

AISLAMIENTO DE GRAM NEGATIVOS EN LECHE CRUDAS CON ANTIBIOTICOS

Gram negative isolations from raw milk with antibiotics

Zulbey Ch. Rivero R.*

José F. Faría R.**

Rosa Santoro S.*

* Facultad Experimental de Ciencias

** Facultad de Ciencias Veterinarias

Universidad del Zulia

Maracaibo, Edo. Zulia, Venezuela

RESUMEN

En virtud del uso indiscriminado de antibióticos en el ganado, se realizó un estudio para detectar su presencia en leche cruda. Se recolectaron aleatoriamente 216 muestras de fincas del área Concepción-La Paz y de la Costa Oriental del Lago de Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela. El Delvotest P y el Disco Ensayo propuesto por la AOAC fueron usados para detectar antibióticos, las leches positivas fueron sembradas en ARVB y los crecimientos se identificaron según las tablas de Martínez. Un 20.37% de las muestras resultaron positivas para antibióticos y de éstas se aislaron 77 cepas bacterianas, de las cuales 71 (92.2%) eran coliformes y 6 (7.8%) bacilos Gram negativos no fermentadores de la glucosa. Dentro de los coliformes, *Enterobacter sp.* representó el 39.4%; *Escherichia coli*: 22.5%; *Klebsiella sp.*: 26.7% y otros géneros un 11.26%. Para los bacilos Gram negativos no fermentadores, *Pseudomonas sp.* representó el 66.6% de los aislamientos y *Acinetobacter sp.* el 33.3%. En vista de los numerosos aislamientos de Gram negativos en leche con antibióticos se destaca el posible alto grado de resistencia desarrollado por las mismas.

Palabras claves: Gram negativos, antibióticos, leche cruda.

ABSTRACT

Because of the indiscriminate use of antibiotics in livestock, a study was conducted to detect its presence in raw milk. 216 samples of milk were randomly collected from farms in the

Concepción - La Paz area and the Oriental Coast Maracaibo Lake, Zulia State, Venezuela. Devoltest P and the Disc Assay Method of the AOAC were performed to detect antibiotics; the positives samples were cultured in ARVB and the isolations identified by Martínez's tables. 20.37% of the samples were positives for antibiotics, and from this, 77 bacterial strains isolated, 71 corresponded to coliforms (92.2%) and 6 to Gram negative glucose no-fermenter rods (7.8%). In coliforms *Enterobacter sp.* represented the 39.4%; *Escherichia coli*: 22.5%; *Klebsiella sp.*: 26.7% and another genus: 11.26%. To Gram negative no-fermenter rods, *Pseudomonas sp.* represented the 66.6% of the isolations and *Acinetobacter sp.* the 33.3%. As the numerous isolations of Gram negatives in milks with antibiotics, it emphasize the probable high degree of resistance developed by them.

Key words: Gram negative, antibiotics, raw milk.

INTRODUCCIÓN

Los antibióticos son ampliamente usados en el tratamiento de infecciones bovinas, particularmente la mastitis. Por otra parte, es conocido que pueden conseguirse residuos de ellos en la leche y sus productos.

La detección de estos residuos en leche es importante por varias razones: primero, en cuanto a salud pública, en vista de que algunos antibióticos tienen propiedades alergizantes para personas sensibles; segundo, los antibióticos causan inhibición de las bacterias iniciadoras usadas en la elaboración de productos lácteos fermentados; tercero, en algunos países su presencia es considerada ilegal y está sujeta al pago de multas; y cuarto, la probabilidad de que se incremente la resis-

cia de las bacterias entéricas humanas o se dé lugar a la ingestión de bacterias antibiótico-resistentes [5].

La OMS* ha establecido algunos parámetros en relación a la presencia de antibióticos en la leche. En 1993 la OMS y la FAO** estipularon que la concentración máxima aceptable de residuos de antibióticos era de <0.2 ppm; específicamente para leche de consumo humano el límite de penicilina es de 0.01 UI/m [4]. En nuestro país los organismos oficiales no tienen especificación alguna al respecto.

En virtud de esta problemática, en los últimos años en los países desarrollados, entre ellos, los Estados Unidos de Norteamérica, y la Comunidad Económica Europea, se han ensayado y comparado gran cantidad de técnicas microbiológicas y no microbiológicas que permiten detectar la presencia de residuos de antibióticos en leche [3,7,12,13,21,22,25,28,29,31].

