



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

IDENTIFICAÇÃO DE *Staphylococcus* spp. EM CABRAS PRIMÍPARAS
ASSOCIADAS A MASTITE SUBCLÍNICA

Camila Pereira da Silva

Areia, 2016



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**IDENTIFICAÇÃO DE *Staphylococcus* spp. EM CABRAS PRIMÍPARAS
ASSOCIADAS A MASTITE SUBCLÍNICA**

Camila Pereira da Silva

**Trabalho de conclusão de curso
apresentado como requisito parcial
para obtenção do título de Bacharel em
Medicina Veterinária pela Universidade
Federal da Paraíba, sob orientação do
Profº. Danilo Tancler Stipp.**

Areia, 2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

FOLHA DE APROVAÇÃO

Camila Pereira da Silva

**IDENTIFICAÇÃO DE *Staphylococcus* spp. EM CABRAS PRIMÍPARAS
ASSOCIADAS A MASTITE SUBCLÍNICA**

Trabalho de conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em **Medicina Veterinária**, pela Universidade Federal da Paraíba.

Aprovada em:

Nota:

Banca Examinadora

Prof.º Dr.º Danilo Tancler Stipp, UFPB.
(Orientador)

Prof.ª Dra. Suzana Aparecida Costa de Araújo, UFPB.

Msc. Candice Maria Cardoso Gomes de Leon, Doutoranda em Zootecnia, UFPB.

Aos meus amados pais, que há 24 anos me deram a vida e até hoje cuidam de mim com tanto carinho e dedicação. Vocês me ofereceram oportunidades de estudo que nunca tiveram, e por causa de vocês e de seus esforços, pude concluir mais uma etapa em minha vida, por isso dedico este trabalho a vocês, como forma de agradecimento e reconhecimento por tudo que fizeram e fazem por mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pelas oportunidades que me foram concedidas.

Aos meus pais, pelo amor que me motiva a cada dia e por terem feito o possível e o impossível por mim.

A minhas irmãs, por serem o meu porto seguro e por todo o apoio e compreensão que demonstraram durante esses anos.

A Robério e sua família, por tudo que vivemos juntos, as dificuldades e as alegrias. Obrigada por estarem sempre ao meu lado.

Ao professor Danilo Tancler Stipp, por ter aceitado meu pedido de orientação, pelos ensinamentos e disponibilidade de sempre.

Ao professor Celso José Bruno de Oliveira, pela oportunidade de estágio, confiança e incentivo durante esses cinco anos de orientação.

Aos meus preceptores, Geovania, Candice e Mauro, pela paciência com que me ensinaram, pelo apoio e por se dedicarem a fazer a rotina do laboratório um lugar melhor.

A todos os professores do curso de Medicina Veterinária, que contribuíram com seu conhecimento ao longo desse curso, em especial a professora Suzana Aparecida Costa de Araújo, pelo saber transmitido, disponibilidade e paciência que demonstrou no apoio ao meu projeto de extensão.

Aos meus amigos, que sempre me apoiaram e compreenderam a distância. E também aos meus colegas de turma, que se tornaram amigos de vida, pelos bons momentos que passamos juntos, pelas madrugadas de estudo e todo amor construído durante essa longa jornada.

RESUMO

SILVA, Camila Pereira da, Universidade Federal da Paraíba, Dezembro de 2016. **Identificação de *Staphylococcus* spp. em cabras primíparas associadas a mastite subclínica.** Orientador: Prof. Dr. Danilo Tancler Stipp. Co-orientador: Prof. Dr. Celso Jose Bruno de Oliveira.

