

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA

COMPARACIÓN MICROBIOLÓGICA DE DOS MÉTODOS DE
LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN EN CORRALES DE GRANJAS
PORCINAS

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

CATALINA TUFÍÑO LOZA

Asesores:

MVZ PhD Antonio Morilla González
M en C Laura Hernández Andrade

México, D. F.

2010



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.

DEDICATORIAS

Por mi oportunidad de existir, por su sacrificio en algún tiempo incomprendido, por su ejemplo de superación incansable, por su comprensión y confianza, por su amor y amistad incondicional, porque sin su apoyo no hubiera sido posible la culminación de este trabajo.

Por lo que ha sido y será . . . Gracias

A Dios, por haberme permitido llegar a este momento tan especial en mi vida y haberme dado salud para lograr mis objetivos, por los triunfos y los momentos difíciles que me han enseñado a valorarte cada día más, además de tu infinita bondad y amor.

A mis padres. Rosa María y Miguel, les agradezco su apoyo, guía y su confianza en la realización de mis sueños. Soy afortunada por contar siempre con su amor, comprensión y ejemplo. Esta tesis es suya.

A mis hermanas, Tere y Rosita, con mucho cariño, por la amistad y los sueños que hemos compartido y realizado.

A Adrian por su amor, su cariño, su estímulo, su apoyo constante, sus conocimientos y su gran ayuda que me brindo, que son evidencia de su gran amor. ¡Gracias!

“Paco, recuerda siempre que te amo ”.

A Itan, Karla, Ariel, Adriana e Isabel por ser unos amigos increíbles y con quienes he compartido muchos momentos que siempre llevaré en mi corazón. Ustedes han enriquecido mi vida con su cariño y alegría. Gracias por recordarme que hay personas valiosas en el mundo y gracias por estar en el mío.

A el Dr. Alejandro Vargas, Lulú, Félix, Carolina, Magda y todos las personas que han dejado huella en mi vida. Ustedes han sido fuente de alegría y muchos de ustedes fueron de

gran ayuda para terminar mi servicio social y no perder la fe en mi.

Al Dr. Alejandro Vargas, por depositar en Adrián y en mi toda su confianza, sus oportunos consejos y reflexiones que me han ayudado tanto y su continuo apoyo.

A mi prima Lucy, mi tía Leonor, mis tíos José y Gustavo, y mis abuelitos, Lucia, Manuel y Chuchito, que me acompañan siempre y me mandan todas sus bendiciones desde el cielo.

AGRADECIMIENTOS

A el Dr. Antonio Morilla y la Dra. Laura Hernández Andrade por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza, afecto y amistad, fundamentales para la elaboración de este trabajo. Gracias por creer en mi.

A la Dra. Rosalba Carreón, el Dr. Jorge López y la Dra. Amalia Martínez por su gran interés y apoyo durante toda la realización de esta tesis y su valiosa amistad.

A Isabel por su gran ayuda, consejos y enseñanzas en el laboratorio pero sobre todo su incondicional amistad.

A la Dr. Antonio Jasso y la Dra. Ruth Tejeda por todo el tiempo brindado, conocimiento y experiencia así como su confianza y paciencia para poder entrar a las granjas.

A INIFAP - Departamento de Bacteriología que me proporcionaron un lugar para el procesamiento de las muestras.

A BAYER- Sanidad Animal que me proporciono los hisopos y el luminómetro.

A todos los dueños de las granjas que nos permitieron pasar y depositaron su confianza en la Dra. Ruth, Adrian y en mi, así como a los trabajadores que nos ayudaron y nos dieron parte de su tiempo.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Limpieza y desinfección en las explotaciones de cerdos.....	2
1.2 Limpieza.....	4
1.3 Sustancias limpiadoras.....	4
1.3.1 Limpiadores alcalinos.....	5
1.3.2 Limpiadores ácidos.....	6
1.3.3 Limpiadores neutros.....	7
1.4 Otras sustancias activas y auxiliares.....	10
1.5 Métodos de limpieza.....	11
1.6 Desinfección.....	12
1.6.1 Métodos químicos.....	12
1.6.2 Métodos físicos.....	16
1.6.3 Características de los desinfectantes.....	16
1.7 Evaluación cuantitativa de la limpieza y desinfección.....	17
1.7.1 Métodos indirectos.....	17
1.7.2 Métodos directos.....	17

2. JUSTIFICACIÓN.....	20
3. HIPÓTESIS.....	21
4. OBJETIVOS.....	21
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
5.1 Granjas.....	22
5.2 Modelo Experimental.....	22
5.2.1 Sistema estandarizado.....	22
5.2.2 Sistema de la granja.....	23
5.3 Evaluación de la limpieza y desinfección.....	23
5.4 Muestreo.....	23
5.4.1 Bacteriología.....	23
5.4.2 Luminimetría.....	24
5.4.3 Petrifilm.....	24
5.5 Análisis Estadístico.....	25
6. RESULTADOS.....	26
7. DISCUSIÓN.....	34
8. CONCLUSIONES.....	41
9. REFERENCIAS.....	42

RESUMEN

TUFIÑO LOZA CATALINA. Comparación microbiológica de dos métodos de limpieza y desinfección en corrales de granjas porcinas (Bajo la dirección de MVZ, PhD Antonio Morilla González y M en C. Laura Hernández Andrade)

Debido a la problemática patológica en las explotaciones intensivas casi siempre asociada a la carga bacteriana, el objetivo de este trabajo fue comparar el grado de sanitización de dos métodos de limpieza y desinfección por medio de técnicas de análisis bacteriológico, en corrales de engorda de 5 granjas porcinas localizadas en los estados de Morelos y México. Se comparó un método estandarizado que consistió en limpieza en seco por barrido y/o raspado, lavado con agua y detergente, se enjuagó, se dejó secar, se desinfectó y se dejó secar nuevamente. El otro método fue el que se utilizaba normalmente en la granja que consistió en limpieza en seco, lavado con agua con/sin detergente y desinfección, sin importar el equipo usado, tipo de instalaciones y/o técnica. La evaluación cuantitativa consistió en el muestreo de 100cm² en comederos, bebederos, pared y piso de los corrales, antes y después de lavar y después de desinfectar para su posterior análisis bacteriológico tradicional. Además se comparó el método bacteriológico con dos pruebas rápidas para analizar el grado de contaminación: el petrifilm y la bioluminiscencia. Se encontró que no hubo diferencia estadística entre los dos métodos de limpieza y desinfección y que hubo una baja correlación entre los resultados de la bacteriología con la bioluminiscencia y el petrifilm. Se concluyó que ambos protocolos de limpieza dieron buen resultado en la sanitización de los corrales y la técnica más confiable para determinar el grado de contaminación fue la bacteriología tradicional; los métodos rápidos no funcionaron.

1. INTRODUCCIÓN

En las explotaciones ganaderas y en la producción y elaboración de alimentos de origen animal, la limpieza y desinfección ocupa desde hace mucho tiempo un lugar importante en el marco de las medidas de prevención de enfermedades e higiene general. Su importancia ha aumentado como consecuencia de la tendencia a crear grandes núcleos de explotación ganadera. Es por este motivo que es necesario disponer de información adecuada en lo referente a medidas de limpieza y desinfección.^{1,2}

La limpieza y desinfección estricta removiendo los residuos de alimento y excretas es una de las medidas que permite irrumpir los ciclos de enfermedades infecciosas y reducir el número de contaminantes existentes en el interior o en la superficie de un producto.^{3,4,5}

En este trabajo se compararon dos métodos de limpieza y desinfección de los corrales de las granjas porcinas y se evaluó el grado de desinfección por medio de pruebas bacteriológicas.

1.1 Limpieza y desinfección en las explotaciones de cerdos

La crianza de cerdos en un ambiente confinado con muchos animales hace que estos tengan una constante exposición a diversos agentes contaminantes como virus, bacterias, parásitos, hongos, polvo (partículas pequeñas de dimensiones variables que proceden del suelo, esporas, alimentos seco y cama), entre otros.¹

Cuanto más especializado es el establecimiento y mayor el número de animales, cobra mayor importancia la limpieza y desinfección entre las medidas a adoptar para preservar la salud de los animales.¹

Los microorganismos exacerbaban su multiplicación en los animales cuando estos se mantienen en malas condiciones de higiene y manejo y se difunden en grandes cantidades en las instalaciones, agua, aire y el medioambiente para tratar de colonizar nuevamente animales susceptibles. Los cerdos al estar constantemente expuestos a contaminantes microbianos, partículas, polvos, sustancias tóxicas, etc., utilizan una gran cantidad de energía y desarrollan el síndrome de la estimulación crónica del sistema inmune, que se manifiesta con retraso en el crecimiento de los cerdos, mayor deposición de grasa y consumo de alimento, menor formación de músculo, lo que provoca grupos de animales de pesos desiguales. Esta es la enfermedad más común cuando hay malas condiciones higiénicas y de manejo en la granja.^{6,7}

Para eliminar la mayor parte de los microorganismos de un alojamiento se necesita una limpieza previa. Por ello, toda sanitización de superficies e instalaciones debe regirse por la máxima: PRIMERO LIMPIAR, DESPUÉS DESINFECTAR.^{1,5}

Durante el ciclo productivo aumenta continuamente la presencia de microorganismos en los alojamientos, que se pueden ver favorecidos por una alta acumulación de animales en espacios reducidos, en quienes al ir transmitiéndose de unos a otros se incrementa su patogenicidad y aumenta la virulencia, ocasionando enfermedades.¹

Es importante recalcar que toda medida encaminada a lograr una menor aplicación de medicamentos en la producción animal, eleva la aceptación de productos animales por el público consumidor.