Diversos trabajos usando estas técnicas, han reportado significativos niveles de antibióticos en leches de vaca y otros animales [1,9,19,20,24,27,30], detectándose en algunos, la presencia de más de un antibiótico. Brady y Katz [5] en un estudio de leches pasteurizadas en Estados Unidos, confirmaron que un 63% de las muestras tenían antibióticos, un 27% contenía dos residuos y un 1% contenía tres o más residuos.

Los mecanismos bacterianos de resistencia a antibióticos son bien conocidos desde hace mucho tiempo, y la presencia de residuos de antibióticos en la leche permiten el desarrollo de resistencia por la mayoría de las cepas que en ella se encuentran. Jones [14] encontró que 122 de 466 muestras de leche cruda y 5 de 586 de leche pasteurizada contenían *Escherichia coli*; de estos 127 aislamientos, 15 eran resistentes a uno o más antibióticos. Resultados similares han sido reportados para otros coliformes como *Enterobacter spp* y *Klebsiella spp* por varios autores [2,6,8,11,15,16,17].

Considerando que en Venezuela no se han hecho estudios acerca de la prevalencia de bacilos Gram negativos en leche con antibióticos, se decide realizar el presente trabajo para evaluar la situación en la Región Zuliana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra

216 muestras de leche cruda fueron recogidas asépticamente en frascos de vidrio de 50 ml de capacidad, directamente de los tanques de enfriamiento en varias fincas, 181 muestras correspondían al sector Laberinto y 35 a la COL***. Estas fueron transportadas bajo refrigeración al Laboratorio de Cien-

cia y Tecnología de la Leche de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia.

Tratamiento de la muestra

A las muestras se les practicaron pruebas para detectar antibióticos, el Delvotest P (de Gist-Brocades) y/o el método de Disco Ensayo con *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* propuesto por la AOAC [23]. Las muestras de leche que resultaron positivas para el ensayo de antibióticos se diluyeron en Buffer Fosfato Salino (PBS), a varias concentraciones (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}), las cuales fueron sembradas por profundidad en Agar Bilis Rojo Violeta (ARVB), e incubadas a 37°C por 24 horas.

Aislamiento y Caracterización

Las colonias fermentadoras o no de la lactosa aisladas en ARVB fueron sembradas en Agar Triple Azúcar Hierro (TSI), y posteriormente pruebas bioquímicas como: producción de Indol, utilización de Urea, utilización de Citrato, motilidad en Agar, decarboxilación de Ornitina y Lisina fueron realizadas para su caracterización según las tablas de identificación de Martínez [18]. Otras pruebas bioquímicas (E). KCN, MR-VP, Gelatina, Arginina decarboxilasa), fueron realizadas cuando se necesitaba una diferenciación mayor de las enterobacterias.

A los cultivos que resultaron inactivos en el TSI, Taco alcalino, Bisel alcalino, se les realizaron pruebas de Oxidasa en agar nutritivo, motilidad y presencia o no de pigmentos, para su diferenciación dentro de los bacilos Gram negativos no fermentadores de la glucosa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

44 muestras resultaron positivas a las pruebas de antibióticos, lo que representa un total de 20.4%. Esta incidencia de antibióticos no se considera tan alta si se compara con los valores encontrados en otros países de América del Sur, especialmente los reportados por Cruz y cols. [9] en México, cuyas cifras alcanzan hasta un 90.4%.

En la TABLA I se puede observar los resultados por zonas; se destaca que el mayor porcentaje corresponde a la COL en donde el 68.6% de sus leches contenían antibióticos. También se señala que el 90.9% de las leches de ambas zonas que resultaron positivas a las pruebas de antibióticos, se obtuvo crecimiento de Gram negativos. Esto podría indicar que los residuos de antibióticos presentes, no interfirieron en el crecimiento bacteriano, bien, porque la concentración en la cual estos se hallaban no eran suficientes para inhibir el desarrollo, o que el tipo de antibiótico no era efectivo contra estas bacterias.

En la TABLA II se aprecia que los principales aislamientos de Gram negativos corresponden a coliformes (92.2%), quedando los bacilos Gram negativos no fermentadores de la

* Organización Mundial de la Salud.

