

LOS ESTAFILOCOCOS COMO AGENTES DE MAMITIS EN EL GANADO VACUNO

Por M. L. García López y
B. Moreno García

INTRODUCCION

Aún cuando la información con que se cuenta sobre la participación de los estafilococos en las mamitis del ganado vacuno en los diferentes países es muy variable, existe acuerdo general en el sentido de que se trata de uno de los agentes más frecuentes e importantes. En nuestro país, la falta de datos sobre el papel relativo de los estafilococos como agentes etiológicos de estas enfermedades y, en general, de los otros microorganismos es casi absoluta.

En un proyecto de investigación que se lleva a cabo en nuestro laboratorio, cuyos objetivos finales son la caracterización bioquímica y fisiológica de los estafilococos productores de mamitis y el estudio de su capacidad de producción de enterotoxinas y, consiguientemente, de intoxicaciones alimentarias humanas, se hizo necesario inicialmente contar con un número adecuado de cepas. A este fin, se llevó a cabo la toma de muestras de leche procedentes de vacas que presentaban síntomas de mamitis clínica y de otras que, aún no presentando síntomas, daban positiva una prueba rápida de mamitis subclínica, así como el aislamiento e identificación de los agentes causales con especial atención a los estafilococos.

Con los resultados de esta primera fase del proyecto a que nos estamos refiriendo, se obtuvo una información de la participación relativa de los estafilococos en las mamitis clínicas y subclínicas del ganado vacuno, información de la que se da cuenta en este trabajo.

MATERIAL Y METODOS

Toma de muestras:

Las muestras estudiadas correspondían a formas diversas de mamitis, tanto clínicas como subclínicas. En las mamitis clínicas, la leche siempre presentaba modificaciones de sus caracteres organolépticos. En algunos de estos casos los animales habían sido tratados. Las mamitis subclínicas fueron diagnosticadas por el método rápido denominado «California Mastitis Test», utilizando el reactivo y material suministrados por la firma Especialidades Drosán, S. A. Se consideraron como sospechosos de mamitis subclínica únicamente los animales con reacciones claramente positivas y sólo las muestras de estos animales fueron sometidas a análisis bacteriológico.

Todas las muestras de mamitis subclínicas y la mayoría de mamitis clínicas fueron recogidas por nosotros en los propios establecimientos. En alguna ocasión, las muestras de mamitis clínicas fueron traídas al laboratorio por veterinarios clínicos instruidos previamente sobre la forma de la toma de muestras.

En la Tabla I se indica la procedencia de las muestras, el número de muestras estudiadas y el número de animales y establecimientos de los que procedían. En la Fig. 1 se señalan las zonas de muestreo. En la zona de Montaña predominaba la raza parda alpina, en la Ribera la frisona y en El Bierzo se muestrearon animales de ambas razas. En cuanto a las condiciones higiénicas de los establecimientos y la forma de ordeño, en la montaña el ordeño era a mano y las condiciones higiénicas muy deficientes. Por lo que se refiere a la comarca de El Bierzo, las condiciones higiénicas eran variables, así como la forma de ordeño. Finalmente, en la zona de Ribera, las condiciones higiénicas de los establecimientos eran, por lo general, buenas y el ordeño mecánico. La edad de las vacas muestreadas era diversa, así como también la fase de la lactación y la época del año.

En general, cada muestra procedía de un animal, aunque en algún caso se contó con dos o más muestras de un mismo animal procedentes de dos o más cuarterones afectados. El tamaño de la muestra fue variable, aunque por lo general oscilaba entre 10 y 15 ml.

