

49 29



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**

**ANALISIS BACTERIOLOGICO DE CINCO ALIMENTOS  
COMERCIALES PARA PERROS**

**T E S I S**  
PARA OBTENER EL TITULO DE :  
**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**P R E S E N T A :**  
**ERNESTO MARTINEZ GARCIA**

**DIRECTOR DE TESIS :**  
**MVZ. H. ALEJANDRO MARTINEZ RODRIGUEZ**

**CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO.**

**1990**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# I N D I C E .

	PAG.
1. RESUMEN . . . . .	1
2. ANTECEDENTES. . . . .	2
3. INTRODUCCION. . . . .	8
3.1 RESISTENCIA DE LOS MICROORGANISMOS. . . . .	13
3.1.1 MUTACION CROMOSOMICA. . . . .	13
3.1.2 SISTEMAS DE TRANSFERENCIA GENETICA. . . . .	14
3.2. USOS DE LOS ANTINICROBIANOS EN MEDICINA VETERINARIA . . . . .	18
3.2.1 PROMOTORES DEL CRECIMIENTO. . . . .	18
3.2.2 CONTROL DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS . . . . .	20
3.2.3 PRESERVACION DE ALIMENTOS . . . . .	22
3.3 PRESENCIA DE HONGOS EN LOS ALIMENTOS. . . . .	27
4. OBJETIVOS. . . . .	31
5. MATERIAL . . . . .	32
6. METODOS . . . . .	37
7. RESULTADOS . . . . .	43
8. DISCUSION . . . . .	50
9. CONCLUSIONES . . . . .	53
10. RECOMENDACIONES. . . . .	54
11. REFERENCIAS. . . . .	55

## 1. RESUMEN.

En el presente trabajo se realizó un análisis bacteriológico de alimentos comerciales para perros. Se eligieron alimentos que en su fórmula presentaran antibiótico, tomando dos lotes de cada uno. Para cada uno de los alimentos se prepararon diez diluciones ( $10^{-1}$ - $10^{-10}$ ) sembrándose en agar soya tripticaseína en forma estéril de los cuales se eligió la dilución con carga bacteriana más alta. A éstas se les realizaron pruebas primarias bacteriológicas para determinar su género. Encontrando Staphylococcus, Corynebacterium, Bacillus, Streptococcus, Enterobacterias. Además se llevó a cabo identificación de hongos por el método de microcultivo encontrando los géneros: Penicillium, Cladosporium, Fusarium, Aspergillus y Mucor.

## 2. ANTECEDENTES.

Por más de treinta años, las drogas antimicrobianas han sido ampliamente utilizadas en los alimentos de los animales. Estas drogas se usan para incrementar la tasa de ganancia de peso, mejorando la eficiencia en el aprovechamiento del alimento y/o la prevención y control de enfermedades.

Otros de los usos de los antimicrobianos es la preservación de los alimentos. Dentro de los más utilizados tenemos a las penicilinas, estreptomina, cloramfenicol, tetraciclinas y oxitetraciclinas (17).

En 1957, la conferencia de la "British Veterinary Association" sobre los suplementos y los aditivos en la alimentación animal expresan su inquietud sobre las posibles repercusiones del uso de antibióticos en alimentos balanceados como causa de la resistencia de las bacterias a éstos (36).

Pero no es hasta el año de 1960, cuando una ola de críticas y protestas empezaron a darse contra el empleo de los antibióticos (4).

En 1962, el comité "Nether Thorpe" publica su primer reporte en el cual reconoce que la administración de antibióticos en los animales domésticos favorece la resistencia a los mismos por las bacterias, sin que haya evidencias de que éstos microorganismos van incrementando su virulencia (5).

En 1965 aparecen varios reportes que evidencian el incremento de resistencia a los antibióticos de los microorganismos, especialmente Salmonella, y la presentación de formas transferibles de resistencia (5).

En 1968, el "Ministerio de la Salud y Agricultura, Pesca y Alimentos" de la Gran Bretaña nombra su comité para el uso de antibióticos en los animales domésticos y Medicina Veterinaria, dirigido por el profesor H.M. Swann, siendo el primer gobierno que oficialmente se preocupa por dicha situación (5).

Hasta 1971 el gobierno de la Gran Bretaña acepta el reporte del comité Swann, el cual recomendaba que fuese revocado el acuerdo sobre el uso en los alimentos de la penicilina, clortetraciclina y oxitetraciclina (5). Concluyendo que eran bajos los riesgos que concernían la salud humana y animal pero que, sin embargo, la administración de antibióticos en bajas concentraciones exponía seriamente a la vez a los hombres y a los animales (36).

En 1972, es publicado en Estados Unidos, el reporte de la "Task Force" sobre el uso de los antibióticos en la alimentación animal (25).

La administración para los alimentos y las drogas (FDA) de los Estados Unidos ha propuesto (1978) algunas consideraciones para el uso de antibióticos. Una de ellas dice:

Los niveles bajos de antibióticos en alimentos para animales promueven la aparición de bacterias resistentes entre la flora normal de estos. Reviste mayor interés la flora entérica y la alta tasa de resistencia entre enterobacteriaceas en la flora fecal de los animales que reciben antibióticos en su alimento (33).

Los microorganismos no afectados por un antibiótico, son denominados resistentes. El término resistencia es relativo y aplicable solo para un microorganismo específico y un antibiótico. La resistencia no es universal, por ejemplo, la resistencia a los antibióticos no ocurre en todos los organismos, ni con todas las drogas.

Las bacterias desarrollan resistencia en una o en varias formas incluyendo: mutación, transducción, transformación y conjugación. Y recientemente la resistencia esta relacionada a la transferencia de plásmidos R (29).

Se han observado consecuencias indeseables del uso de antibióticos en los alimentos, entre las que destacan:

a) La selección y diseminación de cepas resistentes a antibióticos.

b) La presencia de un antibiótico produce una presión selectiva que resulta en la remoción de las cepas que conforman la población bacteriana normal, permitiendo su reemplazó por cepas resistentes.

c) Cuando los antibióticos se usan en el tratamiento de una enfermedad clínica, la presión es alta pero de poca duración.

d) Cuando se utilizan como aditivos alimenticios, la presión producida es baja pero de larga duración (43).

Se ha encontrado mayor incremento en el porcentaje de cepas resistentes a tetraciclina en los animales que recibieron antibiótico como suplemento alimenticio, que en los que recibieron a dosis terapéuticas (1).

Sin embargo, se han reportado problemas de resistencia bacteriana a los antimicrobianos, así como problemas diarreicos y respiratorios, sobre todo en pequeñas especies, en donde el agente causal son las enterobacterias. Las enterobacterias más asociadas a este problema son Escherichia coli, Salmonella Thyphimurium, Shigella, Klebsiella, Proteus y Pseudomonas (32).

El uso de antibióticos en la suplementación de alimentos para animales resulta de una resistencia de E. coli (16), y esta resistencia ha sido transferible, de una cepa a otra.

Mercer , encontró que la incidencia de resistencia múltiple en los aislamientos de E. coli fue mayor en hatos expuestos a la administración continua de agentes antimicrobianos. Así mismo encontró que la transferencia de esta resistencia fue mucho mayor en los organismos multirresistentes en los hatos expuestos a medicamentos

antimicrobianos y que las E. coli fueron eficientes en transferir los factores de resistencia.

Otra de las bacterias que ha visto incrementada su resistencia y que han tenido una mayor difusión ha sido la Salmonella (25).

En un estudio bacteriológico sobre la influencia de agentes antimicrobianos sobre el porcentaje de bacterias resistentes a las tetraciclinas en 200 muestras de heces de animales se encontró:

Perros	90%.
Gatos	87%.
Cerdos	100%.
Caballos	38%.

Todos los animales que recibieron antimicrobianos mostraron mayores porcentajes de coliformes y anaerobios resistentes a las tetraciclinas que los animales que no la recibieron (1).

Novick en 1981 cita a varios autores que mencionan que los animales tratados con antibióticos son más susceptibles a la infección por Salmonella que los testigos no tratados y aún señala la posibilidad de que lo mismo puede ocurrir en humanos.

Cambios en la constitución antigénica de las bacterias.

Caccarelli menciona como importante el efecto de los antibióticos sobre la constitución antigénica de los gérmenes .

El uso de los antimicrobianos en los animales no vacunados, permite, una protección clínica sin la adquisición de inmunidad y no contra una reinfección; al contrario, los animales previamente vacunados son más resistentes y responden mejor a un tratamiento con antibióticos.

