

Universidad de Costa Rica
Facultad de Microbiología

Trabajo Final de Graduación
para optar por el título de Licenciado en Microbiología
y Química Clínica

ANÁLISIS DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL
ALIMENTO CONCENTRADO COMERCIAL
PARA PERROS ADULTOS QUE SE EXPENDE EN
COSTA RICA

Mauricio A. Herrera Morice

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
San José, 2007



**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
VICERRECTORÍA DE DOCENCIA**

**FACULTAD DE MICROBIOLOGÍA
CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO**

Acta de presentación de Requisito Final de Graduación

Sesión del Tribunal Examinador celebrada el martes 03 de julio del año 2007 con el objeto de recibir el informe oral del estudiante **MAURICIO HERRERA MORICE**, carné A22504, quien se acoge al Reglamento de Trabajos Finales de Graduación bajo la modalidad de **PRACTICA DE GRADUACIÓN**, para optar por el grado académico de **LICENCIADO EN MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA CLÍNICA** y el título profesional de **DOCTOR EN MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA CLÍNICA**.

Están presentes los siguientes miembros del tribunal:

Dr. Adolfo Quesada **PRESIDENTE**
Dra. María Laura Arias
Dra. Carolina Chaves
Dra. Evelyn Rodríguez
Dra. Olga Guerrero

ARTICULO 1

El presidente informa que el expediente de **MAURICIO HERRERA MORICE**, contiene todos los documentos de rigor, incluyendo el recibo de pago de los derechos de graduación. Declara que el postulante cumplió con todos los demás requisitos del plan de estudios correspondientes, y por lo tanto, se solicita que proceda a hacer la exposición.

ARTICULO 2

El postulante **MAURICIO HERRERA MORICE**, hace la exposición oral de su trabajo de graduación titulo "Análisis de la calidad microbiológica del alimento concentrado comercial para perros adultos que se expende en Costa Rica".

ARTICULO 3

Terminada la disertación, los miembros del Tribunal Examinador interrogan al Postulante durante el tiempo reglamentario y, una vez concluido el interrogatorio, el Tribunal se retira a deliberar.

ARTICULO 4

El tribunal considera el trabajo final de graduación satisfactorio y le confiere la calificación de: 10,0

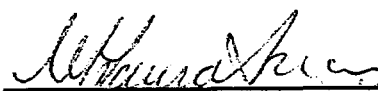
ARTICULO 5

El presidente del Tribunal comunica al Postulante el resultado de la deliberación y lo declara acreedor al grado de Licenciado en Microbiología y Química Clínica y al título profesional de Doctor en Microbiología y Química Clínica.

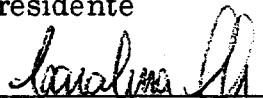
Se le indica la obligación de presentarse al acto público de juramentación al que será oportunamente convocado. Se da lectura al acta que firman los Miembros del Tribunal Examinador y al Postulante, a las 10:40 horas.



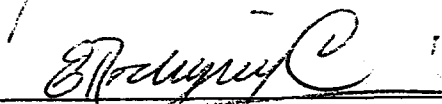
Dr. Adolfo Quesada
Presidente



Dra. María Laura Arias



Dra. Carolina Chaves



Dra. Evelyn Rodríguez



Dra. Olga Guerrero



Mauricio Herrera Morice
Postulante

DEDICATORIA

*A mis padres y demás seres queridos por su apoyo
y motivación para lograr esta meta.*

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Dra. María Laura Arias por su guía y asesoramiento y además al personal del Laboratorio de Aguas y Alimentos de la Universidad de Costa Rica donde se desarrolló la investigación, en especial a la Dra. Carolina Chaves y a Laura Villalobos; y a la Dra. Evelyn Rodríguez. Además a Walter Max Blanco Solís por su colaboración y aporte técnico en la realización del proyecto.

RESUMEN

Se analizaron tres lotes de diez marcas diferentes de alimentos concentrados para perro disponibles en la mayoría de veterinarias del país, con el fin de evaluar su calidad microbiológica. A cada alimento se le realizaron pruebas de recuento total aerobio mesófilo y de hongos y levaduras, determinación del número más probable (NMP) de *Staphylococcus aureus*, de coliformes totales y fecales; así como la evaluación de la presencia de bacterias patógenas como *Salmonella* sp. y *Listeria* sp.

Se encontró en los alimentos analizados que algunos lotes contenían recuentos ligeramente altos, aunque no se encontraron patógenos, si se identificaron bacterias oportunistas como *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae* spp. *pneumoniae* y *Enterobacter sakazakii* con perfiles de resistencia hacia algunos antibióticos. Además se plantea la posibilidad de que el alimento presente bacterias portadoras de genes de resistencia, capaces de transmitirlos a otras bacterias de la flora normal del tracto gastrointestinal e incluso a patógenos; pudiendo ser el alimento un vehículo de dispersión.

En este estudio se destaca la falta de investigación en esta área de la microbiología de alimentos, además sobresale el poco control en el proceso de manufactura que tienen los alimentos de uso veterinario debido a la variación en los resultados obtenidos entre lotes de la misma marca de alimento. También se observa que el alimento tiende a aumentar sus indicadores conforme pasa el tiempo de almacenamiento quizás debido a sus empaques no son totalmente herméticos y va ganando humedad lo que favorece la multiplicación de los organismos presentes.

A nivel nacional, hace falta mucha investigación, por lo que se espera que este proyecto sirva de base para futuras investigaciones en el área.

Palabras claves: alimento para perro, NMP, recuento total aerobio mesófilo, recuento de hongos y levaduras y resistencia a antibióticos.

ÍNDICE GENERAL

Portada	i
Acta firmada de presentación	ii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Resumen	vi
Índice general	vii
Índice de cuadros	ix
Índice de figuras	x
CAPÍTULO I: Marco Teórico	
1.1. Alimento Concentrado para Perro	1
1.2. Contenido Microbiológico de los Alimentos para Perro	3
1.3. Mascotas como agentes de dispersión de agentes patógenos y de genes de resistencia a los antibióticos	6
1.4. Alimentación Animal en Costa Rica	9
CAPÍTULO II: Introducción	
2.1. Justificación	11
2.2. Objetivos	
2.2.1. Objetivo General	12
2.2.2. Objetivos Específicos	12
CAPÍTULO III: Materiales y Métodos	
3.1. Selección y almacenamiento de las muestras	13
3.2. Indicadores de vida útil	
3.2.1. Recuento de Hongos y Levaduras	13
3.2.2. Recuento Total Aerobio Mesófilo	14
3.3. Indicadores de higiene y contaminación	
3.3.1. Número más probable de coliformes totales y fecales	14
3.4. Indicador de Manipulación	
3.4.1. Número más probable de <i>Staphylococcus aureus</i>	15
3.5. Presencia / ausencia de organismos patógenos	
3.5.1. Aislamiento de <i>Listeria</i> sp.	16
3.5.2. Aislamiento de <i>Salmonella</i> sp.	16
3.6. Efecto del almacenaje, manipulación e hidratación del alimento	17
3.7. Prueba de Sensibilidad a los Antibióticos (PSA)	17
CAPÍTULO IV: Resultados y Discusión	
4.1. Resultados	18
4.2. Discusión de los resultados	
4.2.1. Indicadores de vida útil	23

4.2.2. Indicadores de manipulación	25
4.2.3. Indicadores de higiene y contaminación	25
4.2.4. Presencia / ausencia de organismos patógenos	27
4.2.5. Efecto del almacenamiento y manipulación en los indicadores de vida útil	28
4.2.6. Hallazgos importantes en la PSA	29
CAPÍTULO V: Conclusiones y Recomendaciones	
5.1. Conclusiones	31
5.2. Recomendaciones	32
CAPÍTULO VI: Referencias	33
Apéndices	37

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Resultados obtenidos e interpretados para el análisis microbiológico de los alimentos para perro de venta en Costa Rica	19
Cuadro 2: Efecto del almacenamiento y manipulación del alimento para perro en los recuentos microbiológicos realizados	22
Cuadro 3: Resultados obtenidos en la PSA para <i>S. aureus</i> con los antibióticos seleccionados	22
Cuadro 4: Resultados obtenidos en la PSA para <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>spp. pneumoniae</i> y para <i>Enterobacter sakazakii</i> con los antibióticos seleccionados	23
Cuadro 5: (Apéndice 1) Abreviaturas y dosis de los antibióticos usados en el proyecto	37
Cuadro 6: (Apéndice 2) (tomado de Munro <i>et al.</i> , 1995). PSA para Enterobacteriaceae	38
Cuadro 7: (Apéndice 3) (tomado de Munro <i>et al.</i> , 1995) PSA para <i>Staphylococcus sp.</i>	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:

Resultados obtenidos para los tres lotes de cada alimento en el recuento total aerobio mesófilo (escala logarítmica)

20

Figura 2:

Resultados obtenidos para los tres lotes de cada alimento en el recuento total de hongos y levaduras (escala logarítmica)

21

Figura 3: (*Apéndice 4*)

Determinación del efecto del almacenamiento y manipulación en los alimentos para perro analizados en los recuentos aerobio mesófilo total y en el de hongos y levaduras

40

Figura 4: (*Apéndice 5*)

Determinación del efecto del almacenamiento y manipulación en los alimentos para perro analizados en las pruebas de número más probable de *S. aureus* y de coliformes totales y fecales

40

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Alimento concentrado para perro

El alimento comercial seco tiene como principal factor intrínseco su baja humedad que condiciona la flora normal predominante. Este tipo de alimento se prepara por medio de un proceso llamado extrusión húmeda; mediante el cual se elaboran hoy en día varios productos como aperitivos, cereales, golosinas, alimentos para animales, ingredientes de alimentos para bebés, e ingredientes para sopas instantáneas, entre muchos otros. La extrusión permite controlar la cantidad de agua contenida en los ingredientes, de la que dependen la aparición de microbios y el consiguiente deterioro de los alimentos. Por lo tanto, es una técnica muy útil para producir productos alimentarios duraderos con una baja humedad (EUFIC, 2005).

