

USO RACIONAL DE ANTIMICROBIANOS NA BUIATRIA: ENTENDENDO A FORMAÇÃO DE POPULAÇÕES BACTERIANAS RESISTENTES

RATIONAL USE OF ANTIBIOTICS IN BUIATRICS: UNDERSTANDING THE EMERGENCE OF RESISTANT BACTERIAL POPULATIONS

Matheus Resende Nobre¹, Danielle dos Santos Cinelli Pinto¹, Marcos Ferrante¹,
Patrícia Yoshida Faccioli Martins² e Humberto de Mello Brandão^{1,3}

RESUMO

A descoberta da penicilina no início do século passado deu início à era dos antibióticos e contribuiu para transformar o mundo rapidamente. Até então, feridas que infecionavam eram praticamente uma sentença de morte para o paciente, enquanto aglomerados humanos ou animais eram ambientes perfeitos para ocorrência de surtos de infecções bacterianas. Na prática, este grupo de moléculas permitiu o rápido crescimento da população humana, o aumento de sua expectativa de vida e a maior produção de proteínas de alto valor biológico para sustentar esta nova ordem mundial. Destarte, além de saúde, os antibióticos geraram riqueza ao longo dos seus anos de uso, contribuindo para o contínuo crescimento da soma dos bens e serviços produzidos no mundo. Todavia, seguindo uma lógica Darwiniana, as bactérias seguiram seus processos evolutivos naturais, porém moldados pela intervenção humana. Assim, inúmeras populações bacterianas que antes eram sensíveis a qualquer antibiótico hoje são multirresistentes, e a humanidade passou a conviver com o risco de retroceder à era pré-antibiótica. Tal condição consolidou a resistência bacteriana aos antibióticos (RBA) como um dos maiores desafios à saúde pública e à economia da humanidade. Em suma, é fácil compreender que ambiente e saúde humana e animal são indissociáveis. Esse cenário desafiador faz com que o uso de antibióticos na buiatria seja “demonizado” por uma parcela crescente da população, a qual desconhece que seu uso racional apresenta baixo risco de seleção de resistência e é uma potente ferramenta para aumentar a produtividade e promover a saúde e bem-estar animal. Neste contexto, onde o uso correto dos antibióticos é dependente de fatores vinculados às bactérias, aos fármacos e às peculiaridades do paciente, o presente artigo objetiva fornecer informações sobre os mecanismos de seleção da RBA, bem como sobre as características dos ensaios de sensibilidade bacteriana para auxiliar a tomada de decisão do prescritor de antibióticos durante suas atividades de campo.

Palavras-chave: bactérias, resistência antimicrobiana, testes de sensibilidade bacteriana, uso racional de antibióticos.

ABSTRACT

The discovery of penicillin in the early 20th century marked the beginning of the antibiotic era, triggering a rapid transformation of society. Until then, infected wounds were practically a death sentence, and human or animal populations provided ideal environments for outbreaks of bacterial infections. In practice, antibiotics enabled the rapid growth of the human population, increased life expectancy, and enhanced the production of high-biological-value proteins to sustain this new world order. Thus, beyond their undeniable health benefits, antibiotics also generated wealth through their use, contributing to the continuous growth of global goods and services. However, following Darwinian principles, bacteria have undergone natural evolutionary processes that are now strongly influenced by human intervention. As a result, many bacterial populations that were once highly susceptible to antibiotics have become multidrug-resistant, and humanity faces the risk of a return to the pre-antibiotic era. This scenario has consolidated antibiotic resistance (RBA) as one of the greatest challenges to both public health and the global economy. Ultimately, it is evident that the environment, human health, and animal health are inseparable. This complex situation has fueled the “demonization” of antibiotic use in buiatrics by segments of the population who are unaware that rational antibiotic use carries a low risk of resistance selection and remains a powerful tool for enhancing productivity, animal health, and animal welfare. In this context, where the appropriate use of antibiotics depends on bacterial characteristics, drug properties, and patient-specific factors, this article aims to provide an overview of RBA selection mechanisms and the key features of bacterial susceptibility testing, supporting veterinarians in evidence-based antibiotic prescription in the field.

Keywords: bacteria, antimicrobial resistance, bacterial susceptibility testing, rational use of antibiotics.

1 Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil.

2 Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Caprinos e Ovinos, Sobral, CE, Brasil.

3 Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil.



Autor para correspondência:
humberto.brandao@embrapa.br

Revista Brasileira de Buiatria
Volume 2, Número 1, p. 147-163, 2025

Publicado em 01 de maio de 2026

ISSN 2763-955X

DOI: 10.70061/2763-955X.2026.001



Associação Brasileira
de Buiatria



INTRODUÇÃO

A propagação da resistência aos antibióticos já é reconhecida pelas principais agências internacionais (Organização Mundial da Saúde, o G20, o G7 e a União Europeia) como uma crise global de saúde¹. Os integrantes do Projeto Global de Pesquisa sobre Resistência Antimicrobiana estimaram que no ano de 2019 a resistência bacteriana aos antibióticos (RBA) foi responsável pela morte de 4,95 milhões de pessoas ao redor do mundo e esse valor pode atingir 10 milhões em 2050². Segundo esses autores, a possibilidade de bactérias adquirirem resistência a múltiplos antibióticos tem potencial para gerar populações com multirresistência, e, por isso, a RBA é um dos maiores desafios da saúde pública nas próximas décadas. Em adição, segundo os autores, se providências globais não forem adotadas, os valores supracitados podem se agravar ainda mais no futuro^{1,2}.

A resistência bacteriana não é um problema exclusivo de países ricos. Países de baixa e média renda como Brasil, Rússia e Indonésia já apresentam elevados índices de infecções por bactérias resistentes³. Baseada em dados da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), Hofer³ relata que, nesses países, entre 40 e 60% das infecções humanas já são causadas por microrganismos resistentes e que a evolução da resistência bacteriana aumentará entre quatro e sete vezes mais rapidamente em países em desenvolvimento que nos países membros da OCDE.

Do ponto de vista veterinário, bactérias multirresistentes podem ser transmitidas entre espécies, com destaque para a transmissão bilateral entre animais de produção e seres humanos, seja por contato direto entre as espécies ou vetoradas por produtos de origem animal⁴. Assim, a promoção do uso racional de antibióticos na pecuária, tanto sob a ótica de Saúde Única quanto sob a de comércio, encontra-se como um dos pilares da buiatria moderna e sustentável. Diante desse contexto, é importante atentar que a prevenção da RBA

e o uso racional dos antibióticos devem considerar a tríade bactéria, paciente e antimicrobiano. Portanto, no presente artigo serão abordados conceitos do estabelecimento da RBA associados às bactérias, bem como a importância dos principais testes para determinar a sensibilidade bacteriana aos antibióticos.

A IMPORTÂNCIA SOCIOECONÔMICA RESISTÊNCIA BACTERIANA NA PECUÁRIA

Dentro do conceito de Saúde Única, o qual considera indissociáveis a saúde humana, a saúde animal e o meio ambiente, o uso de antibióticos em animais é um ponto extremamente sensível na estratégia global de combate à resistência bacteriana. Isso porque, em muitos países, o consumo de antibióticos destinados aos animais supera o consumo por humanos. Nos Estados Unidos da América, por exemplo, cerca de 80% dos antibióticos consumidos no país são destinados para o uso em animais⁵. Adicionalmente, inúmeras bactérias, patogênicas ou não, podem ser intercambiadas entre humanos, animais e o ambiente que os cerca, o que agrava ainda mais a dispersão da RBA.