Lo importante es que cuando se suministre un antibiótico en el alimento y aceptando lo anterior, los animales pueden manifestar una mayor susceptibilidad a las infecciones.

La selección de cepas resistentes virulentas ha tenido innumerables repercusiones en animales en lo que respecta a brotes de campo, hasta epidemias con alta morbilidad y mortalidad, esto se debe a la ineficacia de los antibióticos utilizados en los tratamientos iniciales (13).

Una posibilidad prometedora es la indicada por Viseck (48) en que los mecanismos de promoción del crecimiento parecen no estar relacionados con los factores que ocasionan la resistencia, pero también indica que se requiere mucha mayor investigación experimental.

Jamás los antibióticos podrán sustituir a las medidas adecuadas de alimentación, manejo e higiene.

### 3. INTRODUCCION.

La producción de animales, así como la intensificación de los sistemas de crianza y el aumento de animales en hacinamiento ha obligado el empleo constante de antibacterianos, para lograr una producción económica y masiva, con el objeto de satisfacer las necesidades de la demanda de alimento.

Sin embargo, este empleo indiscriminado de antibióticos ha originado, cada vez mayor frecuencia de cuadros infecciosos que no se resuelven con antibioterapia de primera elección, los cuales estan estrechamente relacionados al fenómeno de resistencia bacteriana. "Se conoce como resistencia bacteriana a un conjunto de mecanismos mediante los cuales los gérmenes se vuelven insensibles ante un quimioterápico al que anteriormente eran sensibles".

Hoy en día por los conocimientos que se han alcanzado en el campo de la genética bacteriana, se conocen más detalladamente los procesos involucrados en el fenómeno de la resistencia bacteriana, el cual es motivo de alarma en los investigadores, los cuales advierten de los grandes peligros tanto para la salud humana como animal de seguir empleándose como hasta ahora, como se señala en el cuadro 1.

**CUADRO 1. DISTRIBUCION DE LA UTILIZACION DE ANTIBIOTICOS EN DIFERENTES PAISES DESARROLLADOS .**

	HOMBRES	ANIMALES	
		T.	U.A.
Gran Bretaña. Reporte Swann año de 1969.	58%	21%	21%
Canadá. Estadística Oficial. año 1974	65%	24%	11%
Francia. Fuente Rhone-Poulec. año 1978.	54%	30%	16%

T -terapéuticos.

U.A. - Uso en alimentos .

\* Fuente Manual Técnico Baytril, 1987.

Basta para ejemplificar este problema las implicaciones graves que puede tener la transferencia de resistencia plasmídica, la cual se caracteriza por transmitir en segundos resistencia a diferentes antibióticos, los cuales pueden llegar a ser 15 en un solo paso y entre bacterias de diferente género.

Los efectos de los antibióticos en el consumidor deben también tomarse en cuenta: por ejemplo la sensibilización al antibiótico, la modificación de su flora intestinal y el desarrollo en su cuerpo de cepas patógenas resistentes al antibiótico (3,14).

La presencia de un antibiótico produce una acción selectiva que resulta en la remoción de las cepas susceptibles del ambiente y su reemplazo por cepas resistentes (3).

Mercer , encontró que la incidencia de resistencia múltiple en los aislamientos de E. coli fué mayor en hatos expuestos a la administración continua de antimicrobianos (84.8%), que en un hato que no recibió antimicrobianos (15.7%). Así mismo encontró que la transferencia de esta resistencia fué mucho mayor en organismos multiresistentes, en los hatos expuestos a antimicrobianos y que la E. coli fué relativamente eficiente en transferir dichos factores de resistencia. (ver cuadro 2).

El uso indiscriminado de agentes antimicrobianos en medicina veterinaria y en nutrición animal, favorece ampliamente la selección de cepas bacterianas portadoras de plásmidos "R". Dada la potencial transmisión de estos plásmidos a cepas patógenas (ver cuadro 3), el riesgo que ésto implica para la salud de los animales es obvia.

**CUADRO 2. ANTIMICROBIANOS PRODUCTORES DE RESISTENCIA MULTIPLE CUANDO SON ADMINISTRADOS EN LA ALIMENTACION.**

SUBSTANCIAS PROBADAS	RESISTENCIA PARA
Tetraciclina	Tetraciclina, Estreptomocina.
Estreptomocina	Tetraciclina, Estreptomocina.
Cloramfenicol	Tetraciclina, Estreptomocina, Cloramfenicol.
Ampicilina	Tetraciclina, Estreptomocina, Ampicilina, Kanamicina, Neomicina.
Kanamicina/Neomicina	Tetraciclina, Estreptomocina, Cloramfenicol, Ampicilina, Kanamicina, Neomicina.
Sulfonamidas	Tetraciclina, Estreptomocina, Cloramfenicol, Ampicilina, Kanamicina, Neomicina.
Arsenicales	Estreptomocina, Ampicilina.
Sales de Cobre	Tetraciclina, Estreptomocina, Cloramfenicol.

\*Fuente Manual Técnico Baytril, 1987.

**CUADRO 3. DETECCION DE RESISTENCIA ANTIBIOTICA DETERMINADA POR PLASMIDOS EN PATOGENOS.**

ORGANISMOS	CLOR	GEN	KAN	MLS	EST	SUL	TET
<b>Gram (-)</b>							
Enterobacteriaceae	•	•	•	•	•	•	•
Haemophilus	•		•				•
Pseudomonas	•	•	•	•	•	•	•
<b>Gram (+)</b>							
S. aureus	•	•	•	•	•	•	•
S. epidermidis	•		•				•
Streptococcus							
Grupo A				•			
Grupo B	•			•			
Grupo C	•	•	•	•	•		•
<b>Anaerobios</b>							
Cl. perfringes	•			•			•

CLOR=Cloramfenicol    GEN=Gentamicina    KAN=Kanamicina  
 MLS=Macrolidos    EST=Estreptomicina    SUL=Sulfas  
 TET=Tetraciclinas

•Fuente Manual Técnico Baytril, 1987.

### 3.1 RESISTENCIA DE LOS MICROORGANISMOS.

El proceso mediante el cual las bacterias adquieren la capacidad de resistencia a los antibióticos varía, pero se puede agrupar en dos mecanismos principales: Mutación Cromosómica y Sistemas de Transferencia Genética (45).

#### 3.1.1 Mutación Cromosómica:

Por definición, una mutación es todo cambio hereditario y da como resultado cambios en la secuencia nucleotídica del ácido desoxirribonucleico (DNA).

Este cambio ocurre al azar, es heredable y da como resultado una modificación en el comportamiento del microorganismo ante determinado antibiótico, sin embargo este cambio no es forzosamente inducido por el quimioterapéutico en cuestión (15).

Las mutaciones pueden ser inducidas por una gran variedad de agentes físicos y químicos que causan directa o indirectamente un aumento en su frecuencia.

Las implicaciones prácticas de este tipo de resistencia pueden comprenderse cuando se consideran las toneladas de sustancias antibacterianas empleadas año con año, las cuales ejercen una acción de selección poblacional dominando posteriormente únicamente las cepas resistentes (44).

### 3.1.2 Sistemas de Transferencia Genética.

#### a) Transformación:

Este fenómeno consiste en que el DNA de un donador es absorbido a la superficie celular de la bacteria receptora para después pasar al citoplasma de la misma. Esto es limitado a gérmenes gram positivos, con excepción de los Haemophilus (45).

#### b) Transducción:

Este proceso involucra la transferencia del DNA de un donador a un receptor, por medio de un bacteriófago. Este puede transmitir un fragmento de DNA cromosómico o un plásmido completo y ocurre en bacterias patógenas, apatógenas, y tanto en grampositivas como gramnegativas (45).

Se realizó un estudio con ratones donde fueron inoculados intravenosamente con una cepa de Staphylococcus sensible a las tetraciclinas, a los que posteriormente se les aplicó un fago transductor obtenido de un Staphylococcus resistente a este antibiótico, dando Staphylococcus resistentes a las tetraciclinas, los cuales fueron recuperados de los riñones de los ratones (8).

Aunque la transducción es responsable de resistencia bacteriana a los antibióticos, no puede ser responsable de la resistencia a varios antibióticos en forma simultánea (45).

### c) Conjugación:

Es un mecanismo de transferencia genética en el cual se requiere del contacto directo entre célula donadora y receptora, sin embargo, los genes necesarios para que se lleve a cabo este proceso están codificados por plásmidos y no por el cromosoma bacteriano (45).

Los plásmidos son moléculas circulares de DNA extracromosómicas, de existencia autónoma en el citoplasma (10).

