

# RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS DE ESPECIES DE *Bacillus* AISLADOS DE LECHE CRUDA

## Antimicrobial Resistance of *Bacillus* Isolated From Raw Milk

José F. Faría Reyes<sup>1</sup>, María Allara Cagnasso<sup>1</sup>, Pedro Izquierdo Córser<sup>1</sup>, Gerardo D'Pool<sup>2</sup>, Aleida García Urdaneta<sup>1</sup> y Kutchynskaya Valero-Leal<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Investigación Ciencia y Tecnología de Alimentos. <sup>2</sup> Cátedra de Enfermedades Infecciosas, Facultad de Ciencias Veterinarias. <sup>3</sup> Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina. La Universidad del Zulia, Apartado 15252. Maracaibo 4005-A, Venezuela. E-mail: allara@mipunto.com poic@telcel.net.ve

### RESUMEN

Fueron recolectadas 200 muestras de leche cruda de cántaras ubicadas en las receptorías de El Laberinto, en Machiques, Distrito Perijá y en la Costa Oriental del Lago de Maracaibo, estado Zulia, Venezuela. Se les aplicó la prueba del cloruro de TrifenilHetrozolio (CTT) y la prueba del disco ensayo de la AOAC para detectar la presencia de antimicrobianos. De las muestras positivas se aislaron bacterias del género *Bacillus* spp., éstos se identificaron hasta el nivel de especie y se les determinó el patrón de resistencia ante 15 antimicrobianos. Un total de 9 *Bacillus* fueron aislados: 4 *B. circulans*, 3 *B. cereus*, 1 *B. firmus* y 1 *B. alvei*. Todos los aislados resultaron resistentes al menos a 2 antimicrobianos. Frente a los betalactámicos: penicilina G, oxacilina y la mezcla amoxicilina/ácido clavulánico, se encontraron aislados resistentes en todas las especies, con excepción de *B. cereus* frente a la amoxicilina/ácido clavulánico, cuyas cepas presentaron un 33% de resistencia. Ante las cefalosporinas de primera y tercera generación, *B. cereus* demostró 33% de resistencia y 100% de sensibilidad, respectivamente. Todos los aislados de *B. firmus* fueron resistentes a la cefalosporina de primera generación, mientras que *B. alvei* se mostró sensible a todas las cefalosporinas probadas. Solo el aislado de *B. firmus* fue sensible a la eritromicina. El grupo de antimicrobianos más efectivo fue el de los aminoglicósidos, observándose un 25% de resistencia solo de *B. circulans* ante la amikacina. Los aislados de *B. cereus* y el de *B. firmus* presentaron resistencia a la triple sulfa. Se concluye que las especies de *Bacillus* aisladas de leche cruda con residuos de antimicrobianos, presentaron variaciones en su patrón de resistencia. Debe resaltarse la relevancia de la transmisión al hombre, a

través de la cadena alimentaria, de bacterias resistentes a diversos antimicrobianos.

**Palabras clave:** *Bacillus*, leche cruda, antimicrobianos, resistencia bacteriana.

### ABSTRACT

Two hundred of raw milk were collected from milk cans in milk receiving plants located at El Laberinto, Machiques, District Perijá and eastern coast of the Maracaibo Lake, Zulia State, Venezuela. Both CTT and test of the trial Disk of AOAC were applied to detect the presence of antimicrobials. Out of positive samples, *Bacillus* spp. were isolated, and identified for the species level; also pattern of resistance was determined for 15 antimicrobials. A total of 9 *Bacillus* was isolated: 4 *B. circulans*, 3 *B. cereus*, 1 *B. firmus* and 1 *B. alvei*. All the isolates were resistant to at least 2 antimicrobials. Resistance against the beta-lactamics: penicillin G, oxacillin and the mixture amoxicillin/clavulanic acid, was found in all the species, with exception of the strains of *B. cereus* which showed 33% resistance against amoxicillin/clavulanic acid. Against cephalosporins of first and third generation, *B. cereus* showed 33% resistance and 100% sensitivity, respectively, *B. circulans* was 50% and 25% resistant to cephalosporines of first and second generation, respectively. All the *B. firmus* isolates were resistant to the first generation cephalosporins, where as *B. alvei* indicated sensitivity to all the cephalosporins tested. Only the *B. firmus* isolate was sensitive to erythromycin. The most effective group of antimicrobials was the aminoglycosides with some strains of *B. circulans* showing resistance to amikacin. *B. cereus* and *B. firmus* isolates indicated resistance to triple sulfa. The species of *Bacillus* isolated from raw milk with antimicrobials residues showed variation in their pattern of resistance. It is relevant to point out the importance of transmission to hu-

mans, through the food chain, of bacteria resistant to certain number of antimicrobials.

