



Claves Dicotómicas para la Identificación de *Staphylococcus* Aislados de Leche Bovina

M. DEMO,^{1*} J. QUIÑONES,² y V. MARTÍN.²

Facultad de Ciencias. Exactas, Físico-Químicas y Naturales¹ y Facultad de Agronomía y Veterinaria,² Universidad Nacional de Río Cuarto. 5800 Río Cuarto. Argentina.

*Corresponding author: Tel. 058-67-61-13. Fax 54-81-24 -81-69. E.mail: mdemo@Exa.UNRC.EDU.AR

ABSTRACT. Many efforts have been done in order to identify species of Gram positive and catalase positive coccus isolated from raw milk. The aim of this epidemiological observation, was to identify different strains isolated from raw milk according to conventional criteria and to recommend a useful and practical methodology for their correct identification. Gram positive and catalase positive coccus were tested for bacitracin resistance, novobiocin susceptibility, coagulase and others tests (e. g. carbohydrate fermentation). Dichotomic keys were designed to typify *Staphylococcus* species. They were grouped into: Group I, coagulase positive, novobiocin susceptibility; Group II coagulase negative novobiocin resistance; and Group III coagulase negative novobiocin susceptibility. 62 strains were tested and *S. hyicus* (17.7%) was the most isolated species, *S. aureus* (14.5%), *S. sciuri* (12.9%) and *S. haemolyticus* (11.3%) were also isolated. *S. epidermidis* was not isolated.

Key words: dichotomic key, *Staphylococcus*, bacitracin, novobiocin.

RESUMEN. Se han realizado numerosos intentos para identificar las especies de cocos Gram positivos y catalasa positivos aislados de leche cruda bovina. Así el objetivo principal de este trabajo fue clasificar diferentes cepas del género *Staphylococcus* aislados de leche cruda por medio de pruebas convencionales y recomendar una metodología útil y práctica para su correcta identificación. Los cocos Gram positivos y catalasa positivos fueron sometidos a pruebas de resistencia a la bacitracina, sensibilidad a la novobiocina, coagulasa (rápida y lenta) y otras pruebas (p. ej. fermentación de carbohidratos). Para tipificar especies de *Staphylococcus* se diseñaron claves dicotómicas y fueron agrupados como: Grupo I coagulasa positivo-novobiocina sensibles; Grupo II: coagulasa negativo-novobiocina resistentes; y Grupo III coagulasa negativo-novobiocina sensibles. De un total de 62 cepas, las especies de mayor frecuencia de aislamiento fueron: *S. hyicus* (26%), *S. aureus* (14,5 %), *S. sciuri* (12.9%) y *S. haemolyticus* (11.3%). No se aisló *S. epidermidis*.

Palabras claves: claves dicotómicas, *Staphylococcus*, bacitracina, novobiocina.

INTRODUCCION

Universalmente, uno de los microorganismos mayormente aislados de leche corresponde al género *Staphylococcus*, siendo *S. aureus* la especie más frecuentemente asociada a casos clínicos de mastitis.^{35,42} Se han aislado además otras especies patógenas de estafilococos coagulasa positivo y negativo implicadas en casos de mastitis subclínicas tales como: *S. hyicus*, *S. haemolyticus*, *S. intermedius*, *S. xilosus* y *S. simulans* entre otros.^{9,14,24,37}

La novena edición de Bergey's Manual grupo 17 (1994) presenta 24 géneros diferentes de cocos Gram positivos los cuales son filogenética y fenotípicamente muy diversos. Estos pueden diferenciarse en dos grandes grupos: los que poseen catalasa y/o citocromo y los que carecen de las mismas. Dentro del primer grupo se incluye al género *Staphylococcus*. A su vez dentro de éste género se han descrito 32 especies tanto de origen humano como de diferentes animales.^{4, 15, 23}

El género *Staphylococcus* se caracteriza por dividirse

en más de un plano formando paquetes irregulares. Son inmóviles y el diamino ácido presente en el péptidoglucano es L-Lisina. Son anaerobios facultativos, quimiorganotrofos, tienen un metabolismo respiratorio y fermentativo. Son catalasa positivos, presentan citocromos y usualmente oxidasa negativos. Son susceptibles a la lisis por lisostafina y furazolidone y resistentes a la bacitracina. Utilizan carbohidratos y/o aminoácidos como fuente de carbono y energía, tienen requerimientos nutricionales variables.

