

## INVESTIGACION DEL STREPTOCOCCUS AGALACTIAE DE CASOS DE MASTITIS CRONICA BOVINA EN CHILE

por

RICARDO ABEL KREFFT (\*)

La mastitis o mamitis infecciosa, constituye una de las enfermedades más difundidas entre el ganado bovino del mundo. Autoridades sobre la materia se han preocupado de este importante problema, desde Nocard (20) hasta nuestros días. Al efecto, se han hecho extensos estudios sobre su etiología en Francia, Alemania, Inglaterra, Australia, Estados Unidos de N. A., etc. Importancia preferente se le ha dado a la mastitis estreptocócica de carácter contagioso, de tipo generalmente subagudo y crónico, cuyo agente causal predominante es el *Streptococcus agalactiae*.

La mastitis crónica, sobre todo, tiene la particularidad de presentarse, muchas veces, sin otros síntomas que una ligera alteración de la leche, con pequeñas tumefacciones o nódulos en el cuarto mamario comprometido. A medida que el grado del proceso infeccioso aumenta, el tejido glandular de la ubre se reemplaza por tejido fibroso. El cuarto mamario se torna duro, firme y con uno o varios nódulos hasta del tamaño de un huevo de paloma más o menos; algunas veces se atrofia. Como resultado, la secreción láctea disminuye en cantidad apreciable. Este es el tipo de mastitis más corriente.

De todo lo señalado se desprende la gran importancia económica que tienen las mastitis crónicas para el ganadero. Por otra parte, se puede agregar que los animales que padecen mastitis por *Str. agalactiae*, son una fuente de peligro permanente para los animales sanos, ya que la infección puede llevarse por las manos del ordeñador. También por las pezoneras de la máquina ordeñadora, insuficientemente esterilizadas, paños, etc.

El motivo de este trabajo es presentar un número de cepas de *Streptococcus agalactiae*, aisladas e identificadas en este Instituto por

(\*) Médico Veterinario Bacteriólogo del Instituto de Investigaciones Veterinarias. El autor agradece al Prof. R. Allen Packer de Iowa State College, su colaboración en el presente trabajo.

procedimientos bacteriológicos conocidos y a nuestro alcance, y métodos de reciente introducción en el campo de la bacteriología como el de "CAMP" (iniciales de los autores Christie, Atkins y Munch-Petersen) (6).

#### REVISION DE LA LITERATURA

Kitt (13), en 1893, describe al agente causal de la mastitis crónica; lo denomina *Streptococcus agalactiae contagiosae*. Dicho germen aparece constituido por largas cadenas de cocos hasta de 50 elementos. Al igual que Nocard y Mollereau, logra reproducir este tipo de mastitis.

Orla-Jensen (10), en 1919, hace una descripción del *Str. mastitidis*, el estreptococo de la mamitis "más frecuentemente encontrado". Sus cepas fueron sembradas en medios nutritivos a base de digesto de caseína como fuente de nitrógeno y con 18 hidratos de carbono y alcoholes polivalentes. Orla-Jensen establece que, desde el punto de vista morfológico, el *Str. mastitidis* es enteramente igual al *Str. cremoris*.

Brown (4), en 1919, amplía su trabajo sobre propiedades hemolíticas de los estreptococos, hecho en colaboración con Smith en 1915. A los tipos  $\alpha$  (alpha),  $\beta$  (beta) y  $\gamma$  (gamma), agrega el  $\alpha'$  (alpha prima). Las colonias beta se rodean de zonas hemolíticas perfectamente definidas; de un ancho de 2 a 4 milímetros. Las colonias alpha prima, presentan a su alrededor una zona de hemolisis algo confusa y no tan precisamente delimitada como en el caso de la hemolisis tipo beta. Las colonias gamma, se desarrollan en el agar sangre sin alteración alguna del medio de cultivo.

Brown (5), en 1920, observa que las cepas típicamente humanas de estreptococos, muestran una zona hemolizada transparente, bien definida de 2 a 2,5 milímetros de diámetro sobre placas de agar sangre, después de 18 a 24 horas de incubación a 37°C. En cambio las cepas bovinas, presentan una zona más pequeña, angosta, de desarrollo lento. Algunas cepas son, no obstante irregulares y difíciles de distinguir.