A mastite é uma enfermidade complexa, resultante da interação entre o animal e o ambiente, associada à presença de microrganismos na maioria dos casos. Constitui-se em importante problema de saúde animal e de saúde pública, com grande repercussão econômica em praticamente todos os países do mundo. No entanto, o conhecimento sobre a etiologia desta enfermidade em cabras de primeira cria é escasso. O objetivo deste estudo foi investigar a ocorrência da mastite subclínica causada por bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. em cabras no período pré-parto ou nas primeiras semanas pós-parto. Um estudo longitudinal composto por três amostragens (uma pré-parto e duas pós-parto) foi realizado em duas propriedades de caprinos de leite localizadas na Paraíba. Foram coletadas amostras de secreção de leite pré-parto e leite pós-parto de cabras primíparas para análise de cultura microbiológica. Foi possível afirmar que microrganismos associados a mastite caprina estão presentes no colostro e leite de cabras primíparas no período pré-parto e pós parto, principalmente bactérias do gênero *Staphylococcus* spp.

PALAVRAS-CHAVE: *Staphylococcus*, Mastite caprina, Cabras primíparas.

ABSTRACT

SILVA, Camila Pereira, Federal University of Paraiba, December 2016. **Identification of *Staphylococcus* spp. in primiparous goats associated with subclinical mastitis.** Adviser: Prof. Dr. Danilo Tancler Stipp. Co-adviser: Prof. Dr. Celso Jose Bruno de Oliveira.

Mastitis is a complex disease resulting from the interaction between animal and environment associated with the presence of microorganisms in most cases. It constitutes a major problem of animal health and public health, with great economic impact in almost every country in the world. However, the knowledge about the etiology of this disease in primiparous goats is scarce. The aim of this study was to investigate the occurrence of subclinical mastitis caused by *Staphylococcus* spp. in primiparous goats in the antepartum period or in the first weeks postpartum. A longitudinal study consisting of three samples (one antepartum and two post-partum) was performed in two dairy goat farms located in Paraiba State. Prepartum colostrum and postpartum milk were sampled from primiparous goats for culture analysis. It was possible to state that microorganisms associated with goats mastitis are present in colostrum and milk of primiparous goats in the prepartum and postpartum period, mainly *Staphylococcus* spp.

KEYWORDS: *Staphylococcus*, goat mastitis, primiparous goats.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. MATERIAL E MÉTODOS	10
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	11
4. CONCLUSÃO	15

1. INTRODUÇÃO

A caprinocultura destinada à exploração leiteira tem apresentado grande perspectiva econômica no Brasil (GUIMARÃES et al., 1989). Segundo o Ministério da Agricultura, pecuária e abastecimento (MAPA, 2016), a região Nordeste do país mantém o maior efetivo de cabras no total nacional. A caprinocultura leiteira sempre se apresentou como uma atividade promissora, mas até ser transformada em negócio eficiente e rentável, verifica-se que existem pontos de estrangulamento em todo o seu arranjo produtivo, como por exemplo, má qualidade e falta de padronização dos produtos e subprodutos do leite caprino, mercados inconstantes sem política de preços, produtores não capacitados e animais inadequados para a produção leiteira (RODRIGUES e QUINTANS, 2003). De fato, com o incremento da produção do leite de cabra, assumem importância os estudos relacionados a afecções da glândula mamária (GUIMARÃES et al., 1989).

A mastite é uma enfermidade complexa, resultante da interação entre o animal e o ambiente, associada à presença de microrganismos na maioria dos casos. Constitui-se em importante problema de saúde animal e de saúde pública, com grande repercussão econômica em praticamente todos os países do mundo (SANDHOLM e PYÖRÄLÄ, 1995). Pode ser classificada, de acordo com sua origem ou habitat dos microrganismos e forma de transmissão, em ambiental e contagiosa, e conforme a intensidade da resposta inflamatória, em clínica ou subclínica. A mastite subclínica tem sido considerada a forma mais preocupante, pois não manifesta sinais evidentes da doença (LANGONI, 1999). De acordo com Castro et al. (2001), a mastite caprina gera graves prejuízos econômicos devido ao descarte do leite, custos com medicamentos e assistência veterinária, aumento da mão de obra, redução da qualidade e quantidade do leite e seus subprodutos.

