

RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS DE *Enterococos* AISLADOS DE LECHE CRUDA

Antimicrobial Resistance of *Enterococci* Isolated from Raw Milk

José F. Faría Reyes¹, Kutchynskaya Valero Leal², Pedro Izquierdo Córser¹,
Aleida García Urdaneta¹ y María Allara Cagnasso¹

¹ Unidad de Investigación en Ciencia y Tecnología de los Alimentos (UDICTA), Facultad de Ciencias Veterinarias.

² Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina. La Universidad del Zulia, Apartado 15252, Maracaibo 4005-A, Venezuela.

Fax: 0261-7596158. E-mail: allara@mipunto.com poic@telcel.net.ve

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue determinar el patrón de resistencia de cepas de *Enterococcus* aisladas de leche cruda producida en el estado Zulia, positiva a la presencia de antibióticos, frente a un grupo de antimicrobianos betalactámicos, aminoglicósidos, fluoroquinolonas, macrólidos, lincomicina y quimioterápicos. En 200 muestras de leche se detectó la presencia de inhibidores microbianos por el método del cloruro de trifenilte-trazolío, identificándose los que eran antibióticos con el método del Disco Ensayo. Las 45 muestras positivas a la presencia de antibióticos fueron sembradas en agar sangre humana con el fin de aislar las cepas caracterizadas como cocos Gram positivos por morfología celular y tinción de Gram. La identificación de especie se realizó con pruebas bioquímicas. Se aislaron 17 *Enterococcus*, siendo las especies: 7 *E. avium*, 4 *E. faecium*, 2 *E. durans*, 2 *E. faecalis*, 1 *E. solitarius* y 1 *E. raffinosus*. Se realizaron a las 17 cepas pruebas de susceptibilidad a 15 antimicrobianos a través del método del disco de difusión en agar. Todas las especies mostraron resistencia múltiple al menos a tres antibióticos. *E. avium* fue la especie menos sensible al presentar resistencia a 12 de los 15 antimicrobianos, mientras que *E. faecalis* fue la especie menos resistente (3/15). El patrón de resistencia en orden descendente fue: penicilina, oxacilina, lincomicina, cefoxitin. Los antibióticos más efectivos fueron: imipenen, cefoperazone, amoxicilina/ácido clavulanico y fosfomicina.

Palabras clave: *Enterococcus*, leche cruda, antibióticos, resistencia.

ABSTRACT

The objective of this research was to determine the antibiotic resistance pattern of enterococci strains isolated from raw milk

produced in Zulia state, positive to the presence of antibiotics, against a group of antimicrobials: betalactamic, aminoglycosides, fluoroquinolonas, macrolides, lincomycin and chemotherapeutic. The presence of microbial inhibitors was detected among 200 samples of milk by the method of triphenyl tetrazolium chloride, identifying those that were antibiotics with the AOAC disk assay method. 45 positive samples were streaked in human blood agar. The strains were characterized as Gram-positive cocci by cell morphology and Gram staining. Those compatible with *Enterococcus* were identified with biochemical tests. Antimicrobial susceptibility test to 15 agent was performed through the agar diffusion disk method. A total of 17 enterococci strains were isolated: 7 *E. avium*, 4 *E. faecium*, 2 *E. durans*, 2 *E. faecalis*, 1 *E. solitarius* and 1 *E. raffinosus*. All the isolated species showed multiple resistance. at least to three antibiotics. *E. avium* was the most resistant specie, showing resistance to 12 of 15 antimicrobials. *E. faecalis* was the most sensitive (12/15). The resistance pattern in descending order was: penicillin, oxacillin, lincomycin, cefoxitin. The most effective antibiotics were: imipenen, cefoperazone, amoxicillin/clavulanic acid and phosphomicin.

Key words: *Enterococcus*, raw milk, antibiotics, resistance.

INTRODUCCIÓN

Desde hace más de 45 años los antibióticos se han usado para la prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas en animales. Además del uso terapéutico, estos compuestos algunas veces son incorporados en alimentos concentrados con el fin de promover el crecimiento animal al mejorar los beneficios nutricionales, generando un problema de salud pública la posterior aparición de sus residuos en los alimentos derivados de los animales tratados [5, 14, 23].