Ayers y Rupp (2), en 1922, diferencian los estreptococos humanos y bovinos por su capacidad de hidrolizar el hipurato de sodio. Los primeros lo hidrolizan, no así los segundos.

Klimmer y Haupt (14), en 1930, proponen el nombre de *Str. agalactiae* (Kitt, 1893) en lugar de *Str. mastitidis contagiosae*, dado por Guillebeau (10), al agente causal predominante de la mastitis de carácter contagioso. Al respecto es menester expresar que ya Lehman y Neumann (16) en 1896 lo habían denominado *Str. agalactiae*.

Diernhofer (7), en 1932, recomienda cultivar el *Str. agalactiae* en un medio líquido que lleva esculina. El *Str. agalactiae*, concluye, no disocia dicho glucósido, al contrario de lo que sucede con los estreptococos del Grupo *faecalis lactis*, que lo hidrolizan al cabo de 48 horas de incubación a 37°C y, a veces, antes.

Edwards (8), en 1933, describió su ya universalmente conocido medio selectivo para el diagnóstico de los estreptococos de la mastitis. Es a base de agar sangre bovina con cristal violeta y esculina. En este medio el *Str. agalactiae* dá colonias pequeñas gris azuladas, llamativas. No producen obscurecimiento, pueden aparecer débilmente hemolíticas o indiferentes. El *Str. dysgalactiae* o *pseudo agalactiae*, dá colonias semejantes o bien colonias color café, análogas a las originadas por los estreptococos saprófitos. El *Str. uberis* y como igualmente todos los gémenes considerados saprófitos, producen zonas de color café y obscurecimiento del medio.

Lancefield (15), en 1934, amplía sus métodos serológicos para diferenciar y clasificar los estreptococos sobre la base de las reacciones de precipitación que se obtienen con extractos de dichos microorganismos y antisueros homólogos y heterólogos. Al comienzo estableció los Grupos A, B, C, D y E. En el Grupo B están ubicadas las cepas del *Str. agalactiae*. En el Grupo C, se incluyen las cepas pyogenes de origen animal, muy semejantes por sus relaciones fisiológicas al *Str. pyogenes* humano; pero muy diferentes por su acción frente a los animales. Posteriormente fueron agregados nuevos grupos: F, G, H, K, etc. Dentro del Grupo B, Lancefield distingue varios tipos específicos. Stableforth, Stewart, Simmons y Keogh establecen un cierto número de subtipos, mediante la técnica de aglutinación y absorción de aglutininas (12-23).

Hansen (10), en 1935 confirmó las conclusiones de Nocard y Mollereau, Orla-Jensen, Ayers y Mudge, Klimmer y Haupt, sobre las características del *Str. mastitidis*, o mejor dicho del *Str. agalactiae*. Esta última denominación la consideró correcta. Sus cepas fermentaron en un 89% a la trehalosa, en un 87% a la salicina; observó que ellas originaron diversos tipos de hemolisis en placas de agar sangre; pero con una sola excepción, no evidenció una ancha zona de hemolisis en sus cultivos.

Munch-Petersen (18) en 1938, hizo una extensa revisión de la literatura sobre mastitis bovina.

Christie-Atkins y Munch-Petersen (6) en 1944, establecieron que cepas de estreptococos del Grupo B de Lancefield, de origen animal y algunas cepas aisladas de afecciones a la garganta, nariz, vagina, piel, etc., del hombre, producen un agente que lisa los glóbulos rojos de oveja y buey; pero no los eritrocitos del hombre, caballo, conejo o cuy, cuando estas células han sido alteradas, pero no destruidas por la toxina beta estafilocócica. Dicho agente es intracelular, filtrable y termoestable y sólo lo poseen los estreptococos del Grupo B ya enunciado. Por tal motivo consideran, estos autores, que este fenómeno de lisis inducido puede substituir al test serológico de Lancefield para evidenciar los estreptococos del Grupo B. Hacen, además, hincapié en el sentido de que con cierta frecuencia el estafilococo productor de toxina beta y el estrepto-

coco del Grupo B, han sido encontrados juntos en la ubre bovina. Puede ser de consideración, agregan, la conexión entre esta ocurrencia y el hecho de que juntos pueden tener ellos un poder lítico que ni uno ni otro poseen en forma independiente.

