

Aislamiento de bacterias gram positivas de leche cruda con residuos de antimicrobianos

José Faría Reyes, Aleida García Urdaneta, Pedro Izquierdo Corser, María Allara Cagnasso, Kutchynskaya Valero Leal

Universidad del Zulia. Facultad de Ciencias Veterinarias. Estado Zulia-Venezuela

RESUMEN. Se recolectaron 200 muestras de leche cruda a nivel de cántaras en receptorías ubicadas en tres zonas de alta producción lechera del estado Zulia-Venezuela. Se aplicaron las pruebas del cloruro de trifetil tetrazolio (CTT) y el disco ensayo para detectar presencia de antimicrobianos. Las muestras positivas se sembraron en caldo soya tripticasa, agar sangre humana y agar manitol salado para realizar el aislamiento de bacterias Gram positivas. La identificación de especies se realizó a través de pruebas bioquímicas. Se encontró que 45 muestras (22,5%) de leche analizadas contenían antimicrobianos, obteniéndose crecimiento bacteriano en 35 de ellas. Se aislaron 100 cepas, que se distribuyeron en los siguientes géneros: 44 *Staphylococcus*, 19 *Streptococcus*, 17 *Enterococcus*, 9 *Bacillus*, 4 *Micrococcus*, 4 *Corynebacterium* y 3 *Lactococcus*. La especie más frecuentemente aislada fue el *S. aureus*, principal agente productor de mastitis bovina en el estado Zulia, y microorganismo frecuentemente asociado en el país con intoxicaciones alimentarias vehiculizadas por queso elaborado con leche cruda. Se recomienda aplicar programas de control para el uso de antibióticos.

Palabras clave: Leche cruda, antimicrobianos, bacterias Gram positivas.

SUMMARY. Isolation of Gram-positive bacteria from raw milk with antimicrobial residues. Two hundred samples of raw milk were collected at the receiving plants located in three areas of high milk production in Zulia state, Venezuela. The CTT test and trial disk were used in order to detect the presence of antimicrobials. The positive samples were inoculated in tripticase soy broth, human blood agar and manitol salt agar in order to isolate Gram-positive bacteria. The identification of species was performed through biochemical tests

It was found that 45 samples (22,5%) of analyzed milk contained antimicrobials, and bacterial growth was obtained in 35 of them. 100 strains were isolated namely: 44 *Staphylococcus*, 19 *Streptococcus*, 17 *Enterococcus*, 9 *Bacillus*, 4 *Micrococcus*, 4 *Corynebacterium* and 3 *Lactococcus*. The most frequently isolated specie was *S. aureus*, the main producing agent of bovine mastitis in Zulia state, a microorganism frequently associated in the country to food-borne intoxications, associated to cheese processed from raw milk. It is recommended to apply control programs for the use of antibiotics.

Key words: Raw milk, antimicrobial, Gram-positive bacteria.

INTRODUCCION

La presencia en leche de residuos de productos farmacológicos utilizados como medio terapéutico o profiláctico, reviste gran importancia por los efectos que éstos producen en la salud del consumidor, la inhibición de cultivos utilizados en la manufactura de productos lácteos fermentados, y la selectividad de poblaciones microbianas resistentes (1-4).

En muchos países esta situación ha sido reglamentada, la Comunidad Económica Europea considera ilegal la presencia de residuos de antimicrobianos en leche destinada al consumo humano, y penaliza con multas a los productores que incurrir en ello (5). Por su parte, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación/ Organización Mundial de la Salud y la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos de América, establecen concentraciones de residuos aceptables, consideradas como niveles seguros para el consumo humano (6,7). Estas

reglamentaciones, así como la puesta en práctica de programas de vigilancia, han tenido resultados beneficiosos (8).

