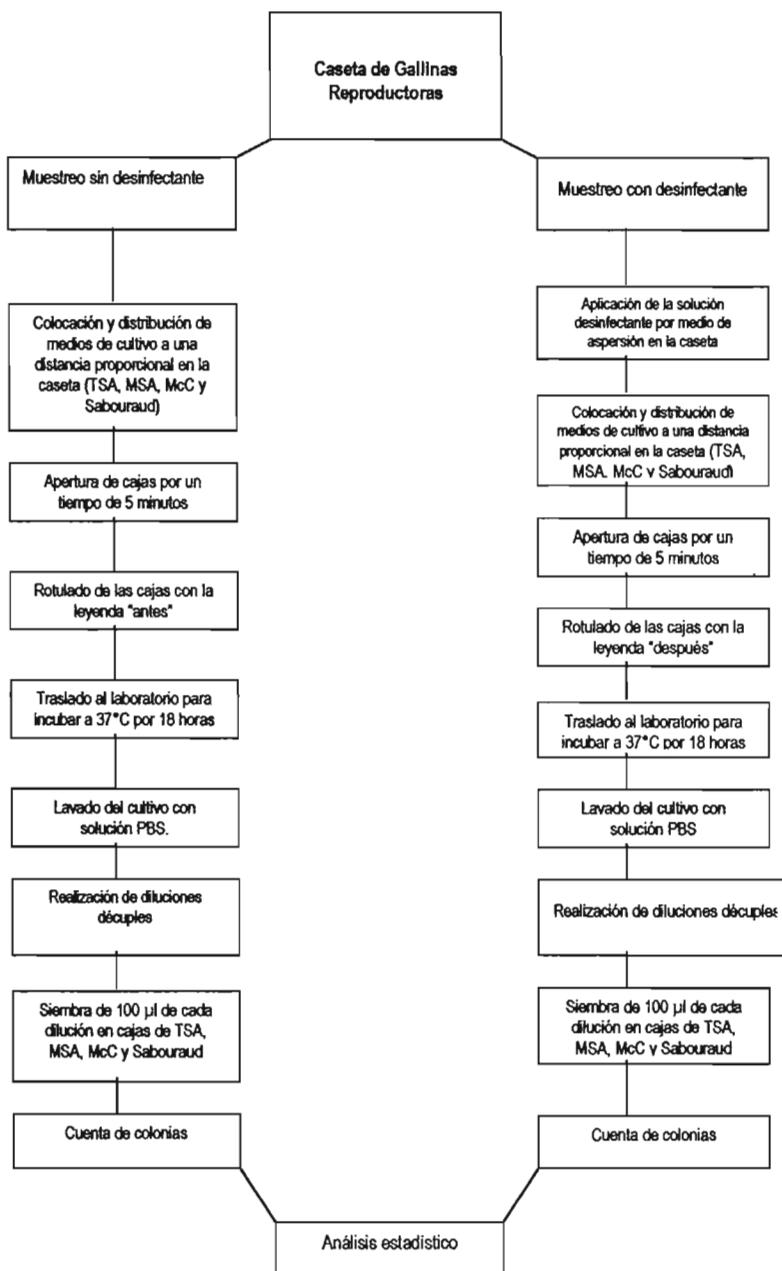


Figura 2: Diagrama de Flujo del Muestreo Externo e Interno de Huevo de Pavo

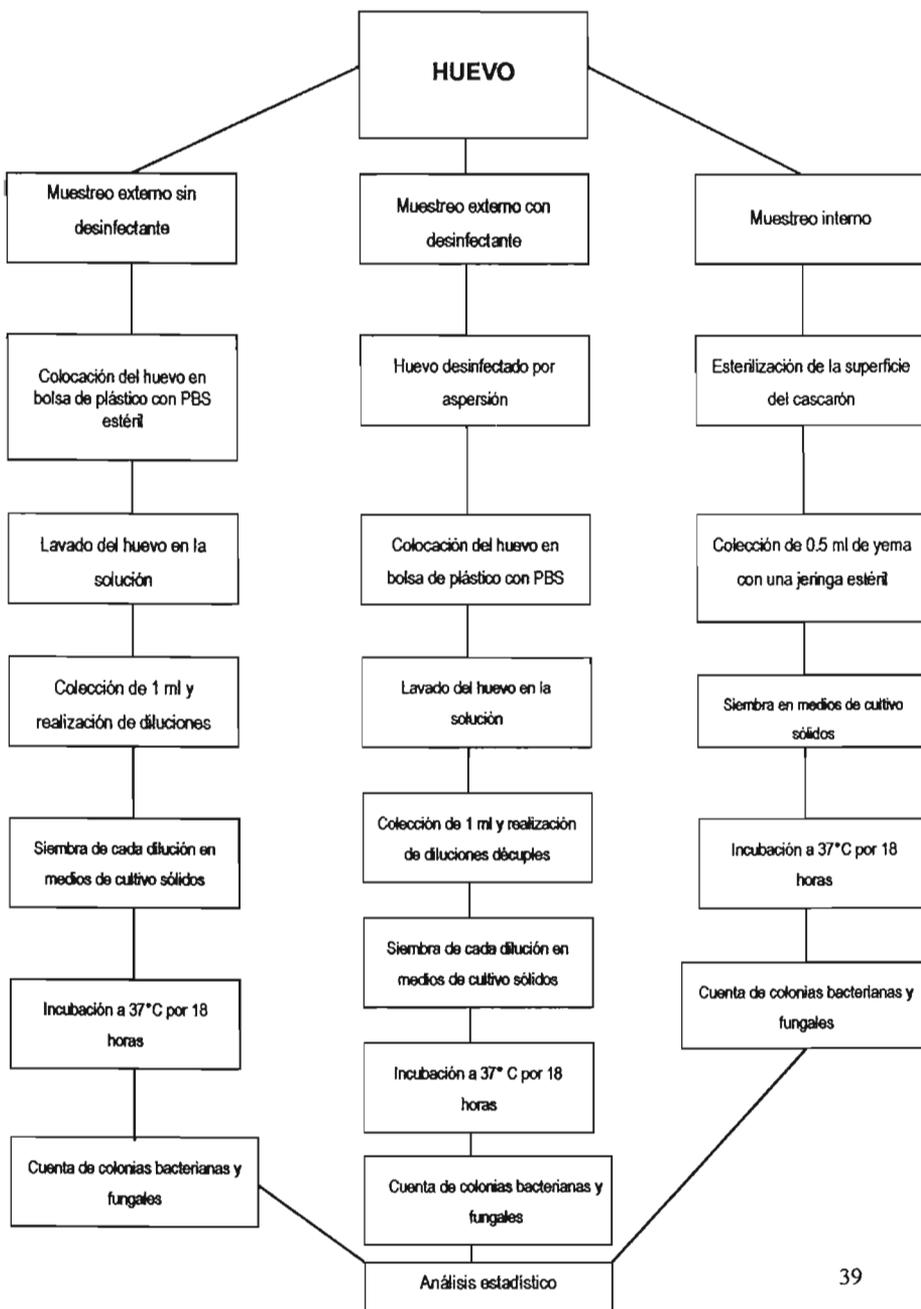


Figura 3: Comparación de las colonias fungales presentes en el ambiente de una caseta de aves antes y después de