

AISLAMIENTO DE ESTAFILOCOCOS COAGULASA POSITIVOS, DISTINTOS A *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, DE CUARTOS CON MASTITIS SUBCLINICA EN LA VILLA DEL ROSARIO, ESTADO ZULIA, VENEZUELA

Isolation of Coagulase Positive *Staphylococcus spp*, other than *Staphylococcus aureus*, From Quarters with Subclinical Mastitis in La Villa del Rosario, Estado Zulia, Venezuela

Armando Hoet¹, Gerardo D'Pool¹, Waleska Fulcado², Rosa Polo², Carmen Graterol² y Milexy Brito²

¹Facultad de Ciencias Veterinarias, Apartado 15252. ²Escuela de Bioanálisis. Universidad del Zulia. Maracaibo 4005-A, estado Zulia, Venezuela

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo es reportar el hallazgo de estafilococos coagulasa positivos distintos a *Staphylococcus aureus*; aislados en cuartos mamarios con mastitis subclínica en bovinos del municipio Valle del Rosario de Perija, estado Zulia, Venezuela. Se evaluó una población de 80 vacas en ordeño mediante el test de California, seleccionándose 65 muestras de leche para cultivo bacteriológico de aquellos cuartos con tres (3) cruces, de un total de 320 cuartos evaluados. Las vacas se encontraban entre los 30 días postparto y los 8 meses de lactación. El análisis bacteriológico se realizó basado en las indicaciones del Consejo Nacional de Mastitis de EEUU, obteniéndose 28 (43%) aislamientos positivos, distribuidos de la siguiente manera: 14 aislamientos (50%) del género *Streptococcus*, todos ellos de la especie *Streptococcus agalactiae*; 12 aislamientos (43%) del género *Staphylococcus*, de los cuales 11 eran estafilococos coagulasa positivos y 1 coagulasa negativo; y 2 aislamientos (7%) del género *Corynebacterium*, siendo ambos de la especie *Corynebacterium bovis*. Ninguno de los 11 aislamientos de estafilococos coagulasa positivos correspondían a *Staphylococcus aureus*, determinándose que 9 eran *S. intermedius* y 2 *S. hyicus*. El aislamiento de estafilococos coagulasa positivos que no fueran *Staphylococcus aureus* en cuartos mamarios con mastitis subclínica no había sido reportado con anterioridad en nuestra región. Por lo que se recomienda la aplicación de pruebas microbiológicas adicionales en muestras de leches provenientes de esta zona geográfica, con el fin de establecer un diagnóstico diferencial entre *S. aureus* y otras especies de estafilococos coagulasa positivos.

Palabras clave: Mastitis, bovino, estafilococos coagulasa positivos.

ABSTRACT

The objective of the present research is to report the finding of coagulase positive *Staphylococcus* other than *Staphylococcus aureus*, from quarters of cows with subclinical mastitis at Valle del Rosario de Perija, Zulia state, Venezuela. A population of 80 milking cows was evaluated using the California Mastitis Test. 65 milk samples were collecting for bacteriologic culture from quarters that gave 3 crosses to the CMT. A total of 320 quarters were evaluated. The cows were between 30-d postpartum and 8 months of lactation. The bacteriologic analysis of samples were made based on guidelines of the National Mastitis Council, by getting 28 (43%) positive isolations, distributed as follows: 14 isolations (50%) *Streptococcus*, all of the species *Streptococcus agalactiae*; 12 isolations (43%) were of the genus *Staphylococcus*, from which 11 were coagulase positive *Staphylococcus spp* and 1 coagulase negative; and 2 isolations (7%) *Corynebacterium*, being both of the species *Corynebacterium bovis*. None of the 11 coagulase positive *Staphylococcus* were *Staphylococcus aureus*, which 9 were *Staphylococcus intermedius* and 2 *Staphylococcus hyicus*. The isolation of coagulase positive *Staphylococcus spp* other than *Staphylococcus aureus* in mammary quarters with subclinical mastitis has been not reported in our region yet. Therefore, it is recommended that additional microbiological tests be used in milk samples from this geographic area to establish a differential di-

agnosis between *S. aureus* and other coagulase positive *staphs*.