**Key words:** *Bacillus*, raw milk, antimicrobials, bacterial resistance.

## INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana a los agentes antimicrobianos se ha extendido en todo el mundo debido a su uso incontrolado [23], pudiendo producirse por selección de mutaciones espontáneas, herencia extracromosomal o por transmisión de plásmidos de resistencia de una bacteria a otra, siendo favorecida por la presión selectiva de los antibióticos utilizados en terapia, profilaxia o promoción del crecimiento animal [13].

La cadena alimentaria ha sido reconocida como una vía para la transmisión al hombre de bacterias resistentes a los antimicrobianos, enfocándose recientemente la atención hacia la importancia que tiene, desde el punto de vista de salud pública, la presencia de estas bacterias en la leche cruda [8, 13, 22]. Algunos autores han intentado establecer una relación entre los patrones de resistencia de microorganismos aislados de vacas con mastitis y la presencia de antimicrobianos, reportándose un incremento en la resistencia de cepas obtenidas de vacas con mastitis [1, 5, 17].

La mayoría de las especies del género *Bacillus* son saprófitos distribuidos en la naturaleza, particularmente en suelo, agua y en materiales de origen animal o vegetal; también se encuentran en una amplia variedad de alimentos, incluyendo vegetales, carnes y cereales [25]. Asimismo, constituyen un importante porcentaje de la flora microbiana de la leche cruda, y pueden producir deterioro de ésta y sus productos, debido a su actividad proteolítica, lipolítica y sacarolítica [14, 24]; especies como *B. licheniformis*, *B. cereus* y *B. cereus var. mycoides*, han sido asociadas con alteraciones del sabor y la fermentación en leche fluida y agriado de crema [6, 21].

Las esporas de *B. cereus* sobreviven a la pasteurización de la leche, causando intoxicaciones alimentarias que pueden ser producidas por una o varias enterotoxinas [4, 11]. El Centro de Control de Enfermedades de Atlanta reportó 24 brotes de gastroenteritis causadas por *B. cereus*, durante los años 1982 y 1987 [15]. Cepas de *Bacillus cereus* pueden producir mastitis aguda, como indican estudios realizados en Venezuela señalando a especies de este género como agentes causales esporádicos de la mastitis bovina [7].

Aunque existe variación en los patrones de resistencia frente a los antimicrobianos entre las diferentes especies del género *Bacillus*, se consideran generalmente resistentes a las penicilinas y cefalosporinas, incluyendo las cefalosporinas de tercera generación. Por otro lado, la mayoría de las especies son susceptibles a los aminoglicósidos, a la clindamicina, la vancomicina, el cloranfenicol, y la eritromicina [25]. En Venezuela no se han realizado estudios sobre el patrón de resisten-

cia de microorganismos en leches crudas contaminadas con antibióticos. El objetivo de la presente investigación fue determinar el patrón de resistencia de especies de *Bacillus spp* aislados de leche cruda, positiva a la presencia de antibióticos, frente a un grupo de antimicrobianos: betalactámicos, aminoglicósidos, fluoroquinolonas, macrólidos, lincosamidas y quimioterápicos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestreo y detección de antimicrobianos

Se recolectaron 200 muestras de leche cruda a nivel de cántaras en receptorías ubicadas en El Laberinto, Machiques Distrito Perijá y en la Costa Oriental del Lago de Maracaibo (COL), estado Zulia. Se tomaron 25 mL en forma aséptica, en envases de vidrio estériles, con doble tapa y trasladaron bajo refrigeración (4°C) hasta el Laboratorio de Ciencia y Tecnología de la Leche de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia, procesándose en un tiempo no mayor de dos horas.

Para verificar en las muestras de leche la presencia de residuos de antimicrobianos se utilizó el método del cloruro de trifeniltetrazolio (Nutritional Biochemical Corporation, Cleveland, Ohio) [2] la prueba del Disco Ensayo (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) de la Asociación Oficial de Analistas Químicos [2] utilizando *Bacillus stearothermophilus var. calidolactis*.