Munch-Petersen y Christie (19), en 1947, publican una nueva nota sobre el efecto de la interacción de la toxina beta estafilocócica y la substancia o agente producido por estreptococos del Grupo B, sobre glóbulos rojos de cordero y su empleo como prueba eficaz para la identificación del *Str. agalactiae*. Establecen que cuando las placas de agar sangre ovina con colonias de *Str. agalactiae* son irrigadas con toxina beta estafilocócica, se puede observar extensas zonas de hemólisis dentro de dos horas a 37°C.

Topley y Wilson (23) en 1949, expresan que aún no hay acuerdo unánime sobre la identidad o no identidad de las razas del Grupo B de origen humano y bovino. Agregan que hace falta la prosecución de nuevos trabajos tendientes a esclarecer las discrepancias de esta clase. Además, manifiestan que sobre el origen de las cepas de dicho Grupo serológico, se puede establecer que su mayoría se las ha aislado de casos de mastitis del ganado vacuno; muchos veces en condiciones que permiten asegurar que la causa primaria de la enfermedad eran dichas cepas. Finalmente, sobre el particular, expresan estos autores que algunas veces, muy pocas, se las ha aislado de la garganta y la vagina humanas sanas y que *rara vez son patógenas para el hombre*.

Los autores americanos del Bergey's Manual (3), en 1948, al referirse al *Str. agalactiae*, manifiestan que entre un tercio y la mitad de las cepas, producen un clara y angosta zona de hemólisis y que ciertas cepas han sido descritas como productoras de enverdecimiento. En cuanto a su procedencia expresan que ha sido aislado de la leche y ubres del ganado bovino con mastitis.

Abel (1), en 1949, como una primicia al presente trabajo sobre aislamiento de cepas nacionales del *Str. agalactiae*, dá a conocer las primeras cepas de este microorganismo aisladas en el país.

Fincher (9) en 1950, reconoce las bondades del método propuesto por Christie, Atkins y Munch-Petersen ("CAMP") en la identificación práctica del estreptococo predominante en las mastitis bovinas de carácter contagioso, o sea, el *Str. agalactiae*. Considera que el método "CAMP" posee una seguridad de aproximadamente el 98%.

Packer (22) en 1951, estima que el método "CAMP" es una reacción específica para los estreptococos del Grupo B de Lancefield.

Merchant y Packer (17), en 1952, expresan que la mastitis contagiosa se halla en todas partes del mundo en donde se emplean las vacas para la producción de leche y derivados. El porcentaje de animales y rebaños infectados varía en diferentes partes de la tierra. Informes relacionados con el número de rebaños comprometidos o con el número

de vacas infectadas en el rebaño, dependen, en gran manera, de los métodos utilizados como base para determinar e investigar la infección. Consideran que el examen bacteriológico de la leche es el más indicado para dicho objetivo.

#### MATERIAL Y METODOS

De diversos puntos del país, se recibieron muestras de leche de vacas con mastitis crónica con su correspondiente historia clínica. Gran parte del material se obtuvo en lecherías vecinas a la capital y de vacas de gran producción láctea.

Las muestras respectivas después de un lapso de 2 a 72 horas de haber sido tomadas, fueron sometidas a la prueba de Hotis (11). Se hizo a continuación el examen de extensiones con coloración de Gram y solución de azul de metileno, previa incubación del material a 37°C, por 24-36 horas. De esta manera se trataba de favorecer el desarrollo del *Str. agalactiae*, motivo principal del presente trabajo.

Tanto las muestras Hotis positivas como negativas, se sembraron en placas de agar sangre ovino con cristal violeta y esculina (Medio selectivo de Edwards). Las colonias de estreptococos sospechosas, se inocularon en leche tornasolada, caldo esculina y caldo con hipurato de sodio, de acuerdo con las respectivas técnicas preconizadas por Hansen (10), Kelsner y Schoening (12).

Para el estudio de los diversos tipos de hemolisis se emplearon placas de agar sangre. Para las pruebas fermentativas se utilizaron tubos Durham con caldo sin hidratos de carbono. Se empleó como indicador gotas de tintura de tornasol "Merck". En el momento de las siembras les fueron agregadas a cada tubo, gotas de "azúcares". Para ello se emplearon soluciones de: lactosa, glucosa, sacarosa, levulosa, manosa, maltosa, manita, inulina, arabinosa, rafinosa, salicina, sorbita, trehalosa y almidón; las cuales fueron mantenidas en ampollas de vidrio neutro.

