

AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE *IN VITRO* A ANTIMICROBIANOS DE MICRORGANISMOS ISOLADOS NOS CASOS DE MASTITE NO MUNICÍPIO DE APODI/RN

A.M.A Carmo; R.C. Sales; A.P.A.C. Gracindo; G.F. Pereira; M.R. Abrantes; J.B.A. Silva; Ê.S. Sousa.

E-mail: marcos-andreystar@hotmail.com ; ritasales_1@hotmail.com; elika.sousa@ifrn.edu.br

RESUMO

A inflamação da glândula mamária ou mastite é o principal problema que afeta os rebanhos leiteiros, reduzindo a qualidade e a quantidade da produção e industrialização do leite e derivados. É causada por diversos agentes, sendo a maioria de origem bacteriana. Para o tratamento da doença, comumente são utilizados drogas antimicrobianas. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o perfil de sensibilidade antimicrobiana de microrganismos isolados de amostras de leite de vaca com mastite em propriedades leiteiras do município de

Apodi. Para os testes de sensibilidade antimicrobiana foram realizados a técnica de difusão em discos para 07 antibióticos, verificando-se que os mais eficazes foram a norfloxacin com 100% de sensibilidade e a amicacina com 93.3%. Os que apresentaram menor eficácia foram a penicilina e a eritromicina. Portanto é importante recorrer a testes de diagnóstico laboratoriais a fim de propor um adequado tratamento no animal com a droga que apresentou sensibilidade ao teste *in vitro* e melhores medidas de controle da doença em questão.

PALAVRAS-CHAVE: mastite, vacas leiteiras, sensibilidade antimicrobiana.

IN VITRO

EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL SENSITIVITY OF MICROORGANISMS ISOLATED FROM MASTITIS CASES IN APODI/ RN

ABSTRACT

The inflammation of the mammary gland or mastitis is the main problem affecting the dairy herds, reducing the quality and quantity of production and industrialization of dairy products. It is caused by different agents, the majority of bacterial origin. For treatment of disease, are commonly used antimicrobials. This study aimed to evaluate the antimicrobial susceptibility profile of microorganisms isolated from milk samples from cows with mastitis in dairy farms in the city of Apodi. For

antimicrobial susceptibility testing were performed disc diffusion technique to 07 antibiotics, verifying that the most effective were norfloxacin with 100% sensitivity and amikacin 93.3%. The least effective were penicillin and erythromycin. Therefore it is important to use diagnostic laboratory tests in order to propose an appropriate treatment to animals with a drug that showed *in vitro* sensitivity testing and better measures to control the disease in question.

KEYWORDS: Mastitis, dairy cattle, antimicrobial susceptibility.

1 INTRODUÇÃO

Conforme a Instrução Normativa nº 51 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2002).

A produção mundial de leite fluido foi cerca de 430.128 bilhões de toneladas em 2009, sendo os maiores produtores: a União Europeia com 133.800 bilhões de toneladas, os Estados Unidos com 85.820 bilhões de toneladas, a Índia com 45.800 bilhões de toneladas, a Rússia com 32.500 bilhões de toneladas e o Brasil, na quinta posição, com aproximadamente 28.790 bilhões de toneladas os maiores produtores (USDA, 2010).

A mastite ou infecção da glândula mamária, que na maioria das vezes tem origem bacteriana, é o principal problema que afeta os rebanhos leiteiros, reduzindo a qualidade e a quantidade da produção e industrialização do leite e derivados (FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004). É responsável por grandes perdas econômicas para indústria leiteira em todo o mundo, pois causa o aumento do descarte involuntário, aumento dos custos com tratamentos, diminuição da produção de leite e mudança na composição do leite, causando também, grandes preocupações a saúde pública, pela veiculação de microorganismos patogênicos aos humanos através da ingestão do leite (HALASA et al., 2007; BEECHER et al., 2010).

