

**ALGUNAS PROPIEDADES ENZIMATICAS EN
ESTAFLIOCOCOS AISLADOS DE MUESTRAS DE LECHE
PROCEDENTES DE CASOS DE MAMITIS Y SU RELACION
CON LA PRODUCCION DE COAGULASA, DE
TERMONUCLEASA Y SENSIBILIDAD A LA LISOSTAFINA**

*Por M.^a L. García López y
B. Moreno García*

INTRODUCCION

La dificultad en el ensayo de la capacidad infectiva y enterotoxigénica de los estafilococos ha sido la causa de que se hayan investigado otras propiedades buscando correlaciones positivas. Las propiedades más útiles en este sentido, en estafilococos de origen animal, quizás sean la producción de coagulasa, de DNAsa termostable y la sensibilidad a la lisostafina.

Entre otras propiedades que se han estudiado con la finalidad de relacionarlas con la patogenicidad, destacan la producción de fosfatasa, de gelatinasa y de lisozima, así como la reacción en yema de huevo. Una revisión de la bibliografía (véase más adelante) sobre el valor de estas pruebas como índices de patogenicidad de los estafilococos, permite concluir que la producción de sustancias exocelulares con actividad enzimática es más frecuente en los estafilococos coagulasa positivos que en los coagulasa negativos. Sin embargo, cada vez es más general la opinión de que el carácter patógeno de los estafilococos no se debe a ninguna toxina ni enzima concretos, sino más bien a la capacidad de estos gérmenes de multiplicarse en el organismo humano o animal, capacidad que estaría relacionada con la producción en conjunto de una serie numerosa de toxinas y enzimas. Haciendo referencia únicamente a los trabajos más recientes, ésta es la opinión de WISEMAN²⁴, cuando afirma que la virulencia de los estafilococos no puede asociarse con ningún factor concreto, sino más bien con una serie amplia de agresinas. También GEMMEL *et al.*⁷, en un estudio sobre patogenicidad para ratones de estafilococos coagulasa

An. Fac. Vet. León, 1978, 24, 183-193.

negativos, concluye que el poder patógeno viene determinado por la capacidad de producción de múltiples toxinas y enzimas más bien que por la producción de coagulasa. ANDERSON³, en una revisión sobre los mecanismos de virulencia de los estafilococos en relación con la mamitis bovina, señala, del mismo modo, que ningún enzima concreto o combinación de enzimas está relacionado de modo exclusivo con la patogenicidad de los estafilococos.

En el presente trabajo se da cuenta de la capacidad de producción de fosfatasa, de gelatinasa y de lisozima, así como de los enzimas que determinan la reacción en yema de huevo, por parte de una serie de cepas de estafilococos aisladas de casos de mamitis en el ganado vacuno y se relacionan cada una de estas propiedades con la producción de coagulasa, de termonucleasa y con la sensibilidad a la lisis por lisostafina¹.

MATERIAL Y METODOS

Cepas de estafilococos:

Las 57 cepas de estafilococos cuyas propiedades enzimáticas se estudian en este trabajo habían sido aisladas por nosotros de casos de mamitis clínicas y subclínicas en el ganado vacuno⁶. Todas ellas fermentaban la glucosa en anaerobiosis y eran coagulasa positivas, aunque en diverso grado.

Producción de fosfatasa:

La producción de fosfatasa se ensayó por la técnica de BARBER y KUPER⁴, salvo en lo que se refiere al período de incubación. A un agar nutritivo licuado y enfriado a 50°C, se añadió asépticamente una solución al 1 % de fosfato de fenolftaleína (Phenolphthalein diphosphate, sodium salt, BDH), esterilizada previamente por filtración, hasta una concentración final del 0,01 %. Una vez mezclado el medio y preparadas las placas, éstas se sembraron en estría y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Las placas con los cultivos se exponían a una solución concentrada de amoníaco, colocando bajo la tapa de la placa una tira de papel de filtro impregnada con unas gotas de la mencionada solución.

Se consideraron como fosfatasa positivas las cepas cuyas colonias adquirían un color rosa intenso y como negativas aquellas cuyo color no variaba.

