

IDENTIFICACIÓN Y SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS DE *STAPHYLOCOCCUS* COAGULASA NEGATIVOS AISLADOS DE MASTITIS BOVINA EN LA CUENCA LECHERA SANTA FESINA*

Armando Delgado C. (M.V.), Marcelo Aubagna B. (M.V.), Norma Russi F. (M.V.), Nerina Aguirre S. (M.V.), Paula Rejf J. (M.V.), y Luis Calvino G. (M.V., M.V.M., Ph D.)

IDENTIFICATION AND ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY OF COAGULASE-NEGATIVE *STAPHYLOCOCCI* ISOLATED FROM BOVINE MASTITIS IN THE SANTA FE DAIRY AREA

One hundred thirty five staphylococci isolated from bovine mastitis cases were characterized based upon physiological and biochemical tests. Among the novobiocin-sensitive group the isolated organisms were: Staphylococcus chromogenes (20%), S. simulans (17.7%), S. haemolyticus (15.5%), S. epidermidis (8.8%), S. carnosus (2.2%) y S. capitis subsp. capitis (6.6%), whereas among the novobiocin-resistant group the isolated species were: S. lentus (13.3%), S. xylosus (8.8%), S. sciuri (2.2%) and S. cohnii (2.2%). Susceptibility to eight antimicrobial drugs frequently used for mastitis treatment in Argentina was evaluated. SCN strains showed the highest resistance against penicillin (52.5%) and oxacillin (57.03%).

INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina es la enfermedad que produce las mayores pérdidas económicas en los rodeos lecheros (DeGraves y Fetrow, 1993). Si bien la inflamación puede responder a diversas etiologías, usualmente es la consecuencia de infección bacteriana. Las especies de los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus* son las más prevalentes en infecciones subclínicas y clínicas en Argentina (González y col., 1980; Rivero y col., 1984; Calvino y col., 1991 a,b). Dentro del género *Staphylococcus*, las especies caracterizadas como coagulasa-negativas (SCN) son consideradas como patógenos menores, siendo causantes tanto de mastitis subclínica como clínica (Holmberg, 1986). Asimismo, las infecciones intramamarias (IIM) causadas por algunas especies de SCN interfieren con la colonización de la glándula mamaria por bacterias de mayor patogenicidad (Holmberg, 1986). Los SCN son con frecuencia los organismos más prevalentes en secreciones mamarias de vacas lactantes y no lactantes (Oliver y Mitchell, 1984; Watts y Owens, 1989), siendo la prevalencia de las especies de SCN variable en distintos países (Hodges y col., 1984; Holmberg, 1986; Jarp, 1991). En Argentina sólo se cuenta con información sobre su distribución en establecimien-

tos lecheros del centro de la Provincia de Córdoba (Rampone y col., 1993). Los objetivos de este trabajo fueron caracterizar cepas de SCN aisladas a partir de mastitis bovina en establecimientos ubicados en la cuenca lechera santafesina y determinar su susceptibilidad a agentes antimicrobianos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas

Se obtuvieron 135 cepas de SCN aisladas de cuartos mamarios de vacas holando-argentino pertenecientes a 50 establecimientos lecheros ubicados en el centro oeste de la Provincia de Santa Fe (Departamentos Las Colonias y Castellanos). De ellas, 122 (90.37%) fueron aisladas a partir de mastitis subclínicas, y 13 (8.63%) de casos clínicos. De cada establecimiento se obtuvieron entre dos a cuatro aislamientos. Las muestras de leche se obtuvieron en forma aséptica luego de desinfectar la punta del pezón con alcohol 70%.