O *Staphylococcus aureus* é o principal agente etiológico da mastite, este produz uma variedade de fatores de virulência que são responsáveis pelas infecções intramamárias persistentes e subclínicas. (HWANG et al., 2010). A probabilidade de surgimento de uma infecção na glândula mamária está relacionada principalmente com o grau de exposição do teto aos microorganismos patogênicos, às oportunidades desses agentes penetrarem na glândula mamária e à habilidade da bactéria se multiplicar e sobreviver ao sistema imune (BRAMLEY et al., 1998).

No município de Apodi/RN, não diferente de outras cidades do país, é frequente o uso de antimicrobianos para o tratamento de mastites, porém não se conhece a eficácia desse manejo empírico e as contribuições para o desenvolvimento de resistência bacteriana com a utilização da prática. Nesse contexto, são necessárias pesquisas que se proponha a avaliar a susceptibilidade antimicrobiana dos agentes etiológicos envolvidos na mastite bovina, já que é relatado por diversos autores o incremento da resistência bacteriana devido ao uso indiscriminado de antibióticos (STILWELL; GONÇALVES, 2002).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MASTITE

A mastite é uma doença infecciosa complexa e economicamente importante para a produção de leite em todo o mundo, o que pode resultar em perdas substanciais devido a redução

da produção leiteira, aumento do abate de animais, despesas veterinárias e laboratoriais, além de perdas no potencial genético (LI et al., 2009).

Esta infecção pode manifesta-se de duas formas: clínica ou subclínica (PHILPOT; NICKERSON, 1991). A forma clínica caracteriza-se por apresentar sinais visíveis de inflamação na glândula mamária, além de grumos, pus ou qualquer modificação presente no leite; e subclínica onde não se evidencia os sinais inflamação no úbere e nem alterações macroscópicas no leite, porém apresenta mudança na sua composição (RIBEIRO et al., 2003).

A mastite pode ser classificada como contagiosa ou ambiental de acordo com o tipo de microrganismo causador das infecções no rebanho; podendo ainda ser caracterizada de acordo com dois modelos epidemiológicos, baseados no momento da infecção: mastite de ordenha e mastite de ambiente. A primeira ocorre durante a ordenha enquanto a segunda se dá nos intervalos entre as ordenhas (ESSLEMONT; KOSSAIBATI, 2002).

Os microrganismos contagiosos, presentes na pele do úbere e dos tetos do animal com ou sem mastite e os presentes no ambiente (ar, água, cama e fezes) propagam-se através de procedimentos de ordenha e de contaminação da maquinaria, de utensílios e das mãos dos ordenhadores, invadindo a glândula mamária, superando o mecanismo de defesa normal, estabelecendo-se o processo infeccioso (PRESTES; FILAPPI; CECIM, 2002; FERREIRA et al., 2006).

A maior parte das infecções da glândula mamária é causada por microrganismos (bactérias, fungos, leveduras). Mais de 200 espécies foram relacionadas com as infecções, porém menos de 20 foram descritas detalhadamente. Dentre elas as principais são: *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, *Corinebacterium bovis*, *Mycoplasma*, alguns coliformes, levedura, fungos e algas.

2.2 PRINCIPAIS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DA MASTITE

O diagnóstico clínico de mastite é simples, uma vez que há a presença de reação inflamatória, difusa ou focalmente, ou dolorosa em um ou mais quartos, não querendo deixar-se ordenhar, ou ainda sem alterações anatômicas, mas secretando leite com pus, grumos e/ou sangue. Todavia as mastites subclínicas, persistentes ou crônicas, que em alguns meses destroem a capacidade funcional da mama, causando prejuízos econômicos, podendo também propagar-se silenciosamente no rebanho, agravando os prejuízos e causando problema de saúde animal, não são diagnosticadas pelos métodos rotineiros de exame clínico (RADOSTITS et al., 2002).