** Food Agricultural Organization.

*** Costa Oriental del Lago de Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela.

TABLA I

RESULTADO EN TÉRMINOS DE PORCENTAJE, DE LECHE POSITIVAS A ANTIBIÓTICOS
Y CRECIMIENTOS OBTENIDOS DE ELLA SEGÚN ORIGEN DE LA MUESTRA

Origen	Nº de muestra	Con antibiótico	%	Con crecimiento	%
Maracaibo	181	20	11.0	18	90.0
COL	35	24	68.6	22	91.6
Total	216	44	20.4	40	90.9

TABLA II

RESULTADO EN TÉRMINOS DE PORCENTAJES,
DE LOS GÉNEROS OBTENIDOS A PARTIR DE LECHE POSITIVAS A ANTIBIÓTICOS

Género	No. de cepas aisladas	%
Coliformes:		
<i>Enterobacter</i> sp.	28	36.4
<i>Escherichia</i> sp.	16	20.7
<i>Klebsiella</i> sp.	19	24.7
<i>Serratia</i> sp.	4	5.2
<i>Citrobacter</i> sp.	3	3.9
<i>Proteus</i> sp.	1	1.3
Sub-total	71	92.2
BGNNFG		
<i>Pseudomonas</i> sp.	4	5.2
<i>Acinetobacter</i> sp.	2	2.6
Sub-total	6	7.8
Total	77	100.0

glucosa (BGNNFG), en un menor porcentaje (7.8%). Esta misma relación se encuentra normalmente entre los bacilos Gram negativos en leches crudas sin antibióticos [26].

En la TABLA III se especifican los géneros encontrados dentro de los coliformes, y se destacan los altos porcentajes encontrados de *Enterobacter spp* (39.4%), *Escherichia spp* (22.6%) y *Klebsiella spp* (26.7%); quedando un pequeño porcentaje (11.3%) para otros géneros de menor frecuencia, FIG. 1.

Estos resultados se consideran razonables, en vista de

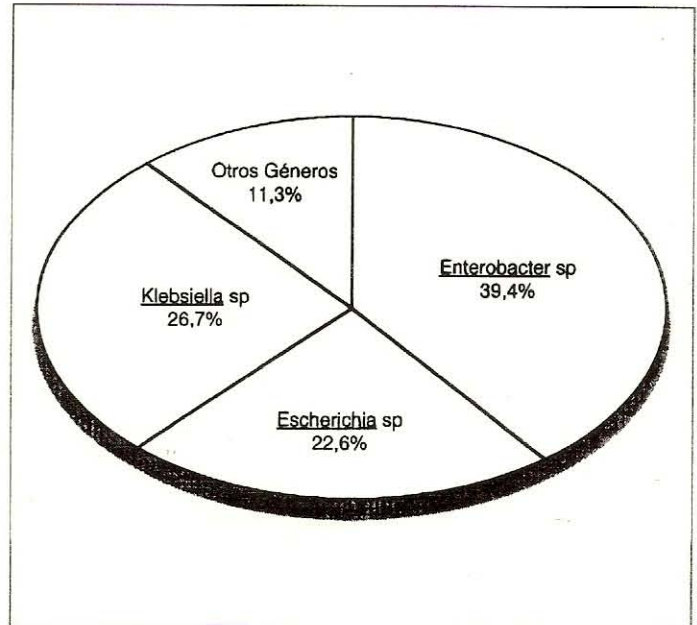


FIGURA 1. DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE LOS PRINCIPALES GÉNEROS DE COLIFORMES AISLADOS DE LECHE POSITIVAS A ANTIBIÓTICOS.

TABLA III

RESULTADO EN TÉRMINOS DE PORCENTAJES,
DE LOS GÉNEROS DE COLIFORMES OBTENIDOS A
PARTIR DE LECHE POSITIVAS A ANTIBIÓTICOS

Género	No. de cepas aisladas	%
<i>Enterobacter</i> sp.	28	39.4
<i>Klebsiella</i> sp.	19	26.7
<i>Escherichia</i> sp.	16	22.6
<i>Serratia</i> sp.	4	5.6
<i>Citrobacter</i> sp.	3	4.3
<i>Proteus</i> sp.	1	1.4
Total	71	100.0

