

CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTO CONCENTRADO PARA PERROS ADULTOS QUE SE EXPENDE EN COSTA RICA

M. Herrera M, E. Mena J, C. Rojas S, E. Rodríguez C, C. Chaves U, ML Arias E

Facultad de Microbiología y Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET), Universidad de Costa Rica, 2060 San José, Costa Rica

Resumen: El concentrado empacado en bolsa representa uno de los tipos de alimento para perro más utilizados actualmente. Su formulación incluye carne de origen animal como ingrediente mayoritario y un proceso térmico de extrusión, el cual condiciona la flora final predominante. Este tipo de producto, a pesar de su elaboración, está expuesto a muchas fuentes potenciales de contaminación, razón por la cual se decidió evaluar la carga microbiológica presente en 30 muestras expandidas en el Área Metropolitana de Costa Rica, así como estimar el efecto sobre la carga microbiológica que tiene la manipulación del alimento y determinar la presencia de bacterias resistentes a antibióticos. El análisis incluyó el estudio de indicadores de vida útil: recuento total aerobio y anaerobio mesófilo y de hongos y levaduras; 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 presencia de organismos patógenos: *Listeria sp.* y *Salmonella sp.*, y NMP de *Clostridium perfringens* productor de enterotoxina, todo según metodología estandarizada. Los resultados obtenidos demuestran una baja carga microbiológica en el producto, así como la ausencia de *Salmonella spp.*, y *Listeria monocytogenes*. *Clostridium perfringens* fue aislado de dos muestras, pero ningún aislamiento fue enterotoxigénico. El efecto de la manipulación y almacenaje, así como de la hidratación de los alimentos demuestra un aumento gradual de los recuentos bacterianos. Se aislaron cepas bacterianas resistentes a antibióticos, con idéntico perfil de sensibilidad provenientes de diferentes lotes y marcas del producto. Se concluye que el alimento seco para perro es de buena calidad microbiológica, no obstante se deben realizar más estudios que permitan confirmar la seguridad de éste tanto para los animales como para el ser humano.

Palabras clave: alimento concentrado para perro, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, recuentos.

MICROBIOLOGICAL ANALYSIS OF COMMERCIAL ADULT DOG PELLETS SOLD IN COSTA RICA

Abstract: Actually, packed pellets represent one of the most used food sources for dogs. Its formulation includes animal origin meat as mayor ingredient and an extrusion thermic treatment, which conditions the final flora present. This type of product is exposed to several potential sources of contamination, reason why an evaluation of the microbiological load present in 30 different samples sold in the Metropolitan Area of Costa Rica was performed. Also, the effect of manipulation of the product over the microbiological load and the presence of antibiotic resistant bacteria was studied. Analysis included shelf life indicators: total mesophilic aerobic and anaerobic counts, molds and yeasts, contamination indicators: Most Probable Number (MPN) of total and fecal coliforms, a manipulation indicator: *Staphylococcus aureus* MPN, and the presence of pathogenic microorganisms: *Listeria sp.* and *Salmonella spp.* and *Clostridium perfringens* enterotoxin producer MPN, according to standardized methodology. Results obtained show a low microbiological load in the product, and the absence of *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes*. *Clostridium perfringens* was isolated from two samples, but none was enterotoxigenic. The effects of manipulation and rehydration of the product show a gradual increase of the bacterial counts. Antibiotic resistant bacterial strains were isolated, with identical resistance patterns coming from different lots and brands of the product. Concluding, dog food pellets have good microbiological quality, nevertheless, further research shall be done in order to confirm the security of the product, for animals and human beings.

Key words. Dog food pellets, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, counts.

Fecha de recepción: 15/05/09

Fecha de aprobación: 10/12/09

Dirección para correspondencia: M.L. Arias. Facultad de Microbiología y Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET), Universidad de Costa Rica, 2060 San José, Costa Rica.

E-mail: mlarias@fcariari.ucr.ac.cr

INTRODUCCIÓN

Hoy día, uno de los tipos de alimento para perro más utilizados es el concentrado empacado en bolsa, en presentación de figuras compactas. Este producto utiliza carne de origen animal como ingrediente mayoritario, por lo que se considera que es responsable de la calidad final del producto (1); también, conlleva un proceso térmico de extrusión, el cual condiciona la flora normal predominante (2).

