

MILIMANI ANDRETTA

**UMA ABORDAGEM EM ONE HEALTH PARA COMPREENDER FATORES
ASSOCIADOS A DISTRIBUIÇÃO DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS NA
CADEIA PRODUTIVA DO LEITE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Luís Augusto Nero

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

A561a
2023
Andretta, Milimani, 1992-
Uma abordagem em one health para compreender fatores
associados a distribuição de resistência a antibióticos na cadeia
produtiva do leite / Milimani Andretta. – Viçosa, MG, 2023.
1 tese eletrônica (92 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexos.

Orientador: Luis Augusto Nero.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Veterinária, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.586>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Escherichia coli*. 2. Bacteriologia veterinária. 3. Leite -
Produção. 4. Bovinos de leite - Doenças. 5. Drogas - Resistência
em micro-organismos. I. Nero, Luis Augusto, 1975-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária. III. Título.

CDD 22. ed. 636.0896926


MILIMANI ANDRETTA

UMA ABORDAGEM EM ONE HEALTH PARA COMPREENDER FATORES ASSOCIADOS A DISTRIBUIÇÃO DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS NA CADEIA PRODUTIVA DO LEITE


Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 29 de agosto de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 MILIMANI ANDRETTA
Data: 27/09/2023 14:56:41-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Milimani Andretta
Autora

Documento assinado digitalmente
 LUIS AUGUSTO NERO
Data: 02/10/2023 17:59:42-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Luís Augusto Nero
Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, que foram os meus maiores apoiadores e provedores ao longo de todos estes anos. Os quais me deram educação, e sempre me ensinaram a correr atrás dos meus objetivos, a lutar pelos meus sonhos e me tornar a mulher independente que aqui vos fala.

Agradeço também aos meus amigos, que foram família, aconchego, abraço em tantos momentos. Que vibraram com as minhas vitórias e me incentivaram nas dificuldades. E aqui, eu não poderia deixar de agradecer à Rafa Tavares, à Lorena e à Laryssa, que foram como irmãs enquanto dividimos o apartamento. À Frida, minha irmã da vida inteira, que me salva em toda vez que o assunto é formatação de word e power point, me faltam palavras pra descrever tamanho sentimento e conexão. À Carol, que foi minha companheira em Palotina onde juntas nos apoiamos para superar momentos difíceis.

Agradeço a todos os meus colegas e amigos de laboratório, pelos conhecimentos compartilhados e bons momentos de descontração em meio ao caos (haha). Um agradecimento especial à Lara e ao Caio, que me auxiliaram nas extensivas coletas, tanto em Viçosa, quanto em Palotina, vocês foram essenciais. Agradeço também à Rafa Tavares, que foi minha companheira durante todo doutorado, validando métodos, executando milhares de antibiogramas e lavando muito, mas muitos tubos de ensaio. Eu não poderia ter tido melhores companheiros.

À equipe do LACOMA - UFPR, pela disponibilidade e apoio durante as coletas das amostras e análises laboratoriais, bem como o Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot, por auxiliar no primeiro contato com um dos laticínios amostrados.

Um agradecimento a todos os professores envolvidos no projeto, Prof. Ricardo, Wladimir, Mococa, Juliano, Luciano, Doug e meu orientador, por todos os ensinamentos, opiniões, e principalmente por confiarem em mim para a realização da etapa do breakpoint de cada pequeno projeto.

Aos membros da banca por terem aceito o meu convite, e por terem contribuído durante a minha vida acadêmica, seja cientificamente ou apenas com uma prosa inteligente e esclarecedora durante os momentos de descontração.

Minha gratidão ao meu orientador, Prof. Dr. Luís Augusto Nero, por estes mais de seis anos entre estágio final supervisionado, mestrado e doutorado. Obrigada por me orientar, auxiliar e ajudar em tudo o que fosse necessário e do seu alcance, e em diversos momentos aguentou os meus surtos e a minha teimosia (e posso dizer que em 99% das vezes foi o senhor quem esteve correto hahahaha).

Por fim, agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG por viabilizarem a execução do projeto. E à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (Código Financeiro 001) pelo subsídio da minha bolsa de doutorado.

RESUMO

ANDRETTA, Milimani, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2023. **Uma abordagem em One Health para compreender fatores associados a distribuição de resistência a antibióticos na cadeia produtiva do leite.** Orientador: Luís Augusto Nero.

O uso abusivo e inadequado de antibióticos é uma prática comum na pecuária leiteira do Brasil, usualmente associados a diagnóstico incorreto de doenças infectocontagiosas, sub dosagens e tratamentos incompletos. Apesar de não ser claro o impacto causado devido ao uso de antibióticos, a cadeia produtiva leiteira é uma importante fonte de desenvolvimento e distribuição de microrganismos resistentes a antibióticos, podendo contribuir com as falhas terapêuticas em humanos. Neste sentido, esse estudo teve como objetivo avaliar a potencial associação de características de propriedades rurais leiteiras e a distribuição de resistência a antibióticos, considerando uma abordagem One Health. Vinte (n = 20) propriedades rurais leiteiras foram selecionadas nas regiões de Viçosa, MG (n = 10) e Palotina, PR (n = 10) e seus proprietários entrevistados considerando um questionário epidemiológico contendo questões objetivas relacionadas às características da propriedade rural, produção leiteira, higiene de ordenha e sanidade animal. Amostras de leite, fezes de animais e humanos e água das propriedades rurais selecionadas foram obtidas (n = 340) e submetidas a análises microbiológicas para isolamento de *Escherichia coli*; Os 1.091 isolados obtidos foram caracterizados quanto aos seus perfis de resistência à amoxicilina (AMO), ceftiofur (CEF), ciprofloxacina (CIP), cloranfenicol (CLO), sulfametaxazol + trimetropima (SUT) e tetraciclina (TET), pelo teste de diluição em ágar. Considerando o número total de animais, as propriedades rurais foram classificadas em pequenas (n = 13), semiextensivas (n = 3) e intensivas (n = 4), todas com características heterogêneas na produção leiteira. Nenhuma propriedade rural indicou controle da incidência de mastite e outras doenças infectocontagiosas e tampouco gastos com medicamentos e perda de animais. Amoxicilina e tetraciclina foram os antibióticos com maiores índices de resistência (37,5% e 36,4%, respectivamente), e ao menos uma propriedade de cada grupo apresentou isolados resistentes. Todos os grupos de propriedades rurais apresentaram isolados de *E. coli* com variados perfis de resistência e com múltipla resistência (MDR). Propriedades rurais de criação intensiva apresentaram o maior percentual de micro-organismos MDR (14,6%) e maior variedade de perfis de MDR. Os perfis de resistência AMO-SUT-TET, AMO-CLO-TET, AMO-CEF-SUT-TET, AMO-CIP-CLO-SUT-TET estiveram presentes em todos os grupos. Considerando os resultados obtidos, é possível concluir que independentemente das características do tamanho e das características

das propriedades, as medidas adotadas para evitar o desenvolvimento e distribuição de micro-organismos resistentes não são adotadas de maneira consciente e sistemática. Mais estudos são necessários, para consolidar um monitoramento efetivo de presença e distribuição de micro-organismos resistentes nos diferentes pontos críticos deste sistema de produção.

Palavras-chave: *Escherichia coli* genérica. Sistema de produção. Enfermidades.

ABSTRACT

ANDRETTA, Milimani, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2023. **An approach in One Health to understand factors associated with the distribution of antibiotic resistance in dairy chain.** Advisor: Luís Augusto Nero.

The abusive and inappropriate use of antibiotics is a common practice in Brazilian dairy farms, usually associated with incorrect diagnosis of infectious and contagious diseases, under dosages and incomplete treatments. Although the impact caused by the use of antibiotics is not clear, the dairy production chain is an important source of development and distribution of antibiotic-resistant microorganisms, which may contribute to therapeutic failures in humans. In this sense, this study aimed to evaluate the potential association of characteristics of dairy farms and the distribution of antibiotic resistance, considering a One Health approach. Twenty (n = 20) dairy farms were selected in the regions of Viçosa, MG (n = 10) and Palotina, PR (n = 10) and their owners were interviewed considering an epidemiological questionnaire containing objective questions related to the characteristics of the farm, production milking, milking hygiene and animal health. Milk, animal and human feces and water samples from selected rural properties were obtained (n = 340) and submitted to microbiological analysis for isolation of *Escherichia coli*; the 1,091 isolates obtained were characterized according to their profiles of resistance to amoxicillin (AMO), ceftiofur (CEF), ciprofloxacin (CIP), chloramphenicol (CLO), sulfamethoxazole + trimethoprim (SUT) and tetracycline (TET), by the dilution test in agar. Considering the total number of animals, rural properties were classified as small (n = 13), semi-extensive (n = 3) and intensive (n = 4), all with heterogeneous characteristics considering of milk production. Any dairy farm indicated control of the incidence of mastitis and other infectious-contagious diseases, nor expenses with medicines and loss of animals. Amoxicillin and tetracycline were the antibiotics with the highest rates of resistance (37.5% and 36.4%, respectively), and at least one property in each group had resistant isolates. All groups of rural properties presented *E. coli* isolates with different resistance profiles and with multiple resistance (MDR), whether they come from cows, heifers, joint milk or from humans working on the properties. Intensive farming farms had the highest percentage of MDR microorganisms (14.6%) and the greatest variety of MDR profiles. The resistance profiles AMO-SUT-TET, AMO-CLO-TET, AMO-CEF-SUT-TET, AMO-CIP-CLO-SUT-TET were present in all groups. Considering the results obtained, it is possible to conclude that, regardless of size characteristics and property characteristics, the measures adopted to prevent the development and distribution of resistant microorganisms are not systematically adopted. More studies are

needed to consolidate an effective monitoring of the presence and distribution of resistant microorganisms in the different critical points of this production system.