La célula donadora es distinguida de la célula receptora por la presencia de pili sexuales en la superficie. La unión de una célula con pili sexuales con una sin pili, resulta en la formación de un puente de unión entre las dos células. Durante la formación del puente, el factor "R" asume la forma de cadena simple. La célula donadora es dejada con una sola cadena de DNA del factor "R", la cual pronto sintetiza una copia complementaria. Poco después, la secuencia de genes del factor "R" es transcrita y se sintetiza el pilus sexual, llegando la célula a ser capaz de transferir factores "R" a cualquier otra célula. La transferencia de factores de resistencia requiere además de otro factor conocido como Factor de Transferencia de Resistencia (R.T.F.) que a su vez tiene carácter plasmídico y que origina la formación de pili o microvellosidades de transferencia, que son necesarios para poder transferir los factores "R", codificando

multirresistencia a diversos antibióticos(10).

Los plásmidos que contienen factores "R" confieren resistencia a uno o varios antibióticos y/o metales pesados. Estos plásmidos pueden en un sólo paso conferir resistencia a varios antibióticos. Algunos organismos de bajo poder patogénico pueden actuar como reservorios y transmitirlos a gérmenes patógenos (10).

Este proceso es más común entre enterobacterias. Por ejemplo, se ha visto que Escherichia coli puede transferir eficientemente resistencia por conjugación a Salmonella, Shigella, Klebsiella y Enterobacter. Otros gramnegativos tienen esta propiedad como Haemophilus, Pseudomonas y Neisseria. Los grampositivos como Streptococcus del grupo A, B y D, así como Staphylococcus también la presentan (9).

Se conocen factores "R" con determinantes de resistencia a: Estreptomina, Tetraciclina, Cloramfenicol, Sulfas, Eritromicina, Lincomicina, Penicilinas, Acido Nalidixico, Gentamicina, Kanamicina, Amikacina, Trimetoprim y Furazolidona (9).

#### d) Transposones:

Posteriormente al descubrimiento de la resistencia por plásmidos, se observó una cepa de Streptococcus multirresistente a Eritromicina, Kanamicina,

Tetraciclina, Cloramfenicol y Trimetopris. Lo sorprendente fué que esta cepa no albergaba plásmidos de resistencia que era la única manera de explicar el fenómeno de multirresistencia. Como consecuencia de ello se identificó un nuevo tipo de elemento transponible que se denominó "Transposon Pendular Conjugado". Este elemento genético móvil se autotransporta por un proceso similar al de la conjugación a bacterias grampositivas, como Streptococcus, Staphylococcus y Listeria. Una vez penetrado a la bacteria, este elemento se introduce al cromosoma con lo que pasa a formar parte del material genético hereditario (8).

Entre las bacterias patógenas para los animales, el origen de la multirresistencia es mediado principalmente por plásmidos aunque también la transposición ha sido observada (21).

## 3.2 USOS DE LOS ANTIBIOTICOS EN MEDICINA VETERINARIA.

### 3.2.1 PROMOTORES DE CRECIMIENTO.

Los promotores de crecimiento son compuestos antimicrobianos, agentes sintéticos o mezclas de éstos, que suministrados a los animales aumentan su crecimiento y eficiencia alimenticia, disminuyendo a la vez la morbilidad y mortalidad (39). Estos compuestos son agregados en pequeñas cantidades en la dieta.

La gran mayoría de estos compuestos son antibióticos, existiendo otros como lo son enzimas (mezclas de amilasas, lipasas y proteasas), que liberan nutrientes que no son normalmente aprovechados durante el proceso digestivo.

Otro grupo son los denominados probióticos, que son cepas de *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. bifidus*, *L. bulgaricus* y *L. casei*) o *Streptococcus* (*S. faecium*); que se administran oralmente para alterar la flora intestinal aumentando con esto la ganancia de peso y conversión alimenticia (25).

No ha sido muy bien explicado el mecanismo de acción por medio del cual los antibióticos ejercen este efecto. Hay muchas teorías que se han propuesto con este fin y cada una de ellas se encarga de destacar algunos de los hallazgos, pero no todos juntos.

Sin embargo, se considera que su capacidad para actuar como promotores del crecimiento se debe a la eliminación de microorganismos causantes de infecciones no manifiestas, reducción de sustancias tóxicas que retardan el crecimiento, menor destrucción de nutrientes esenciales en el tracto gastrointestinal por parte de microorganismos, cambios metabólicos, fisiológicos y anatómicos (2,18,30,39,46).

### 3.2.2 CONTROL DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS.

El antibiótico se puede definir como la sustancia química derivada de un ser vivo, que es capaz de inhibir el crecimiento o incluso destruir a los microorganismos. Los antibióticos se han obtenido de determinadas plantas; pero la inmensa mayoría son productos de otros microbios.

Fué la formidable demostración de las posibilidades extraordinarias de la penicilina en la quimioterapia de varias enfermedades infecciosas lo que llamó la atención del mundo médico sobre los antibióticos y condujo a la investigación intensa de nuevas sustancias de este tipo, lo que todavía continúa. En 1929, el bacteriólogo inglés, Fleming, separó por primera vez de un hongo, el Penicillium notatum, la sustancia llamada penicilina, e hizo observaciones originales sobre su acción antibacteriana. Sin embargo, no fué sino hasta el año 1938, cuando Florey y Chain, iniciaron una serie de estudios sobre la penicilina en que se demostró su poder verdaderamente extraordinario como agente en la quimioterapia contra las enfermedades infecciosas humanas. Otro descubrimiento inicial importante fué el de Waksman y col., que en 1944 anunciaron haber aislado la estreptomocina, que fué el primer antibiótico de valor positivo en el tratamiento de la tuberculosis (23).

Hasta la fecha han sido descubiertas más de 20,000

substancias con características antibacterianas, de las cuales apenas un centenar son empleadas en forma terapéutica rutinaria y en Medicina Veterinaria el número es aún menor (45).

El Médico Veterinario ha utilizado a los antibióticos para la terapia de enfermedades infecciosas en animales enfermos, pero ha hecho de esta práctica un hábito innecesario en muchos casos.

Melson y Morelli, señalaron que el uso inadecuado de las drogas pueden provocar:

1. Demora en el diagnóstico.
2. Ausencia de una terapia efectiva para cierta enfermedad que amenaza la vida, pero que sea curable.
3. La producción de una toxicidad seria.
4. La prolongación de la enfermedad.
5. El desarrollo de un desorden que de otra manera no padecería el paciente.

Las drogas antimicrobianas pueden prolongar la duración de la diarrea de un animal al inducir infecciones menores en el tracto intestinal (26).

Médicos Veterinarios de los Estados Unidos y de Europa señalaron que el desarrollo de la resistencia bacteriana se debe, en la mayoría de los casos, al uso terapéutico y a la adición de los antibióticos en los alimentos (30).

### 3.2.3 PRESERVACION DE ALIMENTOS.

La habilidad de los antibióticos para inhibir el crecimiento bacteriano, aún cuando hubiesen sido utilizados en mínimas dosis, hacen que estos compuestos sean atractivos para la preservación de los alimentos (33).

Los antibióticos han despertado gran interés en varios países como medio para retardar la putrefacción durante el almacenamiento de alimentos tales como pescado, carnes, aves de corral, frutas, etc. Las investigaciones han demostrado de modo concluyente que pequeñas dosis de antibióticos empleadas en la elaboración de estos alimentos duplican su tiempo de conservación (41).

Algunos antibióticos son efectivos en grados diferentes en la conservación de alimentos. Entre los más importantes tenemos a la penicilina, la estreptomina, cloramfenicol, tetraciclina y la oxitetraciclina, bacitracina, nicina y subtilin (17).

Estos han sido usados como:

1. Aditivos en la refrigeración de alimentos perecederos durante su almacenamiento, transporte y mercadeo.
2. Durante la preparación de diversos productos como los congelados.
3. Como aditivo para disminuir el tiempo de aplicación de calor durante el procesado.

Para ser autorizados en la producción de alimentos, los antibióticos han de reunir ciertas condiciones: deben estar libres de toxicidad y no influir sobre la calidad nutricional del alimento; deben tener un amplio espectro de actividad microbiana y deben quedar fácilmente inactivados cuando el alimento se trata por el calor o en un determinado tiempo, dependiendo del antibiótico empleado (ii).

Al consumir los alimentos, no debe haber presente la más mínima cantidad de antibiótico activo, para evitar que pueda provocar la aparición de cepas resistentes de bacterias patógenas (ii).

a) uso en la carne y huevo.