O diagnóstico da mastite clínica pode ser feito através da sintomatologia, como inflamação do úbere, secreção láctea com grumos, sangue, pus, entre outras secreções patológicas. Entretanto, para diagnosticar a mastite subclínica é necessária a utilização de exames complementares baseados no conteúdo celular do leite, como o California Mastitis Test (CMT) e a Contagem de Células Somáticas (CSS). Além disso, existe a necessidade da cultura e isolamento dos agentes etiológicos envolvidos, para a implantação de métodos de tratamento e estratégias de controle e profilaxia adequados (LANGONI, 1999).

O conhecimento dos agentes etiológicos da mastite de uma determinada região é de suma importância para a adoção de medidas higiênicas adequadas e para o controle da doença, assim como para melhor entender seus aspectos epidemiológicos e patológicos (MOTA et al., 2002).

Dentre os agentes etiológicos identificados na mastite caprina, a maioria é similar àqueles encontrados na espécie bovina, entre eles *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa, *Streptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Micrococcus* spp. e *Pasteurella* spp. (LIMA JÚNIOR et al., 1993). No entanto, os casos existentes de controle e tratamento desta enfermidade contemplam exclusivamente as cabras adultas, sejam secas ou em lactação, ficando as cabritas sem a devida atenção, pois acredita-se que essa classe de animais seja livre da enfermidade por possuírem o óstio do teto fechado e ainda não sofrerem os efeitos deletérios de ordenhas diárias.

Tendo em vista a importância da caprinocultura para a região Nordeste do Brasil, as perdas econômicas ocasionadas pela mastite e a escassez de informações sobre essa doença nas cabritas, objetivou-se com este trabalho investigar a ocorrência da mastite subclínica causada por bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. em cabras no período pré-parto e nas primeiras semanas pós-parto.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Um estudo longitudinal foi realizado em duas propriedades institucionais de rebanhos caprinos (A e B), localizadas no Centro de Ciências Agrárias (CCA) em Areia e no Centro de Ciências Humanas, Sociais e Agrárias (CCHSA) em Bananeiras, Universidade Federal da Paraíba, Brasil. De cada propriedade, 7 cabras primíparas foram selecionadas e identificadas. O número de animais incluídos no estudo foi definido com base no número de animais disponíveis no rebanho. Em cada propriedade foram coletadas amostras dos animais em três amostragens. A primeira coleta foi realizada antes do parto, e as duas últimas coletas foram realizadas aos 15 e 30 dias após a primeira coleta.

Foram coletadas amostras do teto direito e esquerdo de todos os animais, ressaltando que um animal proveniente da propriedade B possuía o teto esquerdo atrofiado, sendo possível a coleta de amostras apenas da metade mamaria direita. Assim, foram analisadas durante todo o estudo, 27 amostras de colostro pré-parto e 54 amostras de leite pós-parto de cabras primíparas.

Antes de realizar a coleta das amostras, os animais foram submetidos a exame físico e a saúde do úbere foi avaliada clinicamente por meio do teste da caneca telada para detecção de mastite clínica. Estas amostras foram colhidas de forma asséptica, os tetos foram previamente lavados com solução de hipoclorito e secados com papel toalha descartável. Os tetos foram imersos em solução de álcool iodada antes e após a coleta das amostras de leite, seguindo os procedimentos do Conselho Nacional de Mastite (CNM, 1996). As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas refrigeradas e encaminhadas para o Laboratório de Análises de Produtos de Origem Animal (LAPOA).

Cultura microbiológica convencional para isolamento de *Staphylococcus* foi realizada de acordo com o NMC (1996). As amostras foram semeadas em ágar sangue, ágar MacConkey e ágar manitol salgado. Após cultura aeróbica durante 24 a 48 h a 35 ° C, as colônias foram analisadas por coloração de Gram e teste da catalase. Isolados de colostro e leite de cabras primíparas considerados gram positivos e catalase positivos foram identificados por um painel bioquímico em microplaca (Combo PC33, a Siemens Healthcare, Malvern, PA), utilizando um sistema semi-automatizado (Autoscan 4, Siemens Healthcare, Malvern, PA). Os dados foram armazenados e analisados utilizando o Microsoft Office Excel.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolados foram obtidos a partir de 14 das 81 amostras de leite e colostro (17,3%), das quais 4 (28,5%) foram provenientes da propriedade A e 10 (71,4%) da propriedade B. Os isolados obtidos durante o estudo e a frequência de isolamento está representada na TABELA 1.