Keywords: Generic *Escherichia coli*. Production system. Infirmities.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Data on dairy production of the six countries with the largest milk production worldwide in 2020. (a) Milk production (grey bars); (b) Number of lactating cows (grey bars) and milk productivity (dots). Sources: FAO (2022); EMBRAPA (2022b)..... 20

Figure 2: Summary of the alternative routes of distribution and contamination by antibiotic residues (blue arrows) and antibiotic-resistant bacteria (orange arrows) in the dairy production environment, leading to the acceleration in the development of resistant..... 29

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Informações básicas presentes no questionário epidemiológico utilizado como referencial durante as entrevistas realizadas com proprietários de propriedades rurais leiteiras (n = 20) localizadas nas regiões de Viçosa (Minas Gerais) e Palotina (Paraná). 51
- Tabela 2:** Antibióticos e concentrações ($\mu\text{g/mL}$) utilizadas para interpretação de isolados de *Escherichia coli* obtidos da cadeia produtiva de leite (n = 1.091) quanto a resistência (R), resistência intermediária (RI) e susceptibilidade (S) através da técnica de breakpoint.....54
- Tabela 3:** Isolados de *Escherichia coli* obtidos em grupos de propriedades leiteiras (pequenas propriedades (PP), de criação semiextensiva (PCSE) e de criação intensiva (PCI)) e que apresentaram resistência aos respectivos antibióticos: amoxicilina, ceftiofur, ciprofloxacina, cloranfenicol, sulfametoxazol + trimetopim e tetraciclina. 63
- Tabela 4:** Número de isolados de *Escherichia coli*, oriundos da cadeia produtiva leiteira, que foram caracterizados como multidroga resistentes (MDR) e os perfis de resistência identificados nos grupos de pequenas propriedades (PP), de criação semiextensiva (PCSE) e de criação intensiva (PCI). 66

SUMÁRIO

ARTIGO I	13
Insights About Antibiotic Use in Brazilian Dairy Production.....	14
ABSTRACT.....	15
GRAPHICAL ABSTRACT	16
INTRODUCTION	17
THE BRAZILIAN DAIRY INDUSTRY	18
ANTIBIOTICS USED IN BRAZILIAN DAIRY PRODUCTION	21
Bovine mastitis and antibiotic use	22
CONSEQUENCES OF ANTIBIOTIC USE	25
Antibiotics residues.....	25
Antibiotic resistance.....	27
PERSPECTIVES	29
CONCLUSIONS	32
Acknowledgments	33
REFERENCES	34
ARTIGO II.....	45
Uma abordagem em One Health para compreender fatores associados a distribuição de resistência a antibióticos na cadeia produtiva do leite	46
RESUMO	47
1. INTRODUÇÃO.....	47
2. MATERIAL E MÉTODOS	51
2.1. Avaliação de características da produção leiteira	51
2.2. Avaliação da distribuição de resistência a antibióticos nas cadeias produtivas de leite	52
2.3 Análise de dados	55
2.4 Aspectos éticos.....	55
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
PUBLICAÇÕES	78
ANEXOS	84

ARTIGO I

Insights About Antibiotic Use in Brazilian Dairy Production

Insights About Antibiotic Use in Brazilian Dairy Production

Milimani Andretta¹, Douglas Ruben Call², Luís Augusto Nero^{1*}

¹ InsPOA - Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Campus Universitário, Viçosa, MG 36570-900, Brazil

² Paul G. Allen School for Global Health, Washington State University, 240 SE Ott Road, Pullman, WA 99164, USA

* Corresponding author: Luís Augusto Nero. E-mail: nero@ufv.br. Address: Universidade Federal de Viçosa, Campus Universitário, Viçosa, MG 36570-900 Phone Number: +55 31 9 9744-6002

Artigo publicado na *International Journal of Dairy Technology* (FI 4.286: 2021), 2022. DOI: doi.org/10.1111/1471-0307.12914

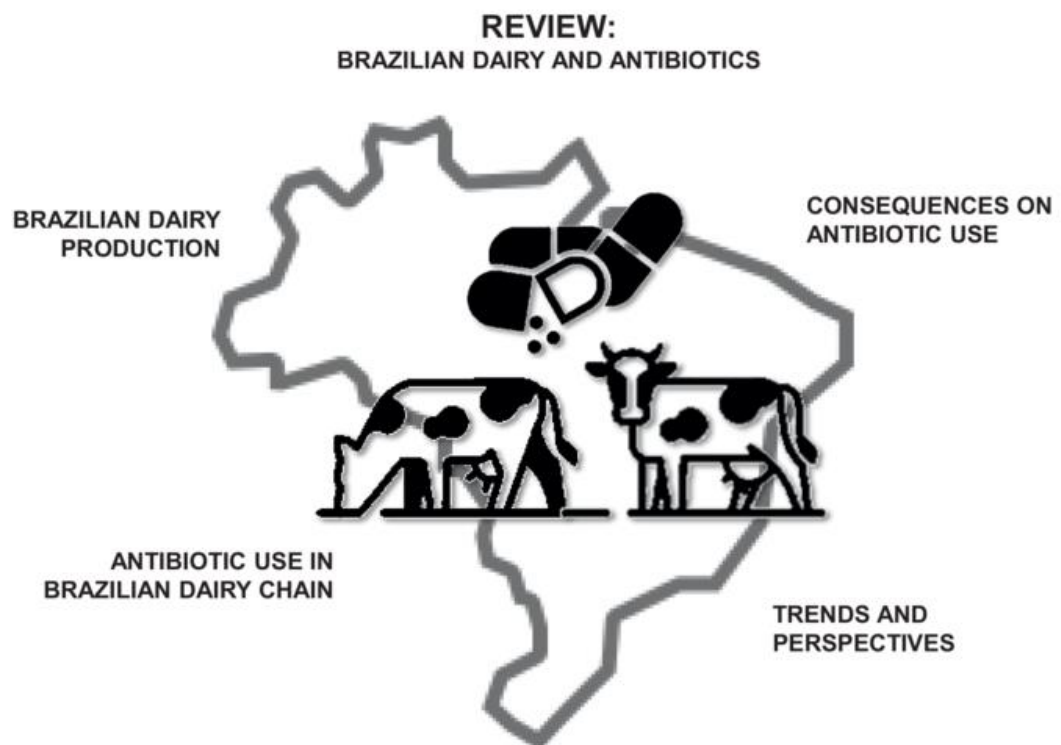
ABSTRACT

Milk and dairy products are important sources of proteins, fats, and vitamins. Although Brazil is the fourth largest milk producer in the world, mastitis, metritis, enteritis, and respiratory diseases are still important in this industry. A number of antibiotics are employed for treatment and prophylaxis for these diseases, including cephalosporins, lincosamides, aminoglycosides, penicillins, tetracyclines and macrolides. Vaccination offers an important opportunity to reduce the demand for antibiotics. In this review, we present the insights of production, the antibiotics use in the Brazilian dairy industry, the consequences of these activities, and perspectives for their control and surveillance of antibiotic resistance.

Keywords: antibiotic, dairy, Brazil, animal health, surveillance.

GRAPHICAL ABSTRACT

Brazil has an important role in dairy production worldwide, and antibiotics are widely used to control dairy cattle diseases. Improper use of antibiotics can lead to residues in milk and dairy products, as well as antimicrobial resistance in dairy microbiota, relevant hazards for Public Health. Thus, this review presents insights into the antibiotics use in Brazilian dairy cattle, including benefits, consequences and alternatives.