La carne de bovinos, de pescado y aves, ha sido conservada utilizando tetraciclinas y sus derivados. Se ha reportado que aves enteras, en partes o sus vísceras sumergidas en una solución de 30 ppm. de tetraciclina amplía su vida de conservación en 7 a 14 días más que los controles (41).

La "Food and Drug Administration" permite el empleo de baños de clortetraciclina y oxitetraciclina para la conservación de la carne de aves, permitiendo un residuo de 7 ppm en aves evisceradas no cocidas. Tal nivel de antibióticos duplica o triplica el tiempo de almacenamiento posible para la carne. También permite 5

ppm de las tetraciclinas en pescado fresco, moluscos sin concha, por inmersión o en el hielo (14).

La tetraciclina se ha usado también para proteger el huevo aplicándola por inmersión. El huevo se conservó en un buen estado durante 8 meses post-tratamiento a 18°-35°C ; más del 80% de los huevos tratados con antibiótico fueron microbiológicamente estériles en tanto que los controles no lo fueron (41).

Los microorganismos que por lo común se encuentran en el hielo empleado para preservar los productos de la pesca, son Pseudomonas, Achromobacter y Flavobacterium spp. De ahí que cada vez es más frecuente la práctica de agregar antibióticos al hielo. Para ello se emplea tetraciclina (2 a 5 ppm) incluida en el hielo empleado por barcos pesqueros de Gran Bretaña, Canadá, Japón y los Estados Unidos. En un experimento de 14 días de duración se obtuvieron recuentos bacterianos de 190 millones de bacterias por gramo de pescado con hielo ordinario, en tanto que en el preservado con hielo con antibiótico, el recuento sólo alcanzó 25 millones de gérmenes por gramo de pescado (42).

#### b) Uso en leche y productos lácteos.

A pesar de que los antibióticos en la leche y sus derivados son considerados como una adulteración, se han realizado algunos intentos para conservarlos con ellos.

Se ha utilizado por ejemplo la estreptomicina, observandose que inhibe el crecimiento de E. coli pero no afecta las bacterias patógenas. Se ha sugerido que el antibiótico sea agregado inmediatamente después de la ordeña para prevenir el crecimiento de microorganismos contaminantes.

El mayor problema de los residuos de antibióticos es la manufactura de alimentos derivados de la leche tales como la crema, mantequilla, yogurth, etc., ya que los antibióticos pueden inhibir el crecimiento de microorganismos iniciadores (24).

#### c) Uso en alimentos balanceados.

Ya que la mayoría de los alimentos balanceados son peletizados para reducir o eliminar los microorganismos presentes en los subproductos de origen animal, dicho proceso no es una garantía de que los alimentos así tratados estén libres de patógenos al ser consumidos por los animales, por las posibilidades de recontaminación después de salir del equipo productor. Se han utilizado antibióticos como la penicilina, tetraciclina y oxitetraciclina, para aumentar la preservación de los alimentos en almacenamiento (20).

El ciclo de transmisión de salmonelas patógenas en humanos y animales se ha estudiado ampliamente y se ha llegado a la conclusión de que la principal fuente

contaminante son los subproductos de origen animal (Harina de pescado y Harina de carne) que se usan como ingredientes en alimentos balanceados; éstos a su vez contaminan a los animales como pollos de engorda los cuales pueden sufrir los efectos de salmonelas patógenas (28).

### 3.3 PRESENCIA DE HONGOS EN LOS ALIMENTOS.

Hay que considerar también que ciertos padecimientos transmitidos por los alimentos son producidos por micotoxinas. No está aclarado por completo el papel de las micotoxinas, pero la incidencia y la naturaleza de su acción en los animales justificaría su estudio.

Las micotoxinas son sustancias metabólicas producidas por hongos. Algunas de ellas son fuertemente tóxicas para muchos animales, además se ha encontrado que poseen propiedades carcinogénicas. No obstante se ha reportado su presencia en alimentos para animales domésticos(14).

Existe gran número de toxinas fúngicas en los alimentos, pero sólo unas pocas parecen constituir peligro potencial. Entre éstas se encuentran las aflatoxinas (19).

La aflatoxicosis se descubrió en el año 1947 por Ewing en una intoxicación masiva sufrida por pavos ingleses alimentados con maíz, intoxicación que se denominó "hepatitis X", ya que el órgano afectado era el hígado. Se hizo responsable de esta intoxicación al hongo Aspergillus flavus. Las aflatoxinas también las producen otras especies del mismo género: Aspergillus parasiticus, Aspergillus niger, Aspergillus ruber, etc. (19).

Los hongos se desarrollan ampliamente con una temperatura ambiente de 20°C en adelante, una humedad relativa

externa del 80% y una humedad de sustrato del 9% o bien donde el almacenamiento de los alimentos se realiza por procedimientos primitivos (19).

Las aflatoxinas más hepatocarcinógenas son:(37).

Aflatoxina B<sub>1</sub>.

Aflatoxina B<sub>2</sub>.

Aflatoxina B<sub>1+2</sub>.

Aflatoxina G<sub>1</sub>.

Aflatoxina G<sub>2</sub>.

Aflatoxina G<sub>1+2</sub>.

Las aflatoxinas son los carcinógenos hepáticos más potentes que se conocen en la actualidad. Prácticamente afectan a todos los animales y al hombre. Entre los primeros, las aves, ganado porcino y bovino, cánidos y peces.

En el cuadro 4 se presentan la DL-50 oral de aflatoxina B<sub>1</sub> para diferentes especies.

CUADRO 4. DL-50 ORAL DE LA AFLATOXINA B<sub>1</sub> PARA LAS DIFERENTES ESPECIES (mg/kpv).

Conejo. . . . .	0.3
Gato. . . . .	0.3-0.6
Cerdo . . . . .	0.62
Rata 21 días. . . . .	5.5-7.2
Oveja . . . . .	2.0
Pollo . . . . .	6.3
Hamster . . . . .	10.2

FUENTE: Jurado R: Introducción a la Toxicología Veterinaria 1983.

Las dietas con alto contenido en proteína suelen ser protectoras, ya que hacen posible que las enzimas detoxificantes del hígado funcionen en forma óptima. La deficiencia protéica, ciertas deficiencias de vitaminas y las dietas ricas en grasas saturadas hacen que el animal sea más sensible a la intoxicación por aflatoxina (12).

Los experimentos con animales sugieren que las aflatoxinas son inmunosupresoras. Por ello, la exposición a la toxina hace posible el empeoramiento de los efectos de cualesquiera enfermedades infecciosas recurrentes o la predisposición a estas enfermedades (12).

En el cuadro 5 se marcan los efectos tóxicos de estas sustancias sobre los diferentes órganos (22):

**CUADRO 5. LESIONES MAS CARACTERISTICAS CAUSADAS POR UNA INTOXICACION CON MICOTOXINAS.**

- |                        |  |
|------------------------|--|
| 1. Lesiones Hepáticas: | Hepatitis con necrosis y hemorragias que afectan al parénquima, tejido conectivo y conductos biliares.<br>Inhibición del DNA hepático.                           |
| 2. Lesiones Gástricas: | Lesiones irritativas con posible ulceración.   |
| 3. Lesiones Renales:   | Degeneración parenquimatosa.   |
| 4. Lesiones Hemáticas: | Hemorragias y edemas locales.<br>Aumento de fragilidad capilar.<br>Disminuye el nitrógeno no proteico, que se traduce en el mediano crecimiento de los animales. |

Fuente: Jurado, R.: Introducción a la Toxicología Veterinaria 1983.

Se presentan otras micotoxinas que no son tan importantes como las citadas, pero que sin embargo, pueden ser unas de ellas mucho más tóxicas. Este es el caso de la luteosquirina y la islanditoxina producidas por el Penicillium islandicum, regulocina producida por el Penicillium regulosum, patulina producida por Penicillium patulinum, que son altamente hepatocarcinógenas (37).

#### **4. OBJETIVO .**

- 1) Aislar e identificar los principales generos bacterianos y de hongos, presentes en el alimento comercial para perros.**
- 2) Una vez identificado el agente contaminante, determinar su posible resistencia hacia los antimicrobianos contenidos en el alimento comercial encontrados en diluciones mayores de  $10^{-6}$ .**

## 5. MATERIAL.

Cinco alimentos comerciales para perros. Los cuales se enumeraron del 1 al 5, identificando los diferentes lotes con las letras A y B, con las siguientes características.

