

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EFFECTO DE LA INCLUSIÓN DE BACTERIOFAGOS EN DIETAS
SORGO-PASTA DE SOYA PARA GALLINAS BOVANS WHITE
SOBRE EL COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

PAULINA GUZMÁN KUBLI

Asesores:

MVZ, MC. Analía Balderas González

MVZ, MSc. Ernesto Ávila González

Cd. Mx

2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

Le dedico mi trabajo mis papás Luis Guillermo Guzmán Aguilar y Adriana Kubli Hernández quienes siempre han estado a mí lado apoyándome incondicionalmente en cada una de mis decisiones, además de brindarme los consejos necesarios para poder lograr mis objetivos. Siempre me han motivado e impulsado a ser mejor cada día, a no rendirme nunca y luchar por lo que quiero.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Luis Guillermo Guzmán Aguilar, Adriana Kubli Hernández y hermano Luis Guzmán Kubli por todo el apoyo, motivación y consejos que me brindaron tanto en este proyecto como a lo largo de mi formación profesional.

A mi abuelo Guillermo Kubli Sarmiento por la inspiración y la motivación que me dio a lo largo de la carrera.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y profesores por la formación y conocimiento que me transmitieron.

Al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola por el apoyo y conocimiento que me brindaron.

Al Dr. Ernesto Ávila González y Dra. Analía Balderas González, por el apoyo, las asesorías y la dedicación que me proporcionaron a mí y al trabajo que realice.

Al Dr. Arturo Cortés Cuevas por el tiempo y dedicación que le brindó a mi trabajo, además de las asesorías y los consejos que me proporcionó.

Al Dr. Benjamín Fuente Martínez por los consejos, conocimientos y asesoramientos que me brindo.

A la participación de la empresa CTCBIO INC por la cual pude realizar éste proyecto.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
MATERIAL Y MÉTODOS.....	14
RESULTADOS.....	18
DISCUSIÓN.....	20
CONCLUSIONES.....	22
REFERENCIAS.....	23
CUADROS.....	26
ANEXOS.....	29

RESUMEN

GUZMÁN KUBLI PAULINA. Efecto de la inclusión de bacteriófagos en dietas sorgo-pasta de soya para gallinas Bovans White sobre el comportamiento productivo (bajo la dirección de: MVZ, MC Analía Balderas González y MVZ, MSc. Ernesto Ávila González).

Debido a la prohibición de los antibióticos como promotores de crecimiento en la alimentación animal, existe el interés de evaluar la habilidad de los bacteriófagos como alternativa para disminuir o controlar la carga de bacterias patógenas en las gallinas ponedoras. Para tal fin, se desarrolló una prueba experimental con 216 gallinas Bovans White de 30 semanas de edad alojadas en jaulas tipo California dentro de una caseta de ambiente natural durante 8 semanas, las aves se alimentaron con dietas base sorgo + soya enriquecidas, según los siguientes tratamientos: T1- Testigo: sin Bacitracina ni bacteriófago, T2- Como 1+ Bacitracina de Zn 250ppm, T3- Como 1 + 500ppm de bacteriófagos[®] T4 Como 1 + 1000ppm de bacteriófagos[®]. Cada tratamiento constó de 6 réplicas con 9 gallinas cada una distribuidas en un diseño completamente al azar, tanto la dieta como el agua se ofrecieron *ad libitum*. Al concluir los 54 días de experimentación se observó un comportamiento similar ($P>0.05$) entre los tratamientos para las principales variables de interés; porcentaje de postura (97.2, 97.8, 98.1, 97.6), peso de huevo (59.3, 59.6, 59.2, 59.1), consumo de alimento (105.7, 104.6, 103.5, 105.3), conversión alimentaria (1.829, 1.796, 1.783, 1.827) y masa de huevo (57.8, 58.3, 58.1, 57.6). Los resultados de la cuenta de bacterias mesófilas en cascarón indicaron ser diferentes ($P<0.05$) entre tratamiento: M (392.5^a, 390.8^a, 156.2^b, 388.3^a). Sin embargo para el conteo de coliformes no existió diferencia ($P>0.05$) entre tratamiento: C (87.9, 65.8, 54.2, 70). Se concluye de este estudio que los bacteriófagos son una alternativa viable como reemplazo de promotor de crecimiento en dietas para gallina a una inclusión de 500 ppm.

INTRODUCCIÓN

Los antibióticos se han utilizado en la investigación animal casi desde el momento de su descubrimiento y su uso se ha iniciado en la alimentación animal como agentes terapéuticos y promotores de crecimiento (Joerger, 2003).

En la producción avícola, el uso de antimicrobianos en la alimentación a dosis sub-terapéuticas ha sido una práctica tradicional para la prevención de infecciones del tracto gastrointestinal y el mejoramiento del desempeño productivo (Grant *et al*, 2016). Por ejemplo, la bacitracina de zinc, es un antibiótico ampliamente utilizado como promotor de crecimiento en pollo de engorda y gallinas ponedoras por ser muy efectivo para modificar la composición de la microbiota bacteriana a nivel intestinal, mejorar la absorción de nutrientes y por lo tanto reflejar mejores ganancias de peso en el animal (Gong *et al*, 2008).