En el caso de la leche, las regulaciones internacionales establecen que ésta debe estar libre de sustancias inhibitorias, por ello en Estados Unidos de Norteamérica y en la Comunidad Económica Europea, la presencia de antibióticos en leche destinada para consumo humano es considerada ilegal, comercializándose solo aquella que proviene de animales sin reciente historia de terapia antimicrobiana y cuyo alimento se encuentra libre de antibióticos [17, 29].

En Venezuela es frecuente que la leche cruda se encuentre contaminada con residuos de antimicrobianos, debido a las pocas restricciones existentes en el uso de antibióticos en las explotaciones bovinas, lo que se ha evidenciado en algunas investigaciones realizadas en leche cruda producida en el Estado Zulia, entidad donde se genera más del 40% de la producción total nacional [9, 11, 26].

La presencia de residuos de antibióticos en leche tiene una repercusión negativa debido a las reacciones de hipersensibilidad que pueden provocar en algunos consumidores, igualmente por propiciar el desarrollo de resistencia en microorganismos presentes en ella, al producir un efecto similar al que se genera cuando un antimicrobiano es utilizado en dosis subterapéuticas en el tratamiento de una infección [5, 18].

Los enterococos forman parte de la flora intestinal normal de humanos y animales; su presencia en leche es indicativo de contaminación fecal y reflejo de las condiciones higiénico sanitarias de producción y manejo, las cuales en nuestro medio son generalmente muy deficientes [4, 10]. Situación que no ha limitado el empleo de la leche cruda en la elaboración de más del 50% del total de queso blanco que se consume en el país. De hecho, muchos quesos producidos en el Estado Zulia tienen recuentos de enterococos de alrededor de 1×10^7 ufc/g de queso [12, 13, 20].

Muchos autores han atribuido a alimentos muy contaminados con enterococos casos y brotes de intoxicaciones alimentarias; sin embargo, ha sido complicado demostrar su implicación, sugiriéndose una asociación sinérgica con algún otro microorganismo [18].

Además de la posibilidad de producir intoxicaciones alimentarias, los enterococos han emergido como agentes importantes de infecciones nosocomiales, siendo con frecuencia resistentes a múltiples antibióticos, principalmente debido a la transmisión extracromosómica o plasmídica a través de la modificación de enzimas [6, 8].

Dicha resistencia generalmente provoca que el éxito de la antibiótico terapia de infecciones enterocócicas dependa del efecto sinérgico de algunos antibióticos, característica que ha sido reportada para cepas de enterococos aisladas de alimentos, las que además son reconocidas como agentes propagadores de genes de resistencia a los antimicrobianos a través de la cadena alimentaria [19, 24].

Esta investigación fue realizada con el propósito de determinar la resistencia, frente a un grupo de antibióticos, de

enterococos aislados de leche cruda producida en el estado Zulia, la cual es positiva a la prueba de detección de residuos de antimicrobianos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de leche

Se recolectaron 200 muestras de leche cruda a nivel de cántaras en receptorías ubicadas en El Laberinto, Machiques de Perijá y la Costa Oriental del Lago de Maracaibo, estado Zulia-Venezuela. En envases de vidrio estériles se tomaron 25 mL de leche en forma aséptica, y se trasladaron bajo refrigeración hasta el laboratorio de Ciencia y Tecnología de la Leche de la Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad del Zulia, en un tiempo no mayor de 2 horas.

Detección de residuos de antimicrobianos

Para detectar la presencia de inhibidores microbianos fue utilizado el método del cloruro de trifeniltetrazolio (CTT) (Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio) [15], y la prueba del Disco Ensayo (DE) (Difco Laboratories) propuesto por la AOAC [1], utilizando *Bacillus stearothermophilus* variedad *calidolactis*. Se consideraron muestras con residuos de antimicrobianos aquellas que dieron resultado positivo a ambas pruebas.

Aislamiento e identificación de las cepas bacterianas

Las muestras positivas al CTT y al DE se sembraron en agar sangre humana y se incubaron a 37°C por 24 horas. A las colonias se les realizó frotis y tinción de Gram, las cepas caracterizadas como cocos Gram positivos compatibles con enterococos se identificaron hasta especie con pruebas bioquímicas de acuerdo a lo propuesto en el manual de Bergey [3].