La toma de muestras, su traslado al laboratorio, su conservación y prepa-

TABLA I
Procedencia de las muestras

Procedencia	N.º de muestras	N.º de animales	N.º de rebaños
Zona de Montaña	77	67	24
Zona de Ribera	69	57	50
Comarca de El Bierzo	22	19	11
TOTAL	168	143	85

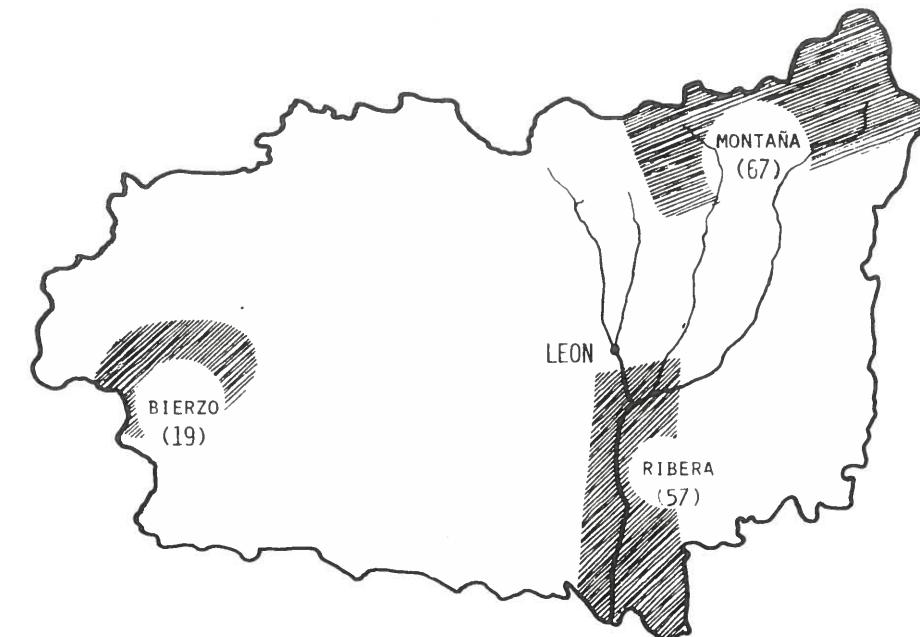


Figura 1.-Zonas de muestreo. El número entre paréntesis indica los animales muestreados en cada zona.

ración previa a la siembra y la propia siembra se realizaron según las instrucciones del National Mastitis Council¹¹. En todos los casos, las muestras se recogían en frascos estériles con tapón de rosca, previa limpieza de la mama con agua tibia y secado con servilleta de papel y final desinfección del extremo del pezón con alcohol. Se tenía buen cuidado también en el lavado con una solución desinfectante de las manos de la persona que tomaba las muestras. Al objeto de arrastrar en lo posible la flora existente en el conducto del pezón, se despreciaron siempre los primeros chorros.

Las muestras se llevaban al laboratorio en una nevera portátil y, una vez en él, se conservaban refrigeradas. Las siembras se realizaban lo antes posible y siempre dentro de las 24 horas. Las muestras refrigeradas se mantenían a 37°C durante 5-10 minutos y se agitaban suavemente antes de la siembra. En ningún caso fueron incubadas ni centrifugadas.

Cultivo y aislamiento:

Los medios utilizados para el aislamiento de las cepas fueron diversos con las primeras muestras: mannitol salt agar, CHAPMAN-STONE medium, *Staphylococcus* medium 110, BAIRD-PARKER medium y agar sangre. Los medios citados fueron suministrados por la firma Difco, salvo el medio de BAIRD-PARKER que

era de la firma Oxoid y el agar sangre que fue preparado en el propio laboratorio utilizando triptose blood agar base (Difco) al que se añadía 5 % de sangre de vacuno joven citratada. Por razones de experiencia, de economía y prácticas, se eligieron para el resto de las muestras únicamente dos medios: el de BAIRD-PARKER, en razón de sus mejores resultados y la más fácil identificación de las colonias, y el agar sangre por obtenerse en él una buena información de la flora bacteriana presente en la muestra.

