

COM-01

## Evaluación de la eficacia de desinfectantes en una incubadora comercial

D. GARGALLO<sup>1</sup>, C. GARCÍA<sup>1</sup>, D. MUÑOZ<sup>2</sup>, E. RUIZ<sup>2</sup> y P. CATALÁ-GREGORI<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Calidad Avícola y Alimentación Animal de la Comunidad Valenciana CECAV, Alquerías del Niño Perdido (Castellón); <sup>2</sup>Laboratorios Zotal, Camas (Sevilla);

\*email: direccion@cecv.es

---

En este trabajo se evaluó la eficacia de un procedimiento de limpieza y desinfección con empleo de varios desinfectantes basados en amonio cuaternario, una combinación de éstos con glutaraldehído, y ácido glicólico, en una incubadora de pollitos de carne. Para ello, se tomaron muestras que fueran representativas de todas las zonas de la incubadora (entrada de huevos, fumigación, clasificación, cámara, incubadoras, nacedoras, sala de vacunación, expedición y camión de transporte) para el análisis de *Salmonella* spp. y mohos.

Se realizaron dos tandas de muestreo. En la primera, se analizaron las muestras tomadas previa a la desinfección y en la segunda, tras dos meses después de la aplicación continuada de los productos. Los diferentes tipos de muestras que se tomaron en cada tanda fueron: placas RODAC para el análisis de mohos en superficies, placas de 90 mm para el análisis de mohos en ambientes, y paños para el análisis de *Salmonella* spp. en superficies y mohos en superficies de huevos.

Antes de la aplicación de los desinfectantes, el 26,7% de muestras de ambientes y el 50% de las muestras de superficies superaron el límite de referencia establecido para mohos, mientras que tras su aplicación este porcentaje disminuyó hasta 13,3% y 7,1% respectivamente. En cuanto al recuento de las muestras de paños tomadas de la superficie de los huevos se obtuvo una reducción del 87,9%. Tanto en la primera tanda como en la segunda no se aisló *Salmonella* spp. en ninguna muestra de superficies.

El empleo de los desinfectantes contribuyó a reducir la cantidad de mohos en las muestras analizadas. No se pudo valorar el efecto frente a *Salmonella* spp. puesto que no se aisló este microorganismo antes del tratamiento.

The effectiveness of a cleaning and disinfecting process including the use of some disinfectants based on quaternary ammonium, a combination thereof with glutaraldehyde, and glycolic acid, in a chicken hatchery was evaluated. Thus, representative samples were taken of all areas of the hatchery (entry of eggs, fumigation, classification, camera, incubators, hatcher, vaccination room, shipping and truck transport) for *Salmonella* spp. and molds analysis.

Two round of sampling were performed. In the first round, the samples taken before disinfection and in the second round the samples taken two months after the continued application of these products. Different kind of samples were taken in each round for analysis: RODAC plates for molds on surface samples, 90 mm plates for mold in the environment and swabs for *Salmonella* spp. surfaces samples and molds on eggs surfaces.

**Before applying disinfectants, 26,7% of environmental samples and 50% of surfaces samples exceeded the established limit for molds, while after application this percentage decreased to 13,3% and 7,1% respectively. For swabs to molds count taken from eggs surface a reduction of 87,9% was obtained. In both rounds *Salmonella* spp. was not isolated in any surface sample. The use of disinfectants helped to reduce the amount of molds in the analyzed samples. It couldn't be assessed the effect against *Salmonella* spp. because it wasn't isolated before treatment.**

---

**Palabras clave:** Desinfectantes; Incubadora; *Salmonella* spp.; Mohos

**Keywords:** Disinfectant; Hatchery; *Salmonella* spp.; Molds

## Introducción

Para el estudio mencionado, se han realizado ciclos de limpieza y desinfección durante dos meses en una incubadora comercial, con aplicación por parte del personal de la misma, con el fin de estimar la reducción en la práctica de la presencia de mohos y *Salmonella* spp. en superficies, ambientes y los propios huevos de incubación.

Entre las patologías que pueden afectar al huevo de incubación resultan particularmente importantes la contaminación por *Salmonella* y por hongos, que en ambos casos pueden ocasionar desde abortos a nacimientos de animales con escasa vitalidad o muerte durante la eclosión, pudiendo además en el caso de *Salmonella* generar animales portadores de la misma (Cox *et al.*, 2000; Ivanovi, 2008; Kim y Kim, 2010).