Sin embargo, el uso de antimicrobianos a dosis sub-terapéuticas así como el abuso en dosis terapéuticas, se ha asociado al desarrollo de resistencia antimicrobiana haciendo menos efectivos a los tratamientos de elección (Grant *et al*, 2016; WHO, 2014). Aunque el esfuerzo de las compañías farmacéuticas para desarrollar nuevos antibióticos y contrarrestar la tendencia ha sido importante, se ha demostrado que medio siglo de abuso de antibióticos a nivel mundial ha equipado a las bacterias sobrevivientes con “transferencia de genes”, lo que las ha hecho hábiles para resistir rápidamente nuevas clases de antibióticos, incluso a aquellos a los que nunca han sido expuestos (Carlton, 1999). Según Dofour

(2017), el continuo incremento de la resistencia bacteriana junto con las enfermedades infecciosas en humanos ha exigido tanto a médicos, investigadores y políticos a buscar alternativas viables al uso de los antibióticos para prevenir y controlar de igual forma los agentes infecciosos.

En el caso de la salud animal, especialmente en los animales de abasto, como las aves, una estrategia alternativa para prevenir y controlar las infecciones en la avicultura comercial pudiera ser el uso de bacteriófagos como método de bio-control contra bacterias patógenas (Grant *et al*, 2016).

Los bacteriófagos también llamados fagos son consumidos de manera regular a través del agua y el alimento, no se han reportado casos de efectos indeseables. Además, gracias a su especificidad los hacen una excelente herramienta para la inocuidad alimentaria (Mahony y M^cAuliffe, 2010).

En las ultimas 2 décadas se ha dirigido la evaluación del uso de fagos para eliminar bacterias indeseables, ya que la terapia de estos representa una alternativa debido a su crecimiento exponencial y la habilidad para mutar contra la resistencia bacteriana (Carlton, 1999; Mahony y M^cAuliffe, 2010).

Por ejemplo, Smith y Huggins (1982) demostraron que en ratas inoculadas intramuscularmente por una dosis letal de *E. coli* fue más efectivo aplicar una sola dosis de bacteriófagos que múltiples inyecciones de antibióticos. Posteriormente Levin y Bull (1997) replicaron el mismo experimento usando un modelo matemático para estudiar el título de fagos y bacterias en los animales, y encontraron que una sola inyección de fagos era mejor debido a que los

bacteriófagos crecen exponencialmente en número de acuerdo a las bacterias presentes.

Por tal razón, la terapia de fagos representa una herramienta potencial para el control bacteriano y quizás sean usados como primera opción cuando otros medios más baratos como los antibióticos convencionales ya no tengan el efecto esperado (Joerger, 2003).

¿Qué es un bacteriófago?

Los bacteriófagos son virus que infectan y se multiplican en las bacterias. La liberación en el medio ambiente de dichos virus después de la replicación se acompaña de la lisis de la bacteria huésped (Joerger, 2003). Es decir, se trata de parásitos intracelulares obligados que se multiplican dentro de la bacteria utilizando sus requerimientos esenciales, una vez adentro comienzan a replicarse causando la desintegración de la misma (Grant *et al*, 2016; Zhao *et al*, 2012).

La International Committee for Taxonomy of Viruses (ICTV) clasifica a los virus dentro de tres órdenes, 61 familias y 241 géneros. Los bacteriófagos constituyen un orden, 13 familias y 30 géneros (Ackermann, 2003). Representan una de las entidades biológicas más abundantes en la naturaleza y han sido reconocidas por su potencial uso como agentes terapéuticos (Mahony y McAuliffe, 2010).

Los bacteriófagos generalmente son entes muy estables y sobreviven relativamente bien al almacenamiento. Por ejemplo un título de 10^9 unidades formadoras de placa (cfu) de fagos de *Salmonella* mezclado con el alimento

peletizado de pollos decreció por aproximadamente 2 órdenes de magnitud en 14 días a 37°C (Sklar y Joerger, 2001).

Tipos de bacteriófago

Los bacteriófagos pueden tener un ciclo lítico o lisogénico.

Los fagos líticos son la opción más adecuada debido a su rápida replicación provocando la lisis de la bacteria. Dependiendo de las condiciones cada virus “padre” puede producir aproximadamente 200 “hijas” en el primer ciclo, habrá cerca de 40 000 progenies al final del segundo ciclo, ocho millones al final del tercer ciclo, 1.6 billones al final del cuarto ciclo y así consecutivamente (Carlton, 1999).

A la vez, los fagos que poseen un ciclo lisogénico han demostrado la habilidad de integrar algunos genomas y replicarse junto al de la bacteria introduciendo potencialmente nuevos rasgos o modificando la expresión de los del huésped (Joerger, 2003).

Los fagos poseen ciertos atributos que les confieren ventaja desde el punto de vista terapéutico:

1) Especificidad del hospedero: esta característica hace a los bacteriófagos muy atractivos por su alta naturaleza discriminatoria, la mayoría de los fagos conocidos son especialistas en interactuar únicamente con un grupo selecto de bacterias que expresan sitios específicos de unión (Joerger, 2003). Es una gran ventaja que estos no maten otras especies de bacterias, ya que hace poco probable que mate

flora saludable del intestino, pulmones o tracto urogenital, y en consecuencia ocasiona enfermedades (Carlton, 1999).