INTRODUCTION

Antibiotic therapy is one of the most important achievements of modern medicine, preventing millions of premature deaths from bacterial infections. Antibiotic resistance has been present in nature for millions of years, but the spread of antibiotic resistant microorganisms has accelerated in the last 30 years, coinciding with the intensification of antibiotic usage (Jørgensen *et al.* 2020). It is estimated that more than 2.8 million hospitalizations and approximately 35,000 deaths are caused by antibiotic resistant bacteria in the United States alone (CDC, 2019).

Antibiotics are commonly used in the animal production, whether for treatment or prophylaxis, thus helping to improve animal production and health (Jayarao *et al.* 2019). In dairy farms, antibiotics are used to control bovine mastitis, respiratory, gastrointestinal and other infectious diseases (Dankar *et al.* 2021). And while antibiotics are central to controlling infectious disease in veterinary medicine, other practices such as improved biosecurity and animal welfare could reduce the burden of infectious disease and commensurate demand for these important therapeutics (Helliwell *et al.* 2020).

According to estimates by Food and Agriculture Organization (FAO, 2020), the world population should reach 9.1 billion inhabitants by 2050 and, consequently, the food industry must increase production up to 70%. According to Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA 2020), milk is consumed by 80% of the world's population and by 91.6% of Brazilians. The FAO (2013) and the Brazilian Ministry of Health (Brasil, 2014) recommends milk as part of a healthy diet, with milk and dairy products being important sources of proteins, fats, vitamins, potassium, phosphorus, magnesium, zinc and calcium needed for child development and prevention of osteoporosis (Ratajczak *et al.* 2021). According to the FAO, Brazil produced 35 million tons of milk in 2019, representing an increase of 673% when

compared to the first official Brazilian census from 1961 (5.2 million tons; FAO, 2021). Presumably, the growth of the Brazilian dairy production is due to an increased number of producers, but also due to improvements in the herd welfare, management, genetics, and milking and milk processing practices. The aim of this review is to discuss the benefits and potential concerns related to the use of antibiotics in Brazilian dairy production.

THE BRAZILIAN DAIRY INDUSTRY

Milk production in Brazil comes from a mix of breeds with Holstein being the most common followed by Girolando, Jersey, Gir, Brown-Swiss and Red Swedish. Smallholder farms have fewer than 70 cows, production is typically below 8 liters per cow per day (L/cow/day), and these operations are usually managed by rural households. Semi-extensive farms have approximately 100 cows with an average production of 12 L/cow/day while specialized and intensive production farms have approximately 200 or more cows and productivity greater than 17 L/cow/day. Regardless of farm size, most cows are pasture fed (Nero et al., 2017, pp. 86-96). Herds are typically closed with calf rearing occurring onsite in individual shelters (2 to 2.5 m² per animal) where they remain until the 2nd or 3rd month of life or in collective pens until the 8th month of age (Silva *et al.* 2019).

Brazilian milk producers are mainly characterized as smallholders (79.6%), accounting for 26% of national production. Semi-extensive farms (19.7%) account for 58.1% of production, and specialized and intensive farms (0.7%) account for 16% of production (EMBRAPA, 2022a). Based on data from EMBRAPA, around 2/3 of the Brazilian milk production is delivered to the formal milk sector for marketing (EMBRAPA, 2022a). The remaining 1/3 of the Brazilian milk production is presumably directed to the clandestine retail sale and processing of non-inspected raw milk products (Lee *et al.* 2012).

Some Brazilian farms are highly specialized and produce high quality milk and dairy products using newer technologies and intensive herd health practices. This effort produces dairy products that are competitive in the retail sale, nationally and internationally. These farms produce milk with high microbiological quality and high nutritional value, maintaining productivity throughout lactation by providing sufficient and adequate nutrition, and by improving the animals' genetics, welfare and health. In addition, these farms employ available technologies, such as mechanization and automated disease control while seeking improvements in hygiene practices and active recruitment of qualified personnel (Nero et al., 2017, pp. 86-96).

Despite these efforts, the majority of Brazilian dairy production is not yet competitive for international trade, likely due to overall poorer raw milk quality, insufficient productivity, inefficient processing and limited access to the market. Nevertheless, the dairy sector has a significant domestic footprint, boosting economic activities and reducing rural exodus. According to the 2017 IBGE agricultural census, Brazil has 2.5 million agricultural farms, of which 50% are dairy farms (IBGE, 2017). Even with the reduction of farms and animals when compared to the 2006 IBGE agricultural census, milk production increased 47%, consistent with greater process efficiency and more productive animals when compared to previous records (IBGE, 2017). Despite these improvements and Brazil being one of the largest milk producers in the world, overall dairy productivity is one of the lowest when compared to the main producing and exporting countries. For example, average daily milk production in Brazil (1,609 kg/cow/year) is considerably lower than other countries including New Zealand (3,800 kg/cow/year), Argentina (5,500 kg/cow/year) and Canada (9,000 kg/cow/year) (Vilela *et al.* 2017). Based on the most recent available data regarding milk production from 2020 (FAO 2022; EMBRAPA 2022b), Brazil was the 4th largest milk producer and presented the 3rd biggest dairy herd worldwide; however, the productivity can be considered as low, five times

lower than the USA productivity, indicating substantial problems in the production at farm level (Figure 1).

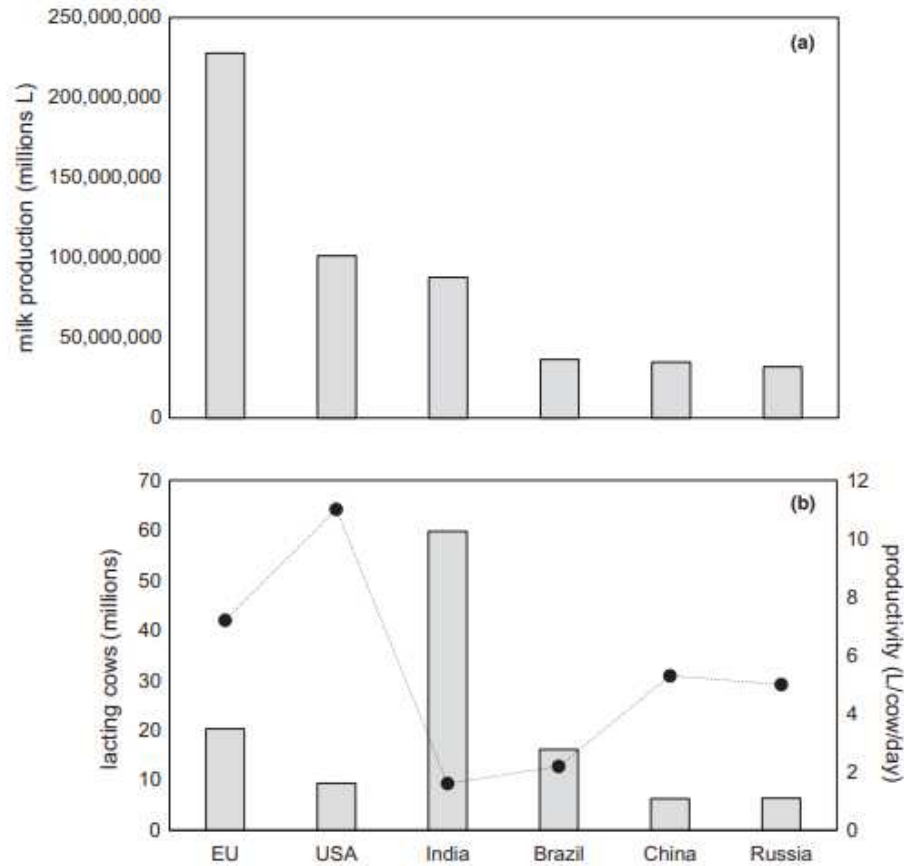


Figure 1: Data on dairy production of the six countries with the largest milk production worldwide in 2020. (a) Milk production (grey bars); (b) Number of lactating cows (grey bars) and milk productivity (dots). Sources: FAO (2022); EMBRAPA (2022b).

Important industry milestones include the formation of the Brazilian Food Inspection Service (Serviço de Inspeção Federal - SIF) in 1950 and publication of the first guidelines for animal origin food production (Regulation of Industrial and Sanitary Inspection of Products of Animal Origin - RIISPOA) in 1952. SIF and RIISPOA established minimum requirements for the sanitary and quality control of milk. In the 1990's, a joint effort from inspection organs, research centers and dairy cooperatives resulted in an important update in the guidelines and requirements for dairy production, aiming to improve the quality and safety of the Brazilian

milk. These rules were subsequently updated to gradually establish more strict parameters for the quality and safety of milk in Brazil, including the adoption of the cold chain in the production (storage and transport), control of antibiotics residues, systematic analysis for somatic cells counts (SCC), and enumeration of mesophilic aerobes in raw milk. The most recent update established that the dairy industry is responsible for providing technical assistance to dairy farmers, supporting the production and assuring the quality of raw milk (Lima *et al.* 2020).