El método de "CAMP", ya reconocido como eficaz para la identificación del *Str. agalactiae*, conjuntamente con pruebas bio-químicas, etc., fué utilizado en el curso del presente trabajo. Su base técnica y valor práctico ha sido ya comentado en la revisión bibliográfica (\*).

#### RESULTADOS

De cien muestras seleccionadas, procedentes de vacas con historia clínica de mastitis crónica, se pudo aislar e identificar, en todas, el *Str. agalactiae*.

(\*) La reacción lítica de "CAMP", fué dada a conocer por el autor de la presente comunicación, en el Instituto de Microbiología: Prof. Hugo Vaccaro, Universidad de Chile, en reunión de Ayudantes del 19 de Junio de 1952.

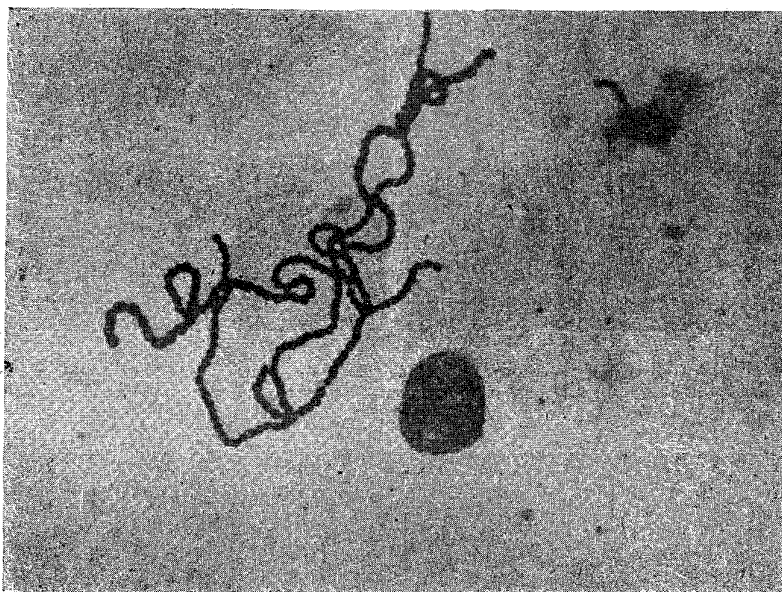


Figura N° 1, original. *Str. agalactiae* de un caso de mastitis bovina crónica.

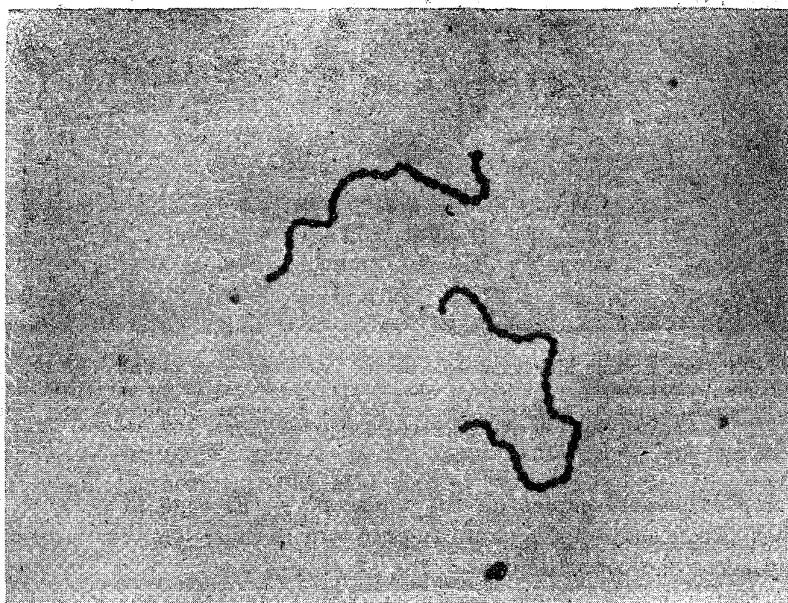


Figura N° 2, original. Frote de un cultivo de *Str. agalactiae* (cepa N° 50), en caldo glucosado de 48 horas de incubación a 37°C.