En Venezuela, no se dispone de una reglamentación específica para los límites permisibles de antimicrobianos en leche, tampoco se aplican programas de control, y peor aun, en muchos casos no se realiza la práctica común de retiro de la leche proveniente de animales que se encuentran bajo tratamiento, siendo por tanto probable que una parte importante de la leche cruda producida en el país se encuentre contaminada con residuos de antimicrobianos, los cuales podrían estar ejerciendo una presión selectiva hacia la presencia en ésta de bacterias patógenas antibiótico-resistentes.

La pasteurización es el proceso más frecuentemente utilizado para la destrucción de la flora patógena de la leche; sin embargo en algunos casos no es aplicado. En el país, un 55% de la leche que se produce se destina a la elaboración de quesos, y cerca de un 40% de ésta es usada cruda en la

producción de queso artesanal (9). Por otra parte, se ha demostrado que la pasteurización no afecta la concentración de un antimicrobiano en leche, y sólo en algunos casos modifica su actividad (10,11).

Dentro del grupo de bacterias Gram positivas que suelen aislarse de leche cruda se encuentran los principales agentes etiológicos causantes de la mastitis bovina, así como especies implicadas en numerosos brotes de enfermedades alimentarias (12,13).

El objetivo de esta investigación fue realizar el aislamiento e identificación de bacterias Gram positivas presentes en leche cruda, producida en el estado Zulia-Venezuela, en aquellas muestras que resultaron positivas a la prueba de detección de residuos de antimicrobianos.

MATERIALES Y METODOS

Muestras de leche: Las muestras consistieron en 25 ml de leche cruda recolectada en forma aséptica en frascos de vidrio esterilizados, a nivel de cántaras, en receptorías ubicadas en tres zonas de alta producción lechera del estado Zulia, entidad donde se genera el 40% del total nacional. De El Laberinto, municipio Jesús Enrique Lossada, provinieron 88 muestras, 62 de Machiques de Perijá y 50 de la Costa Oriental del Lago de Maracaibo (COL), para un total de 200 muestras. La leche fue transportada bajo refrigeración, en un tiempo no mayor a 3 horas, hasta el Laboratorio de Ciencia y Tecnología de la Leche de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia, donde fueron analizadas.

Detección de antimicrobianos: Se utilizaron dos métodos para la detección de antimicrobianos en las muestras de leche analizadas, el método de óxido-reducción con cloruro de trifeníl tetrazolio (CTT) (Nutritional Biochemical Corporation, Cleveland, Ohio) y *Streptococcus thermophilus* (14), y el método del disco ensayo propuesto por la AOAC (15), utilizando el *Bacillus stearothermophilus* variedad *calidolactis* (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA). Se consideraron muestras de leche con presencia de antimicrobianos aquellas que dieron resultado positivo a las dos pruebas aplicadas.

Análisis microbiológicos: Para el aislamiento de las bacterias una alícuota de las muestras de leche fue sembrada en caldo soya tripticasa, agar sangre humana y agar manitol salado. Para identificar los *Micrococcus* y *Staphylococcus* se caracterizaron las colonias aisladas del agar sangre humana compatibles con los miembros de la familia Micrococaceae, y a las colonias de *Staphylococcus* recuperadas del agar manitol salado, de acuerdo a su morfología, producción de hemólisis y tinción de Gram.

Las colonias aisladas se sembraron en agar nutritivo

(cepario) y posteriormente la diferenciación se realizó mediante pruebas bioquímicas de glucosa, coagulasa, manitol y Dnasa. La identificación hasta especie se realizó utilizando pruebas de azúcares, descarboxilación de ornitina, urea y Voges-Proskauer. Para identificar cocos Gram positivos, catalasa negativa se realizaron las siguientes pruebas: susceptibilidad a bacitracina, disco de optoquina, test de camp, producción de hemólisis en agar sangre de carnero, prueba de crecimiento en bilis e hidrólisis de la esculina y crecimiento en caldo salado (6,5% de NaCl). También se aplicaron pruebas de utilización de azúcar, descarboxilación de arginina y piruvato, urea, Voges-Proskauer, motilidad y agar sangre telurito.