Este tipo de producto, a pesar de su elaboración, está expuesto a muchas fuentes potenciales de contaminación; diversos estudios han puesto de manifiesto la presencia de agentes patógenos en él. Strombeck (1) refiere que *Salmonella* sp. es el agente patógeno que se aísla con mayor frecuencia, seguido por *Staphylococcus aureus*. Por otro lado, *Clostridium perfringens* representa la causa más importante de enfermedad entérica clostridial en animales domésticos (3). También, los hongos y levaduras pueden ser aislados con cierta frecuencia, y son capaces de producir micotoxinas que pueden resultar tóxicas para el animal, causando hasta su muerte, como sucedió recientemente en Sudamérica (4). Al respecto, Penido y Pereira (2002) refieren un 12% de positividad por aflatoxinas (n=100) en alimentos para animales obtenidos en Brasil (5).

Por otra parte, varios estudios también han demostrado la presencia de bacterias resistentes a antibióticos en este tipo de producto, incluso se informa de cepas multiresistentes (6). Guardabassi *et al.* (7) demuestran que el uso indiscriminado de antibióticos de amplio espectro en medicina veterinaria ha ayudado a la producción de resistencia a medicamentos como aminopenicilinas combinadas con ácido clavulánico, cefalosporinas y fluoroquinolonas por parte de cepas de *S. intermedius*, *E. coli* y otras bacterias con potencial zoonótico. Además, varios estudios longitudinales de índole veterinaria indican que muchos de los fenotipos resistentes a antibióticos se originaron en hospitales veterinarios, como *S. aureus* meticilina resistentes, enterococos resistentes a vancomicina y *S. typhimurium* DT104 multiresistentes (8).

Lo anterior resulta de suma importancia al considerar la convivencia del ser humano con sus animales de compañía y la posibilidad de transmisión de microorganismos y de sus genes de resistencia (9). Adicionalmente, hay que destacar la poca atención que se le ha dado a las mascotas en la diseminación de bacterias resistentes, comparada con la que se le ha dado a animales y plantas utilizados en la alimentación humana.

Se pretende con este estudio evaluar la carga microbiológica presente en alimento concentrado para perro expendido en el Área Metropolitana de Costa Rica. Se desea estimar el efecto sobre los recuentos bacterianos y fúngicos que

tiene la manipulación del alimento por parte del comprador, así como determinar la presencia de bacterias resistentes a antibióticos y predecir su posible riesgo de diseminación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen de las muestras

Se trabajaron tres muestras de diferente lote de cada uno de 10 alimentos para perro adulto, de diferentes marcas nacionales e internacionales, disponibles (en bolsas cerradas) en las veterinarias del país.

Las bolsas fueron almacenadas a temperatura ambiente, en un sitio de baja 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 las muestras consistió en el estudio de tres indicadores de vida útil: recuento total aerobio y anaerobio 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 presencia de organismos patógenos: presencia de *Listeria* sp. y *Salmonella* sp., y NMP de *Clostridium perfringens* productor de enterotoxina, todo según la metodología descrita en Pouch (10).

INDICADORES DE VIDA ÚTIL

2.1 Recuento total aerobio (RTAM) y anaerobio mesófilo (RTAnM)

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 diluciones decimales utilizando tubos con 9 mL APE. Se inoculó 1 mL de cada dilución en placas petri que fueron recubiertas con agar estándar fundido con 2,3,5 cloruro de trifetil tetrazolium (TTC) 0,5%. Las placas fueron incubadas por 48 h a 35°C en atmósfera aerobia. Para el análisis anaerobio, se realizó el mismo procedimiento pero las placas fueron incubadas en jarras de anaerobiosis.

1.2. Recuento de hongos y levaduras (RH_{YL})

Se utilizaron las mismas diluciones preparadas anteriormente y se inoculó 0,1 mL de cada una por esparcimiento en placas de Agar Papa Dextrosa, las cuales fueron incubadas por 4 días a temperatura ambiente.

3. INDICADORES DE HIGIENE Y CONTAMINACIÓN

3.1 NMP/g de coliformes totales y fecales

Se empleó la técnica de Número Más Probable (NMP) utilizando caldo lactosado simple con campana Durham en la fase de preenriquecimiento (35°C, 48 h), caldo bilis verde brillante (CBVB), incubado 48 h a 35°C para la confirmación de coliformes totales y caldo EC, incubado 24 h a 44,5°C para la confirmación de coliformes fecales.

Los tubos positivos por coliformes totales o fecales fueron rayados en agar sangre para separar las colonias que luego fueron identificadas mediante el sistema miniaturizado API20E® (bioMérieux).