Key words: Mastitis, bovine, coagulase positive *Staphylococcus*.

INTRODUCCIÓN

Son numerosos los agentes causales de Mastitis Bovina que son reportados en la literatura, los cuales pertenecen a diferentes grupos de microorganismos tales como: bacterias, hongos, mycoplasmas y las recientemente reportadas algas [2, 7, 9, 13]. Dentro de esta amplia gama de gérmenes que producen mastitis el principal grupo son las bacterias [13], siendo las más comúnmente aisladas las del género *Streptococcus*, *Staphylococcus* y Enterobacterias, principalmente las del grupo de los Coliformes [2, 7, 9, 13].

En diferentes partes del mundo se ha investigado la distribución y prevalencia de los agentes causales de mastitis en su área de influencia [4, 5, 9, 10, 11, 18, 19, 20, 21]; ya que para poder abordar el problema de mastitis bovina es necesario previamente conocer quien la causa [1, 9], debido a que cada microorganismo posee características epizootiológicas diferentes que deben ser usadas para establecer las medidas más apropiadas de Prevención y Control en contra de estos.

En la región de la Cuenca del Lago de Maracaibo solo se han realizado algunos reportes sobre las diferentes especies o géneros de microorganismos que más frecuentemente causan mastitis en esta área [1, 6, 12, 17].

El objetivo del presente trabajo es reportar el hallazgo de estafilococos coagulasa positivos distintos a *Staphylococcus aureus*; aislados en cuartos mamarios con mastitis subclínica en bovinos del municipio Valle del Rosario de Perija, Edo. Zulia, Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluó una población de 80 vacas en ordeño pertenecientes a la hacienda "Los Caracas" ubicada en la Villa del Rosario, Municipio Rosario de Perija, Estado Zulia, Venezuela. Esta zona es catalogada como bosque seco tropical. El ordeño es de tipo mecánico, sin apoyo de becerro; ordeñándose dos veces al día.

Para el aislamiento bacteriológico sólo se tomaron muestras de leches de aquellos cuartos que dieron alta positividad (tres cruces) a la prueba de California para Mastitis (CMT), siguiendo el procedimiento descrito en la literatura [8]. Las muestras correspondían a vacas que estaban entre los 30 días postparto y los 8 meses de lactación; ya que en dichos cuartos existe una alta probabilidad de aislar microorganismos [1]. La positividad del CMT indica la presencia de mastitis subclínica [8, 9].

La rutina utilizada en la toma de la muestra y posterior transportación es la indicada por el Consejo Nacional de Mastitis de EEUU [13]. El análisis bacteriológico se realizó en el Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico de la Cátedra de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad del Zulia, basado en las indicaciones para este tipo de procedimientos [13].

El aislamiento de microorganismos de las muestras de leche se realizó de acuerdo a lo indicado por varios autores [3, 13, 16]. Luego de obtener un crecimiento positivo se procedió a realizar el estudio de las colonias que se desarrollaron; a las diferentes colonias se les practicó la Prueba de la Catalasa, además de realizarles frotis coloreados con GRAM.

De acuerdo con los resultados de la Catalasa, morfología celular y afinidad tintorial, se identificaron las colonias de la manera siguiente:

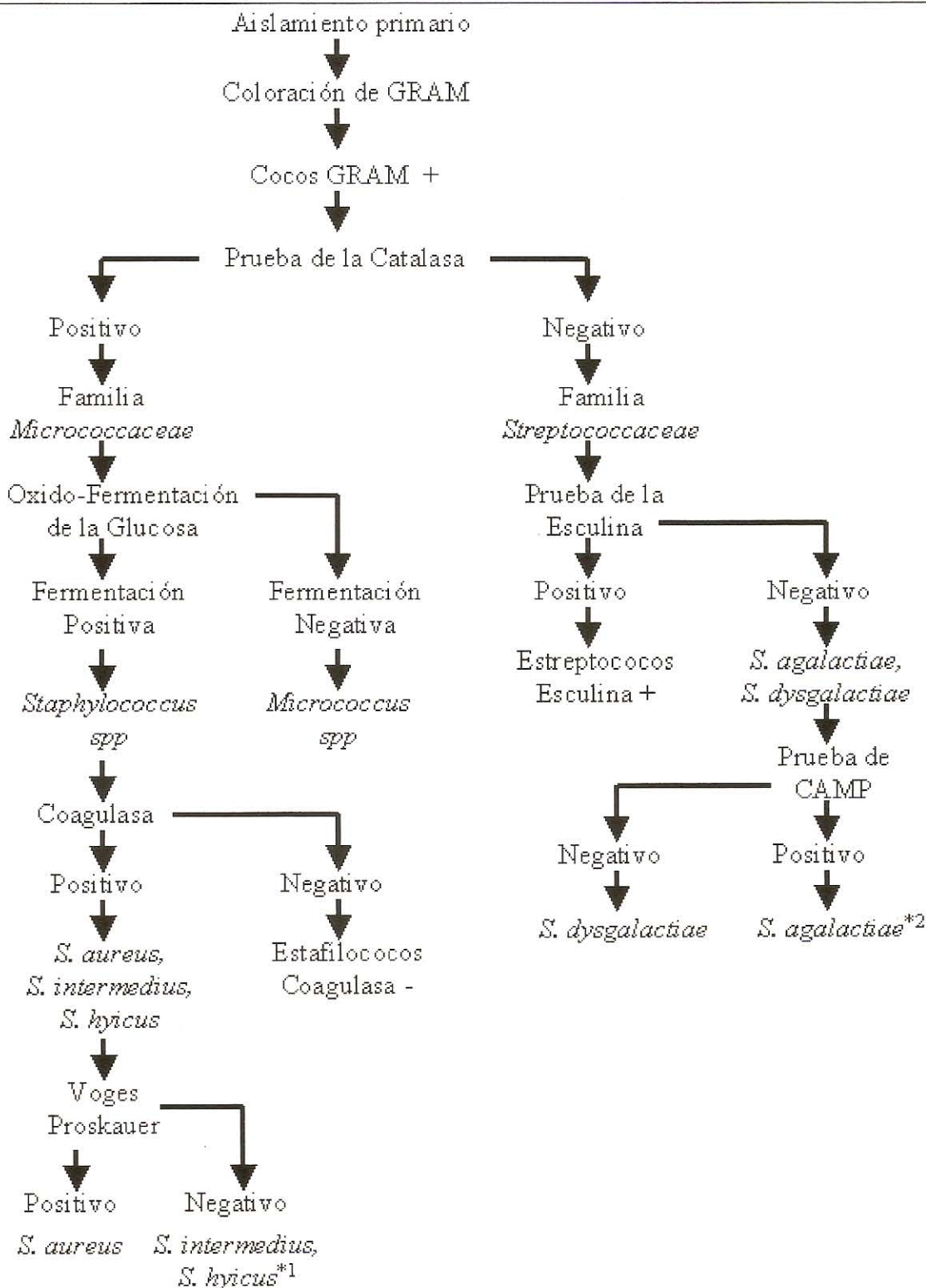
- Cultivos que resultaron ser cocos GRAM positivos, catalasa positivo; eran clasificados como gérmenes de la familia *Micrococcaceae*, por lo que se procedió a practicar las pruebas específicas para identificar género y especie, las cuales fueron: Oxido-Fermentación de la Glucosa (O-F), Coagulasa, Voges Proskauer y Fermentación del Manitol [3, 13, 16], FIG.1 .
- Los gérmenes cocos GRAM positivos, catalasa negativos; se ubicaron en la Familia *Streptococcaceae*, y a los cuales se les realizó las pruebas de Esculina, CAMP y Hipurato [3, 13, 16], FIG.1.
- Cultivos que resultaron ser bacilos o cocobacilos GRAM positivos fueron catalogados como gérmenes pertenecientes al género *Corynebacterium*. Ha estos se les aplicó la tinción con Nuevo Azul de Metileno, con el fin de observar los gránulos metacromáticos y la agrupación típica en empalizada de este género. La clasificación por especie se basó en las características morfológicas de la colonia, patrón hemolítico y la prueba de la Catalasa [16].