Producción de gelatinasa:

Se llevó a cabo esta prueba en CHAPMAN-STONE medium (Difco) por siembra en estría e incubación a 30°C durante 48 horas. Se tomaron como positivas las reacciones con un halo de aclaramiento del medio mayor de dos milímetros, medidos desde el borde de la estría de crecimiento, como débil-

¹ Los resultados referidos a estas últimas propiedades están aún pendientes de publicación.

mente positivas aquellas que presentaban una pequeña zona de aclaramiento parcial inferior a dos milímetros, y como negativas aquellas reacciones en las que no se observaba ningún aclaramiento del medio de cultivo.

Producción de lisozima:

El ensayo se llevó a cabo según la técnica de ROSKEY y HAMDY¹⁹, utilizando como substrato lysozyme substrate (Difco), y haciendo las lecturas a las 48 horas. Esta técnica es una modificación de las descritas por GROSSGEBAUER *et al.*⁸ y JAY¹¹. Se preparaban 100 mililitros de una suspensión de lysozyme substrate en tampón fosfato 0,06 M (pH 6,2), a una concentración de 1 mg/ml. Esta suspensión se trataba por el calor (una atmósfera durante 15 minutos) y se enfriaba hasta 55°C. Paralelamente, se preparaban 400 ml de agar BHI (Difco), que se esterilizaban también a una atmósfera durante 15 minutos, y se enfriaban hasta 55°C (pH de este medio 7,4). Suspensión y medio se mezclaban y la mezcla se distribuía en placas de Petri. La siembra de la cepa a ensayar, crecida en caldo BHI, se realizaba por estría, y la incubación se llevaba a cabo a 37°C durante 48 horas. Para la interpretación de los resultados de esta prueba, se tuvo en cuenta tanto la amplitud de la zona de lisis como la intensidad de la misma. Se consideraron como positivas de producción de lisozima las cepas que, presentando una lisis clara en cuanto a intensidad, la amplitud de la misma era mayor de 2 mm, medidos desde el borde de la estría de crecimiento, como débilmente positivas aquéllas en que el halo de aclaramiento era menor de 2 mm y como negativas las que no presentaban aclaramiento.

Reacción en yema de huevo:

Se ensayó en el medio de BAIRD-PARKER (Oxoid) contenido 5 % de la emulsión yema de huevo-telurito potásico (Oxoid) en placas de Petri de fondo plano de 10 cm de diámetro con 10 ml de medio por placa. Las siembras se realizaron depositando en superficie un asa de un cultivo en caldo BHI (Difco) de 18 horas. Las placas sembradas se incubaron a 37°C durante 48 horas. Las lecturas se realizaron a las 24 y 48 horas. Se consideraron como positivas las cepas que presentaban: a) únicamente aclaramiento del medio, b) aclaramiento primero y posteriormente opacidad y opalescencia o brillo superficial. Y como negativas las que no presentaban ninguno de estos fenómenos. En todos los experimentos se incluyeron cepas control.

RESULTADOS

En la Tabla I se indican los resultados obtenidos en las pruebas de producción de fosfatasa. Como puede verse, 52 (91,2 %) de las cepas estudiadas producían este enzima y 5 (8,8 %) fueron negativas. También en la men-

cionada tabla se recogen los resultados de las pruebas de producción de gelatinasa: 41 (71,9 %) de las cepas fueron positivas en esta prueba y 10 (17,6 %) negativas. Las seis restantes (10,5 %) se clasificaron como débilmente positivas, ya que su actividad era escasa. Por lo que se refiere a la producción de lisozima, 48 cepas (84,2 %) fueron positivas, 4 (7 %) negativas y 5 (8,8 %) mostraron una pequeña actividad y fueron consideradas como débilmente positivas.

TABLA I
Resultados de las pruebas de producción de fosfatasa, gelatinasa y lisozima

	Cepas positivas	Cepas débilmente positivas ¹	Cepas negativas
Fosfatasa	52 (91,2)*		5 (8,8)
Gelatinasa	41 (71,9)	6 (10,5)	10 (17,6)
Lisozima	48 (84,2)	5 (8,8)	4 (7,0)

¹ Halo de aclaramiento menor de 2 mm medidos desde el borde de la estría de crecimiento.

* Las cifras entre paréntesis indican %.