En la etapa de finalización del ciclo productivo de los cerdos, con limpieza y desinfecciones regulares pueden lograrse incrementos de las ganancias diarias de peso hasta

del 17% y una disminución de la mortalidad en torno al 1.5%. En la producción de lechones, se puede aumentar el número de lechones por cerda alrededor de 1.3. Aún cuando este efecto positivo depende de muchos factores, vale la pena llevarlo a cabo correctamente teniendo en cuenta a la vez un criterio consecuente en el manejo de costos y mano de obra. ¹

Para llevar a cabo la limpieza y desinfección se debe considerar la clase y calidad del material de construcción, así como la disposición de los alojamientos. Esto condiciona de forma esencial el éxito de las medidas de limpieza y desinfección. ¹

1.2 Limpieza

En lo que se refiere a la reducción de la carga microbiana existente en las superficies, con sólo la limpieza se reduce alrededor del 95%; aunque depende del tipo de suciedad, la naturaleza de las superficies, y los métodos de limpieza. ⁸

Para efectuar la limpieza de un local, se debe empezar por raspar las paredes y el piso para eliminar la materia gruesa y se barre fuera, se continúa con la humidificación del piso y paredes con un aspersor. Posteriormente se puede utilizar agua a presión para lavar y si está caliente es mejor; además es recomendable utilizar un detergente que ayude a despegar la suciedad. Una vez eliminada la suciedad se deja secar la superficie. ^{1,9}

1.3 Sustancias limpiadoras

Los limpiadores pueden clasificarse en alcalinos, ácidos y neutros (Cuadro 1), pueden ser sustancias simples o bien, mezclas de éstas con otros productos químicos como ténsidos o quelantes. ¹

1.3.1 Limpiadores alcalinos

La acción limpiadora de los álcalis se ejerce por emulsión, suspensión y saponificación pero actúan muy lentamente y sólo en determinados casos se usan como productos simples, aunque con frecuencia entran a formar parte de los desinfectantes mixtos.¹

Estas sustancias provocan la imbibición de los residuos proteicos en las superficies. Cuanto más alto es el pH, mejor es el efecto limpiador, pero también es mayor el peligro de corrosión o alteración de las superficies (sobre todo metálicas), un inconveniente es su mala capacidad emulsionante. Por ello, la grasa inicialmente disuelta se vuelve a depositar en las superficies y esto sucede también con las partículas de suciedad que no se distribuyeron suficientemente en el solvente, que es el agua. Por esta razón, se utilizan generalmente productos limpiadores mixtos, que, además de álcalis, pueden contener sales neutras, productos formadores de complejos, tensidos (aniónicos y no iónicos), así como inhibidores de espuma.¹

Las sales neutras sirven para fluidificar el producto limpiador o mantenerlo en este estado. Los formadores de complejos fijan los iones alcalino-térreos e impiden la precipitación de los responsables de la dureza del agua en soluciones alcalinas. A la vez fijan iones de metales pesados. Los tensidos (sustancias superficie activas o surfactantes) reducen la tensión superficial del agua, con lo que favorecen la penetración de ésta en la capa de suciedad y en estrechas hendiduras. Simultáneamente emulsionan la suciedad grasa y las partículas hidrófobas de suciedad presentes en la solución limpiadora.¹

Los productos limpiadores se utilizan en el lavado de los alojamientos como aditivo al agua, sobre todo para reblandecer la suciedad, para lo cual deben actuar durante cierto

tiempo humedeciendo las superficies. Este reblandecimiento abrevia notablemente la limpieza propiamente dicha que se realiza a continuación, que por lo regular se lleva a cabo con un aparato de limpieza a alta presión.^{1,4}

1.3.2 Limpiadores ácidos

Las sustancias limpiadoras ácidas se emplean sobre todo para eliminar de las superficies las sales difícilmente solubles, lo que no se consigue con limpiadores alcalinos. Estos depósitos que contienen residuos mayormente orgánicos, dificultan la limpieza y desinfección, a la vez que constituyen un medio de cultivo para las bacterias. Sólo pueden eliminarse eficazmente con ayuda de estos limpiadores que contiene ácidos orgánicos o inorgánicos.

Menos corrosivos pero a la vez de menor fuerza limpiadora, son los ácidos orgánicos, entre los se utilizan, están: el ácido cítrico, tartárico, glucónico ó sulfamínico. Éstos ácidos solubilizan pero también ejercen fuerte acción corrosiva sobre los metales; los ácidos clorhídrico y sulfúrico atacan incluso los metales nobles. Para reducir el efecto corrosivo, es frecuente añadir inhibidores a los limpiadores ácidos. Como inhibidores se utilizan alcoholes de alto peso molecular, aldehídos, aminas o amidas, ácidos sulfónicos, ácidos grasos o compuestos de amonio cuaternario.¹

Cuadro 1. Ácidos y álcalis utilizados en las operaciones de limpieza en granjas

Álcalis	Ácidos
Hidróxido de sodio	Ácido clorhídrico
Carbonato de sodio (sosa)	Acido nítrico
Carbonato ácido de sodio	Ácido sulfúrico
Silicato sódico	Acido fosfórico
Fosfato trisódico	Fosfato ácido de sodio
Difosfato tetrasódico	Ácido cítrico
Trifosfato pentasódico	Acido tartárico
Hidróxido de amonio	Acido glucónico
	Ácido sulfamínico

Fuente: Strauch et al. 2003

1.3.3 Limpiadores neutros

Los limpiadores inorgánicos neutros desarrollan una débil acción limpiadora, pero con frecuencia se utilizan asociados a tensidos o bien, se emplean solos en la limpieza de superficies sensibles a la corrosión. Aquí hay que citar principalmente el fosfato ácido disódico y también el sulfato sódico, utilizados mayormente como aditivos o sustancias auxiliares de limpiadores neutros mixtos. Los tensidos neutros no reaccionan o lo hacen solo muy débilmente como ácidos o álcalis en solución acuosa.

Los tensidos pueden clasificarse en cuatro grupos: aniónicos, catiónicos, anfóteros y no iónicos. En la limpieza se utilizan principalmente los detergentes aniónicos y los no iónicos, ya que los catiónicos sólo desarrollan una deficiente acción limpiadora. En cambio, estos últimos se incluyen entre los desinfectantes en virtud de su acción microbicida. La constitución de los tensidos (Cuadro 2) es básicamente siempre la misma. Todos poseen un grupo hidrófobo y otro hidrófilo. Como grupo hidrófobo actúan ácidos grasos, parafina, olefina, alquilbenzol, alcoholes y alquilfenoles.

En los ténidos aniónicos, el ion ténido está cargado negativamente en solución acuosa. Suele ser generalmente un sulfonato, sulfato o carboxilato de uno de los grupos hidrófobos. El representante más importante es el alquilbenzolsulfonato (LAS). Los ténidos catiónicos forman en solución acuosa un ion ténido positivo. A ellos pertenecen sobre todo los compuestos de amonio cuaternario, utilizados como desinfectantes. Los ténidos no iónicos no forman ningún tipo de ion en solución acuosa. ¹

Al existir un grupo hidrófilo y otro hidrófobo en una misma molécula, los detergentes se acumulan en solución acuosa en las superficies de separación de las fases. Entonces, el grupo hidrófilo contacta con la fase acuosa, mientras que el hidrófobo se separa del líquido. Al acumularse en las superficies de separación, los ténidos reducen la tensión superficial del agua. Por encima de una concentración crítica para cada sustancia, los surfactantes forman en la solución micelas, en cuyo interior se sitúan los grupos hidrófobos, mientras que los grupos hidrófilos se orientan hacia la fase acuosa. Como consecuencia de disminuir la tensión superficial, los productos limpiadores penetran con mayor facilidad en la capa de suciedad. Las micelas pueden entonces retener partículas de suciedad y mantenerlas de esta manera en solución en el líquido limpiador. Aquí radica la buena acción limpiadora de los ténidos. La toxicidad de estas sustancias para los mamíferos es escasa. ¹

Cuadro 2. Clasificación de los ténidos y constitución química de algunos de estos

Clase	Subclase	Tipo de ténido	Denominación abreviada
Tensidos ionógenos	Anión activos	Alquilcarboxilato	
		Alquilsulfato (Alcoholsulfato graso)	FAS
		Alquilbenzolsulfonato (lineal)	LAS
	Cación activos	Alquiloxiethylsulfato (Alcoholetersulfato graso)	FES
		Trialkilbenzilamonio halógeno	
		Alquilpiridin halógeno	
Ténsidos no ionógenos	Anfóteros	Betaína	
		Aminoalquilaminoácido	
		Alquilfenoloxietilato	APE
		Alcoholtoxilato	FAE
		Etoxipropoxipolimerizado	

Fuente: Strauch et al. 2003

El limpiador remueve el biofilm logrando una desinfección más efectiva. El uso apropiado de los limpiadores, permitirá ahorrar de un 30 hasta un 50% en la etapa de lavado.^{6, 7, 10, 11} Vangroenweghe et al. encontraron que en el lavado de las instalaciones al aplicar un detergente, mejora notablemente los resultados bacteriológicos y mejora el desempeño de los cerdos hasta la finalización.^{2, 12, 11}

Gadd encontró que el enjuagar las superficies con agua, inclusive bajo presión, para obtener todo virtualmente libre de suciedad, ya no es suficiente, pues aun quedan residuos fecales mezclados con grasa (biofilm) proveniente del alimento en el comedero así como del digerido. Los detergentes son una herramienta útil que permiten alcanzar lugares poco accesibles en corrales y con su aplicación es esencial alcanzar un total de 100,000 UFC per cm² antes de la desinfección. Esto a su vez permite a los desinfectantes bajar este nivel

hasta 1,000 UFC por cm² con el cual el sistema inmune del cerdo, incluyendo lechones que hayan consumido calostro, pueden resistir al desafío.^{13, 14}

1.4 Otras sustancias activas y auxiliares

El agua en el proceso limpiador desempeña diversas funciones: imbibes, disuelve, fluidifica y transporta la suciedad, a la vez que actúa como medio disolvente de los productos químicos utilizados en la limpieza y desinfección. El agua tiene composición diferente según su origen. A este respecto corresponde especial significado la dureza del agua, para cuya corrección se pueden utilizar con frecuencia productos fijadores de complejos (quelantes).