Cepas de referencia

Como cepas de referencia se utilizaron: *Staphylococcus intermedius* (MRLCC AB0001), *S. hyicus* (American Type Culture Collection, ATCC 11249), *S. xylosus* (ATCC 29971), *S. cohnii* (ATCC 29974), *S. chromogenes* (MRLCC AD001), *S. epidermidis* (ATCC 12228), *S. warneri* (ATCC 27836), *S. saprophyticus* (Brl 4/86) y *S. haemolyticus* (ATCC 29970). Las mismas

*Departamento de Patología, Facultad de Agronomía y Veterinaria de Esperanza, Universidad Nacional del Litoral, Argentina. Rvdo. Padre Kreder 2805 (3080), Esperanza, Pcia. de Santa Fe, Argentina.

fueron mantenidas en agar tripticasa soya (Difco), a 4°C durante el transcurso del estudio.

Características examinadas

Los primoaislamientos fueron caracterizados tentativamente como SCN en base a tinción de Gram, morfología microscópica, producción de catalasa y coagulasa (Cowan y Steel, 1974). Posteriormente se caracterizaron en base a las siguientes propiedades: (a) morfología colonial sobre agar sangre ovino al 5%, (b) utilización de la glucosa por la vía fermentativa y oxidativa (Cowan y Steel, 1974), (c) diámetro de la colonia y producción de pigmento en Agar P (Kloos y col., 1974), (d) crecimiento anaeróbico en tioglicolato (Kloos y Schleifer, 1975), (e) producción de hemólisis en agar sangre bovino (Kloos y Schleifer, 1975), (f) reducción de nitratos (Kloos y Schleifer, 1975), (g) presencia de ureasa (Cowan y Steel, 1974), (h) producción de acetoina (Cowan y Steel, 1974), (i) producción de ácido en aerobiosis a partir de los siguientes hidratos de carbono: B-D-fructosa, D-galactosa, D-mannosa, D-xylosa, D-ribosa, maltosa, sucrosa, y D-mannitol (Kloos y Schleifer, 1975), y (j) susceptibilidad a la novobiocina en Agar P (Devrille, 1979).

Identificación de las cepas

Se realizó en forma tentativa utilizando una modificación del esquema propuesto por Romeo y col. (1988). Dentro de los SCN novobiocina resistentes, *S. lentus* fue diferenciado de *S. sciuri* en base a crecimiento anaeróbico en tioglicolato. Dentro de los SCN novobiocina sensibles, *S. simulans* se diferenció de *S. saccharolyticus* en base a utilización de la sucrosa. También dentro de este grupo, *S. haemolyticus* se diferenció de *S. capitis* subsp. *capitis* en base a utilización de la maltosa y de *S. capitis* subsp. *ureolyticus* en base a la presencia de ureasa. La clasificación fue confirmada de acuerdo con Holt y col. (1994). Para la identificación se siguió el criterio de Devriese (1979), según el cual una cepa debió diferir de otra en al menos dos caracteres para ser considerada como perteneciente a otra especie. Consecuentemente, las cepas que mostraron más de dos reacciones que no se ajustaran a las establecidas para las cepas de referencia fueron consideradas como no caracterizables.

Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos

Se realizó la técnica de difusión en agar (Bauer y col., 1966). Los discos de antibióticos (Britania) utilizados fueron: clindamicina (2 µg), eritromicina (15 µg), oxacilina (1 µg), ampicilina, penicilina (10 U), cefoperazona (75 µg), neomicina (30 µg) y espiramicina (10 µg).

RESULTADOS

Las 135 cepas de SCN fueron clasificadas en 10 especies distintas de acuerdo con el esquema propuesto (Tabla 1), mientras que tres cepas no pudieron ser clasificadas. Las 13 cepas aisladas de mastitis clínicas fueron identificadas como *S. chromogenes* (4), *S. simulans* (2), *S. lentus* (2), *S. capitis* subsp. *capitis* (1), *S. haemolyticus* (1), *S. cohnii* (1), *S. epidermidis* (1), mientras que una cepa no pudo ser identificada. La susceptibilidad a los antibióticos se muestra en la Tabla 2.