Antibiogramas

Los microorganismos identificados como enterococos se sembraron en caldo soya tripticasa (CST) y se incubaron a 37°C por 24 horas. El cultivo obtenido fue diluido con solución salina fisiológica estéril hasta obtener una densidad equivalente al estándar N° 0,5 de Mac Farland. Posteriormente, se aplicó el método del Disco de Bauer y col. [2], utilizando discos comerciales (BBL, DIFCO, OXOID) con las concentraciones para los antimicrobianos señalados en la TABLA I. Las placas fueron incubadas a 37°C por 24 horas y el criterio de sensibilidad o resistencia a cada agente fue determinado según las especificaciones del fabricante. Los resultados se presentan en forma de gráficos, como porcentajes de resistencia, para las diferentes especies de enterococos encontradas.

TABLA I
CONCENTRACION DE LOS ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS EN LA PRUEBA DE DIFUSIÓN EN AGAR

Antimicrobiano	Contenido del disco
Betalactámicos	
Penicilinas naturales	
Penicilina G	10 unidades
Penicilina resistente a penicilinas	
Oxacilina	1 µg
Carbapenem	
Imipenem	10 µg
Inhibidores de betalactamasa	
Amoxicilina/ac. Clavulánico	
Cefalosporina de 1era generación	20/10 µg
Cefazolin	
Cefalosporina de 2da generación	30 µg
Cefoxitin	
Cefalosporina de 3era generación	30 µg
Cefoperazona	75 µg
Aminoglicósido	
Amikacina	30 µg
Netromicina	30 µg
Tobramicina	10 µg
Fluoroquinolonas	
Ciprofloxacina	5 µg
Macrólidos	
Eritromicina	15 µg
Lincosamidas	
Lincomicina	1 µg
Otros	
Triple sulfa	1 µg
Fosfomicina	50 µg

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 200 muestras de leche cruda analizadas, 45 resultaron positivas a la prueba de detección de residuos de antimicrobianos, y de éstas se aislaron 17 cepas del género *Enterococcus*: 7 *E. avium*, 4 *E. faecium*, 2 *E. durans*, 2 *E. faecalis*, 1 *E. solitarius* y 1 *E. raffinosus*.

En la FIG. 1 se muestran los resultados de los antibiogramas para los enterococos aislados de las muestras de leche. *E. avium*, especie encontrada frecuentemente en el intestino del pollo, fue la de menor susceptibilidad al presentar resistencia a 12 de los 15 antimicrobianos probados, seguida por *E. faecium* con resistencia a 10, *E. raffinosus* a 7, *E. durans* y *E. solitarius* a 5, y *E. faecalis* con resistencia a 3.

Susceptibilidad a Betalactámicos

Todas las cepas de enterococos aisladas fueron resistentes a penicilina y oxacilina. Los enterococos han sido reconocidos por su baja susceptibilidad a la penicilina, tanto para cepas de origen humano como en las aisladas de leche. El alto nivel de resistencia frente a este antibiótico, no atribuible a la producción de β -lactamasa, ha sido asociado con sobrepro-

ducción y sustitución de aminoácidos en la PBP 5, una proteína ligadora con baja afinidad para penicilina [25].

Para la oxacilina, una penicilina resistente a la penicilinas, se ha reportado una elevada resistencia por parte de los enterococos [22], en concordancia con lo encontrado en la presente investigación. En medicina veterinaria este antibiótico es usado preferentemente contra estafilococos resistentes a la penicilina, y también contra los estreptococos β -hemolíticos, para quienes se reportan concentraciones mínimas inhibitorias de oxacilina muy inferiores a las del *E. faecalis* [16], especie que en este estudio presentó resistencia solo a penicilina, oxacilina y triple sulfa.

Las 17 cepas aisladas de enterococos fueron sensibles al imipenem. Este antibiótico β -lactámico, es el más activo que se dispone (*in vitro*) contra diversas bacterias, debido a su resistencia a la hidrólisis por parte de casi todas las β -lactamasas. En otros estudios han caracterizado a los enterococos como sensibles a este antimicrobiano [21].