la aplicación del desinfectante con base en peróxido de hidrógeno

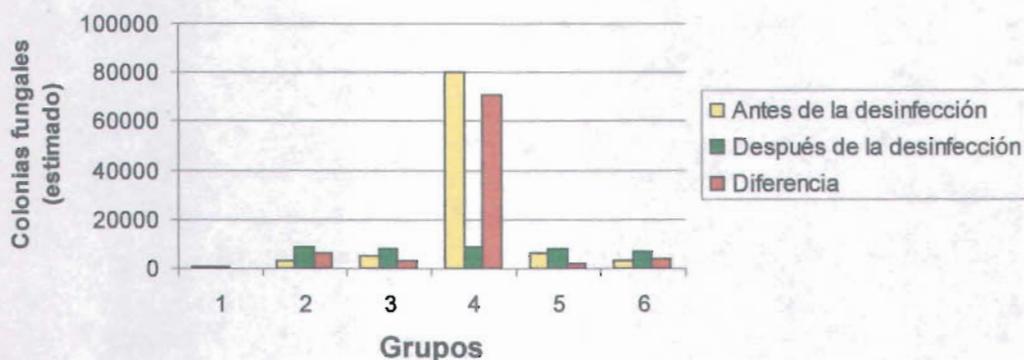


Figura 4: Comparación de colonias fungales presentes antes y después de la desinfección del cascarón del huevo con un desinfectante con base en peróxido de hidrógeno.