2) Ingeniería genética: es posible que genéticamente los fagos puedan expresar nuevos rasgos de valor potencial (Carlton, 1999), en especial los fagos lisogénicos ya que junto con el genoma bacteriano, las secuencias de ADN de fagos pueden participar en eventos de recombinación, dando lugar a modificaciones (Joerger, 2003).

3) Candidatos ideales para la co-terapia con antibióticos: si una bacteria adquiere la habilidad de crear resistencia contra el antibiótico es poco probable que pueda desarrollar resistencia contra el bacteriófago y viceversa. Si la bacteria es expuesta a ambos agentes las posibilidades son remotas de que cualquier gen de resistencia comience a expresarse o adquiera una nueva (Carlton, 1999).

Existen reportes de que la bacteria tiende a mutar en contra de los antibióticos cada 10^6 divisiones, mientras que tiende a mutar contra los bacteriófagos cada 10^7 divisiones. En consecuencia las posibilidades de que una bacteria mute en contra del bacteriófago y de un antibiótico al mismo tiempo sería producto de una división $10^6 \times 10^7$, esto significa que posiblemente le tome a la bacteria 10^{13} divisiones, lo que conlleva a que ocurra una doble mutación. Dada esa baja probabilidad, la co-administración de fagos y antibióticos puede ayudar a prevenir de emergencia la resistencia bacteriana prolongando así su utilidad clínica y viceversa (Carlton, 1999).

Descubrimiento y uso terapéutico

Los bacteriófagos también llamados fagos, fueron descubiertos en 1915 por el microbiólogo británico Felix Twort (Carlton, 1999) e independientemente en 1917 por Felix d'Hérelle un francés canadiense que trabajaba en el Instituto Pasteur de Paris, quien observó la lisis de cultivos y le asignó el término "Bacteriófago", adicionalmente ideó varias técnicas aún en uso y postuló la replicación intracelular de virus introduciendo la terapia de fagos con enfermedades infecciosas (Ackermann, 2003).

Durante su descubrimiento tres fueron las principales problemáticas a las que los investigadores se enfrentaron: 1) la contaminación bacteriana en la preparación de los fagos, 2) la desnaturalización de las proteínas de la cubierta del bacteriófago y; 3) la rápida eliminación de los fagos por una supuesta inactivación de anticuerpos preexistentes (Carlton, 1999).

En 1950 se demostró la habilidad de algunos genomas del bacteriófago que podían integrarse en el cromosoma de la bacteria como "pro-fagos". Y en este contexto, es probable que algunos ensayos de fagos tuvieran un resultado negativo debido al uso inadvertido de cepas lisogénicas las cuales no podrían proporcionar la lisis rápida y el crecimiento exponencial en el número que se necesitan para la eficacia completa (Carlton, 1999).

En cuanto a la inactivación por anticuerpos, Merrill (1996) observó que los fagos permanecían viables en el bazo durante 7 días en los animales de estudio, indicando que éstos no fueron neutralizados por anticuerpos o por macrófagos,

aparentemente fueron atrapados pasivamente por este órgano filtro, lo cual inhabilita al fago para poder alcanzar a la bacteria, que finalmente descartaba la interacción con anticuerpos preexistentes. La solución de este problema constó en observar que en todas las especies de fagos, la menor variación en la cubierta de proteínas ayuda a que estos no sean reconocidos por los órganos de sistema retículo endoplásmico (RES) y puedan permanecer periodos más largos en la circulación. Un método para lograr esto fue inyectar fagos en animales y tomar muestras de sangre en ciertos periodos de tiempo, cualquier fago encontrado en las muestras era tomado, “reproducido” e inyectado nuevamente (Carlton, 1999).

De 1950 a 1980 hubo pocas publicaciones, la euforia inicial sobre el fago como agentes terapéuticos se disipó con el inicio de la era del antibiótico hasta que se comenzó a demostrar la utilidad y eficacia de la terapia de los fagos, por ejemplo: se mostró la efectividad rescatando ratas de infecciones sistémicas infectadas con *E. coli*; terneros y corderos con procesos diarreicos fatales; pollos con diarreas inducidas por *S. typhimurium* y conejos contaminados con *Pseudomonas aeruginosa* en injertos de piel (Carlton, 1999).

Interacción con anticuerpos

Aunque; la penetración del fago y la presencia en diversos tejidos puede variar dependiendo de la ruta de administración y del animal (Górski y Dabrowska, 2005; Merrill, 1996). Se ha observado que tras la administración endovenosa de los fagos, estos se integran al sistema circulatorio; mientras que, el resto, es retenido

por el hígado y bazo. Aquellos fagos que prevalecen en el sistema circulatorio son susceptibles a ser atacados por anticuerpos.

Existen reportes en la literatura donde los anticuerpos aparecen semanas después de administrar fagos en humanos y animales. Aunque no parece probable que interfieran en un tratamiento agudo que dura una semana, si es posible que en tratamientos crónicos o con uno recurrente de la misma infección bacteriana, los anticuerpos puedan prevenir que una porción de los fagos administrados no se adhiera a la bacteria. En este caso es posible administrar una dosis elevada de bacteriófagos para compensar a aquellos que son neutralizados por los anticuerpos (Carlton, 1999).