La combinación de amoxicilina y ácido clavulánico fue efectiva contra todos los enterococos, con excepción para *E. avium*, especie donde el 20% de las cepas fueron resistentes. Los inhibidores de β -lactamasa como el ácido clavulánico se

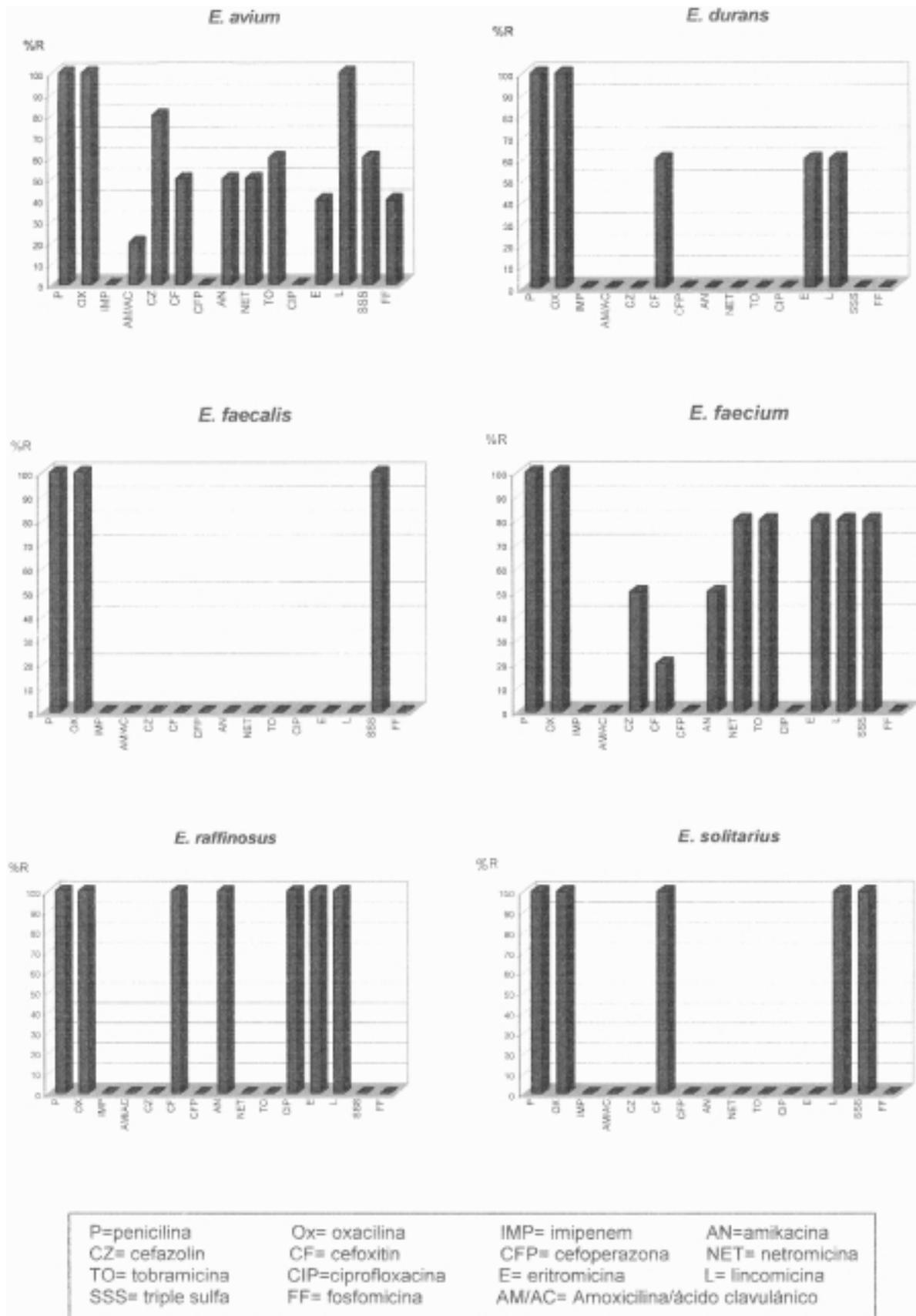


FIGURA 1. ANTILOGRAMAS DE *ENTEROCOCCUS* AISLADOS DE LECHE CRUDA.

utilizan para ampliar el espectro de las penicilinas contra microorganismos productores de dicha enzima [16].