4. INDICADOR DE MANIPULACIÓN

4.1. NMP/g de *Staphylococcus aureus*

A partir de las diluciones preparadas previamente, se realizó la técnica de NMP para *S. aureus*. Como fase de preenriquecimiento se utilizaron tubos de caldo tripticase soya (CTS) + 10% NaCl los cuales se incubaron 48 h a 35°C, y como medio confirmatorio se utilizó agar Baird Parker el cual se incubó 24 h a 35°C.

Las colonias características fueron identificadas mediante tinción de Gram, pruebas de catalasa, coagulasa y crecimiento en agar Manitol Sal. La identificación definitiva se realizó utilizando el sistema miniaturizado APIStaph® (bioMérieux).

5. PRESENCIA / AUSENCIA DE ORGANISMOS PATÓGENOS

5.1 Aislamiento de *Listeria sp.*

Se enriqueció 25 g del alimento en 225 mL de caldo *Listeria* y se incubó por 48 h a 35°C; posteriormente se inoculó en agar Oxford, el cual fue incubado 48 h a 35°C. A las colonias sospechosas se les realizó las pruebas de CAMP, xilosa, arabinosa, ramnosa y movilidad a temperatura ambiente para su confirmación.

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 h a 35°C; posteriormente se realizaron enriquecimientos selectivos en Caldo Selenito (que se incubó por 24 h a 37°C) y en Caldo Tetrionato (que se incubó 24 h a 43°C). Luego del enriquecimiento selectivo se inoculó, por rayado, placas de agar xilosa, lisina, desoxicolato (XLD) y de agar Hecktoen las cuales fueron incubadas 48 h a 35°C. A las colonias sospechosas se les realizó la identificación definitiva con el sistema miniaturizado API20E®(bioMérieux).

5.3. Número Más Probable de *Clostridium perfringens*

Se realizó una fase presuntiva utilizando las diluciones previamente preparadas e inoculándolas en series de tres tubos por dilución de caldo carne picada, anaerobios, prereducidos (PRAS) (11), los cuales fueron incubados a 44°C por 24 h. Los tubos que presentaron turbidez y formación de gas fueron confirmados rayando en placas

de agar oleandomicina polimixina sulfadiazina perfringens (OPSP) las cuales fueron incubadas en anaerobiosis 24 h a 44°C. Las colonias sospechosas fueron confirmadas por las pruebas de Gram, tinción de esporas, doble hemólisis en agar sangre, movilidad y las pruebas rapid ID 32A® (bioMérieux).

5.4 Detección de enterotoxina tipo A de *C. perfringens*

Para la detección de enterotoxina A, cada cepa de *C. perfringens* aislada fue cultivada en caldo carne picada (PRAS) por 24 h a 44°C. Luego, cada tubo fue colocado en baño de agua a 75°C por 20 min y subcultivado en caldo modificado de Duncan y Strong (PRAS) por 96 h a 35°C. Posteriormente, se realizó la prueba de detección utilizando un kit de aglutinación de látex pasiva reversa (PET_RPLA®, Oxoid) (12)

6. EFECTO DEL ALMACENAJE, MANIPULACIÓN E HIDRATACIÓN DEL ALIMENTO

Una vez obtenidos y analizados los resultados anteriores se escogieron dos muestras: aquella con el recuento más bajo y otra con el recuento más alto y se repitieron las pruebas, pero tres meses después de haber abierto el empaque y de haber realizado el primer análisis. Se verificó que la fecha de caducidad fuera posterior al análisis; el alimento fue almacenado en un recipiente plástico cerrado no hermético, a temperatura ambiente. Las muestras fueron evaluadas por indicadores de vida útil, manipulación e higiene. 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 descritas anteriormente.

7. PRUEBA DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS (PSA)

Se seleccionó al azar una submuestra de coliformes totales y de las bacterias patógenas (30%) con el fin de someterlas a la prueba de sensibilidad a los antibióticos, por el método de difusión de Kirby-Bauer en agar Müeller Hinton (13). Se utilizaron como cepas control las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Los antibióticos se seleccionaron de acuerdo con el tipo de bacteria aislada según tablas establecidas.

RESULTADOS

Como parámetro de comparación de este tipo de producto, se utilizó la norma de la Dirección General de Salud Ambiental de Perú (14) donde se establece como límites máximos

permisibles un recuento de aerobios mesófilos hasta $1,0 \times 10^4$ UFC/g; de hongos y levaduras hasta $1,0 \times 10^2$ UFC/g; de coliformes totales hasta 10^1 NMP/g y ausencia de *Salmonella* en 25 g de alimento.