Una vez obtenidos los resultados, se determinó la proporción de los gérmenes identificados, para saber la distribución porcentual de ellos en la finca muestreada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los 65 cuartos muestreados para el aislamiento bacteriológico (de 320 cuartos evaluados al CMT), se obtuvieron 28 (43,08%) aislamientos positivos. Una vez realizada toda la rutina microbiológica para identificar cada uno de los gérmenes aislados se obtuvo los siguientes resultados:

- 14 aislamientos (50,00%) pertenecían al género *Streptococcus*, resultando todos ellos de la especie *Streptococcus agalactiae*.
- 12 aislamientos (42,86%) pertenecían al género *Staphylococcus*, de los cuales 11 eran estafilococos



*1 La diferenciación entre dichos agentes se basó en el estudio de sus colonias, patrón hemolítico y características en la fermentación del Manitol [3,13,16].

*2 Se realizó la Prueba de Hipurato para confirmar el resultado. *S. agalactiae* es hipurato+ [3,13,16].

FIGURA 1. FLUJOGRAMA SEGUIDO EN LA IDENTIFICACIÓN DE COCOS GRAM POSITIVOS, CAUSANTES DE MASTITIS BOVINA.

coagulasa positivos y 1 coagulasa negativo. Al realizar la prueba de Voges-Proskauer para diferenciar entre *Staphylococcus aureus* y otros estafilococos coagulasa positivos, se encontró que ninguno de los 11 aislamientos correspondían a *Staphylococcus aureus*, por los que estos pertenecían a las especies *Staphylococcus intermedius* o *Staphylococcus hyicus*. Basándose en el estudio de las colonias (tamaño y coloración), patrón hemolítico (el *S. intermedius* es hemolítico, mas no el *S. hyicus*), y características físico-químicas de estas dos especies, se determinó que 9 eran *S. intermedius* y 2 *S. hyicus*.

- 2 aislamientos (7,14%) pertenecieron al genero *Corynebacterium*, siendo ambos de la especie *Corynebacterium bovis*.

La mayoría de los géneros aislados e identificados en este trabajo coinciden con los reportados por otros autores que han trabajado en la región [1, 6, 7, 12, 17]. Sin embargo, en este caso en particular se aisló un alto numero de estafilococos coagulasa positivos distintos a *Staphylococcus aureus* (*S. intermedius* y *S. hyicus*); los cuales no se habían reportado con anterioridad en la región; aunque estos son reconocidos como agentes causales de mastitis bovina [2, 9, 13, 15, 19].

La razón de esto radica en que los autores [1, 6, 7, 12, 17] que han reportado la incidencia de las mastitis en la Cuenca del Lago de Maracaibo, al realizar la rutina de identificación de los microorganismos causantes de mastitis sólo llegaban hasta genero; o en su defecto hasta la prueba de la coagulasa, asumiendo que todo los aislamientos que resultasen cocos GRAM positivos, catalasa y coagulasa positivo eran *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, hoy en día ya se han identificado otras especies de estafilococos coagulasa positivos causantes de mastitis bovina, ellos son *S. intermedius* y *S. hyicus* [2, 3, 9, 13, 15, 19].

Aunque estos tres microorganismos comparten la misma característica de ser coagulasas positivos, existe una marcada diferencia entre los aspectos epidemiológicos y de infección del *S. aureus* con respecto a los otros dos estafilococos coagulasa positivos aquí nombrados. El *S. aureus* es un agente altamente infeccioso difícil de controlar; el cual tiende a producir infecciones crónicas en los rebaños, así como cuadros clínicos muy severos, difíciles de tratar [14]. En contraste, el *S. intermedius* y *S. hyicus* son microorganismos catalogados como oportunistas, los cuales producen principalmente casos subclínicos de mastitis, con ocasionales brotes de cuadros clínicos no muy severos [15].