La legislación actual para el registro y comercialización de desinfectantes en el entorno ganadero dispone de una serie de normas estandarizadas para la evaluación de la eficacia de los desinfectantes de uso en la higiene veterinaria. Dichas normas, elaboradas por el Comité Europeo de Normalización, dividen la evaluación de estos productos en varias fases. Se realiza un primer cribado de los mismos mediante ensayos absolutos de eficacia bactericida o fungicida por medio de las normas: UNE-EN 1040:2006 y UNE-EN 1275:2007, realizadas en suspensión y sin presencia de materia orgánica. En la siguiente fase, los productos son testados conforme a las normas UNE-EN 1656:2010 (bactericida) y UNE-EN 1657:2007 (fungicida), en las cuales los ensayos de suspensión son adaptados a las condiciones de temperatura y presencia de materia orgánica del entorno ganadero. La última fase es comprobada mediante la norma UNE-EN 14349:2013, en este caso exclusivamente bactericida, donde el producto se enfrenta a una prueba de desinfección de superficie en presencia de materia orgánica y una temperatura de 10° C.

Todas estas normas requieren de una disminución de la carga bacteriana superior a logaritmo 5 (4 para productos fungicidas). Sin embargo, la traslación de estos resultados a la desinfección en la práctica puede verse condicionada por el modo de aplicación del producto, la presencia de materia orgánica en rangos muy diferentes a los incluidos en las normas mencionadas o el tiempo de contacto del producto con los materiales, así como la presencia de especies microbianas diferentes a las utilizadas en los ensayos.

En la prueba de la que es objeto el presente estudio, se realizó un esquema de limpieza y desinfección consistente en la aplicación de un detergente para limpieza de instalaciones ganaderas aplicado mediante sistema de espuma a una concentración del 2%, con un tiempo de permanencia de 15 minutos y enjuagado. A continuación, se realizó una aplicación manual, mediante bayeta, de una solución al 0,5% de un desinfectante combinación de glutaraldehído y cloruro de didecil dimetil

amonio. Este sistema de aplicación, poco convencional con respecto a la habitual aplicación de los desinfectantes por pulverización, se realiza para minimizar la presencia de líquidos en el entorno de las incubadoras. Por último, se realizó una desinfección de superficies por vía aérea (DSVA) por medio de un desinfectante formulado con ácido glicólico. Como excepción, la desinfección de las salas de incubación se realizó exclusivamente por sistema DSVA para evitar la introducción de fuentes de humedad exógenas en las mismas.

## Material y métodos

En el presente trabajo se evaluó la eficacia de distintos desinfectantes utilizados en la limpieza y desinfección de una incubadora comercial de pollitos de carne.

Para el desarrollo de la prueba, se tomaron muestras de diferentes zonas de la incubadora en dos etapas distintas: antes de aplicar los productos desinfectantes, y otra después de la aplicación de los mismos. La toma de muestras se realizó de modo que fuera representativa de todas las zonas de la incubadora. Así, se tomaron muestras en: entrada de huevos, fumigación, clasificación/cámara, 10 huevos de un lote aleatorio, incubadoras, nacedoras, proceso, expedición y camión de transporte.

Se tomaron tres tipos de muestras diferentes en las distintas partes de la incubadora para realizar un control ambiental y de superficies, y posteriormente se analizaron en el laboratorio (CECAV). Estas muestras fueron:

- Paños de superficies (investigación de *Salmonella* y mohos en superficie huevos)
- Placas RODAC para determinar la presencia de mohos en superficies
- Placas preparadas de 90 mm de ambientes para determinar la presencia de mohos

Se tomaron un total de 120 muestras para la realización de la prueba, las cuales, se dividieron en dos tandas. En la primera tanda se tomaron 60 muestras antes de la aplicación de los desinfectantes. En la segunda tanda se tomaron las otras 60 muestras, dos meses después de la aplicación y uso continuado de dichos productos. En ambas tandas, las muestras se tomaron en los mismos puntos de las distintas zonas de la incubadora para comparar los resultados, antes y después de la aplicación de los desinfectantes. Así, para cada una de las tandas se tomaron:

- 28 placas RODAC de superficies para mohos
- 15 placas preparadas de 90 mm de ambientes para mohos
- 1 paño de un lote de huevos para mohos
- 16 paños de superficie para *Salmonella*

Todas las muestras se guardaron en refrigeración hasta llevarlas al laboratorio y comenzar con el proceso de ensayo.