El proceso de extrusión es una técnica industrial de alta temperatura en corto tiempo (H.T.S.T). Los extrusores para alimentos se comenzaron a usar en la industria alimenticia desde hace 55 años y desde entonces se han incrementado sus aplicaciones. El extrusor es considerado un bio-reactor que en poco tiempo y a muy altas temperaturas transforma la materia prima. En la industria ha tenido grandes desarrollos, lo atractivo es que cumple con los requerimientos de control de calidad y rentabilidad, porque da continuidad al proceso, controla los cambios térmicos de los componentes y se mejora la textura, sabor y digestibilidad de los alimentos (Molina, 1999).

Durante la extrusión, el pienso y sus constituyentes moleculares están sujetos a una sucesión de tratamientos casi instantáneos. Las principales variaciones del proceso incluyen humedad, perfil de temperaturas, velocidad de rotación de la hélice que mezcla

el alimento y acondicionamiento del material antes de la extrusión (Rokey, 1995). En el caso de los alimentos para perros lo que se hace es mezclar una fórmula de distintas variedades de materias primas de origen animal (carne y pollo) y vegetal, con una mezcla de vitaminas; minerales y saborizantes, orientados a una especie en específico, en forma balanceada, es decir, que la fórmula contenga los requerimientos de la especie de aminoácidos y ácidos grasos esenciales, vitaminas y minerales. Una vez homogenizada esta mezcla, se procede a la extrusión. En este proceso, el vapor se inyecta en el tambor de extrusión para alcanzar las condiciones de procesado el alimento y se somete a presiones de 5-40 bares. Por esta razón alrededor del 18% de la humedad presente en la masa de alimento se evapora cuando el material se expande a la salida (por el cambio de presión) donde el alimento tiene una temperatura de entre 70-80 °C (Molina, 1999).

El proceso es muy similar al funcionamiento de un autoclave, pero en menores tiempos. Esto reduce enormemente la cantidad de contaminación microbiana pero no se llega a la esterilidad debido a razones de costo. Aún así es considerada como una pasteurización y es efectiva para eliminar *Salmonella* sp. y otros patógenos. Un alimento que se somete a extrusión disminuye el recuento aerobio total mesófilo de $2,2 \times 10^6$ UFC/g y de hongos y levaduras de $7,4 \times 10^4$ UFC/g a valores después de la extrusión de $3,7 \times 10^3$ UFC/g y de <10 UFC/g, respectivamente (Rokey, 1995).

Luego del proceso de extrusión se continúa con el secado a 130-160°C (se secan hasta el 10% de humedad que evita el crecimiento fúngico) y por último se lleva a cabo una cobertura con grasa donde se usa grasa animal fundida y un baño con saborizantes en polvo, los cuales son proteínas hidrolizadas de pavo o pollo que mejoran el gusto a la comida (Rokey, 1995).

La calidad del alimento está directamente relacionada con la calidad de la materia prima, en muchas ocasiones la carne utilizada en la elaboración del concentrado corresponde a carne considerada no apta para consumo humano: intestinos, esófago y

otras vísceras, llamados a veces subproductos, que se utilizan como harina de carne y corresponde al ingrediente de mayor variabilidad entre los lotes (Strombeck, 2001) por lo que podemos esperar una gran variabilidad en los resultados del estudio. En cuanto a las coberturas de grasa estas se obtienen de la grasa usada en los restaurantes. Conforme menor sea el precio de la materia prima, menor será el precio del producto y con ello mayores serán las ganancias de la empresa. Es importante destacar que la producción de alimentos para animales es una extensión de muchas otras empresas transnacionales de producción de alimentos para humanos y el mercado animal representa un negocio de alrededor de \$11 mil millones por año, utilizando los desperdicios de otras industrias (API, 2003).

1.2. Contenido microbiológico de los alimentos para perro

Los estudios sobre flora y resistencia a antibióticos en el alimento para perro son muy escasos. Para entender el tipo de bacterias esperables en estos alimentos hay que entender el proceso de manufacturación que los origina, la extrusión (ver capítulo 2.1.) en el cual, el alimento sale de la línea con una muy baja carga microbiana, en especial, de hongos y levaduras debido a que estos son más termolábiles. Por lo tanto, si el proceso de extrusión húmeda se da de manera correcta, la contaminación se daría durante el secado o durante la cobertura con grasa. Otra fuente importante de contaminación es también el empaclado en la línea de producción de la misma fábrica o inclusive durante el procesamiento que se somete hasta que llegan a los anaqueles de venta, donde las bolsa pueden romperse o si no son impermeables permitir el ingreso de agua que eleva la humedad del alimento facilitando el crecimiento de los microorganismos.

Para fines de este trabajo se analizarán los alimentos bajo las normas de la dirección general de salud ambiental de Perú (DIGESA, 2003) debido a que dentro de las normas latinoamericanas parece ser bastante completa ya que establece claramente planes de muestreo según el tipo de alimento. Dentro de sus categorías de alimentos encontramos

una llamada “alimentos cocidos de consumo directo como los expandidos o extruídos de hojuela instantánea”; o “productos instantáneos extruídos o expandidos proteinizados o no y hojuelas a base de granos que no requieren cocción” donde podríamos ubicar a los alimentos concentrados para perros. Establece los límites máximos permisibles para los diferentes indicadores microbiológicos que recomienda analizar para esta categoría de alimento: para el recuento de aerobios mesófilos hasta 10^4 UFC/g; hongos y levaduras hasta 10^2 UFC/g; coliformes hasta 10^1 NMP/g y ausencia de *Salmonella* en 25 g de alimento.

Según Strombeck (2001), como contaminantes en el concentrado se pueden encontrar especies del género *Salmonella* sp., que han sido cultivadas de las heces de los perros y de algunas marcas comerciales de alimento para perros. Esta bacteria muere en el proceso de cocción, pero aparece en el alimento probablemente porque la planta de procesamiento puede estar contaminada y el alimento es expuesto a la bacteria después de la extrusión. Otros patógenos que podemos encontrar son bacterias de los géneros *Campylobacter* sp. y *Listeria* sp. ya que se encuentran en la materia prima, pero al ser no esporulados no resisten la cocción por lo que un proceso de extrusión adecuado las elimina. Cobran importancia en la recontaminación del alimento al igual que *Salmonella* sp. También se puede aislar *Staphylococcus aureus* que es el segundo agente más comúnmente identificado en el alimento. El alimento se puede contaminar post cocción, como en el caso de *Salmonella* sp. *Campylobacter* sp. y *Listeria* sp o la bacteria puede causar daño al producir un toxina que no se ve afectada con la temperatura por lo que podría llegar a causar problemas gastrointestinales.

El mismo autor afirma que bacterias como los coliformes fecales que son indicadores de contaminación fecal, y algunas son capaces de producir exotoxinas causantes de diarrea. Además se puede aislar del alimento hongos y levaduras, de los cuales algunos pueden producir micotoxinas como las aflatoxinas producidas por *Aspergillus flavus* que no son destruidas durante la cocción y pueden causar vómito, pérdida de peso y hasta daño hepático y muerte.

Los estudios sobre aflatoxinas en este tipo de alimentos han sufrido un auge debido a un brote ocurrido en Sudamérica por el consumo de ciertos lotes de alimento para perro y gato que ocasionó muchas mascotas enfermas y algunas muertes (PURINA, 2005).

Se cuenta con algunos estudios sobre la prevalencia de estas aflatoxinas en los alimentos secos para mascotas. El más destacado se realizó en Brasil donde se analizaron 100 muestras de alimento para perros, gatos y aves (45, 25 y 30 alimentos, respectivamente) y se obtuvo que el 12% de las muestras analizadas por medio de cromatografía de capa fina contenían niveles de aflatoxinas superiores al permitido (50 g/Kg) con predominio de la forma B₁, B₂, G₁ y G₂. Dependiendo de la dosis, tiempo de exposición y condición del animal pueden comportarse como potentes agentes cancerígenos, o producir daño funcional y estructural al hígado (necrosis, hemorragia, fibrosis y cirrosis), además de encefalopatía hepática, inmunosupresión, infecciones respiratorias, hemorragia gastrointestinal, anorexia y fiebre (Penido y Pereira, 2002).

Un estudio realizado en Estados Unidos por White *et al.* en el 2003, a 158 bocadillos ("treats") para perros hechos de orejas de cerdos y otras partes animales, demostró que el 41% (64/158) de las muestras estaban positivas por *Salmonella* sp., de las cuales algunas cepas eran sensibles a todos los antibióticos evaluados, pero otras eran resistentes a tetraciclina (26%), estreptomycin (23%), sulfametoxazol (19%), cloranfenicol (8%) y ampicilina (8%) e incluso dos cepas resultaron pentaresistentes (ampicilina, cloranfenicol, estreptomycin, sulfametoxazol, y tetraciclina) lo cual es característico de *S. typhimurium* DT104. La conclusión a la que llegaron los investigadores es que los bocadillos pueden ser fuente potencial de infecciones por *Salmonella* sp. en el humano y en los animales, y algunas de éstas resistentes a antibióticos.

Otro estudio realizado en Canadá por Weese *et al.* En el 2005 que analizó 25 marcas comerciales de alimentos demostró la presencia coliformes en todos los alimentos en rangos de $3,5 \times 10^3$ a $9,4 \times 10^6$, de las cuales *Escherichia coli* fue identificada en 15 de

las 25 marcas (64%), pero ninguna correspondió a *E. coli* O157. Se identificó también *Salmonella* sp. en 5 de los 25 estudios (20%), mientras que *S. aureus* se aisló de solo 1 alimento (4%). Bacterias fastidiosas como *Campylobacter* sp. no pudieron ser aisladas pero anaerobias como *Clostridium perfringens* y *C. difficile* productores de toxinas fueron halladas en 5 de las 25 muestras (20%) (Weese *et al.*, 2005).

1.3. Mascotas como agentes de dispersión de agentes patógenos y de genes de resistencia a los antibióticos

Los animales de compañía, principalmente perros y gatos, han sido poco estudiados como posibles reservorios de bacterias resistentes a antibióticos y existe un riesgo importante de transmisión de esos microorganismos o los genes de resistencia que estos portan a los hombres, lo cual podría eventualmente producir infecciones en estos últimos (Heuer *et al.*, 2005).

Se han encontrado cerca de 17 cepas de *E. coli* causantes de infecciones del tracto urinario (ITU) en perros, consideradas como especie específicas, pero se les ha encontrado genes de virulencia capaces de causar infecciones extraintestinales en el hombre (Johnson *et al.*, 2001). Más aún cinco de esas cepas han sido aisladas causando infecciones extraintestinales en seres humanos con una alta patogenicidad y resistencia a algunos antibióticos, quizás por el abuso de antibióticos en los perros (Johnson *et al.*, 2001).