En la Tabla II se presentan los resultados referidos a la reacción en yema de huevo en el medio de BAIRD-PARKER. De las 57 cepas estudiadas, sólo 26 (45,6 %) producían esta reacción. De estas cepas positivas, 10 presentaban únicamente aclaramiento del medio alrededor de la zona de crecimiento, y 16 opacidad y opalescencia o brillo superficial, además del aclaramiento inicial. El diámetro del halo de aclaramiento fue muy variable de unas cepas a otras, oscilando entre alrededor de 1 mm, medido desde el borde de la zona de aclaramiento, hasta 3,5-4 mm. La relación entre el diámetro del halo de aclaramiento y el de opacidad, surgido posteriormente, fue muy variable en las diferentes cepas.

TABLA II
Reacción en yema de huevo en el medio de Baird-Parker

	Cepas positivas	Cepas negativas
Positivas aclaramiento	Positivas aclaramiento, opacidad y brillo superficial	Total positivas
10	16	26 (45,6)*
		31 (54,4)

* Las cifras entre paréntesis indican %.

DISCUSION

En la Tabla III se esquematizan las relaciones de los resultados obtenidos en la prueba de la fosfatasa con los obtenidos en la prueba de la coagulasa, de la DNAsa termostable y de la sensibilidad a la lisostafina, respectivamente. Como puede observarse, las cepas fosfatasa negativas se corresponden también con actividades mínimas en la prueba de la coagulasa, con resultados negativos en la prueba de la termonucleasa y con escasa sensibilidad a la lisostafina. En cambio, las cepas fosfatas positivas, si bien, por lo general, corresponden a actividades máximas en la prueba de la coagulasa, a resultados positivos en la prueba de la DNAsa termostable y a máxima sensibilidad a la lisostafina, también incluyen algunas cepas con poca actividad coagulasa, DNAsa termostable negativas y poco sensibles a la lisostafina. Cabe concluir, por lo tanto, de estos resultados, que aun existiendo una estrecha relación entre producción de fosfatasa y producción de coagulasa, de DNAsa termostable y sensibilidad a la lisostafina, propiedades estas últimas más características de *S. aureus*, esta relación no es absoluta.

TABLA III
Relación entre la producción de fosfatasa y la producción de coagulasa, DNAsa termostable y la sensibilidad a la lisostafina

Producción de fosfatasa	Producción de coagulasa	Producción de DNAsa termostable	Sensibilidad a la lisostafina ¹
52 +	40 4+	47 +	49 MS
	7 3+	1 ±	1 Int.
	4 2+	4 -	2 PS
	1 1+		
5 -	3 2+	5 -	4 PS
	2 1+		1 Int.

¹ MS = Muy sensibles.

PS = Poco sensibles.

Int. = De sensibilidad intermedia.

Un examen de las revisiones de ABRAMSON², y de MINOR y MARTH¹⁶, en lo que se refiere a la producción de fosfatasa por parte de estafilococos de diversos orígenes permite señalar que esta propiedad no puede considerarse como indicativa de patogenicidad, si bien el porcentaje de estafilococos coagulasa positivos productores de fosfatasa es muy superior al porcentaje de estafilococos coagulasa negativos productores de este enzima.

Por lo que se refiere a estafilococos de origen animal, de los trabajos publicados parece posible llegar a una conclusión similar. BROWN *et al.*⁵, estudian estafilococos aislados de muestras de leche de ganado vacuno: todas las cepas identificadas como *S. aureus* (coagulasa positivas) fueron también

fosfatasa positivas, mientras que de las identificadas como *S. epidermidis* (coagulasa negativas) el 22,9 % se clasificaron como productoras débiles de fosfatasa y el 4,7 % como negativas. HAJEK¹⁰, da los resultados referidos a 50 cepas de estafilococos coagulasa positivos aislados de las fosas nasales de diversas especies animales, y clasificados por él como *S. intermedius*. Todas estas cepas eran fosfatasa positivas. WECKBACH y LANGLOIS²², aíslan 303 cepas de estafilococos a partir de muestras de leche. De ellas, el 93,1 % eran coagulasa positivas y el 83,8 % fosfatasa positivas.

En la Tabla IV se relacionan los resultados de las pruebas de producción de gelatinasa con otras propiedades fundamentales en la caracterización de *S. aureus*. Como puede observarse, existe una buena correlación entre producción positiva de gelatinasa y producción de coagulasa, de termonucleasa y sensibilidad en grado máximo a la lisostafina. Ahora bien, la propiedad de producir en grado mínimo este enzima o de no producirlo en absoluto no va correlacionada con una actividad coagulasa y termonucleasa escasas o nulas de las cepas ni con una baja sensibilidad a la lisostafina, como cabría esperar.