A tendência mundial é aumentar o consumo de antibióticos destinados a animais de produção, impulsionado pela demanda mundial por alimentos, pela elevação de renda em países como China e Índia e pela tendência de adensamento e intensificação dos sistemas produtivos⁵. Tomando como base o consumo de antibióticos no ano de 2010, estima-se que haverá um aumento no consumo mundial destes medicamentos em cerca de 67% até 2030, e o Brasil quase duplicará seu consumo em relação à média mundial, atingindo nessa data a segunda posição no *ranking* de países consumidores de antibióticos destinados à produção de alimentos^{6,7}.

Se por um lado a RBA deve avançar mundialmente tanto em humanos quanto em animais, a



perspectiva de lançamento de novas famílias/classes de antibióticos para controlar esta pandemia é limitada. Isso ocorre em função do elevado tempo de desenvolvimento de uma nova molécula e do alto custo atrelado a esse processo de desenvolvimento. De uma forma geral, o desenvolvimento completo de um medicamento com uma nova molécula de antibiótico demora entre 15 e 20 anos para chegar ao mercado⁸, enquanto que o custo total pode chegar a 2 bilhões de dólares. Uma baixa quantidade de lançamentos de novos antibióticos se explica pelo fato de o dispêndio de tempo e recursos gastos no desenvolvimento destes ser semelhante aos gastos com o desenvolvimento de medicamentos para tratar o câncer ou doenças crônicas/degenerativas, que tendem a ser mais lucrativos para a indústria farmacêutica⁹. Esta condição desloca o investimento em pesquisa, desenvolvimento e inovação (P, D & I) da iniciativa privada para medicamentos “não antibacterianos”, enquanto que os novos desenvolvimentos nessa área têm ficado majoritariamente atrelados aos entes públicos, os quais muitas vezes têm dificuldade de fazer todas as etapas do processo de P, D & I¹⁰.

Do ponto de vista econômico, a resistência bacteriana deve ser responsável por uma queda de 1% no produto interno bruto (PIB) mundial em 2050. Em um cenário menos promissor, a redução do PIB chegará a 3,8% nesse período¹¹. Nesse segundo cenário, estima-se perda de 11% na produtividade pecuária até 2050 e uma significativa redução no comércio mundial de proteína animal. O impacto negativo no comércio global de produtos de origem animal que tenham sido produzidos com o uso de antimicrobianos ou que sejam portadores de bactérias resistentes possivelmente ocorrerá em função de regulamentações internacionais, como por exemplo os acordos sobre Barreiras Técnicas ao Comércio ou sobre a Aplicação de Medidas Sanitárias e Fitossanitárias da Organização Mundial do Comércio. Essas regulamentações permitem que os países membros tomem medidas para proteger a saúde humana ou o ambiente e, com isso, apliquem medidas

protetivas para incentivar a utilização adequada de antibióticos em países exportadores¹².

As potenciais ações preventivas de segurança no comércio internacional se sustentam no fato de que no mundo moderno, tanto alimentos de origem animal quanto animais de produção são intensamente comercializados em escala global e podem servir como vetores de bactérias resistentes. Quando encontrados no sistema produtivo de um país, esses microrganismos podem facilmente causar problemas em outros locais¹³. Exemplificando esta possibilidade, Agerso et al.¹⁴ utilizaram técnicas de biologia molecular e demonstraram que matrizes de aves de corte (avós) importadas da Inglaterra para a Dinamarca e Suécia foram responsáveis por veicular e dispersar clones de *Escherichia coli* resistentes às cefalosporinas em plantéis destes países. Este caso demonstra o quanto a produção e o comércio de animais e produtos pecuários são vulneráveis economicamente aos impactos da resistência bacteriana.

PARA USAR CORRETAMENTE UM ANTIBIÓTICO, É PRECISO ENTENDER COMO “SURTEM” BACTÉRIAS RESISTENTES

Ao expor uma bactéria a um antibiótico, estamos intencionalmente modificando o ambiente no qual ela se encontra. Nesse caso, dentro de uma visão darwiniana, podemos considerar que o “aparecimento” da RBA seja um processo de seleção, no qual as bactérias mais adaptadas das distintas espécies sobrevivem ao novo ambiente em que elas se encontram. Mas se as bactérias se reproduzem de forma assexuada, formando colônias clonais praticamente idênticas, como ocorre variabilidade genética nesses microrganismos para que haja adaptação ao novo ambiente?

Para responder a esse questionamento, é fundamental compreender os mecanismos pelos quais



ocorre movimentação de material genético entre bactérias que permitam a ocorrência desses “processos adaptativos”. A compreensão desses mecanismos é pré-requisito para que os antibióticos existentes sejam utilizados de forma crítica e o mais racional possível e, com isso, sejam obtidos desfechos terapêuticos aceitáveis com o mínimo impacto nas distintas populações bacterianas que circulam no ambiente da buiatria nacional.

O aparecimento de populações contendo genes de RBA ocorre seguindo a dinâmica de mutação, aquisição, deriva genética, seleção e dispersão bacteriana¹⁴. Bactérias, assim como qualquer outro ser vivo, estão naturalmente expostas a processos de mutação, os quais evolutivamente estão associados com o aumento da diversidade de genes e alelos em uma população. Apesar de não ocorrerem com tanta frequência, mutações genéticas que conferem resistência aos antibióticos podem surgir espontaneamente durante a replicação celular^{16,17}. Diferentemente dos animais superiores, as bactérias podem passar por fenômenos naturais de aquisição e deleção de genes, o que é de extrema importância para os processos de transferência horizontal de genes (THG)¹⁵. Apesar de mutações

ocorrerem naturalmente em genes associados à RBA, a THG de RBA pré-existent é muito mais frequente e, portanto, relevante no que tange à dinâmica populacional de bactérias¹⁸.

Inúmeras variantes de genes já foram descritas e associadas aos mais diversos mecanismos de RBA, como transporte ativo de antibióticos; alteração, modificação e proteção de sítios alvos dos antibióticos; inativação e modificação do antibiótico; produção de vias celulares alternativas que contornem o alvo do antibiótico supérfluo; e redução da permeabilidade de membrana¹⁹.

A compreensão dos mecanismos de THG por parte do médico veterinário é de extrema relevância para o entendimento da RBA. Parâmetros como vias de aplicação e biodistribuição dos antibióticos podem favorecer ou minimizar a seleção de populações bacterianas resistentes fora do tecido acometido pela infecção. A THG pode ser definida como o movimento de informação genética entre células bacterianas distintas, com sua incorporação ao genoma da bactéria receptora^{15,19}. Os mecanismos de THG podem ser classificados em quatro grandes grupos, dispostos no Quadro 1 e na Figura 1^{15,18}.

Quadro 1. Mecanismos de transferência horizontal de genes (THG) em bactérias.

Eventos do puerpério fisiológico	Fatores relacionados
Conjugação	É o mecanismo mais frequente de THG que está relacionado à transmissão de elementos genéticos móveis (e.g. plasmídeos e elementos conjugativos e integrativos) por meio de um contato físico direto entre a bactéria doadora e a bactéria receptora pelo pilus sexual ou por poros na membrana.
Transformação	Está relacionada à aquisição de DNA do ambiente em que a bactéria se encontra. DNA plasmidial ou fragmentado, liberado por secreção ativa ou lise da bactéria doadora no ambiente, é absorvido pela receptora competente.
Transdução	O DNA cromossômico e extracromossômico da bactéria doadora é transferido para a receptora por um vírus bacteriófago, que infecta e se replica em bactérias.
Outras formas de THG	Vesículas de membrana bacteriana, estruturas em forma de “nanotubos” que exerçam efeito agulha, agentes de transferência de genes semelhantes a fagos (conversão lisogênica), fusão de protoplastos ou por transposição (transposons ou retrotransposons).