Se puede afirmar que la comida seca para perros y sus bocadillos ("treats"), como huesos o cartílagos provenientes de orejas de cerdo o pezuñas de vaca, presentan un riesgo elevado de transmitir *Salmonella* sp. El problema radica en que este tipo de productos no son regulados, lo que facilita la dispersión de enfermedades de origen alimentario a los seres humanos que manipulan el alimento o incluso infectar a los animales y después al hombre (Finley *et al.*, 2006).

En Barbados, Workman y colaboradores investigaron el origen de algunas cepas de *Campylobacter* sp. que representa la causa más común de gastroenteritis en ese país, y se determinó por métodos moleculares, que las cepas aisladas de la carne cruda y de las heces de los perros eran las mismas aisladas en los casos clínicos en humanos. Aquí y en otros estudios se sugiere la posibilidad de que los perros estén sirviendo como reservorios para la bacteria y que de aquí puedan infectar al ser humano (Workman *et al.*, 2005).

A los animales de compañía no se les ha dado un papel importante en la diseminación de patógenos o de bacterias con perfiles de resistencia, lo que sí ha sido estudiado principalmente en animales para consumo humano (ganado vacuno, porcino y aves) ya que estas bacterias, comensales o patógenas, pueden alcanzar al hombre a través del suministro de comida; y así podrían provocar enfermedades o transmitir los genes de resistencia a bacterias de la flora normal y de éstas a patógenos humanos, lo que obliga a los médicos a usar antibióticos de última línea para tratar estas infecciones, con las graves consecuencias que esto conlleva.

El impacto que tiene el uso de antibióticos como promotores de crecimiento (en algunos casos puede aumentar 4-5% del peso de un animal) ha sido estudiado en animales para consumo humano. El uso de antibióticos en la agricultura no tiene comparación con su uso en medicina. Hay muchas razones por las que este exceso es el responsable de generar o seleccionar cepas resistentes; según Salyers (2004) se usan enormes cantidades de antibióticos suministrados en concentraciones subóptimas o subterapéuticas, que tienen poco efecto sobre el crecimiento de las bacterias; pero que pueden acumular mutaciones o favorecer la selección de organismos resistentes. Además, se ve facilitada la transmisión de resistencias entre los animales por el hacinamiento en que se mantienen estos animales, especialmente el ganado porcino y aviar.

También hay estudios realizados por el DANMAP (por sus siglas en inglés: Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme, del Ministerio de Alimentos, Agricultura y Ganadería del Ministro de Interior danés), sobre el impacto del uso terapéutico de antibióticos en medicina veterinaria. En Dinamarca se controla el uso de drogas en animales de compañía, y éstas sólo pueden ser obtenidas con prescripción médica; aún así reportan el uso total de fluoroquinolonas en animales en el 2003 de 53 Kg de los cuales 24 Kg se administraron en animales de compañía y para cefalosporinas en el mismo año de 461 Kg más de la mitad 254 Kg se administraron en mascotas (DANMAP, 1997). Debido a este abuso en la utilización de antibióticos, aún en países con controles tan estrictos, su uso veterinario fue prohibido y se autoriza su prescripción sólo en casos excepcionales, ya que las cefalosporinas y las fluoroquinolonas son considerados por FDA (Food and Drug Administration) de los Estados Unidos como críticamente importantes para el uso humano y el surgimiento de resistencias debe ser evitado al máximo (Heuer *et al*, 2005).

En Estados Unidos, por ejemplo, el uso del antibiótico fluoroquinolona inició en 1986 en la medicina, pero no fue aprobado su uso en veterinaria hasta 1995, y fue hasta ese mismo año cuando se detectó resistencia a ese medicamento en *Campylobacter* sp. patógeno comúnmente asociado a transmisión a través de alimentos, principalmente pollo. Más interesante aún es que en Australia, donde esa droga no está autorizada para su uso veterinario, las infecciones alimentarias por *Campylobacter* sp. siguen siendo sensibles a fluoroquinolona (Molbak, 2004).

Guardabassi *et al.* (2004) demuestran que el uso indiscriminado de antibióticos de amplio espectro en medicina veterinaria ha ayudado a la producción de resistencias a medicamentos como las aminopenicilinas combinadas con ácido clavulánico, cefalosporinas y fluoroquinolonas por parte de cepas de *S. intermedius*, *E. coli* y otras bacterias con potencial zoonótico. Además, se mencionan varios estudios longitudinales que indican que muchas de los fenotipos resistentes se originaron en hospitales veterinarios, como el *S. aureus* meticilina resistente, enterococos resistentes a

vancomicina y *S. typhimurium* DT104 multiresistente. Los autores también destacan la poca atención que se le ha dado al papel de las mascotas en la diseminación de resistencias en comparación con el que se le ha dado a los animales para alimentación.

Las mascotas viven en una íntima relación con el ser humano, por lo que se le debería prestar más atención a la posibilidad de que le transmitan microorganismos. Por esto es importante vigilar su alimentación y evitar que se infecten con patógenos y les sirvan de reservorios y así evitar que ellos alcancen al hombre. Además se debe tratar las infecciones en mascotas de manera adecuada, limitando el uso de antibióticos y así, la aparición y selección de resistencias bacterianas.

Si los animales se mantienen como reservorios de genes y fenotipos de resistencias, la eficacia de los tratamientos disminuiría y por lo tanto, como consecuencia aumentarían las tasas de mortalidad, duración y severidad de la enfermedad (Molbak, 2004).

1.4. Alimentación Animal en Costa Rica

En nuestro país existe una legislación en Salud Animal Decreto No. 16899 del MAG donde se establece un Reglamento de la Ley 6883 del cual se rescata lo siguiente:

Los alimentos que consumen los animales inciden directamente en la calidad de los productos y subproductos que se utilizan para consumo humano, por tanto, es imprescindible que la alimentación animal sea lo más equilibrada y sana.

Laboratorio oficial: El designado en el artículo 9º de la Ley N° 6883 del 27 de septiembre de 1983, es el Centro de Investigación en Nutrición Animal (CINA) ubicado en la Universidad de Costa Rica.

Certificado de análisis microbiológico para productos y subproductos de origen vegetal o animal de alto contenido de humedad (Por ser los alimentos concentrados

para perro un alimento seco con aproximadamente un 10% de humedad, quedan exentos del análisis microbiológico).

El CINA se encarga de todos los análisis de alimentos de uso veterinario. Entre los exámenes microbiológicos se realizan análisis de coliformes fecales y de patógenos como *Salmonella* sp., además se realizan determinaciones de micotoxinas por medio de técnicas de ELISA. Este centro es una institución adjunta al Ministerio de Agricultura y Ganadería por lo tanto se centra en la investigación y fiscalización de principalmente alimentos para uso en animales de consumo, y los alimentos para mascotas son poco estudiados. La mayoría de sus estudios se basan en el análisis de materias primas para la producción de alimentos para animales.

De los estudios realizados sobre materias primas y algunos lotes de alimento de perro desarrollados en el período comprendido desde enero a octubre del año 2006, revelan que todos los ingredientes utilizados en la fabricación del alimento se encuentran libres de *E. coli* y *Salmonella* sp. con excepción de la harina de carne y hueso (elemento cárnico de los concentrados) ya que dos lotes (15 %) de los 13 analizados resultaron positivos para *E. coli* y solo uno (8 %) de ellos positivo para *Salmonella* sp. (Molina, 2006 *comunicación personal*). Para las micotoxinas se obtienen resultados muy diversos de varios lotes de cereales como maíz, cebada, soya y otros, pero para alimento de perro terminado en ese período de tiempo sólo hay una muestra analizada dando un resultado de 43 ppb para aflatoxinas (límite máximo permitido según la FAO, 2003: 20 ppb) y de vomitoxina (DON) 0,318 ppm (según la FAO, 2003: 1 ppm).

En el instituto se observa una variación importante entre los lotes de materia prima del mismo tipo de alimento, y esto podría llegar a ser importante a la hora de analizar alimentos terminados ya que como se mencionó anteriormente, la calidad del producto depende de los materiales con que se elabore. Al variar la materia prima es muy probable que igualmente cambie la calidad del alimento terminado de lote en lote (Molina, 2006 *comunicación personal*).

CAPÍTULO II

INTRODUCCIÓN

2.1. Justificación

La importancia de este estudio es dar a conocer cuáles y en qué cantidad, están presentes los microorganismos en el alimento concentrado para perro, además de estimar el efecto sobre los recuentos bacterianos y fúngicos, que tiene la manipulación del alimento por parte del comprador. Se pretende, además, determinar la presencia de bacterias portadoras de genes o fenotipos de resistencia, para estimar el posible riesgo de diseminar éstas cepas.

La calidad del alimento concentrado influye directamente en la salud y desempeño del animal como compañeros, guardianes, lazarillos y cualquier otra labor que éstos desempeñan dentro de la sociedad actual.

En muchas ocasiones la relación que existe entre un amo y su perro es muy estrecha, lo que permite el contacto y traspaso de microorganismos de uno a otro. El alimento comercial para uso humano pasa por un control bastante riguroso que evita o controla altas cargas microbianas que deterioren el alimento o que sirva como vehículo de organismos patógenos. En gran medida el alimento para perro está exento de tales controles por lo que es una vía ideal para la diseminación de organismos que afecten la calidad del alimento, como también la salud del animal y del ser humano.

En este campo a nivel nacional, hace falta mucha investigación, por lo que se espera que este proyecto sirva de base para futuras investigaciones en el área.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo General:

Determinar la presencia de algunos microorganismos, patógenos y no patógenos, en los alimentos extruídos para perros adultos que se expenden en Costa Rica con el fin de hacer una evaluación de su calidad microbiológica, así como evaluar las posibles consecuencias en los animales y en el hombre de la presencia de dichos microorganismos.