Usualmente las cepas crecen en presencia de concentraciones de NaCl al 10%.^{4,17, 20, 33, 40}

Ya en la 7ª Ed. de Bergey's Manual (1957), la prueba de la coagulasa lenta separaba al Género *Staphylococcus* en *S. aureus* (coagulasa positivo) y *S. epidermidis* (coagulasa negativo) y además incluía las pruebas de fermentación y oxidación del manitol.³⁶

Hasta la aparición de la 8ª Ed. de Bergey's Manual (1974) las especies coagulasa negativo fueron consideradas indistintamente *S. epidermidis* o *Micrococcus*,⁶ debido a que la taxonomía de los estafilococos no estaba bien defi-



nida.³⁶

El esquema simplificado de Kloos and Schleifer (1975) para el laboratorio de rutina, en la que se incluye la susceptibilidad y resistencia a la novobiocina, permitió identificar por lo menos 16 nuevas especies de estafilococos coagulasa negativo por lo que las especies pertenecientes al género *Staphylococcus* se separan actualmente en grupos utilizando principalmente la prueba de coagulasa y sensibilidad y resistencia a la novobiocina.^{25,26}

Para identificar las diferentes especies de estos grupos se han sugerido diversas pruebas bioquímicas, pero no todas son necesarias para una correcta identificación por lo que la elección de las mismas es un primer paso en la clasificación.^{12,33}

El propósito de este trabajo fue identificar diferentes cepas del género *Staphylococcus* aisladas de leche bovina, por medio de pruebas convencionales y desarrollar una metodología conveniente y práctica para una correcta identificación de las cepas aisladas utilizando claves dicotómicas.

MATERIALES Y METODOS

Se recolectaron 20 ml de leche de la producción de los cuartos derechos e izquierdos de vacas pertenecientes a un tambo del Departamento de Río Cuarto, (Córdoba, Argentina) en forma separada y en condiciones de esterilidad. Estas muestras fueron sembradas en Test de Hotis (0.5 ml de púrpura de bromocresol y 9.5 ml de leche) con el objeto de enriquecer la muestra. Después de 24 h de incubación a 37°C fueron aisladas en placas de Petri conteniendo agar triptosa-cloruro de sodio (8.5%). Al cabo de 24 h a 37°C, se realizó la coloración de Gram a las colonias características. A los cocos Gram positivos se les efectuó la prueba de catalasa. Se analizaron 62 cepas y las pruebas bioquímicas realizadas a los cocos Gram positivos y catalasa positivos fueron las siguientes: resistencia la bacitracina utilizando discos de 0.04 U/ml,¹⁷ sensibilidad a la novobiocina utilizando discos de 5 ug,²⁵ producción de coagulasa ligada¹⁸ y libre,⁷ utilización de diferentes carbohidratos, producción de acetoina, producción de ureasa,⁴¹ producción de pigmentos,¹² crecimiento a diferentes temperaturas, producción de oxidasa, reducción de nitratos, crecimiento en anaerobiosis.³¹

Basándose en las múltiples pruebas establecidas en Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9^o edición,⁴ se diseñaron claves dicotómicas. Se efectuó la separación de grupos por sus caracteres opuestos y se seleccionaron aquellas pruebas que presentaban el 90-95% de positividad o negatividad. Estas claves incluyen especies de origen bovino y de animales de granja y domésticos, por lo que no están contempladas aquellas especies exóticas. Se dividió a los estafilococos en tres grupos: I coagulasa positivo, novobiocina sensible; II coagulasa negativo, novobiocina resistente y III coagulasa negativo novobiocina sensi-

ble,³⁹ que se muestran en las tablas 1, 2 y 3 respectivamente.