In 1990, the Brazilian Ministry of Agriculture launched a national program to control waste and chemical contaminants in animal-origin foods (Programa Nacional de Controle de Resíduos - PNCR, Brasil, 1999). This program conducted surveillance and control activities for chemical residues, including antibiotics, in food products available for retail sale. The consequences of antibiotic resistance were not a significant concern for these efforts. The National Plan for the Prevention and Control of Microbial Resistance in Health Services established an Acceptable Daily Intake (ADI) and a Maximum Residue Limit (MRL) for different residues.

ANTIBIOTICS USED IN BRAZILIAN DAIRY PRODUCTION

Relevant diseases are still important in the Brazilian dairy cattle and antibiotics help farmers offer industries and consumers a safe and quality food, limiting transmission of foodborne pathogens (Rabello *et al.* 2020). Bacterial diarrhea can cause high mortality in herds, reducing animal production and generating economic losses to the farmer (Zhao *et al.* 2021). Antibiotic therapy is recommended in such cases because these pathogens spread rapidly in the small intestine of calves, causing clinical complications and widespread environmental contamination (Constable 2009; Klaus *et al.* 2021). Metritis is another disease of global

importance, which affects approximately 20% of lactating cows and generates at a cost of \$600 million for the American dairy industry alone (Overton and Fetrow 2017; Ma *et al.* 2018). Tetracyclines and β -lactams are usually employed for laminitis, while cephalosporins, tetracyclines and penicillins are used to treat metritis, respiratory diseases and enteritis (Obaidat *et al.* 2018; Ma *et al.* 2018; Mileva *et al.* 2020). A wide range of antibiotics are used to treat mastitis in the Brazilian dairy cattle, including cephalosporins, lincosamides, aminoglycosides, penicillins, tetracyclines and macrolides (Kuipers *et al.* 2016; More *et al.* 2017; Doehring and Sundrum 2019; Tomazi *et al.* 2020). Although it is mandatory to present a veterinary prescription to purchase antibiotics, the use of drugs without veterinarian prescription is recurrent (Silva *et al.* 2019).

Bovine mastitis and antibiotic use

Bovine mastitis is a complex, multifactorial disease that is caused by several pathogens that infect the mammary gland of animals. Around 80% of the mastitis cases in cows involve bacteria such as *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Mycoplasma* and other environmental pathogens (Dalanezi *et al.* 2020). Mastitis diagnosis is performed by checking the somatic cell count, which differentiates the onset of inflammatory processes in the mammary gland (Giagu *et al.* 2022). Management of mastitis usually involves transferring infected animals to the end of the milking order, preventing other mammary quarters of the same animal from being contaminated, and ensuring the comfort and well-being of that animal to limit the spread of infection to the rest of the herd. While smallholders rarely have access to microbiological services, the ideal would be isolation of pathogens and testing for antibiotic susceptibility to guide treatment decisions (Halasa and Kirkeby 2020).

Treatment of clinical mastitis usually involves infusing the infected quarter with different antibiotics, such as aminoglycosides, 2nd and 3rd generation cephalosporins, and

penicillins (Doehring and Sundrum 2019), but parenteral administration is used with severe cases (Cheng and Han 2020). The treatment of potential subclinical mastitis, known as dry cow therapy, is carried out during the dry period of cows, with the application of long-acting antibiotics such as tilmicosin (Ortega *et al.* 2020). The accumulation of residual milk in the cow's udder can also facilitate development and infection by pathogenic microorganisms (Bhutto *et al.* 2010; Terra *et al.*, 2020).

The failures in mastitis treatment cause serious economic problems as the condition spreads in the affected herds, leading to failure in the treatment of other diseases, such as respiratory, reproductive and foot diseases (Gelalcha *et al.* 2022, pp. 1-22), decrease in milk production and quality, potentially leading to milk disposal and premature slaughter (Cockram 2021). The current SCC limit in Brazilian raw milk is 500,000 cells/mL (Lima *et al.* 2020), which is lower than for US in general (750,000 cells/mL), but equivalent to some US states (California, 600,000 cells/mL, Oregon, 500,000 cells/mL, Washington and Idaho, 400,000 cells/mL) and the European Union (400,000 cells/mL) (USDA, 2019, 2022). Based on available data from Instituto Clínica do Leite (<https://www.clinicadoleite.com.br/>, Piracicaba, SP, Brazil), the geometric mean of SCC in commercial raw milk from Brazil increased from 341,000 to 400,000 per mL between 2006 and 2016 (Cassoli *et al.* 2016, pp. 16).

There is little reliable information on production, health and veterinary costs of mastitis at the herd level in Brazil (Gonçalves *et al.* 2019). One study evaluated the incidence of subclinical mastitis in 517 herds from five regions and found that an average 46.1% of herds were positive annually between 2011 and 2015 (Busanello *et al.* 2017). In the same study, SCC counts from dairy herds that were actively monitored for mastitis were substantially lower when compared to farms where mastitis was not managed. A study carried out by Gonçalves *et al.* (2019) in the state of Minas Gerais found that the increase in SCC in the bulk tank was the main

factor for decreasing milk production, clearly demonstrating that the lower the SCC, the greater the profit.

And while there is no centralized mechanism to collect data on antibiotic use in Brazilian food production systems, a study by Tomazi *et al.* (2020) in 19 dairy farms (southeastern Brazil) found that more than 60% of dairy farms use intramammary and systemic drugs for the treatment of bovine mastitis (penicillin, 1st- 3rd-, and 4th-generation cephalosporins, aminoglycosides, macrolides and tetracyclines, sulfonamides and pyrimidines). Pérez *et al.* (2020) characterized antibiotic resistance in 400 *S. aureus* isolates from cows with mastitis from four Brazilian states. The majority harbored genes that conferred resistance to penicillin (82.2%), while 33.9% and 45.2% harbored genes conferring resistance to tetracyclines and aminoglycosides, respectively. *S. aureus* isolates (n = 31, 100%) from clinical and subclinical mastitis samples from southern Brazil, were resistant to at least one of the tested antibiotics, including beta-lactams (ampicillin, penicillin, oxacillin), lincosamides (clindamycin) macrolides (erythromycin, tobramycin), sulfonamide and tetracycline (Haubert *et al.* 2017). Resistance to neomycin and tetracycline by *Streptococcus agalactiae* was also recorded in isolates obtained from mastitis samples from dairy cow herds located in northeastern Brazil (da Costa *et al.* 2021).

Although policies to control the use of antibiotics are individual for each country, some perceptions and procedures regarding the use of these substances in livestock are similar. Llanos-Soto *et al.* (2021) conducted a survey with an international group of dairy veterinarians to assess their opinions on antibiotic use and AMR in dairy farms. Based on this specific research, most of the interviewed veterinarians considered as excessive the use of antibiotics for mastitis and diarrhoea treatments, and indicated the absence of proper knowledge, poor hygienic conditions in production and failures in herd management are the main drawbacks to reducing the antibiotic use in dairy farms. In a study carried out in the United Kingdom, the

authorities considered that the dry cow therapy is the main cause of the presence of antibiotic residues in milk, indicating that proper assistance to producers to perform this therapy properly would be a fundamental strategy to reduce the use of antibiotics in dairy production (Begemann et al. 2020).

CONSEQUENCES OF ANTIBIOTIC USE

Antibiotics residues

Use of antibiotics in food production presents the potential for introducing drug residues into the environment (Ahmad *et al.* 2019). High doses of antibiotics are necessary for therapy, but parent compounds and bioactive metabolites are typically concentrated by the kidneys and excreted in urine and to a lesser extent via feces, reaching the environment where they may favor populations of antibiotic-resistant bacteria. Depending on the load being released, high concentrations of antibiotic residues have been found in surface water, irrigation and groundwater close to dairy farms (Sachi *et al.* 2019).

Milk from cows undergoing treatment must be discarded, but this milk is often used instead as feed for calves in Brazil (Vieira *et al.* 2021). Chiesa *et al.* (2015), in Italy, evaluated a liquid chromatography mass spectrometry method to detect antibiotic residues *in vitro* and *in vivo*. Application of the procedure found high concentrations of oxytetracycline and doxycycline in urine samples from calves of different ages (6 to 11-months-old), with some samples positive for tetracycline, florfenicol and amoxicillin. In a survey carried out with almost 11% of dairy farmers in Switzerland, 47.3% of the farms stated that they provide their calves with waste milk that is potentially contaminated with antibiotics. The producers also described disposal methods including deposition in dunghills and streams and feeding waste milk to other animals (Gosselin *et al.* 2022).