2.2.2. Objetivos Específicos:

- A. Determinar mediante la técnica de número más probable (NMP) y recuento, el número de bacterias, hongos y levaduras presentes en los alimentos a analizar.
- B. Determinar el NMP de coliformes totales y fecales contenidos en los alimentos a analizar.
- C. Determinar el NMP de *Staphylococcus aureus* en los alimentos a analizar.
- D. Determinar la presencia de agentes patógenos específicos *Salmonella* sp. y *Listeria* sp., a partir de los alimentos.
- E. Determinar la manera en que se afecta la calidad microbiológica del alimento después de la compra, el almacenaje y la manera en que éste se sirve.
- F. Determinar el patrón de sensibilidad a antibióticos de las bacterias aisladas para evaluar la posible dispersión de genes y fenotipos de resistencia bacteriana, en este tipo de producto.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Selección y almacenamiento de las muestras

Se analizaron 10 muestras de alimento para perro adulto, de diferentes marcas nacionales e internacionales, disponibles (en bolsas cerradas) en las veterinarias del país. Se trabajaron 3 muestras de diferente lote (A,B y C) de cada uno de los 10 alimentos.

Las bolsas fueron almacenadas a temperatura ambiente, en un sitio bajo de humedad y protegido de la luz solar directa hasta su análisis en la sección de Microbiología de Alimentos y Aguas de la Facultad de Microbiología en la Universidad de Costa Rica.

El análisis de la muestras consistió en el estudio de dos indicadores de vida útil: recuento total aerobio mesófilo y el recuento de hongos y levaduras; dos indicadores de contaminación: número más probable de coliformes totales (NMP) y NMP de coliformes fecales; un indicador de manipulación: NMP de *Staphylococcus aureus*; y la determinación de organismos patógenos: presencia de *Listeria* sp. y *Salmonella* sp.

3.2. Indicadores de vida útil

3.2.1. Recuento de hongos y levaduras

Se pesaron 25 g del alimento y se homogenizaron en el Stomacher con 225 mL de APE (Agua Peptonada Estéril). A partir de esta dilución (10^{-1}) se prepararon dos diluciones decimales más (10^{-2} y 10^{-3}) con APE y se inoculó 0,1 mL de cada dilución por esparcimiento en placas de Agar Papa Dextrosa, las cuales se incubaron por 4 días a

temperatura ambiente. Después de la incubación se realizó un conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) por placa (entre 3 y 30 UFC/g) y se calculó, siguiendo las reglas de conteo, el número de UFC/mL.

3.2.2. Recuento total aerobio mesófilo

Se utilizaron las mismas diluciones (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}) preparadas en la sección anterior para hacer el recuento por vaciado, inoculando 1 mL de cada dilución y agregando agar estándar fundido con 2,3,5 cloruro de trifeníl tetrazolium (TTC) que es un indicador de oxidorreducción para evidenciar el crecimiento microbiano.

Luego de la solidificación del medio, se incubó cada placa por 48 horas a 37°C. Se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC) por placa y a partir de aquella placa en que las colonias encontradas estuvieran entre 25 y 250 se calculó el número de UFC/g.

3.3. Indicadores de higiene y contaminación

3.3.1. NMP de coliformes totales y fecales

La técnica de NMP se realizó según se describe en Arias *et al.* (2006). A partir de cada dilución preparada anteriormente (a saber 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}), se inoculó por triplicado 1 mL en tubos con 9 mL de Caldo Lactosado Simple (CLS) con campana Durham, y se incubaron por 48 horas a 37°C. Los tubos con gas luego del período de incubación se sembraron por duplicado en tubos de caldo bilis verde brillante (CBVB), los cuales se incubaron por 48 horas a 37°C; y en tubos con caldo *E. coli* (EC), los cuales se incubaron por 24 horas (estrictas) a 44,5°C.

Luego de los periodos de incubación se tomó como resultado positivo por coliformes totales los tubos que presentaron gas en el CBVB y se interpretaron como NMP de

coliformes totales/g; los tubos con caldo EC se tomaron como positivos por coliformes fecales a aquellos que presentaron gas. Se interpretó el NMP/g según las tablas dispuestas en Vanderzant y Splittstoesser (1992).

Los tubos positivos fueron rayados a agar sangre para separar las colonias que luego fueron identificadas con la prueba miniaturizada de API20E .

3.4. Indicador de manipulación

3.4.1. NMP de *Staphylococcus aureus*

A partir de cada dilución preparada 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} ; se inoculó por triplicado 1 mL en tubos de Caldo Trypticasa Soya (CTS) con 10% de NaCl. Estos tubos se incubaron por 48 horas a 37°C.

Transcurrida la incubación los tubos con turbiedad se inocularon por rayado en estría en placas de agar Baird Parker, utilizando una placa por cada dilución, rayando los 3 tubos de una misma dilución en una misma placa. La lectura se hizo contando el crecimiento característico de *Staphylococcus aureus* por campo rayado y se determinó el NMP/g de alimento.

La identificación preliminar de la bacteria se hizo realizándole a los aislamientos una tinción de gram y las pruebas de catalasa, coagulasa en tubo y crecimiento en agar Manitol Sal. La que dieron positivas se identificaron por el sistema miniaturizado APIStaph siguiendo las recomendaciones del fabricante.

3.5. Presencia / ausencia de organismos patógenos

3.5.1. Aislamiento de *Listeria* sp.

Se enriquece 25 g del alimento en 225 mL de caldo Listeria y se incubó por 48 horas a 37°C. Posteriormente se inoculó en una placa de agar Oxford, utilizando la técnica de rayado. Ésta se incubó por 48 horas a 37°C.

Las placas con crecimiento colonial característico, es decir, con pigmento oscuro y una depresión en el centro compatible con *Listeria* sp., se les realizó las pruebas de CAMP, xilosa, arabinosa, rhamnosa y movilidad a temperatura ambiente.

3.5.2. Aislamiento de *Salmonella* sp.

Se realizó un preenriquecimiento de 25 g del alimento en 225 mL de Caldo Lactosado Simple (CLS) y se incubó por 24 horas a 37°C, posteriormente se hacen enriquecimientos selectivos, al inocular 1 mL del CLS en un tubo de Caldo Selenito, (que se incubó por 24 horas a 37°C), y en Caldo Tetracionato con 3 gotas de yodo/yoduro, (se incubó 24 horas a 44,5°C). Luego del enriquecimiento selectivo se inoculó por rayado una placa de agar xilosa, lisina y desoxicolato (XLD) y una placa de agar Hecktoen a partir de cada uno de los caldos. Estas placas se incubaron por 48 horas a 37°C.

Se considera como crecimiento colonial sugestivo de *Salmonella* sp. las colonias rojas con o sin centro negro en el agar XLD y las colonias azul verdosas con o sin centro negro en el agar Hecktoen. A las colonias positivas se les realizó la identificación definitiva con el sistema miniaturizado API20E , siguiendo las recomendaciones de la casa fabricante.

3.6. Efecto del almacenaje, manipulación e hidratación del alimento

Una vez obtenidos y analizados los resultados anteriores se escogieron dos muestras: aquellas con las que se obtuvo el recuento más bajo y otro con el recuento más alto (alimentos A5 y A6 lotes A, respectivamente) y se repitieron las pruebas, pero 3 meses después de haber abierto el empaque y de haber realizado el primer análisis. Esta fecha era anterior al vencimiento indicado en el empaque, y el alimento fue almacenado en un recipiente plástico cerrado no hermético a temperatura ambiente.

Las muestras se trabajaron de la manera indicada en las secciones 3.2. a 3.4. Además se pesaron 25 g de cada uno de los alimentos y se colocaron en un recipiente limpio con una taza de agua de tubo, como recomiendan muchas de las casas fabricantes. Se dejó a temperatura ambiente durante una hora y después se realizaron las pruebas como se describen en los puntos 3.2. a 3.4.

3.7. Prueba de Sensibilidad a los Antibióticos (PSA)

Las bacterias que se aislaron en las pruebas anteriores, fueron sometidas a la prueba de sensibilidad a los antibióticos, por el método de discos de Kirby-Bauer en agar Müller Hinton de 4 mm de espesor. Se utilizaron como cepas control las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Los antibióticos se seleccionarán de acuerdo al tipo de bacteria aislada según tablas establecidas para esto en Munro *et al.* (1995). Ver apéndices 1, 2 y 3.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

Los recuentos totales aerobios mesófilos y de hongos y levaduras, así como los NMP/g de coliformes totales y fecales se detallan en el cuadro 1. Todas las muestras analizadas (30) fueron negativas por la presencia de *Salmonella* sp. y *Listeria* sp.

Dos de los alimentos (A2 y A6) presentaron recuentos totales de aerobios mesófilos ligeramente superiores al límite superior para este tipo de alimentos de 1×10^4 UFC/g y 14 (47%) de los 30 alimentos presentan recuentos superiores al 10^2 UFC/g mencionado para el recuento de hongos y levaduras (ver figuras 1 y 2).

El efecto de la manipulación y almacenaje, así como de la hidratación de los alimentos seleccionados (A6 y A5) se puede apreciar en el cuadro 2 o en las figuras 3 y 4 ubicadas en los apéndices 4 y 5, respectivamente.