Bacteriófagos en el intestino

Un gran número de reportes describe la presencia de fagos en heces de animales y humanos, de hecho Hoshua Lederberg (ganador de premio Nobel) ha observado que los fagos están comúnmente presentes junto con sus bacterias hospedadoras en la parte inferior del intestino. La presencia de fagos en el tracto gastrointestinal sugiere que bajo ciertas circunstancias pueden cruzar la barrera epitelial y entrar a los nódulos linfáticos mesentéricos, al bazo, al hígado (órganos que son los principales responsables de la depuración del fago) y alcanzar el torrente sanguíneo (fagemia) pasando por el sistema circulatorio periférico y migrando hacia el sitio de infección (Górski y Dabrowska, 2005).

Los fagos de coliformes y enterobacterias son resistentes a ácidos arriba de un pH de 3, con un pH más bajo de 2.5 su actividad rápidamente disminuye, esto puede

prevenirse proporcionando dietas alcalinas o alimentos que neutralizan el ácido gástrico, por lo tanto se cree que los fagos deben darse junto con el alimento, sin embargo hay que tener en cuenta que los diferentes fagos pueden tener una susceptibilidad distinta a los ácidos gástricos y biliares (Górski y Dabrowska, 2005).

Justificación

El Centro de Control de Enfermedades y Prevención (CDC), ha reportado que la principal causa de muerte por alimentos son causadas por las bacterias patógenas de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella entérica*, siguiendo de cerca a *E. coli* enterotóxica y *Campylobacter jejuni*. Las bacterias patógenas con amplio espectro que son resistentes a los antibióticos se han convertido en un peligro considerable para la salud pública, particularmente para las personas mayores y jóvenes inmuno-comprometidos (Mahony y M^cAuliffe, 2010).

Los modelos animales son un paso inicial importante para ayudar a determinar condiciones experimentales potenciales en la línea, tales como la ruta y el momento de administración (Flaherty *et al*, 2009).

Debido a la prohibición de los antibióticos como promotores de crecimiento en la alimentación animal, se busca emplear un método más eficiente de origen natural como alternativa para disminuir la carga de bacterias patógenas en las gallinas de postura. Los bacteriófagos son agentes prometedores que podrían complementar y en algunas ocasiones remplazar a los antibióticos promotores del crecimiento o terapéuticos concurrentes (Joerger, 2003).

Hipótesis

El comportamiento productivo de las gallinas Bovans White de primer ciclo, será similar utilizando un bacteriófago comparado con Bacitracina de Zn, además reducirá la carga bacteriana en el cascarón de huevo.

Objetivo general

Evaluar la inclusión de bacteriófagos y Bacitracina de Zn en dietas a base sorgo-soya para gallinas de postura Bovans White, sobre el comportamiento productivo y la reducción de la carga bacteriana del cascarón en el huevo.

Objetivos particulares

- 1) Evaluar los parámetros productivos de las aves los cuales son; porcentaje de postura, peso promedio del huevo, consumo de alimento, conversión alimentaria y masa de huevo.
- 2) Evaluar la calidad de huevo respecto a las variables de huevo sucio, huevo roto y huevo en fáfara.
- 3) Realizar una cuantificación de la carga bacteriana en el cascarón.
- 4) Monitorear el peso de las gallinas al inicio y término de la prueba.

MATERIAL y MÉTODOS

El experimento se realizó dentro del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (CEIEPAv) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México. Ubicado en la calle de Manuel M. López s/n, Avenida Tláhuac, km 21.5, Colonia Zapotitlán, Delegación Tláhuac, en México DF. La altura es de 2,250 msnm, con una temperatura media anual de 18°C y una precipitación pluvial de 747 mm, con una superficie de 48,470 m² (FMVZ.UNAM).

El número de animales que se utilizaron fueron 216 gallinas Bovans White de primer ciclo con 30 semanas de edad y 11 semanas de producción en jaulas de 2 niveles con 3 gallinas cada en una caseta de ambiente natural. Durante el experimento se utilizaron 4 tratamientos con 6 réplicas de 9 gallinas cada una distribuidos en un Diseño Completamente al Azar, proporcionándoles agua y alimento *ad libitum*. La dieta basal o testigo fue formulada de acuerdo al ciclo productivo de la gallina siguiendo las recomendaciones del manual de la estirpe cubriendo sus necesidades nutricionales con una base de sorgo+pasta de soya **Cuadro 1.**, adicionando los productos a estudiar a la dieta por tratamiento. La presentación de los alimentos fueron en harina.

Tratamientos o dietas experimentales:

- 1.- Testigo: sin Bacitracina ni bacteriófago
- 2.- Como 1+ Bacitracina de Zn 250ppm

3.- Como 1 + 500ppm de bacteriófagos [®] CTCBIO Xolution

4.- Como 1 + 1000ppm de bacteriófagos [®] CTCBIO Xolution

Para comenzar la prueba se seleccionó aleatoriamente una gallina por jaula (3 por réplica), las cuales representan el 33% del total de animales y se pesaron, se repitió este procedimiento al finalizar la prueba con la finalidad de medir la ganancia o pérdida de peso de las aves.