Tabela 1. Isolados obtidos a partir de 14 amostras de colostro e leite de cabras primíparas provenientes de rebanhos caprinos leiteiros localizados na Paraíba, Brasil.

Microrganismo	Número	%
<i>S. aureus</i>	6	40,0
<i>S. hyicus</i>	2	13,3
<i>S. haemolyticus</i>	1	6,6
<i>S. epidermidis</i>	2	13,3
<i>S. cohnii</i>	1	6,6
<i>S. xylosus</i>	1	6,6
<i>Micrococcus</i>	2	13,3
Total	15	100,0

O gênero *Staphylococcus* predominou entre os isolados e a maioria deles eram estafilococos coagulase-negativa (ECN) como *S. hyicus* (13,3%), *S. haemolyticus* (6,6%), *S. epidermidis* (13,3%), *S. cohnii* (6,6%) e *S. xylosus* (13,3%). O gênero *Micrococcus* foi observado em duas amostras. Este resultado corrobora com os achados de Mota et al. (2002) e Contreras et al. (2007), os quais apontam o gênero *Staphylococcus* como o principal microrganismo identificado no leite de cabras com mastite.

A mastite clínica foi detectada, por meio do teste da caneca telada, em uma metade mamária de uma cabra primípara no período pré-parto (1/13) proveniente da propriedade B em todas as três coletas. *Staphylococcus aureus* foi isolado a partir do colostro e do leite desse animal nas três coletas, mas uma co-infecção por *S. hyicus* foi confirmada na segunda coleta, como mostra a TABELA 2.

Tabela 2. Frequência de *Staphylococcus* spp. isolados a partir de amostras de colostro pré-parto e amostras de leite 15 e 30 dias pós-parto em cabra primípara com mastite clínica em uma propriedade de caprinos leiteiros localizada na Paraíba, Brasil.

Amostras	Propriedade B		
	1 ^a (pré-parto)	2 ^a (15dias)	3 ^a (30dias)
	1/13		
Colostro	<i>S. aureus</i>	-	-
		1/13	1/13
Leite	-	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
		<i>S. hyicus</i>	
- Não coletado			

Por outro lado, nenhum dos outros animais (13 primíparas) investigados apresentou mastite clínica durante todo o período do estudo. A frequência de cultura microbiológica positiva nas três amostragens realizadas nas propriedades A e B, para os animais em que mastite clínica não foi observada, está representada nas TABELAS 3 e 4.

Tabela 3. Frequência de *Staphylococcus* spp. e *Micrococcus* isolados a partir de amostras de colostro pré-parto e amostras de leite 15 e 30 dias pós-parto em cabras primíparas em uma propriedade de caprinos leiteiros localizadas na Paraíba, Brasil.

Amostras	Propriedade A		
	1 ^a (pré-parto)	2 ^a (15dias)	3 ^a (30dias)
	2/14		
Colostro	<i>S. haemolyticus</i>	-	-
	<i>Micrococcus</i>		
		1/14	1/14
Leite	-	<i>S. epidermidis</i>	<i>Micrococcus</i>
- Não coletado			

Entre as quatro amostras da propriedade A, *S. haemolyticus* (n = 1), e *S. epidermidis* (n=1) foram identificados, além de *Micrococcus* (n = 2). *S. haemolyticus* foi isolado a partir de colostro de uma cabra primípara antes do início da lactação e, curiosamente, *S. epidermidis* foi isolado do mesmo animal a partir da mesma metade do úbere, na segunda coleta. *Micrococcus* foi isolado da secreção de leite de uma cabra primípara antes de lactação e de uma cabra primípara diferente na terceira coleta.

O isolamento de *Micrococcus* associado a mastite em caprinos foi demonstrado por Cavalcante et. al. (2013), no entanto, este microrganismo foi apenas isolado na propriedade A, sugerindo que fatores externos, como manejo, podem interferir na etiologia da mastite em cabras primíparas.