Cuadro 1:
Resultados obtenidos e interpretados para el análisis microbiológico de los alimentos para perro de venta en Costa Rica

Alimento (n)	Lote	Recuento Total Aerobio Mesófilo (UFC/g)	Recuento de Hongos y Levaduras (UFC/g)	NMP de <i>S. aureus</i> (NMP/g)	NMP de coliformes totales (NMP/g)	NMP de coliformes fecales (NMP/g)
A1 (n=3)	A	$2,0 \times 10^1$ *	$2,0 \times 10^2$ *	< 3	< 3	< 3
	B	$7,0 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^2$ †	< 3	4	< 3
	C	$7,0 \times 10^1$ *	$1,1 \times 10^4$	< 3	< 3	< 3
A2 (n=3)	A	$5,0 \times 10^4$	$< 1,0 \times 10^2$ †	< 3	< 3	< 3
	B	$4,9 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3
	C	$1,1 \times 10^4$	$1,0 \times 10^2$ *	< 3	< 3	< 3
A3 (n=3)	A	$3,6 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	< 3	< 3	< 3
	B	$8,1 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^2$ †	< 3	< 3	< 3
	C	$1,7 \times 10^3$	$3,3 \times 10^4$	< 3	< 3	< 3
A4 (n=3)	A	$6,0 \times 10^1$ *	$8,0 \times 10^2$	9	4	< 3
	B	$1,2 \times 10^3$	$2,0 \times 10^2$ *	< 3	< 3	< 3
	C	$9,0 \times 10^1$ *	$< 1,0 \times 10^2$ †	< 3	< 3	< 3
A5 (n=3)	A	$1,0 \times 10^1$ *	$1,0 \times 10^2$ *	< 3	< 3	< 3
	B	$7,0 \times 10^1$ *	$1,0 \times 10^2$ *	< 3	< 3	< 3
	C	$2,0 \times 10^3$	$2,0 \times 10^2$ *	< 3	< 3	< 3
A6 (n=3)	A	$7,5 \times 10^3$	$4,0 \times 10^4$	< 3	9	< 3
	B	$3,6 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$	< 3	< 3	< 3
	C	$8,3 \times 10^4$	$< 1,0 \times 10^2$ †	< 3	43	< 3
A7 (n=3)	A	$1,2 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$	< 3	4	< 3
	B	$4,4 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$ *	< 3	< 3	< 3
	C	$3,3 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^2$ †	< 3	4	4
A8 (n=3)	A	$4,0 \times 10^1$ *	$5,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3
	B	$1,0 \times 10^1$ *	$< 1,0 \times 10^2$ †	< 3	< 3	< 3
	C	$5,0 \times 10^3$	Incl [†]	4	< 3	< 3
A9 (n=3)	A	$6,0 \times 10^2$	$6,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3
	B	$3,7 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^2$ †	< 3	< 3	< 3
	C	$5,3 \times 10^2$	$4,0 \times 10^2$	7	9	< 3
A10 (n=3)	A	$9,0 \times 10^1$ *	$< 1,0 \times 10^2$ †	< 3	< 3	< 3
	B	$2,5 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^2$ †	< 3	< 3	< 3
	C	$8,0 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^2$ †	< 3	< 3	< 3

UFC/g estimado.

† La placa se reportó como incontable debido a que hubo crecimiento de micelio aéreo en todas las placas lo que imposibilitó la lectura.

‡ No se obtuvo crecimiento colonial en la menor dilución realizada (10^{-2}).

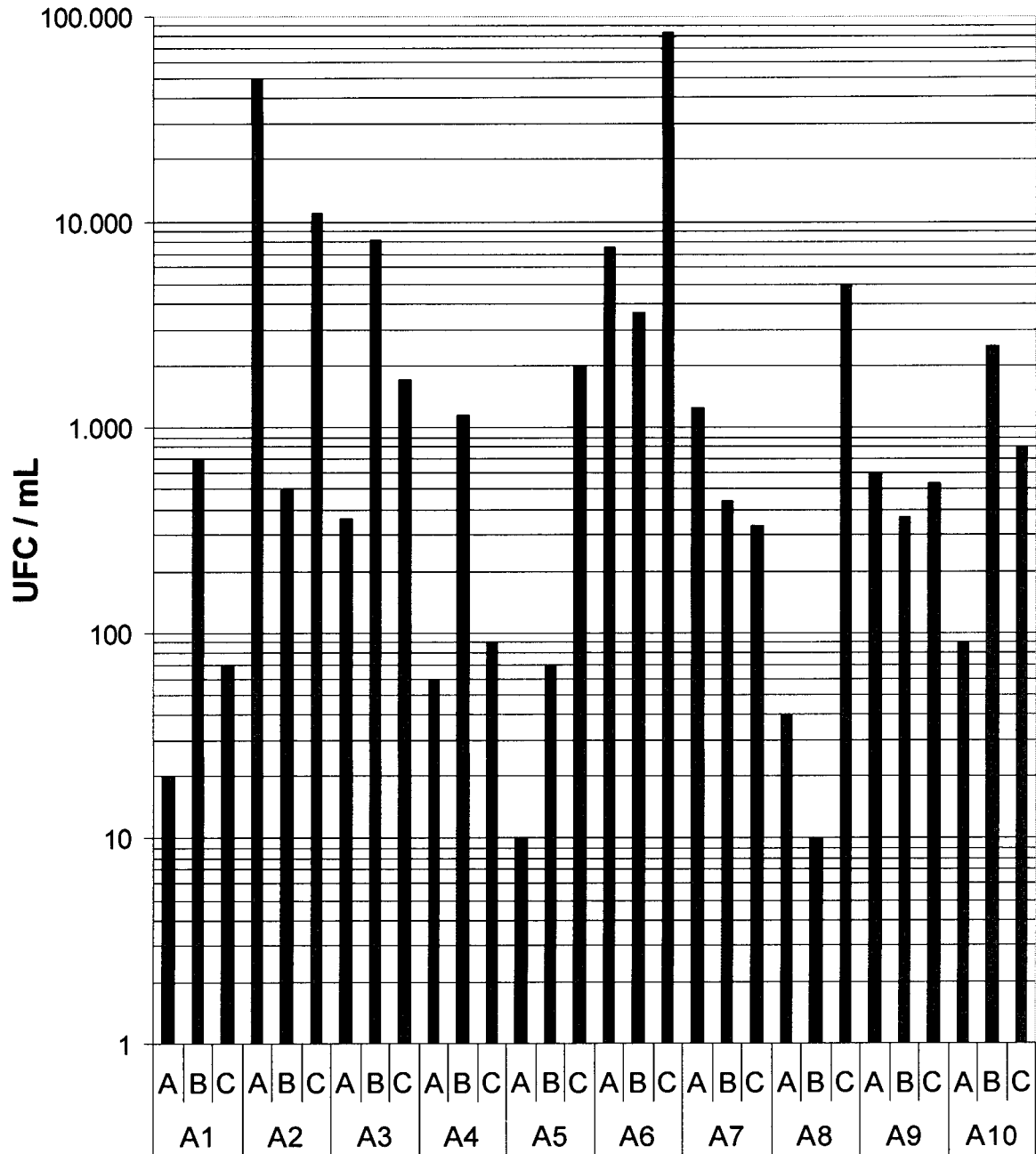


Figura 1: Resultados obtenidos para los tres lotes de cada alimento en el recuento total aerobio mesófilo (escala logarítmica).

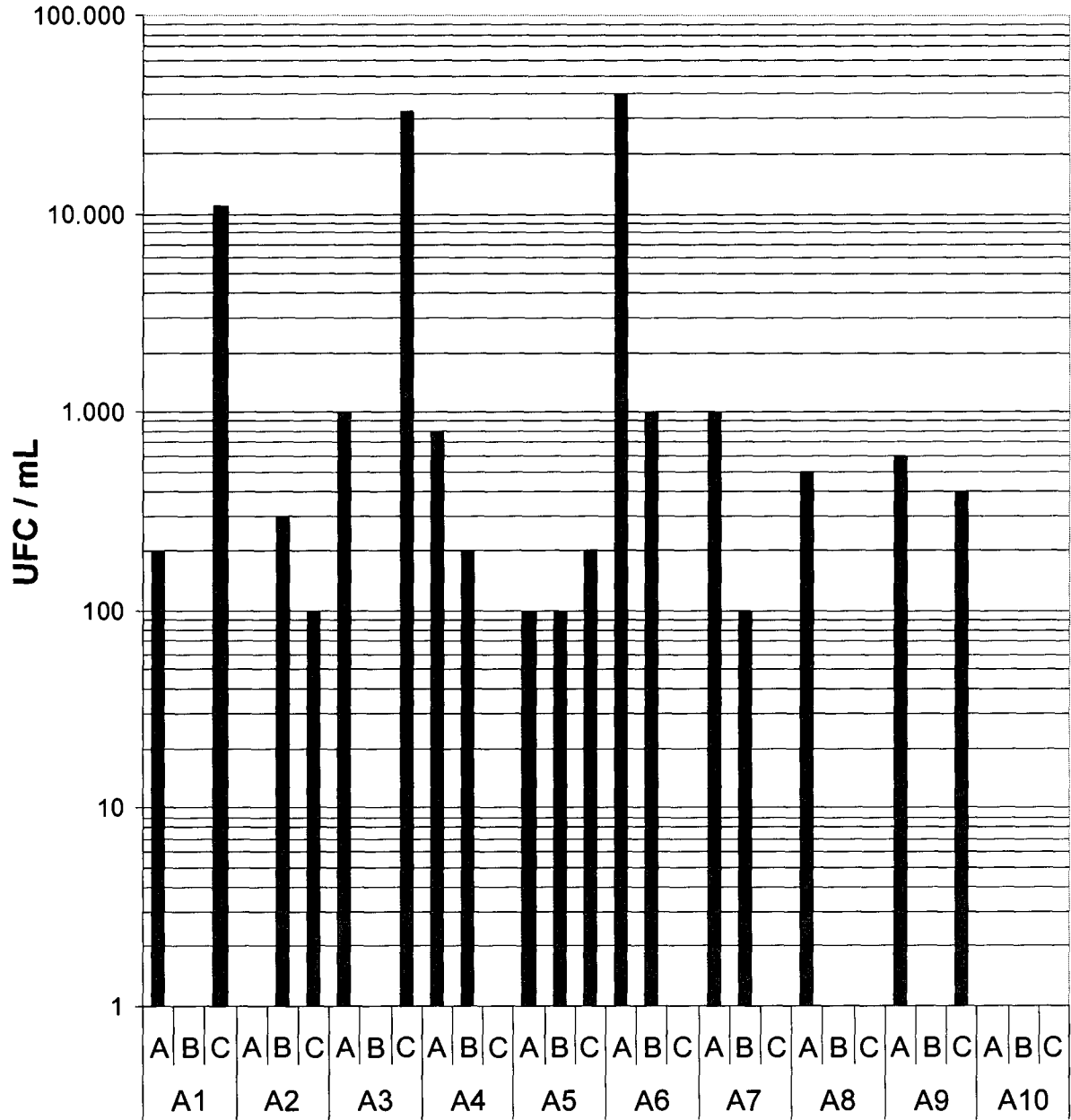


Figura 2: Resultados obtenidos para los tres lotes de cada alimento en el recuento total de hongos y levaduras (escala logarítmica).