Durante los 56 días de la prueba, se resumieron semanalmente los parámetros productivos de porcentaje de postura, peso promedio del huevo, masa de huevo ave/día, porcentaje de huevo roto, fáfara y sucio, conversión alimenticia y consumo de alimento ave/día, además se realizó calidad interna y externa de 20 huevos por tratamiento al finalizar, donde se midió el peso, grosor de cascarón, unidades Haugh y color de yema. La carga bacteriana del cascarón, se determinó tomando 40 muestras por tratamiento, cada huevo fue colocado en una bolsa procurando que éste no tuviera contacto con ningún objeto externo a la jaula para evitar contaminación, los huevos fueron identificados por Tx y réplica, se colocaron en una hielera con refrigerantes para su determinación como se señala a continuación.

El experimento se realizó según un diseño completamente al azar con el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{(ij)}$$

$i = 1, 2, 3, 4$

$j = 1, 2, 3, 4, 5, 6$

Dónde:

Y_{ij} = variable de respuesta (porcentaje de postura, peso de huevo (g), masa de huevo ave/día (g), consumo de alimento ave/día (g), índice de conversión alimentaria, porcentaje de huevo sucio, roto y sin cascarón (fárfara).

μ = media general, T_i = Efecto del i -ésimo tratamiento, $\varepsilon_{(ij)}$ = Error experimental.

Las diferencias entre las medias se compararon mediante la prueba de Tukey con una significancia de $P < 0.05$ (Kuehl, 2001).

Laboratorio

Las muestras se trabajaron en el Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, y fueron enviadas en bolsas de plástico de forma individual de manera estéril para su procesamiento e identificadas adecuadamente. Se depositó 9ml de PBS estéril en cada bolsa, se frotaron las paredes externas del cascarón de cada huevo para suspender en el líquido todas las partículas presentes en la superficie de éstos, se dejó reposar durante 5 minutos y se homogenizó la suspensión con ayuda de una pipeta, se realizaron diluciones décuples (1:10) desde 10^{-1} a 10^{-6} por cada huevo, se depositaron 3 gotas de 20µl cada una en cajas de Petri conteniendo Tripteína Soya Agar (TSA) y Agar MacConkey (McC), utilizando dos cajas divididas en tres porciones en la que cada división corresponda a cada dilución. Se dejó reposar para permitir que las gotas se absorban en el agar para posteriormente voltear las cajas. Éstas se incubaron a 36-38°C por 18 a 24 horas, posteriormente se realizó el conteo bacteriano de las cajas de TSA, McC. Se realizaron las operaciones necesarias para ajustar el resultado en unidades formadoras de colonia (UFC) en 1 ml o gramo de muestra.

RESULTADOS

Los datos obtenidos para las variables productivas en estudio en ocho semanas de experimentación en gallina de postura Bovans White alimentadas con dietas convencionales, y adicionadas con la mezcla de bacteriófagos, se muestran en el **Cuadro 2**, en donde se aprecian, que los valores promedio para porcentaje de postura, peso de huevo, consumo de alimento, masa de huevo y conversión alimentaria, no mostrarán diferencias estadísticas entre tratamientos ($P>0.05$).

En el caso del número de huevos totales producidos por tratamiento, las dietas con bacteriófagos fueron mayores que el resto de los tratamientos ($P<0.05$). Para la determinación de calidad del huevo que consistió en: porcentaje de huevo sucio con heces, huevo en fáfara y huevo roto, tampoco se detectaron diferencias estadísticas significativas ($P>0.05$) entre tratamientos, tal como se aprecia en el **Cuadro 3**.

Respecto a los resultados correspondientes a Unidades Haugh, pigmentación y grosor de cascarón, se muestran en el **Cuadro 4**. Puede apreciarse que los tratamientos se comportaron de manera similar, sin existir diferencias atribuibles a ninguno de los tratamientos ($P>0.05$).

Para los resultados obtenidos del análisis de la carga bacteriana promedio para mesófilos y coliformes muestreadas en el cascarón del huevo y reportadas por mililitro, se muestran en el **Cuadro 5**. Los datos indican que el tratamiento con 500ppm de mezcla de bacteriófagos tuvo la menor cuenta bacteriana para el caso de mesófilos, siendo diferente ($P < 0.05$) y menor a los tratamientos 1,2 y 4. Cabe señalar que en la cuenta de coliformes, no hubo diferencias entre tratamientos ($P < 0.5$), debido en parte a que durante el desarrollo de la prueba experimental prevaleció un buen manejo sanitario de las aves e instalaciones.

DISCUSIÓN

El número de huevos totales producidos por tratamiento fue mayor en la mezcla de bacteriófagos que en el resto y las Unidades Haugh, pigmentación y grosor de cascarón, indican que todos los tratamientos se comportan de manera similar, Zhao *et al.* (2012) reportaron resultados similares en parte a la de este estudio, en el cual se mejoró la producción de huevo y las unidades Haugh, sugiriendo que el descenso de *Salmonella* spp en el tracto gastrointestinal durante el experimento en las gallinas infectadas con la suplementación de bacteriófagos en la dieta dio como resultado mejor producción de huevo y frescura.