Tabela 4. Frequência de *Staphylococcus* spp. isolados a partir de amostras de colostro pré-parto e amostras de leite 15 e 30 dias pós-parto em cabras primíparas em uma propriedade de caprinos leiteiros localizadas na Paraíba, Brasil.

Amostras	Propriedade B		
	1 ^a (pré-parto)	2 ^a (15dias)	3 ^a (30dias)
	3/13		
Colostro	<i>S. aureus</i> <i>S. hyicus</i> <i>S. cohnii</i>	-	-
		2/13	2/13
Leite	-	<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i> <i>S. xylosus</i>

- Não coletado

Na propriedade B, estafilococos foram isolados de três amostras de leite de cabras primíparas. Dentre as espécies de *Staphylococcus* identificadas estão *S. aureus* (n =3), *S. hyicus* (n = 1), *S. epidermidis* (n = 1), *S. cohnii* (n = 1), *S. xylosus* (n = 1). Considerando as infecções subclínicas na propriedade B, foi identificado *S. aureus* de uma amostra de colostro da metade mamaria esquerda de uma cabra primípara pré-parto e também foi identificado esta mesma bactéria na primeira e segunda coleta pós-parto.

Além disso, *S. hyicus* e *S. epidermidis* foram identificados a partir da metade mamaria direita do úbere deste mesmo animal na primeira e segunda coleta, respectivamente. *S. cohnii* também foi identificado a partir do colostro de uma cabra primípara pré-parto, mas a infecção não persistiu, desde que bactérias não foram identificadas nas seguintes coletas. *S. xylosus* foi identificado a partir do leite de uma cabra primípara no terceira coleta.

Salaberry (2016) analisando caprinos leiteiros nos estados de São Paulo e Minas Gerais, identificou *Staphylococcus* spp. em 90% das amostras analisadas, com 73,8% correspondendo a SCN. Dentre as espécies de SCN, estavam *S. epidermidis*, *S. xylosus* e *S. cohnii*, corroborando com os resultados encontrados neste estudo.

Mastite subclínica causada por estafilococos coagulase-positiva (ECP) foi encontrada no presente estudo e também foi relatado anteriormente em cabras multíparas (ALI et al, 2010;. CAVALCANTE et al, 2013). No entanto, a maioria dos estafilococos associadas à mastite identificados no presente estudo foram estafilococos coagulase-negativa, confirmando relatos anteriores no Brasil e em outros países (AULRICH E BARTH, 2008; PEIXOTO et al., 2013; KOOP et al., 2010, GEBREWAHID et al., 2012).

Sobre a ocorrência de mastite em novilhas, várias investigações têm sido conduzidas com o objetivo de descrever a natureza da mastite, derrubando o dogma de que as novilhas são livres dessa doença (FOX, 2009). No Brasil, estudos demonstraram a ocorrência de 80% de infecções intramamárias em novilhas primíparas no período pré-parto. Estudando-se 120 novilhas primíparas no pré-parto de várias propriedades leiteiras, foi detectado o predomínio de 49,2% de *Staphylococcus* spp., sendo 95% caracterizados como ECN (COSTA et al., 1996).

Os resultados do presente estudo corroboram com outros estudos que afirmam que ECN podem desempenhar um papel fundamental como um patógeno causador de mastite na espécie caprina, e também em novilhas primíparas. No entanto, a persistência de infecções durante o período de lactação foi claramente observada nas infecções apenas por *S. aureus* (Propriedade B). O fato de que uma variedade de ECN tem sido associada à mastite em caprinos e as diferenças na etiologia da mastite nas duas propriedades investigadas indicam que a epidemiologia da mastite estafilocócica na espécie caprina é complexa.

4. CONCLUSÃO

É possível afirmar que microrganismos associados a mastite caprina estão presentes no colostro e leite de cabras primíparas no período pré-parto e pós parto, principalmente bactérias do gênero *Staphylococcus* spp., expondo a glândula mamaria a possível infecção, que pode persistir na lactação, especialmente se causada por *S. aureus*.