Cuadro 2:

Efecto del almacenamiento y manipulación del alimento para perro en los recuentos microbiológicos realizados

Alimento/ Lote	Condición	Recuento Total Aerobio Mesófilo (UFC/g)	Recuento Total de Hongos y Levaduras (UFC/g)	NMP de <i>Staphylococcus aureus</i> (NMP/g)	NMP de coliformes totales (NMP/g)	NMP de coliformes fecales (NMP/g)
A5	Control	$1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3
Lote A	Seco	$6,6 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3
	Húmedo	$3,3 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3
A6	Control	$7,5 \times 10^3$	$4,0 \times 10^4$	< 3	9	< 3
Lote A	Seco	$9,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$	4	4	4
	Húmedo	$1,2 \times 10^4$	$1,7 \times 10^4$	9	4	4

Se obtuvo 9 cepas a partir de los medios selectivos utilizados, 3 (33%) *Staphylococcus aureus*, 5 (56%) *Klebsiella pneumoniae* spp. *pneumoniae* y 1 (11%) *Enterobacter sakazakii*.

Del Baird Parker se recuperaron 3 cepas catalasa y coagulasa positivas, que crecieron en agar Manitol Sal (fermentadoras del manitol) y fueron identificadas como *S. aureus* en el sistema miniaturizado APIStaph®. De los caldos CBVB y EC se lograron aislar 6 cepas de enterobacterias, identificadas en API20E®. De esas 6, 5 (83%) fueron identificadas como *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae* y solo 1 (17%) como *Enterobacter sakazakii*.

A estas cepas se les realizó la PSA. Para las 3 cepas de *S. aureus* se utilizaron algunos de los antibióticos recomendados para tratar infecciones por esta bacteria. Los antibióticos son enumerados en el apéndice 3. De la misma manera se procedió con las enterobacterias según el apéndice 2. Los resultados obtenidos en estas pruebas se pueden observar en los cuadros 3 y 4.

Cuadro 3:

Resultados obtenidos en la PSA para *S. aureus* con los antibióticos seleccionados

Alimento*	P10*	AM10	CIP5	CRO30	Va30	CTX	E15	SXT	TE30	GM10	IPM10	F/M300
A4 lote A	R	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
A9 lote C	R	R	S	S	R	S	R	S	S	S	R	S
A9 lote C	R	R	S	S	R	S	R	S	S	S	R	S

*Alimento del cual fue aislada la cepa probada.

*Ver apéndice 1 para los nombres completos y dosis de los antibióticos usados.

Cuadro 4:
Resultados obtenidos en la PSA para *Klebsiella pneumoniae* spp. *pneumoniae* y para *Enterobacter sakazakii* con los antibióticos seleccionados

Alimento*	Bacteria	AM10*	CRO30	GM10	TE30	TIC75	F/M300	CTX	IPM10	AN30	CIP5	SXT	NOR10
A6 lote A	<i>K. pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i>	R	S	S	S	R	R	I	S	S	S	S	S
A6 lote A	<i>K. pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i>	R	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S
A6 lote C	<i>K. pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i>	R	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S
A6 lote C	<i>K. pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i>	R	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S
A9 lote C	<i>K. pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i>	R	S	S	S	R	R	I	S	S	S	S	S
A6 lote A	<i>Enterobacter sakazakii</i>	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S

*Alimento del cual fue aislada la cepa probada.

*Ver apéndice 1 para los nombres completos y dosis de los antibióticos usados.

4.2. Discusión de los resultados

4.2.1. Indicadores de vida útil

La presencia de una serie de bacterias, hongos y levaduras en los alimentos analizados son considerados como parte de su flora normal ya que la mayoría de los recuentos no superan el umbral mencionado anteriormente como normal (hasta 10^4 UFC/g para el recuento total aerobio mesófilo y hasta 10^2 para el recuento de hongos y levaduras).

Para el recuento total aerobio mesófilo (RTAM) todos se encuentran por debajo del límite de detección con excepción de tres lotes, dos de ellos de la misma marca de alimento, que se encuentran en el límite establecido. Estos alimentos son el A2, lotes A y C; y el A6, lote C. Estos tres recuentos mencionados pueden indicar fallas en el proceso de manufacturación, en el empaqueo o almacenamiento del producto hasta su análisis. La falla principal se da cuando el alimento no alcanza una humedad menor del 10% y puede deberse a una mala extrusión, un mal secado o empaqueo, lo que permite una mayor colonización de bacterias.

Los recuentos altos afectan la vida útil del alimento llegando a acortar la fecha de expiración o incluso las cualidades organolépticas (sabor, color y olor) si la contaminación es muy elevada. Por lo tanto se puede concluir que estos alimentos en general poseen la vida útil indicada en el empaque siempre y cuando el empaque se mantenga herméticamente sellado y este no gane humedad.

La producción de este alimento es un proceso muy variable que depende principalmente de la disponibilidad de las materias primas, éstas varían entre lote y lote lo que afecta los recuentos de los alimentos. Por ejemplo en el alimento A2, A4 y A8 el recuento total aerobio difieren en dos órdenes de magnitud entre los lotes. Lo mismo sucede con el recuento de hongos y levaduras en los alimentos A1, A3 y A6, pero es más llamativo el hecho que se presentó con las pruebas de NMP para *S. aureus* y para coliformes totales y fecales, ya que hay alimentos como el A4, A8 y A9 que dos de los tres lotes presentan la prueba negativa pero la otra positiva. Los A1, A4, A6 y A9 presentaron el mismo fenómeno para NMP de coliformes totales lo que demuestra poco control del proceso ya que un lote difiere significativamente en calidad del siguiente.

De igual manera los hongos y levaduras afectan la vida útil del producto, pero es importante para la seguridad del alimento considerar la posibilidad de producción de micotoxinas (como fue discutido en 2.3.). Las esporas de los hongos se encuentran muy fácilmente en el aire lo que facilita la contaminación post-cocción, antes del empaquetado. Por lo que las medidas de higiene en la planta procesadora deberían incluir la eliminación de ventiladores o accesos de corrientes de aire del exterior que arrastran consigo esporas fúngicas hacia el alimento.

Los recuentos para hongos y levaduras en su mayoría (47% de los lotes) fueron superiores al umbral aceptado de 10^2 UFC/g por lo que se esperaría que la mayor parte del deterioro que sufre el alimento es a causa del metabolismo de estos organismos. Esto es normal si se toma en cuenta las condiciones de baja humedad que presenta el alimento que beneficia su crecimiento. En el A2 lotes A y C hay un recuento total muy

elevado y de hongos muy bajo, esto quizás es debido a que el alimento presentaba una humedad superior y benefició el crecimiento bacteriano sobre el fúngico.

4.2.2. Indicadores de manipulación

El indicador de manipulación utilizado en este estudio fue el *S. aureus* que puede estar presente en las manos de los empleados en la línea de producción. Esta bacteria no es muy resistente al calor por lo que no pudo haber sobrevivido a una extrusión correcta, y es de suponer que la contaminación se da posterior a éste proceso. El empaçado pudo haber sido la principal fuente de esta bacteria en el alimento.

Solo tres alimentos de los 30 (10%) analizados dieron esta prueba positiva por medio de la técnica de NMP. El alimento A4 lote A, A8 y el A9 ambos los lotes C. De estas pruebas se logró aislar 3 cepas identificadas (una de cada alimento) por el sistema miniaturizado API y todas resultaron ser coagulasa positivas en tubo.

La presencia de esta bacteria es asociada con la producción de una toxina de acción neurotóxica que induce al vómito. Esta toxina no es secretada por todas las cepas de *S. aureus* pero se ha visto una buena correlación entre la prueba coagulasa positiva y la producción de la toxina. Además las cepas capaces de secretarla sólo pueden hacerlo cuando se encuentra en condiciones favorables, libre de competidores. El bajo aw del alimento es un impedimento para el crecimiento de muchas bacterias, pero no de *S. aureus* por lo que se inhiben sus competidores y sería capaz de producir la toxina durante el almacenamiento del alimento (Arias *et al.*, 2006).

4.2.3. Indicadores de higiene y contaminación

Los coliformes totales nos ayudan como indicadores de higiene post-producción debido a que son destruidos durante la cocción y su presencia señalaría mala higiene en los

procesos posteriores y aunque no son patógenos, la presencia de patógenos de transmisión fecal oral es más factible cuando estos indicadores dan positivos.

Para esta prueba se obtuvo como resultado predominante valores por debajo del límite de detección de la técnica (23 de los 30, es decir el 76,7%), pero en los alimentos A1 lote B, A4 lote A, A6 lotes A y C, A7 lotes A y C y A9 lote C, se observaron resultados positivos por coliformes totales. Al ser organismos ubicuos se considera normal recuentos hasta 10 NMP/g (DIGESA, 2003) por lo que sólo un alimento el A6 lote C supera este umbral.

Con estos indicadores se puede apreciar más la variación de la calidad de los lotes de los alimentos conforme varían las materias primas y el poco control durante su producción y el almacenamiento hasta la venta. Se puede tomar como ejemplo más claro el A6 donde el lote B permaneció por debajo del límite de detección, el lote A cerca del límite aceptado y el lote C muy por encima de este límite. Las variaciones entre lotes son aspectos muy importante debido a que estos alimentos no están sujetos a normativas de control de calidad muy estrictas y las materias primas utilizadas para su elaboración varían según la disponibilidad y el costo en el mercado (ver 1.1.). El contenido microbiológico de la materia prima influye en el contenido final del alimento debido a que algunos de estos organismos pueden permanecer post-extrusión o darse el fenómeno de contaminación cruzada donde la materia prima cruda tiene contacto con el producto terminado a través de los instrumentos o de las bandas transportadoras.

Sería importante realizar un análisis de superficies y de maquinaria en las bandas y demás equipos manufacturadores para evaluar si la recontaminación se da dentro de la misma planta por falta de sanitización, o por fallas en el empaque mientras es transportado y vendido.

Para el indicador de contaminación fecal elegido solo se obtuvo un resultado positivo en el alimento A7 lote C en el caldo EC a 44,5°C. La presencia de contaminación fecal es

inaceptable en un alimento ya que conlleva un riesgo elevado de transmisión de bacterias y virus patógenos de transmisión fecal-oral.

Se identificaron cepas de importancia médica a partir del CBVB, como lo son *Klebsiella pneumoniae* spp. *pneumoniae* y *Enterobacter sakazakii*. Son bacterias oportunistas y nosocomiales y esta última ha sido relacionada con brotes de meningitis en recién nacidos debido al uso de fórmulas de leche en polvo. Estas meningitis causan serias lesiones y secuelas si es que el niño sobrevive, debido a la altísima tasa de mortalidad (CDC, 2002). Es una bacteria capaz de mantenerse viable a bajos aw (leche en polvo tiene un aw <0,60).