TABLA IV
Relación entre la producción de gelatinasa y la producción de coagulasa, de DNAsa termostable y la sensibilidad a la lisostafina

Producción de gelatinasa	Producción de coagulasa	Producción de termonucleasa	Sensibilidad a la lisostafina ¹
41 +	33 4+	38 +	39 MS
	4 3+	1 ±	1 Int.
	3 2+	2 -	1 PS
	1 1+		
6 ±*	5 4+	6 +	6 MS
	1 3+		
10 -	2 4+	6 -	5 PS
	2 3+	4 +	1 Int.
	4 2+		4 MS
	2 1+		

* ± = Débilmente positivas.

¹ MS = Muy sensibles.

PS = Poco sensibles.

Int. = De sensibilidad intermedia.

Considerados de modo absoluto, nuestros resultados (71,9 % de cepas gelatinasa positivas, 10,5 % débilmente positivas y 17,6 % negativas), coinciden de modo bastante preciso con datos de otros autores referidos a estafilococos aislados de casos de mamitis en el ganado vacuno, y de muestras de leche normal, datos que por otra parte, son bastante uniformes. REID y WILSON¹⁸, estudian cepas de estafilococos, aisladas de casos de mamitis aguda, de mamitis crónica y de muestras de leche normal, encontrando que el porcentaje

de cepas que licuaban la gelatina era del 86,7, del 65,5 y del 66,1 %, respectivamente. St. GEORGE *et al.*²⁰, dan los resultados obtenidos con 688 cepas de origen bovino, la mayoría aisladas de leche normal, resultados que indican que el 66 % de las cepas eran gelatinasa positivas. ZEMELMAN y LONGERI²⁵, dan porcentajes de cepas licuadoras de la gelatina del 75 % y del 16 % para estafilococos coagulasa positivos y coagulasa negativos, respectivamente. Todas las cepas, en total 775, habían sido aisladas a partir de leche cruda. OLSON *et al.*¹⁷, estudian 139 cepas de estafilococos coagulasa positivos aislados de casos de mamitis aguda y 18 de mamitis crónica. En el primer grupo de cepas, el porcentaje de gelatinasa positivas era del 76,9 %, y en el segundo del 100 %.

Porcentajes más bajos de cepas gelatinasa positivas han sido encontrados también por otros autores. JOSHI y DALE¹³ señalan que de 154 cepas de estafilococos coagulasa positivos aislados de mamitis bovinas, el 46 % eran gelatinasa positivas, y que de 24 cepas coagulasa negativas sólo el 8 % eran gelatinasa positivas. WECKBACH y LANGLOIS²² dan un porcentaje del 43,2 % de cepas gelatinasa positivas. Su estudio se refiere a 303 cepas de estafilococos aislados de muestras de leche, de las que el 93,1 % eran coagulasa positivas.

La Tabla V muestra las relaciones establecidas entre la producción de lisozima y la producción de coagulasa, de DNAsa termostable y sensibilidad a la lisostafina. En líneas generales, las cepas lisozima positivas son también cepas productoras de coagulasa en grado máximo, termonucleasa positivas y muy sensibles a la lisostafina, mientras que las lisozima negativas muestran una menor actividad coagulasa, son termonucleasa negativas y poco sensibles a la lisostafina.

TABLA V
Relación entre la producción de lisozima y la producción de coagulasa, de DNAsa termostable y sensibilidad a la lisostafina

Producción de lisozima	Producción de coagulasa	Producción de termonucleasa	Sensibilidad a la lisostafina ¹
48 +	40 4+	47 +	47 MS
	6 3+	1 -	1 PS
	1 2+		
	1 1+		
5 ±	4 2+	1 ±	1 MS
	1 1+	4 -	1 Int. 3 PS
4 -	1 3+	4 -	1 MS
	2 2+		1 Int.
	1 1+		2 PS

¹ MS = Muy sensibles.

PS = Poco sensibles.

Int. = De sensibilidad intermedia.

Los datos sobre producción de lisozima que pueden encontrarse en la bibliografía sobre el tema son, como los referidos a otros enzimas, por lo general diversos y aún en algunos casos contradictorios. Predominan, sin embargo, los trabajos en los que los resultados apoyan la tesis de que la producción de lisozima es mucho más frecuente en estafilococos coagulasa positivos que en coagulasa negativos, y que, por tanto, existe una razonable correlación entre la producción de este enzima y la patogenicidad de las cepas.