Para identificar *Bacillus* se aplicaron pruebas complementarias como catalasa, glucosa, reducción de azúcares, motilidad, hemólisis, indol, citrato, Voges-Proskauer y urea.

En el caso de *Corynebacterium* además de las pruebas de fermentación de azúcares y producción de ureasa se aplicó reducción de nitratos.

Todos los análisis microbiológicos se realizaron utilizando principalmente medios de la casa BBL (BBL Microbiological System, Cockeysville, MD), así como las metodologías propuestas por la ICMSF (16).

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla 1 se presentan los resultados de las pruebas del cloruro de trifeníl tetrazolio (CTT) y el disco ensayo (DE), utilizadas en la detección de residuos de antimicrobianos en las muestras de leche provenientes de El Laberinto, Machiques y la Costa Oriental del Lago (COL) de Maracaibo. En ésta se observa que en las muestras de leche de El Laberinto se encontró el mismo número de resultados positivos al utilizar el CTT y el DE; mientras que, en las muestras de leche provenientes de Machiques y la COL el número de resultados positivos fue mayor con el CTT.

TABLA 1

Resultados de las pruebas de detección de residuos de antimicrobianos aplicadas a las muestras de leche cruda producida en el estado Zulia-Venezuela

Origen	N	Muestras positivas a CTT(1)	Muestras positivas a DE(2)	Porcentaje muestras Positivas
El Laberinto	88	14	14	16
Machiques	62	15	10	16
La COL(3)	50	23	21	42
Total	200	52	45	23

1 CTT= Prueba del Cloruro de Trifenil Tetrazolio. 2 DE = Disco Ensayo de la AOAC. 3 COL= Costa Oriental del Lago de Maracaibo. Edo. Zulia-Venezuela

Diversas investigaciones (1,17,18), han demostrado que las pruebas microbiológicas comúnmente utilizadas para la detección de residuos de antimicrobianos presentan diferencias en los límites de detección; y que además, los microorganismos utilizados como indicadores, generalmente difieren en los niveles de concentración inhibitoria mínima. Es probable que el mayor número de muestras positivas encontradas con el CTT se haya debido a su mayor sensibilidad para detectar la presencia de diferentes inhibidores microbianos. Es importante resaltar que las diversas pruebas disponibles para la detección de residuos de antibióticos, casi siempre tienen una sensibilidad por debajo de los límites permisibles establecidos en las normativas de diversos países.

De las tres regiones consideradas se encontró la mayor incidencia de residuos de antimicrobianos en la leche de la COL (42%). Este resultado coincide con un estudio previo realizado por Rivero y col.(19), donde al analizar muestras de leche cruda proveniente de Maracaibo y la COL se encontró para esta última un resultado positivo en 68,6% de las muestras.

La prevalencia global encontrada (23%), puede considerarse bastante elevada al compararse con valores reportados para otros países latinoamericanos como Barbados (8%), Jamaica (10%) y Costa Rica (0%)(2). Resultado que hace evidente la existencia de un serio problema de salud pública, por ser la leche un alimento de alto valor nutritivo y de amplio consumo por parte de una población particularmente vulnerable como los niños.

Diversos factores han sido asociados con este problema; sin embargo, se ha reconocido que el cumplimiento del tiempo mínimo de retiro de la leche proveniente de animales que se encuentran bajo tratamiento, suele proveer de un alto grado de seguridad al consumidor, a pesar de lo cual en muchas regiones del país esto no es puesto en práctica, lo que probablemente se deba, en algunos casos, al desconocimiento de las consecuencias, y en otros, a las pérdidas económicas que esto implicaría para los productores.