Para tipificar especies de *Staphylococcus* del grupo I: coagulasa positivo, novobiocina sensible, se utilizaron las siguientes pruebas: producción de acetoina, crecimiento a 45°C y como pruebas confirmatorias utilización de maltosa y producción de pigmentos. Para el grupo II: coagulasa negativo, novobiocina resistente se realizaron las pruebas de ureasa, reducción de nitratos y utilización de rafinosa, manosa y xilosa, además de las pruebas confirmatorias de producción de acetoina y oxidasa. Para el grupo III: coagulasa negativo, novobiocina sensible las pruebas fueron: producción de oxidasa, crecimiento en aerobiosis y anaerobiosis, crecimiento a 15°C y a 45°C, producción de pigmentos, ureasa, acetoina, reducción de nitratos, utilización de trehalosa y maltosa y como prueba confirmatoria utilización del manitol.

RESULTADOS

Se analizaron 62 cepas de cocos en racimos, Gram positivas, catalasa positivos. A fin de tipificar los géneros se realizaron las pruebas de resistencia a la bacitracina, utilización anaeróbica de la glucosa y la motilidad. Todas las cepas probadas fueron inmóviles, resistentes a la bacitracina y fermentaron la glucosa siendo consideradas como miembros del género *Staphylococcus*.

Las especies del grupo I fueron: nueve cepas pertenecientes a *S. aureus*, seis cepas a *S. intermedius* y tres cepas a *S. hyicus*. Las especies del grupo II se tipificaron como: ocho cepas de *S. sciuri*, seis cepas de *S. xylosus*, cinco cepas de *S. cohnii subsp 1*, dos cepas de *S. cohnii subsp 2* y dos cepas *S. lentus*. Todas las cepas del grupo III fueron oxidasa negativas y crecieron tanto en aerobiosis como en anaerobiosis y se clasificaron como: ocho cepas de *S. hyicus*, siete cepas de *S. haemolyticus*, cinco cepas de *S. chromogenes* y una cepa de *S. simulans*.

De un total de 62 cepas tipificadas, la especie de mayor frecuencia correspondió a *S. hyicus* (17.7%), *S. aureus* (14.5%), *S. sciuri* (12.9%), *S. haemolyticus* (11.3%), *S. xylosus* (9.7%), *S. intermedius* (9.7%), *S. chromogenes* (8.1%), *S. cohnii subsp.1* (8.1%), *S. cohnii subsp 2* (3.2%), *S. lentus* (3.2%) y *S. simulans* (1.6%).

DISCUSION

Tipificación de géneros. Todas las cepas aisladas de leche cruda bovina fueron inmóviles, resistentes a la bacitracina y fermentaron la glucosa siendo consideradas como miembros del género *Staphylococcus*.⁴⁰ La ausencia de *Micrococcus* en las muestras estudiadas, es coincidente con lo hallado por otros autores quienes raramente encontraron este género en muestras de leche fresca.^{10,11,30}

En relación con la prueba de resistencia a la bacitracina

Tabla 1. Coagulasa positivo-Novobiocina sensible
(Grupo I)

A. Producen acetoina	<i>S. aureus</i>
AA. No producen acetoina	
B. Crecen a 45°C	<i>S. intermedius</i>
BB. No crecen a 45°C	<i>S. hyicus</i>

Tabla 2. Coagulasa negativo - Novobiocina resistente
(Grupo II)