Los recuentos totales aerobios, anaerobios mesófilos y de hongos y levaduras, así como los NMP/g de coliformes totales y fecales se detallan en la tabla 1. Según lo anterior, tres de los alimentos (10%) (alimento 2, lotes A y C, alimento 6, lote C) presentaron recuentos totales de aerobios mesófilos ligeramente mayores al límite superior para este tipo de alimento; el 63% de las muestras presentó un recuento total anaerobio inferior a 10^2 UFC/g. Con respecto al recuento de hongos y levaduras, 15 (50%) de las muestras presentaron recuentos superiores al límite establecido. Todas las muestras analizadas fueron negativas por la presencia de *Salmonella* sp. y *Listeria* sp. Con respecto a *C. perfringens*, únicamente se detectó en dos muestras (6,7%) (alimento 5, lote B y alimento 9, lote A) y ninguno de los aislamientos fue enterotoxigénico.

El efecto de la manipulación y almacenaje, así como de la hidratación de los alimentos seleccionados se puede apreciar en la tabla 2, donde se observa un aumento gradual del RTAM así como del RHyL.

A partir del 30% de aislamientos tomados al azar, se identificaron las especies *Klebsiella pneumoniae* spp. *pneumoniae*, *Enterobacter sakazakii* y *Staphylococcus aureus*. La prueba de sensibilidad a los antibióticos para *K. pneumoniae* demostró resistencia a ampicilina, ticarcilina y nitrofurantoína. Sólo un aislamiento de *E. sakazakii* mostró resistencia a cefotaxime. Dos de las cepas de *S. aureus* aisladas presentaron resistencia a penicilina, ampicilina, eritromicina y al imipenem.

DISCUSIÓN

Las bacterias presentes en el producto analizado son consideradas como parte de su flora normal y la mayoría de los recuentos no superaron el umbral estipulado en la norma utilizada.

Todas las muestras analizadas presentaron RTAM por debajo del límite de detección con excepción de tres lotes, dos de ellos de la misma marca de alimento. Estas excepciones pueden indicar fallas en el proceso de manufacturación, en el empaqueo o en el almacenamiento del producto hasta su análisis. Las fallas de manufactura se dan especialmente cuando el alimento no alcanza una humedad menor del 10% debido a una mala extrusión, un mal secado o empaqueo (2).

Tal y como era de esperar, el RTAM fue bajo en la mayoría de las muestras pues la manufactura y almacenamiento del producto no favorece a esta población. No obstante, la importancia de este análisis estriba en mostrar

que probablemente el proceso de extrusión fue lo suficientemente efectivo como para disminuir las bacterias anaerobias esporuladas presentes.

Un buen número de los RHyL (50% 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 sea a causa del metabolismo de estos organismos. Ante esta situación, no se puede dejar por fuera la potencial presencia de micotoxinas y su efecto, tal y como ha sido descrito en el trabajo de Penido y Pereira (5), quienes informan un 12% de positividad para aflatoxinas en muestras de alimentos secos para mascotas, y el estudio de Purina donde se describe el impacto de aflatoxinas en gatos y perros en Sudamérica (4).

Con respecto a *S. aureus* como indicador de manipulación, únicamente se detectó en tres muestras (10%) lo cual demuestra un buen manejo del producto. Sin embargo, esta bacteria ha sido asociada con enfermedad alimentaria en animales por lo que representa un potencial riesgo para ellos.

Con respecto a los indicadores de higiene y contaminación, únicamente una muestra superó el umbral de 10 NMP/g para coliformes totales y sólo una muestra presentó coliformes fecales. No obstante, la presencia de materia fecal es inaceptable en un alimento ya que conlleva el riesgo de transmisión de bacterias y virus patógenos entéricos.

En este estudio no se logró aislar *Salmonella* spp. ni *Listeria monocytogenes*, probablemente porque son termosensibles y son eliminadas de la materia prima durante la extrusión y el manejo fue adecuado, tal como se señaló anteriormente.

Con respecto a *C. perfringens*, su porcentaje de aislamiento fue bajo (6,7%), lo cual se podría explicar con base en un procesamiento térmico adecuado durante la extrusión o a la presencia de preservantes en el alimento, especialmente antioxidantes artificiales, los cuales son, generalmente, compuestos fenólicos (15) que tienen una probada actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas (16).