Los fijadores de complejos se hallan en el límite entre las sustancias activas y las auxiliares. Se trata del difosfato sódico y del trifosfato sódico, en unión al ácido cítrico. Otros reblandecedores se incluyen en el Cuadro 3. Los más importantes formadores de complejos son el ácido etilendiaminotetracético (EDTA) y los ténsidos-quelantes derivados de ellos. Otros aditivos adicionados para el empleo de los productos limpiadores son ¹: enzimas (proteasas), imbibidores (carboximetilcelulosa), decolorantes (perborato sódico), inhibidores de la espuma (trialquilmelamina), disolventes (isopropanol) y clarificadores ópticos.¹

Cuadro 3. Productos formadores de complejos y su capacidad fijadora de Ca a 20°C y 90°C

Productos	Capacidad fijadora de Ca a:	
	20°C mg CaO/g	90°C mg CaO/g
Difosfato sódico	114	28
Trifosfato sódico	158	113
Ácido 1 hidroxietano-1, 1-difosfónico	394	378
Ácido amino-trimetilfosfónico	224	224
Ácido nitrilotriacético	285	202
Ácido etilendiamintetracético	219	154
Ácido cítrico	195	30

Fuente: Strauch et al. 2003

1.5 Métodos de limpieza

En la limpieza, los componentes físicos y químicos actúan sinérgicamente. La eficacia de los componentes químicos viene determinada por el agente limpiador y la de los componentes físicos por el método de limpieza.

Básicamente debe distinguirse entre métodos de limpieza húmedos y secos, manuales y mecánicos, así como entre las instalaciones fijas y móviles.^{1, 5, 9, 12}

El curso de la limpieza sigue por lo regular cuatro fases con medios manuales y mecánicos.

El proceso sigue el curso siguiente:

- Prelimpieza: Eliminación de restos de producción por medio del raspado y el barrido.
- Reblandecimiento: Desprendimiento e imbibición de la capa de suciedad con agua, con o sin adición de limpiadores o sustancias auxiliares o en forma de espuma.
- Limpieza: Eliminación de la suciedad reblandecida previamente con agua caliente o fría a presión, con o sin detergentes, con o sin aplicación de acción mecánica auxiliar, empleando aparatos especiales.

- Secado: Eliminación del agua residual de las superficies o del material mediante secado al aire o secado en caliente

De acuerdo con la naturaleza y características de las superficies y atendiendo a la finalidad de las medidas limpiadoras puede hacerse hincapié en una u otra fase del proceso o bien acortar o incluso suprimir fases.^{1, 4, 5}

1.6 Desinfección

La desinfección se utiliza para eliminar el 5% restante de microorganismos que quedaron después del proceso de limpieza. Puede llevarse a efecto por procedimientos físicos, químicos y biológicos. Los métodos físicos se basan principalmente en la inactivación por efecto de altas temperaturas. Los métodos biológicos utilizan la actividad metabólica microbiana. Los métodos químicos de inactivación de microorganismos son los más comunes.^{1, 8}

1.6.1 Métodos químicos

El concepto “desinfección” es en la mayoría de ocasiones sinónimo de desinfección química. Con frecuencia se combinan métodos físicos y químicos para mejorar el efecto final.

Su efectividad depende de la cantidad y especie de los microorganismos a destruir; tipo, concentración y tiempo de actuación del desinfectante, así como el grado de limpieza, clase y textura de las superficies a desinfectar. También depende de la temperatura ambiental, dureza del agua de dilución, humedad relativa y velocidad del aire.

Diversas sustancias actúan de diferente manera sobre bacterias, hongos, virus y estadios duraderos de parásitos (Cuadro 4).^{1,5}

Cuadro 4. Desinfectantes: Grupos de principios activos

Aldehídos
Alcoholes
Cloro + liberadores de cloro
Yodóforos
Liberadores de oxígeno
Álcalis
Ácidos
Fenoles
Sustancias tensoactivas
Catiónicas (Quats) Anfóteras Aniónicas

Fuente: Strauch et al. 2003, Morishita et al. 2002

Las esporas son las más resistentes. Por lo regular, los oxidantes son más eficaces contra las esporas de gérmenes anaerobios, mientras que los aldehídos ejercen acción más intensa contra las esporas de microorganismos aerobios.

El orden de sensibilidad de los microorganismos frente a los productos químicos es el siguiente^{1,5}:

- Clamidias y rickettsias se comportan como las bacterias vegetativas.
- En los hongos, las diferencias entre formas vegetativas y esporas son bastante menores que en las bacterias. Por lo común, las esporas y micelios de los mohos son más

resistentes a la mayoría de los desinfectantes químicos que las formas correspondientes de las levaduras.

- Sucede generalmente en los virus que los carentes de cápsula son más resistentes a los productos químicos que los capsulados.
- Referente a los estadios parasitarios reproductores, los ooquistes de coccidios son por lo regular más resistentes que los huevos de nematodos intestinales, si bien no llegan a superar la resistencia de los criptosporidios.

Para la desinfección se debe tomar en cuenta la cantidad de gérmenes y el espectro de acción y la zona de empleo. A efectos de eficacia, la sustancia debe cumplir esencialmente 3 requisitos ¹:

- § Adsorción de superficies del objetivo (células bacterianas, partículas víricas, etc.)
- § Penetración en las estructuras del objetivo.
- § Reacción con uno o varios componentes del objetivo.

Los factores con influencia sobre la desinfección pueden dividirse en factores primarios y secundarios. Los factores primarios más importantes: 1. Cantidad y especie de los microorganismos a destruir; 2. Cantidad, tipo, concentración y tiempo de actuación del desinfectante utilizado y 3. Grado de limpieza, clase y textura de las superficies a desinfectar. ¹

Los factores secundarios más importantes son: a) Temperatura ambiental, b) Dureza del agua de dilución y c) Humedad relativa y velocidad del aire. Para estos factores secundarios vale, en general, lo siguiente: cuanto más baja es la concentración del desinfectante aplicado, con más intensidad pueden ellos actuar. ¹

Cantidad, tipo, concentración y tiempo de acción se determina de acuerdo con la experiencia adquirida, o mejor, llevando a cabo pruebas adecuadas de los desinfectantes a utilizar en cada caso. La identificación y corrección de posibles influencias del grado de limpieza, clase y textura de los materiales a desinfectar son mayormente responsabilidades del usuario, que también aquí deberá adoptar las medidas pertinentes para conseguir una eficaz desinfección. ¹

Fablet et al. encontraron que los cerdos se infectaban con *Salmonella choleraesuis* cuando eran introducidos a locales, si antes de desinfectarlos en los que no se eliminaba el excremento adecuadamente, o porque las paredes eran muy rugosas o existía tránsito de personas durante el periodo de desecación de los locales. ¹⁵

La influencia de la dureza del agua es positiva o negativa, de acuerdo con el pH óptimo para el desinfectante. Los aldehídos actúan por lo regular mejor utilizando aguas duras que con agua bidestilada, mientras que los fenoles pierden fuerza a causa del agua dura. ¹

La temperatura ambiental, la humedad relativa y la velocidad del aire influyen sobre el secado de las superficies tratadas. ¹

Los efectos sobre las estructuras microbianas son definitivos o reversibles de acuerdo con la concentración y tiempo de acción. Los mecanismos básicos de acción más importantes de los desinfectantes son ¹:

- Reacciones químicas
- Acciones iónicas mutuas
- Acciones físicas mutuas

1.6.2 Métodos físicos

La mayoría de los procedimientos se basan en la inactivación por efecto de altas temperaturas. El calor es el medio más seguro para inactivar y matar microorganismos, y debe aplicarse a materiales accesibles y resistentes al calor. El calor puede aplicarse húmedo y seco. El calor húmedo (agua caliente y vapor de agua) es más eficaz que el calor seco, los virus y bacterias pierden virulencia como resultado de la desnaturalización de las proteínas, enzimas, ácidos nucleicos, etc. El calor seco es mediante el flameado.^{1, 3}

1.6.3 Características de los desinfectantes

El desinfectante ideal debe contar con ^{1, 16}:

- Amplio espectro de acción contra diversos grupos de microorganismos o bien alto efecto selectivo contra gérmenes concretos.
- Acción rápida e irreversible en la concentración ordinaria
- Escasa pérdida de efecto por la influencia del medio ambiente (proteína, heces, cambios de pH).
- Composición estable (buena capacidad de depósito del concentrado, estabilidad de la solución de empleo, solubilidad en agua).
- Inocuidad para el hombre y los animales durante el empleo y después de éste; inocuidad para alimentos de origen animal (ninguna alteración por olor, sabor, coloraciones anómalas).
- Ausencia de ataque a los materiales.
- Buenas propiedades de empleo (acción limpiadora, capacidad humectante).
- Económico.

1.7 Evaluación cuantitativa de la limpieza y desinfección

Los métodos para evaluar el nivel de contaminación se pueden clasificar como indirectos y directos (Cuadro 5).

1.7.1 Métodos indirectos

Los métodos indirectos relacionan el estado de salud de los animales con el nivel de contaminación de las casetas. No indican el grado de contaminación ni que contaminantes están involucrados, pero una adecuada limpieza y desinfección disminuye la posibilidad de transmisión de enfermedades. Por tanto, en los métodos indirectos esta la inspección visual y olfativa, ganancia diaria de peso, evaluación serológica y necropsias.

La inspección visual y olfativa sólo dan una idea de la calidad de la limpieza. Se revisa que no haya olores, presencia de materia orgánica, alimento y heces que no se hayan removido debajo del equipo, grietas y esquinas.¹⁷

1.7.2 Métodos directos

Los métodos directos pueden determinar el grado de contaminación relacionando la concentración de proteínas o adenosín trifosfato (ATP), o por medio del aislamiento de las bacterias. Estos métodos se utilizan en la industria alimentaria y ocasionalmente en la producción porcina.¹⁷

Cuadro 5. Métodos para la comprobación experimental de métodos de limpieza mecánicos en condiciones estándar

Métodos de Calificación	Criterios	Escalas de calificación/ Métodos de verificación
Sensoriales	Aspecto (visual)	Ausencia de suciedad adherida o suspendida (superficies, solución de enjuagado corriente)
	Olor	Ausencia de olores específicos
Microbiológicos	Número de bacterias	Determinación UFC/cm ²
	Contenido de ATP	Bioluminiscencia
Químicos	Reacciones específicas de identificación	Prueba directa sobre la superficie o tras la obtención de residuos, grasa, proteína y almidón.