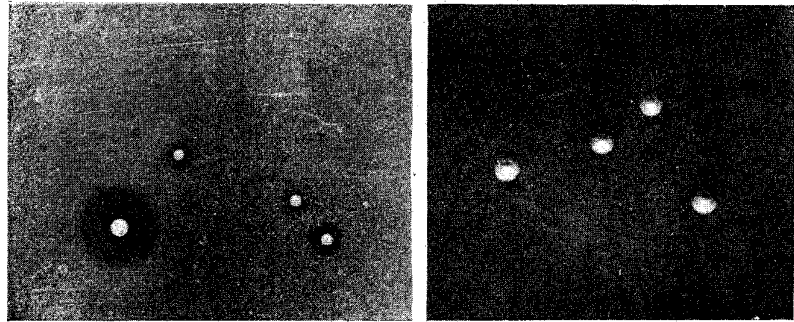


Figura Nº 3, original. Una colonia humana de *Str. pyogenes* y tres colonias de *Str. agalactiae*. (Obsérvese su diferente tipo de hemolisis). Figura Nº 4, original. Colonia no hemolítica de *Str. agalactiae*.

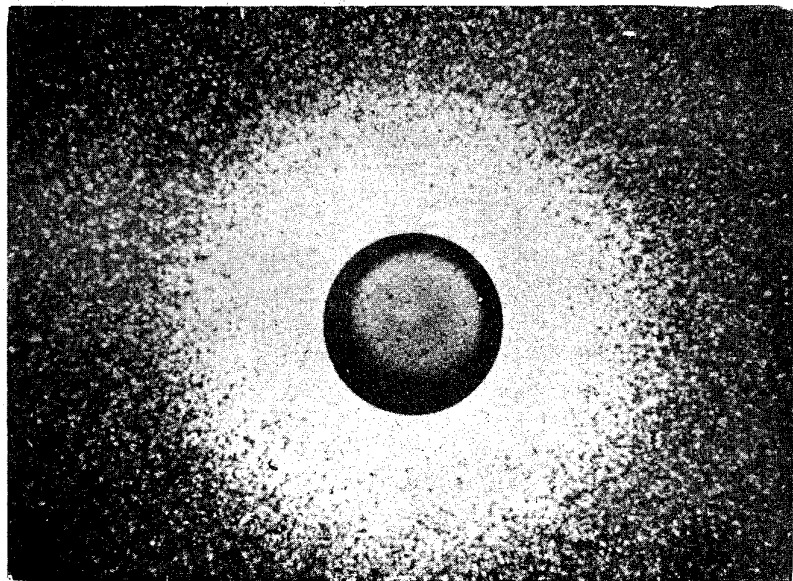


Figura Nº 5, orig. Colonia muy aumentada de *Str. agalactiae*, alpha prima (a'), después de 48 horas de permanencia en el refrigerador. Obsérvese la zona de hemolisis irregularmente delimitada y que ha progresado en anchura por efecto del cambio térmico. (Cultivo en placa de agar sangre ovina).

*Aspecto macroscópico de las muestras.* — El aspecto general, fué de leches grumosas o bien, francamente purulentas, con bastante sedimento y serosidad amarillenta.

*Examen microscópico directo.* — Los frotos de cada muestra sometida a la prueba de Hotis, tanto positiva como negativa, revelaron escasa, regular o abundante cantidad de leucocitos, generalmente poli-