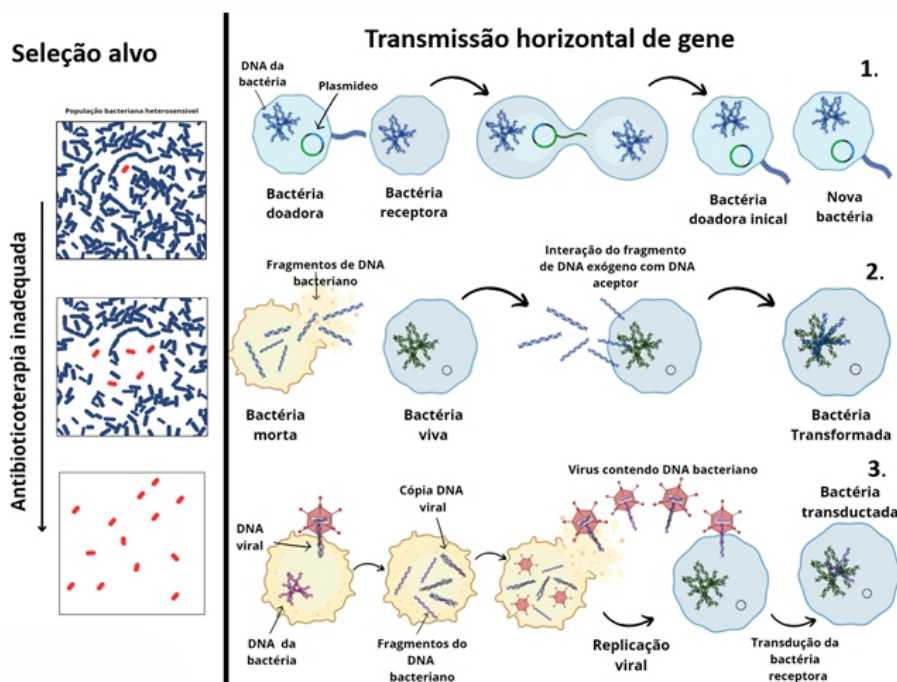


Figura 1. Esquema representativo de quatro mecanismos de formação de populações bacterianas resistentes aos antibióticos. À esquerda, esquema de seleção alvo de bactéria resistente. À direita, três mecanismos de transmissão horizontal de genes de resistência: (1) conjugação, (2) transformação e (3) transdução.

É importante destacar que a conjugação de plasmídeos, a transdução de fagos e a transformação do DNA extracelular permitem que o material genético salte entre bactérias do mesmo gênero ou entre bactérias de espécies diferentes^{15,18,19}.

Seguindo uma escala temporal da dinâmica do aparecimento de populações contendo genes de RBA, uma vez que o gene foi introduzido na população, seja por mutação ou aquisição, as etapas seguintes são a deriva genética ou seleção. A deriva genética é um fenômeno evolutivo e de caráter aleatório, o qual está associado a grandes mudanças no ambiente que venham a deslocar o equilíbrio da frequência de alelos de um gene em uma população. Como exemplo, podemos citar uma mudança climática duradoura ou um processo de desmatamento. Apesar de relevante do ponto de vista evolutivo, a deriva genética possui um papel secundário no estabelecimento de populações

com RBA. Por sua vez, o processo de seleção é extremamente relevante e altamente influenciado pelo ser humano.

A seleção de bactérias resistentes segue uma lógica similar (mas com algumas diferenças) à do melhoramento genético animal, onde o ganho genético é diretamente influenciado pela pressão de seleção e pelo intervalo entre gerações. No caso da RBA, a intensidade da pressão de seleção é definida por uma relação entre a concentração do antibiótico e a duração do tratamento. O processo de seleção para RBA pode ser subdividido em dois grupos: a seleção de alvos e a seleção colateral¹⁶:

Seleção de alvos: está diretamente relacionada às bactérias envolvidas no processo infeccioso. Nesse caso, a posologia adequada e precisa do antibiótico tem importância central no processo de seleção de alvos.



Isso ocorre a partir de bactérias heterorresistentes (policlonais ou monoclonais) ao antibiótico, onde populações maiores de bactéria podem ser selecionadas durante o tratamento e serem transmitidas antes da cura microbiológica ser alcançada ou após uma recidiva por falha do tratamento^{16,17}.

Seleção colateral: ocorre durante a antibioticoterapia, mas em bactérias localizadas fora do sítio de infecção¹⁶. Para ilustrar este conceito, a Figura 2 demonstra o uso sistêmico de um antibiótico durante o tratamento contra pododermatite. Nesse caso, o fármaco contribui para o bom desfecho clínico do problema de casco. Contudo, populações bacterianas periféricas e não associadas à infecção (*e.g.* bactérias localizadas na laringe, no trato gastrointestinal, no ambiente e em outros locais) sofreram aumento na pressão de seleção para resistência aos antibióticos e

poderão ser fonte de genes e bactérias resistentes para o rebanho.

Para a melhor compreensão do processo de seleção colateral, é importante ter em mente (de forma simplista) que ao administrar um antibiótico oralmente para um ruminante lactente, parte do medicamento é absorvida, enquanto outra parte é degradada ou transita intacta pelo trato digestivo e é eliminada nas fezes (biodisponibilidade). Uma vez absorvido ou quando administrado parenteralmente, o antibiótico ganha a circulação e se distribui pelo organismo do paciente (biodistribuição), seguido de sua metabolização e excreção. Destaca-se que o antibiótico pode ser excretado no ambiente tanto em sua forma molecular original quanto na forma de metabólitos inativos ou com atividade antibacteriana. Como exemplo, pode ser citado o ceftiofur, o qual, após ser administrado em um