TABLA 1
FRECUENCIA DE *Staphylococcus* COAGULASA-NEGATIVOS AISLADOS DE MASTITIS CLÍNICAS Y SUBCLÍNICAS EN 50 ESTABLECIMIENTOS LECHEROS DE LA PROVINCIA DE SANTA FE

Especies de SCN	Nº de cepas	Porcentaje
<i>S. chromogenes</i>	27	20
<i>S. simulans</i>	24	17,7
<i>S. haemolyticus</i>	21	15,5
<i>S. lentus</i>	18	13,3
<i>S. epidermidis</i>	12	8,8
<i>S. xylosus</i>	12	8,8
<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	9	6,6
<i>S. cohnii</i>	3	2,2
<i>S. carnosus</i>	3	2,2
<i>S. sciuri</i>	3	2,2
No identificados	3	2,2
Total	135	100

TABLA 2
SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS DE 135 CEPAS DE *Staphylococcus* COAGULASA-NEGATIVOS AISLADOS DE MASTITIS BOVINAS CLÍNICAS Y SUBCLÍNICAS EN 50 ESTABLECIMIENTOS LECHEROS DE LA PROVINCIA DE SANTA FE

Agente antimicrobiano	Cepas de SCN resistentes	
	Número	Porcentaje
Neomicina	32	23,7
Penicilina	71	52,5
Espiramicina	45	33,3
Oxacilina	77	57,3
Eritromicina	38	28,14
Clindamicina	51	37,7
Ampicilina	45	33,3
Cefoperazona	38	28,14

DISCUSIÓN

La alta prevalencia de SCN en leche proveniente de vacas con mastitis clínica y subclínica en Argentina (González y col., 1980, Rivero y col., 1984, Calvino y col., 1991a) ha determinado el interés en la clasificación de las distintas especies que componen este

grupo (Rampone y col., 1993, Gentilini y col., 1995, Quiñones y Demo, 1997). En el presente estudio las especies de SCN más frecuentemente aisladas fueron *S. chromogenes*, *S. simulans* y *S. haemolyticus*, mientras que en el estudio efectuado por Rampone y col. (1993) las especies más prevalentes fueron *S. haemolyticus*, *S. hominis* y *S. warneri*. Las diferencias observadas en ambos casos podrían responder a variaciones determinadas por las distintas zonas geográficas y por predominio de especies dentro de cada rodeo. En el presente estudio se tomaron entre dos a cuatro aislamientos de cada rodeo, a fin de que los organismos reflejaran su proporción relativa dentro de los tambos estudiados. Si bien el número de organismos utilizados por establecimiento fue bajo, se observó la tendencia al aislamiento de una misma especie de SCN dentro de un rodeo determinado (datos no exhibidos), lo cual concuerda con lo informado por otros autores (Matthews y col., 1992, Rampone y col., 1993). El predominio de una especie de SCN dentro de un rodeo se considera que refleja, entre otros factores, las prácticas de manejo empleadas en cada establecimiento, fundamentalmente el tipo de antiséptico utilizado para desinfectar los pezones post-ordeña (Watts y Owens, 1989). La clasificación de SCN en grupos (Gentilini y col., 1995) y la procedencia de aislamientos de un solo establecimiento (Quiñones y Demo, 1997) no permiten hacer comparaciones con otros estudios realizados en el país.

Existen pocos datos en Argentina acerca de la susceptibilidad a antimicrobianos de SCN aislados a partir de mastitis bovina. Los niveles de resistencia a la penicilina (52,5%), eritromicina (28,14%) y neomicina (23,7%) hallados en el presente estudio fueron superiores a los informados en estudios previos (McDonald y Anderson, 1981; Jarp, 1991; Frigerio y col., 1995), mientras que la resistencia a espiramicina (33,3%) fue inferior a la informada por Frigerio y col. (1995). Los elevados niveles de resistencia observados frente a la penicilina podrían deberse al uso extensivo de este antibiótico, sumado a la aplicación de terapias antibióticas sin un adecuado basamento técnico (Tarabla y col., 1994). El significado de este hallazgo no es claro. Si bien no se han informado casos de fallas en el tratamiento antibiótico en mastitis clínicas causadas por SCN, cepas hospitalarias de estos organismos pueden intercambiar plásmidos que codifican para resistencia a antibióticos y también transferirlos a especies de mayor patogenicidad como *S. aureus* (Archer, 1986).