Por lo tanto, un programa de prevención y control de mastitis en un rebaño lechero en contra del *S. aureus* es mucho más complejo y costoso que cualquier otro programa de prevención en contra de *S. intermedius* o *S. hyicus*. Es por ello que es importante el diferenciar al *S. aureus* de estas dos especies que no requieren programas muy costosos y complicados para ser controlados.

Debido a estas razones, se hace necesario el utilizar una prueba que diferencie al *Staphylococcus aureus* de otras especies de estafilococos coagulasas positivos causantes de mastitis, tal como lo es la prueba de Voges Proskauer (VP). Dicha prueba mide la producción de acetoina, siendo el *S. aureus* el único estafilococo coagulasa positivo causante de mastitis que la produce [3, 13, 16]. Basándose en esta particularidad, más los resultados del estudio de las colonias, patrón hemolítico, y características físico-químicas, se puede llegar a diferenciar a estas especies; tal y como se hizo en este trabajo.

Pruebas adicionales para diferenciar entre el *S. intermedius* y el *S. hyicus* no fueron realizadas, ya que hoy en día desde el punto de vista de prevención y control de mastitis, dichas especies son consideradas como un solo grupo de agentes infecciosos con características epidemiológicas y de infección muy similares [15]; por lo que el costo de pruebas adicionales no se justifica. Sin embargo, es importante resaltar, que en el futuro seria interesante realizar un estudio epidemiológico detallado para determinar la prevalencia e incidencia en la región de estos dos microorganismos, tal y como se ha realizado en otras latitudes [15].

El diferenciar con exactitud entre el *Staphylococcus aureus* y otros estafilococos coagulasa positivos, permitirá al Médico Veterinario establecer un adecuado programa de prevención y control de mastitis, basándose en las diferentes características epidemiológicas de cada uno de estos.

CONCLUSIÓN

Ninguno de los 11 estafilococos coagulasa positivos hallados en este trabajo correspondían a *Staphylococcus aureus*, sino a especies de *Staphylococcus intermedius* o *Staphylococcus hyicus*. Esto quiere decir, que estos microorganismos hubieran sido ignorados bajo los patrones de diagnostico rutinariamente usados en la región. Dicho hallazgo es importante que sea tomado en cuenta por los microbiólogos del estado para expandir sus rutinas de diagnostico e incluir pruebas adicionales para poder diferenciar entre *Staphylococcus aureus* y otros estafilococos coagulasa positivos causantes de mastitis.

RECOMENDACIONES

Se hace imperioso la necesidad de realizar un detallado estudio epidemiológico para determinar la prevalencia e incidencia en la región zuliana de estos dos microorganismos, *S. intermedius* y el *S. hyicus*; para así establecer programas de prevención y control de mastitis más ajustados a nuestra realidad.

AGRADECIMIENTO

Se agradece la ayuda prestada por los dueños y el personal de la Hacienda los Caracas en la realización del presen-