De cada muestra se sembraba por extensión en superficie en cada uno de los medios 0,1 ml aproximadamente por placa. Las siembras se incubaban a 37°C y la observación se realizaba a las 24 horas y en los días subsiguientes. Las siembras en las que aparecían cultivos puros con colonias que presentaban caracteres propios de los estafilococos y que pertenecían a cocos Gram positivos catalasa positivos, y aquellas otras en las que, aun tratándose de un cultivo mixto, las colonias sospechosas de ser estafilococos eran predominantes o abundantes y la mamitis no podía atribuirse a los otros gérmenes presentes, se consideraban como positivas de probable mamitis estafilocócica. Las cepas correspondientes se seleccionaron para posterior estudio. En los reducidos casos en que se aisló más de una cepa de un mismo animal por haber contado con muestras de más de un cuarterón mamario, se eligió solamente una de las cepas aisladas. Las siembras de las que se obtuvieron cultivos mixtos en los que las colonias sospechosas de ser estafilococos por corresponder a cocos Gram positivos catalasa positivos estaban presentes en número no significativo se consideraron como negativas de mamitis estafilocócica y estas cepas no fueron seleccionadas para posterior estudio. Número no significativo indica un número muy reducido de colonias (< 5-10 por placa), procedentes quizás del conducto del pezón o de una contaminación. Se tuvo también en cuenta en estos casos si los otros gérmenes presentes en las siembras podían considerarse como los agentes de la mamitis, lo que ocurría frecuentemente, y el hecho de si los animales habían sido o no tratados. También se consideraron como negativas de mamitis estafilocócica las siembras en las que las colonias no pertenecían a cocos Gram positivos catalasa positivos. Finalmente, las siembras en las que no se observó ningún tipo de crecimiento bacteriano se consideraron igualmente como negativas.

De las siembras positivas de probable mamitis estafilocócica se tomaba una colonia representativa y se sembraba en caldo BHI (Difco) y en agar BHI (Difco) inclinado. Los cultivos se incubaban a 37°C durante 18-24 horas y se utilizaban para la prueba de fermentación anaeróbica de la glucosa.

Tinción por el método de Gram:

Esta tinción se llevó a cabo con reactivos y por la técnica aconsejada por la firma Difco.

Prueba de la catalasa:

Se realizó depositando gotas de peróxido de hidrógeno al 3 % p/v sobre colonias en placas de agar triptona extracto de levadura, con un 1 % de glucosa, incubadas en aerobiosis, y observando la formación de burbujas.

Se incluyó la glucosa al objeto de excluir posibles cepas de pediococos^{2,6}.

Fermentación anaeróbica de la glucosa:

Se realizó por la técnica recomendada por el Subcommittee on Taxonomy of Staphylococci and Micrococci¹⁶. Se cuidó especialmente el llenado de los tubos hasta 2/3 de su longitud, la esterilización del medio (20 minutos a 115°C) y la siembra de un inóculo importante hasta el fondo del tubo. Con cada cepa se sembraron tres tubos: dos de ellos se incubaron en condiciones de anaerobiosis, uno cubierto con una capa de parafina estéril y otro en una jarra GasPak (BBL) de cultivo de anaerobios, y el tercero en aerobiosis. En los tres casos, el período de incubación fue de cinco días a 37°C.

Los cultivos que presentaban todo el medio amarillo se consideraban positivos de fermentación de la glucosa (caso de los tubos incubados en condiciones de anaerobiosis) o de utilización oxidativa de este azúcar (caso de los incubados en aerobiosis). Y como negativos aquellos en que el medio no había cambiado su color violeta original. En un número reducido de casos, el cambio de color en los tubos incubados en anaerobiosis era sólo parcial (amarillo rojizo en todo el tubo, pH final a los cinco días entre 5,8 y 6,1) y estas cepas se consideraron como fermentadoras débiles de la glucosa. En los tubos incubados en aerobiosis, las cepas clasificadas como débilmente positivas correspondían a un cambio de color al amarillo sólo en parte del tubo, generalmente en la superior. En los casos de las cepas calificadas como fermentadoras débiles de la glucosa o débilmente positivas, las pruebas se repitieron para mayor seguridad.