Las bacterias del género *Klebsiella* son frecuentemente encontradas en el tracto gastrointestinal de seres humanos y animales. *K. pneumoniae* presenta una cápsula de mucopolisacárido que ofrece protección contra la fagocitosis lo que favorece su virulencia. Es una causa frecuente de infección en tracto respiratorio en pacientes hospitalizados o inmunocomprometidos. También se destaca su capacidad de producir betalactamasas de espectro ampliado (BLEA) (Mahon y Manuselis, 2000). Se han encontrado reportes de diferentes casos clínicos en animales como ardillas y búhos, con afecciones renales fatales producidas por diferentes especies de *Klebsiella* (van der Bogaard y Stobering, 2000).

4.2.4. Presencia / ausencia de organismos patógenos

Se realizaron pruebas para determinar la presencia/ausencia de dos bacterias patógenas, *Salmonella* sp. y *Listeria* sp. ya que son los organismos patógenos más probables de estar presentes en el alimento seco. *Salmonella* sp. es una bacteria muy común en carne de res, pollo, especias, entre otros por lo que sería razonable que esté presente en la comida para perro, además presenta una larga sobrevivencia en alimentos desecados (Arias *et al.*, 2006).

Por otra parte *Listeria* sp. es una bacteria ubicuota, oportunista, crece a una amplia gama de temperaturas y resiste aw bastante bajos. Se puede encontrar en vegetales, carne de res y pollo, suelos, y en muchos otros lugares por lo que podría ser de importancia determinar su presencia (Arias *et al.*, 2006).

En este estudio no se logró aislar ninguna de las bacterias patógenas indicadas anteriormente, probablemente porque son termosensibles y son eliminadas de la materia prima durante la extrusión. La recontaminación por éstas no se da, ya que aunque se presentara contaminación cruzada con la materia prima contaminada, es menos probable que se contamine el producto terminado con patógenos que con otros indicadores, debido a que generalmente se presentan en alimentos en bajas concentraciones.

4.2.5. Efecto del almacenamiento y manipulación en los indicadores de vida útil

En cuanto al efecto de la manipulación del alimento en los recuentos se puede observar una tendencia a aumentar los conteos entre más tiempo se deja abierto el alimento (respetando la fecha de vencimiento). Hay una excepción en los resultados cuando en el alimento 6, el dato correspondiente al control es menor que el de 3 meses después, en el recuento total de hongos y levaduras (ver cuadro 2). Esta observación puede deberse quizás debido al sitio de la bolsa de donde se tomó la muestra, pues podía haber una concentración especial de elementos fúngicos en un sitio específico de la bolsa que afectó la primera lectura.

En el cuadro 2 se puede apreciar que los recuentos tienden a aumentar conforme pasa el tiempo de almacenaje y también al humedecer el alimento cuando se sirve, así si el perro no se come su alimento de inmediato la cantidad de bacterias y hongos aumentan. Si el alimento contiene alguna bacteria patógena podría reproducirse y aumentar su población y así alcanzar una dosis infectante determinada.

Con la técnica de número más probable los cambios fueron más sutiles debido a la sensibilidad de la técnica, pero se ve un aumento significativo en el NMP/g de *Staphylococcus aureus* en el alimento 6.

En la prueba de NMP/g de coliformes totales se ve una disminución en la muestra a los tres meses quizás debido a que la mayoría de estas bacterias no resisten mucho tiempo en condiciones de baja humedad y por lo tanto perdieron su viabilidad aún después de humedecer el alimento no fueron capaces de reproducirse. Para los coliformes fecales no ocurrió este fenómeno sino que más bien pasaron de niveles no detectables por la técnica a valores de 4 NMP/g.

4.2.6. Hallazgos importantes en la PSA

Se puede inferir de las fuentes que el alimento posee una alta cantidad de microorganismos, procedentes de una materia prima de baja calidad y poco control sobre el producto final por lo que es un vehículo poco investigado por transmisión de patógenos y fenotipos de resistencia al hombre a través del contacto con animales llevándose a cabo un intercambio entre la flora normal entre el amo y su mascota. La flora de la mascota depende directamente de su alimentación por lo que la comida de perro afecta indirectamente la flora de su dueño.

Estudios hechos por Molbak (2004) demuestran que la prevalencia de la resistencia a los antibióticos en las bacterias comensales o patógenas del ser humano o animales son buenos indicadores de la presión selectiva y refleja el potencial de expresar resistencia a esos medicamentos en futuros agentes infecciosos. Además que en organismos causantes de infecciones alimentarias u organismos indicadores la tendencia a la resistencia depende directamente del uso de antibióticos en la medicina veterinaria (Molbak, 2004).

El alimento de perro no presenta patógenos, pero sí algunas bacterias comensales o zoonóticas y es importante conocer su perfil de resistencia a los antibióticos para la evaluación de su potencial para la transmisión de esta resistencia a través de plásmidos u otros elementos móviles en su genoma a la flora normal de la mascota y del amo, y posteriormente a patógenos.

La mayor parte de las cepas aisladas corresponden a *Klebsiella pneumoniae* spp. *pneumoniae* según la identificación con el API20E . Se aislaron 5 cepas de esta bacteria y 4 de ellas del mismo alimento A6. Además otra cepa del alimento A9 fue identificada como la misma bacteria que las 4 anteriores con el mismo método; es importante destacar que en la PSA se obtuvieron resultados casi idénticos con las 4 del mismo alimento y la aislada del otro. Podría pensarse que se trata de una misma cepa que es resistente a la ampicilina, ticarcilina y a la nitrofurantoína y que proviene de la misma materia prima utilizada en la elaboraciones de alimentos de diferentes marcas.

Para la cepa identificada como *Enterobacter sakazakii* la PSA demuestra una sensibilidad a todos los antibióticos probados con excepción del cefotaxime al cual presenta una sensibilidad intermedia.

Mientras tanto las cepas aisladas del A9 de *S. aureus* presentaron resistencia a la penicilina, lo cual es muy común pues más del 85% de las cepas de *S. aureus* son resistentes a la penicilina (Mahon y Manuselis, 2000), además, presentaban una resistencia a la ampicilina, la eritromicina y al imipenem, destacar que son antibióticos de acción diferente y de mucha importancia en la medicina. Además de los antibióticos probados es resistente a 3 drogas consideradas del grupo A, una del B y otra del C de los medicamentos probados ante infecciones causadas por este agente (ver apéndice 3). La otra cepa de *S. aureus* era sensible a todos los antibióticos probados con excepción de la penicilina y el ceftriaxone al cual presentó un resistencia intermedia.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

El alimento seco para perro es microbiológicamente estable debido a que presenta bajo aw y un proceso de cocción a alta temperatura, lo que compensa en cierta medida la baja calidad de la materia prima y la poca estandarización de los procesos de producción lo que lleva a una variabilidad en la calidad de los lotes de una misma marca de alimento. Todos los alimentos analizados estaban libres de bacterias patógenas como *Salmonella* sp. y *Listeria* sp.

En algunos lotes de alimentos se encontraron bacterias como *Enterobacter sakazakii*, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* que no se consideran patógenas para el animal pero lo podrían ser para una persona que manipule el alimento y más importante aún es que poseen genes de resistencia contra algunos antibióticos y podrían eventualmente ser capaces de transmitirlos.

La calidad del alimento depende principalmente de los procedimientos realizados después de la extrusión, por lo que debería instaurarse en la plantas procesadoras mecanismos preventivos en esos puntos para bajar la carga de microorganismos que alcancen en el alimento.

Es muy importante en la calidad final del alimento, la manipulación que el cliente le dé a la comida. Bolsas abiertas almacenadas por mucho tiempo en condiciones de humedad favorecen su deterioro, además si se humedece o no el alimento influye en un mayor crecimiento bacteriano, y por lo tanto de deteriorarse o de encontrar un patógeno.

5.2. Recomendaciones

Se hace evidente la escasa información que existe sobre el tema en publicaciones formales, por lo que hace falta nuevos estudios que profundicen el tema, en especial en la materia de organismos patógenos para el hombre y para los animales; además de estudios sobre toxinas presentes en el alimento. Podría realizarse estudios que evalúen indicadores más resistentes a las condiciones de humedad del alimento como lo son *Enterococcus* sp. y bacterias esporuladas presentes en el alimento.

Es necesario que las compañías productoras de la comida implementen normas más estrictas sobre el control de la materia prima, evitar el deterioro incipiente (antes de la cocción) para disminuir la posibilidad de producción de toxinas, y mantener buenas normas de higiene en la línea de producción después de la cocción ya que debe ser un “área limpia” con empleados entrenados en las buenas normas de manufactura, para garantizar un alimento limpio y que no vaya a ocasionar daño a la salud de los animales ni del hombre. Incluso cabe la posibilidad de la implementación de estudios de superficie en las fábricas en especial en el área post-cocción donde el alimento se recontamina.

Adicionalmente, se necesita de regulaciones más fuertes por parte del gobierno para alimentos que aunque sean para uso animal, no sean de una calidad inferior. Hace falta crear conciencia que con lo que alimentamos a los animales (tanto los de consumo como los de compañía) puede llegar a afectar nuestra salud.

CAPÍTULO VI

REFERENCIAS

API. What's Really in Pet Food. API Animals Protection Institute. Informe del 2003. www.api4animal.org

Arias, M. Antillón, F. Chaves, C. y Villalobos, L. Microbiología de Aguas y Alimentos: Principios y Prácticas de Laboratorio. Primera Edición. Editorial de la Universidad de Costa Rica. San José, 2006. pp. 18-57; 75-79 y 150-157.

CDC. *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula. Boletín semanal de la CDC #51. 2002. pp. 298-300.

DANMAP. Consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. Danish Zoonosis Center, Danish Veterinary Laboratory. DANMAP No. 1, 1997.

DIGESA. Normativa de criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. Codex alimentario del Perú RM n° 615. 2003.

EUFIC, 2005. www.eufic.com.

FAO. Departamento de Agricultura. Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos. 2003. www.fao.org

Finley, R. Reid, R. Scott, J. Human Health Implications of *Salmonella*-contaminated natural pet treats and raw pet food. Clinical Infectious Diseases. Marzo, 2006. pp. 686-691.