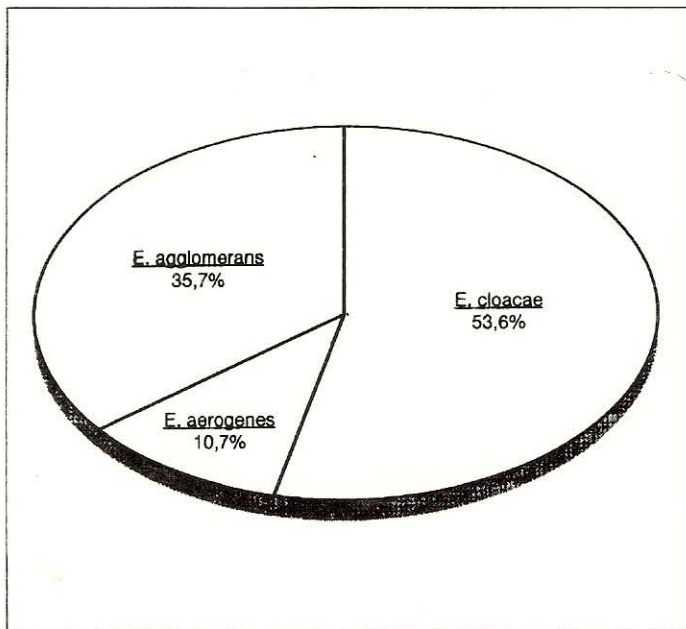


FIGURA 2. DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE LAS ESPECIES IDENTIFICADAS DENTRO DEL GÉNERO *Enterobacter*.

que estos géneros representan a los coliformes mayormente productores de mastitis en la Región Zuliana. Andrade [2] encontró 25 aislamientos de *Escherichia coli*, 7 de *Klebsiella* spp y 5 de *Enterobacter* spp, en su estudio de prevalencia de coliformes en mastitis bovina en la COL; si además consideramos que estos microorganismos podrían haber desarrollado en los últimos años una gran antibiótico-resistencia, se explicaría entonces su presencia en las muestras de leche.

En la TABLA IV se observa que *Pseudomonas* spp, representa al BGGNFG más comúnmente aislado (66.7%), se considera que esta prevalencia se debe a que en los últimos años este género ha desarrollado una gran resistencia a una amplia gama de antibióticos.

En la TABLA V se pueden notar algunas diferencias en los porcentajes de géneros aislados, entre las leches provenientes de Maracaibo y la COL. En Maracaibo prevalecieron los aislamientos de *Escherichia coli* (39.3%) y *Enterobacter* spp (30.3%); mientras que en la Costa Oriental del Lago prevalecieron los de *Enterobacter* spp (41.0%) y *Klebsiella* spp (36.3%); estas diferencias pueden atribuirse a variaciones en la flora bacteriana de acuerdo al mestizaje del ganado que se encuentra en cada una de estas regiones y/o variaciones en las fuentes de contaminación de la leche cruda.

Las pruebas bioquímicas que permitieron identificar los 16 aislamientos de *Escherichia* como *Escherichia coli* (100%), los 28 crecimientos de *Enterobacter* como: *Escherichia cloacae* un 53.6%; *Escherichia aerogenes* un 10.7% y *Escherichia agglomerans* un 35.7%, FIG. 2; cabe destacar que *Escherichia coli* es considerada coliforme fecal, lo que podría indicar po-

TABLA IV

RESULTADO EN TÉRMINOS DE PORCENTAJES, DE LOS GÉNEROS DE BGGNFG OBTENIDOS A PARTIR DE LECHES POSITIVAS A ANTIBIÓTICOS

Género	No. de cepas aisladas	%
<i>Pseudomonas</i> sp.	4	66.7
<i>Acinetobacter</i> sp.	2	33.3
Total	6	100.0

TABLA V

RESULTADO EN TÉRMINOS DE PORCENTAJES, EN CUANTO A GÉNEROS AISLADOS DE LECHES POSITIVAS A ANTIBIÓTICOS, SEGÚN ORIGEN DE LA MUESTRA

Género	% Maracaibo	COL
Coliformes:		
<i>Enterobacter</i> sp.	30.3	41.0
<i>Klebsiella</i> sp.	9.1	36.3
<i>Escherichia</i> sp.	30.3	13.6
<i>Serratia</i> sp.	9.2	2.3
<i>Citrobacter</i> sp.	3.0	4.5
<i>Proteus</i> sp.	3.0	0.0
BGGNFG		
<i>Pseudomonas</i> sp.	12.1	0.0
<i>Acinetobacter</i> sp.	3.0	2.3
Total	100.0	100.0

bres condiciones higiénicas en la recolección y manipulación de la leche. Los 19 aislamientos *Klebsiella* se identificaron como: *Klebsiella oxytoca*, un 63.2% y como *Klebsiella pneumoniae*, un 36.8%, FIG. 3. Todos los aislamientos del género *Citrobacter*, correspondieron a *Citrobacter freundii*; los de *Serratia* a *Serratia marcescens* y de *Proteus* a *Proteus myxofaciens*.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El evidente crecimiento en las placas, a partir de leches con antibióticos, indica la presencia de resistencia natural y/o adquirida por las cepas aisladas en este estudio.