A. Ureasa (+)	
B. Rafinosa (+)	<i>S. gallinarum</i>
BB. Rafinosa (-)	
C. Manosa (+)	
D. Xilosa (+)	<i>S. xylosus</i>
DD. Xilosa (-)	<i>S. cohnii Subsp urealyticus</i>
CC. Manosa (-)	<i>S. saprophyticus</i>
AA. Ureasa (-)	
B. Rafinosa (+)	<i>S. lentus</i>
BB. Rafinosa (-)	
C. Reducción de nitratos (+)	<i>S. sciuri</i>
CC. Reducción de nitratos (-)	<i>S. cohnii Subsp.cohnii</i>

utilizando discos de 0.04 U fue altamente sensible y específica.^{2,3}

La prueba de sensibilidad a la lisostafina no fue utilizada debido a que presenta algunos inconvenientes ya que por un lado los resultados están sujetos al medio de cultivo que se utiliza y por el otro, hay variación de la susceptibilidad entre las especies de *Staphylococcus*.²⁰

No fue utilizada la prueba de resistencia a la furazolidona, porque si bien los estafilococos son resistentes, diversos autores han observado que algunas cepas han adquirido bajos niveles de resistencia, lo cual podría llevar a clasificaciones erróneas.¹³

La prueba de fermentación de glucosa no presentó inconvenientes para tipificar cepas aisladas de leche a pesar de que algunos autores han observado que algunas cepas de *Staphylococcus* crecen pobremente o no crecen en condiciones anaeróbicas, mientras que otras cepas de *Micrococcus* pueden liberar ácidos de glucosa.^{32,33}

De acuerdo con nuestros resultados, para diferenciar géneros de cepas provenientes de glándula mamaria bovina, aisladas en un medio de cultivo conteniendo NaCl al 8.5%, son suficientes las pruebas de resistencia a la bac-

Tabla 3. Coagulasa negativo-Novobiocina sensible
(Grupo III)

A. Oxidasa (-)	
B. Crecimiento en aerobiosis	
C. Crecimiento en anaerobiosis	
D. No crecen a 45°C	
E. Producen pigmentos	<i>S. chromogenes</i>
EE. No producen pigmentos	<i>S. hyicus</i>
DD. Crecen a 45°C	
E. Ureasa (+)	
Reducción de nitratos (+)	
G. Acetoina (+)	
H. Trehalosa (+)	<i>S. caprae</i>
HH. Trehalosa (-)	<i>S. epidermidis</i>
GG. Acetoina (-)	<i>S. simulans</i>
Reducción de nitratos (-)	<i>S. warneri</i>
EE. Ureasa (-)	
M. Maltosa (+)	<i>S. haemolyticus</i>
MM. Maltosa (-)	
G. Crece a 15°C	<i>S. carnosus</i>
GG. No crece a 15°C	<i>S. capitis</i>
CC. No crece en anaerobiosis	
D. Ureasa (+)	<i>S. hominis</i>
DD. Ureasa (-)	<i>S. auricularis</i>
BB. No crece en aerobiosis	<i>S. sacharolyticus</i>
AA. Oxidasa (+)	<i>S. caseolyticus</i>

tracina, utilización anaeróbica de la glucosa y la motilidad.

Tipificación de especies. Los resultados obtenidos en este estudio indicaron que de nueve cepas de *S. aureus* todas fueron coagulasa ligada positivo (clumping factor +), de las seis cepas de *S. intermedius*, cinco fueron coagulasa ligada positivo (clumping factor+) y una fue negativa. Con relación a *S. hyicus* todas las cepas fueron negativas a "clumping factor".

Si bien *S. aureus* y *S. intermedius* son siempre coagulasa lenta positivo (estafilococoagulasas +) únicamente *S. aureus* es siempre positiva a coagulasa rápida, en cambio *S. intermedius* es variable y *S. hyicus* es variable a coagulasa lenta y siempre negativa a coagulasa rápida.^{29, 38, 40}

La especie de mayor frecuencia fue *S. hyicus* con once cepas, de las cuales tres fueron coagulasa positivo y ocho coagulasa negativo. Estos hallazgos son coincidentes con



las de otros autores.^{22,44} *S. aureus* le sigue en frecuencia de aislamiento, esta especie coloniza la ubre especialmente cuando existen lesiones y es considerado como un microorganismo propio de la glándula mamaria.¹⁴