Por lo que se refiere a los estafilococos aislados de mamitis en el ganado vacuno, UNTERMANN *et al.*²¹ señalan que de 120 cepas de estafilococos coagulasa positivos el 99 % eran productores de lisozima. WECKBACH y LANGLOIS²² encuentran que el porcentaje de lisozima positivas en sus 303 cepas de estafilococos aislados de leche era del 88,1 %.

Por lo que se refiere a estafilococos de diverso origen, principalmente humano, entre los trabajos que apoyan la tesis antes mencionada de que la producción de lisozima va unida, generalmente, a la producción de coagulasa, pueden citarse los de JAY^{11,12}, GROSSGEBAUER *et al.*⁸, ROSKEY y HAMDY¹⁹ y HAJEK¹⁰.

En la Tabla II se recogen los resultados de las pruebas de crecimiento en medio con yema de huevo y en la Tabla IV se relacionan los resultados agrupados (cepas yema de huevo positivas y negativas) con la producción de coagulasa, de termonucleasa y sensibilidad a la lisostafina. Dos aspectos merecen ser analizados: en primer lugar, el porcentaje encontrado de cepas yema de huevo positivas y negativas, y en segundo, la relación existente entre esta propiedad y las señaladas anteriormente. En relación con el primero de estos aspectos, destaca el escaso porcentaje de cepas yema de huevo positivas (45,6 %) por nosotros encontrado. Una revisión de la bibliografía sobre esta propiedad de los estafilococos permite concluir que, en general, los estafilococos coagulasa positivos son a su vez yema de huevo positivos, mientras que en los coagulasa negativos predominan los yema de huevo negativas. No faltan tampoco trabajos que registran porcentajes bajos de cepas yema de huevo positivas entre estafilococos coagulasa positivos. REID y WILSON¹⁸ indican que el 73,3 % de las cepas de estafilococos aisladas de casos de mamitis aguda en el ganado vacuno eran yema de huevo positivas, y sólo el 7,7 % de las cepas aisladas de ubres normales. ABO-ELNAGA y KANDLER¹ señalan que únicamente 5 de 69 cepas de estafilococos coagulasa negativos de origen bovino eran yema de huevo positivas, mientras que 93 de 97 cepas coagulasa positivas de este mismo origen daban positiva esta reacción. BROWN *et al.*⁵ dan cuenta en su trabajo de que el 77 % de 43 cepas de estafilococos coagulasa positivos aislados de la ubre en el ganado vacuno eran yema de huevo positivas, mientras que sólo el 11 % de 145 cepas de estafilococos coagulasa negativos del mismo origen mostraban esta propiedad. HAJEK y MARSALEK⁹ estudian 92 cepas de estafilococos coagulasa positivos aislados de casos de mamitis aguda

en el ganado vacuno, comprobando que el 77,2 % de estas cepas daban positiva la reacción en yema de huevo. Por el contrario, los mismos autores dan los datos de 80 cepas (de las que el 97,5 % eran coagulasa positivas) aisladas de las fosas nasales de ganado vacuno, con sólo 21,3 % de yema de huevo positivas. JAY¹² estudia 235 cepas de estafilococos coagulasa positivos, de los que el 87,8 % eran yema de huevo positivos y 57 cepas coagulasa negativas, de las que sólo el 12,3 % eran positivas. OLSON *et al.*¹⁷, indican que de 139 cepas de *S. aureus* coagulasa positivas aisladas de casos de mamitis aguda, únicamente dos dieron negativa la reacción en yema de huevo, y que de 18 cepas también coagulasa positivas aisladas de mamitis crónicas sólo tres eran negativas.