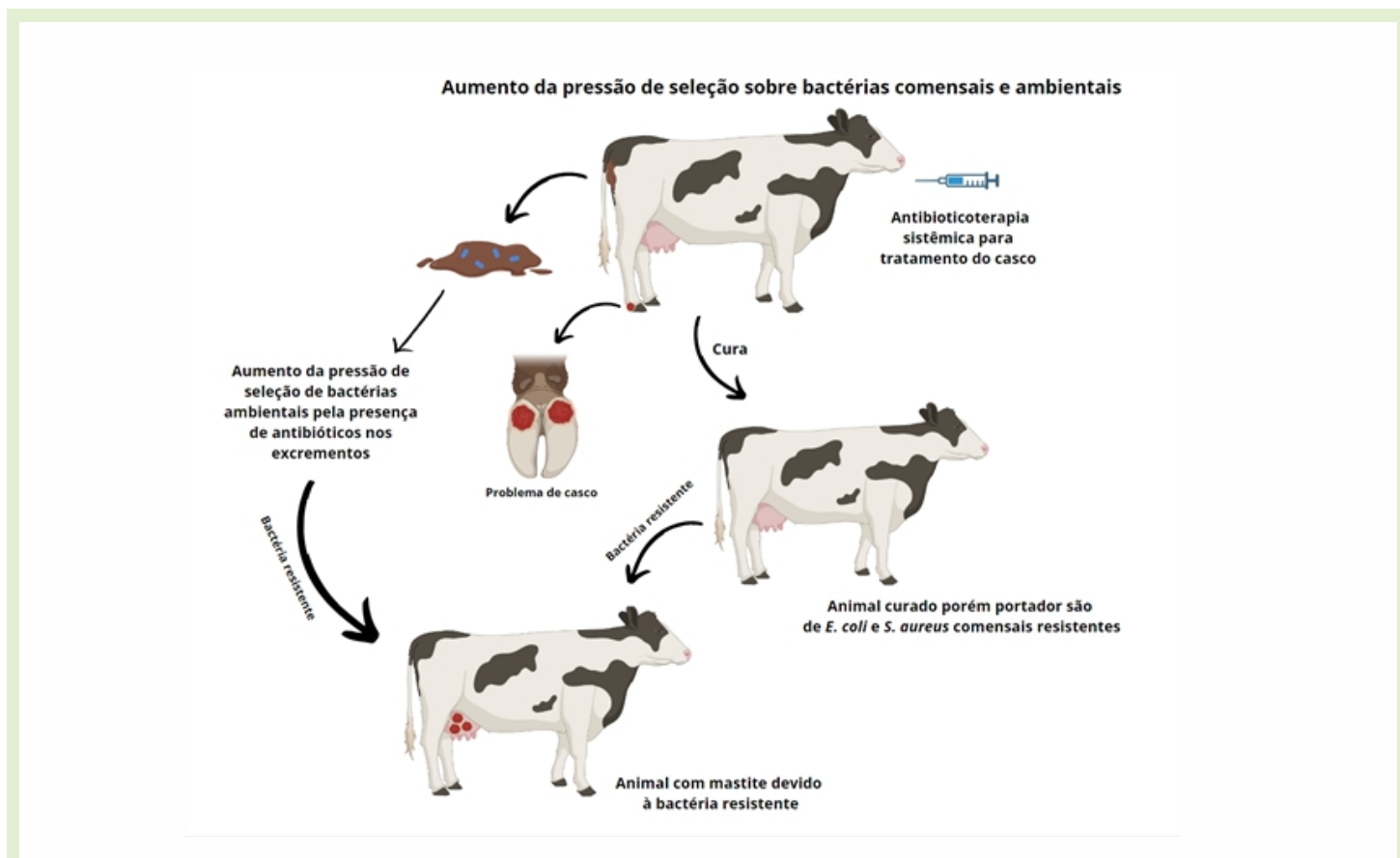


Figura 2: Esquema representativo do aumento da pressão de seleção bacteriana favorecendo a seleção colateral e a transmissão de bactérias comensais e ambientais resistentes aos antibióticos.



animal, é rapidamente metabolizado e excretado majoritariamente como desfuroilceftiofur, um metabólito com grande atividade antibacteriana²⁰. Outro antibiótico que segue este exemplo é a enrofloxacin, que é biotransformada em ciprofloxacino. Assim, tanto os antibióticos quanto seus metabólitos ativos podem facilmente atingir o sistema digestivo, a pele, membranas mucosas e outros tecidos não-alvo no paciente, além do meio ambiente.

Esses locais são colonizados por bactérias ambientais e comensais apatogênicas ou oportunistas, as quais se encontram em estabilidade de frequência gênica no que tange a genes de resistência bacteriana, não ocasionando problemas. Contudo, esses ecossistemas possuem uma diversidade de genes e alelos de resistência aos antibióticos extremamente grande, que podem ter sua frequência populacional aumentada em função da maior pressão de seleção exercida pelos antibióticos¹⁶. Assim, mesmo sem a ocorrência de qualquer alteração clínica ou imunológica, as alterações na estabilidade da frequência de genes de resistência aos antibióticos da microbiota comensal podem ser classificadas como um tipo de disbiose, haja vista que essa é definida por Walker²¹ como qualquer alteração nos componentes das comunidades comensais residentes em relação à comunidade encontrada em indivíduos saudáveis. Como exemplo, na microbiota ruminal, é encontrada naturalmente grande abundância de genes relacionados à resistência a β -lactâmicos, glicopeptídeos, tetraciclina e aminoglicosídeos²², e os mesmos podem ter suas frequências relativas aumentadas em função do uso de antibióticos, o que favorece a transmissão horizontal de genes. No meio ambiente, não é diferente, e a diversidade é ainda maior²³.

De uma forma geral, a maior parte das espécies bacterianas que atualmente representam problemas de RBA não desenvolve resistência pela seleção de alvos, mas sim pela seleção colateral¹⁶. A maior ameaça clínica provém principalmente de espécies bacterianas comensais oportunistas, como por exemplo *Escherichia*

coli, *Staphylococcus aureus* e outras bactérias. Isso porque durante a antibioticoterapia de outras infecções, cepas bacterianas de uma mesma espécie mais resistentes aos antibióticos podem ser selecionadas a partir de múltiplas estirpes que colonizam o animal e o ambiente²³. Em paralelo, a seleção colateral de bactérias não patogênicas portadoras de genes e alelos de RBA eleva substancialmente a probabilidade de ocorrer THG entre uma bactéria oportunista e uma bactéria não patogênica resistente ao antibiótico que colonizam o animal ou o ambiente^{15,16,18,19}.

Assim, se por um lado a seleção colateral contribui para ocorrência de surtos de infecções bacterianas resistentes que podem ocorrer independentemente da transmissão de uma estirpe ou espécie específica (mediadas pela THG), por outro, a seleção colateral também contribui para ocorrência de surtos originados de cepas bacterianas resistentes oportunistas adquiridas do ambiente ou transmitidas entre animais portadores assintomáticos^{15,16,18,19}.

De uma forma macro, cabe destacar que a pressão de seleção imposta pelo uso de antibióticos exerce papel preponderante no estabelecimento da RBA¹⁶. Dentro deste contexto, considerando os mecanismos de “aparecimento” de populações contendo genes de RBA, pode-se concluir que a prevenção da RBA é dependente de antibioticoterapia baseada em uma posologia precisa. Isso porque subdosagens de antibióticos podem promover tanto seleção colateral quanto seleção alvo, favorecendo principalmente a ocorrência de falhas terapêuticas e seleção de bactérias heterorresistentes. Por sua vez, a sobredosagem, decorrente de dose ou de tempo de tratamento superior ao necessário para o bom desfecho terapêutico, pode ser ainda mais perigosa para a RBA. Como motivo, a pressão de seleção ocorre sobre a população bacteriana “global” (bactérias do foco infeccioso, comensais e do meio ambiente).



ATENÇÃO ESPECIAL DEVE SER DADA À ANTIBIOTICOTERAPIA EM INFECÇÕES CAUSADAS POR BACTÉRIAS TOLERANTES AOS ANTIBIÓTICOS

Não é incomum que resultados laboratoriais indiquem que a bactéria é sensível a um determinado antibiótico, que sua posologia e administração tenham ocorrido conforme o preconizado pelo médico veterinário, que o animal melhore clinicamente e, mesmo assim, ocorra falha na cura microbiológica da infecção e o animal apresente uma manifestação clínica redicivante. Erroneamente, esse padrão de comportamento da infecção, identificado durante o acompanhamento do caso clínico ou da anamnese, é atribuído à RBA. Nesses casos, a ação corretiva comumente praticada nas fazendas é a mudança de antibiótico, normalmente para uma base de espectro de ação mais amplo e de última geração, o que não é favorável ao uso racional de antibióticos. Nessas situações, podemos estar diante de casos de tolerância bacteriana aos antibióticos.

Assim, é importante conceituar a RBA e a tolerância aos antibióticos: na RBA, uma população bacteriana é considerada resistente quando as bactérias sobrevivem à exposição a um antibiótico em concentrações acima da concentração inibitória mínima (CIM) da população bacteriana suscetível. Por outro lado, a tolerância aos antibióticos descreve a capacidade de uma população bacteriana de sobreviver transitoriamente a concentrações letais de antibióticos, o que pode ocorrer devido a algumas bactérias conseguirem retardar processos celulares essenciais para a ação do fármaco²⁴ ou criarem barreiras que dificultem o contato entre fármaco e bactéria¹⁹. Normalmente, esses mecanismos de defesa estão associados a fatores de virulência.