There is no data about the extent of waste milk feeding in Brazil, but it can select antibiotic resistant bacteria and consequently modify the gut microbiota of calves. One study carried out in Brazil did not find differences in ruminal parameters, health and development of calves fed waste milk (Vieira *et al.* 2021). Pereira *et al.* (2018) demonstrated that feeding residual milk to calves increases differences in the relative abundance of genes associated to stress response, regulation and cell signaling in the gut microbiota, with direct impacts on selection and dissemination of virulence and antibiotic resistance. Fecal carriage and whole-genome sequencing-assisted characterization of CMY-2 beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in calves at Czech dairy cow farm also reported an increase in shedding of antibiotic-resistant bacteria by calves that have been fed with waste milk (Maynou *et al.* 2017; Manga *et al.* 2019).

In addition to urine and feces, these residues (metabolized or not) can be accumulated in the milk and meat of treated animals, leading to potential toxicity when consumed (Chiesa *et al.* 2015). Regulatory barriers aside, the dairy industry is not interested in purchasing milk with antibiotic residues due to the potential allergic reactions to consumers, as well due to the potential interference such contaminants could have on fermentation-based production (e.g., cheese) (Messias *et al.* 2021). The Brazilian Ministry of Agriculture tests approximately 670 milk samples per year, randomly collected from weekly drawings of farms that are registered in the PNCRC. This surveillance suggests that the presence of antibiotic residues is <1% of samples (Brasil, 2021). Research carried out in Sergipe, also located in the Brazilian Northeast region, found the presence of antimicrobial residues (β -lactams) in one sample of fresh milk (0.92%) by six dairy farms (18 samples each, collected directly from the animal) (Carvalho *et al.* 2020). In the state of Pernambuco, only one (0.54%) of the 184 raw milk samples presented β -lactam residues above the maximum residues limit (Valença *et al.* 2020).

Long-term exposure to foods that have residues above the maximum limits can result in health problems, such as allergic, carcinogenic, teratogenic, mutagenic effects in people, and antibiotic resistance in commensal bacteria found in the human gastrointestinal tract (Kyuchukova 2020). Based on PNCRC, approximately one thousand samples of UHT milk were collected from 2009 to 2011 in the Brazilian retail sale and subjected to assays to detect residues of different antibiotics, including beta-lactams, tetracyclines, amphenicols, aminoglycosides, quinolones and sulfonamides. None of the tested antibiotics was detected at levels higher than their MRLs, despite the presence of doxycycline and norfloxacin in some samples (Novaes *et al.* 2017).

Although the sale of raw milk directly to the consumer is prohibited, if regional requirements and criteria for production of safe foods are respected (health and hygiene in animal production, control of biological parameters), artisanal cheeses produced with raw milk can be marketed (Brasil, 2018a). However, in addition to failures in the control of these practices and inspection of retail products, the consumption of dairy products and raw milk is a common practice, enhancing the clandestine trade of these products, which can be a public health problem when pathogens, antibiotic residues and other chemical components are involved (Ribeiro Júnior *et al.* 2019).

Antibiotic resistance

Using antibiotics in food animal production contributes to the proliferation of antibiotic resistant bacteria (Oliver *et al.* 2020). Studies of Brazilian artisanal cheeses microbiota described the widespread presence of lactic acid bacteria (LAB) resistant to different antibiotics including vancomycin, tetracycline, penicillin, erythromycin, streptomycin, clindamycin and ceftazidime. As LAB are part of the autochthonous microbiota of milk and dairy products, horizontal gene transfer can be considered as one of the ways for resistance spreading among

bacteria and a potential dissemination of resistant bacteria between people (Margalho *et al.* 2020). Between administration of antibiotics and subsequent excretion, strains exhibiting resistance gain a selective advantage over their competitors through both *in vivo* and *ex vivo* exposure. Advantages are gained through direct, cross- or co-selection, with the latter involving genetic linkage between different antibiotic resistance genes and other potentially fitness-enhancing genes such as those conveying resistance to heavy metals (Pietsch *et al.* 2020). For example, Liu *et al.* (2020) examined the impact on the soil and fecal microbiome and resistome of dairy calves that had been treated with florfenicol (two doses, 48 h apart); there were no consistent changes to the composition of the microbial community between treated animals and pens, but there was a short-term (10-day) increase in the copy number of genes that encode resistance to other antibiotics (tetracyclines, aminoglycosides, sulfonamides, elfamycins, macrolides-lincosamides-streptogramin A/B and beta-lactams), consistent with co-selection.

Environmental spread of antibiotic resistant bacteria can be an occupational problem, as employees, farmers and veterinarians are often exposed to the production environment, whether through animal handling, or contact with dust, contaminated water, feces or milking parlor environments (Kates *et al.* 2021). These interactions can be a problem because some bacteria have zoonotic potential, such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (Pirolo *et al.* 2020). It follows that workers could also be fomites for transmission of resistant bacteria to livestock. Figure 2 summarises the consequences of antibiotic use and the potential routes of dissemination.

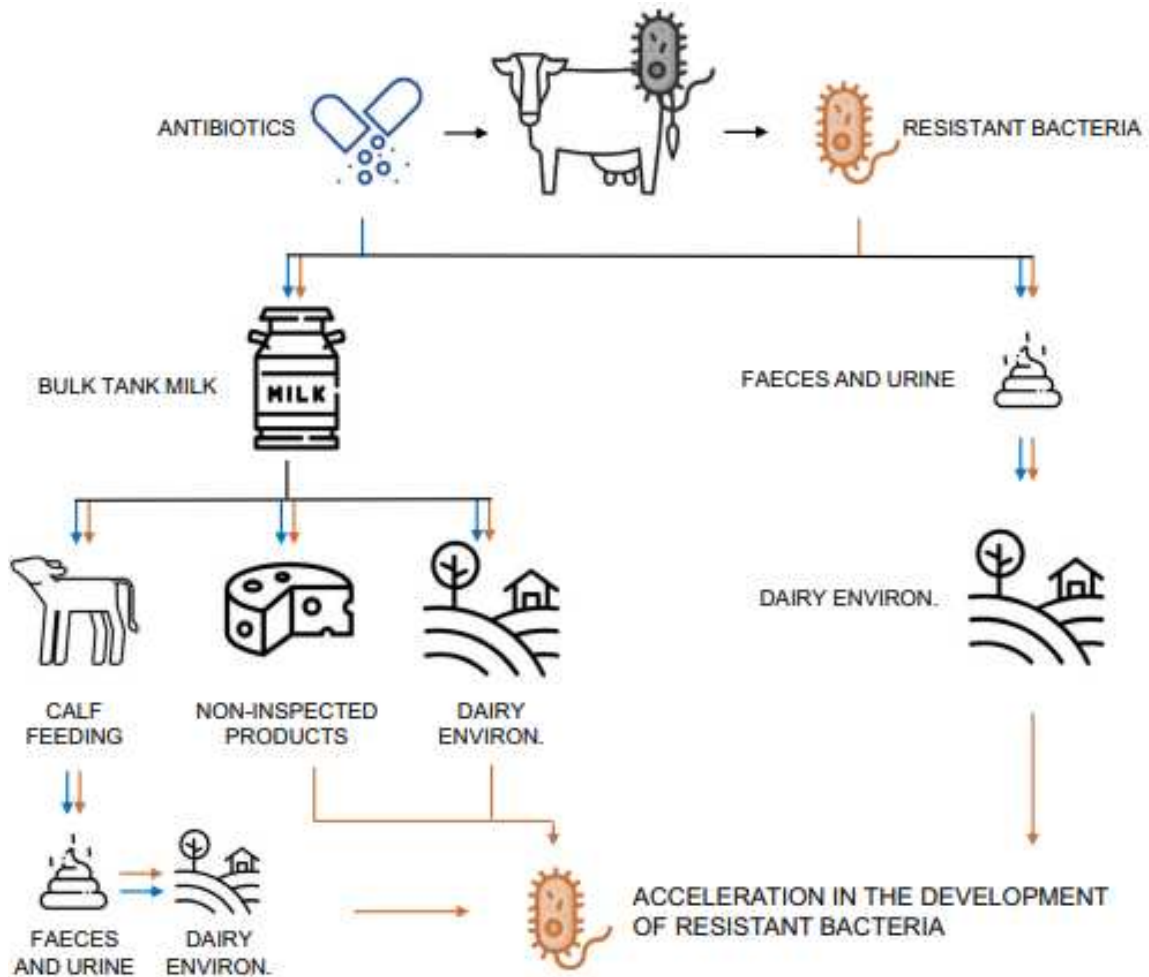


Figure 2: Summary of the alternative routes of distribution and contamination by antibiotic residues (blue arrows) and antibiotic-resistant bacteria (orange arrows) in the dairy production environment, leading to the acceleration in the development of resistant.