Los trabajos mencionados hasta ahora apoyan la idea de que un alto porcentaje de estafilococos coagulasa positivos son también yema de huevo positivos, mientras que el porcentaje entre los coagulasa negativos es mucho menor. No faltan, sin embargo, como ya señalamos antes, trabajos cuyos resultados son bien distintos. WHITE *et al.*²³ ensayan 339 cepas de estafilococos coagulasa positivos aislados de la ubre de vacas, encontrando que sólo siete de estas cepas eran yema de huevo positivas. KOSKITALS y MILLING¹⁴ estudiaron 150 cepas yema de huevo negativas encontrando que casi el 90 % eran coagulasa positivas. MARADON y OEDING¹⁵ dan los resultados de 146 cepas de estafilococos coagulasa positivos, de los cuales 118 eran de origen bovino y de estos 116 habían sido aislados a partir de pus en casos de mamitis. Las 28 cepas restantes procedían de otras especies animales. El 22 % de las 146 cepas estudiadas eran yema de huevo positivas y el 78 % restante negativas.

Con respecto al segundo de los aspectos mencionados anteriormente, es decir la relación existente entre la propiedad de producir los enzimas que intervienen en la reacción en yema de huevo y la de producir coagulasa,

TABLA VI
Relación entre la reacción en yema de huevo y la producción de coagulasa, de termonucleasa y sensibilidad a la lisostafina

Reacción en yema de huevo	Producción de coagulasa		Producción de termonucleasa	Sensibilidad a la lisostafina ¹
26 +	20	4+	21 +	20 MS
	1	3+	5 -	1 Int.
	3	2+		5 PS
	2	1+		
31 -	20	4+	26 +	29 MS
	6	3+	1 ±	1 Int.
	4	2+	4 -	1 PS
	1	1+		

¹ MS = Muy sensibles.

PS = Poco sensibles.

Int. = De sensibilidad intermedia.

termonucleasa y ser sensibles a la lisis por lisostafina, un examen de la Tabla VI permite concluir que no puede establecerse ningún tipo de relación. En los trabajos antes mencionados pueden encontrarse datos sobre las relaciones existentes entre la producción de coagulasa y la reacción en yema de huevo.

RESUMEN

En este trabajo se da cuenta de la capacidad de producción de fosfatasa, de gelatinasa y de lisozima, así como de los enzimas que determinan la reacción en yema de huevo, por parte de 57 cepas de estafilococos aisladas de casos de mamitis clínicas y subclínicas en el ganado vacuno. Estas propiedades enzimáticas se relacionan con la producción de coagulasa y de DNase termostable, así como con la sensibilidad a la lisis por lisostafina.

Un porcentaje alto de las cepas estudiadas producían fosfatasa (el 91,2 %), gelatinasa (el 82,4 %) y lisozima (el 93 %). Comparadas estas propiedades con la producción de coagulasa, termonucleasa y sensibilidad a la lisostafina, se ha encontrado una relación más estrecha con la producción de lisozima y de fosfatasa que con la de gelatinasa.

Por lo que se refiere a la reacción en medios con yema de huevo, el 54,4 % de las cepas no producían esta reacción, por lo que no ha sido posible establecer ningún tipo de relación entre esta propiedad y la producción de coagulasa, de termonucleasa y sensibilidad a la lisostafina.

SUMMARY

This work deals with the study of 57 strains of staphylococci which were isolated from clinical and subclinical cases of mastitis in cattle with special interest in the production of phosphatase, gelatinase and lysozyme. Egg yolk reaction is also studied. Results obtained are related to the production of coagulase, thermostable DNAse and sensitivity to lysostaphin.

A high percentage of the studied staphylococci produced phosphatase (91,2 %), gelatinase (84,4 %) and lysozyme (93 %). The comparison among the above properties and the production of coagulase, thermonuclease and sensitivity to lysostaphin shows that relation is better with lysozyme and phosphatase than with gelatinase.