Sin embargo Kim *et al.* (2015) no observaron efectos positivos con suplementación de bacteriófagos en la producción del huevo ni en la calidad del mismo, a pesar de que la población de *Salmonella* spp en el contenido cecal si disminuyó. La razón de la diferencia de estos resultados no es clara, sin embargo, puede estar relacionada con las diferencias en el estado de salud, edad de las gallinas y las condiciones del experimento así como la sanidad, componentes de la dieta, niveles de inclusión y composiciones de la mezcla de bacteriófagos (Joerger, 2003).

Los resultados obtenidos del análisis de la carga bacteriana en el cascarón del huevo indicaron en nuestro estudio que el tratamiento con 500ppm de mezcla de bacteriófagos tuvo la menor cuenta bacteriana para el caso de mesófilos, Kim *et*

al. (2015) tuvieron resultados opuestos, ya que en las muestras de contenido cecal de las aves, el número de *Salmonella* spp fue menor para las gallinas alimentadas con la dieta que contenía mayor cantidad de la de mezcla de bacteriófagos pero mayor para las gallinas alimentadas con la dieta basal y con menor cantidad de éstos. Un descenso lineal en el número de *Salmonella* spp fue observado al momento de incrementar la dieta con los niveles de inclusión de bacteriófagos, Zhao *et al.* (2012) también muestra resultados similares.

De manera general, los datos obtenidos en este estudio, corroboran lo encontrado por Kim *et al.* (2015) al adicionar bacteriófagos, de no existir diferencias en gallinas en el comportamiento productivo. Estos autores encontraron también en gallinas infectadas con *Salmonella* spp que los bacteriófagos disminuyeron las poblaciones de estas bacterias pero encontraron poblaciones de *Escherichia coli* en el tracto gastrointestinal de las gallinas pero sin impacto en el comportamiento productivo y calidad del huevo en las gallinas. Lo que sugiere la posibilidad de llenar el espacio vacío con alguna especie bacteriana relacionada taxonómicamente (Rodríguez-Brito *et al.*, 2010; Reyes *et al.*, 2013).

CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos y las condiciones experimentales empleadas, se puede concluir:

- 1) El desempeño productivo y la calidad externa e interna del huevo de gallinas Bovans de 30 a 38 semanas de edad alimentadas con dietas sorgo + soya con bacteriófagos, fue similar al del antibiótico promotor Bacitracina de Zinc.
- 2) En el número de huevos totales producidos por tratamiento, se encontraron resultados superiores cuando se incluyó 500ppm o 1000ppm de la mezcla de bacteriófagos ($P < 0.05$).
- 3) La cuenta bacteriana en el cascarón del huevo para mesófilas, fue mejor con la adición de 500ppm de la mezcla de bacteriófagos.
- 4) La mezcla de bacteriófagos a razón de 500ppm o 1000ppm, resulta ser una alternativa en la dieta de gallinas al promotor de crecimiento Bacitracina de Zinc cuando se utilizó a 250ppm en dietas sorgo + soya.

REFERENCIAS

Ackermann W. 2003. Bacteriophage observations and evolution. *Research in Microbiology*. 154:245-251. DOI:10.1016/S0923-2508(03)00067-6.

Carlton R. 1999. Phage Therapy: Past History and Future Prospects. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 47:267-274.

CDC] Centers for Disease Control and Prevention. 2013. Antimicrobial Resistance Threats in de United States, 2013. <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/> [consulta: 27 oct 2016]

Flaherty O, Paul R, Aidan C. 2009. Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 33:801-819.

[FMVZ] Facultad de Meidcina Veterinaria y Zootectnia. *Centro y su localización geométrica*, Universidad Autónoma de México. <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/centros/ceiepav/localizacion.html> [consulta: 27 sept 2016].

Grant A, Hashem F, Parveen S. 2016. Salmonella and Campylobacter: Antimicrobial resistance and bacteriophage control in poultry. *Food Microb*, 53:104-109.

Gong J, Yu H, Liu T. 2008. Effects of zinc bacitracin, bird age and access to range on bacterial microbiota in de ileum and caeca of broiler chickens. *J Appl Microbiol*, 104:1372-1382.

Górski A, Weber-Dabrowska B. 2005. The potential role of endogenous bacteriophages in controlling invading pathogens. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.*, 62:511-519.

Joerger R. 2003. Alternatives to Antibiotics: Bacteriocins, Antimicrobial Peptides and Bacteriophages. *Poultry Science*, 82:640-647.

Kim JH, Kim JW, Shin HS, Kim MC, Lee JH, Kim GB, Kil DY. 2015. Effect dietary supplementation of bacteriophage on performance, egg quality and caecal bacterial populations in laying hens. *British Poult Sci.*, 56:1, 132-136, DOI:10.1080/00071668.2014.991272.

Kuehl RO. 2001. Diseño de experimentos. Principios estadísticos de diseño y análisis de investigación. 2ª ed. Arizona: Thomson Learning.

Levin B, Bull J 1997. Phage therapy revisited: the population biology of a bacterial infection and its treatment with bacteriophage and antibiotics. *Am. Naturalis*, 147:881-898.

Mahony J, McAuliffe O. 2010. Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens. *Current Opinion in Biotechnology*.22: 1-7.

Merril C. 1996. Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:3188-2192.

Reyes A, Wu M, McNulty NP, Rohwer FL, Gordon JI. 2013. Gnotobiotic mouse model of phage-bacterial host dynamics in the human gut. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 110:20236-20241. DOI:10.1073/pnas.1319470110.