Conservación de las cepas:

Una vez realizadas las pruebas de utilización de la glucosa, las cepas se pasaron a cultivos en agar BHI inclinado para su utilización en las pruebas inmediatas y se liofilizaron para su conservación a largo plazo. En el caso de las cepas en agar inclinado se realizaron resiembras mensuales.

RESULTADOS

En la Tabla I se indican las muestras estudiadas y sus procedencias. En total, se han estudiado 168 muestras procedentes de 143 animales en 85 establejos. De las 168 muestras estudiadas, 130 procedían de otros tantos animales muestreados en un solo cuarterón, y las 38 restantes de 13 animales

TABLA II
Casos de mamitis estudiados y resultados del análisis bacteriológico

Forma de mamitis	Número de animales muestreados	Positivos de mamitis estafilocócica		Negativos de mamitis estafilocócica		Crecimiento negativo
		Cultivos puros	Cultivos mixtos (1)	Cultivos mixtos (2)	Positivos de gérmenes diversos	
Mamitis clínicas no tratadas	62 (43,3)*	19	9	8	19	7
Mamitis clínicas tratadas	26 (18,2)	4	—	2	10	10
Mamitis subclínicas	55 (38,5)	25	—	6	12	12
TOTAL	143 (100)	48	9	16	41	29

(1) Estafilococos predominantes o abundantes.

(2) Cocos Gram + catalasa + en número no significativo.

* Las cifras entre paréntesis indican porcentajes.

muestreados en dos o más cuarterones. Los resultados de la Tabla II no se refieren a las muestras sino a los animales muestreados, ya que en los casos de siembras de más de un cuarterón de un mismo animal únicamente se ha contabilizado una de las siembras. Como puede observarse en la mencionada Tabla II, de los 143 casos de mamitis estudiados, 88 (61,5 %) correspondían a mamitis clínicas y 55 (38,5 %) a mamitis subclínicas. En 57 (39,9 %) de los animales estudiados, la causa de la mamitis pudo ser atribuida a estafilococos, ya que o bien se obtuvieron estos gérmenes en cultivo puro (en 48 de los casos) o las colonias a ellos pertenecientes eran predominantes o abundantes en los cultivos mixtos (en 9 de los casos). Se asumió en un principio que siendo estas 57 cepas cocos agrupados en racimos, Gram positivos, catalasa positivos, y agentes de mamitis, podían ser incluidas en los géneros *Staphylococcus* o *Micrococcus*³. Teniendo en cuenta los datos de fermentación anaeróbica de la glucosa (véase más adelante), se designa a estos gérmenes ya en la Tabla II y en lo que sigue como estafilococos. En otros 16 casos se comprobó la presencia de cocos Gram positivos, catalasa positivos, de morfología semejante a los anteriores, pero su escaso número en relación con el resto de la flora presente no permitió considerar a estas cepas como los agentes etiológicos del proceso. De los restantes casos, en 41 se puso en evidencia la presencia de una flora constituida por formas diversas (bacilos Gram positivos, bacilos Gram negativos, cocos Gram positivos catalasa negativos, etc.), frecuentemente en cultivo puro, y en 29 no se obtuvo ningún tipo de crecimiento bacteriano.

En la Tabla III se recogen los resultados obtenidos en las pruebas de utilización de la glucosa. Como puede verse, de las 57 cepas estudiadas 50 (87,7 %) fermentaban este azúcar en anaerobiosis, seis (10,5 %) fueron calificadas como fermentadoras débiles y una (1,75 %) como no fermentadora. Esta última cepa crecía de modo abundante en anaerobiosis, pero el cambio de color producido fue mínimo (pH final a los cinco días 6,6). Esta misma cepa

TABLA III
Resultados de las pruebas de utilización de la glucosa

	En anaerobiosis	En aerobiosis
Positivas	50 (87,7 %)	56 (98,25 %)
Fermentadoras débiles o débilmente positivas	6* (10,5 %)	1** (1,75 %)
Negativas	1 (1,7 %)	—
TOTAL	57	57

* Cambio de color incompleto: amarillo rojizo en todo el tubo (pH final a los cinco días entre 5,8 y 6).