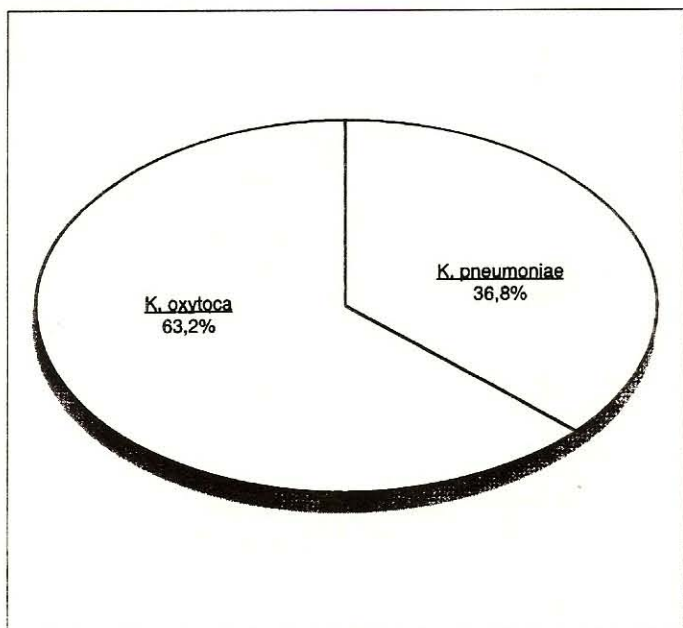


FIGURA 3. DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE LAS ESPECIES IDENTIFICADAS DENTRO DEL GÉNERO *Klebsiella*.

Dichos procesos pueden ser el resultado del uso indiscriminado de antibióticos en el ganado, sin conocer la etiología del agente causal de la infección, que permitirían establecer en dicho caso, la terapia antimicrobiana específica.

La mayoría de las especies aisladas son consideradas como clínicamente significativas en bacteriología humana; dentro de los coliformes *Escherichia coli* y dentro de los BGNNFG *Pseudomonas* spp. Esto debe tomarse en consideración en caso de consumo de productos lácteos elaborados con leche sin higienizar.

Se recomienda el estudio de la presencia de antibióticos en leches producidas en diversas localidades del país; así como una investigación más profunda de la posible patogenicidad de las cepas aisladas a partir de ellas, para tener un conocimiento mayor de la situación existente en Venezuela.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Albright, J.L.; Tickey, S.L. and Woods, G.T. Antibiotics in milk, A review. *J. Dairy Sci.* 44:779-807. 1961.
- [2] Andrade, L.F. Prevalencia de coliformes en mastitis bovina, sensibilidad y resistencia *in vitro*. Trabajo de Ascenso. Universidad del Zulia. Facultad de Ciencias Veterinarias. 1979.
- [3] Bishop, J.R. Detection of antibiotics. *J. Dairy Sci.* 72 (Suppl. 1):144. 1989.
- [4] Booth, J.M. and Harding, F. Testing for antibiotics residues in milk. *Vet. Rec.* 119:565-569. 1986.
- [5] Brady, M.S. and Katz, S.E. Antibiotic/Antimicrobial residues in milk. *J. Food Prot.* 51 (1):8-11. 1988.
- [6] Chang, S.H. *Escherichia coli* isolation from raw milk in Central and Souther Taiwan and their susceptibility to drugs. *Chinese J. Microbial* 8:142-145. 1975.
- [7] Charm, S.E. and Chi, R. Microbial receptor assay for rapid detection and identification of seven families of antimicrobial drugs in milk: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71 (2):304-316. 1988.
- [8] Costa, R.R.; Carvalho, F.D. y Andrade, M.A. Mastitis bovina: Sensibilidad de agentes etiológicos a antibióticos e quimioterápicos. *Anais Esc. Agron. e Vet.* 14/15/16 (1):79-85. 1984/85/86.
- [9] Cruz, M.; Pérez, M. y Velásquez, F. Frecuencia de contaminación en la leche disponible en el Valle de México con Estreptomycina, Tetraciclina y Penicilina. *Salud Pública Mex.* 28 (4):438-42. 1986.
- [10] Hands, A.H. Assay of inhibitory substances. *J. of the Society of Dairy Tech.* 42 (4):92-93. 1989.
- [11] Hankin, L. Lacy, G.; Stephens, G. and Dillman, W. Antibiotic resistant bacteria in raw milk and ability of some to transfer antibiotic resistance to *Escherichia coli*. *J. Food Prot.* 42 (12):950-953. 1979.
- [12] International Dairy Federation. Milk and milk products detection of inhibitors. *Bulletin of the International Dairy Federation* N° 220, 78 pp. 1987.
- [13] Jaksch, P. The Penzime test -A rapid enzymic method for detection of b-lactam antibiotics in raw milk. *Kieler Milchwirtschaftliche. Forschungsberichte.* 109 (29):898, 900-903. 1986.
- [14] Jones, A.M. *Escherichia coli* in retail samples of milk and their resistance to antibiotics. *Lancet* ii:347-350. 1971.
- [15] Jonhston, D.W.; Bruce, J. and Hill, J. Incidence of antibiotics resistance *Escherichia coli* in milk produced in the West of Scotland. *Appl. Bacteriol.* 54:77. 1983.
- [16] Langlois, B.E.; Finzenstat, J.; Bull, L.S. and Hemken, R.W. Antibiotics resistance of enteric bacteria isolated from milk and faeces. *J. Dairy Sci.* 63 (Suppl 1):124. 1980.
- [17] Mackie, D.P.; Logan, E.F.; Pollock, D.A. and Rodgers, S.P. Antibiotic sensitivity of bovine staphylococcal and coliform mastitis isolates over four years. *Vet. Rec.* 123 (20):515-517. 1988.