Quando há invasão de um agente patogênico a glândula mamária, o organismo do animal reage mandando para o local, células de defesa, principalmente leucócitos, a maioria neutrófilos, para tentar reverter o processo infeccioso. Essas células de defesa somadas as células de descamação do epitélio secretor são chamadas células somáticas. (PEDERSEN et al., 2003). Deste modo, a inflamação ocasiona alteração na contagem de células somáticas, apresentando-se elevada, acima de 300.000 células/ mL de leite. (BEAUDEAU et al., 2002).

O aumento na CCS é a principal característica utilizada para o diagnóstico da mastite subclínica. Assim, existem vários testes de diagnósticos que avaliam o teor de células somáticas do

leite, e entre esses testes destacam-se o CMT (Califórnia Mastitis Test), o WMT (Wisconsin Mastitis Test) e a contagem eletrônica de células somáticas (RUPP et al., 2000), bem como exames microbiológicos do leite (PHILPOT; NICKERSON, 1991).

O CMT é um dos testes mais conhecidos e práticos para o diagnóstico da mastite subclínica, baseando-se na estimativa da contagem de células somáticas no leite. O reagente do CMT é um detergente que possui um indicador de pH. Quando o leite é misturado ao CMT em quantidades iguais, este reagente dissolve ou rompe a membrana das células de defesa (leucócitos) e o material genético (DNA) da célula é liberado. O DNA formará uma massa ou gel. Quanto maior o número de leucócitos, maior a quantidade de gel formada. O CMT deve ser feito com os primeiros jatos de leite, e a presença de sujeira, fezes e outras partículas não interfere no resultado do teste, pois não há material genético de leucócitos (HOE, 2005).

O resultado do teste é avaliado em função do grau de gelatinização ou viscosidade da mistura do leite e do reagente em bandeja apropriada. Os resultados são expressos em cinco escores: Negativo e Traços (um, dois e três sinais positivos), os quais apresentam correlação relativamente boa com a contagem de células somáticas (ESSLEMONT; KOSSAIBATI, 2002).

2.3 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Em função das infecções causadas na glândula mamária, os agentes antimicrobianos têm sido utilizados com frequência nas propriedades produtoras de leite (NASCIMENTO; MAESTRO; CAMPOS, 2001) visando o controle ou a prevenção de vacas lactantes ou secas (LUTHJE; SCHWARZ, 2006). Contudo, o uso sem critérios dessas drogas tem contribuído para o aumento progressivo da resistência bacteriana, culminando em sérios problemas do ponto de vista clínico devido as mesmas atuarem como agentes seletivos de microrganismos resistentes (MOTA et. al., 2005).

A resistência bacteriana tem se tornado um sério problema mundial, e os mecanismos de resistência têm sido identificados e descritos para todos os antimicrobianos atualmente utilizados na prática clínica na medicina veterinária (WHITE; McDERMOTT, 2001).

O Teste de Sensibilidade aos Antibióticos (TSA) é um exame laboratorial “in vitro” de rotina realizado na microbiologia clínica, é um ensaio que mede a susceptibilidade/resistência de uma bactéria a um ou mais agentes antimicrobianos. Por isso se configuram num importante método de informação na medicina veterinária, uma vez que proporciona ao clínico que atua diretamente com o produtor no campo, a seleção do mais efetivo agente antimicrobiano para uso no tratamento dos casos de mastites clínicas e subclínicas (WATTS et al., 1995).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido em duas fazendas de criação de bovinos, localizada no município de Apodi/RN, propriedade de média produção leiteira, com incidência de mastite clínica e subclínica (diagnosticadas pelo método Califórnia Mastitis Test - CMT) (SCHALM; NOORLANDER, 1957), nas matrizes em lactação.

As coletas do leite foram realizadas diretamente do teto afetado, após o diagnóstico da mastite clínica e/ou subclínica, pelo CMT. As amostras foram coletadas em frascos estéreis individuais, por teto afetado e identificados.