It has not been possible to find any relation between egg yolk reaction and production of coagulase, thermonuclease and lysostaphin sensitivity: only 45,6 % of the strains were classified as egg yolk positive.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ABO-ELNAGA, I. y KANDLER, D. (1965).—Zur Charakterisierung der in Milch verbreiteten Staphylokokken. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.*, **196**: 438-451.
- 2) ABRAMSON, C. (1972).—Staphylococcal enzymes. En *The Staphylococci*, J. O. COHEN (editor), John Wiley, New York, N. Y., 187-248.
- 3) ANDERSON, J. C. (1976).—Mechanisms of staphylococcal virulence in relation to bovine mastitis. *Brit. Vet. J.*, **132**: 229-245.
- 4) BARBER, M. y KUPER, S. W. A. (1951).—Identification of *Staphylococcus pyogenes* by the phosphatase reaction. *J. Pathol. Bacteriol.*, **63**: 65-68.
- 5) BROWN, R. W., SANDVIK, O., SCHERER, R. K. y ROSE, D. L. (1967).—Differentiation of strains of *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine udders. *J. Gen. Microbiol.*, **47**: 273-287.
- 6) GARCIA LOPEZ, M. L. y MORENO GARCIA, B. (1979).—Los estafilococos como agentes de mamitis en el ganado vacuno. Véase este mismo número de *Anales de la Facultad de Veterinaria de León*, 83-93.
- 7) GEMMEL, C. G., THELESTAM, M. y WADSTROM, T. (1976).—Toxinogenicity of coagulase-negative staphylococci. En *Staphylococci and staphylococcal diseases*, Proc. of III International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections, J. JELJASZEWCZ (editor), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-N. York, 133-136.
- 8) GROSSGEBAUER, R., SCHMIDT, B. y LANGMAACK, M. (1968).—Lysozyme production as an aid for identification of potentially pathogenic strains of staphylococci. *Appl. Microbiol.*, **16**: 1.745-1.747.
- 9) HAJEK, V. y MARSALEK, E. (1969).—A study of staphylococci of bovine origin: *Staphylococcus aureus* var. *bovis*. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.*, **209**: 154-160.
- 10) HAJEK, V. (1976).—*Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **26**: 401-408.
- 11) JAY, J. M. (1966).—Production of lysozyme by staphylococci and its correlation with three other extracellular substances. *J. Bacteriol.*, **91**: 1.804-1.810.
- 12) JAY, J. M. (1970).—Effect of borate on the growth of coagulase-positive and coagulase-negative staphylococci. *Infect. Immun.*, **1**: 78-79.
- 13) JOSHI, N. y DALE, D. G. (1963).—Some microbiological aspects of staphylococcal mastitis. *Can. J. Comp. Med.*, **27**: 61-68.
- 14) KOSKITALS, L. D. y MILLING, M. E. (1968).—Lack of correlation between egg yolk reaction in staphylococcus medium 110 supplemented with egg yolk and coagulase activity of staphylococci isolated from cheese. *Can. J. Microbiol.*, **15**: 132-133.
- 15) MARADON, J. L. y OEDING, P. (1966).—Investigations on animal *Staphylococcus aureus* strains. I. Biochemical characteristics and phage-typing. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **67**: 149-156.
- 16) MINOR, T. E. y MARTH, E. H. (1976).—*Staphylococci and their significance in foods*. Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, 53-77.
- 17) OLSON, J. C. (Jr.), CASMAN, E. P., BAER, E. F. y STONE, J. E. (1970).—Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* cultures isolated from acute cases of bovine mastitis. *Appl. Microbiol.*, **20** (4): 605-607.
- 18) REID, W. B. y WILSON, J. B. (1959).—A study of the staphylococci associated with the bovine udder. *Am. J. Vet. Res.*, **20**: 825-831.
- 19) ROSKEY, C. T. y HAMDY, M. K. (1972).—Bruised poultry tissue as a possible source of staphylococcal infection. *Appl. Microbiol.*, **23**: 683-687.
- 20) ST. GEORGE, C., RUSSELL, K. B. y WILSON, J. B. (1962).—Characteristics of staphylococci from bovine milk. *J. Infect. Dis.*, **110**: 75-79.
- 21) UTERMANN, F., KUSCH, D. y LUPKE, H. (1973).—Zur Bedeutung der Mastitis-Staphylokokken als Ursache von Lebensmittelvergiftungen. *Milchwissenschaft*, **28**: 686-688.
- 22) WECKBACH, L. S. y LANGLOIS, B. G. (1976).—Classification by numerical taxonomy of staphylococci isolated from the bovine udder. *J. Milk Food Technol.*, **39** (4): 246-249.
- 23) WHITE, F., RATTRAY, E. A. S. y DAVIDSON, D. J. (1963).—Sensitivity to antibiotics and biochemical activities of serotypes of bovine staphylococci. *J. Comp. Pathol.*, **73**: 21-26.
- 24) WISEMAN, G. M. (1975).—The hemolysins of *Staphylococcus aureus*. *Bacteriol. Rev.*, **39** (4): 317-344.
- 25) ZEMELMAN, R. y LONGERI, L. (1965).—Characterization of staphylococci isolated from raw milk. *Appl. Microbiol.*, **13**: 167-170.