Tal y como se señaló, la detección de enterotoxina de *C. perfringens* fue negativa en las dos cepas aisladas, que se puede explicar por el hecho de que el gen que codifica por ésta (cpe) es difícilmente encontrado en cepas aisladas del ambiente (17); además, se informa que únicamente 5-6% de los aislamientos globales portan este gen (16). Incluso, en un estudio realizado por Yuan Tong y Labbé (18), de 40 muestras de alimentos positivas por *C. perfringens* tipo A, ninguna portaba el gen cpe ni la enterotoxina mencionada. Sin embargo, debe considerarse la posibilidad de que en los aislamientos realizados pudieran presentarse a la vez, tanto cepas enterotoxigénicas como no enterotoxigénicas (19).

En cuanto al efecto de la manipulación del alimento en los recuentos se puede observar una tendencia al aumento con el transcurrir del tiempo de exposición al aire. El mismo comportamiento se presenta cuando se da el humedecimiento del producto, por lo que si contiene algún microorganismo patógeno, éste podría aumentar y alcanzar eventualmente su dosis infectante.

Los alimentos para mascotas representan un vehículo poco investigado para transmisión de patógenos y fenotipos de resistencia al hombre, no obstante, la flora de la mascota depende en gran medida de su alimentación, por lo que la comida de perro afecta indirectamente la flora de su dueño. El propósito de realizar la prueba de PSA fue conocer la posible resistencia a los antimicrobianos presente en las cepas aisladas. A partir del análisis realizado, se destaca el aislamiento de cepas de *K. pneumoniae* con moderada resistencia a antibióticos de uso frecuente, pero más importante aún, con idéntico perfil de sensibilidad a partir de diferentes lotes y marcas de alimento, lo que permite suponer el uso de una misma materia prima contaminada.

Estudios hechos por Molbak (8) demuestran que el aumento en la prevalencia de la resis-

tencia a antibióticos en las bacterias comensales o patógenas de animales es indicadora del uso desmedido de antibióticos en medicina veterinaria. 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 extensamente estudiado en animales para consumo humano (20), pero no así en mascotas. Dentro de los pocos estudios que hay referidos a animales de compañía, se reporta también un excesivo uso, especialmente de cefalosporinas y fluoroquinolonas (21), drogas 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 (9).

De los resultados obtenidos, se puede concluir que el alimento seco para perro es de buena calidad microbiológica, probablemente debido a su baja disponibilidad de agua y a que es sometido a 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.

También, se hace evidente la escasa información que existe sobre el tema en publicaciones

Tabla 1. Análisis microbiológico de alimento concentrado para perros adultos que se expenden en Costa Rica.

Microbiological analysis of commercial adult dog pellets sold in Costa Rica.

		RTAM		RHyL	NMP de <i>S. aureus</i>	NMP de coliformes totales (NMP/g)	NMP de coliformes fecales (NMP/g)
	Lote	(UFC/g)	RTAnM	(UFC/g)	(NMP/g)		
1	A	$2,0 \times 10^1$	$6,1 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3
	B	$7,0 \times 10^2$	$1,5 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^2$	< 3	4	< 3
	C	$7,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$	$1,1 \times 10^4$	< 3	< 3	< 3
2	A	$5,0 \times 10^4$	$8,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3
	B	$4,9 \times 10^2$	$6,0 \times 10^1$	$3,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3
	C	$1,1 \times 10^4$	$5,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3
3	A	$3,6 \times 10^2$	$4,5 \times 10^1$	$1,0 \times 10^3$	< 3	< 3	< 3
	B	$8,1 \times 10^3$	$6,8 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3
	C	$1,7 \times 10^3$	$4,8 \times 10^2$	$3,3 \times 10^4$	< 3	< 3	< 3
4	A	$6,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$	$8,0 \times 10^2$	9	4	< 3
	B	$1,2 \times 10^3$	$1,0 \times 10^1$	$2,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3
	C	$9,0 \times 10^1$	$8,1 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3
5	A	$1,0 \times 10^1$	$2,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3
	B	$7,0 \times 10^1$	$9,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3
	C	$2,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^1$	$2,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3
6	A	$7,5 \times 10^3$	$1,0 \times 10^1$	$4,0 \times 10^4$	< 3	9	< 3
	B	$3,6 \times 10^3$	$2,7 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	< 3	< 3	< 3
	C	$8,3 \times 10^4$	$4,9 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^2$	< 3	43	< 3
7	A	$1,2 \times 10^3$	$3,7 \times 10^1$	$1,0 \times 10^3$	< 3	4	< 3
	B	$4,4 \times 10^2$	$5,8 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3
	C	$3,3 \times 10^2$	$4,2 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^2$	< 3	4	4
8	A	$4,0 \times 10^1$	$7,0 \times 10^1$	$5,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3
	B	$1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3
	C	$5,0 \times 10^3$	$2,6 \times 10^2$	Inc	4	< 3	< 3
9	A	$6,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	$6,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3
	B	$3,7 \times 10^2$	$6,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3
	C	$5,3 \times 10^2$	$9,1 \times 10^1$	$4,0 \times 10^2$	7	9	< 3
10	A	$9,0 \times 10^1$	$2,9 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3
	B	$2,5 \times 10^2$	$1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3
	C	$8,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3