Con respecto a las cefalosporinas se encontró que algunas cepas de *E. avium* y *E. faecium* fueron resistentes a las de 1era y 2da generación, *E. durans*, *E. raffinosus* y *E. solitarius* lo fueron solo frente a la de 2da generación; mientras que *E. faecalis* fue sensible a las tres generaciones de cefalosporinas probadas. Las cefalosporinas de segunda generación generalmente son menos activas contra cocos Gram positivos que las de primera generación [21], correspondiéndose esto con los resultados encontrados. La sensibilidad de *E. faecalis* aisladas de leche frente a cefalosporinas ha sido reportada en otro estudio [22].

Susceptibilidad a Aminoglucósidos

Las cepas de *E. durans*, *E. faecalis* y *E. solitarius* fueron susceptibles a los tres aminoglucósidos ensayados (amikacina, netromicina y tobramicina). Por su parte, *E. raffinosus* fue resistente solo a amikacina, mientras que *E. avium* y *E. faecium* fueron resistentes a los tres aminoglucósidos. La resistencia de los enterococos a los aminoglucósidos es atribuida a la producción de enzimas inactivadoras mediadas por plásmidos [7]. Los niveles de resistencia a este grupo de antibióticos son más elevados en cepas de enterococos de origen humano que en las aisladas de muestras de leche [7, 8].

El desarrollo de resistencia a los aminoglucósidos por parte de los enterococos ha sido reconocido como un serio problema, al reducirse las opciones terapéuticas, por cuanto el efecto sinérgico alcanzado con la combinación de un betalactámico o un glicopéptido con un aminoglucósido, que es generalmente efectivo en el tratamiento de infecciones enterocócicas severas, puede verse disminuido.

Susceptibilidad a Fluoroquinolonas

Solo la cepa aislada de *E. raffinosus* fue resistente a la ciprofloxacina. Esta cepa además fue resistente a amikacina, lo que concuerda con lo reportado en la literatura, donde se señala que la resistencia a ciprofloxacina está asociada a resistencia con aminoglucósidos [28].

Susceptibilidad a Macrólidos

E. faecalis y *E. solitarius* fueron sensibles a la eritromicina, mientras que las otras especies presentaron resistencia. La eritromicina pertenece al grupo de antibióticos activos preferentemente contra los microorganismos Gram positivos, sin embargo, para cepas de enterococos aislados de humanos el uso de este antibiótico no está justificado debido a los altos porcentajes de resistencia [8]. También para el caso de cepas aisladas de leche se reportan altos niveles de resistencia [7].

Susceptibilidad a Lincomicina

Frente a la lincomicina solo *E. faecalis* presentó susceptibilidad, a pesar que algunos autores [27, 30], han reportado moderada actividad de la lincomicina sobre los enterococos.

Susceptibilidad a Fosfomicina y Triple Sulfa

De estos dos antimicrobianos, la fosfomicina fue más efectiva, al encontrarse que solo el 40% de las cepas de *E. avium* fueron resistentes, mientras que frente a triple sulfa fueron sensibles solo *E. durans* y *E. raffinosus*. Las sulfas son consideradas de amplio espectro y se espera una disminución de la resistencia a ellas por el poco uso que se les ha dado en los últimos años.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las especies de enterococos aisladas de las muestras de leche cruda contaminada con residuos de antimicrobianos fueron; *E. avium*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. solitarius* y *E. raffinosus*.

E. avium fue la especie que presentó resistencia a mayor número de antimicrobianos (12/15), mientras que *E. faecalis* fue la menos resistente (3/15).

Los betalactámicos más efectivos contra los enterococos aislados fueron el imipenen, la combinación amoxicilina/ácido clavulánico y la cefalosporina de primera generación cefazolin.

Las cepas de *E. avium* y *E. faecium* fueron resistentes a los aminoglucósidos amikacina, netromicina y tobramicina. Solo *E. raffinosus* fue resistente a la ciprofloxacina.

Todas las especies presentaron cepas resistentes a eritromicina y lincomicina, a excepción de *E. solitarius* para eritromicina y *E. faecalis* para ambos compuestos.