Fuente: Strauch et al. 2003

- Determinación de proteína residual: Este método cuantifica la concentración de proteína de las superficies, como correlación de la contaminación. Un incremento de color indica mayor cantidad de proteína y los resultados se obtienen en aproximadamente en 20 minutos. El método se describe como muy específico, pero poco sensible.^{1, 17}
 - Conteo de unidades formadoras de colonias o aislamiento bacteriano: Este es el método más común para evaluar la contaminación y se basa en el aislamiento de las bacterias y en el conteo de las unidades formadoras de placas por cm². Es un método poco sensible, pero específico, además de que se puede evaluar la concentración de microorganismos, también se pueden aislar las bacterias u hongos. Sus desventajas son el tiempo de transporte, procesamiento de muestras y entrega de resultados así como el costo.^{12, 16, 17}
- La técnica que se utiliza para la determinación de las UFC se describe en la NOM-110-SSA1-1994 Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico y la NOM-092-SSA1-1994 Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.^{18, 19, 20, 21}

Por facilidad y conveniencia se desarrolló la técnica del petrifilm, que consiste en una placa de 4.5 x 4.5 cm con medio deshidratado y un cromógeno indicador para la identificación microbiana. Es un sistema listo para usar y se obtienen los resultados en 24 horas.^{6, 16, 20, 22, 23}

- Método de determinación del ATP o bioluminiscencia: Se basa en la detección de ATP en las superficies. El ATP se encuentra en la materia orgánica, heces, alimento, bacterias, hongos, protozoarios, parásitos, excepto en los virus.^{17, 24, 25} Se utiliza principalmente en la industria alimentaria, como una forma rápida de evaluar el grado de sanitización o reducción de microorganismos de diversas superficies.^{17, 25}

El método de detección de ATP o bioluminiscencia se realiza por medio de hisopos que se pasan sobre la superficie y en caso que se encuentren microorganismos su ATP reacciona con un complejo enzimático luciferín-luciferasa, emitiendo luz, la cual es medida por un luminómetro y se expresa como unidades de radiación luminosa (URL) por cm².^{25, 26, 27, 28} Entre mayor sea el valor obtenido, mayor es la contaminación. Los resultados se obtienen en 10 segundos.^{17, 25}

En la industria alimentaria se consideran 300 URL o menos como un lugar higiénico. El objetivo en las granjas porcinas es que después de la desinfección se obtengan menos de 1000 URL.¹⁷ A pesar de la sensibilidad y rapidez del método^{17, 25, 26, 27, 28}, su principal desventaja es su inespecificidad, pues sólo indica la concentración de contaminación sin determinar de qué tipo es, y debido a que se basa en la actividad de una enzima, cualquier residuo químico sobre la superficie puede desnaturalizarla dando falsos negativos.^{16, 17, 25}

Para este estudio, los límites usados en la clasificación de una zona como limpia en la bacteriología convencional y en la bioluminiscencia fue de ≤ 100 UFC y ≤ 1000 URL después de desinfectar, respectivamente. Una zona sucia es considerada como aquella que se encuentra por arriba de cualquiera de los límites mencionados anteriormente.¹⁷

Con base en lo anterior, en esta tesis se compararon dos métodos de limpieza y desinfección de corrales de engorda midiendo la carga bacteriana en comederos, bebederos, piso y pared. A la vez se hizo una comparación entre el análisis bacteriológico convencional, que es el estándar de oro, con dos métodos rápidos, petrifilm y luminometría que también se podrían utilizar para evaluar la contaminación microbiana.

2. JUSTIFICACIÓN

Este estudio se hizo con el objetivo de evaluar dos métodos de limpieza y desinfección en los corrales de finalización en las granjas porcinas, conocer la importancia de la implementación de un protocolo adecuado, así como la correcta aplicación de limpiadores y desinfectantes apropiados y determinar los puntos críticos de la limpieza en el corral. Además, conocer la confiabilidad de la utilización de métodos rápidos para evaluar la limpieza y desinfección de los corrales, comparándose con el estándar de oro que es la bacteriología tradicional. Esta información será de utilidad para poder ofrecer una mejor asesoría a las personas encargadas de la limpieza.

3. HIPÓTESIS

La utilización de un método estandarizado de limpieza y desinfección de corrales de cerdos en finalización, reduce en mayor proporción la contaminación microbiológica en comparación con el que se utiliza en la granja. La aplicación de la bioluminiscencia y el petrifilm en el análisis microbiológico de la limpieza y desinfección, pueden ser útiles para la industria porcina.

4. OBJETIVOS

1. Comparar un método estandarizado de lavado y desinfección con el que normalmente se efectúa en cada granja, de acuerdo al grado de contaminación residual en corrales de engorda.
2. Comparar el grado de contaminación de la pared, piso, bebedero y comedero de los corrales.
3. Detectar puntos críticos donde se encuentra la mayor carga bacteriana que represente un riesgo para la salud de los animales.
4. Establecer si existe correlación entre los resultados emitidos por la luminimetría y la bacteriología convencional.
5. Establecer si existe correlación entre los resultados emitidos por el petrifilm y la bacteriología convencional.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Granjas

Se utilizaron 5 granjas de 150 a 200 vientres cada una, localizadas en el estado de Morelos y México.

5.2 Modelo Experimental

En cada granja se utilizaron dos corrales del área de engorda-finalización. Un corral se limpió, lavó y desinfectó con un método estandarizado y otro con el que se utiliza en la granja. El grado de desinfección se evaluó por medio de análisis bacteriológico convencional.

5.2.1 Sistema estandarizado

Consistió en la limpieza en seco, removiendo material fecal, alimento, cama por barrido y/o raspado. Se continuó con un lavado utilizando agua con detergente (BIOSOLVE[®]) que se compone de una mezcla alcalina de surfactantes no-iónicos y anfotéricos en una solución acuosa que incorpora un secuestrante totalmente biodegradable para eliminar la materia orgánica, dejándose actuar por 20 minutos. Se enjuagó con agua, se dejó secar y se desinfectó con una mezcla de acción sinérgica de ácidos orgánicos (ácido cresílico), surfactantes y compuestos de bajo peso molecular. El desinfectante (FARM FLUIDS[®]) se usó a una dilución de 1:200 (0.5%), aplicándose con una bomba de aspersión a razón de 350 ml por m² de superficie. Se dejó secar antes de introducir un nuevo lote de cerdos.

5.2.2 Sistema de la granja

Las granjas escogidas para su evaluación cumplieron con los siguientes parámetros en su proceso de limpieza y desinfección: limpieza en seco, removiendo el material fecal, alimento, cama por barrido y/o raspado; lavado con agua con/sin detergente y desinfección química; sin importar el equipo usado, tipo de instalaciones y/o técnica.

5.3 Evaluación de la limpieza y desinfección

En cada corral se cuantificó el nivel de contaminación del piso, comedero, pared y bebedero, antes de lavar, después de lavar y después de desinfectar.

5.4 Muestreo

Se muestreó una superficie de 10 x 10 cm en zonas contiguas, del piso, comedero y pared con excepción del bebedero el cual se muestreó alrededor del chupón. En caso del piso y pared se muestreó donde los cerdos descansan. La pared se muestreó aproximadamente a 100 cm de altura, el piso a 150 cm del comedero, el fondo del comedero y el bebedero rodeando la superficie que mantiene contacto con la boca del cerdo.¹⁷

5.4.1 Bacteriología

El muestreo se hizo por medio de un hisopo estéril presionando firmemente y colocándose en un tubo de ensaye conteniendo 4.5 ml de solución salina estéril al 8%. Las muestras fueron transportadas en una caja térmica con refrigerantes. En el laboratorio se hicieron diluciones decuples a partir de cada muestra y fueron sembradas a razón de 1 ml en agar para cuenta estándar e incubadas durante 24 hrs para hacer la lectura. Los resultados se reportaron en UFC/cm².^{18, 19, 21}

5.4.2 Luminimetría

Se utilizó un sistema de monitoreo rápido de sanitización (AccuPoint[®]) mediante la detección de ATP presente en las superficies, los dispositivos (hisopos) se mantuvieron refrigerados todo el tiempo y se sacaron de la bolsa térmica 10 minutos antes de usarlos. Se muestreó un área de 10 x 10 cm y se introdujo en la cámara del dispositivo para la activación enzimática, se agitó y se introdujo en el luminímetro para determinar la cantidad de luz emitida. Los valores se anotaron como unidades relativas de luz (URL).

26

5.4.3 Petrifilm

Las tarjetas conteniendo el medio bacteriológico tienen una superficie de 20 cm² (Rida Count[®]) Se separó la cubierta transparente que cubre el medio de cultivo y se presionó sobre la superficie a muestrear. Posteriormente se aplicó 1 ml de solución salina estéril sobre el medio de cultivo y se colocó nuevamente la cubierta transparente sobre el medio hidratado sin dejar burbujas. Se incubaron a 37°C y la lectura se hizo a las 48 hrs. Los resultados se anotaron como número de colonias.^{20, 23}

5.5 Análisis Estadístico

Los métodos de limpieza y desinfección se compararon entre sí; además se comparó el grado de contaminación de cuatro sitios del corral: pared, piso, bebedero y comedero. Todos los valores obtenidos de las granjas estudiadas, se transformaron a logaritmo base 10.²⁹ Para conocer la interacción entre las variables, los resultados se analizaron por medio de una prueba de T, un análisis de varianza de una vía, prueba de Tukey y análisis de varianza de dos vías; el grado de correlación de los datos se hizo por medio de un análisis de regresión lineal simple y correlación de Spearman, tomando como base los datos de la bacteriología convencional como “estándar de oro” y se compararon con los obtenidos con la luminimetría y el método del petrifilm.^{30, 31} El análisis estadístico se llevó a cabo en el programa MINITAB[®] 15.1.0.0. 2006.³²

6. RESULTADOS

Los resultados del estudio comparativo de los dos sistemas de limpieza y desinfección se presentan en el cuadro 1 y figura 1. El análisis estadístico (Prueba T) mostró que no hubo diferencia significativa entre los dos sistemas ($P > 0.05$). Sin embargo, en promedio, el método estandarizado fue mejor con menor carga bacteriana.