De las 45 muestras con residuos de antimicrobianos, se obtuvo crecimiento de bacterias Gram positivas en 35 de ellas (Tabla 2), esto podría deberse, a que el nivel del inhibidor presente no era lo suficientemente elevado para impedir el crecimiento, o al desarrollo de resistencia frente al inhibidor por parte de esta flora microbiana. Es evidente, que además de los problemas comúnmente asociados con la presencia de residuos de antimicrobianos en leche, estos también pueden afectar la utilidad de los resultados de los análisis microbiológicos como indicadores de la calidad higiénico sanitaria de la leche, debido a la alteración de los mismos.

TABLA 2

Muestras de leche con residuos de antimicrobianos que presentaron crecimiento de bacterias gram positivas

Origen	Muestras con antimicrobianos(1)	Muestras con crecimiento
El Laberinto	14	13
Machiques	10	10
La COL	21	12
Total	45	35

1 Muestras positivas al CTT y Disco Ensayo.

En la Tabla 3 se muestran los resultados del aislamiento e identificación de géneros y especies Gram positivas presentes en las muestras de leche con residuos de antimicrobianos. Se observó un claro predominio de los *Staphylococcus* frente a los demás géneros, al pertenecer a éste 44 de las 100 cepas aisladas, seguido por los *Streptococcus* y *Enterococcus*, con 19 y 17 cepas, respectivamente, y en un menor número *Bacillus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium* y *Lactococcus*. Escasa información se reporta en la literatura sobre los géneros y especies predominantes en la flora microbiana de la leche cruda producida en el estado Zulia, con o sin residuos de antimicrobianos.

La especie encontrada en mayor número fue el *S. aureus*, principal agente etiológico en la producción de mastitis bovina en el estado Zulia (12,20), y agente causal de numerosas intoxicaciones alimentarias en el país vehiculizadas por quesos elaborados con leche cruda (13, 21). Aun cuando son numerosos los factores relacionados con la efectividad de los antibióticos en el tratamiento de la mastitis causada por estafilococos, se ha reconocido que ésta puede ser menor a causa de la tolerancia y adaptabilidad que han demostrado frente a varias drogas antibacterianas, lo cual, de acuerdo a algunos autores, pudiera estar siendo favorecido por la presencia en leche de residuos de antibióticos y antimicrobianos.

Brady y col. (22), demostraron que hasta los niveles de concentración considerados por la FDA como seguros, tienen un fuerte potencial para la selectividad de poblaciones resistentes, señalando en otro estudio (23), que la exposición de *S. aureus* ATCC 9144 por 14 días a niveles residuales de una mezcla de oxitetraciclina, tylosina, penicilina y virginiamicina, provocó un incremento en la concentración inhibitoria mínima. Es importante resaltar que en el estado Zulia la oxitetraciclina es un antibiótico de primera elección en el tratamiento de la mastitis bovina.

Por otra parte, dicha selectividad e incremento de resistencia, pudiera provocar un aumento de casos de intoxicaciones alimentarias causadas por estafilococos, por

cuanto las cepas antibiótico resistentes de *S. aureus* son capaces de producir toxinas con mayor frecuencia que las cepas sensibles (24).

TABLA 3

Géneros y especies Gram positivos aislados de las muestras de leche cruda con residuos de antimicrobianos

Genero	Nº	Especies identificadas	Total de cepas para el género
<i>Staphylococcus</i>	15	<i>S. aureus</i>	44
	12	<i>S. haemolyticus</i>	
	6	<i>S. Intermedius</i>	
	4	<i>S. schleiferi</i>	
	3	<i>S. hyicus</i>	
	2	<i>S. lugdunensis</i>	
	2	<i>S. epidermidis</i>	
<i>Streptococcus</i>	10	<i>S. bovis</i>	19
	6	<i>S. Mitis</i>	
	2	<i>S. mutans</i>	
	1	<i>S. equinus</i>	
<i>Enterococcus</i>	7	<i>E. avium</i>	17
	4	<i>E. faecium</i>	
	2	<i>E. faecalis</i>	
	2	<i>E. durans</i>	
	1	<i>E. raffinosus</i>	
1	<i>E. solitarius</i>		
<i>Bacillus</i>	4	<i>B. circulans</i>	9
	3	<i>B. cereus</i>	
	1	<i>B. Firmus</i>	
	1	<i>B. alvei</i>	
<i>Micrococcus</i>	3	<i>M. varians</i>	4
	1	<i>M. luteus</i>	
<i>Corynebacterium</i>	4	<i>C. pseudotuberculosis</i>	4
<i>Lactococcus</i>	2	<i>L. lactis</i>	3
	1	<i>L. cremoris</i>	
Total general			100