S. hyicus fue descrita en 1978³⁶ y presenta algunas características en común con *S. aureus* por lo que fue considerada como perteneciente a esta especie. Esto explicaría el aumento en los últimos años de la frecuencia de *S. hyicus* en muestras de leche.²² Por otra parte, algunos investigadores encontraron que según el esquema de tipificación utilizado podría llevar a resultados erróneos; así por ejemplo tipificar a *S. hyicus* y *S. chromogenes* como *S. epidermidis* y muchos *S. hyicus* son identificados como *S. hominis*.²⁷

Si bien *S. aureus* ha sido la especie más frecuentemente asociada a casos de mastitis,^{35,42} también se ha encontrado *S. hyicus* en infecciones intramamarias.⁵ Estas especies junto a *S. intermedius*, son consideradas patógenas para animales. Aunque algunos investigadores no han encontrado *S. intermedius* en bovinos,⁵ otros lo han aislado de la glándula mamaria.⁴³

Especies coagulasa negativas como *S. haemolyticus*, *S. warneri* y *S. epidermidis* colonizan el ducto de la ubre y la punta del pezón, en tanto *S. sciuri* junto a *S. xylosus* abunda en la piel de la ubre.¹⁴ Las especies coagulasa negativas que se han reconocido como potencialmente patógenas y que han sido aisladas de casos de mastitis clínica y subclínica son *S. hyicus*, *S. haemolyticus*, *S. xylosus* y *S. simulans*.^{14, 16, 19, 24} A medida que se mecaniza el ordeño, aumentan en importancia como agentes productores de mastitis.⁸

En este trabajo no fue aislado *S. epidermidis*. Esta especie es flora normal de la piel de humanos y es agente causal de casos clínicos humanos, especialmente de tracto urinario.^{4,12} Esta especie es muy poco frecuente en animales.^{14,24} Tampoco fue aislado *S. saprophyticus*, especie que raramente se encuentra en animales de granja y domésticos.¹⁴ *S. simulans*, *S. cohnii* y *S. capitis* pueden aislarse de muestras de leche pero en muy baja frecuencia^{11,24} y junto a *S. epidermidis* podrían ofrecer protección a la infección por otros patógenos.^{28,34}

De acuerdo con lo expuesto podemos concluir que las pruebas de resistencia a la bacitracina, utilización anaeróbica de la glucosa y motilidad, fueron suficientes para diferenciar géneros. Asimismo las pruebas utilizadas no presentaron dificultad para identificar las cepas aisladas y la aplicación de las claves dicotómicas permitió el ordenamiento de los resultados para una correcta identificación de especies de *Staphylococcus* provenientes de leche bovina.