### ALIMENTO 1.

Fórmula: maíz molido, y otros cereales, subproductos de los granos, pasta de soya, pasta de cártamo, pasta de girasol, gluten de maíz, fosfato dicalcico, carbonato de calcio, sal, DL-Metionina, L-Lisina, vitaminas A, B<sub>1</sub>, D<sub>3</sub>, E, K, cloruro de colina, tiamina, riboflavina, DL-Pantotenato de calcio, niacina, piridoxina, ácido fólico, biotina, almidon de maíz, aceite, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, I, antibiótico, antioxidante, saborizante y color artificial.

	A	B
LOTE No.:	39	81
FECHA DE ELABORACION:	03-5-88	16-11-88
FECHA DE CADUCIDAD:	ausente	ausente
TOMA DE MUESTRA:	26-6-88	01-12-88
FECHA DE ANALISIS:	01-8-88	02-12-88

### ALIMENTO 2.

Fórmula: germen de trigo, maíz precocido, harina de soya, harina de alfalfa, azúcar de maíz y caña, productos de destilería, pastas de oleaginosas, harina de carne con hígado, harina de pescado, solubles de pescado, leche en

polvo, grasa animal, vitaminas A, D estabilizadas, riboflavina, ácido pantoténico, niacina, colina, vitaminas B<sub>1</sub>, ácido fólico, vitaminas E, C, tiamina, piridoxina, vitamina K, fosfato de calcio, carbonato de calcio, cloruro de sodio, yodo, hierro, cobre, cobalto, manganeso, magnesio, antibióticos: tetraciclina o penicilina procainica 2 gr. por tonelada, antioxidante.

	A	B
LOTE No.:	54283	56882
FECHA DE ELABORACION:	12-6-87	ausente
FECHA DE CADUCIDAD:	ausente	ausente
TOMA DE MUESTRA:	03-09-88	01-12-88
FECHA DE ANALISIS:	17-09-88	14-01-89

### ALIMENTO 3.

Fórmula: leche deshidratada, granos precocidos, harina de hueso, harina de pollo, harina de pescado, pastas de oleaginosas, suero seco de leche, subproductos de trigo, grasa animal, levadura de cerveza, azúcar, fosfato de calcio, carbonato de calcio, sal, vitamina A estabilizada, vitaminas D<sub>3</sub>, E, K, tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantoténico, cloruro de colina, piridoxina, yodo, hierro, cobre, cobalto, manganeso, magnesio, zinc, colorante, saborizante artificial, antioxidante y antibiótico.

	A	B
LOTE No.:	54283	41783
FECHA DE ELABORACION:	ausente	11-2-88
FECHA DE CADUCIDAD:	ausente	ausente
TOMA DE MUESTRA:	03-09-88	10-12-88
FECHA DE ANALISIS:	17-10-88	24-02-89

#### ALIMENTO 4.

Fórmula: maiz, trigo, sorgo, pasta de soya, gluten de maiz, harina de carne y hueso, harina de carne de ave, harina de pescado, suero seco de leche, leche deshidratada, levadura de cerveza, grasa animal estabilizada, lisina, methionina, ortofosfato, carbonato de calcio, cloruro de sodio, vitaminas A, D, E, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, ácido pantoténico, niacina, piridoxina, ácido fólico, biótina, vitamina B<sub>12</sub>, colina, antioxidante, colorante, saborizante, antibiótico, Cu, Mg, Fe, Mn, Zn, I, Se, y K.

	A	B
LOTE No.:	118	0120
FECHA DE ELABORACION:	ausente	ausente
FECHA DE CADUCIDAD:	ausente	ausente
TOMA DE MUESTRA:	24-10-88	01-12-88
FECHA DE ANALISIS:	12-11-88	03-03-89

#### ALIMENTO 5.

Fórmula: Harina de carne, pasta de soya, harina de pescado, sorgo precocido, salvado de trigo, trigo, edulcorantes, grasa animal, vitamina A, vitamina B-12, vitaminas C, D, E, vitamina K, ácido fólico, ácido

pantotenico, colina, niacina, piridoxina, riboflavina, tiamina, fosfato de calcio, carbonato de calcio, cloruro de sodio, yodo, hierro, cobre, cobalto, magnesio, manganeso, metionina, sabor a carne, antioxidantes y antibiótico.

	A	B
LOTE No:	457	488
FECHA DE ELABORACION:	AUSENTE	AUSENTE
FECHA DE CADUCIDAD:	AUSENTE	AUSENTE
FECHA DE TOMA:	01-12-88	22-12-88
FECHA DE ANALISIS:	27-01-89	27-01-89

**MATERIAL DE LABORATORIO:**

Cajas de microcultivo.

Cajas petri.

Tubos de ensayo.

Matraz Erlen-Meyer.

Gradillas de alambre.

Asas de inoculación.

Portaobjetos.

Cubreobjetos.

Pipetas 1/10 ml.

Pipetas 10 ml.

Morteros.

Espátula.

Pinzas de disección.

Bisturí.

**Frasco para muestras estériles**

**Contador de colonias**

**Microscopio Compuesto.**

**Microscopio Estereoscópico.**

**Estufa Bacteriológica.**

**Algodón.**

**Alcohol.**

**Autoclave.**

**Azul de algodón de lactofenol.**

**Formol 10%.**

**Agua destilada.**

**Agua oxigenada.**

**Agar Soya Trypticaseina.**

**Agar Dextrosa Sabouraud.**

**Agar G/F.**

**Medio ácido-glucosa.**

**Medio de Casein-meat.**

## **6. METODOS.**

### **PROCEDIMIENTO:**

La metodología aplicada para el procesamiento de las muestras se puede observar en el diagrama 1.

Los alimentos utilizados para el desarrollo de este estudio se obtuvieron de dos centros comerciales de autoservicio, en donde los alimentos se encontraban en anaqueles metálicos, las bolsas de alimento que fueron muestreadas eran de presentación de 5 Kg., éstas se encontraban colocadas una encima de otra formando pilares, las presentaciones de alimento en caja de 750 gr. que fueron muestreadas son colocadas en forma vertical una detrás de la otra. Se seleccionó la bolsa o caja de alimento que no presentara perforaciones o algún otro daño en su empaque.

La temperatura promedio del lugar varía entre los 16°-18°C. La humedad relativa no se obtuvo.

1. La toma de muestras se realizó de la siguiente manera:

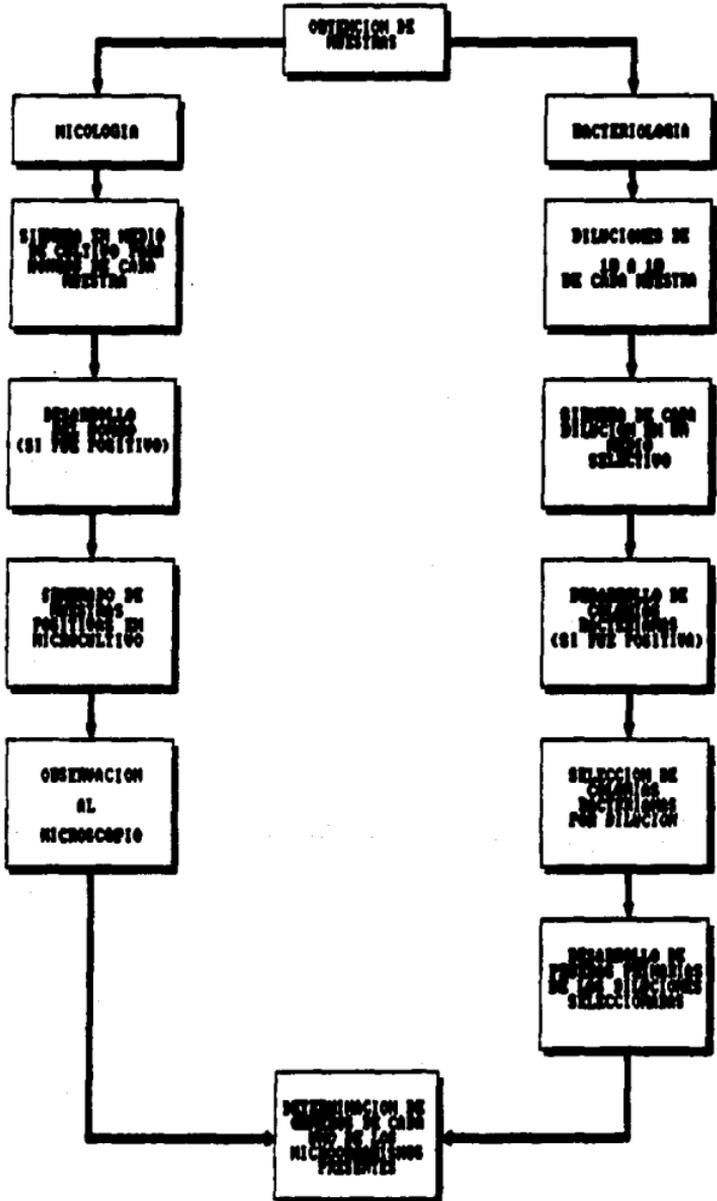
- Las cajas o bolsas de alimento comercial fueron seleccionadas al azar.