También se encontraron en la leche cepas de *S. haemolyticus*, *S. hyicus* y *S. epidermidis*, que han sido reconocidos como patógenos oportunistas capaces de adquirir genes de resistencia a los antibióticos (25).

De acuerdo con algunas investigaciones los *Streptococcus* ocupan el segundo lugar de prevalencia como agentes etiológicos de la mastitis bovina en la cuenca del lago de Maracaibo (20), siendo implicados principalmente las

especies *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* y *S. uberis*, las cuales no fueron aisladas de las muestras de leche analizadas en este estudio. El *S. bovis*, especie encontrada en mayor número dentro del género, se ha aislado del tracto digestivo de vacas y otros rumiantes y también se ha encontrado en gran proporción en heces humanas, lo que podría corresponderse con la baja calidad higiénico sanitaria que ha sido reportada para la leche producida en el estado Zulia (26).

Los *Enterococcus* por provenir del tracto intestinal del hombre y los animales suelen usarse como indicadores de contaminación fecal de los alimentos (27). También se les reconoce como la especie responsable del 10 al 15% de la endocarditis bacteriana, con una mortalidad de aproximadamente el 20%(28).

La antibioterapia de infecciones enterocócicas severas usualmente depende del efecto sinérgico de la combinación de antimicrobianos, y esto además de encontrarse en cepas de origen hospitalario, ha sido reportado en cepas aisladas de agua y animales como el cerdo, en forma especial para *E. faecalis* (29), la que además ha sido reconocida como una especie propagadora de resistencia a través de la cadena alimentaria. Perreten y col.(30), encontraron que cepas de *E. faecalis*, con resistencia múltiple a los antibióticos, aislada de queso elaborado con leche cruda, transfirió por conjugación genes de resistencia a tetraciclina, al cromosoma de otras cepas de *E. faecalis*, *Lactococcus lactis* subs *lactis* biovar *diacetylactis*, *Listeria innocua*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Staphylococcus aureus*, señalando el mismo autor en otro estudio (31) en otro estudio, que también cepas de *E. faeciun* transfieren genes de resistencia a tetraciclina, concluyendo el autor que en la cadena alimentaria del hombre se encuentran genes de resistencia a los antibióticos iguales a los conocidos en especies de origen clínico.

Los *Bacillus* se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y pueden llegar a la leche por diversas vías. Una de las especies de este género más aislada es el *B. cereus*, el cual reviste una gran importancia para la industria alimentaria, debido principalmente a la producción de toxinas, la producción de una proteasa extracelular y fosfolipasa que suelen causar deterioro de los alimentos; así como, por la formación de esporas termoresistentes (27,32).

Los *Micrococcus* forman parte de la flora normal de la leche, siendo las especies encontradas en este estudio las aisladas con mayor frecuencia, las cuales además se caracterizan por no ser patógenas.

Dentro de los *Lactococcus* se identificaron el *L. lactis* y *L. cremoris*, que son cepas utilizadas con mucha frecuencia en la elaboración de productos fermentados, diversos estudios han sido realizados con el fin de demostrar como la presencia de residuos de antimicrobianos en leche causan la inhibición de su crecimiento (3,33,34). También se ha comprobado que el *Lactococcus lactis* aislado de queso elaborado con leche

cruda, transfiere genes de resistencia a estreptomicina, tetraciclina y cloramfenicol (35), este último antimicrobiano, al cual se le atribuye que sus residuos en leche podrían aumentar la aparición de resistencia bacteriana en las personas, ha sido retirado en muchos países de la línea veterinaria por la inducción de anemia aplásica en individuos susceptibles, considerándose su presencia en leche potencialmente letal para el consumidor.