Cuadro 1. Concentración de bacterias después de lavado y desinfección en cinco corrales con el método estandarizado y cinco con el utilizado en la granja

Método	Media	Desv. Est.	Valor mínimo	Valor máximo
1 - Estandarizado	1.749	1.19	-0.52	4.62
2 - Granja	1.830	1.17	-0.26	4.56
$- 0.089 \pm 0.426 \quad (- 0.515 , 0.337)$				

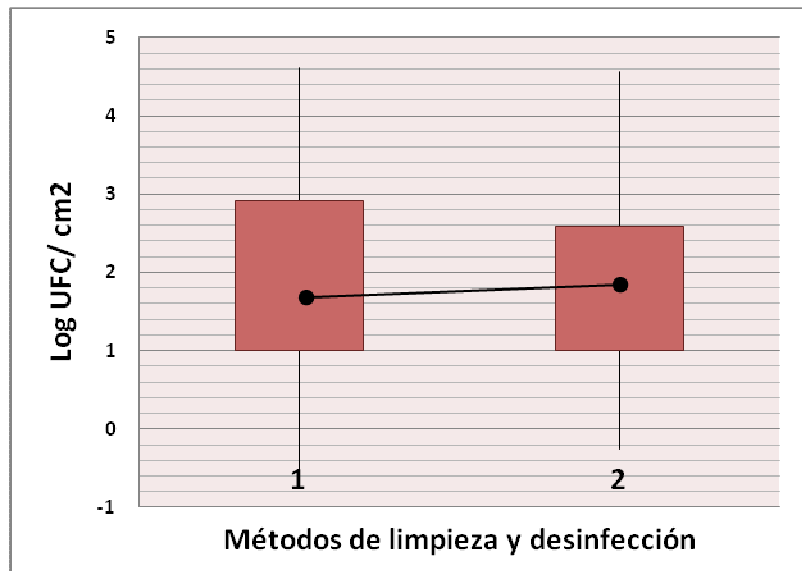


Figura 1. Concentración de bacterias después de lavado y desinfección en cinco corrales con el método estandarizado (1) y cinco con el utilizado en la granja (2)

Los resultados de la concentración bacteriana antes y después de lavar y desinfectar con los dos sistemas se presentan en el cuadro 2 y figura 2. Hubo diferencia significativa de carga bacteriana entre antes, después de lavar y después de desinfectar ($P < 0.05$) pero no entre los dos últimos tiempos

Cuadro 2. Concentración bacteriana antes de lavar (Ala), después de lavar (Dla) y después de desinfectar (Des) en cinco corrales con el método de limpieza estandarizado y el que se utilizaba en la granja

Método	Período	Media	Valor mínimo	Valor máximo
Estandarizado	Ala	2.45	0	4.63
	Dla	1.56	0.18	3.39
	Des	1.25	0.43	1.47
De la granja	Ala	2.38	0.78	4.57
	Dla	1.84	0	5.33
	Des	1.27	0.48	2.16

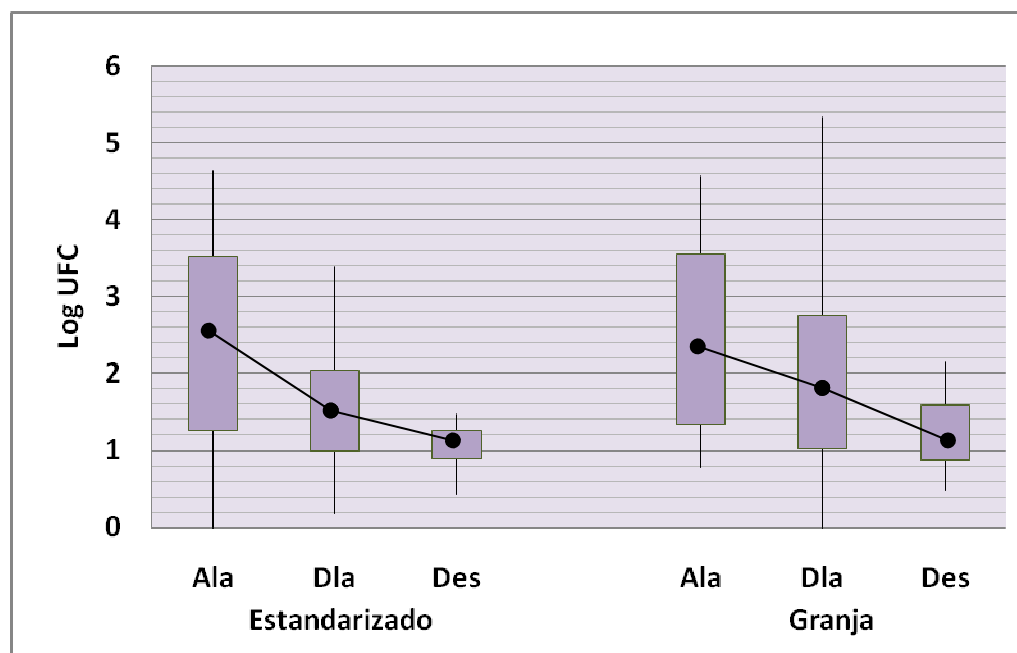


Figura 2. Concentración bacteriana antes de lavar (Ala), después de lavar (Dla) y después de desinfectar (Des) en cinco corrales con el método de limpieza estandarizado y el que se utilizaba en la granja

Los resultados de la comparación de los cuatro sitios del corral muestreados con cada sistema de lavado se presentan en el cuadro 3 y figura 3. Se encontró que el comedero fue la parte más contaminada y el bebedero, piso y pared las menos contaminadas, donde hubo diferencia significativa ($P < 0.05$).

Cuadro 3. Promedio de la concentración de bacterias después de lavado y desinfectado en cuatro lugares de cinco corrales, con el método estandarizado (1) y con el utilizado en la granja (2)

Lugar	Método	Media	Valor mínimo	Valor máximo
Bebedero	1	1.31	0.5	1.58
	2	1.73	0.6	3.45
Comedero	1	2.61	0.88	4.63
	2	2.85	1	5.33
Pared	1	1.11	0.43	2.28
	2	1.32	0	2.66
Piso	1	1.54	3.03	0.63
	2	1.84	2.26	1.08

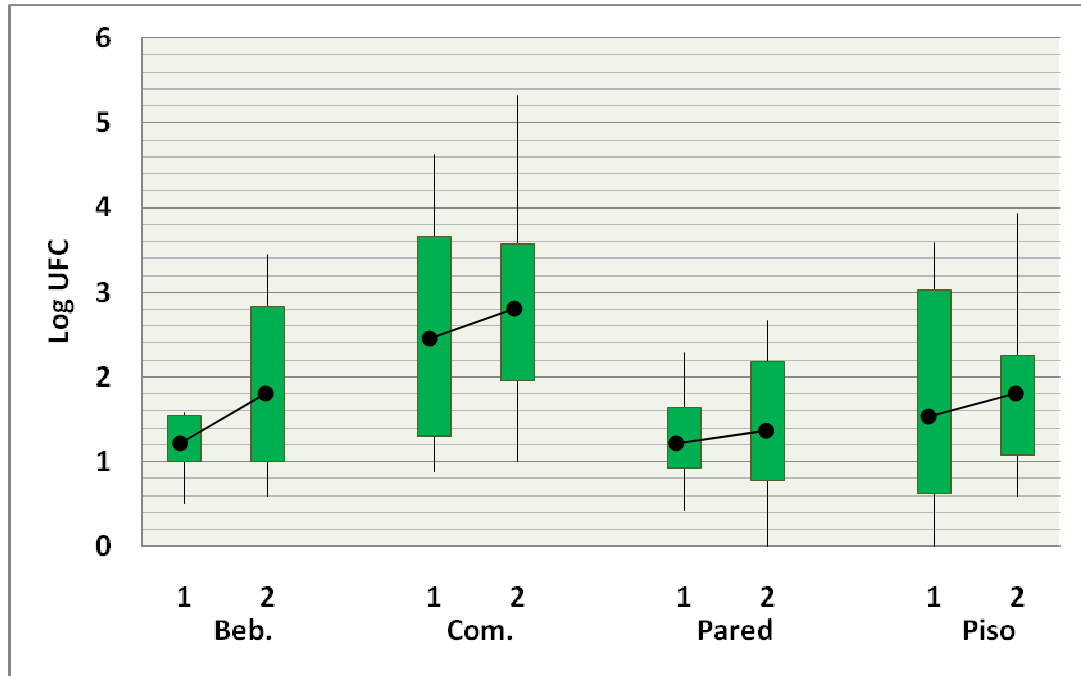


Figura 3. Promedio de la concentración de bacterias después de lavado y desinfectado en cuatro lugares de cinco corrales con el método estandarizado (1) y con el utilizado en la granja (2)

Debido a que no hubo diferencia entre los sistemas de lavado y desinfección estandarizado y el de la granja se promedió la concentración bacteriana antes de lavar (Ala) y después de lavar (Dla) y desinfectar (Des) en cuatro lugares de diez corrales para determinar el grado de reducción de la carga bacteriana con los procedimientos. Los resultados se presentan en el cuadro 4 y figura 4.

Cuadro 4. Promedio de la concentración bacteriana antes de lavar (Ala), después de lavar (Dla) y después de desinfectar (Des) en cuatro lugares de diez corrales sin importar el método de limpieza y desinfección

Lugar	Periodo	Media	Valor mínimo	Valor máximo
Bebedero	Ala	2.41	1.17	3.65
	Dla	1.02	0.49	1.34
	Des	1.12	0.6	1.53
Comedero	Ala	3.32	1.06	4.62
	Dla	2.97	0.95	5.33
	Des	1.91	0.88	3.43
Pared	Ala	1.4	0	2.65
	Dla	1.28	0	2.18
	Des	0.97	0.43	1.6
Piso	Ala	2.54	1	3.93
	Dla	1.48	0.18	3.03
	Des	1.05	0	1.33