Os fatores de virulência das bactérias são características ou propriedades específicas associadas à patogenicidade bacteriana, conferindo às mesmas, por exemplo, capacidade de evadir-se do sistema imune e

de colonizar, invadir e causar danos nos tecidos do hospedeiro por se adaptarem ao microambiente. Em muitos casos, tanto a expressão do fator de virulência quanto sua intensidade de expressão podem ser influenciadas por fatores externos à bactéria. Existem inúmeros fatores de virulência bacterianos, como capacidade de formar biofilmes; presença de fímbrias e pili; cápsula bacteriana; produção de toxinas ou de enzimas de degradação; ativação de sistemas de secreção; capacidade de invasão celular; dentre outros.

Se por um lado, os fatores de virulência isoladamente não conferem a RBA, em conjunto, vários fatores de virulência podem conferir tolerância aos antibióticos. De todos os fatores de virulência, a capacidade de produzir biofilmes é o mais relevante no que tange à tolerância aos antibióticos e à RBA. Isso porque, além de estes serem inerentemente tolerantes à ação de antibióticos, eles criam um microambiente favorável tanto para a ocorrência da transferência horizontal de genes entre bactérias quanto para a seleção alvo da RBA¹⁹. Dada a importância do biofilme nos casos de falha terapêutica e da sua contribuição para a RBA, a antibioticoterapia contra bactérias potencialmente produtoras de biofilme deve receber atenção especial nas propriedades rurais. Como exemplos de patógenos com capacidade de produzir biofilme e que comumente acometem rebanhos de ruminantes produtores de carne e leite destacam-se: *S. aureus* e outros *Staphylococcus* spp., *E. coli*, *Salmonella* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* e outros.

Ciofu et al.²⁴ e Schroeder et al.²⁵ apresentam duas revisões de literatura sobre biofilme bacteriano e RBA. Simplificadamente, o biofilme é uma forma organizada em uma estrutura tridimensional de uma população bacteriana (única ou multiespécie), a qual apresenta propriedades qualitativamente diferentes da mesma população em condição planctônica. Estruturalmente, o biofilme é composto por água e eletrólitos, bactérias, matriz extracelular polimérica (normalmen-



te polissacarídeos), proteínas e fragmentos de DNA. Segundo os autores, a dinâmica de formação do biofilme se dá pela fixação de bactérias planctônicas, tanto na superfície de tecidos danificados quanto saudáveis (ácinos glandulares) do hospedeiro, ou formando agregados em secreções com muco viscoso. Uma vez fixadas, ocorre uma fase de proliferação e maturação, marcada pela intensa produção de matriz extracelular. Nessa fase, à medida que as bactérias se multiplicam, a quantidade e a complexidade da composição da matriz extracelular aumentam, criando um microambiente caracterizado por gradientes de nutrientes e oxigênio no interior do biofilme, o que gera heterogeneidade fisiológica e adaptação das bactérias que fazem parte do biofilme. Nessa estrutura tridimensional, as bactérias que estão mais próximas da interface da superfície do biofilme apresentam maior taxa de multiplicação e atividade metabólica, enquanto bactérias localizadas nas camadas mais profundas do biofilme apresentam multiplicação lenta e maior tolerância aos antibióticos. Por fim, considerando a dinâmica de formação do biofilme, a fase final é marcada pela dispersão bacteriana desencadeada por

fatores ambientais. No processo de formação do biofilme, é importante evidenciar que a transição do crescimento bacteriano planctônico para o crescimento bacteriano no biofilme é caracterizada por uma série de alterações fisiológicas, metabólicas e fenotípicas das bactérias. A estrutura tridimensional do biofilme pode ser vista na Figura 3.

O biofilme favorece a RBA por seleção alvo, haja vista que a estrutura tridimensional do biofilme pode funcionar como uma barreira física para a difusão do antibiótico, apresentando um gradiente decrescente de concentração ao longo do perfil do biofilme. Assim, as bactérias mais próximas da interface externa do biofilme ficam expostas a concentrações de antibióticos mais elevadas que as bactérias presentes nas porções mais profundas. Este gradiente diferencial da concentração de antibióticos no biofilme pode ser acentuado ainda mais por dois fatores:

- I) A menor atividade metabólica das bactérias, decorrente das baixas concentrações de oxigênio e nutrientes no interior do biofilme, faz com que estas fiquem menos susceptíveis a antibió-

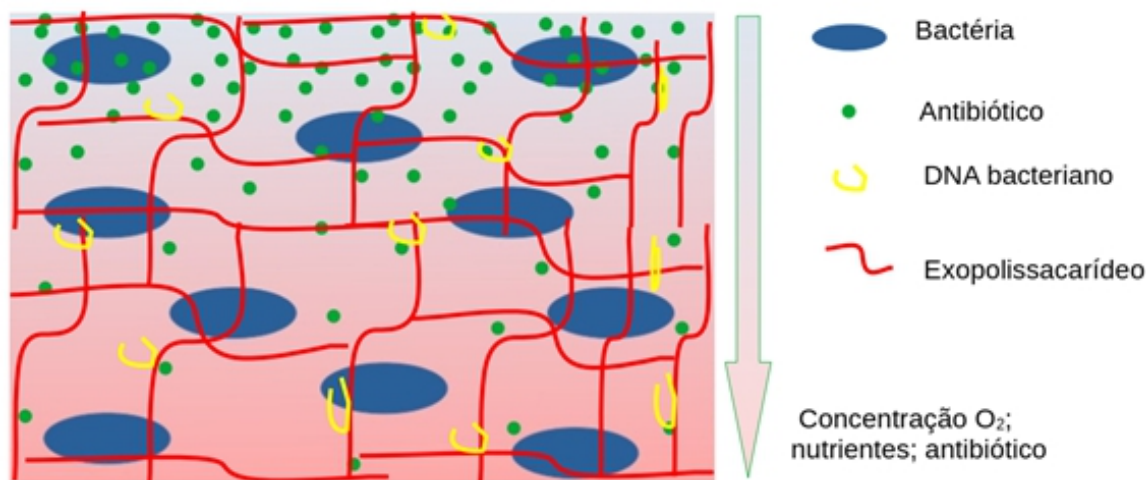


Figura 3. Esquema de arquitetura do biofilme bacteriano exposto ao antibiótico.



ticos cuja ação seja dependente do metabolismo bacteriano (*e.g.* β -lactâmicos e quinolonas);

- II) O microambiente interno do biofilme favorece a concentração de enzimas, debris e metabólitos bacterianos que em condições naturais não degradariam o antibiótico, mas em concentrações elevadas podem fazê-lo. Assim, do ponto de vista farmacocinético, o microambiente do biofilme pode ser considerado um terceiro compartimento biológico, interagindo com os compartimentos intersticiais e vasculares²⁴.

Estruturalmente, o fato de o biofilme ser rico em fragmentos de DNA bacteriano e de as bactérias permanecerem fisicamente próximas umas das outras, favorece também a ocorrência de THG dentro da comunidade bacteriana que o habita. Adicionalmente, a probabilidade de ocorrência de THG no interior do biofilme é ampliada ainda mais em decorrência do elevado estresse oxidativo endógeno, gerado pela grande quantidade de metabólitos e debris celulares e pela baixa tensão de oxigênio e de nutrientes.

IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA E TESTES DE SENSIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS

É importante ter em mente que a antibioticoterapia se baseia na determinação do agente causal da infecção e do perfil de sensibilidade deste, devendo o diagnóstico ser embasado em resultados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais²⁶. Todavia, a baixa disponibilidade de laboratórios de análises clínicas, aliada às grandes distâncias e dificuldades logísticas no meio rural brasileiro, tornou frequente a administração de antibióticos de forma empírica, sendo baseada quase que exclusivamente nos sinais clínicos gerais do animal, o que muitas vezes implica em altas taxas de falha

terapêutica. Nesses casos, a falha terapêutica é decorrente de uma escolha inadequada do princípio. A antibioticoterapia é considerada empírica quando a escolha da molécula não é feita com base em testes microbiológicos. Equivocadamente, para contornar este problema, o que muitas vezes se pratica na rotina das fazendas é a priorização do uso de um antibiótico de amplo espectro, em detrimento de um antimicrobiano mais específico, ou a realização de uma antibioticoterapia combinada de mais de uma molécula. No que tange à prevenção da RBA, tanto o uso de antibiótico de amplo espectro quanto a realização de uma antibioticoterapia combinada só devem ser usados quando já houver histórico de existência de uma população bacteriana com RBA na propriedade.

Tecnicamente, a antibioticoterapia empírica só deve ser adotada pelo médico veterinário nos casos em que:

- O isolamento bacteriano é impossível de ser feito;
- Em casos clínicos de alta gravidade, nos quais, a critério do médico veterinário, o tempo de espera dos resultados dos testes microbiológicos (*i.e.* média de 72 horas) possa colocar em risco a vida do animal ou a taxa de cura clínica da enfermidade.

Diante disso, é prudente que o médico veterinário estabeleça uma rotina de identificação e determinação da resistência bacteriana na propriedade sob sua responsabilidade. Este procedimento é bastante útil para auxiliar a tomada de decisão na escolha do antibiótico e de sua posologia, evitando-se a antibioticoterapia empírica, haja vista que a escolha do tratamento amparada pela avaliação clínica e por dados epidemiológicos de sensibilidade e de ocorrência de patógenos da própria fazenda mitiga a ocorrência de insucesso terapêutico.



Por outro lado, o uso de antibioticoterapia específica é baseado em testes microbiológicos de bactérias isoladas do próprio animal, em que inicialmente faz-se o isolamento do agente etiológico da infecção e em seguida procede-se com a identificação da espécie e a determinação do seu perfil de sensibilidade. Felizmente, com a crescente implementação de sistemas de “isolamentos bacterianos na fazenda”, a antibioticoterapia contra mastite em muitas propriedades leiteiras tem sido mais eficiente. No entanto, apesar de este procedimento constituir um grande avanço no uso de antibióticos em nível de fazenda, a prescrição baseada exclusivamente nele ainda não pode ser considerada um tratamento específico. Isso ocorre porque esse sistema de isolamento possui um certo grau de incerteza, pois as provas são realizadas em meios de cultivo microbiológico cromogênicos, os quais permitem diferenciar apenas presumivelmente espécies e/ou grupos bacterianos, de acordo com a cor das colônias²⁷.

Ressalta-se que os meios de cultivo microbiológicos são presuntivos, classificando os isolados em grupos (a depender dos meios empregados), e que, nesse sistema de diagnóstico, a ocorrência de não isolamento é relativamente alta, notadamente em casos de:

- I) Mastite não infecciosa;
- II) Resolução da infecção pelo sistema imune do animal no período entre a identificação da mastite e a coleta de amostra de leite;
- III) Presença do microrganismo em concentração abaixo do limite de detecção;
- IV) Bactérias ou outros organismos causadores da mastite que não cresçam em meios de cultura padrão (*e.g.* vírus, bactérias anaeróbicas, *Mycoplasma* spp., dentre outros);
- V) Presença de resíduos de antibióticos;
- VI) Falha de coleta de amostra²⁸.

Mesmo com tais limitações, o emprego do método é de grande valia no que tange à velocidade de diagnóstico, favorecendo o início precoce do tratamento antimicrobiano. Entretanto, mesmo com tendência do uso crescente, apenas esporadicamente esses isolados “na fazenda” seguem para testes de perfil de sensibilidade bacteriana. Apesar da dificuldade de se realizar o perfil de sensibilidade bacteriana na rotina da fazenda, destaca-se a relevância da determinação rotineira de isolados bacterianos, pois esta pode contribuir significativamente para a tomada de decisão, baseada em dados epidemiológicos da própria fazenda, como na escolha da dose e do antibiótico mais apropriado.

Outro ponto relevante a ser destacado é que existem diversos protocolos para apoiar a tomada de decisão de tratamento dos casos de mastite clínica baseados no diagnóstico “na fazenda”²⁸. Segundo os autores²⁸, variações nos distintos protocolos ocorrem por variações de cura espontânea, tipos de meio de cultura, recorrência da infecção, intensidade de manifestação clínica e fase da lactação. Diante do exposto, é recomendável que o veterinário adote o protocolo indicado pelo fornecedor de meios de cultura.

De uma forma geral, todos os protocolos de uso de antibióticos baseados em sistemas de diagnóstico “na fazenda”, quando empregados corretamente, resultam em ganhos econômicos e redução no uso de antibióticos²⁹. Isso ocorre em virtude do aumento da probabilidade de cura microbiológica, da menor taxa de descarte de leite, da melhor condição geral do animal e da identificação de algumas condições que dispensam o tratamento de mastites causadas por bactérias gram-negativas, haja vista que a taxa de cura espontânea é alta para este grupo de patógenos^{28,29}.

Dados não publicados do sistema de produção *compost barn* da Embrapa Gado de Leite indicam uma redução de uso de antibiótico intramamário em cerca de um terço em função da implementação do sistema de diagnóstico “na fazenda” (comunicação pessoal de:



Carlos Roberto da Silva). A Figura 4 demonstra o perfil microbiológico presuntivo de isolados clínicos de mastite ocorridos na fazenda experimental realizado por diagnóstico “na fazenda” e, em alguns casos, complementado por isolamento bacteriano clássico, no ano de 2023. De acordo com estes dados, cerca de 22,7% dos animais com mastite clínica não apresentaram isolamento positivo no sistema “na fazenda”.

A determinação do perfil de sensibilidade bacteriana é um ponto que gera muita dificuldade de compreensão por parte de alguns técnicos. Diante disso, é importante compreender que os testes de sensibilidade bacteriana podem ser utilizados para determinar a sensibilidade total, a sensibilidade diminuída (necessitando do aumento da exposição ao fármaco) ou a resistência de bactérias frente aos antibióticos *in vitro*²⁶. Independentemente dos tipos de testes utilizados, para conferir acurácia e reprodutibilidade, é recomendado que os laboratórios que os

executem sigam protocolos mundialmente reconhecidos e padronizados, como, por exemplo, as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), do Comitê Brasileiro de Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (BrCAST) ou do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST). No caso do Brasil, a partir da Portaria SVS/MS nº 64, de 11 de dezembro de 2018, determinou-se que todos os laboratórios comerciais e públicos sigam a versão brasileira do EUCAST (versão BrCAST). Para os casos em que não houver ponto de corte definido para alguma combinação de microrganismo x antimicrobiano, deverão ser adotadas as recomendações mais recentes da *European Food Safety Authority* (EFSA).