- [18] Martínez, A. Familia *Enterobacteriaceae*. Universidad del Zulia. Facultad de Medicina. Escuela Bioanálisis. Cátedra Bacteriología. 1990.
- [19] Martinz, J.L.S. Aflatoxina e inhibidores bacterianos no leite tipo "B" comercializado em Sao Paulo: levantamento das gratro marcas maior consumo. Tesis de Grado. Universidad de Sao Paulo. Facultad de Salud Pública. 1984.
- [20] Martinz, J.L.S., y Martinz, I.S. Inhibidores bacteriano no leite tipo "B" comercializado no municipio de Sao Paulo, SP (Brasil). Rev. Saúde Pública. 19(5), 421-430. 1985.
- [21] Moretain, J.P. and Boisseau, J. Antibiotic residues in milk. An inter-laboratory study of methods of detection. Bulletin d'information des Laboratoires des Services Veterinaires. 21:71-78. 1986.
- [22] Nows, J.M.; Laurensen, J. and Aerts, M.M.C. Monitoring milk for chloramphenicol residues by an inmunoassay (quick-card). Veterinary Quarterly. 10 (4):270-272. 1988.
- [23] Official Methods of Analysis AOAC. Sección Leche. Nº 982, 16. 1990.
- [24] Postigo, C.B. y Vautier, H.E. Hallazgo de Penicilina y otras drogas antimicrobianas en leche destinada a consumo. Rev. Asoc. Med. Argent. 98 (1/4):22-24. 1985.
- [25] Renner, E. and Renz-Schaufen, A. Detection of inhibitory sustancias by the spot test. Deutsche Milchwirtschaft. 38 (10):274-277. 1987.
- [26] Robinson, R.K. Microbiología Lactológica. Tomo I. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. 1987.
- [27] Santiago, B. Determinación de aditivos químicos en leche pasteurizada. Tesis de Grado. Universidad del Zulia. Facultad Experimental de Ciencias. 1986.
- [28] Senyk, G.F.; Davidson, J.H.; Brown, J.M. and Sherbon, J.W. Comparison of rapid test used to detect antibiotic residues in milk. J. Dairy Sci. 72 (Suppl. 1):141-142. 1989.
- [29] Senyk, G.F.; Davidson, J.H.; Brown, J.M.; Hallstead, E.R. and Sherbon, J.W. Comparison of rapid test used to detect antibiotic residues in milk. J. Food Prot. 53 (2):158-164. 1990.
- [30] Sulbarán, B. Adulteraciones químicas en leche en polvo. Trabajo de Ascenso. Universidad del Zulia. Facultad Experimental de Ciencias. 1986.
- [31] Tolle, A.V. and Sudi, J. Applications of the Limulus test in the Dairy Industry. Meijeritietee Ilinen Aikakauskinja. 44 (1):1-6. 1986.