PERSPECTIVES

New antibiotic options are relatively scarce, and the pharmaceutical industry has to grapple with a number of challenges when developing new antibiotic products. According to the CDC (2019), drug companies have reduced research on antibiotics by 78% since 1990, decreasing the options that might be used exclusively in humans or animals. Without new antibiotics, alternative and innovative approaches are being proposed to treat bacterial infections. A recent WHO report included, for the first time, a comprehensive overview of non-

traditional antibacterial drugs, highlighting 27 agents including bacteriophage and therapies that directly attack pathogens or that stimulate the patient immune response (WHO, 2021). Despite this, the use of these technologies is still limited in Brazil and the industry remains reliant on medically-important antibiotics.

Vaccines are a good alternative to reduce the use of antibiotics (Benkirane *et al.* 2021) through induction of specific antibody responses. Like antibiotics, vaccines are also classified into generations: classic inactivated and live attenuated vaccines belong to the first generation; vaccines with synthetic proteins, subjugated and/or recombinant antigens are second-generation and, finally, third-generation vaccines are the most technological, involving genetic elements (DNA and RNA) (Aida *et al.* 2021). Some bacterial vaccines are whole cell bacterins and induce the production of antibodies to almost all bacterial components, and some of these have already been used for the prevention of infections caused by *Clostridia*, *Pasteurella*, *Salmonella* and coliforms (Benkirane *et al.* 2021). Most of existing vaccines against bacterial pathogens are recombinant proteins and chimeric proteins, both containing antigens that were produced and purified from plasmids containing specific fragments for their production. Although there are few commercial vaccines, the use of plasmid DNA is also an alternative, where the DNA itself will induce the animal organism to produce the foreign antigens (Aida *et al.* 2021).

Machado *et al.* (2014) carried out a study to evaluate the effectiveness of five different vaccines in combating uterine infections in dairy cows. The vaccines had combinations of inactivated cells of *E. coli*, *Fusobacterium necrophorum* and *Trueperella pyogenes*, in addition to different combinations of proteins associated with metritis and endometritis (FimH; leukotoxin, LKT; and piolysin, PLO). Heifers (n = 371) were randomly allocated into six groups, three of which received subcutaneously administered vaccine and the other two received intravaginally administered vaccine, both receiving two doses of vaccine at 230 and

260 days of gestation. Subcutaneous vaccines presented promising results, mainly in reducing the incidence of metritis with a commensurate increase in antibody titre.

For bovine mastitis, there are several vaccine options that are monovalent (against one antigen or pathogen) or polyvalent (against more than one antigen or pathogen), and the application varies by the pathogens and formulations. The ability to customize vaccines (autogenous vaccines) at a regional level may be important given the regional success and failure of some commercial vaccines (Tashakkori *et al.* 2020). Autogenous vaccines are typically used for on-farm emergencies where commercial vaccines are not effective and the problem is persistent, such as recurrent mastitis in the herd and septicemic colibacillosis (Benkirane *et al.* 2021).

Gorden *et al.* (2018) investigated the effectiveness of a vaccine (Kleb-SRP) based on the bacterial extracts of different *Klebsiella pneumoniae* strains obtained from several USA dairy herds. The vaccinated animals presented a significant increase in humoral response, especially after two weeks of vaccination, enhancing the milk production and reducing SCC. Animals vaccinated with *S. aureus* surface proteins (SASP) and *Staphylococcus chromogenes* surface proteins (SCSP) presented high levels of anti-SASP IgG1 and anti-SCSP IgG2, respectively, when compared to non-vaccinated cows (Merrill *et al.* 2019). Despite not being effective at preventing infection, SASP- and SCSP-based vaccines reduced the pathogen load and the clinical symptoms of the infection (Merrill *et al.* 2019). There are other studies in the experimental phase related to the application of vaccines to improve the immune response of cows in the postpartum period, reducing the incidence of metritis (Machado and Silva 2020).

Vaccines can also be administered via an intranasal route, mainly to prevent respiratory infections. This has been done with *Mannheimia* sp. both in the form of killed cells and recombinant bacterial vector vaccines (Salisi *et al.* 2012; Annas and Zamri-Saad 2021). Also, aerosols with live vaccines containing an attenuated pathogen, such as *Pasteurella multocida*

B:2 GDH7, offer a potential advantage of surviving long enough to spread across a herd for efficient immunization (Rafidah and El-Sayed 2013; Annas and Zamri-Saad 2021). Many technologies used in animal vaccines are also applied in products for people. It must be considered that the revolution with mRNA vaccines in the context of the SARS-CoV-2 pandemics will impact the other diseases, leading to the development of novel and much more effective vaccines against specific food animal pathogens (Machado and Silva, 2020).

CONCLUSIONS

Due to the ease of obtaining veterinary products, lack of record of purchase and sale of antibiotics in agriculture, some information on the use of antibiotics in dairy farms is still relatively scarce and dubious in Brazil. Antibiotics are effective tools for the prevention and treatment of bacterial diseases that are responsible for high morbidity and/or mortality and great economic losses to dairy producers. Nevertheless, it is essential to recognize that antibiotic resistance can be a threat to public health, for which closer tracking of antibiotic use and emergence and spread of the antibiotic resistant bacteria is needed. For this, a joint action between all the links in the production chain is necessary to understand how resistant organisms are disseminated between environments, animals and people.

In this context, Brazilian Ministries of Health and Agriculture developed the Action Plan for the Prevention and Control of Antibiotic Resistance (PAN-BR, Brasil, 2018b), which includes humans, animals, and environment measures. The expected objectives for agriculture and livestock are: 1) raising awareness among the population; 2) establishing a national and integrated antibiotic resistance surveillance system; 3) reducing the incidence of infections, adopting good hygiene practices, improving basic sanitation policies, and facilitating access to sewage and drinking water networks; 4) promoting the rational use of antibiotics, updating

legislation, increasing veterinary supervision for diagnosis and administration of these substances; and 5) encouraging the industry to develop new substances, diagnostic methods, vaccines and new technologies.

Acknowledgments

The authors are thankful for the financial support provided by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasília, DF, Brazil - financial code 001), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasília, DF, Brazil), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Belo Horizonte, MG, Brazil).

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Author contributions

Milimani Andretta: Conceptualization; investigation; writing - original draft; writing – review & editing. **Douglas R. Call:** Conceptualization; writing – review. **Luís A. Nero:** Conceptualization; writing – review & editing; project administration; supervision.

REFERENCES

- Abdi R D, Gillespie B E, Vaughn J, Merrill C, Headrick S I, Ensermu D B, D'Souza, D H, Agga G E, Almeida R A, Oliver S P and Kerro D O (2018) Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus aureus* Isolates from Dairy Cows and Genetic Diversity of Resistant Isolates. *Foodborne Pathogens and Disease* **15** 449–458.
- Ahmad T, Aadil R M, Ahmed H, Rahman U, Soares B C V, Souza S L Q, Pimentel T C, Scudino H, Guimarães J T, Esmerino E A, Freitas, M Q, Almada R B, Vendramel S M R, Silva M C and Cruz A G (2019) Trends in Food Science & Technology Treatment and utilization of dairy industrial waste : A review. *Trends in Food Science & Technology* **88** 361–372.
- Aida V, Pliasis V C, Neasham P J, North J F, McWhorter K L, Glover S R and Kyriakis C S (2021) Novel Vaccine Technologies in Veterinary Medicine: A Herald to Human Medicine Vaccines. *Frontiers in Veterinary Science* **8** 1–20.
- Annas S and Zamri-Saad M (2021) Intranasal vaccination strategy to control the Covid-19 pandemic from a veterinary medicine perspective. *Animals* **11** 1-11.
- Begemann S, Watkins F, Hoyweghen I V, Vivancos R, Christley R and Perkins E (2020) The Governance of UK Dairy Antibiotic Use: Industry-Led Policy in Action. *Frontiers in Veterinary Science* **7** 1-12.
- Benkirane A, El Idrissi A and Johnson A (2021) Bacterial and *Mycoplasma* Vaccines. *Veterinary Vaccines* 63–76.
- Bhutto A L, Murray R D and Woldehiwet Z (2010) Udder shape and teat-end lesions as potential risk factors for high somatic cell counts and intra-mammary infections in dairy cows. *The Veterinary Journal* **183** 63–67.
- Brasil (1999) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Altera o Plano Nacional do Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal - PNCR e os Programas de Controle

de Resíduos em Carne - PCRC, Mel - PCRM, Leite - PCRL e Pescado – PCRP. Instrução Normativa nº 42, 1999 December 22. MAPA, Brasília, DF, Brazil.

Brasil (2014) Ministério da Saúde. Guia alimentar para a população brasileira– 2. ed. Ministério da Saúde, Brasília, DF, Brazil.

Brasil (2018a) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Dispõe sobre o processo de fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. Diário Oficial da União, 2018. Lei 13.680, 2018, June 14. MAPA, Brasília, DF, Brazil.