El esquema de caracterización y el número de pruebas utilizado fueron satisfactorios para lograr la identificación de los aislamientos, excepto en tres oportunidades. Estas pruebas, si bien exceden las usa-

das como rutina, pueden ser implementadas sin inconvenientes para realizar estudios epidemiológicos. Este tipo de estudios, así como aquéllos que tienden a definir los potenciales factores de virulencia de los SCN, podrá contribuir a dilucidar el rol que estos organismos cumplen dentro del complejo de la mastitis bovina, ya sea como causantes de IIM o interfiriendo con el establecimiento de IIM causadas por organismos de mayor patogenicidad.

AGRADECIMIENTOS

Las cepas de referencia fueron cedidas gentilmente por el Dr. A. Calzolari, Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina. Este trabajo fue financiado con un subsidio CAI+D, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

RESUMEN

Se aislaron e identificaron 135 cepas de estafilococos coagulasa-negativos, caracterización bioquímica y fisiológica, a partir de mastitis bovinas. Como grupo novobiocina-sensible se aislaron: *Staphylococcus chromogenes* (20%), *S. simulans* (17,7%), *S. haemolyticus* (15,5%), *S. epidermidis* (8,8%), *S. carnosus* (2,2%) y *S. capitis* subsp. *capitis* (6,6%). Dentro del grupo novobiocina-resistente se aislaron: *S. lentus* (13,3%), *S. xylosus* (8,8%), *S. sciuri* (2,2%) y *S. cohnii* (2,2%). Tres aislamientos (2,2%) no pudieron ser caracterizados. Se evaluó la sensibilidad de los SCN a ocho agentes antimicrobianos de uso frecuente para el tratamiento de mastitis bovina en Argentina, hallándose la mayor resistencia frente a la penicilina (52,5%), y oxacilina (57,03%).

REFERENCIAS

- ARCHER, G.L. 1986. Antibiotic resistance in coagulase-negative staphylococci. En: Congulase-negative staphylococci. Almquist & Wiksell International. Stockholm, Sweden. Eds. P.-A. Mårdh y K.H. Schleifer. pp. 93-101.
- BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M., SHERRIS, J.C., y TURCK, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol. 45: 493-496.
- CALVINHO, L.F.; VITULICH, C.A.; ZURBRIGGEN, M.A., CANAVESIO, V.R. y TARABIA, H.D. 1991a. Prevalencia de microorganismos patógenos de la ubre en rodeos de la cuenca lechera santafesina. Therios 10: 188-196.
- CALVINHO, L.F.; DELGADO, A.R.; VITULICH, C.A.; OCCHI, H.L.; CANAVESIO, V.; R. ZURBRIGGEN, M.A. y TARABIA, H.D. 1991b. Susceptibilidad in vitro a los antimicrobianos de microorganismos aislados a partir de mastitis clínicas en tambos de la cuenca lechera santafesina. Vet. Arg. 8: 677-680.
- COWAN, S.T. y STEEL, K.J. 1974. Cowan and Steel's Manual for the identification of medical bacteria. Second ed. University Press, Cambridge, Great Britain. 238 pp.