Para las muestras de superficies se utilizaron placas RODAC (de 25 cm<sup>2</sup>) para realizar el recuento de mohos. El proceso de toma de muestras se llevó a cabo abriendo la placa RODAC y poniendo en contacto el medio de cultivo de la placa con la zona de la superficie a analizar, cerrando la placa al finalizar el contacto. Se utilizó una placa RODAC en cada uno de los puntos analizados.

Las muestras de ambientes para mohos se tomaron con placas comerciales de 90 mm con medio de cultivo Sabouraud. Para ello, se abrió una placa en cada uno de los puntos elegidos durante 30 minutos en las condiciones habituales de trabajo de la zona. Pasado este tiempo, se cerraron las placas.

Además, se tomó una muestra de superficie de un lote de huevos al azar en las dos tandas. Para ello se tomó un paño que se pasó por la superficie de 10 huevos al azar almacenados en la cámara. Una vez tomada la muestra se guardó para procesarla. En el laboratorio, al paño de superficie se le añadieron 225 ml de agua de peptona (dilución 1:10) y se homogeneizó en el Stomacher durante 30 segundos. A partir de esta dilución, se sembró 0,1 ml sobre la superficie bien seca de Sabouraud contenido en la placa de Petri. Se diseminó con asa Drigalsky previamente esterilizada y se cerró la placa.

Todas las placas para el recuento de mohos, se incubaron de manera invertida a  $25 \pm 1$  °C durante un periodo de 4 a 6 días. Una vez transcurrido este tiempo de incubación, se procedió al recuento de colonias crecidas.

También se tomaron paños de superficies para investigación de *Salmonella* en las 2 tandas de la prueba. Los paños se procesaron según la Norma ISO 6579:2002/AMD 1:2007 para la investigación *Salmonella* spp. En primer lugar, se realizó el preenriquecimiento no selectivo de las muestras en una dilución 1:10 en agua de peptona incubando a  $37 \pm 1$  °C durante  $18 \pm 2$  horas. Se transfirió 100 µl de la muestra enriquecida, en tres gotas, a una placa de medio Rappaport-Vassiliadis semisólido modificado (MSRV) y se incubó a  $41,5 \pm 1$  °C durante  $24/48 \pm 3$  horas. Se consideraron muestras sospechosas aquellas que presentaron halo en los puntos de inoculación de la muestra. A partir del cultivo obtenido, se sembraron los dos medios sólidos selectivos: XLD (Xilosa-lisina-desoxicolato) y ASAP (AES *Salmonella* Agar Plate), que se incubaron a  $37 \pm 1$  °C durante  $24 \pm 3$  horas. Se seleccionaron 5 colonias sospechosas de XLD y ASAP, que se cultivaron en agar nutritivo a  $37 \pm 1$  °C durante  $24 \pm 3$  horas. Finalmente, la confirmación bioquímica se realizó con tira API 20E (Biomérieux). De acuerdo con la norma ISO 6579, tras la confirmación bioquímica de las colonias sospechosas de pertenecer al género *Salmonella*, hay que realizar la confirmación serológica (Patrick, 2007).

## Resultados y discusión

Las siguientes tablas muestran los resultados de la Tanda 1, antes de la aplicación de los productos, y Tanda 2, después de la aplicación y uso continuado de los productos desinfectantes durante 2 meses. Además, también se detallan las zonas donde se tomaron las muestras en la incubadora.

En la tabla 1 se presentan los resultados de los paños de superficies para la investigación de *Salmonella* spp. El resultado se expresa como Ausencia o Presencia/paño.