- Se utilizaron frascos limpios y estériles para la recolección.

- Cada frasco se etiquetó, con los siguientes datos:

- a) Nombre del producto.
- b) Fecha de elaboración.
- c) Fecha de caducidad.
- d) Número de lote.
- e) Fecha de toma de la muestra.

DIAGRAMA 1. METODOLOGIA APLICADA.



- Se tomaron aproximadamente 20 gr. de muestra, estas se mantuvieron en un lugar fresco y tapadas. Tomando dos de cada alimento, en frascos individuales.

## 2. Conteo de colonias por inoculación en superficie.

Técnica de Miles y Mirsa (Técnica de la gota).

- Se preparó agar soya tripticaseína a razón de 40 gr del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Se esterilizó en autoclave entre 118°-121°C y a una presión no mayor de 15 lb por 15 minutos.

- Se dejó enfriar hasta llegar a una temperatura de 40°-45°C aproximadamente y se procedió a vaciar 15ml. del medio de cultivo agar soya tripticaseína en cada una de las cajas petri estériles, se dejaron solidificar. Enseguida se colocaron las cajas petri en la incubadora a 37°C con la tapa removida durante unas tres horas.

- Por otro lado se realizaron diluciones del alimento a analizar de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-10}$ , tomando como base 1 gr. de alimento, previamente triturado con la ayuda de un mortero estéril, más 9ml. de agua destilada estéril en cada tubo de ensayo.

- Posteriormente se inoculó, utilizando una caja petri con agar soya tripticaseína por cada dilución, a la cual se le dividió en tres segmentos iguales con un marcador e identificando cada una. Con ayuda de una pipeta pasteur estéril se inocularon dos gotas por segmento a distancia suficiente para evitar su confluencia. Utilizando una pipeta por dilución.

- Terminada la inoculación de todas las diluciones, se incubaron a 37°C durante 24 horas, en posición invertida.

- La lectura se realizó de la siguiente manera: Se contaron las colonias de cada dilución, sacando el número de colonias promedio, previamente identificando que fueran colonias similares en base a su forma o tinción de Gram.

- Posteriormente se eligió la dilución con carga bacteriana más alta. A estas diluciones se les realizó las pruebas primarias (forma, Gram, Catalasa, Motilidad, Ácido glucosa, Oxidación/Fermentación) con la finalidad de determinar el género.

3. Identificación de hongos por el método de microcultivo.

- Se preparó agar dextrosa sabouraud a razón de 65 gr. del medio deshidratado por litro de agua destilada. Se esterilizó a 118°-120°C y a una presión no mayor de 15 lb durante 15 minutos.

- Se dejó enfriar y se vaciaron 10 ml. del medio de dextrosa sabouraud en cajas petri estériles, dejando solidificar. Posteriormente se pasaron a prueba de esterilidad.

- Se procedió a inocular pequeños trozos de alimento en las cajas petri en forma estéril, se incubaron a temperatura ambiente durante 3 - 9 días.

- Posteriormente se realizó la técnica de microcultivo.

**Procedimiento:**

- Se cortó aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> del medio de dextrosa sabourand en caja, con ayuda de una espátula en forma aseptica.

- Se depositó sobre el portaobjetos que previamente se colocó sobre la varilla de la caja de microcultivo.

- Por medio de una asa en forma de "L" se tomó una pequeña cantidad del cultivo primario del hongo y se inoculó en las orillas del cuadrito del medio que se encuentra sobre el portaobjetos de la caja de microcultivo.

- Tomando el cubreobjetos con ayuda de unas pinzas de disección previamente flameadas se colocó encima del cuadrito de medio, terminando con una ligera presión.

- Dentro de la caja de microcultivo se adicionaron aproximadamente 10 ml. de agua destilada esteril, teniendo cuidado de que el nivel del líquido no toque el portaobjetos.

- Se incubó a temperatura ambiente, hasta observar en los bordes del medio desarrollo del micelio debiendo tocar tanto el portaobjetos como el cubreobjetos.

- Antes de su observación fué necesario inactivar el hongo, para ello retiramos el agua destilada con una

pipeta estéril y la sustituimos por formol al 10 %, dejándola por espacio de 24 horas.

- Posteriormente se retiró el cubreobjetos con ayuda de unas pinzas de disección previamente flameadas, colocandolo en un portaobjetos que contenía unas gotas de azul de algodón de lactofenol.

- Se continuó retirando el cuadrado del medio de cultivo con un bisturí previamente flameado, del portaobjetos del microcultivo. A éste se le agregan unas gotas de azul de algodón de lactofenol y se le colocó encima un cubreobjetos.

- De esta manera se obtuvieron dos preparaciones por microcultivo, y se procedió a la observación en el microscopio compuesto con el objetivo 40X, para determinar su género.

## 7. RESULTADOS.

Se mencionaran los resultados por número de alimento y lote.

ALIMENTO 1 LOTE A. No se observó crecimiento bacteriano en ninguna dilución, siendo lo mismo en el agar para hongos (microcultivo). Ver gráfica 1.

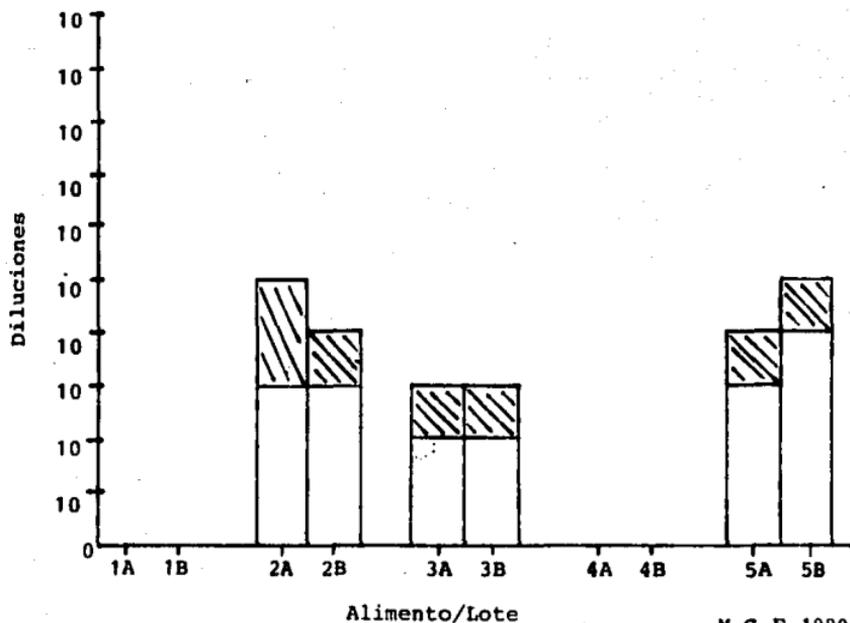
ALIMENTO 1 LOTE B. No se presentó crecimiento bacteriano en ninguna dilución, ni se observó desarrollo micelial en el microcultivo microcultivo.

ALIMENTO 2 LOTE A. Hubo crecimiento bacteriano en las diluciones  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  (gráfica 1). De la colonia de la dilución  $10^{-4}$  se encontraron bacterias con forma de coco, los resultados de las pruebas primarias se observan en el cuadro 6, identificándose el género Staphylococcus spp. De las colonias de la dilución  $10^{-5}$  se aisló una forma única de bacterias siendo éstas bacilos, los resultados de las pruebas primarias se observan en el cuadro 6, se identificó el género Corynebacterium spp.

Por el método de microcultivo se encontró un hongo, aterciopelado de color verde oscuro, de crecimiento abundante, identificado morfológicamente como el género Penicillium spp. (cuadro 7)

ALIMENTO 2 LOTE B. Hubo crecimiento bacteriano en la dilución  $10^{-4}$  (gráfica 1). Observando bacterias en forma

**Gráfica 1. DILUCIONES DE LOS ALIMENTOS ANALIZADOS CON CRECIMIENTO BACTERIANO.**



M.G.E. 1990

En la gráfica 1 se muestran las diluciones donde hubo crecimiento bacteriano. Se señalan las diluciones en las cuales se encontró mayor número de colonias bacterianas a partir de las cuales se llevaron a cabo pruebas primarias para determinar su género.