- DEGRAVES, F.J. y FETROW, J. 1993. Economics of mastitis and mastitis control. *Vet. Clin. North Am.: Food Anim. Pract.* 9: 421-434.
- DEVRIESE, L.A. 1979. Identification of clumping-factor-negative staphylococci isolated from cow's udders. *Res. Vet. Sci.* 27: 313-320.
- FRIGERIO, C.; BETTERA, S.; SCALISE, I. y CALZOLARI, A. 1995. Resistencia a antibióticos de cepas de estafilococos aisladas en tres tambos de Córdoba, Argentina. *Rev. Med. Vet. (Bs. As.)* 76: 288-292.
- GENTILINI, E.; DENAMIEL, G. y GODALY, M.S. 1995. Mastitis bovina: tipificación del género *Staphylococcus*. *Vet. Arg.* 12: 384-386.
- GONZÁLEZ, R.N.; GIRAUDO, J.A. y BUSO, J.J. 1980. Investigación de mastitis subclínicas: II Agentes etiológicos bacterianos. *Rev. Med. Vet. (Bs. As.)* 61: 225-234.
- HODGES, R.T.; JONES, Y.S. y HOLLAND, J.T.S. 1984. Characterization of staphylococci associated with clinical and subclinical bovine mastitis. *N.Z. Vet. J.* 32: 141-145.
- HOLMBERG, O. 1986. Coagulase-negative staphylococci in bovine mastitis. en: *Coagulase-negative staphylococci*. Almqvist & Wiksell International. Stockholm, Sweden. Eds. P.-A. Mårdh y K.H. Schleifer. pp. 203-211.
- HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T. y WILLIAMS, S.T. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Ninth ed., Baltimore, USA Eds. Williams & Wilkins, pp. 544-558.
- JARP, J. 1991. Classification of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine clinical and subclinical mastitis. *Vet. Microbiol.* 27: 151-158.
- KLOOS, W.E.; TORNABENE, T.G. y SCHLEIFER, K.H. 1974. Isolation and characterization of *Micrococci* from human skin: including two new species: *Micrococcus lylae* and *Micrococcus kristinae*. *Int. J. Syst. Bact.* 24: 70-101.
- KLOOS, W.E. y SCHLEIFER, K.H. 1975. Simplified scheme for routine identification of human staphylococcus species. *J. Clin. Microbiol.* 1: 82-88.
- MATTHEWS, K.R.; HARMON, R.J. y LANGLOIS, B.E. 1992. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci during the periparturient period in primiparous and multiparous cows. *J. Dairy Sci.* 75: 1835-1839.
- MC DONALD, J.S. y ANDERSON, A.J. 1981. Antibiotic sensitivity of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from infected bovine mammary glands. *Cornell Vet.* 71: 391-396.
- OLIVER, S.P. y MITCHEL, B.A. 1984. Prevalence of mastitis pathogen in herds participating in a mastitis control program. *J. Dairy Sci.* 67: 2436-2440.
- QUINONES, J. y DEMO, M. 1997. Estafilococos coagulasa negativo aislados de glándula mamaria bovina: producción de citolisinas, sinergismo hemolítico y slime. *Vet. Arg.* 14: 95-100.
- RAMPONE, H.; BOGNI, C.; GIRAUDO, J. y CALZOLARI, A. 1993. Identification of staphylococci from bovine milk in Argentina. *Zbl. Bakt.* 279: 537-543.
- RIVERO, V.B.; VENA, M.M. y CORBELLINI, C.N. 1984. Resultados bacteriológicos en casos de mastitis clínicas en rodeos lecheros de la cuenca de Abasto del Gran Buenos Aires. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 4: 211-223.
- ROMEO, A.M.; CATALANO, M. y LOVADINA, L. 1988. Pruebas bioquímicas mínimas para la identificación interespecie en el género *Staphylococcus*. *Rev. Arg. Microbiol.* 20: 171-182.
- TARABLA, H.D., CALVINHO, L.F. y VITULICH, C.A. 1994. Encuesta sobre el uso de antibióticos en mastitis bovina. En: *Resúmenes del VII Congreso Argentino de Ciencias Veterinarias*, p. 354.
- WATTS, J. y OWENS, W.E. 1989. Prevalence of staphylococcal species in four dairy herds, 46: 1-4.