** Cambio de color al amarillo únicamente en 1/3 del tubo.

utilizaba débilmente la glucosa en aerobiosis frente al resto de las cepas que fueron claramente positivas de utilización oxidativa de este azúcar.

DISCUSION

Como hemos señalado anteriormente, el porcentaje absoluto de mamitis por estafilococos encontrado ha sido del 39,9 %. Este porcentaje debe analizarse teniendo en cuenta el criterio seguido en la interpretación de los resultados de las siembras, así como las circunstancias de que se ha obtenido del estudio tanto de mamitis clínicas como subclínicas, de que cierto número de mamitis clínicas (véase Tabla II) habían sido tratadas antes de la toma de muestras y de que en su estimación se han contabilizado todos los casos de mamitis estudiados (en total 143), aun cuando las siembras fueran negativas o no permitiesen adscribir la mamitis a un agente determinado.

En nuestro país, existen muy pocos trabajos publicados que den cuenta de los porcentajes en que intervienen los diversos agentes productores de mamitis en el ganado vacuno. En una publicación reciente, ROJO VÁZQUEZ *et al.*¹³ señalan que de 60 casos de vacas diagnosticadas de mamitis subclínica por recuento celular, en 49 se aislaron estafilococos. VENDRELL BALLONGA¹⁸, en una campaña de lucha contra la mastitis bovina en el trienio 1975-77, realizada en unos 3.000 animales, da cuenta de 1.738 análisis microbiológicos positivos, señalando una frecuencia de participación de los estafilococos del 53 %.

En otros países, el porcentaje de participación de los estafilococos en infecciones mamarias del ganado vacuno es variable, aunque casi siempre elevado. Existen pocos trabajos, sin embargo, que den datos concretos referidos a mamitis clínicas o subclínicas. NARDELLI *et al.*¹⁰, en Italia, obtienen porcentajes de participación de los estafilococos del 25,5 % para las mamitis subclínicas y del 8,2 % para las clínicas.

Son más abundantes los trabajos que señalan el % de infección por estafilococos en rebaños o grupos amplios de animales. Así, WALLACE *et al.*¹⁹, en Hawaii, en un rebaño de 1.000 vacas, de las que 108 presentaban mamitis clínicas o subclínicas, aislaron *S. aureus* en el 50 % de los animales estudiados.

dos. PARISI y BALDWIN¹² estudian un rebaño de 55 vacas en Ohio, 21 de las cuales (31,5 %) eliminaban *S. aureus* y sólo siete (12,5 %) presentaban mamitis clínicas. En otro rebaño de 20 animales, encuentran que aproximadamente la mitad estaban infectados. Finalmente, en 920 animales de 14 rebaños detectan los citados autores un % de infección del 16,9 %. Según datos de SCHALM *et al.*¹⁴, las infecciones mamarias por estafilococos en el ganado vacuno en California alcanzan cifras medias del 40 %. En Dinamarca, MADSEN⁸ da los resultados de un estudio de 180.047 muestras de leche, de otros tantos animales, de los que 12,3 % estaban infectados. TERPLAN y ZAADHOF¹⁷, en Alemania, señalan un porcentaje de infección del 41,4 % en 442 vacas por ellos estudiadas. Finalmente, datos de la FIL⁷ indican que de 126.409 muestras de leche estudiadas en Austria durante cuatro años, 26.643 (19,7 %) contenían estafilococos hemolíticos.