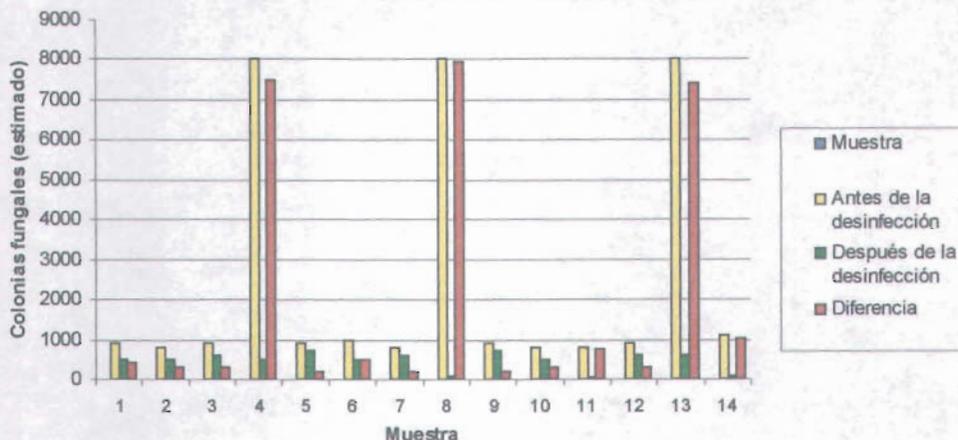


Figura 5: Comparación de colonias fungales presentes antes y después de la desinfección del cascarón del huevo con un desinfectante con base en peróxido de hidrógeno.

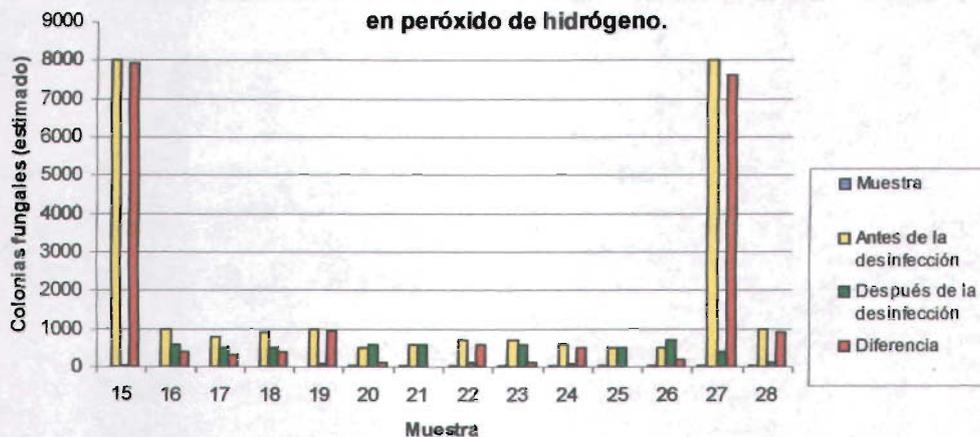


Figura 6: Comparación de colonias fungales presentes antes y después de la desinfección del cascarón del huevo con un desinfectante con base en peróxido de hidrógeno.

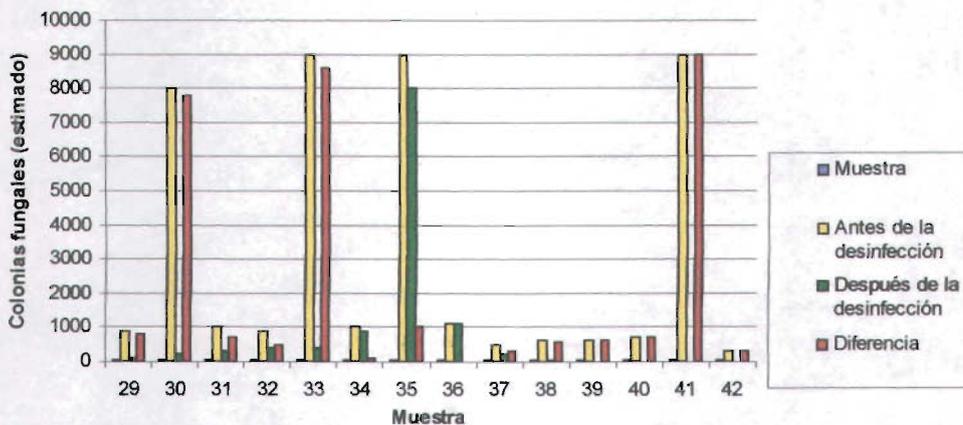


Figura 7: Porcentaje de microorganismos colectados a partir de las 42 muestras de yema.