O ensaio de disco-difusão (Figura 5) figura entre os testes mais amplamente utilizados dentre os distintos testes de sensibilidade bacteriana existentes. Sua ampla adoção se deve, em grande parte, ao baixo

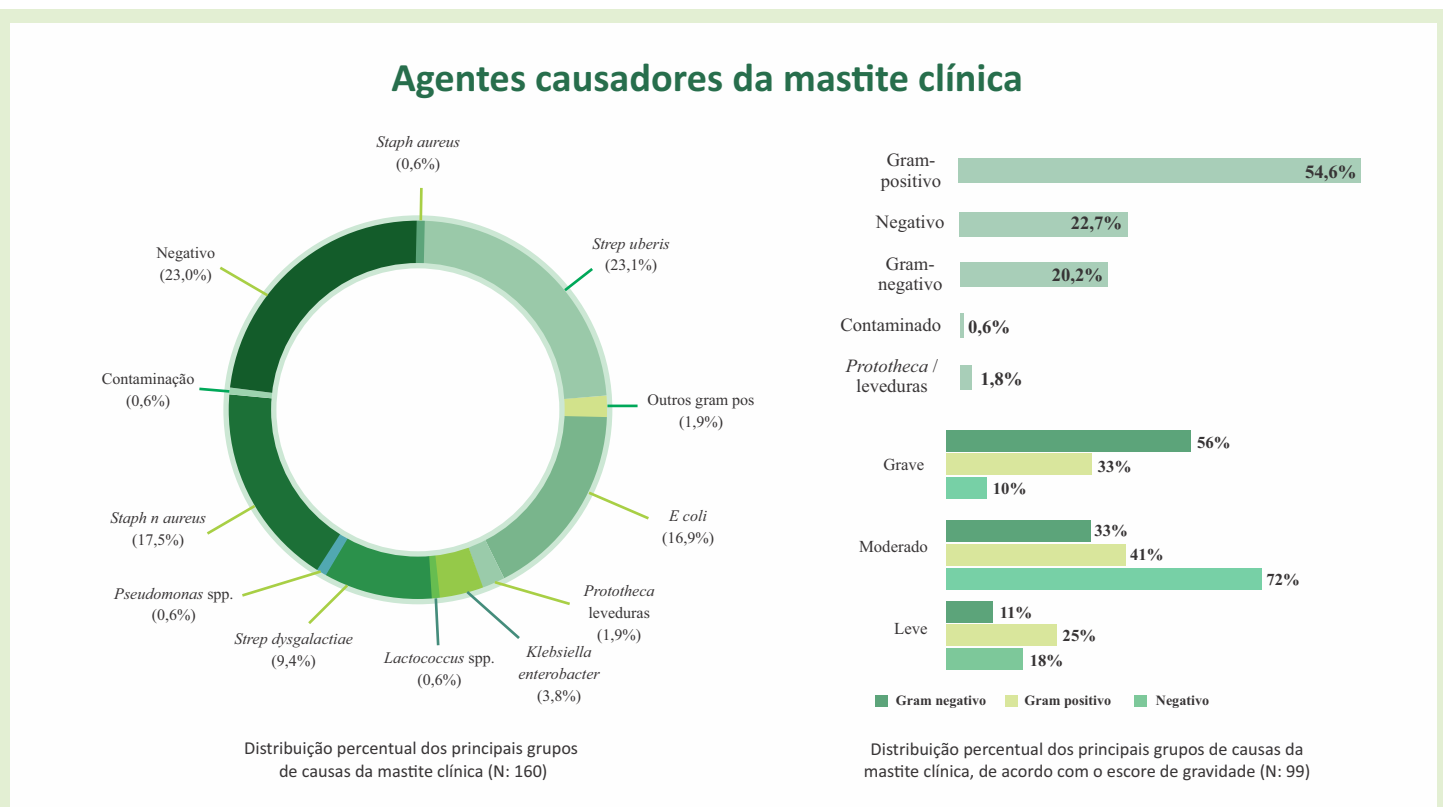


Figura 4. Perfil microbiológico presuntivo de isolados clínicos de mastite ocorridos na fazenda experimental José Henrique Bruschi no ano de 2023 da Embrapa Gado de Leite (Fonte: C.R. da Silva).



Figura 5. Teste de disco-difusão pelo método de Kirby-Bauer. Imagem destaca um isolado multidroga resistente, produtor de beta-lactamase de espectro estendido, pela formação de zona fantasma entre cefalosporina e amoxicilina-clavulanato (ESBL - seta) (Fonte: N.C. Gaeta).

custo, à facilidade de execução e ao curto tempo de resposta. Por outro lado, trata-se de um ensaio qualitativo, onde os resultados são classificados em “sensível”, “sensibilidade diminuída” (intermediária) ou “resistente”, baseados no diâmetro do halo de inibição do crescimento bacteriano. Apesar de haver forte correlação negativa entre os resultados de CIM obtidos dos ensaios quantitativos e o diâmetro do halo, os pontos de corte para essa medida podem apresentar pequenas distorções de resultado frente à bactéria avaliada. Isso ocorre porque a determinação dos pontos de corte dos halos de inibição é feita por um comitê internacional, baseado em dois parâmetros:

- I) Na CIM de pelo menos 300 isolados clínicos (que não são de origem brasileira);
- II) Nos parâmetros farmacocinéticos esperados para o antibiótico no plasma e tecido da espécie-alvo.

Assim, é importante que o médico veterinário se certifique de qual foi o ponto de corte utilizado pelo laboratório para emitir o resultado, visto que, muitas vezes, são utilizados pontos e cortes de bactérias isoladas de outras espécies. Do ponto de vista interpretativo, considera-se o disposto no Quadro 2.

Os testes de sensibilidade bacteriana quantitativos são amplamente utilizados para definições de abordagens terapêuticas baseadas em testes microbiológicos de bactérias isoladas do próprio animal. Quando se considera a prevenção da RBA, este grupo de ensaios é a recomendação “ouro” para a definição da posologia a ser empregada na antibioticoterapia. Os ensaios quantitativos podem ser realizados pelas técnicas de diluição ou microdiluição em caldo, fitas de gradiente de concentração e diluição em ágar. Normalmente, os resultados são expressos em CIM, acompanhados ou não da classificação (S) sensível, (I) intermediária ou (R) resistente baseada em pontos de corte epidemiológicos. A CIM é definida como a menor concentração de antibiótico que impede o crescimento



Quadro 2. Interpretação dos resultados de testes de sensibilidade antimicrobiana.

Resultado	Interpretação clínica
(S) Sensível	Probabilidade de sucesso terapêutico é grande quando usada uma posologia padrão para o controle do agente.
(I) Sensibilidade diminuída ou intermediária	Alta probabilidade de sucesso terapêutico pela exposição aumentada ao antimicrobiano, ou seja, deve-se fazer um ajuste do regime de dosagem do antibiótico. É recomendável que o veterinário leve em consideração a forma de ação (dose dependente ou tempo dependente) do antimicrobiano.
(R) Resistente	Alta probabilidade de insucesso terapêutico, mesmo em condições de elevação da dose.

visível de bactérias. Apesar dos custos e da dificuldade de execução dos testes quantitativos na rotina laboratorial, seu uso permite que o médico veterinário, associando conhecimentos de clínica e farmacologia, realize uma abordagem de antibioticoterapia mais precisa e com menor risco de seleção de bactérias resistentes.

A interpretação dos resultados de sensibilidade bacteriana aos antibióticos, nos casos em que biofilme bacteriano já está formado durante o tratamento, deve ser realizada com bastante atenção pelo prescritor do antibiótico. Isso ocorre em função da inexistência de protocolos de teste para determinação da sensibilidade bacteriana aos antibióticos aprovados por comitês da área, como os acima mencionados. Assim, a escolha do antibiótico para o tratamento de infecções por bactérias em biofilme, quase que em sua totalidade, é baseada nos testes de susceptibilidade de inóculos de bactérias em crescimento planctônico. Todavia, existem adaptações científicas do teste de diluição em caldo para determinação da concentração mínima de erradicação de biofilme (CMEB) e concentração inibitória mínima de biofilme (CIMB)²⁴. Segundo os autores, à medida que o biofilme envelhece, a CMEB tende a aumentar. Assim, tanto a CMEB quanto a CIMB tendem a ser de 4 a 1000 vezes maiores que a CIM da bactéria planctônica, a depender do antibiótico, da espécie bacteriana e da fase de desenvolvimento do biofilme.