Tabla 2. Efecto de la manipulación y almacenaje del alimento para perro con respecto a los recuentos microbiológicos realizados

Effect of manipulation and storage of dog food according to the microbiological counts realized.

Alimento	Condición	RTAM (UFC/g)	RHyL (UFC/g)	NMP de <i>S. aureus</i>	NMP de coliformes totales	NMP de coliformes fecales
1	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
2	Control	$7,5 \times 10^3$	$4,0 \times 10^4$	< 3	4	< 3
	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

formales, por lo que hace falta nuevos estudios relacionados con la detección de organismos patógenos para el hombre y para los animales; de toxinas presentes en el alimento y el potencial de transmitir al ser humano cepas resistentes a diversos antibióticos y capaces de producir enfermedad.

REFERENCIAS

1. Strombeck D. The question of Bacteria in Processed Pet Foods. Animal Protection Institute (API) for AAFCO (Association of American Feed Control Officials). Pet Food Committee 2001.
2. Barrios A, Quincke D, Bayley L & Colombi G. Alimento balanceado para perros. Montevideo, Uruguay: Editorial de la Universidad Católica de Uruguay. 2002; p. 19-21.
3. Walker P. *Clostridium*. En: Carter G y Cole J., editores. Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and micology. Academic Press. California. EEUU, 1990; p 229-251.
4. PURINA. NESTLÉ S.A. de Venezuela. 2005. Sitio oficial: www.purina.com.ve/comunicado Consultado septiembre del 2007.
5. Penido P & Pereira M. Occurrence of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in some Brazilian pet foods. Food Addit. Contam. J. 2002; 19: 1180-1183.
6. 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. J. Antimic. Chemoth 2003; 52: 860-863.
7. Guardabassi L, Schwarz S & Lloyd D. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. J. Antimic. Chemoth 2004; 54: 321-332.
8. Molbak K. Spread of Resistant Bacteria and Resistance Genes from Animals to Humans. The Public Health Consequences. J. Vet. Med 2004; 51: 364-369.
9. Heuer O, Vibeke F & Hammerum A. Antimicrobial Drug Consumption in Companion Animals. CDC Emerg. Infec. Dis. J 2005; 11: 46-54.
10. Pouch F. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Washington, APHA 2001.
11. Holdeman, LV, Cato EP & Moore WEC. Anaerobe Laboratory Manual. 4th ed. Blacksburg: Virginia Polytechnic Institute and State University 1977.
12. Sakagushi G, Uemura T & Riemann H. Simplified method for purification of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. J. Appl. Microbiol 1973; 26: 762.767.
13. Munro M. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington. ASM Press 1995.
14. 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.
15. Hillestad K. Antioxidants as preservatives in dog food. Pet Education 1998.
16. Raccach M. The antimicrobial activity of phenolic antioxidants in foods: a review. J. Food Safety 1984; 6: 141-170.
17. Van Damme-Jongsten M, Wernars K. & Notermans S. Cloning and sequencing of the *Clostridium perfringens* enterotoxin gene. J. Microb 1989; 56: 181-190.
18. Yuan-Tong L & Labbé R. Enterotoxigenicity and genetic relatedness of *Clostridium perfringens* isolates from retail foods in the United States. Appl. Environ. Microbiol 2003; 69: 1642-1646.
19. Garcia-Alvarado JS, Labbé RG & Rodríguez MA. Sporulation and enterotoxin production by *Clostridium perfringens* type A at 37 and 43°C. Appl. Environ. Microbiol 1992; 58: 1411-1414.
20. 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 Consultado setiembre del 2007.
21. 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 . 1997.