### Aislamiento e identificación de cepas bacterianas

Las muestras de leche cruda positivas a la prueba de detección de antibióticos, fueron sembradas en caldo tripticosa soya (CTS) y posteriormente en agar sangre (ASH), incubándose en ambos casos a 37°C por 24 horas. De las muestras donde se obtuvo crecimiento fueron aisladas colonias con morfología compatible al género *Bacillus* (tamaño variable, márgenes irregulares, elevadas, ondulados). A dichas colonias se les realizó un frotis coloreado por la tinción de Gram, para confirmar la presencia de bacilos Gram positivos característicos del género. Posteriormente para la identificación de las especies, se realizaron pruebas complementarias, tales como catalasa, OF glucosa, motilidad, hemólisis en ASH, indol, citrato, Voges-Proskauer e hidrólisis de la urea [18].

### Antibiogramas

Las especies de *Bacillus* identificadas, se sembraron en CTS e incubaron a 37°C durante 24 horas; el cultivo obtenido fue diluido con solución salina fisiológica estéril, hasta obtener una densidad equivalente al estándar N° 0,5 de la escala del nefelómetro de Mc Farland. Luego, se aplicó el método de difusión a partir del disco de Bauer y col. [3], utilizando discos comerciales (BBL, DIFCO, OXOID) con las concentraciones señaladas en la TABLA I. Las placas fueron incubadas a 37°C por 24 horas y el criterio de sensibilidad o resistencia fue determinado según las especificaciones de cada fabricante.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 45 muestras positivas a la presencia de antibióticos, en 35 de estas se obtuvo desarrollo de bacterias Gram positivas. Se aislaron 9 cepas del género *Bacillus*, las especies identificadas fueron: 4 de *B. circulans*, 3 de *B. cereus*, 1 de *B. firmus* y 1 de *B. alvei*. Existen grandes variaciones en las especies de *Bacillus* que pueden ser aisladas de leche cruda; algunas de carácter regional y estacional y otras están asociadas a las condiciones higiénico-sanitarias en los procesos de obtención y manejo de la leche [20, 24]. También es posible que la presencia de residuos de antimicrobianos en la leche esté incidiendo en las especies de *Bacillus* que pueden ser encontradas en ellas. Matta y Punj [19] obtuvieron de 100 muestras de leche cruda, 59 aislados lipolíticos de *Bacillus*: 19 de *B. cereus*, 12 de *B. polymixa*, 10 de *B. licheniformis*, 7 de *B. circulans*, 5 de *B. subtilis*, 4 de *B. laterosporus* y 2 de *B. coagulans*.

Analizando los patrones de resistencia (presentados en la FIG. 1), de las especies de *Bacillus* aisladas de leche cruda con antimicrobianos, se observó que todas las cepas aisladas mostraron resistencia múltiple, al ser resistentes a más de un antimicrobiano. El aislado de las especies *B. firmus* y *B. alvei* presentó resistencia total frente a 6 y 5 de los 15 antimicrobianos en estudio, respectivamente. Por otro lado, *B. cereus* mostró 100% de resistencia frente a 3 antimicrobianos, mientras que *B. circulans* fue 100% resistente a 4 antimicrobianos, 50% resistente a un compuesto y 25% resistente a otros 4 antimicrobianos.

En todas las especies fue observada resistencia a los antibióticos betalactámicos penicilina G, oxacilina y amoxicilina/ácido clavulánico, ante éste último la resistencia fue de 33% y 25% para las especies *B. cereus* y *B. circulans*, respectivamente. En relación con las cefalosporinas *B. circulans* presentó una resistencia del 50% y 25% frente a las de primera y segunda generación, respectivamente, *B. cereus* del 33% a los de primera y tercera generación; por su parte *B. firmus* resultó resistente solo frente a las de primera generación, mientras que *B. alvei* fue sensible a todas las cefalosporinas consideradas. Aunque suele encontrarse variación en los patrones de resistencia de las diferentes especies del género *Bacillus*, las mismas se consideran generalmente resistentes a las penicilinas y cefalosporinas, incluyendo las cefalosporinas de tercera generación, debido a la producción de un amplio espectro de lactamasas, que hidrolizan el anillo  $\beta$  lactámico presente en todas las penicilinas y cefalosporinas [15, 16]. Estas enzimas inactivadoras están codificadas por genes extracromosomales localizados en factores "R" o en plásmidos [10].