CONSIDERAÇÕES FINAIS

Bactérias resistentes podem ser selecionadas pela exposição inadequada aos antibióticos. A transmissão de genes de resistência entre bactérias da mesma espécie e de espécies distintas pode ocorrer por mecanismos horizontais. Tanto a sobredosagem, quanto a subdosagem favorecem a RBA. Portanto, sempre que possível, deve-se utilizar balança (pesagem) para definir a dose adequada para o paciente. Para minimizar a pressão de seleção no meio ambiente, recomenda-se a utilização de um antibiótico que apresente baixa resiliência ambiental, ou que seja metabolizado e excretado na forma de compostos inativos ou com baixa atividade antimicrobiana. Quando tratamos uma infecção, também estamos elevando a pressão de seleção sobre bactérias comensais oportunistas e outras bactérias do microbioma no qual o ruminante está inserido. Ou seja, na maioria das vezes, a origem das bactérias resistentes não é a infecção tratada. É preferível uso de antibióticos mais específicos em detrimento dos de amplo espectro para reduzir a pressão de seleção em espécies bacterianas que não sejam o alvo terapêutico. Em uma infecção, a identificação da bactéria e a definição do seu perfil de sensibilidade são o alicerce para o uso racional de antibióticos e para a alta taxa de sucesso terapêutico.

O processo de envelhecimento do biofilme (cronificação) aumenta a resiliência das bactérias contra os antibióticos que se encontram nesse microambiente. Portanto, o tempo entre o início da infecção e o início da antibioticoterapia impacta na taxa de sucesso terapêutico. É preconizável o uso de antibioticoterapia local em detrimento à sistêmica para que não haja exposição de todo o organismo a um antimicrobiano seletivo. Sempre que possível, deve-se solicitar ao laboratório microbiológico que emita os resultados de sensibilidade baseados em pontos de corte da espécie e de tecidos-alvo. A transferência horizontal de genes é um fenômeno probabilístico, e as condições ambientais e o aumento da frequência de genes de resistência aos antibióticos no microbioma bacteriano podem contribuir para o aparecimento de populações bacterianas patogênicas com RBA. Assim, a adoção de boas práticas de higiene, o isolamento dos animais acometidos e o destino adequado do leite e dejetos dos animais tratados com antibiótico são fundamentais na prevenção da RBA.

REFERÊNCIAS

1. COOK, M.A.; WRIGHT, G.D. The past, present, and future of antibiotics. *Science Translational Medicine*, v.14, n.657, 7793, 2022.
2. MURRAY, C.J. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, v.399, n.10325, p.629-655, 2022.
3. HOFER, U. The cost of antimicrobial resistance. *Nature Reviews Microbiology*, v.17, n.1, p.3, 2018.
4. STEHLING, E.G. et al. Livestock and its role in the emergence, spread, and evolution of antimicrobial resistance: animal-to-human or animal-to-environment transmission. *Frontiers in Veterinary Science*, v.10, p.1-3, 2023.
5. THE JOHNS HOPKINS PUBLIC HEALTH.



The legacy of a century of service: The food issue. *Hopkins Bloomberg School of Public Health Magazine*. Edição Especial: Food. Baltimore: Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, 2014.

46. TISEO, K. et al. Global trends in antimicrobial use in food animals from 2017 to 2030. *Antibiotics*, v.9, n.12, p.918, 2020.

7. VAN BOECKEL, T.P. et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.112, n.18, p.5649-5654, 2015.

8. DIMASI, J.A. et al. The price of innovation: new estimates of drug development costs. *Journal of Health Economics*, v.22, n.2, p.151-185, 2003.

9. ADAMS, C.P.; BRANTNER, V.V. Estimating the cost of new drug development: is it really 802 million dollars? *Health Affairs (Project Hope)*, v.25, n.2, p.420-428, 2006.

10. ÅRDAL, C. et al. Insights into early stage of antibiotic development in small- and medium-sized enterprises: a survey of targets, costs, and durations. *Journal of Pharmaceutical Policy and Practice*, v.11, p.8, 2018.

11. WORLD BANK. *Drug-resistant infections: a threat to our economic future (discussion draft)*. Washington, DC: World Bank, 2016. 132 p.

12. WHO; WIPO; WTO. *Antimicrobial resistance – a global epidemic*. Geneva: World Health Organization, World Intellectual Property Organization, World Trade Organization, 2016.

13. MAGNUSSON, U. et al. Antimicrobial resistance at the livestock–human interface: implications for

veterinary services. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, v.40, n.2, p.511-521, 2021.

14. AGERSØ, Y. et al. Spread of extended spectrum cephalosporinase-producing *Escherichia coli* clones and plasmids from parent animals to broilers and to broiler meat in a production without use of cephalosporins. *Foodborne Pathogens and Disease*, v.11, n.9, p.740-746, 2014.

15. ARNOLD, B.J. et al. Horizontal gene transfer and adaptive evolution in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, v.20, n.4, p.206-218, 2021.

16. LLEWELYN, M.J. et al. The antibiotic course has had its day. *BMJ*, v.358, 3418, 2017.

17. ANDERSSON, D.I. et al. Mechanisms and clinical relevance of bacterial heteroresistance. *Nature Reviews Microbiology*, v.17, n.8, p.479-496, 2019.

18. TAO, S. et al. The spread of antibiotic resistance genes in vivo model. *Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology*, v.2022, 3348695, 2022.

19. DARBY, E.M. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nature Reviews Microbiology*, v.21, n.5, p.280-295, 2023.

20. WANG, J. et al. Pharmacokinetic profile of ceftiofur hydrochloride injection in lactating Holstein dairy cows. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v.41, n.2, p.301-306, 2018.

21. WALKER, W.A. Dysbiosis. In: NAGLER-ANDERSON, C.; KAMADA, N. 1ª ed. *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology*. London: Academic Press, 2017. p.227-232.



22. SABINO, Y.N.V. et al. Characterization of antibiotic resistance genes in the species of the rumen microbiota. *Nature Communications*, v.10, n.1, p.5252,2019.
23. LARSSON, D.G.J.; FLACH, C.-F. Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology*, v.20, n.5, p.1-13,2021.
24. CIOFU, O. et al. Tolerance and resistance of microbial biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, v.20, n.10, p.621-635,2022.
25. SCHROEDER, M. et al. The complex relationship between virulence and antibiotic resistance. *Genes*, v.8, n.1, p.39,2017.
26. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Diretriz nacional para elaboração de programa de gerenciamento de antimicrobianos em serviços de saúde*. Revisão 2023. Brasília: ANVISA, 2023.96 p.
27. TOMMASONI, C. et al. Mastitis in dairy cattle: on-farm diagnostics and future perspectives. *Animals*, v.13, n.15, p.2538,2023.
28. LAGO, A.; GODDEN, S.M. Use of rapid culture systems to guide clinical mastitis treatment decisions. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v.34, n.3, p.389-412,2018.
29. DOWN, P.M. et al. Factors affecting the cost-effectiveness of on-farm culture prior to the treatment of clinical mastitis in dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*, v.145, p.91-99,2017.