**Tabla 1. Paños de superficie para investigación de *Salmonella* spp**

ZONA	PUNTO	Resultado Tanda 1	Resultado Tanda 2
Clasificación cámara	Pared	Ausencia	Ausencia
Clasificación cámara	Mesa	Ausencia	Ausencia
Entrada huevos	Pared	Ausencia	Ausencia
Entrada huevos	Pared fumigación	Ausencia	Ausencia
Entrada huevos	Mesa	Ausencia	Ausencia
Fumigación	Pared	Ausencia	Ausencia
Fumigación	Carro	Ausencia	Ausencia
Incubadora	Pared	Ausencia	Ausencia
Incubadora	Techo	Ausencia	Ausencia
Nacedora	Pared	Ausencia	Ausencia
Nacedora	Techo	Ausencia	Ausencia
Proceso	Ventana carrusel	Ausencia	Ausencia
Proceso	Carrusel	Ausencia	Ausencia
Proceso	Cinta carrusel	Ausencia	Ausencia
Sala expedición	Puerta expedición	Ausencia	Ausencia
Camión	Pared	Ausencia	Ausencia

En la tabla 2 se presentan los resultados de las placas de ambientes tomadas en la incubadora para el recuento de mohos. El resultado se expresa como ufc/placa.

**Tabla 2. Placas de ambientes para recuento de mohos**

ZONA	PUNTO	Resultado Tanda 1	Resultado Tanda 2
Entrada huevos	Entrada huevos	<1	<1
Fumigación	Fumigación	<1	1,0
Clasificación cámara	Entrada	<1	1,0
Clasificación cámara	Salida	<1	<1
Incubadora X	Dentro	1,0	8,0
Zona incubadoras	Mesa de pesadas	1,0	<1
Incubadora	Fuera	8,0	<1
Incubadora Y	Dentro	2,0	1,0
Nacedora	Fuera	<1	2,0
Nacedora	Dentro	3,0	2,2·10 <sup>2</sup>
Proceso	Proceso	6,0	1,0
Vacunación	Carrusel	6,0	1,0
Expedición	Bomba de presión	2,0	1,0
Expedición	Salida pollitos	1,0·10 <sup>1</sup>	1,0
Sala carros	Sala de carros	3,0	3,0

En la tabla 3 se presentan los resultados de las muestras de superficies tomadas para el recuento de mohos. El resultado se expresa como ufc/cm<sup>2</sup>.

**Tabla 3. Placas de superficie para recuento de mohos**

ZONA	PUNTO	Resultado Tanda 1	Resultado Tanda 2
Clasificación cámara	Pared fumigación	2,0	<1
Clasificación cámara	Pared fumigación	1,0	<1
Clasificación cámara	Techo	<1	<1
Clasificación cámara	Carro	<1	<1
Clasificación cámara	Mesa	7,0	<1
Entrada huevos	Pared	2,4	<1
Entrada huevos	Pared fumigación	1,2	1,0
Entrada huevos	Marco puerta huevos	<1	<1
Entrada huevos	Mesa	7,0	1,2
Fumigación	Pared entrada huevos	2,0	<1
Fumigación	Cámara	<1	<1
Fumigación	Marco puerta	<1	<1
Fumigación	Carro	1,0	<1
Incubadora	Pared izquierda	5,0	<1
Incubadora	Pared derecha	3,0	<1
Incubadora	Techo	<1	<1
Incubadora	Suelo	3,0	<1
Nacedora	Pared izquierda	<1	<1
Nacedora	Pared derecha	<1	<1
Nacedora	Techo	<1	<1
Nacedora	Suelo	<1	<1
Proceso	Ventana carrusel	<1	<1
Carrusel	Lado puerta	21,0	<1
Carrusel	Lado expedición	3,0	<1
Expedición	Cinta carrusel	4,0	<1
Expedición	Puerta	2,2·10 <sup>1</sup>	1,2
Camión	Pared	<1	<1
Camión	Suelo	1,2	<1

En los paños de superficie tomados de un lote de huevos al azar, el resultado del recuento de mohos antes de la aplicación de los productos fue de 8,3 ufc/huevo, mientras que el resultado después de la aplicación y uso continuado, fue de 1,0 ufc/huevo.

En ninguna de las 2 tandas se aisló *Salmonella* spp. en las muestras de superficies, por tanto no es posible valorar la eficacia de estos productos frente a *Salmonella* spp.

Para el recuento de mohos, se han establecido unos valores de referencia internos. Así, se considera una contaminación aceptable o baja por hongos un valor de  $\leq 3$  ufc/placa en muestras de ambientes, y  $\leq 1$  ufc/cm<sup>2</sup> en muestras de superficies.