El aislado de *B. firmus* fue sensible a la eritromicina, *B. cereus* presentó resistencia del 67%, mientras que las cepas de *B. alvei* y *B. circulans* fueron resistentes a este antimicrobiano. Algunos estudios han reportado que el género *Bacillus* suele ser sensible a la eritromicina [9]. Estudios genéticos en *E. coli* y *B. subtilis* han demostrado que el cambio mutacional

TABLA I  
CONCENTRACIÓN DE LOS ANTIMICROBIANOS USADOS  
EN LA PRUEBA DE DIFUSION A PARTIR DEL DISCO DE  
BAUER Y COL. (1966)

Antimicrobiano	Contenido del Disco
<b>Betalactámicos</b>	
Penicilinas naturales Penicilina G (P)	10 Unidades
Penicilinas resistentes a la penicilinasasa Oxacilina (OX)	1 $\mu$ g
Carbapenemos Imipenem (Imp)	10 $\mu$ g
Betalactámicos e inhibidores de $\beta$ lactamasa Amoxicilina/Ac. Clavulánico (Am/Ac)	20/10 $\mu$ g
Cefalosporina 1ª generación Cefazolín (Cz)	30 $\mu$ g
Cefalosporina 2ª generación Cefoxitín (Cf)	30 $\mu$ g
Cefalosporina 3ª generación Cefoperazona (Cfp)	75 $\mu$ g
<b>Aminoglicósidos</b>	
Amikacina (An)	30 $\mu$ g
Netromicina (N)	30 $\mu$ g
Tobramicina (T)	10 $\mu$ g
<b>Fluoroquinolonas</b>	
Ciprofloxacina (Cip)	5 $\mu$ g
<b>Macrólidos</b>	
Eritromicina (E)	15 $\mu$ g
<b>Lincosamidas</b>	
Lincomicina (L)	1 $\mu$ g
<b>Quimioterápicos</b>	
Triple Sulfa (SSS)	1 $\mu$ g
Fosfomicina (Ff)	50 $\mu$ g

en un péptido de la subunidad ribosomal 50S, es responsable de la resistencia a la eritromicina [10].

Para la lincomicina se encontró un 100% de resistencia en las especies estudiadas, con excepción de *B. cereus*, que presentó una resistencia del 67%.

Las especies mostraron una elevada sensibilidad a los aminoglicósidos amikacina y netromicina, con excepción de *B. circulans* que mostró resistencia a la amikacina en el 25% de los aislados, a pesar de que se ha reportado elevada sensibilidad de este género bacteriano a los aminoglicósidos [25]. Por otra parte, las especies aisladas fueron sensibles a la fluoroquinolona ciprofloxacina, con excepción de *B. circulans* ya que el 25% de los aislados fueron resistentes. Estos resultados