Ante la fosfomicina se encontró una mayor sensibilidad de los enterococos que con respecto a la triple sulfa.

Por la probable transmisión de cepas multirresistentes al hombre a través de la ingestión de productos lácteos no pasteurizados, se recomienda determinar el origen de las cepas resistentes de enterococos aisladas de leche cruda, así como establecer la concentración inhibitoria mínima a los aminoglucósidos y analizar los plásmidos asociados con resistencia a éstos, debido a la importante aplicación terapéutica en el tratamiento de infecciones producidas por enterococos.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de La Universidad del Zulia (CONDES-LUZ), por el apoyo financiero para la realización del presente estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis**. 9th edition. Washington, D.C. 138 pp.1990.
- [2] BAUER, A.; KIRBY, W.; SHERRIS, J.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.** 45: 493-496.1966.

- [3] BERGEY, D. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 8th edition. Edit. "Williams & Wilkins company". Baltimore, USA. 1600 pp.1984.
- [4] BOSCÁN, L.; FARÍA, J.; SÁNCHEZ, M.D. Calidad química y microbiológica de la leche en Venezuela. Cap. IX. In: **Ganadería Mestiza de Doble Propósito**. Ed. González Stagnaro, C. 1era edición. Ediciones Astro Data S.A. Maracaibo, Venezuela. p. 605-629. 1992.
- [5] BRADY, M.; WHITE, N.; KATZ, S. Resistance development potential of antibiotic/ antimicrobial residue levels designated as "safe levels". **J. Food Prot.** 56(3): 229-233. 1995.
- [6] BUSH, L.M.; CALMON, J.; CHERNEY, C.L. High level penicillin resistance among isolates of enterococci: implications for treatment of enterococcal infections. **Ann. Intern. Med.** 110:515-520. 1989.
- [7] COMEGNA, M.; GUZMÁN, M.; CARMONA, O.; MOLINA, M.; Grupo colaborativo del grupo venezolano de resistencia bacteriana. Resistencia bacteriana a los antimicrobianos en Venezuela. Nuevos hallazgos. **Bol. Soc. Ven. Microb.** 20 (1): 58-63. 2000.
- [8] CONTRERAS, R.; TEIXEIRA, G.; INCIARTE, L.; SANZ, L.; CARMONA, L. Grupo de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos en Venezuela. Resistencia de enterococos a los antimicrobianos en Venezuela. **Bol. Soc. Ven. Microb.** 15 (1): 11-15. 1995.
- [9] FARÍA, J.; GARCÍA, A.; MÁRQUEZ, A.; MANZANILLA, B.; MORALES, D.; GARCÍA, A.U. Resistencia a los antimicrobianos de *Staphylococcus* aislados de leche cruda. **Rev. Cient. FCV-LUZ.** 9(4): 343-348. 1999.
- [10] FARÍA, J.; BOSCÁN, L.; CHOURIO, L. Contribución al estudio de la calidad de la leche en el Distrito Perijá del estado Zulia. XXIV Convención anual de la ASOVAC. **Acta Científica Venezolana.** p 87. 1974.
- [11] FARÍA, J.; RIVERO, Z.; GALLEGOS, B.; GARCÍA, A. Resistencia a los antimicrobianos y concentración inhibitoria mínima (CIM) de enterobacterias aisladas de leche cruda. **Rev. Cient. FCV-LUZ** 8(4): 315-322. 1998.
- [12] FERRER, A.; URDANETA, D.; RINCON, Z. Evaluación físico-química y microbiológica del queso palmita venezolano. **Rev Ciencias.** 133-147. 1987.
- [13] FERRER, A.; URDANETA, D.; RINCON, Z.; CABREIRA, L.; BASANTA, Y. Microflora isolated from Venezuelan "Palmita type" cheese. **J. Food. Prot.** 54: 856-860. 1991.
- [14] GORBACH, S.L. Antimicrobial use in animal feed. Time to stop. **N. Engl. J. Med.** 343 (16): 1202-1203. 2001.
- [15] HANDS, A.H. Assay of inhibitory substance. **J. Soc. Dairy Tech.** 42 (4):92-93.1989