Si se tiene en cuenta el número de casos de mamitis clínicas no tratadas, de mamitis clínicas tratadas y de mamitis subclínicas, el porcentaje de diagnóstico de estafilococos fue del 45,2 %, del 15,4 % y del 45,4 %, respectivamente. Resulta evidente de estos datos la influencia decisiva del tratamiento en el aislamiento de estafilococos agentes de mamitis. La influencia del tratamiento se observa también en el número de casos con crecimiento negativo (véase Tabla II).

Un análisis de los resultados teniendo en cuenta la procedencia de las muestras (véase Tabla IV), permite poner de manifiesto el porcentaje muy superior de los estafilococos como agentes de mamitis encontrado en los animales de la zona de Montaña (53,7 %), comparado con los de la zona de Ribera (29,8 %). La explicación a estos resultados quizás haya que encontrarla en las circunstancias de higiene deficiente y raza más rústica de las explotaciones tradicionales de la zona de Montaña. Ciento es también que en este grupo de animales de Montaña más de 2/3 (47 de un total de 67) eran mamitis subclínicas, mientras que en los animales de Ribera no se estudió ninguna mamitis subclínica. SCHALM *et al.*¹⁵ concluyen en su obra sobre mamitis bovinas que la manifestación más común de las mamitis por estafilococos es la

TABLA IV
Casos de mamitis estudiados y diagnósticos de mamitis estafilocócica realizados, según la procedencia de las muestras

Zona	Clínicas no tratadas	Clínicas tratadas	Subclínicas	Total	% de mamitis estafilocócica
Montaña	18 (12)*	2 (2)	47 (22)	67 (36)	53,7
Ribera	37 (15)	20 (2)	0 (0)	57 (17)	29,8
El Bierzo	7 (1)	4 (0)	8 (3)	19 (4)	21,0
TOTAL	62 (28)	26 (4)	55 (25)	143 (57)	39,9

* La primera cifra indica el número de casos estudiados y la cifra entre paréntesis el número de diagnósticos positivos de mamitis estafilocócica.

forma subclínica. Estos resultados también pueden estar influenciados por el hecho de que de las 20 mamitis clínicas estudiadas en los animales de la zona de Montaña, únicamente dos habían sido tratados, mientras que de las 57 estudiadas en los animales de la zona de Ribera lo habían sido 20. Con todo, si consideramos sólo las mamitis clínicas no tratadas en ambos grupos de animales, mientras que en los primeros el porcentaje de mamitis por estafilococos fue del 66,7 % en los segundos fue sólo del 40,5 %.

En cuanto a la eficacia de los medios utilizados en el aislamiento de estafilococos, todas las muestras con las que se obtuvieron cultivos puros en agar sangre, o mixtos en los que predominaban este tipo de gérmenes, también dieron cultivos abundantes en el medio de BAIRD-PARKER. En cambio, con las muestras que producían cultivos mixtos en agar sangre donde las colonias pertenecientes a estafilococos eran escasas, estas colonias no aparecían generalmente en el medio de BAIRD-PARKER. MUNCH-PETERSEN⁹ estudia la eficacia de cuatro medios en el aislamiento de estafilococos a partir de leche normal, encontrando como más eficaces el agar sangre y el medio de BAIRD-PARKER. En cuanto a la eficacia diagnóstica de estos dos medios de cultivo, en el agar sangre fue decisiva en muchos casos la hemólisis, el aspecto, el tamaño y el color de las colonias. Por lo que se refiere al medio de BAIRD-PARKER, deben destacarse dos hechos: el crecimiento en algunos casos de gérmenes no pertenecientes al género *Staphylococcus* y los problemas que se presentan a la hora de asociar el aspecto de las colonias con el mencionado género, fundamentalmente por la inconstancia de la reacción en yema de huevo. En relación con el primero de estos hechos, cabe señalar que hemos constatado en algunos casos el crecimiento en este medio de gérmenes pertenecientes al género *Corynebacterium*, de estreptococos y de bacilos Gram positivos. En ningún caso se comprobó el crecimiento de bacilos Gram negativos. En relación con la especificidad del medio de BAIRD-PARKER, DE WAART *et al.*⁴ señalan que en él pueden crecer formando colonias negras algunos estreptococos del grupo D, micrococos, corinebacterias y enterobacteriáceas, aunque ninguno de estos gérmenes produce aclaramiento del medio. El propio BAIRD-PARKER¹ indica también la posibilidad de crecimiento de levaduras, mohos y bacilos, aunque sus colonias, según él, son fácilmente diferenciables. En un trabajo reciente, WECKBACH y LANGLOIS²⁰ dan cuenta del aislamiento a partir de leche en el medio de BAIRD-PARKER de 303 cepas de cocos Gram positivos, de las que 16 eran estreptococos y el resto estafilococos. El segundo de los hechos antes mencionados se refiere a la irregularidad con que los estafilococos presentan la reacción en yema de huevo, carácter de valor diagnóstico: de las 57 cepas estudiadas por nosotros 31 (54,4 %) no presentaban aclaramiento del medio.