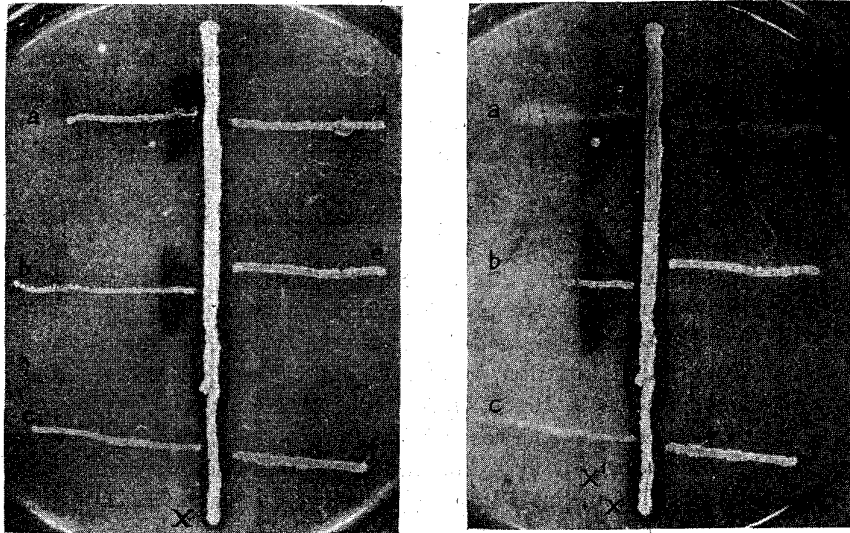


Figura N° 7, original. Método de "CAMP" a y b: dos estrias de *Str. agalactiae*. Obsérvese dos ángulos de clara hemolisis dentro de la zona opaca (X), producida por la toxina beta estafilocócica, indicando reacción "CAMP" positiva. c, d, e y f: estrias de otras especies de estreptococos con reacción "CAMP" negativa. Figura N° 8. La misma placa de agar sangre ovina de la figura N° 7; pero fotografiada 36 horas después de permanecer a la temperatura del Laboratorio. Puede verse una nueva zona oscura (X) producida por la toxina beta estafilocócica, lo que hace progresar los dos ángulos de lisis de la reacción "CAMP".

nucleares en buen estado de conservación cito-nuclear o muy degenerados. En algunos de ellos, no obstante, se observaron monocitos y también glóbulos rojos numerosos. La flora microbiana estaba constituida por cocos Gram positivos aislados, o bien dispuestos en diploe, en cortas, medianas y, a veces, muy largas cadenas (ver figura N° 1). En un 20% de las muestras se evidenciaron, además, grupos de cocos y difteroides Gram positivos. Sólo en un 7% de las muestras observadas, se encontraron bacilos Gram negativos, delgados, gruesos, cortos, medianos, etc.

*Cultivos.* — Las siembras por dilución de este material incubado, en placas de agar sangre de oveja o de caprino con cristal violeta y esculina (Medio de Edwards), dieron desarrollo a las 24-48 horas a 37°C, a colonias pequeñas, gris azuladas, llamativas, con o sin hemolisis circunvecina. Como nuestro objetivo era el hallazgo del *Str. agalactiae*, sólo nos interesaron estas colonias sospechosas.

Cada colonia estreptocócica presuntiva, sembrada en caldo glucosado, dió abundante desarrollo, revelándose al examen microscópico, cadenas medianas de cocos Gram positivos en unas cepas y muy largas en otras (ver figura N° 2). Cada cepa evidenció las características gene-



rales del *Str. agalactiae*, siguiendo las técnicas preconizadas por Hansen (10), Kelser y Schoening (12). En realidad, la mayoría de ellas coaguló la leche tornasolada con reducción lenta y posterior a la coagulación, desde el fondo de los tubos. Unas pocas sólo acidificaron dicho medio de cultivo: cepas N.os 7, 27, 28, 36, 65, 66, 68. Ninguna hidrolizó la esculina en dos días. Todas hidrolizaron el hipurato de sodio en cuatro días de incubación a 37°C.

Desde el punto de vista fermentativo, todas las cepas atacaron, sin producción de gas, la glucosa, sacarosa, levulosa, maltosa, manosa, lactosa y trehalosa. Ninguna atacó la manita, inulina, arabinosa, rafinosa y sorbita. Su comportamiento para con la salicina fué irregular; sólo 61 cepas (61%) acidificaron el medio de cultivo con dicho glucósido. 8 cepas (8%) atacaron el almidón, quedando un grueso sedimento amarillo anaranjado al cabo de 8, 10, 12 días de incubación a 37°C.

Sembradas las cepas presuntivas de *Str. agalactiae* en placas de agar sangre de oveja, un 20% de ellas reveló hemolisis alpha ( $\alpha$ ); un 57%, alpha prima ( $\alpha'$ ) y un 23% no presentó alteración alguna del medio de cultivo señalado.

Todas las cepas estudiadas resultaron positivas a la prueba ideada por Christie, Atkins y Munch-Petersen (Método de "CAMP") (ver figura N° 7). Antes de conocer esta interesante reacción práctica de identificación de estreptococos del Grupo B, se enviaron 15 cepas aisladas e identificadas presuntivamente como *Str. agalactiae*, a Iowa State College. El Prof. R. Allen Packer (21-22), las sometió a la prueba serológica de Lancefield, quedando todas ellas incluidas en el Grupo B. Además, todas, también, según dicho Bacteriólogo, dieron las reacciones típicas del *Str. agalactiae*. Algunas, no obstante, las encontró más hemolíticas que las cepas norteamericanas de dicho microorganismo.