- [16] HANS, T. **Antibióticos en Medicina Veterinaria**. Edición en lengua española. Editorial ACRIBIA. Zaragoza, España. 230 pp.1980.
- [17] HEESCHEN, W.H. Hygienic quality requirements for raw milk and dairy products and their production, manufacture and sale in the European Community. **Milchwirtschaftslehre.** 112: 117-129. 1992.
- [18] INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOOD (ICMSF). **Ecología Microbiana de los Alimentos**. Edición en lengua Española. Vol. II. Editorial ACRIBIA. Zaragoza, España.378 pp. 1980.
- [19] KNUDTSON, L.M.; HARTMAN, P.A. Antibiotic resistance among enterococcal isolates from environmental and clinical sources. **J. Food Prot.** 56(6):489-492. 1993.
- [20] LÓPEZ, N. Valoración de las normativas legales existentes en Venezuela para la producción de queso y su incidencia en los aspectos higiénico-sanitarios. **Rev. Fac. Ciens. Vet. UCV.** 38 (8): 64-70. 1992.
- [21] MANDELL, G.L.; PETRI, W.A. Fármacos antimicrobianos. Penicilinas, cefalosporinas y otros antibióticos β -lactámicos. En: **Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica**. (Des) Hardman, J.; L. Limbird, P. Molinoff, R. Ruddon y A. Goodman. Goodman & Gilman. Editorial McGraw-Hill. 9na edición. México D.F. p. 1141-1171. 1996.
- [22] OWENS, W.E.; WATTS, L.; GREENE, B.B.; RAY, C.H. Minimum inhibitory concentrations and disk diffusion zone diameter for selected antibiotics against *Streptococci* isolated from bovine intramammary infections. **J. Dairy Sci.** 73:1225-1231. 1990.
- [23] PERRETEEN, V.; SCHWARZ, F.; CRESTA, L.; BOEGLIN, M.; DASEN, G.; TEUBER, M. Antibiotic resistance spread in food. **Nature** 7:801-805. 1998.
- [24] PERRETEEN, V. Distribution, molecular characterization and genetic mobilization of antibiotic resistance genes in enterococci, staphylococci and lactic acid bacteria isolated from food. **Disert. Abstr. Intern.** 57 (9): p 102. 1996.
- [25] QUINTILIANI, R.; SAHM, D.F.; COUVALIN, P. Mechanisms of resistance to antimicrobial agents. In: **Manual of Clinical Microbiology**. (Des) Murray, P.; Baron, E.; Pfaller, M.; Tenover, E.; Tenover, R. (Eds). 7th edition. ASM Press. Washington, D.C. p. 1505-1525. 1999.
- [26] RIVERO, Z.; FARÍA, J.; SANTORO, R. Aislamiento de Gram negativos en leche cruda con antibióticos. **Rev. Cient. FCV-LUZ.** 4(1):11-16. 1994.
- [27] SALMON, S.A.; WATTS, J.L.; ARESTRUP, F.M.; PANKEY, J.W.; YANCEY, R.J. Minimum inhibitory concentrations for selected antimicrobial agents against or-

- ganisms isolated from the mammary glands of dairy heifers in New Zealand and Denmark. **J. Dairy Sci.** 81 (2): 570-578. 1998.
- [28] SCHABERG, D.R.; DILLON, W. I.; TERPENNING, M.S.; ROBINSON, K.A.; BRADLEY, S.F.; KAUFFMAN, C.A. Increasing resistance of enterococci to ciprofloxacin. **Antimicrob. Agents Chemother.** 36(11): 2533-2535. 1992.
- [29] STRIBLING, J.H. Animal drug requirements of the federal food, drug and cosmetic In: **Proceedings of the symposium on animal drug use-dollar and sense.** (De) Stefan, G.E. Center for Veterinary Medicine, Food and Drug Administration, Rockville, Maryland. act.p. 29-36. 1987.
- [30] WATTS, J.L.; SALMON, S.A.; YANCEY, R.J.; NICKERSON, S.C.; WEAVER, L.J.; HOLMBERG, C.; PANKEY, J.W.; FOX, L.K. Antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from the mammary glands of dairy heifers. **J. Dairy Sci.** 78 (7): 1637-1648. 1995.