Rodriguez-Brito, Li L, Wegley L, Furian M, Angly F, Breitbart M, Bichanan J, Desnues C, Dindale E, Edwards R, Felts B, Haynes M, Liu H, Pipson D, Mahaffy J, Martin C, Mira A, Nulton J, Pasic L, Rayhawk S, Rodriguez M, Rodriguez V, Salamon P, Srinagesh S, Thingstad TF, Tran T, Thurber RV, Willner D, Youle M, Rohwer F. 2010. Viral and microbial community dynamics in four aquatic environments. *The international Society of Microbial Ecology Journal*, 4:739-751.

Sklar I, Joerger R. 2001. Attempts to utilize bacteriophage to combat *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection in chickens. *J. Food Safety*, 21:15-29.

Smith H, Huggins R. 1982. Successful treatment of experimental E. coli infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics. *J. Gen. Microbiol*, 128:307-318.

[WHO] World Health Organization. 2014. Antimicrobial Resistance: global report on surveillance.

http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1

[consulta: 27 oct 2016]

Zhao P, Baek H, Kim I. 2012. Effects of bacteriophage supplementation on egg performance, egg quality, excreta microflora and moisture content in laying hens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 25:1015-1020. DOI: 10.5713/ajas.2012.12026.

CUADROS

Cuadro 1. Composición de la dieta basal o testigo empleada para gallina de postura Bovans White de primer ciclo de producción

Ingrediente (s)	Cantidad (Kg)
Sorgo	610.856
Pasta de Soya	244.487
Carbonato de calcio	105.375
Fosfato de calcio	11.126
Aceite vegetal	10.592
Sal	4.390
Klin Sil	3.000
Premezcla de vitaminas y minerales	3.000
Byolis	2.956
DL-Metionina 99%	2.480
Avelut polvo 15	1.000
L-Treonina	0.468
Avired	0.020
Antioxidante	0.150
Ronozyme Hi Phos	0.100
Total (Kg)	1000
Análisis Calculado	
Energía metabolizable kcal/kg	2,780
Proteína cruda %	18.0
Lisina %	0.98
Met + cist %	0.80
Treonina %	0.70
Calcio Total %	4.30
Fósforo disponible %	0.48

Cuadro 2. Resultados productivos en gallinas Bovans White alimentadas con dietas sorgo-soya + Bacitracina Zn y bacteriófago

* No existió diferencia significativa $P>0.05$ en las variables

Tratamientos*	(%) Postura	Peso de huevo (g)	Masa de huevo ave día, (g)	Consumo de alimento ave/día (g)	Conversión alimentaria (Kg:Kg)
T1. Control Negativo, sin Bacitracina ni bacteriófago	97.2	59.3	57.8	105.7	1.829
T2. Como 1+Bacitracina (250ppm)	97.8	59.6	58.3	104.6	1.796
T3. Como 1+Bacteriófago (500ppm) ® CTCBIO Xolution	98.1	59.2	58.1	103.5	1.783
T4. Como 1+Bacterófono (1000ppm)® CTCBIO Xolution	97.6	59.1	57.6	105.3	1.827

Cuadro 3. Datos de huevo sucio, roto y fáfara de gallinas ponedoras Bovans White alimentadas con dietas sorgo-soya + Bacitracina de Zn y bacteriófago por tratamiento en 8 semanas

Tratamientos*	Variable: Huevo				
	Total de huevos	Sucio, %	Roto, %	Fáfara, %	Mortalidad %
T1. Control Negativo, sin Bacitracina ni bacteriófago	2865 ^a	1.2	0.5	0.1	5
T2. Como 1+Bacitracina (250ppm)	2871 ^{ab}	2.0	0.6	0.2	3.7
T3. Como 1+Bacteriófago (500ppm) ® CTCBIO Xolution	2955 ^c	1.4	0.4	0.1	0
T4. Como 1+Bacterófono (1000ppm)® CTCBIO Xolution	2937 ^{bc}	1.7	0.5	0.3	1.8

* No existió diferencia significativa $P>0.05$ en las variables

Cuadro 4. Resultados de Unidades Haugh, color de Yema (índice visual) y Grosor de cascarón de huevos de gallinas Bovans White alimentadas con dietas sorgo-soya + Bacitracina de Zn y bacteriófago

Tratamientos*	Variable: Huevo		
	Unidades Haugh (HU)	Color de yema (DSM)	Grosor de cascarón (micrones)
T1. Control Negativo, sin Bacitracina ni bacteriófago	94.8	9.7	351.2
T2. Como 1+Bacitracina (250ppm)	91.1	10.0	348.9
T3. Como 1+Bacteriófago (500ppm) ® CTCBIO Xolution	93.0	10.2	357.6
T4. Como 1+Bacterófago (1000 ppm)® CTCBIO Xolution	91.5	10.2	354.6

* No existió diferencia significativa $P>0.05$ en las variables

Cuadro 5. Cuenta bacteriana del cascarón de huevos de gallinas Bovans White alimentadas con dietas sorgo-soya + Bacitracina Zn y bacteriófago

Tratamientos*	Variable: Huevo	
	Mesófilas/ml	Coliformes/ml
T1. Control Negativo, sin Bacitracina ni bacteriófago	392.5 ^a	87.9
T2. Como 1+Bacitracina (250ppm)	390.8 ^a	65.8
T3. Como 1+Bacteriófago (500ppm) ® CTCBIO Xolution	156.2 ^b	54.2
T4. Como 1+Bacterófago (1000 ppm)® CTCBIO Xolution	388.3 ^a	70

Las literales indican diferencia estadística significativa ($P<0.05$).