#### RESUMEN

Se aislan e identifican por primera vez en el país, cien cepas de *Str. agalactiae*, procedentes de cien muestras seleccionadas de casos de mastitis crónica bovina. Dichas muestras procedieron de vacas de gran producción láctea, en gran parte de lecherías próximas a Santiago.

Las cepas aisladas se estudiaron por procedimientos clásicos y por el Método de "CAMP", ideado por Christie, Atkins y Munch-Petersen.

Un 20% de ellas reveló hemolisis tipo alpha ( $\alpha$ ); un 57%, alpha prima ( $\alpha'$ ) y un 23%, gamma ( $\gamma$ ).

Sus características fermentativas, fueron las correspondientes a la especie. No obstante su comportamiento irregular para con la salicina, un 61% de las cepas estudiadas atacaron dicho glucósido. Un 8%, atacó el almidón.





CARACTERÍSTICAS DE CEPAS NACIONALES DE STREPTOCOCCUS AGALACTIAE AISLADOS DE VACAS CON MASTITIS CRONICA

(CONTINUACION)

Cult. N°	Procedencia	Cuadro	Tipo de Hemo-lisis	Leche tornasolada	Esculina	Hipur. sodio	Producción de ácido en:							Método C-A-M-P.		
							Lact.	Manit.	Inul.	Arab.	Raf.	Salic.	Sorb.		Treh.	
72	"Cartera"	a.d.	a'	"	"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
73	"Cartera"	a.i.	a	"	"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
74	"2661"	—	γ	"	"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
75	"Countess"	p.i.	a'	"	"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
76	"Countess"	a.i.	a'	"	"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
77	"Holly Prize"	a.i.	a	"	"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
78	"Jennie"	a.i.	a'	ac. coag. red.	"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
79	"Inka Lucy"	p.i.	a'	"	"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
80	"1891"	a.i.	a	"	"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
81	"Malva"	a.d.	a	"	"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
82	"Malva"	a.i.	a	"	"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
83	"Chincola"	p.d.	a'	"	"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
84	"Rosalia"	p.i.	γ	"	"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
85	"1850"	a.d.	a'	"	"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
86	"Cutufa"	p.i.	a'	"	"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
87	"Hortelana"	a.d.	a	"	"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
88	"Cuca"	p.d.	γ	"	"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
89	"Cuca"	a.d.	γ	"	"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
90	"Pechuga"	a.d.	γ	"	"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
91	"Patagua"	p.d.	a'	"	"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
92	"Patagua"	p.i.	a'	"	"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
93	"Coralpa"	a.d.	γ	"	"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
94	"Ceniza"	a.i.	a'	"	"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
95	"Coliflor"	p.d.	a'	"	"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
96	"Gaviota"	a.i.	a'	"	"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
97	"Overa"	p.i.	a	"	"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
98	"Overa"	p.d.	a'	"	"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
99	"Cophue"	a.d.	a'	"	"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
100	"Cophue"	a.i.	a'	"	"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

a.d.: anterior derecho; a.i.: anterior izquierdo; p.d.: posterior derecho; p.i.: posterior izquierdo.

a: alpha; a': alpha prima; γ: gamma.

+: positivo.

ac.: acidifica; coag.: coagula; red.: reduce.

—: negativo.

Por falta de espacio no fueron incluidos en este cuadro la glucosa, sacarosa, levulosa, maltosa y manosa, las cuales fueron atacadas por todas las cepas enunciadas.

Verificada la existencia del *Str. agalactiae* en el país en forma evidente, se prosiguen los trabajos tendientes a realizar un estudio bioestadístico sobre el grado de incidencia en las lecherías chilenas.

#### SUMMARY

For the first time in this country, one hundred strains from one hundred selected samples of chronic bovine mastitis cases were isolated. They came from cows in dairies in the Santiago area and from other sections of the country.

Streptococci strains were identified by classic methods and by the so called CAMP reaction. 20 per cent of them were alpha haemolysis; 57 per cent, alpha primé and 23 per cent, indiferent. No beta haemolysis was observed.

Classical fermentative properties were verified.