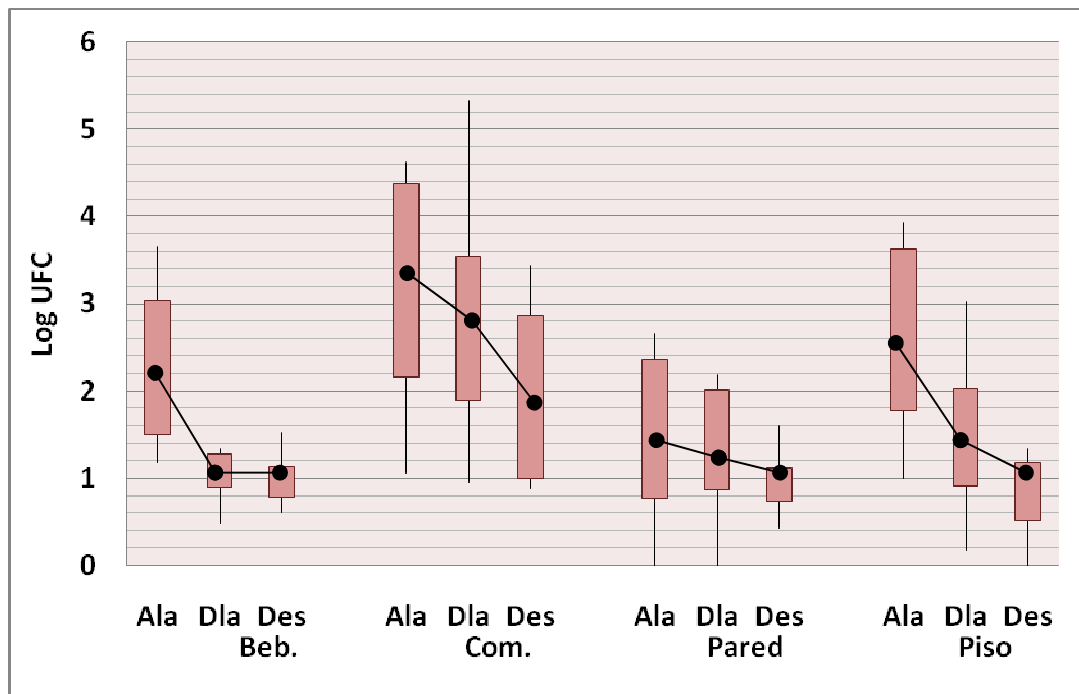
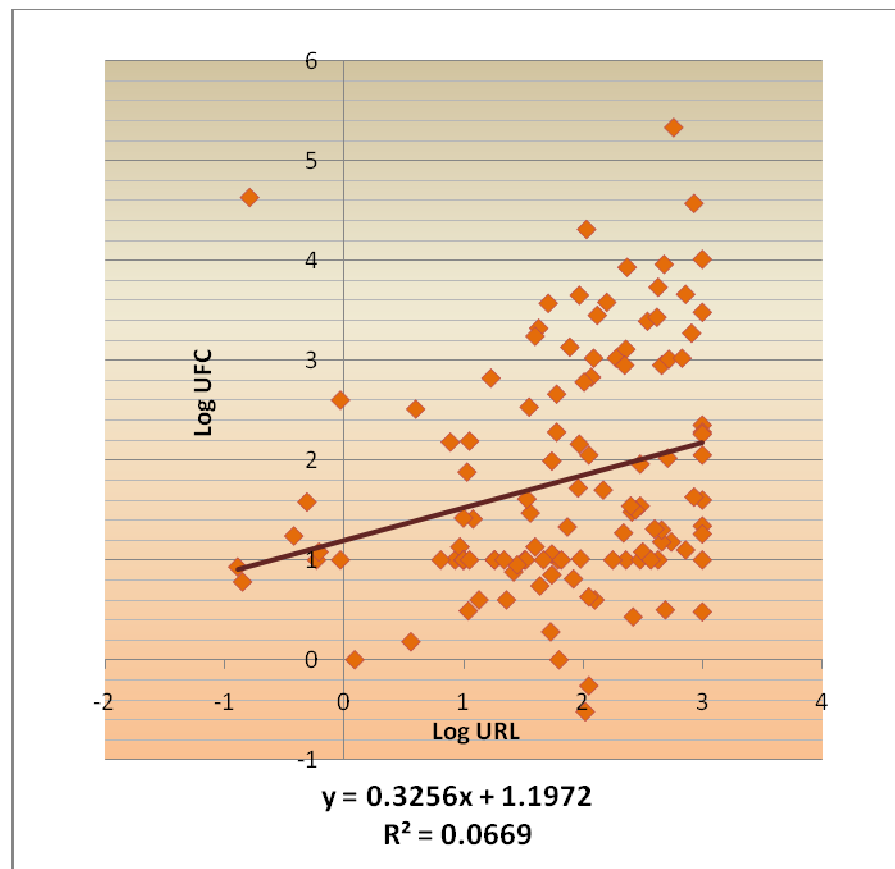


Figura 4. Promedio de la concentración bacteriana antes de lavar (Ala), después de lavar (Dla) y después de desinfectar (Des) en cuatro lugares de diez corrales sin importar el método de limpieza y desinfección

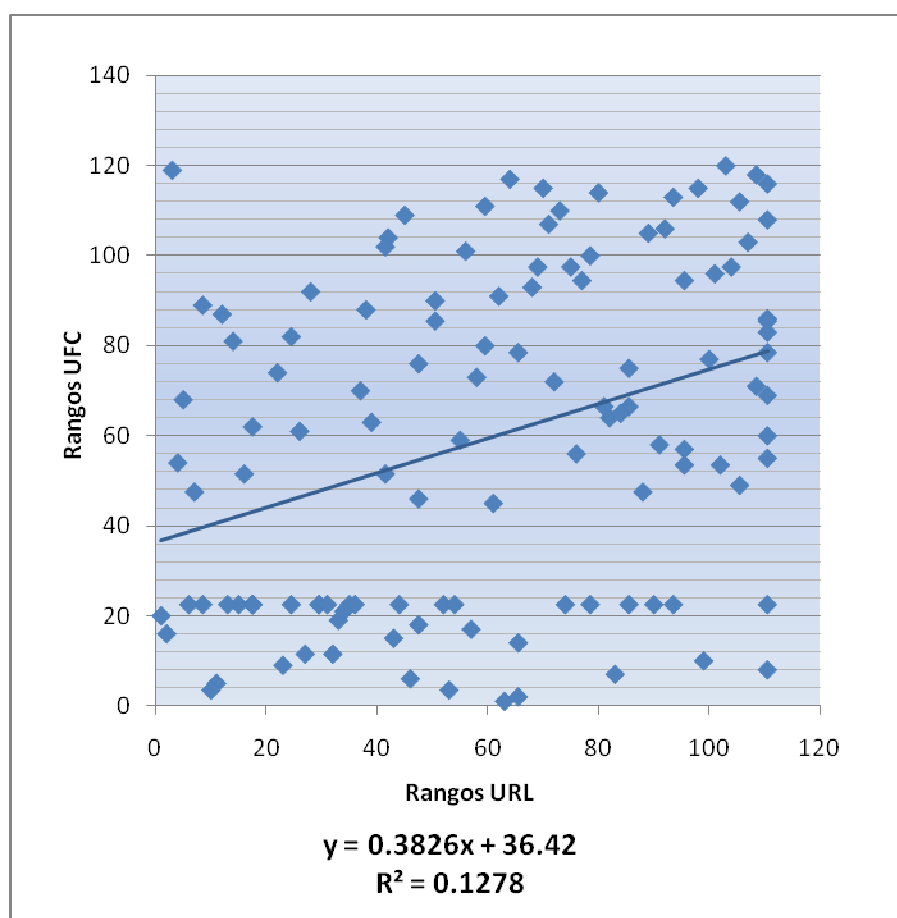
Se hizo un estudio comparativo entre la concentración de bacterias determinado por bacteriología convencional y las pruebas de luminimetría. Los resultados del análisis de regresión lineal para determinar la correlación entre la bacteriología y la luminimetría se presentan en la figura 5. No se encontró correlación entre las dos pruebas.

Figura 5. Resultados del análisis de regresión lineal para establecer la correlación entre los resultados de la concentración bacteriana en unidades formadoras de colonias y la luminimetría en unidades de radiación luminosa.



Los resultados de la correlación de Spearman (por rangos) corroboraron la independencia entre la bacteriología y la luminimetría, se presentan en la figura 6. Aunque se encontró correlación, es de asociación pobre, por lo tanto sin significancia estadística.

Figura 6. Resultados del análisis de correlación simple por rangos de Spearman entre los resultados de la concentración bacteriana en unidades formadoras de colonias y la luminimetría en unidades de radiación luminosa.



Los resultados de la comparación entre la bacteriología y la prueba del petrifilm (Prueba de T) se presentan en el cuadro 7 y figura 7. Existe diferencia significativa ($P = 0.011$) entre estas dos pruebas, donde el petrifilm reporta mayor carga bacteriana después de desinfectar en todas las granjas.

Cuadro 7. Concentración de bacterias después de lavado y desinfección en cinco corrales detectado por la bacteriología convencional y el petrifilm, sin importar el método de lavado utilizado.

Método	Media	Desv. Est.	Valor mínimo	Valor máximo
Bacteriología convencional	1.2618	0.859	0.27	2.16
Petrifilm	1.7613	0.857	0	3.7
$- 0.499 \pm 0.382$ $(- 0.881 , - 0.117)$				

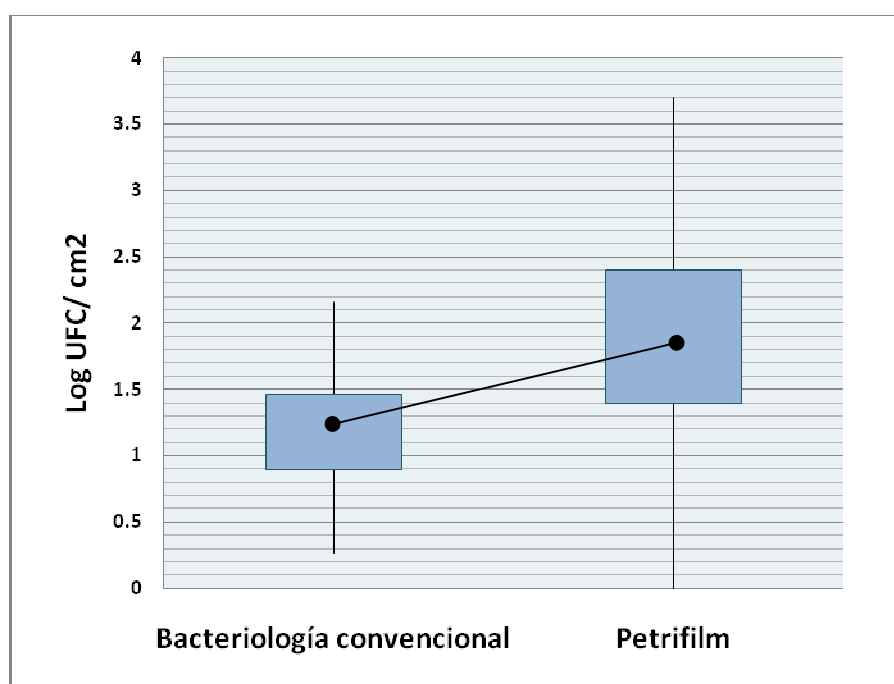


Figura 7. Concentración de bacterias después de lavado y desinfección en cinco corrales detectada por la bacteriología convencional y el petrifilm, sin importar el método de lavado utilizado.

7. DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos en la figura 1, no hubo diferencia entre los dos métodos pero se observó una disminución en la carga bacteriana del método estandarizado; esto se ve reflejado en la figura 2 donde el 50% de los resultados se distribuyen con un flujo de disminución de carga bacteriana esperada en cada tiempo de lavado en el método estandarizado, que a diferencia del método de la granja, se ve un aumento en la dispersión de los resultados así como puntos muy alejados del promedio. El 85% de los resultados del método estandarizado obtenidos por bacteriología convencional fueron considerados como limpias después de la desinfección, mientras que los resultados del método de la granja alcanzaron un 80%. Es importante hacer énfasis que de acuerdo con estos resultados, el método de la granja es bueno, pero el método estandarizado fue levemente mejor y si se tuvieran las instalaciones aun en mejores condiciones, con el correcto uso de un detergente y desinfectante apropiados para las instalaciones y la capacitación del personal encargado de esta tarea, se obtendrían mejores resultados.

En el estudio, el detergente usado por las granjas es de uso doméstico para el lavado industrial de ropa, a este tipo de detergentes frecuentemente se les agregan sustancias que ayudan a la acción de lavar como: fosfatos y carbonatos de sodio, agentes desecadores, silicatos de sodio, carboximetilcelulosa, blanqueadores, perfume, enzimas (para remover manchas), etc., por lo que no es el mas indicado para el lavado y desinfección de instalaciones porcinas; los detergentes apropiados (“de uso rudo”), contienen otro tipo de composición, como enzimas y sustancias que actúan en presencia de materia orgánica (sangre, heces, grasas, etc.) y aguas duras, inhibidores de espuma o pueden estar combinados con desinfectantes, también actúa como desengrasante que disuelven el biofilm

que puede recubrir jaulas, pisos y paredes que a su vez protege a virus y bacterias del lavado y desinfección.¹¹

Un importante punto al que se sigue sin prestar la debida atención es el hecho de que la clase y calidad del material de construcción, así como la disposición e instalación de los alojamientos, condicionan de forma esencial el éxito de las medidas de limpieza y desinfección.¹

Los resultados de este estudio indican que hay problemas con la limpieza y desinfección de los comederos de las granjas de estudio, principalmente, siendo este el sitio más contaminado de los corrales y posteriormente, el piso, el bebedero y la pared. Esto puede ser debido a la negligencia del operador y/o a la dificultad en el acceso a todas las grietas en estos sitios.³³ El tipo de material con el que están hechos los comederos de las granjas utilizadas en este estudio eran de concreto, un material poroso, no tenían un orificio lo suficientemente grande que le permitiera drenar el agua y restos de alimento durante la etapa de limpieza, además, la textura rugosa tiende a la formación de grietas, en la que se hacen depósitos de materia orgánica e inorgánica que funcionan como medios de cultivo para microorganismos patógenos, por lo que son deseables las superficies lisas, las cuales tienden a estar menos contaminadas.³⁴ También durante la limpieza de los pisos de los corrales con hidrolavadora, tiende a esparcir las costras de suciedad del piso así como rociar el agua sucia a las paredes, comederos y bebederos, en el caso de los comederos, particularmente, uno de ellos no se lavaba y solo se quitaba el alimento del lote anterior, esto por disposición del veterinario encargado, otro es la falta de desagüe de los comederos de concreto y finalmente la negligencia del trabajador por no limpiar nuevamente el

comedero de forma manual, después de limpiar el piso, esto se observa después en los altos niveles de UFC obtenidos después de lavar.

La prueba ideal para la evaluación de la sanitización en instalaciones porcinas debe ser no muy cara, rápida, 100% sensible y específica. En el caso de la bioluminiscencia, su uso no está diseñado para instalaciones porcinas, las cuales son principalmente rugosas. Su uso fue transferido a la producción porcina por la necesidad de la industria por evaluar rápida y objetivamente los protocolos de sanitización de las instalaciones.^{17, 35}

En los resultados obtenidos en las figuras 3 y 4 se observó un decremento en la carga bacteriana en los dos métodos de limpieza y desinfección y en cada tiempo, que revela solo el efecto evidente del agua, detergentes y desinfectantes usados, pero no se sabe exactamente si se alcanzó un efecto completo al disminuir la carga bacteriana a los límites permisibles.

Las exigencias cuantitativas para la limpieza y desinfección como medidas preventivas, atendiendo a la disminución del número total de bacterias por cm^2 de superficie de alojamiento, varían completamente entre cada autor:

- Antes de limpiar: 1 000 000 000 UFC/ cm^2 , después de limpiar: 1 000 000 UFC/ cm^2 y después de desinfectar: 1 000 UFC/ cm^2 .¹
- $\leq 100\ 000$ UFC/ cm^2 antes de desinfectar, ≤ 1000 UFC/ cm^2 después de desinfectar.¹³
- $\leq 1 - 100$ UFC/ cm^2 después de desinfectar.¹⁷
- ≤ 1 UFC/ cm^2 después de desinfectar.^{35, 36, 37}

Y los límites admisibles en la bioluminiscencia son:

§ 1000 - 1500 URL después de lavar, \leq 1000 URL después de desinfectar. Ideal 150 URL. ¹

§ \leq 2.5 URL después de desinfectar. ^{16, 36}

Ha sido encontrado que existe una relación lineal entre los niveles de ATP intracelular y el número total de unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias así como levaduras. ²⁴

Se ha demostrado en algunos estudios que la cantidad de contaminación determinada por los métodos de ATP y cuenta en placa están correlacionados en un 80%. ^{38, 39}

Los luminómetros comerciales pueden detectar menos de 0.1 pg (o 10^{-13} g) per cuvette lo que equivale aproximadamente a 100 células bacterianas. La cuantificación de la creación continua de niveles de ATP en una variedad de microorganismos reveló rangos de ATP desde 0.1 hasta 4 fg / UFC (1 fg = 10^{-15} g / UFC) en bacterias y desde 10 a 100 fg / UFC en levaduras. ^{40, 41, 42}

Kelly et al.³⁶ compararon ambos métodos y encontraron que la bioluminiscencia era muy sensible, pero poco específica y la prueba de concentración de proteína era altamente específica, pero poco sensible y no existió relación lineal con la bacteriología convencional. ^{17, 28, 36, 43, 44}

Un factor que puede afectar a la correlación de la bioluminiscencia y la bacteriología convencional, es la presencia de los limpiadores en la superficie de interés. Se ha demostrado que los limpiadores y sanitizantes comerciales como los cuaternarios de amonio, limpiador - desinfectante a base de yodo, limpiadores ácidos y alcalinos pueden

causar aumento o disminución del ATP en los resultados si dichas sustancias entran en contacto directo con los reactivos de la prueba por medio del hisopo.⁴⁵

En otras publicaciones, se encontró que el método es poco específico pero altamente sensible, pues al detectar ATP en comederos, se encontraron residuos de semillas aun después de lavar y desinfectar. Células vivas presentes en las semillas pueden contener suficiente ATP que pueden dar un resultado falso positivo. En el caso del excremento, entre los residuos podemos encontrar células epiteliales del tracto digestivo.^{25, 35}

Bajo las condiciones de este estudio, la bioluminiscencia es altamente sensible pero poco específica, además de que el tipo de superficies muestreadas no son idóneas para este tipo de prueba, pues alteran la lectura de los resultados, y no existe relación lineal significativa entre la bioluminiscencia y la bacteriología convencional.^{44, 46} En la fig. 5 en los resultados del análisis de regresión, la ecuación $y = 0.326x + 1.1972$ indica que por cada unidad que aumente X (log URL), Y (log UFC) aumenta por una cantidad igual a $0.3256 + 1.1972$, esto siempre y cuando el valor de la r^2 fuese mayor a 0.4. Los datos de la muestra extraída de la población de URL, a la larga, proporcionarán ecuaciones de regresión lineal que tiene poco o ningún valor para propósitos de predicción o de estimación de UFC. La relación entre las UFC y URL no es lo suficientemente estrecha ($r^2 = 6.69\%$) para permitir que las URL sean de gran valor para predecir o estimar a las UFC. En el 49.2 % de las zonas muestreadas concordaron las dos técnicas, la bioluminiscencia y la bacteriología convencional en la clasificación de su limpieza, de 120 muestras; después de la desinfección, el 82.5% de las zonas se consideraron limpias por la bacteriología y el 27.5% de las zonas se consideraron limpias por la bioluminiscencia. El análisis de correlación simple por rangos de Spearman de la figura 6 confirmó que no existe asociación

significativa entre las dos variables. En conclusión, el modelo lineal no proporciona ajuste para los datos.

Los resultados obtenidos a través del petrifilm reflejan muy bien los resultados sólo después de la desinfección.⁶ En este estudio, resultó poco práctico su uso por la textura de las instalaciones, pues en superficies porosas, el medio de cultivo solo tiene contacto con una parte de la superficie, generalmente la que se limpió y no aquella superficie baja que no tiene contacto y que es donde tiende a acumularse la suciedad, asimismo la lectura de los resultados se hace a través del conteo de las colonias en el petrifilm, considerados como UFC o en caso de que se dificulte su lectura se usan unas plantillas en las que se marca como se vería una placa con un número aproximado de UFC, estas plantillas van desde 100 hasta 10,000,000 UFC, lo que lo hace muy subjetivo en la obtención de resultados en el momento de que el laboratorista encargado asigne un resultado, con esto se puede marcar una zona como sucia, cuando puede estar limpia, asignando falsos positivos.