Guardabassi, L.; Schwarz, S.; Lloyd, D. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Vol. 54. 2004. pp. 321-332.

Heuer, O.; Vibeke, F. y Hammerum, A. Antimicrobial Drug Consumption in Companion Animals. *CDC Emerging Infection Disease Journal*. Vol. 11, No 2. 2005. Tomado de www.cdc.gov/ncidod/EID/vol11no02/04-0827.htm

Johnson, J. Stell, A. Delavari, P. Murray, A. Kuskowski, M. Gaastra, W. Phylogenetic and Phatotypic similarities between *Escherichia coli* isolates from ITU in dogs and extraintestinal infections in humans. *The Journal of Infectious Diseases*. 2001. pp. 897-906.

Mahon, C. y Manuselis, G. *Textbook of Diagnostic Microbiology*. Segunda edición. Saunders Company. Filadelfia, 2000. pp. 329-341 y 463-484.

Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG). Decreto No. 16899, Reglamento de la Ley 6883 publicada en "La Gaceta" # 182 del 27 de septiembre de 1983.

Molbak, K. Spread of Resistant Bacteria and Resistance Genes from Animals to Humans. The Public Health Consequences. *Journal of Veterinary Medicine*. Vol. 51. 2004. pp. 364-369.

Molina, A. Diseño e implementación de un sistema de control para una máquina extrusora. Universidad Iberoamericana. México DF, 1999. ProcesosVirtuales.com

Munro, M *et al.* *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. ASM Press. Washington D.C., 1995.

Penido, P. y Pereira, M. Occurrence of aflatoxins B₁, B₂, G₁ y G₂ in some Brazilian pet foods. *Food Additives and Contaminants Journal*. Vol. 19, 2002. pp.1180-1183.

PURINA. NESTLÉ S.A. de Venezuela. 2005. Sitio oficial: www.purina.com.ve/comunicado_1802.php Consultado el 22 de septiembre del 2005.

Rokey, G. Tecnología de la extrusión e implicaciones nutricionales. Wenger Manufacturing Inc. FEDNA. Barcelona, 1995.

Salyers, A. Agricultural use of antibiotics and antibiotic resistance in human pathogens: Is there a link? ROAR II, Alliance for a Prudent Use of Antibiotics. www.apua.com

Strombeck, D. The question of Bacteria in Processed Pet Foods. Informe de la Animal Protection Institute (API) para la AAFCO (Association of American Feed Control Officials) Pet Food Committee. Publicación Oficial del 2001. www.aafco.org

Van der Bogaard, A. y Stobbering, E. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *Journal of Antimicrobial Agents*. Vol. 14. 2000. pp. 327-335.

Vanderzant, C. y Splittstoesser, D. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. APHA. Washington, 1992.

Weese, J.; Rousseau, J. y Arroyo, L. Bacteriological evaluation of commercial canine and feline raw diets. *The Canadian Veterinary Journal*. Vol. 46. 2005. pp. 513-516.

White, D. Datta, A.; McDermott, P.; Friedman, S.; Qaiyumi, S.; Ayers, S.; English, S.; Wagner, D.; Zhao, S. Antimicrobial susceptibility and genetic relatedness of *Salmonella* serovars isolated from animal-derived dog treats in the USA. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* Vol. 52 No. 5. 2003. pp 860-863.

Workman, S. Mathison, G. y Lavoie, M. Pet dogs and chicken meat as reservoirs of *Campylobacter* spp. in Barbados. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 43, No 6. 2005. pp. 2642-2650.

APÉNDICES

Apéndice 1

Cuadro 5:
Abreviaturas y dosis de los antibióticos usados en el proyecto

Abreviatura	Antibiótico	Dosis (g)	Abreviatura	Antibiótico	Dosis (g)
AM10	Ampicilina	10	IPM10	Imipenem	10
AN30	Amikacina	30	NOR10	Norfloxacina	10
CIP5	Ciprofloxacina	5	P10	Penicilina G	10
CRO30	Ceftriaxone	30	SXT	Trimetoprim - sulfametoxazole	25
CTX	Cefotaxime	30	TE30	Tetraciclina	30
E15	Eritromicina	15	TIC75	Ticacilina	75
F/M300	Nitrofurantoina	300	Va30	Vancomicina	30
GM10	Gentamicina	10			

Apéndice 2:

Cuadro 6:
(tomado de Munro *et al.*, 1995). PSA para *Enterobacteriaceae*

Grupo	Protocolo	Antibióticos
A	Probar y reportar rutinariamente	Ampicilina
		Cefazolina
		Cefalotina
		Gentamicina
B	Probar rutinariamente y reportar selectivamente	Mezlocilina
		Piperacilina
		Ticarcilina
		Amoxicilina-ácido clavulánico
		Ampicilina-sulbactam
		Piperacilina-tazobactam
		Ticarcilina-ácido clavulánico
		Cefmetazole
		Cefoperazone
		Cefotetan
		Cefoxitina
		Cefamandole
		Cefonicida
		Cefuroxime
Cefotaxime		
Ceftriaxone ₃		
Imipenem		
Amikacina		
Ciprofloxacina		
	Trimetoprim-sulfametoxazole	
C	Suplementarios, probar y reportar selectivamente	Ceftazidime
		Aztreonam
		Kanamicina
		Netilmicina
		Tobramicina
		Tetraciclina
	Cloranfenicol	
D	Suplementarios, para aislamientos de orina	Carbenicilina
		Cinoxacina
		Norfloxacina
		Ofloxacina
		Nitrofurantoína
		Sulfisoxazole
	Trimetoprim	

Apéndice 3

Cuadro 7:
(tomado de Munro *et al.*, 1995) PSA para *Staphylococcus* sp.

Grupo	Protocolo	Antibióticos
A	Probar y reportar rutinariamente	Penicilina G
		Ampicilina
		Oxacilina
		Meticilina
		Cefalotina
		Cefazolina
		Cefotaxime
		Ceftriaxone
		Vancomicina
B	Probar rutinariamente y reportar selectivamente	Ampicilina-sulbactam
		Amoxicilina-ácido clavulánico
		Piperacilina-tazobactam
		Ticarcilina-ácido clavulánico
		Azitromicina
		Claritromicina
		Eritromicina
		Gentamicina
		Clindamicina
C	Suplementarios, probar y reportar selectivamente	Imipenem
		Ciprofloxacina
		Ofloxacina
		Tetraciclina
		Rifampina
		Cloranfenicol
D	Suplementarios, solamente para aislamientos de orina	Lomefloxacina
		Norfloxacina
		Nitrofurantoína
		Sulfisoxazole
		Trimetoprim

Apéndice 4

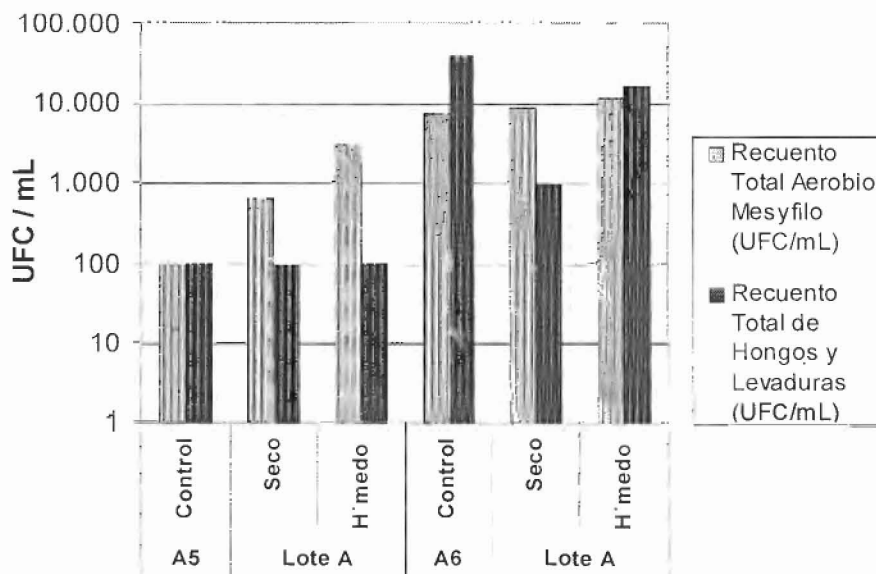


Figura 3: Determinación del efecto del almacenamiento y manipulación en los alimentos para perro analizados en los recuentos aerobio mesófilo total y en el de hongos y levaduras.

Apéndice 5

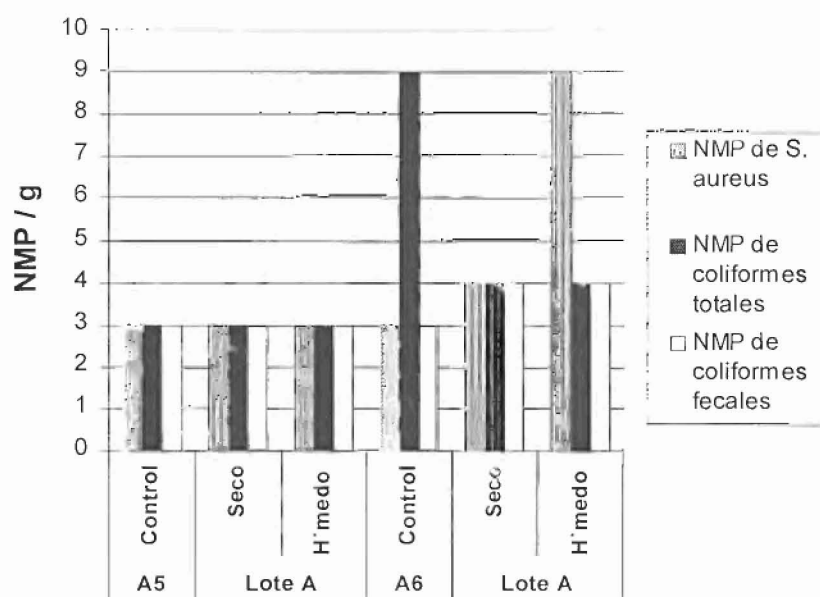


Figura 4: Determinación del efecto del almacenamiento y manipulación en los alimentos para perro analizados en las pruebas de número más probable de *S. aureus* y de coliformes totales y fecales.