REFERENCIAS

1. Baldellon, C., and F. Mégraud. 1985. Characterization of *Micrococcaceae* strains isolated from the human urogenital tract by the conventional scheme and a micro-method. J. Clin. Microbiol. 21:474-477.
2. Baker, J. S. 1984. Comparison of various methods for differentiation of staphylococci and micrococci. J. Clin. Microbiol. 19:875-879.
3. Baker, J. K., M. F. Hackett and D. J. Simard. 1986. Variations in bacitracin susceptibility observed in *Staphylococcus* and *Micrococcus* species. J. Clin. Microbiol. 23:963-964.
4. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th Ed. 1994. Group 17. Williams and Wilkins Co. Baltimore. Pp 527-594.
5. Biberstein, E. L., S. J. Spencer and D. C. Hirsh. 1984. Species distribution of coagulase positive staphylococci in animals. J. Clin. Microbiol. 19:610-615.
6. Brown, R. H. 1973. Intramammary infection produced by various strains of *Staphylococcus epidermidis* and *Micrococcus*. Cornell Vet. 63:630.
7. Collins, C. H., and P. M. Lyne. 1989. Métodos microbiológicos. Ed. Acribia S. A. Zaragoza (España). 1-410.
8. Del Baglivi, L. P., M. Bonilla and M. Laborde. 1976. Investigaciones sobre mastitis subclínica en rodeos lecheros del Uruguay. Veterinaria. 12:69-77.
9. Demo, M., C. Pájaro, J. Quiñones Varela, V. Martín, G. Bagnis, and J. C. Dehaes. 1991. Características de Cito-lisinas Alfa y Beta estafilocócica provenientes de glándula mamaria bovina. Veterinaria Argentina. VIII (75): 320-326.
10. Devriese, L. A. 1979. Identification of clumping-factor-negative staphylococci isolated from cows' udders. Res. Vet. Science. 27:313-320.
11. Devriese, L. A., and H. De Keyser. 1980. Prevalence of different species of coagulase negative staphylococci on teats and milk samples from dairy cows. J. Dairy Res. 47:155-158.
12. Devriese, L. A., and V. Hajek. 1980. Identification of pathogenic staphylococci isolated from animals and foods derived from animals. J. Appl. Bacteriol. 49:1-14.
13. Devriese, L. A., K. H. Schleifer and G.O. Adegoke. 1985. Identification of coagulase-negative staphylococci from farm animals. J. Appl. Bacteriol. 58:45-55.
14. Devriese, L. A. 1990. Staphylococci in healthy and diseased animals. J. Appl. Bacteriol. Sym. Suppl. 71S-80S.
15. Euzéby, J. P. 1996. Les taxons bactériens d'intérêt vétérinaire décrits en 1995. Revue bibliographique. Revue Méd. Vét. 147:3-32.
16. Fabre, J. M., X. Berthelot, P. Lebreton, M. F. Blanc and M. C. Blanc. 1991. Estimation de la fréquence des différents germes responsables d'infections mammaires en élevage bovin laitier dans le sud-ouest de la France. Revue Méd. Vét. 142:823-829.
17. Falk, D., and S. Guering. 1983. Differentiation of *Staphylococcus* and *Micrococcus* spp. with the taxo A bacitracin disk. J. Clin. Microbiol. 18:719-721.
18. Finelgold, S. M., and E. J. Baron. 1992. *Micrococcaceae*: estafilococos y micrococos. Cap 24: 340-347. In: Bailev-Scott. Diagnóstico microbiológico. Aislamiento