Aun cuando la diferenciación de los géneros *Staphylococcus* y *Micrococcus* está en la actualidad sujeta a controversia, los resultados de la Tabla III no presentan problemas en su interpretación. De las 57 cepas estudiadas, 56

fermentaban la glucosa en anaerobiosis, lo que permitió clasificarlas como pertenecientes al género *Staphylococcus*¹⁶, ya que si bien existen dudas sobre si los cocos Gram positivos, catalasa positivos, que no fermentan la glucosa en anaerobiosis, deben adscribirse siempre al género *Micrococcus*, parece haber acuerdo más general en el sentido de que los que cumplen el criterio clásico de fermentación del mencionado azúcar pueden clasificarse como *Staphylococcus*. La cepa restante fue considerada como posiblemente perteneciente a este mismo género por su capacidad de crecimiento abundante en anaerobiosis⁵.

RESUMEN

En este trabajo se da cuenta del papel de los estafilococos como agentes de mamitis en el ganado vacuno. En total, se han estudiado 143 casos de mamitis, de los que 88 correspondían a mamitis clínicas y 55 a mamitis subclínicas. De los 143 casos estudiados, 57 (39,9 %) fueron atribuidos a estafilococos. Los resultados obtenidos se relacionan con la raza, el tipo de ordeño y las condiciones higiénicas de las explotaciones, así como con el tipo de mamitis, clínica o subclínica, y con el hecho de si los animales habían sido o no tratados antes de la toma de muestras.

Las cepas de estafilococos aisladas cumplen de modo uniforme el criterio taxonómico de la fermentación anaeróbica de la glucosa.

SUMMARY

STAPHYLOCOCCI AS AGENTS OF MASTITIS IN CATTLE

This work deals with the important role of staphylococci as agents of mastitis in cattle. 143 mastitis cases have been studied, of which 88 were clinical mastitis and the remaining 55 subclinical mastitis. 57 (39,9 %) of the total cases studied were attributed to staphylococci. The results obtained are considered in relation with the race, type of milking and farm hygienic conditions, as well as with the type of mastitis and, in some cases, with animal treatments before taking samples. All the strains of isolated staphylococci fermented glucose anaerobically.