También, el petrifilm al ser un medio de cultivo deshidratado cuadriculado, que al reaccionar con el cromógeno tiñe donde se detectó una UFC, tiende a hacerlo extendiéndose, por lo que al estar cerca de una o más colonias se unen formando una sola colonia. Esto puede ocasionar en la lectura falsos negativos, todo esto se ve reflejado en la fig. 7, donde los resultados no tiene la misma dispersión, la bacteriología convencional es menos dispersa a diferencia del petrifilm, lo que hace que aumente el error y por ende es menos confiable. En el 75% de las zonas muestreadas concordaron las dos técnicas, el petrifilm y la bacteriología convencional de 40 muestras, el 72.5 % de las zonas se consideraron limpias por el petrifilm. Los resultados de la prueba de T indican que las pruebas son estadísticamente distintas y que aun cuando el porcentaje de zonas limpias es

alto y muy cercano al porcentaje detectado por la bacteriología, no es suficiente para afirmar que al aplicar las dos técnicas, estas sean de igual eficacia, por lo tanto, la técnica del petrifilm no es capaz de sustituir a la de la bacteriología convencional. Por las razones anteriores, este método, no se considera apto en la evaluación cuantitativa de los protocolos de limpieza y desinfección en la industria porcina.

Después de la desinfección: 82.5, 27.5 y 72.5 % respectivamente del total de superficies, fueron clasificadas como limpias por la bacteriología, la bioluminiscencia y el petrifilm respectivamente, y solo en el 37.5% concordaron las 3 técnicas; esto demuestra lo poco confiable que sería el sustituir la bacteriología por otra técnica de diagnóstico, como lo sería la bioluminiscencia o el petrifilm.

8. CONCLUSIONES

El método estandarizado de limpieza y desinfección redujo la misma proporción de carga microbiana que el método de la granja (no hay diferencia estadística); ambos métodos dieron buen resultado. Los factores que pueden influir en el incremento de su eficacia, son: el desarrollo de un esquema mas efectivo de limpieza y desinfección, adecuado al tipo de material de las instalaciones de cada granja, las condiciones en que se encuentran y la capacitación del personal, esto con el propósito de identificar los puntos críticos, reducir la incidencia y consecuencias de numerosas enfermedades y asegurar el correcto uso de detergentes y desinfectantes apropiados.

La baja especificidad de la bioluminiscencia y lo impráctico del petrifilm resulta en la incapacidad de su uso en la evaluación cuantitativa de la contaminación en las instalaciones porcinas, de manera que no se recomiendan para este fin. Por lo tanto, la bacteriología convencional de cuenta en placa sigue siendo el estándar de oro en la evaluación de la sanitización de las instalaciones porcinas.

9. REFERENCIAS

1. Strauch D; Bohm R. Limpieza y desinfección de alojamientos e industrias animales. Zaragoza, España. Ed. Acribia. 2003
2. Vangroenweghe F; Maes W; Arijs D. Hygienograms for the evaluation of cleaning and disinfection protocols in pig facilities. 20th International Pig Veterinary Society Congress June 22-26; Durban, South Africa 2008
3. Linton AH, Russell AD. Disinfection of veterinary and farm animal practice. Blackwell Scientific Publication 1987
4. Corregé I; Hemonic A; Theil G. Factors for optimization of the protocol of cleansing - disinfection in pig farms: importance of soaking proceedings. 20th International Pig Veterinary Society Congress June 22-26; Durban, South Africa 2008
5. Morishita T. Y; Gordon J. C. Cleaning and disinfection of poultry facilities. Fact Sheet Extension. The Ohio State University 2002. Disponible en: <http://ohioline.osu.edu/vme-fact/pdf/0013.pdf>
6. Maes W. the importance of cleaning and disinfection control. Pig Progress 2007; 23 (7) Disponible en: www.pigprogress.net
7. Morilla G. A. Métodos para reducir la contaminación microbiana de la piara. En: Morilla G. A. López M. J. Actualidades de bioseguridad en la industria porcina. Ediciones Pecuarias. México, 2008; 133-140
8. Morilla GA. Manual de Bioseguridad para empresas porcinas. México UNAM 2009
9. Templeton C. Choosing the right cleaning and disinfection program for your operation. Proceedings from London Swine Conference - Production of the leading Edge 6-7 April 2005

10. Walleghem D. V. Biosecurity pays big returns. *Centred on Swine* 2007; 14 (1); 6-7
11. Hurnik, D. Investigations into optimal washing and disinfection techniques for pig pens – Atlantic Swine Research and Partnership Inc, 2003 Proceedings London Swine Conference.
12. Franz B. How clean is clean? *MSU Pork Quarterly* 2006; 11: 3-5
13. Gadd J. Detergents, underused in modern sanitation. *Pig Progress* 2007; 23 (9).
Disponible en: www.pigprogress.net
14. McCallister M. Disinfection of swine barns. Manitoba Pork Council Research 1998.
Disponible en http://en.engormix.com/MA-pig-industry/management/articles/disinfection-swine-barns_34.htm
15. Fablet C; Robinault C; Jolly JP; Eono F; Dorenlor V; Labbé A; Fravallo P; Madec F. Factors associated with Salmonella contamination of finishing facilities following cleaning and disinfection procedure. *IPVS*. 2006; 19(2): 366
16. Amass SF. Diagnosing disinfectant efficacy. *Journal of Swine Health and Production*. 2004; 12 (2): 82-83
17. Jasso VA. Evaluación de la limpieza y desinfección de las instalaciones porcinas. En: Morilla G. A. López M. J. Actualidades de bioseguridad en la industria porcina. Ediciones Pecuarias. México 2008; 27-33
18. Norma oficial mexicana NOM-110-SSA1-1994, bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
19. Norma oficial mexicana NOM-092-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
20. Woodhead G; Pritchett A; Jones M.A. The use of plate count agar and petrifilm for the enumeration of viable organisms. *Pig Journal* 2007; 59

21. Vanderenne C.A; Ribes M.E. Métodos de análisis microbiológicos de los alimentos. Ediciones Días de Sante. Madrid, España 2002
22. Amer, L; De Batista, G.; Medvedeff, M; Bargardi I. Evaluation of petrifilm method for total aerobic mesophyllic microorganisms count determination in vegetable drugs. Ars Pharmaceutica 2000; 41: (4)383-386. Disponible en <http://farmacia.ugr.es/ars/pdf/205.pdf>
23. R-Biopharm AG. Rida Count User's Guide. Darmstadt, Germany 2004
24. Dostálek P; Branyik T. Prospects for rapid bioluminescent detection methods in the food industry – a review. Czech J. Food Sci. 2005; 23 (3): 85-92
25. Deibel V. High tech detection methods: Hygiene Detection using ATP Bioluminescence. TRAC Microbiology, Inc. 3A Standards Meeting. 2008
26. Neogen Corporation. AccuPoint User's Guide. EUA 2004
27. Costa P.D; Andrade J.N; Brandao C.C; Passos F.J.V; Soares N.F.F. ATP-bioluminescence assay as an alternative for hygiene monitoring procedures of stainless steel milk contact surfaces. Brazilian Journal of Microbiology 2006; 37: 345-349
28. Correge I; Dubroca S. Cleaning and disinfecting processes compared. Pig Progress 2005; 21(2): 18-20
29. Dawson B, Trapp RG. Bioestadística Médica. 4a Ed. Manual Moderno, México 2005
30. Daniel WW. Bioestadística, Base para el análisis de las ciencias de la salud. 4ª Ed. Editorial Limusa Wiley. México 2006
31. Álvarez CR. Estadística Aplicada a las Ciencias de la Salud. Ed. Díaz de Santos. España 2007
32. Programa MINITAB 15.1.0.0. 2006

33. Mannion C; Lynch P. B; Egan J; Leonard f. C. Efficacy of cleaning and disinfection on pig farms Ireland. *Veterinary Record* 2007; 16: 371-375
34. Madec F; Humbert F; Salvat G; Maris P. Measurement of the residual contamination of post-weaning facilities for pigs and related risk factors. *Journal of Veterinary Medicine* 1999; Series B 46: 37-45
35. Amass SF; Kelly JA. Development and implementation of an on-farm cleaning and disinfection audit. Research report swine health. Pork checkoff. Purdue University 2000
36. Kelly JA; Amass SF; Ragland D; Spicer P.M; Alvarez R.M. Analysis of lightning and Bioclean tests for assessment of sanitation levels in pork production facilities. *J Swine Health Prod.* 2001; 9(5): 207-213
37. Tamasi G. Testing disinfectants for efficacy. *Rev. Sci. Tech.* 1995; 14: 75-79
38. Poulis J. A; Pijper M; Mossel D. A. A. Assesment of cleaning and disinfection in the food industry with the rapid ATP bioluminescence technique combined with the tissue fluid contamination test and a conventional microbiological method. *International Journal of Food Microbiology.* 1993; 20: 109-116
39. Cais-Sokolinska D; Pikul J. Using the bioluminescence and microbiological contac methods in sustaining a proper hygienic level in food processing plants. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 2008; 7(4): 53-60
40. Leach FR, Webster JJ. Commercially available firefly luciferase reagents. In DeLuca MA, McElroy WD. *Bioluminescence and chemiluminescence-Methods in Enzimology.* Academic Press Inc. Orlando 1986; 133:5170
41. Girotti S, Ferri E, Fini F, Rigletti S, Bolelli L, Budini R, Lasi G, Roubal P, Fukal L, Hochel I Rauch P. Determination of microbial contamination in mil by ATP assay. *Czech Journal of food Science* 1997; 15: 241-248

42. Cross J. Harnessing the firefly. *Food Manufacture* 1992; 67:25
43. Finger R; Sisco WM. J. Bioluminescence as a technique to evaluate udder preparation. *Dairy Sci.* 2001; 84:818-823
44. Chinchilla A.C; Zbiskó T; Luning P; Rovira J. Comparison of bioluminescence assay and microbiological swabbing method to assess contamination of food contact surfaces in restaurants. *Food Micro 2008 Conference. The 21st International ICFMH Symposium "Evolving Microbial Food Quality and Safety" Septiembre 1 –4 Aberdeen, Escocia 2008; Poster session DD Ready to eat food; PDD21.*
45. Green T; Rusell S; Fletcher D. Effect of checmical cleaning agents and commercial sanitizers on ATP bioluminescence measurements. *J Food Prot* 1999; 62: 86-90
46. Ramsay C. An overview of rapid hygiene testing using ATP bioluminescence. *Biotrace Intenational 2002.* Disponible en: www.biotrace.com