te trabajo. Asimismo, al soporte técnico y material del personal del Laboratorio de la Cátedra de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Ciencias Veterinarias de LUZ.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALONSO, F. Programas de control de Mastitis Subclínica Bovina en la Cuenca del Lago de Maracaibo. **Revista Veterinaria Venezolana**. Edición Especial: Mastitis Bovina. Vol: XLVII. Nos. 272/273:11-29 y 67-93. 1981 .
- [2] BLOOD, D.C. **Manual de Medicina Veterinaria**. 1^{era} edición. Interamericana McGraw-Hill. 265-282. 1996.
- [3] CARTER, G.R.; CHENGAPPA, M.M.; ROBERTS, A.W. **Essentials of Veterinary Microbiology**. Fifth Edition. Williams & Wilkins. 112-123. 1995.
- [4] CULLEN, G.A; HEBERT, C.N. Some ecological observation on microorganism inhabiting bovine skin, teat canals and milk. **British Veterinary Journal**. 123: 4-24. 1979.
- [5] DA COSTA, E.O.; BENITES, N.; CARCIOFI, A.C.; MELVILLE, P.A.; PRADA, M.S.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.; TRENTI F. Survey on the etiology of intramammary infections in dairy cattle. **Proceedings 18th World Buiatrics Congress: 26th Congress of the Italian Association of Buiatrics**, Bologna, Italy, August 29-September 2, 1994. Vo 1: 825-828. 1994.
- [6] D'POOL, G. Suceptibilidad in vitro de Estafilococos hemolíticos aislados de mastitis bovina en el Estado Zulia. Universidad del Zulia. Facultad de Ciencias Veterinarias. (Trabajo de Ascenso). 1-38. 1976.
- [7] D'POOL, G. Características de los Principales Agentes Etiológicos de la Mastitis Bovina. **Curso de actualización en Mastitis Bovina**. Universidad del Zulia Facultad de Ciencias Veterinarias. 1-8. 1988.
- [8] ESTRADA, E. **Procedimientos de Diagnóstico de Enfermedades Infecciosas en los animales domésticos**. Editorial de La Universidad del Zulia (EDILUZ). 20-30. 1987.
- [9] JAIN, N.C. Common mammary pathogens and factors in infections and Mastitis. **Journal Dairy Sciences**. 62: 128-134. 1979.
- [10] LANGONI, H. Agentes emergentes na etiologia da mastite bovina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinaria**. 19(6): 238-240. 1997.
- [11] MOHAMED, I.E.; MOHAMED, G.E.; EL-OWNI, O.A.O. A study on the incidence and etiology of bovine mastitis in Sudan. **Proceedings of the Second Scientific Congress Egyptian Society for Cattle Diseases**, 5-7 December 1993. Assiut - Egypt. Vo 2. 326-336. 1993.
- [12] MOSQUERA, O.; JIMÉNEZ, I. Prevalencia de Mastitis Bovina en el sector V del Municipio Rosario de Perijá, Distrito Perijá, Estado Zulia. **I Curso Medio de Salud Animal**. Universidad del Zulia, Facultad de Ciencias Veterinarias. 4-6. 1986.
- [13] NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection**. 3th edition. 1-34. 1990.
- [14] NICKERSON, S.C. **Preventing new Staphylococcus aureus mastitis infections**. **Veterinary Medicine**. 88(4): 368-374. 1993
- [15] ROBERSON, J.R.; FOX, L.K.; HANCOCK, D.D.; GAY, J.M.; BESSER, T.E. Prevalence of coagulase-positive staphylococci, other than *Staphylococcus aureus*, in bovine mastitis. **American Journal of Veterinary Research**. 57(1): 54-58. 1996
- [16] QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.K.; CARTER, G.R. **Clinical Veterinary Microbiology**. Wolfe Publishing. 125-141. 1994.
- [17] SÁNCHEZ, W. Mastitis Subclínica y productividad de leche, relación entre CMT (Prueba de Mastitis de California) y variación de producción de leche por tratamiento intramamario. Universidad del Zulia. Facultad de Ciencias Veterinarias. (Trabajo de Ascenso). 1-20. 1980.
- [18] SINGH, P.J.; SINGH, K.B.; JAND, S.K.; DHINGRA, P.N.; NAURIYAL, D.C. Incidence, etiology and antibiogram of pathogens isolated from subclinical mastitis in machine milked cows. **Indian Journal of Dairy Science**. 47(9): 730-733. 1994.
- [19] WATTS, J.L.; OWENS, W.E. Prevalence of Staphylococcal species in four dairy herds. **Research in Veterinary Sciences**. 46(1): 1-4. 1989.
- [20] WILSON, C.D.; RICHARDS M.S. **A survey of Mastitis in the British dairy herd**. **Veterinary Record**. 106: 431-435. 1980.
- [21] YUS, E; FERNÁNDEZ, G.; SECO, B.; GUITIAN, F.J.; SANJUAN, M.L.; TRENTI, F. Valoración de la persistencia de las mastitis bovinas producidas por estafilococcus coagulasa negativos. **Proceedings 18th World Buiatrics Congress: 26th Congress of the Italian Association of Buiatrics**, Bologna, Italy, August 29-September 2, 1994. Vo 2. 1471-1474. 1994.