Los resultados encontrados en esta investigación hacen evidente la necesidad de realizar investigaciones tendientes a determinar la prevalencia, tipo y concentración de los antimicrobianos presentes en la leche cruda producida en el país, con el fin de establecer las bases para el desarrollo de las normativas legales; así como la aplicación de programas de control para el uso racional de los antibióticos.

AGRADECIMIENTO

Los autores expresan su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de la Universidad del Zulia por el soporte financiero para la realización del presente estudio.

REFERENCIAS

- Sischo WM. Quality milk and test for antibiotic residues. *J Dairy Sci.* 1996; 79(6): 1065-1073.
- Baynes RE, Lyman R, Anderson KL, Brownie CF. A preliminary survey of antibiotic residues and viable bacteria in milk from three caribbean basin countries. *J Food Prot.* 1999; 62(2):177-180.
- Oh SJ, Lim KS, Huh CS, Baek YJ. Effects of antibiotic residues on the growth of lactic culture in milk. *Korean J Dairy Sci* 1996; 18(1):25-30.
- Rodrigues R, Cerqueira, MM, Rubinich J, Fonseca CM. Antibiotic residues detection in milk. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 1993; 45(4): 419-426.
- Heeschen WH. Hygienic quality requirements for raw milk and dairy products and their production, manufacture and sale in the European Community. *Milchwirtschaftliche* 1992; 112: 117-129.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/ Organización Mundial de la Salud. *Codex Alimentarius Vol. 1-7, Secretaria del Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias*, FAO. Roma, 1994.
- Stribling JH. Animal drug requirements of the federal food, Drug and cosmetic act. In: *Proceedings of the Symposium on Animal Drug Use-Dollar and Sense*. Stefan, G.E editor. Center for Veterinary Medicine, Food and Drug Administration, Rockville, 1987 Maryland, 29-36.
- Barbano D. Raw milk quality: milk quality improvement in the United States. *Aust. J Dairy Tech.* 1992; 47(2):89-90.
- CAVEPAS. *Sistema Lácteo Venezolano. Flujo Físico* 1998. Venezuela, 1999 Caracas.
- Shahani K, Gould L, Weiser H, Slatter W. Stability of small concentrations of penicillin in milk as affected by heat treatment and storage. *J Dairy Sci.* 1956; 39:971-977.
- Shahani K. The effect of heat and storage on the stability of aureomycin in milk, buffer and water. *J Dairy Sci.* 1957; 40:289-296.
- Alonso FR. Prevalencia de mastitis subclínica bovina en la Cuenca del Lago de Maracaibo I. Porcentaje de prevalencia y caracteres de la infección. *Las Jornadas Nacionales sobre Ganadería de Doble Propósito. Machiques- Perija.* 1977 Enero 12-16.
- Ministerio de Sanidad y Asistencia Social (MSAS). *Oficina de Higiene de los Alimentos.* 1998 Maracaibo, edo Zulia-Venezuela.
- Hands A. Assay of inhibitory substances. *J Soc Dairy Tech.* 1989; 42 (4):92-93.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). *Official Methods of Analysis.* 15th Edition. 1990 Washington, DC.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). *Microorganismos en alimentos I. Su significancia y métodos de enumeración.* Edición en Lengua Española. Editorial ACRIBIA. 1983 Zaragoza-España.
- Gandino L, Chiappetta G. Comparison of rapid methods for determination of beta-lactam antibiotics in milk. *Latte* 1998 23(3):71-74.
- Senyr GF, Davidson JH, Brow JM, Halltead EP, Sherbon JW. Comparison of rapid test used to detect antibiotic residues in milk. *J Food Prot.* 1990; 53(2): 158-164.
- Rivero Z, Faría J, Santoro R. Aislamiento de Gram negativos en Leches Crudas con Antibióticos. *Revista Científica FCV-LUZ.* 1994; vol. IV, Nº1:11-16.
- Jimenez U. Comparación de la Eficacia de la Cefoperazona y la Novobiocina en la Mastitis Bovina sub-clínica. *La Universidad del Zulia, Facultad de Ciencias Veterinarias. Trabajo de Ascenso.* 1992 Venezuela.
- López N. Valoración de las Normativas Legales Existentes en Venezuela para la Producción de Queso y su Incidencia en los Aspectos Higiénico-Sanitario. *Rev.Fac. Ciens Vets UCV.* 1992; 38(8):64-70.
- Brady MS, Whitw N, Katz S. Resistance Development Potential of Antibiotic/Antimicrobial Residue Levels Designated as "Safe Levels". *J. Food Prot.* 1993; 56(3): 229-233.
- Brady MS, Katz SE. In vitro effect of multiple antibiotic/ antimicrobial residues on the selections for resistance in bacteria. *J AOAC Int.* 1992; 75(4):738-742.
- Zaadhof KJ, Ferplan G. Enterotoxigenicity of Antibiotic-Resistant *Staphylococcus aureus* cultures isolated from mastitis milk. *XIX International Dairy Congress. Vet. Fac. Univ. of Munich, Federal Republic of Germany.* 1974 May 21:57-59.
- Perreten V, Grampa N, Schuñer U, Teuber M. Antibiotic resistance genes in coagulase-negative *Staphylococci* isolated from food. *Syst. Appl. Microb.* 1998; 21(1):113-120.
- Boscán L, Faría J, Sánchez MD. Calidad Química y Microbiológica de la Leche en Venezuela. En: *Ganadería Mestiza de Doble Propósito.* Gonzáles Stagnaro Ed. Editorial