As the presence of *Str. agalactiae* in Chile, was confirmed a research is underway to establish the incidence of this disease in our dairies.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1.—ABEL, K. R. — Presencia en Chile del *Streptococcus agalactiae*. Agr. Téc. Chile. **9**:175, 1949.
- 2.—AYERS & RUPP, P. — Differentiation of haemolytic streptococci from human and bovine sources by the hydrolysis of sodium hippurate. Journ. Infect. Dis. **30**:388-399, 1922.
- 3.—BERGEY, D. H. & Col. — Manual of Determinative Bacteriology. 319-329. 6th ed. The Williams & Wilkins Co. Baltimore, 1948.
- 4.—BROWN, J. H. — The use of blood agar for the study of streptococci. Monograf. Rockefeller Inst. Med. Res. N. Y., 1919.
- 5.—BROWN, J. H. — The cultural differentiation of beta haemolytic streptococci of human and bovine origena. J. Exp. Med. **31**:35-47, 1920.
- 6.—CHRISTIE, R.; ATKINS, N. E. & MUNCH-PETERSEN, E. — A note on a Lytic Phenomenon Schown by Group B Streptococci. Austral. J. Exp. Biol. & Med. Sci. **23**:143-205, 1944.
- 7.—DIERNHOFER, K. — Aesculin bouillon als Hilfsmitted für die Differenzierung von Euter-und Milchstreptokokken bey Massennuntersuchungen. Milchw. Forsch. **13**:368-374, 1932.
- 8.—EDWARD, S. J. — Studies on Bovine Mastitis. A Selective Medium for the Diagnosis of *Streptococcus Mastitis*. Journ. Comp. Path. & Therap. **46**:211-217, 1933.
- 9.—FINCHER, M. G. — An approach to the Mastitis Problem. Journ. Am. Vet. Ass. **117**:194-195, 1950.
- 10.—HANSEN, P. A. — Mastitis. The identity of *Streptococcus agalactiae*. Tech. Bull. Nº 232. N. Y. Agr. Exp. Station, Geneva. N. Y., 1935.
- 11.—HOTIS, R. P. & MILLER, W. T. — A simple Test for Dctecting Streptococci in Milk. U. S. D. A. Circ. Nº 400, 1936.
- 12.—KELSER, R. A. & SCHOENING, H. W. — Manual of Veterinary Bacteriology. 243, 244, 245, 246, 252, 253, 254, 255, 256. 4th. Ed. The Williams & Wilkins Co. Baltimore, 1943.

- 13.—KITZ, TH. — Bakterienkunde und pathologische Mikroskopie. Wien. Perles. Ed. 9: 1893.
- 14.—KLIMMER, M. und HAUPT, H. — Die Streptokokken mastitis. Hyg. Bak. Imm. Therap. 11:354, 446-771-774, 1930.
- 15.—LANCEFIELD, R. C. — A Serological differentiation of specific types of Bovine haemolytic Streptococci (Group B). Journ. Exp. Med. 49:441, 1934.
- 16.—LEHMANN, K. F. und NEUMANN, R. — Atlas und Grundriss der Bakteriologischen Diagnostik I und II. Munchen, Lehmann, 1896.
- 17.—MERCHANT, I. A. & PACKER, R. A. — Handbook for the Etiology, Diagnosis and Control of Infections Bovine Mastitis. Burgee Publ. Co. Minneapolis, 1952.
- 18.—MUNCH-PETERSEN, E. — Bovine Mastitis. Imp. Bur. An. Health. Weibridge, Surrey, 1938.
- 19.—MUNCH-PETERSEN, E. & CHRISTIE, R. — On the effect of the interaction of Staphylococcal Beta toxin and Group B Streptococcal Substance on red blood corpuscles and its use as a test for the identification of *Str. agalactiae*. J. of Path. and Bac. 59: N<sup>o</sup> 3, 367-371, 1947.
- 20.—NOCARD, E. et MOLLEREAU, F. — Sur une mammitte contagieuse des vaches laitières. Soc. Centr. de Med. Vet. Bull. et Mem. 2:308-314, 1884.
- 21.—PACKER, R. A. — Comunicación Personal. Iowa State College. Dic., 1948.
- 22.—PACKER, R. A. — Comunicación Personal. Iowa State College. Jul., 1951.
- 23.—TOPLEY, W. W. C. & WILSON, M. D. — Bacteriología e Inmunidad. I:365, 366, 367, 368, 569, 570, 571. Salvat, Edit. S. A. Barcelona, 1949.