Brasil (2018b) Ministério da Saúde. Plano de Ação Nacional para a Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única 2018-2022. Ministério da Saúde, Brasília, DF, Brazil.

Brasil (2021) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes PNCRC / Animal. MAPA, Brasília, DF, Brazil. URL: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes>. Accessed 20/11/2021.

Busanello M, Rossi R S, Cassoli L D, Pantoja J C F and Machado P F (2017) Estimation of prevalence and incidence of subclinical mastitis in a large population of Brazilian dairy herds. *Journal of Dairy Science*, **100** 6545–6553.

Carvalho R N G, Oliveira A C L A S, Silva J P A A, Anjos C F C and Vieira E S (2020) Detecção de resíduos de antibióticos em leite cru em fazendas de Aquidabã – Sergipe. *Pubmed* **14** 1-7.

Cassoli L D, da Silva J, Machado P F, Sartori. S, et al (2016). *Mapa da qualidade do leite: contagem de células somáticas (CCS)*. Piracicaba: Clínica do Leite - ESALQ/USP.

CDC (2019) Antibiotic Resistance Threats in the United States. URL: <https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html>. Accessed 25/04/2021.

- Cheng W N and Han S G (2020) Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments — A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* **33** 1699–1713.
- Chiesa L, Nobile M, Arioli F, Britti D, Trutic N, Pavlovic R and Panseri S (2015) Determination of veterinary antibiotics in bovine urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* **185** 7–15.
- Cockram M S (2021) INVITED REVIEW: The welfare of cull dairy cows. *Applied Animal Science* **37** 334–352.
- Constable P D (2009) Treatment of Calf Diarrhea: Antimicrobial and Ancillary Treatments. *Veterinary Clinics of NA: Food Animal Practice* **25** 101–120.
- da Costa G M, Ribeiro N A, Gonçalves M S, da Silva J R, Custódio D A C and Mian G F (2021) Antimicrobial susceptibility profile of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from bovine mastitis. *Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science* **58** 1–8.
- Dalanezi F M, Joaquim S F, Guimarães F F, Guerra S T, Lopes B C, Schmidt E M S, Cerri R L A and Langoni H (2020) Influence of pathogens causing clinical mastitis on reproductive variables of dairy cows. *Journal of Dairy Science* **103** 3648–3655.
- Dankar I, Hassan H and Serhan M (2021) Knowledge, attitudes, and perceptions of dairy farmers regarding antibiotic use: Lessons from a developing country. *Journal of Dairy Science*, **105** 1519–1532.
- Doehring C and Sundrum A (2019) The informative value of an overview on antibiotic consumption, treatment efficacy and cost of clinical mastitis at farm level. *Preventive Veterinary Medicine* **165** 63–70.
- da Silva D F, Macêdo A J S, Fonsêca V F C and Saraiva E P (2019). Animal welfare in dairy cattle: review. / Bem-estar na bovinocultura leiteira: revisão. *Pubvet*, **13** 1–11.
- EMBRAPA (2020) Cresce o consumo de lácteos no Brasil. Anuário Leite 2020, p. 33-34.

- EMBRAPA (2022a) Leite em Números – Centro de Inteligência do Leite. URL: <https://www.cileite.com.br/content/leite-numeros>. Accessed 26/01/2022.
- EMBRAPA (2022b) Leite no mundo: produção, rebanho e produtividade continuam em crescimento. Anuário Leite 2022, p. 74-77.
- FAO (2013) Milk and dairy products in human nutrition. URL: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/newsroom/docs/Milk%20and%20Dairy%20Q&A.pdf. Accessed 25/05/2021.
- FAO (2021) FAOSTAT, statistics division, trade, download data, crops and livestock products. Rome. URL: <http://faostat3.fao.org/download/Q/QL/E>. Accessed 25/06/2021.
- FAO (2022) FAOSTAT, Crops and Livestock products. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>. Accessed 18/08/2022.
- Freitas C H, Mendes J F, Villarreal P V, Santos P R, Gonzales H L and Nascente P S (2018) Identification and antimicrobial susceptibility profile of bacteria causing bovine mastitis from dairy farms in Pelotas, Rio Grande do Sul. *Brazilian Journal of Biology*, **78** 661–666.
- Gelalcha B D, Agga G E and Dego O K (2022) *Antimicrobial Usage for the Management of Mastitis in the USA: Impacts on Antimicrobial Resistance and Potential Alternative Approaches* (ed. IntechOpen), 1-21. Mastitis in Dairy Cattle, Sheep and Goats.
- Giagu A, Penati M, Traini S, Dore S and Addis M F (2022) Milk proteins as mastitis markers in dairy ruminants - a systematic review. *Veterinary Research Communications*, **46** 329–351.
- Gonçalves J L, Cue R I, Netto E P L, Gameiro A H and dos Santos M V (2019) Herd-level associations between somatic cell counts and economic performance indicators in Brazilian dairy herds Herd-level associations between somatic cell counts and economic performance indicators in Brazilian dairy herds. *Journal of Dairy Science* **104** 2–11.
- González-Pereyra V, Pol M, Pastorino F and Herrero A (2015) Quantification of antimicrobial

- usage in dairy cows and preweaned calves in Argentina. *Preventive Veterinary Medicine* **122** 273–279.
- Gorden P J, Kleinhenz M D, Ydstie J A, Brick T A, Slinden L M, Peterson M P and Straub D E (2018) Efficacy of vaccination with a *Klebsiella pneumoniae* siderophore receptor protein vaccine for reduction of *Klebsiella* mastitis in lactating cattle. *Journal of Dairy Science* **101** 1–11.
- Gosselin V B, Bodmer M, Schüpbach-Regula G, Steiner A and Meylan M (2022) Survey on the disposal of waste milk containing antimicrobial residues on Swiss dairy farms. *Journal of Dairy Science* **105**1242–1254.
- Halasa T and Kirkeby C (2020) Differential Somatic Cell Count: Value for Udder Health Management. *Frontiers in Veterinary Science* **7** 1-7.
- Haubert L, Kroning I S, Iglesias M A and Padilha W (2017) First report of the *Staphylococcus aureus* isolate from subclinical bovine mastitis in the South of Brazil harboring resistance gene *dfrG* and transposon family Tn916-1545. *Microbial Pathogenesis* **113** 242-247.
- Helliwell R, Morris C and Raman S. (2020) Antibiotic stewardship and its implications for agricultural animal-human relationships: Insights from an intensive dairy farm in England. *Journal of Rural Studies*, **78** 447–456.
- IBGE (2017) SIDRA. Pesquisa da Pecuária Municipal e Censo Agropecuário. URL: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6913#resultado>. Accessed 25/06/2021.
- Jayarao B, Almeida R and Oliver S P (2019) Antimicrobial resistance on dairy farms. *Foodborne Pathogens and Disease* **16** 1–4.
- Jørgensen P S, Folke C, Henriksson P J G, Malmros K, Troell M and Zorzet A (2020) Coevolutionary Governance of Antibiotic and Pesticide Resistance. *Trends in Ecology and Evolution* **35** 484–494.
- Kates A E, Knobloch M J, Konkol A, Young A, Steinberger A, Shutske J, Ruegg P L, Sethi A

- K, Glodberg T, de Campos J L, Suen G and Safdar N. 2021. Wisconsin dairy farm worker perceptions and practices related to antibiotic use, resistance, and infection prevention using a systems engineering framework. *Plos One* **16** 1-15.
- klaus R, Vieira L V, de Matos A D, Barbosa A A, Corrêa M N, Pereira R A, Xavier E G, Brauner C C, del Pino F A B and Rabassa V R (2021) Use of sulfonamides for the treatment of bovine neonatal diarrhea: clinical and performance parameters. *Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science*, **58** 1–10.
- Kuipers A, Koops W J and Wemmenhove H (2016) Antibiotic use in dairy herds in the Netherlands from 2005 to 2012. *Journal of Dairy Science* **99** 1632–1648.
- Kyuchukova R (2020) Antibiotic residues and human health hazard – review. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* **26** 664–668.
- Lee S H I, Camargo C H, Gonçalves J L, Cruz A G, Sartori B T, Machado M B and Oliveira C A F (2012) Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates in milk and the milking environment from small-scale dairy farms of São Paulo, Brazil, using pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Dairy Science*, **95** 7377–7383.
- Lima L P de, Braga G B, Perez R, Nero L A and Carvalho A F de (2020) Evolução do marco legal do leite cru refrigerado no Brasil. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes* **75** 190–203.
- Liu J, Zhu Y, Jay-russell M, Lemay D G and Mills D A (2020) Reservoirs of antimicrobial resistance genes in retail raw milk. *Microbiome* **8** 1–15.
- Llanos-Soto S G, Vezeau N, Wemette M, Bulut E, Safi A G, Moroni P, Shapiro M A and Ivanek R (2021) Survey of perceptions and attitudes of an international group of veterinarians regarding antibiotic use and resistance on dairy cattle farms. *Preventive Veterinary Medicine* **188** 1-13.
- Ma Z, Ginn A, Kang M, Galvão K N and Jeong KC (2018) Genomic and Virulence

Characterization of Intrauterine Pathogenic *Escherichia coli* With Multi-Drug Resistance Isolated From Cow Uteri With Metritis. *Frontiers in Microbiology* **9** 1–12

Machado V S, Bicalho M L S, Meira Júnior E B S, Rossi R, Ribeiro B L, Lima S, Santos T, Kussler A, Foditsch C, Ganda E K, Oikonomou G, Cheong S H, Gilbert R O and Bicalho R C (2014) Subcutaneous immunization with inactivated bacterial components and purified protein of *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum* and *Trueperella pyogenes* prevents puerperal metritis in holstein dairy cows. *PLoS ONE* **9** 1-11.