Para o procedimento de colheita das amostras, foi realizada inicialmente a limpeza das tetas do animal, utilizando água e detergente neutro, em seguida, enxugada com papel-toalha e, posteriormente, submetida à antissepsia empregando-se solução de álcool iodado. Depois, foram colhidos, em tubos de ensaio estéreis, aproximadamente 10 ml de leite dos tetos que apresentaram mastite clínica ou resultado positivo para mastite subclínica através do CMT.

Realizada as colheitas, os tubos foram acondicionados em caixas isotérmicas, contendo gelo reciclável, e transportados ao Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA da UFRSA para realização do teste de sensibilidade antimicrobiana *in vitro*.

Para o procedimento da análise, as amostras foram repicadas em ágar-sangue, contendo 7% de sangue desfibrinado de carneiro e incubadas a 37°C por 24 horas. Em seguida, foram submetidas a análises de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* através da técnica de difusão em discos, em Agar Mueller-Hinton, conforme metodologia descrita por Bauer et al. (1966), utilizando-se os seguintes discos impregnados de antibióticos: penicilina G (10 un), tetraciclina (30µg), amicacina (30µg), cefalexina (30µg), estreptomina (10 µg), norfloxacina (10µg) e eritromicina (15µg). O procedimento de leitura foi realizado medindo os halos de inibição formados ao redor dos discos, após 24h de incubação em estufa bacteriológica a 37°C; a interpretação será feita segundo a tabela de halos padronizada pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2003).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisados 13 animais, totalizando 17 quartos mamários. Destes, 02 (11,8%) apresentavam mastite clínica, 15 (88,2%) mastite subclínica diagnosticadas a partir do teste CMT.

Correlacionando o exame microbiológico ao teste do CMT, verificou-se que nos 15 quartos mamários que apresentaram mastite subclínica, reagentes ao CMT, 13 (86,67) foram positivos ao exame microbiológico. De acordo com COSTA et al. (1996), o CMT é um método auxiliar de boa correlação com o exame microbiológico, porém o processo inflamatório pode não ser de origem infecciosa.

O perfil de sensibilidade antimicrobiana das 15 amostras analisadas positivas ao exame microbiológico encontra-se na Tabela 1. Observou-se que os percentuais gerais de resistência para os grupos farmacêuticos da penicilina, eritromicina e cefalexina foram 86,7, 53,3 e 40%, respectivamente. Os antibióticos mais eficazes foram a norfloxacina com 100% de eficácia, seguida pela amicacina com 93,3% e a tetraciclina 80%. Já a estreptomina foi 73,4% eficaz.

Resultados semelhantes foram obtidos por BRITO et al. (2001) na Zona da Mata do Estado de Minas Gerais e por FREITAS et al. (2005) no Agreste do Estado de Pernambuco, que observaram que a norfloxacina apresentaram 100 e 96% de eficácia para cepas de estafilococos isoladas de mastite bovina, respectivamente. A alta eficácia da norfloxacina nas propriedades do estudo

ocorreu, possivelmente, devido ao pouco uso deste antibiótico em medicina veterinária, pois em nenhuma das propriedades estudadas este medicamento era utilizado para o tratamento da mastite.

Tabela 1 - Análise geral do perfil de sensibilidade antimicrobiana isoladas de amostras de leite de vacas com mastite clínica e subclínica no município de Apodi-RN, 2012.

Antibióticos	Classificação		
	S	I	R
Penicilina G (10 un)	13.3%	---	86.7%
Tetraciclina (30µg)	80.0%	6.7%	13.3%
Amicacina (30µg)	93.3%	---	6.7%
Cefalexina (30µg)	53.3%	6.7%	40.0%
Estreptomicina(10 µg)	73.4%	13.3%	13.3%
Norfloxacina (10µg)	100.0%	---	---
Eritromicina (15µg)	26.7%	20.0%	53.3%

Legenda: S: sensível; I: Intermediário; R: Resistente

Os resultados apresentados revelaram altos índices de resistência tanto para a penicilina quanto para a eritromicina. A penicilina pertence ao mesmo grupo de antibióticos beta-lactâmicos e geralmente os estafilococos mostram elevada resistência (acima de 70%) à penicilina G, bem como, ampicilina, amoxicilina e carbenicilina (TAVARES, 2000).