REFERÊNCIAS

- ALI, Z., et al. Prevalence of caprine sub-clinical mastitis, its etiological agents and their sensitivity to antibiotics in indigenous breeds of Kohat, Pakistan. **Pak. J. Life Soc. Sci.** 8, 63-67, 2010.
- AULRICH, K., BARTH, K. Intramammary infections caused by coagulase - negative staphylococci and the effect on somatic cell counts in dairy goats. **Agric. Forest. Res.** 59, 59-64, 2008.
- CASTRO, F.J.C. et al. Avaliação de dois protocolos de tratamento da mastite clínica subclínica de cabras, utilizando diferentes dosagens de Gentocin Mastite 150 mg. **Hora Vet.**, Porto Alegre, v. 20, n. 120, mar/abr, p.15-18, 2001.
- CAVALCANTE, M. P., et al. Bactérias envolvidas nas mastites subclínicas de cabra da região de Salvador, Bahia. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, 80, 19-26, 2013.
- CONTRERAS, A. et al. Mastitis in small ruminants. **Small Rumin. Res.**, v.68, p.145- 153, 2007.
- COSTA, E.O., et al. Prevalence of intramammary infections in primigravid Brazilian dairy heifers. **Prev. Vet. Med.** v.29, p.151-155, 1996.
- FOX, L.K. Prevalence, incidence and risk factors of heifer mastitis. **Vet. Microbiol.**, n. 134, p.82-88, 2009.
- GEBREWAHID, T. T., ABERA, B. H., MENGHISTU, H. T. Prevalence and etiology of subclinical mastitis in small ruminants of Tigray regional State, north Ethiopia. **Vet. World.** 5, 103-109, 2012.

GUIMARÃES, M. P. et al. Caracterização de alguns componentes celulares e físico-químicos do leite para diagnóstico de mastite caprina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 41, n.2, p.129-142, 1989.

LANGONI, H. Complexidade etiológica da mastite bovina. In: **Encontro de pesquisadores em mastite**, 3. Botucatu. *Anais...* Botucatu, 1999. p. 3-18, 1999.

LIMA JÚNIOR, A.D.; NADER FILHO, A.; VIANNI, M.C.E. Sensibilidade “*in vitro*” dos *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase negativos, isolados em casos de mastite caprina, à ação de antibióticos e quimioterápicos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 45, p. 291-296, 1993.

KOOP, G., et al. The effect of subclinical mastitis on milk yield in dairy goats. **J. Dairy Sci.** 93, 5809-5817, 2010.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Caprinos e ovinos**. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/caprinos-e-ovinos> > Acesso em 05 dez. 2016.

MOTA, R. A. et al. Etiologia e sensibilidade antimicrobiana in vitro das bactérias isoladas do leite de cabras com mastite procedentes da Região Metropolitana do Recife - PE. In: **IV Congresso Pernambucano de Medicina Veterinária**, Recife-PE. *Anais...*p.233-235, 2002.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. Current concepts of bovine mastitis. **Madison**, 4, 64, 1996.

PEIXOTO, R. M., et al. Genotipificação de isolados de *Staphylococcus epidermidis* provenientes de casos de mastite caprina. **Ciên. Rural**, Santa Maria, 43 322-325, 2013.

RODRIGUES, A.; QUINTANS, L.J. Produção e beneficiamento do leite de cabra na Paraíba. In: **Simpósio internacional sobre caprinos e ovinos**, 2., João Pessoa, *Anais...* João Pessoa: EMEPA, p. 291-302, 2003.

SALABERRY, S.R.S., et al. Análise microbiológica e perfil de sensibilidade do *Staphylococcus* spp. em mastite subclínica de caprinos leiteiros. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** vol.68 no.2 Belo Horizonte Mar./Apr, 2016.

SANDHOLM, M.; PYÖRÄLÄ, S. Coliform Mastitis. **The Bovine Udder and Mastitis**, Helsinki., p.149, 1995.