- e identificación de microorganismos patógenos. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires.
19. Fthenakis, G. C. and J. E. Jones. 1990. The effect of inoculation of coagulase-negative staphylococci into the ovine mammary gland. *J. Comp. Pathol.* 102:211-219.
 20. Geary, C., and M. Stevens. 1986. Rapid lysostaphin test to differentiate *Staphylococcus* and *Micrococcus* species. *J. Clin. Microbiol.* 23:1044-1045.
 21. Grasmick, A. E., Naito, N., and D. Bruckner. 1983. Clinical comparison of the automicrobic system Gram-positive identification card, API staph-ident, and conventional methods in the identification of coagulase-negative *Staphylococcus* spp. *J. Clin. Microbiol.* 18:1323-1328.
 22. Harvey, J., and A. Gilmour. 1985. Application of current methods for isolation and identification of staphylococci in raw bovine milk. *J. Appl. Bacteriol.* 59: 207-221.
 23. Hernandez Haba, J., and F. Dubon Pérez. 1992. Sección 12. Cocos Gram positivos. 12.1-12.13. *Sistémática Bacteriana*. 3º Ed. Copión S. L. Valencia, España.
 24. Jarp, J. 1991. Classification of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine clinical and sub-clinical mastitis. *Vet. Microbiol.* 27:151-158.
 25. Kloos, W. E., and P. K. Schleifer. 1975. Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. *J. Clin. Microbiol.* 1:81-88.
 26. Kloos, W. E., and J. F. Wolsfshohl. 1982. Identification of *Staphylococcus* species with the API staph-ident system. *J. Clin. Microbiol.* 16:509-516.
 27. Langlois, B. E., R. J. Harmon and K. Akers. 1983 Identification of *Staphylococcus* species of bovine origin with the API staph-ident system. *J. Clin. Microbiol.* 18: 1212-1219.
 28. Linde, C., O. Holmberg, and G. Åström. 1980. The interference between coagulase negative staphylococci and *Corynebacterium bovis* and the common udder pathogens in the lactating cow. *Nord. Vet. Med.* 32:552-558.
 29. Maddux, R. L., and G. Koehne. 1982. Identification of *Staphylococcus hyicus* with the API staph strip. *J. Clin. Microbiol.* 15:984-986.
 30. Malhotra, B. P. and M. P. Kapur. 1982. Epizootiological studies on bacterial bovine mastitis. *Indian Vet. J.* 59:921-926.
 31. Mc Faddin. 1980. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Ed. Médica Panamericana. S. A. Bs. As. 1-284.
 32. Muryan, A., H. Bianchini and J. Smayevsky. 1991. Diagnóstico microbiológico de infecciones por estafilocos coagulasa negativa. *Rev. Arg. Microbiol.* 23:48-58.
 33. Parisi, J. 1985. Coagulase-negative staphylococci and the epidemiological typing of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiol. Rev.* 49:126-139.
 34. Poutrel, B. and C. Lerondelle. 1980. Protective effect in the lactating bovine mammary gland induced by coagulase-negative staphylococci against experimental *Staphylococcus aureus* infections. *Ann. Rech. Vét.* 11: 327-332.
 35. Puig De Centorbi, O. N., A. M. A. De Cuadrado, L. E. Alcaraz, A. L. Laciari, and M. C. De Milan. 1992. Prevalencia de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis subclínica bovina en tambos de la cuenca lechera de la ciudad de San Luis. *Rev. Arg. Microbiol.* 24:73-80.
 36. Pulverer, G. 1986. Taxonomy of *Staphylococcus aureus*. *Zbl. Bakt. Hyg. A* 262:425-437.
 37. Quiñones Varela, J., and M. Demo. 1997. Estafilococos coagulasa negativo aislados de glándula mamaria bovina, producción de citolisinas, sinergismo hemolítico y "slime". *Veterinaria Argentina*. XIV (132):91-100.
 38. Raus, J., and D. N. Love. 1983. Characterization of coagulase-positive *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus aureus* isolated from veterinary clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 18:789-792.
 39. Romeo, A. M., M. Catalano and L. Lovadina. 1988. Pruebas bioquímicas mínimas para la identificación inter-especies en el género *Staphylococcus*. *Rev. Arg. Microbiol.* 20:171-182.
 40. Schleifer, Y. H. 1984. Section 12. Gram positive cocci. 1003-1035. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams and Wilkins. Baltimore. (ed) Vol 2.
 41. Smibert, M., and N. R. Krieg. 1981. General characterization. Cap 20: 409-443. Edited by Gerhardt, G. *Manual of methods for general bacteriology*. American Society for Microbiology. Washington.
 42. Tessi, M, R. A. Alvarez De Esponda, L. Sabbatini De Comini, M. D. Giavedoni De Taher, A. Paura, M. A. Moguilevsky, N. Casado, L. Romano, and P. Weidmann. 1979. Etiología microbiana de mastitis bovina subclínica en la cuenca lechera santafesina. *Rev. Arg. Microbiol.* 11:49-56.
 43. Watts, J., W. E. Owens, and S. C. Nickerson. 1986. Evaluation of the minitek Gram-positive set for identification of staphylococci isolated from the bovine mammary gland. *J. Clin. Microbiol.* 23:873-875.
 44. Watts, J. and W. E. Owens. 1987. Synergistic hemolysis associated with coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mammary glands. *J. Clin. Microbiol.* 25:2037-2039.