- Astro Data. 1era edición. Maracaibo-Venezuela. Cap XXIX 1992; 604-629.
27. Frazier WC, Westhoff DC. Microbiología de los Alimentos. Editorial Acribia. 3era Edición Española. 1985 Zaragoza, España 521pp.
 28. Contreras R, Teiceira G, Inciarte C, Sanz L, Carmona O. y col. Resistencia de Enterococos a los Antimicrobianos en Venezuela. Bol. Soc. Ven. Microb. 1995; 15(1):11-15.
 29. Knudtson LM, Hartman PA. Antibiotic resistance among Enterococcal isolates from environmental and clinical sources. J Food Prot. 1993; 56(6): 489-492.
 30. Perreten V, Kolloffel B, Teuber M. Conjugal transfer of the Tn916-like Transposon TNF01 from Enterococcus faecalis isolated from cheese to other Gram-positive bacteria. Syst. Applied Microb. 1997; 20(1): 27-38.
 31. Perreten V. Distribution, molecular characterization and genetic mobilization of antibiotic resistance genes in enterococci, staphylococci and lactic acid bacteria isolated from food. Diss Abst. Int. 1996; 57(9) 102pp.
 32. Gilmour A, Rowe MT. Microorganismos Asociados a la Leche. En: Robinson, R.K. editor. Microbiología Lactológica Vol. I. Editorial Acribia. Edición en Lengua Española 1987:33-67.
 33. Champagne CP. Effect of penicillin on free or immobilized lactococci: milk acidification and residual antibiotic level. J. Food Saf. 1992; 12(4): 327-337.
 34. Scheiffmann AP, Schuertz M, Wiesner HU. False negative and positive results in testing for inhibitory substance in milk Y. The influence of antibiotic residues in bulk milk on Lactic acid production of starter cultures. Milchwissenschaft 1992 47(11): 712-715.
 35. Perreten V, Schwarz F, Cresta L, Boeglin M, Dasen G, Teuber M. Antibiotic resistance spread in food. Nat. 1998; 7:801-805.

Recibido: 15-02-2001

Aceptado: 29-10-2001