A resistência bacteriana revelada nas propriedades em estudo alerta aos profissionais para o trabalho de conscientização nas propriedades leiteiras, de modo a atuarem nas ações preventivas a mastite e no caso do surgimento da doença, recorrer a testes de diagnóstico laboratoriais a fim de escolher um adequado tratamento e melhores medidas de controle.

Desta forma, a utilização de antibióticos ineficazes e/ou o uso indiscriminado de antibióticos pode ocasionar a resistência, dos agentes responsáveis pela mastite bovina, aos antibióticos, dificultando ou impossibilitando o tratamento dos animais, acarretando maiores gastos e prejuízos para os produtores. Além da possibilidade de ocasionar problemas de saúde pública pela ingestão de resíduos de antibióticos eliminado no leite, caso não seja respeitado o período de carência do antibiótico.

De acordo com Brito; Lange (2005) os métodos de pasteurização têm pouco ou nenhum efeito sobre o conteúdo de antibiótico no leite, podendo causar o desenvolvimento de reações alérgicas ou tóxicas nos indivíduos que ingerem o leite contaminado com os resíduos de antimicrobianos.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho evidenciaram a ação biológica antibacteriana da norfloxacina, amicacina e tetraciclina e em menor grau, a estreptomina. No entanto, as fórmulas farmacêuticas sintéticas deverão ser comparadas com bactérias no próprio animal e apresentar índices semelhantes aos ensaios obtidos em laboratório para testar a eficiência das drogas para o controle de mastite bovina.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAUER, A.W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**. v.45, p.493-496, 1966.
- BEAUDEAU, F. et al. Risk of clinical mastitis in dairy herds with a high proportion of low individual milk somatic-cell counts. **Prev. Vet. Med.** v.53, p.43-54, 2002.
- BEECHER, C. et al. Polymorphisms in bovine immune genes and their associations with somatic cell count and milk production in dairy cattle. **BMC Genetics**., v.99, n.11, p. 1471-2156, 2010.
- BRAMLEY A.J. et al. Current Concepts of Bovine Mastitis. Madison: National Mastitis Council, 1998. 64 p.
- BRASIL. **Instrução Normativa n. 51, de 18 de setembro de 2002**. Regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade, coleta e transporte de leite. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Secretaria de Inspeção de Produto Animal, 2002, p. 39.
- BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; SILVA, M.A.S.; CARMO, R.A. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *S. aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.5, p.10-17, 2001.
- BRITO, M.A.V.P.; LANGE, C.C. Resíduos de antibióticos no leite. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2005.4p.(Embrapa Gado de Leite. Comunicado Técnico, 44).
- COSTA, E.O.; MIELVILLE, P.A.; RIBEIRO, A.R.; VIANI, F.C.; MASCOLLI, R.; LIVEIRA, P.J. Mastite bovina: CMT versus microbiológico. **Hora Veterinária**, v.15, n.89, p.53-54, 1996.
- ESLEMONT D., KOSSAIBATI M. Mastitis: how to get out of the dark ages. **Vet. J.**, v.164,p.85-86, 2002.
- FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C.A.F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, v.34, n.4, p.1315-20, 2004.
- FERREIRA, L.M. et al. Variabilidades fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas em casos de mastite subclínica bovina. **Ciência Rural**, v.36, n.4, p.1228-34, 2006.
- FREITAS, M.F.L.; PINHEIRO JÚNIOR, J.W.; STAMFORD, T.L.M.; RABELO, S.S. A.; SILVA, D.R.
- SILVEIRA FILHO, V.M.; SANTOS, F.G.B.; SENA, M.J.; MOTA, R.A. Perfil de Sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus coagulase positivos* isolados de leite de vacas com mastite no Agreste do Estado de Pernambuco. **Arq. Inst. Biol.**, v.72, n.2, p.171-177, 2005.
- HALASA, T. et al. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. **Vet. Quart.**, v.29, n.1, p.18-31, 2007.