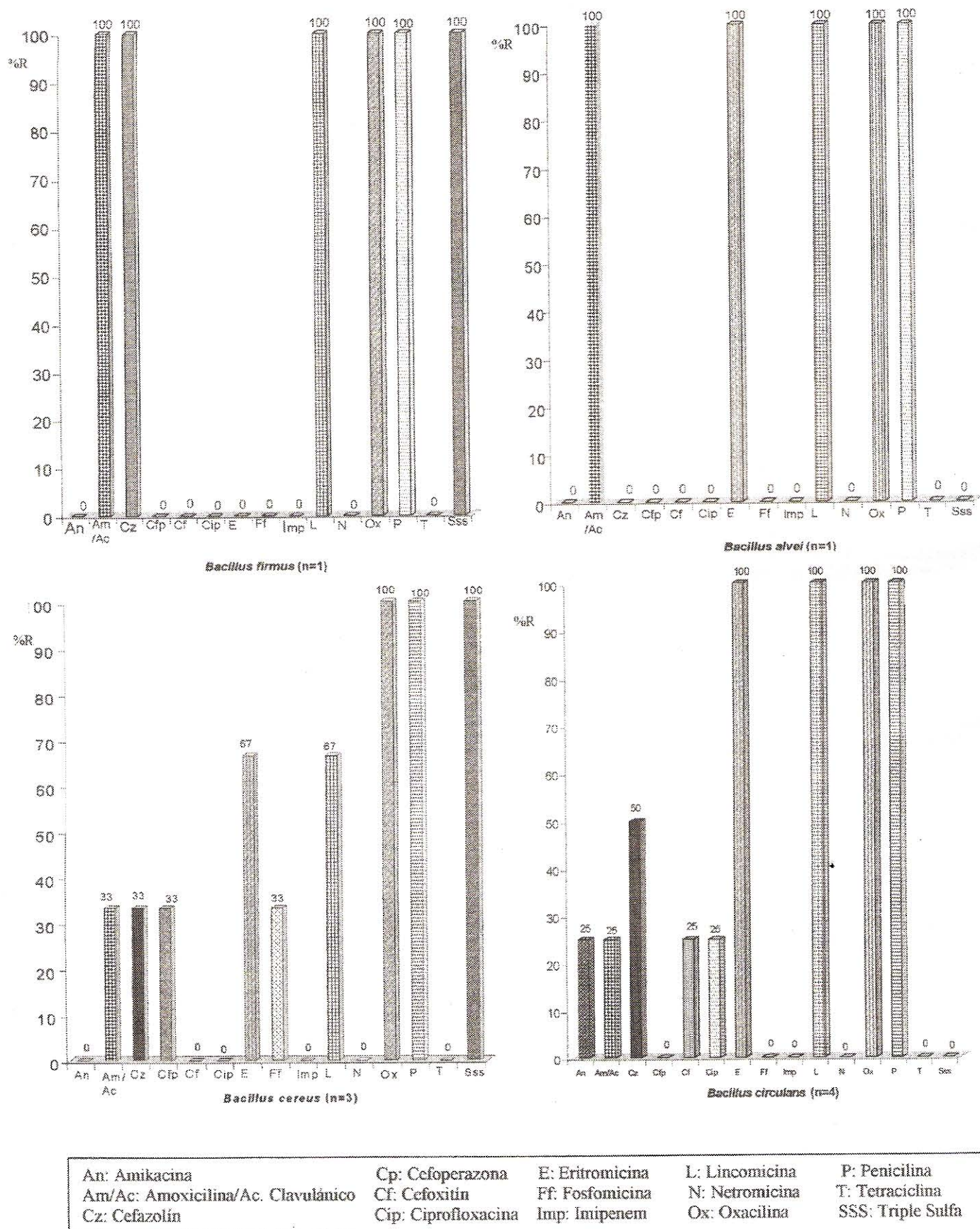


FIGURA 1. ANTILOGRAMAS DE LAS ESPECIES DE *BACILLUS* AISLADAS DE LECHE CRUDA CON ANTIBIÓTICOS.

coinciden con los patrones de sensibilidad reportados por otros autores [16].

Con relación a los quimioterápicos, se encontró que todas las especies fueron sensibles a fosfomicina, con excepción de *B. cereus* donde hubo resistencia en el 33% de las cepas. Por otra parte, *B. cereus* y *B. firmus* presentaron un 100% de resistencia a la triple sulfa, a diferencia de *B. circulans* y *B. alvei*, quienes fueron sensibles a ésta.

## CONCLUSIONES

La leche, un alimento esencial en el crecimiento infantil, presenta bacterias Gram positivas multiresistentes a diversos antimicrobianos. \*

Las especies del género *Bacillus*: *B. circulans*, *B. cereus*, *B. firmus* y *B. alvei* aisladas de la leche cruda producida en el estado Zulia, que contiene residuos de antimicrobianos, presentaron un patrón de resistencia común frente a los betalactámicos penicilina G, oxacilina y amoxicilina/ ácido clavulánico, mientras que la resistencia a las cefalosporinas, macrólidos y lincosamidas, diverge del patrón común que se reporta. Los aminoglicósidos fue el grupo de antimicrobianos más efectivo contra las especies de *Bacillus* aislados.

La presencia en la leche cruda de aislados del género *Bacillus* resistentes a diversos antimicrobianos, representa un problema para la salud pública, por la posible transmisión al hombre de cepas bacterianas resistentes.

## AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES-LUZ), por su apoyo económico.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ANDERSEN, N. Acute clinical mastitis in agriculture practice. **Dansk Veterinaer**. 79 (11): 569-574. 1987.
- [2] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis**. 9<sup>TH</sup> Edition. Washington, D.C. 138 pp. 1990.
- [3] BAUER, A.; KIRBY, W.; SHERRIS, J.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.** 45: 493-496. 1966.
- [4] CHRISTIANSSON, A.; BERTILSSON, J.; SVENSSON, B. *Bacillus cereus* spores in raw milk. Factors affecting the contamination of milk during the grazing period. **J. Dairy Sci.** 82 (2): 305-314. 1999.
- [5] COSTA, R.; CARVALHO, F.; ANDRADE, M. Mastite Bovina: sensibilidad de agentes etiológicos a antibióticos e quimioterápicos. **Anais Esc. Agron. e Vet.** 14-15-16(1): 79-85. 1986.
- [6] DAVIES, F. Heat Resistance of *Bacillus* species. **J. Soc. Dairy Technol.** 28(2): 69-78. 1975.
- [7] D'POOL, G. Enfermedades infecciosas prevalentes en el ganado mestizo de doble propósito. Parte I. Capítulo XIII. En **Ganadería Mestiza de Doble Propósito**. 1era Edición. C. González-Stagnaro, Editor. Editorial Astro Data, Maracaibo, Venezuela. p. 261-277. 1992.
- [8] FARÍA, J.; RIVERO, Z.; GALLEGO, B.; ALLARA, M. Resistencia a los antimicrobianos y concentración inhibitoria mínima (CIM) de BGNNFG aislados de leche cruda (II). **Revista Científica FCV-LUZ**. IX (1): 11-16. 1999.
- [9] GIGANTELLI, J.; TORRES, J.; OSATO, M. In vitro susceptibilities of ocular *Bacillus cereus* isolates to clindamycin, gentamycin, and vancomycin alone or in combination. **Antimicrob. Agents. Chemother.** 35 (1): 201-202. 1991.
- [10] GOMEZ, E. resistencia bacteriana a los antibióticos. La Universidad del Zulia. Facultad de Ciencias Veterinarias. Maracaibo. Venezuela. (Trabajo de Ascenso). 145 pp. 1977.
- [11] GRIFFITHS, M. Toxin production by psychrotrophic *Bacillus* spp. present in milk. **J. Food Prot.** 53 (9): 790-792. 1990.
- [12] HANDS, A. Assay of Inhibitory Substances. **J. Soc. Dairy Technol.** 42 (4): 92-93. 1989.
- [13] HANKIN, L.; LACY, G.; STEPHENS, G.; 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.
- [14] KALOGRIDOU, D. Biochemical activities of *Bacillus* species isolated from flat sour evaporated milk. **J. Dairy Sci.** 75 (10): 2681-2686. 1992.
- [15] KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C. **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. Chapter 13. The aerobic Gram positive Bacilli. Fifth Edition. Lippincott Philadelphia. USA: 651-708. 1997.
- [16] LOGAN, N.; TURNBULL, P. *Bacillus* and recently derived genera. In: **Manual of Clinical Microbiology**. Murray, P.; Jo Baron, E.; Pfaller, M.; Tenover, F.; Tenover, R. Chapter 23. Seventh Edition. ASM PRESS. U.S.A. p. 357-369. 1999.
- [17] MACKIE, D.; LOGAN, E.; POLLOCK, D.; RODGERS, S. Antibiotic sensitivity of bovine staphylococcal and coliform mastitis isolated over four years. **Vet. Rec.** 123(20): 515-517. 1988.
- [18] MAC FADDIN, J. **Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias de Importancia Clínica**. Editorial Panamericana. Cuarta Edición. Caracas. p. 208-225. 1980.

- [19] MATTA, H.; PUNJ, V. Isolation and identification of lipolytic, psychrotrophic, spore forming bacteria from raw milk. **Int. J. Dairy Technol.** 52 (2): 59-62. 1999.
- [20] MEER, R.; BAKER, J.; BODYFELT, F.; GRIFFITHS, M. Psychrotrophic *Bacillus spp.* in fluid milk products: a review. **J. Food Prot.** 54 (12) p 969-979. 1991.
- [21] RANGASAMY, I.; ROGINSKI, H. Isolation and characterization of *Bacillus cereus* in milk and dairy products manufactured in Victoria. **Aust. J. Dairy Tech.** 48: 93-95. 1993.
- [22] RIVERO, Z.; FARÍA, J.; SANTORO, R. Aislamiento de Gram Negativos de leche cruda con antibióticos. **Revista Científica FCV-LUZ.** IV (1): 11-16. 1994.
- [23] RODRÍGUEZ, V. Uso y abuso de antibióticos. **Acta Cient. Ven.** 31: 485-486. 1980.
- [24] TATZEL, R.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.; WALLNÖFER, P. Identification of *Bacillus* strains isolated from milk and cream with classical and nucleic acid hybridization methods. **J. Dairy Res.** 61: 529-535. 1994.
- [25] TURNBULL, P.; KRAMER, J. *Bacillus*. In: **Manual of Clinical Microbiology.** Murray, P.; Jo Baron, E.; Pfaller, M.; Tenover, F.; Tenover, R. Chapter 28. Sixth Edition. ASM PRESS. U.S.A. p. 349-355. 1999.