Basándonos en este criterio y considerando las muestras de ambientes, el 26,7% de las muestras ensayadas superaba este límite establecido antes de empezar con el tratamiento. Después de la aplicación de los productos en la incubadora, este porcentaje disminuyó hasta el 13,3%. El recuento de mohos dentro de la nacedora después de la aplicación de los productos fue mayor que antes del tratamiento. Esto pudo ser debido a una contaminación en la toma de muestra, en el transporte al laboratorio o en el propio análisis, o a la incorrecta aplicación de los productos.

En el caso de las muestras de superficies, antes de la aplicación de los productos, el 50% de las muestras superaron los criterios establecidos para mohos. Este porcentaje se redujo al 7,1% tras aplicar el tratamiento de limpieza y desinfección.

En la superficie de los huevos analizados, también se pudo observar una disminución del 87,9% de mohos después de la aplicación de los productos.

Realizando un análisis global de los resultados de la prueba, si bien los descensos en la contaminación no alcanzan los niveles requeridos en los ensayos estándar de eficacia, podría

concluirse que la aplicación de los desinfectantes contribuyó a reducir la presencia de mohos en la incubadora. Por otro lado, no pudo evaluarse este efecto contra *Salmonella* spp. ya que no se aislaron colonias típicas en ninguna de las muestras analizadas.

## Referencias

- COX N.A., BERRANG M.E., CASON J.A..** (2000) Salmonella penetration of egg shells and proliferation in broiler hatching eggs--a review. Poultry Science. 79(11):1571-4. Review.  
[http://www.ces.ncsu.edu/depts/poulsoci/tech\\_manuals/contamination\\_hatching\\_eggs.html](http://www.ces.ncsu.edu/depts/poulsoci/tech_manuals/contamination_hatching_eggs.html)
- IVANOV I.** (2008) Disinfection of eggs contaminated with some fungi and moulds. Trakia Journal of Sciences, Vol. 6, Suppl. 1, pp 98-101.
- KIM J.H., KIM K.S.** (2010) Hatchery hygiene evaluation by microbiological examination of hatchery samples. Poultry Science. 89(7):1389-98. doi: 10.3382/ps.2010-00661. PubMed PMID: 20548066.
- PATRICK A.D.** (2007) Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. 9<sup>th</sup> edition. Institut Pasteur.  
**RD 3349/1983**, de 30 de noviembre, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la fabricación, comercialización y utilización de plaguicidas.
- REGLAMENTO (UE) N° 528/2012 del Parlamento Europeo y del Consejo**, de 22 de mayo de 2012, relativo a la comercialización y el uso de los biocidas.
- UNE-EN 1040:2006 Antisépticos y desinfectantes químicos.** Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad bactericida básica de los antisépticos y desinfectantes químicos. Método de ensayo y requisitos (fase 1).
- UNE-EN 1275:2007 Antisépticos y desinfectantes químicos.** Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad fungicida o levuricida básica de los antisépticos y desinfectantes químicos. Método de ensayo y requisitos (fase 1).
- UNE-EN 14349:2013 Antisépticos y desinfectantes químicos.** Ensayo de superficie cuantitativo para la evaluación de la actividad bactericida de los antisépticos y desinfectantes químicos utilizados en el área veterinaria sobre superficies no porosas sin acción mecánica. Método de ensayo y requisitos (fase 2, etapa 2).
- UNE-EN 1656:2010 Antisépticos y desinfectantes químicos.** Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad bactericida de los antisépticos y desinfectantes químicos utilizados en el área veterinaria. Método de ensayo y requisitos (fase 2, etapa 1).
- UNE-EN 1657:2007 Antisépticos y desinfectantes químicos.** Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad fungicida o levuricida de los antisépticos y desinfectantes químicos utilizados en el área veterinaria. Método de ensayo y requisitos (fase 2, etapa 1).
- UNE-EN ISO 6579:2003 ERRATUM: 2007 V2** Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. (ISO 6579:2002).
- UNE-EN ISO 6579:2003** Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. (ISO 6579:2002).
- UNE-EN ISO 6579:2003/A1:2007** Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. Modificación 1: Anexo D: Detección de *Salmonella* spp. en heces de animales y en muestras ambientales en la etapa de producción primaria. (ISO 6579:2002/Amd 1:2007).