- HOE, F. Artigos Técnicos Rehagro: Boas práticas no controle de mastite com o uso do CMT. 2005. Disponível em: <<http://rehagro.com.br/plus/modulos/noticias/ler.php?cdnoticia=724>>. Acesso em 30/10/2012.
- HWANG, S.Y. et al. *spa* typing and enterotoxin gene profile of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk in Korea. **J. Vet. Sci.**, v.11, n.2, p.125-131, 2010.
- LI, J. et al. Prevalence, genetic diversity, and antimicrobial susceptibility profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Zhejiang Province, China. **J Zhejiang Univ Sci B**, v.10, n.10, p.753-760, 2009.
- LUTHJE, P.; SCHWARZ, S. Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide–lincosamide resistance phenotypes and genotypes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.57, p. 966 – 969, 2006.
- MILKPOINT. Cadeia do leite: Projeto Balde Cheio é lançado no Estado RN. Disponível em <<http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/giro-lacteo/rn-projeto-balde-cheio-e-lancado-no-estado-66685n.aspx>> Acesso em: 02/04/2012.
- MOTA et al. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana **Braz J vet Res anim Sci**, v.42, n. 6, p. 465-470, 2005.
- NASCIMENTO, G. G. F., MAESTRO, V., CAMPOS, M. S. P. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. **Rev. Nutr.**, v.14, n.2, p.119-124, 2001.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS-NCCLS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 8th.ed. Wayne: NCCLS, 2003. (NCCLS document M2-A8).
- PEDERSEN, L.H., et al. Early pathogenesis and inflammatory response in experimental bovine mastitis due to *Streptococcus uberis*. **J. Comp. Path.** v.128, p.156-164. 2003.
- PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S.C. Mastitis: Counter Attack. A strategy to combat mastitis. Naperville: Babson Bros.Co., 1991.150 p.
- PRESTES, D.S.; FILAPPI, A.; CECIM, M. Susceptibilidade à mastite: fatores que a influenciam – uma revisão. **Revista da FZVA Uruguaiana**, v.7, n.5, p. 268-272, 2002.
- RADOSTITS, O. M. et al. Clínica Veterinária. Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002. 1737 p.
- RIBEIRO, M.E.R. et al. Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.9, n.3, p.287-290, 2003.
- RUPP, R. et al. Relationship between milk somatic-cell counts in the first lactation and clinical mastitis occurrence in the second lactation of French Holstein cows. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 46, p. 99-111. 2000.
- SCHALM, O.W. & NOORLANDER, D.O. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.130, n.5, p.199-207, 1957.
- STILWELL, G; GONÇALVES, A. R. Antibioticoterapia prática na clínica de bovinos In: CONGRESSO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, Oeiras, **Anais...**, Oeiras, p. 119-126. 2002.

TAVARES, W. Bactérias gram positivas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.33, n.3, p.281-301, 2000.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURA. **Dairy:World Markets and Trade/December 2009**. Disponível em <<http://www.fas.usda.gov/dlp/circular/2009/122909dairyfull.pdf>> Acesso em: 26/12/2011.

WATTS et al. Antimicrobial Susceptibility from the Mammary Glands of Microorganisms Isolated Dairy Heifers. **J Dairy Sci**. v.78, p. 1637-1648, 1995.

WHITE, D.G.; MCDERMOTT, P.F. Emergence and Transfer of Antibacterial Resistance. **J. Dairy Sci**. v. 84, p. 151-155, 2001.