BIBLIOGRAFIA

- 1) BAIRD-PARKER, A. C. (1969).—The use of Baird Parker medium for the isolation and enumeration of *Staphylococcus aureus*. En *Isolation methods for microbiologists*. Technical series 3, D. A. SHAPTON y G. W. GOULD (editors), Academic Press, 1-8.
- 2) BAIRD-PARKER, A. C. (1972).—Classification and identification of staphylococci and their resistance to physical agents. En *The Staphylococci*, J. O. COHEN (editor), John Wiley, New York, N. Y., 205-208.
- 3) BUCHANAN, R. E. y GIBBONS, N. E. (1974).—*Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md., 8th edn., 483-489.
- 4) DE WAART, J., MOSEL, D. A. A., TEM BROEKE, R. y VAN DE MOSSIJK, A. (1968).—Enumeration of *Staphylococcus aureus* in foods with special reference to egg yolk reaction and mannitol negative mutants. *J. Appl. Bacteriol.*, **31**: 276-285.
- 5) EVANS, J. B. y KLOOS, W. E. (1972).—Use of shake cultures in a semisolid thioglycolate medium for differentiating staphylococci from micrococci. *Appl. Microbiol.*, **23** (2): 326-331.
- 6) FELTON, E. A., EVANS, J. B. y NIVEN, C. F. (Jr.) (1953).—Production of catalase by Pediococci. *J. Bacteriol.*, **65**: 481-482.
- 7) F. I. L. (1971).—Annual Bulletin. A monograph on bovine mastitis. Part I. *Economics, aetiology and diagnosis*. Secretariat General, Belgique, 37-39.
- 8) MADSEN, J. A. (1968).—*Staphylococcus pyogenes* Penicillin-resistant. *Nord. Vet. Medicin*, **20**: 471-475.
- 9) MUNCH-PETERSEN, E. (1970).—A comparison of four culture media for the demonstration of staphylococci in milk. *Milchwissenschaft*, **25** (1): 36-39.
- 10) NARDELLI, L., BONI, P., MAINETTI, F. y MEDAGLIA, C. (1975).—Stages in the organization of a control programme for bovine mastitis in northern Italy. En *Proc. of the IDF Seminar on Mastitis Control*. 1975, Reading University, April 7-11, F. H. DODD, T. K. GRIFFIN, R. G. KINGWILL (editors), International Dairy Federation, Bulletin, Document 85.
- 11) NATIONAL MASTITIS COUNCIL (1969).—*Microbiological procedures for the diagnosis of bovine mastitis*. National Mastitis Council, Inc., 4-9.
- 12) PARISI, J. T. y BALDWIN, J. N. (1963).—The incidence and persistence of certain strains of *Staphylococcus aureus*. En *Methods in microbiology*, vol. 7B, J. R. NORRIS y D. W. RIBBONS (editors), Academic Press Inc., New York, 1-28.
- 13) ROJO VÁZQUEZ, J., FERNÁNDEZ DÍEZ, M. y ALLER GANCEDO, J. M. (1977).—Aportación al estudio de las mamitis bovinas de tipo subclínico. *An. Fac. Vet. León*, **XXIII** (1), 37-53.
- 14) SCHALM, O. W., CARROLL, E. J. y JAIN, N. C. (1971).—*Bovine mastitis*. Lea & Febiger, Philadelphia, Pa., p. 214.
- 15) SCHALM, O. W., CARROLL, E. J. y JAIN, N. C. (1971).—*Bovine mastitis*. Lea & Febiger, Philadelphia, Pa., p. 216.
- 16) SUBCOMMITTEE ON TAXONOMY OF STAPHYLOCOCCI AND MICROCOCCI (1965).—Minutes of first meeting of Subcommittee on taxonomy of staphylococci and micrococci. *Inter. Bull. Bacteriol. Nomencl. Tax.*, **15**: 107-108.
- 17) TERPLAN, G. y ZAADHOF, K. J. (1969).—Zur diagnostischen und lebensmittelhygienischen Bedeutung von *Staphylococcus aureus* in Kuhmilch. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, **76** (9): 217-221.
- 18) VENDRELL BALLONCA, J. (1978).—Mastitis bovinas: control y profilaxis. *Hygia Pecoris*, **1** (7): 76-131.
- 19) WALLACE, G. D., QUISENBERRY, W. B., TANIMOTO, R. H. y LYND, F. T. (1962).—Bacteriophage type 80/81 staphylococcal infection in human being associated with mastitis in dairy cattle. *Am. J. Public Health*, **52** (8): 1.309-1.317.
- 20) 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.