CUADRO 6. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS PRIMARIAS REALIZADAS A LAS COLONIAS BACTERIANAS ENCONTRADAS EN LOS ALIMENTOS ANALIZADOS.

ALIMENTO	LOTE	FORMA	GRAM	CATALASA	MOTILIDAD	DC GLUCOSA	G/V	GENERO
1	A	/	/	/	/	/	/	SIN CRECIMIENTO
	B	/	/	/	/	/	/	SIN CRECIMIENTO
2	A	COCO	+	+	-	+	F	STAPHYLOCOCCUS SPP
		BACILO	+	+	-	-	-	CORYNEBACTERIUM SPP
	B	BACILO	+	-	-	+	F	CLOSTRIDIUM SPP <sup>*</sup>
3	A	BACILO	+	+	+	+	O	BACILLUS SPP <sup>*</sup>
	B	COCO	+	+	-	+	F	STAPHYLOCOCCUS SPP
4	A	/	/	/	/	/	/	SIN CRECIMIENTO
	B	/	/	/	/	/	/	SIN CRECIMIENTO
5	A	COCO	+	-	-	+	F	STREPTOCOCCUS SPP
		COCO	+	-	-	+	F	STREPTOCOCCUS SPP
	B	BACILO	-	+	+	+	F	ENTEROBACTERIA

N.G.E.1990

\* ESPORULADO, PRUEBA DE COKET MEAT +.

CUADRO 7. GENEROS DE HONGOS ENCONTRADOS EN LOS ALIMENTOS.

ALIMENTO	LOTE	GENERO
1	A	SIN CRECIMIENTO
	B	SIN CRECIMIENTO
2	A	PENICILLIUM SPP
	B	CLADOSPORUM SPP
3	A	FUSARIUM SPP
	B	CLADOSPORUM SPP
4	A	SIN CRECIMIENTO
	B	SIN CRECIMIENTO
5	A	ASPERGILLUS SPP
	B	MUCOR SPP

W.G.E.1998

de bacilos esporulados, los resultados de las pruebas primarias se resumen en el cuadro 6, se identificó el género Clostridium spp. Además se sembró a estas bacterias en el medio Cooked-meat con un crecimiento positivo.

En el medio de Sabouraud (método de microcultivo) se encontró un hongo aterciopelado de color hueso, de escaso crecimiento, identificado morfológicamente como el género Cladosporium spp. (cuadro 7)

ALIMENTO 3 LOTE A. Hubo crecimiento bacteriano en la dilución  $10^{-3}$  (gráfica 1) encontrando bacterias con forma de bacilos esporulados los resultados de las pruebas primarias aparecen en el cuadro 6, se identificaron como el género Bacillus spp. Se sembraron en medio Cooked-meat obteniendo un crecimiento positivo.

Por el método de microcultivo se aisló un hongo identificado morfológicamente como Fusarium spp. (cuadro 7).

ALIMENTO 3 LOTE B. Fue observado crecimiento bacteriano en la dilución  $10^{-3}$  (gráfica 1), encontrando bacterias en forma de coco, las pruebas primarias realizadas se observan en el cuadro 6, se identificó el género Staphylococcus spp.

Se identificó morfológicamente por el método de microcultivo el género Cladosporium spp, de escaso crecimiento y de color blanco (cuadro 7).

ALIMENTO 4 LOTE A. No hubo crecimiento bacteriano en ninguna de las diluciones. Tampoco se presentó crecimiento de hongos por el método de microcultivo (gráfica 1).

ALIMENTO 4 LOTE B. No hubo crecimiento bacteriano en ninguna de las diluciones. Por el método de microcultivo no se obtuvo crecimiento (gráfica 1).

ALIMENTO 5 LOTE A. Se presentó crecimiento bacteriano en la dilución  $10^{-4}$  (gráfica 1). Se observaron bacterias con forma de cocos se identificaron como el género Streptococcus spp. después de realizar las pruebas primarias que aparecen en el cuadro 6.

Como resultado del microcultivo se identificó un hongo del género Aspergillus spp (cuadro 7).

ALIMENTO 5 LOTE B. En la dilución  $10^{-3}$  hubo crecimiento de dos colonias bacterianas diferentes morfológicamente (gráfica 1). De las colonias más pequeñas se observó que eran bacterias en forma de cocos, los resultados de las pruebas primarias aparecen en el cuadro 6, identificándolas como el género Streptococcus spp.

De las colonias más grandes de bordes irregulares de color rosa pastel, se identificaron como el género de Enterobacterias, los resultados de las pruebas primarias se presentan en el cuadro 6.

Por el método de microcultivo se aisló un hongo del

género Mucor spp. De un crecimiento abundante, de color negro/gris (cuadro 7).

## 8. DISCUSION.

El antibiotico en el alimento debe de inhibir o disminuir el crecimiento bacteriano (33,41,17). En los alimentos peletizados es recomendable agregar antibioticos para aumentar su preservación durante su almacenamiento (20).

En el análisis de los alimentos 1 y 4 no se encontró crecimiento de microorganismos. Por lo que se puede pensar que estos alimentos tuvieron concentraciones elevadas de antibioticos y/o fueron sometidos a un peletizado a temperaturas muy elevadas o en su defecto contengan alguna otra sustancia (conservador) que inhibe el crecimiento bacteriano.

De las bacterias encontradas (*Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *E.coli* como *Enterobacteria*) nos indican que los alimentos estan contaminados. Aunque en el presente estudio se encontraron a diluciones bajas.

Por otra parte el uso de los antimicrobianos en el alimento, puede ser utilizado por el productor con fines de control de la flora bacteriana (17) o realmente se presenta resistencia a los antibioticos usados. Sin embargo, en este estudio no se pudo determinar a que antibioticos eran resistentes los microorganismos encontrados, debido a que el fabricante en su fórmula no nos indica la dosis y tipo de antibiotico utilizado y

además existe una diversidad de antibióticos empleados y únicamente se puede evaluar si tiene o no sustancias inhibidoras, por lo que el análisis del tipo de antibiótico que pudiera tener, requiere de estudios más sofisticados. Por lo que no se realizó antibiograma al no encontrar crecimiento bacteriano en diluciones mayores de  $10^{-6}$ , ya que también se menciona que bacterias como E. coli son capaces de producir problemas diarreicos aproximadamente a estos títulos (35).

En el presente estudio se encontró un hongo que pertenece al género Aspergillus como contaminante de un alimento, así como Jurado, que menciona que es contaminante de los alimentos produciendo aflatoxinas que son capaces de producir enfermedad (micotoxicosis), causando severas afecciones en hígado. Actualmente el límite de aflatoxinas permitido en un alimento es de 30 ppb (14). No se realizaron pruebas de niveles de aflatoxinas.

Balconi, menciona en su estudio que los procedimientos en la elaboración de alimentos peletizados no están libres de patógenos al ser consumidos por los animales por las posibilidades de recontaminación después de salir del equipo productor (20). Nosotros consideramos que esto es posible ya que el manejo del alimento durante su almacenaje y venta en los lugares de procedencia de los alimentos analizados es inadecuado. Además su empaque en

la mayoría de los casos presenta perforaciones y/o rupturas.

Consideramos la posibilidad de que los alimentos analizados puedan ser la fuente para producir enfermedades tóxicas e infecciosas y/o transferir resistencia a uno o varios antibióticos sobre la flora intestinal normal de los perros. Esta posibilidad tendrá que ser reafirmada con base a estudios posteriores.

## 9. CONCLUSIONES.

- a) De cinco alimentos comerciales para perros analizados sólo en tres se encontraron microorganismos contaminantes siendo los géneros de bacterias:
- Staphylococcus spp., Corynebacterium spp.,  
Clostridium spp., Bacillus spp., Streptococcus spp.,  
Enterobacteria.
- b) Los géneros de hongos encontrados fueron:
- Penicillium spp., Cladosporum spp., Fusarium spp.,  
Aspergillus spp., Mucor spp.
- c) En ningún alimento se encontraron microorganismos en diluciones mayores de  $10^{-5}$ . Lo que nos indica que la contaminación por bacterias en los alimentos no es abundante.
- d) De los tres alimentos contaminados los microorganismos que se aislaron fueron a diferentes concentraciones (ver gráfica 1).
- e) No se determinó a que antibiótico eran resistentes los microorganismos identificados, al no encontrar ningún alimento con crecimiento bacteriano en diluciones mayores a  $10^{-5}$ .