ANEXOS (ANÁLISIS DE VARIANZA)

ANOVA Parámetros de Producción		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
%Post	Entre grupos	3,031	3	1,010	,874	,471
	Dentro de grupos	23,121	20	1,156		
	Total	26,153	23			
Peso	Entre grupos	1,100	3	,367	,322	,809
	Dentro de grupos	22,755	20	1,138		
	Total	23,854	23			
Cons	Entre grupos	17,172	3	5,724	1,094	,375
	Dentro de grupos	104,625	20	5,231		
	Total	121,797	23			
Conver	Entre grupos	,010	3	,003	1,446	,259
	Dentro de grupos	,045	20	,002		
	Total	,054	23			
Masa	Entre grupos	1,718	3	,573	,334	,801
	Dentro de grupos	34,316	20	1,716		
	Total	36,034	23			
%Roto	Entre grupos	,105	3	,035	,362	,781
	Dentro de grupos	1,925	20	,096		
	Total	2,029	23			
%Suci	Entre grupos	2,053	3	,684	1,361	,283
	Dentro de grupos	10,053	20	,503		
	Total	12,105	23			
Uni Hau	Entre grupos	49,219	3	16,406	2,008	,145
	Dentro de grupos	163,418	20	8,171		
	Total	212,637	23			
Grosor	Entre grupos	262,521	3	87,507	,635	,601
	Dentro de grupos	2757,063	20	137,853		
	Total	3019,583	23			
Color DSM	Entre grupos	,841	3	,280	1,349	,287
	Dentro de grupos	4,156	20	,208		
	Total	4,997	23			

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: No. Total de huevos

HSD Tukey

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
13,0	14,0	-,7500	3,1967	,995	-9,478	7,978
	15,0	-11,2500*	3,1967	,008	-19,978	-2,522
	16,0	-9,0000*	3,1967	,041	-17,728	-,272
14,0	13,0	,7500	3,1967	,995	-7,978	9,478
	15,0	-10,5000*	3,1967	,014	-19,228	-1,772
	16,0	-8,2500	3,1967	,069	-16,978	,478
15,0	13,0	11,2500*	3,1967	,008	2,522	19,978
	14,0	10,5000*	3,1967	,014	1,772	19,228
	16,0	2,2500	3,1967	,895	-6,478	10,978
16,0	13,0	9,0000*	3,1967	,041	,272	17,728
	14,0	8,2500	3,1967	,069	-,478	16,978
	15,0	-2,2500	3,1967	,895	-10,978	6,478

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

ANOVA No. Total de huevos	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	783,000	3	261,000	6,385	,002
Dentro de grupos	1144,500	28	40,875		
Total	1927,500	31			

No. Total

HSD Tukey^a

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
13,0	8	358,125		
14,0	8	358,875	358,875	
16,0	8		367,125	367,125
15,0	8			369,375
Sig.		,995	,069	,895

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Cuenta bacteriana de Mesófilos/ ml

ANOVA (ANÁLISIS DE VARIANZA)

ProCMxx	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	18,735	3	6,245	9,169	,000
Dentro de grupos	51,766	76	,681		
Total	70,501	79			

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: ProCMxx

HSD Tukey

(I) tx1	(J) tx1	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
13,0	14,0	-,07446	,26098	,992	-,7600	,6111
	15,0	1,08264*	,26098	,000	,3971	1,7682
	16,0	-,02524	,26098	1,000	-,7108	,6603
14,0	13,0	,07446	,26098	,992	-,6111	,7600
	15,0	1,15710*	,26098	,000	,4715	1,8426
	16,0	,04922	,26098	,998	-,6363	,7348
15,0	13,0	-1,08264*	,26098	,000	-1,7682	-,3971
	14,0	-1,15710*	,26098	,000	-1,8426	-,4715
	16,0	-1,10788*	,26098	,000	-1,7934	-,4223
16,0	13,0	,02524	,26098	1,000	-,6603	,7108
	14,0	-,04922	,26098	,998	-,7348	,6363
	15,0	1,10788*	,26098	,000	,4223	1,7934

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

ProCMxx

HSD Tukey^a

tx1	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
15,0	20	4,6868	
13,0	20		5,7694
16,0	20		5,7947
14,0	20		5,8439
Sig.		1,000	,992

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Cuenta bacteriana de Coliformes/ ml

Descriptivos

ProCEnx x	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
					13,0	20		
14,0	20	2,9971	2,00683	,44874	2,0578	3,9363	,00	5,93
15,0	20	3,2784	1,60060	,35791	2,5293	4,0275	,00	5,46
16,0	20	3,5285	1,35077	,30204	2,8963	4,1607	,00	6,05
Total	80	3,2496	1,73092	,19352	2,8644	3,6348	,00	6,33

ANOVA

ProCEnx	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	2,908	3	,969	,315	,814
Dentro de grupos	233,781	76	3,076		
Total	236,690	79			