## 10. RECOMENDACIONES.

1. Nosotros recomendamos a los productores de alimentos en galleta para perros, mencionen claramente en su envase la fecha de caducidad, fecha de elaboración y lote, no utilicen sólo las leyendas siguientes:  
"NO LO SIRVA SI SE ENLAMA O CAMBIA DE APARIENCIA".  
"EVITASE SI CAMBIA DE ASPECTO O SE ENLAMA".  
"NO LO SIRVA SI PRESENTA CAMBIOS DE COLORACION".
2. Recomendar a los dueños de los perros no dar alimentos en galletas que contengan antibióticos en su fórmula.
3. Descartar los antibióticos utilizados con más frecuencia en la preparación de alimentos en galletas para perros, en el tratamiento de diarreas principalmente.
4. Como una alternativa en el tratamiento de diarreas utilizar los probióticos, pudiendo desarrollar estudios sobre su eficacia en perros.
5. En próximos trabajos determinar niveles de antibióticos en el alimento en galleta para perros.
6. Evaluar la concentración de los inhibidores o conservadores de los alimentos, así como a que concentraciones inhibe el crecimiento bacteriano.

## 11. REFERENCIAS.

- 1...Ahart, J.G et al. (1978): The influence of antimicrobial agents on the percentage of tetracycline-resistant bacteria in faeces de humans and animals. J. Appl. Bacteriol., 44:183-190 .
- 2...Barnes R.H. and col. (1960): The Mechanism of the Thiamine Sparing Effect of Penicillin in rats. J. Nutrition., 71:149-155 .
- 3...Bartlett J.G. (1979): Antibiotic-associated pseudomembranous colitis. Rev. Infect. Dis.1:530-539.
- 4...Benazet F. (1978): Les Antibiotiques dans L'Alimentation Anmale. Cah. Med. Vet., 47:147-154.
- 5...Braude R. (1978): Antibiotics in Animal Feeds in Britain. J. Anim. Sci., 46:1425-1436 .
- 6...Carter G.R. (1985): Bacteriología y Micología Veterinaria, Acribia, 3a. edición, Zaragoza, pp. 70-90.
- 7...Ceccarelli A. (1969): Azione Degli Antibioici Sulla Inmunita Suplemento. Selenza e Practica 5:137-140 .
- 8...Corona-Brambila G.O. (1982): Avances en el Conocimiento de la Resistencia Bacteriana. Infectología, 2:29 .

- 9...Courvalin P. (1986): Problemas del Desarrollo de Resistencia a los Antibióticos. Ciprofloxacina, monografía del producto, 1a edición, Adis press Nueva Zelanda.
- 10..Davis J., Smith D.I. (1978): Plasmid Determined Resistance to Antimicrobial Agents. Annual Rev. Microbial. 32:469 .
- 11..FAO (1969): La Inspección y Vigilancia de Aditivos Alimentarios en la U.R.S.S. 8:25-27.
- 12..FAO (1982) : Perspectivas sobre Micotoxinas. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma .
- 13..Finlad H. (1970) : Changing ecology of bacterial infection as related to Antibacterial Therapy. J. Infect. Dis. 122:419-431 .
- 14..Frazier W.C. and Vesthoff D.C. (1978): Microbiología de los Alimentos. Acribia, 3a.edición, España, pp 46-80, 162-164, 447-453.
- 15..Fuentes V. México (1985): Farmacología y Terapéutica Veterinaria. Interamericana, 2a edición México, pp 72-73.

- 16..Gardner P. (1978): Antibiotics in Animal Feed. The Need for Better Epidemiologic studies. J. of Infections Diseases. 138:101-103 .
- 17..Genigeorgis C., Riemann H.P. (1979): Food Processing and Hygiene Chap. 11. of Food borne Infections and Intoxications. H. Riemann and F. Bryan, Ed. Academic Press, New York.
- 18..Gordon H.A. (1961) : Effects of the Normal Microbial Flora on Various Tissue Elements of the Small intestine. Acta. Anat. 44:210 .
- 19..Hardisson A., Castells S. (1988) : Cancerigenos en Alimentos. Alimentaria. Vol. año xxv, 190:71-84 .
- 20..Iván R.B. (1988): Efecto del Peletizado Sobre el Contenido Bacteriano en Alimentos. Año 1, 2:3-9 .
- 21..Jawets E., Metnick S.L., Adelberg E.A. (1983) : Microbiología Médica, 10a edición, El Manual Moderno, México.
- 22..Jurado R. (1983) : Introducción a la Toxicología Veterinaria. Artes Graficas Flores, Albacete.
- 23..Kenneth L.B. and Williams P.R. (1982): Microbiología, Publicaciones Cultural, 1a. edición, México, pp.329-333.

- 24..Kilara A. (1980): Antibiotics and Food Safety, in Safety of Foods. Avi. Pub. Co.,Graham H.D. Ed. 2th.
- 25..Kiser J.S. 1976: Perspective on the Use of Antibiotics in Animal Feeds. J. Anim. Sci., 42:1058-1072 .
- 26..Kirk W.R., Bistner I.S. (1985): Terapeutica Veterinaria. Salvat Editores, 3a edición, España, pp 20-29.
- 27..Kolb E. (1971): Microfactores en Nutrición Animal. Acribia, 1a. edición, España, pp 243-257.
- 28..Lassiter W.J., Hardy M.E. (1982): Animal Nutrition, 2a. ed. pp 355-356.
- 29..Linton A.H. (1982): Problems of Antibiotics Resistance in Animals and their Public Health Significance. Annual Veteninary. pp 45-52 .
- 30..Maynerd L.A. (1981): Nutrición Animal. Mc Graw-Hill, 2a. edición, México, pp 381-390.
- 31..McDonald P., Greenhalg F.D. (1981): Nutrición Animal, Acribia, 3a. edición, España, pp 419-428. 32. Nelson K.L. and Morrelli H.F. (1978) : Clinical Pharmacology: Basic Prinples in Therapeutics, 2 nd. ed. New York, Macmillan.

- 33..Memorias Problemática de los Antimicrobianos en la Medicina Veterinaria. U.N.A.M. F.M.V.Z. Posgrado (1984).
- 34..Mendoza M.A., Chacón L.M., Lara G.R. (1986): Aislamientos resistentes a antibióticos. Infectología, Año 6, 12:519-525 .
- 35..Mercer H.D. et al. (1971) Characteristics of antimicrobial resistance of *Escherichia coli* from animals: Relationship to veterinary and management use of antimicrobial agents. *Appl. Microbiol.* 22:700-705 .
- 36..Mickey W.M. (1975): The Use of Antibiotics in Animals Feed in United Kingdom. *World Poul. Sci. J.*, 31:116-128 .
- 37..Moreno F. y Torre Ma. C. de la. (1980) : Lecciones de Bromatología II, Ed. Romagraf, Barcelona, pp 164-168.
- 38..Novick R.P. (1981) : The Development and Spread of Antibiotic Resistant Bacteria as a Consequencel of Feeding Antibitics Tolivestock. *Ann.N.Y. Acad. Sci.* 368: 23-59 .

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

- 39..O'Connor J.J. (1980): Mechanisms of Growth Promoters in Single Stomach Animals. *Growth in Animals*. Edited by: Lawrence, T.L.J., Butter Worths London-Boston, pp 207-227.
- 40..Pi Joan A.C., Lastra G.A. (1977) : Manual de Identificación de Bacterias de Interés Veterinario. UNAM FES-C.
- 41..Potter N.N. (1978): Food Science. Deteriorative Factors and Their Control. *Avi. Pub.*, 8th ed., Co. Connecticut, pp 170.
- 42..Schwabe C.W. (1968): Medicina Veterinaria y Salud Pública. Ed. Navaro, The Williams & Wilkins Co. Baltimore.
- 43..Smith H.W. (1970): Effect of Antibiotics on Bacteria in animals. *Am. J. Clin. Nut.* 23:1472-1479 .
- 44..Vázquez R.F. y col. (1987): El Problema de la Resistencia Bacteriana. Manual Técnico Baytril. Bayer de México, pp 13-19.
- 45..Vásquez R.L.F. (1987): El Problema de la Resistencia Bacteriana, en el VIII Ciclo de Conferencias Internacionales sobre Avicultura. Asociación Mexicana de Especialistas en Nutrición Animal. México.

46. Viseck W.J. (1978): The Mode of Growth Promotion by antibiotics. J. Anim. Sci. 46:1447-1469 .