Machado V S and Silva T H (2020) Theriogenology Adaptive immunity in the postpartum uterus: Potential use of vaccines to control metritis. *Theriogenology* **150** 201–209.

Manga I, Hasman H, Smidkova J, Medvecký M, Dolejška M and Cizek A (2019) Fecal carriage and whole-genome sequencing-assisted characterization of CMY-2 beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in calves at czech dairy cow farm. *Foodborne Pathogens and Disease* **16** 42–53.

Margalho L P, Feliciano M D E, Silva C E, Abreu J S, Piran M V F and Sant’Ana A S (2020) Brazilian artisanal cheeses are rich and diverse sources of nonstarter lactic acid bacteria regarding technological, biopreservative, and safety properties—Insights through multivariate analysis. *Journal of Dairy Science* **103** 7908–7926.

Maynou G, Migura-Garcia L, Chester-Jones H, Ziegler D, Bach A and Terré M (2017). Effects of feeding pasteurized waste milk to dairy calves on phenotypes and genotypes of antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* isolates before and after weaning. *Journal of Dairy Science* **100** 7967–7979.

Merrill C, Ensermu D B, Abdi R D, Gillespie B E, Vaughn J, Headrick S I and Hash K (2019) Veterinary Immunology and Immunopathology Immunological responses and evaluation of the protection in dairy cows vaccinated with staphylococcal surface proteins. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **214** 1–8.

- Messias C T, Pinto H, Siqueira D G, Rosa B L, Carvalho G A and Silva L A (2021) Gestão de Trabalho, Educação e Saúde, desafios agudos e crônicos, vol 2. In: *Ocorrência de resíduos de antibióticos e antiparasitários no leite para consumo – revisão de literatura*. (Ed. Científica), 335-350. Guarujá, SP, Brasil.
- Mileva R, Karadaev M, Fasulkov I, Petkova T, Rusenova N, Vasilev N, Milanova A (2020) Oxytetracycline Pharmacokinetics After Intramuscular Administration in Cows with Clinical Metritis Associated with Trueperella Pyogenes Infection Rositsa. *Antibiotics* **9** 1-13.
- More S J, Clegg T A and McCoy F (2017) The use of national-level data to describe trends in intramammary antimicrobial usage on Irish dairy farms from 2003 to 2015. *Journal of Dairy Science* **100** 6400–6413.
- Nero L A, A G da Cruz, A G and Bersot L S (2017) *Produção mundial e brasileira de leite*. São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte, BR: Atheneu.
- Novaes S F, Schreiner L L, Silva I P and Franco R M (2017) Residues of veterinary drugs in milk in Brazil. *Ciência Rural* **47** 1–7.
- Obaidat M M, Salman A E, Davis M A and Roess A A (2018) Major diseases, extensive misuse, and high antimicrobial resistance of *Escherichia coli* in large- and small-scale dairy cattle farms in Jordan. *Journal of Dairy Science* **101** 2324–2334.
- Oliver J P, Gooch C A, Lansing S, Schueler J, Hurst J J, Sassoubre L, Crossette E M and Aga D S (2020) Invited review : Fate of antibiotic residues, antibiotic-resistant bacteria, and antibiotic resistance genes in US dairy manure management systems. *Journal of Dairy Science* **103** 1051-1071.
- Ortega E, Alfonseca-Silva E, Posadas E, Tapia G and Sumano H (2020) A non-inferiority study evaluating a new extended-release preparation of Tilmicosin injected subcutaneously vs. Ceftiofur administered intramammary, as dry-cow therapy in Holstein Friesian cows.

Journal of Veterinary Science **21** 1–11.

Overton M and Fetrow J (2017) Economics of Postpartum Uterine Health. *Dairy Cattle Reproduction Council Convention* **1** 39–44.

Pereira R V V, Carroll L M, Lima S, Foditsch C, Siler J D, Bicalho R C and Warnick L D (2018) Impacts of feeding preweaned calves milk containing drug residues on the functional profile of the fecal microbiota. *Scientific Reports* **554** 1–12.

Pérez V K C, Custódio D A C, Silva E M M, Oliveira J, Guimarães A S, Brito M A V P, Souza-filho A F, Heinemann M B, Lage A P and Dorneles E M S (2020) Virulence factors and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, **51** 2111–2122.

Pietsch F, O'Neill A J, Ivask A, Jenssen H, Inkinen J, Kahru A, Ahonen M and Schreiber F (2020) Selection of resistance by antimicrobial coatings in the healthcare setting. *Journal of Hospital Infection* **106** 115–125.

Pirolò M, Sieber R N, Moodley A, Visaggio D, Artuso I, Gioffre A, Casalnuovo F, Sparati G, Guardabassi L, Stegger M and Visca p (2020) Local and Transboundary Transmissions of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Sequence Type 398 through Pig Trading. *Applied and Environmental Microbiology* **86** 1-10.

Rabello R F, Bonelli R R, Penna B A, Albuquerque J P, Souza R M and Cerqueira A M F (2020) Antimicrobial Resistance in Farm Animals in Brazil: An Update Overview. *Animals* **10** 1–43.

Rafidah O and El-Sayed A (2013) Effect of Dexamethasone on Protective Efficacy of Live *gdhA* Derivative. *Asian Journal of Animal Veterinary Advances* **8** 548–554.

Ratajczak A E, Zawada A, Rychter A M, Dobrowolska A and Krela-Kaźmierczak I (2021) Milk and dairy products: Good or bad for human bone? practical dietary recommendations for the prevention and management of osteoporosis. *Nutrients* **13** 1-15.

- Ribeiro Júnior J C, Silva F F, Lima J B A, Ossugui E H, Junior P I T, Campos A C L P, Navarro A, Tamanini R, Ribeiro J, Alfieri A A and Beloti V (2019) Short communication : Molecular characterization and antimicrobial resistance of pathogenic *Escherichia coli* isolated from raw milk and Minas Frescal cheeses in Brazil. *Journal of Dairy Science* **102** 10850–10854.
- Roberts M C, Garland-Lewis G, Trufan S, Meschke S J, Fowler H, Shean R C, Greninger A L and Rabinowitz P M (2018) Distribution of Staphylococcus species in dairy cows, workers and shared farm environments. *FEMS Microbiology Letters* **365** 1–7.
- Sachi S, Ferdous J, Sikder M H and Hussani S M A K (2019) Antibiotic residues in milk: Past, present, and future. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research* **6** 315–332.
- Salisi M S, Saad M Z and Kasim A (2012) Implementation of herd health program to improve survival of Boer goats in Malaysia. *Tropical Animal Health and Production* **44** 207–211.
- Silva D B C, da Silva L A L, Queiroz A K L, Silva W P R and Cruz A F (2019) Resíduos de protocolos terapêuticos empregados na medicina veterinária. *Investigação* **18** 45–52.
- Tashakkori N, Khoramian B, Moghadam M F, Heidarpour M, Mashayekhi K and Farzaneh N (2020) Evaluating the effectiveness of two bovine mastitis vaccines and their influences on oxidant and antioxidant capacities of milk. *Tropical Animal Health and Production* **52** 1493–1501.
- Terra R A, Izidorio A S, Assis J D and Meireles G S (2020) CCS e amiloide A do leite de quartos mamários tratados na secagem com plasma rico em plaquetas autólogo , associado ou não a antibiótico. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia* **72** 2077–2085.
- Tomazi T and dos Santos M V (2020) Antimicrobial use for treatment of clinical mastitis in dairy herds from Brazil and its association with herd-level descriptors. *Preventive Veterinary Medicine* **176** 1-8.

- Valença L M, Paiva J E, Barbosa S B P, Pinheiro I O, Batista A M V, da Silva M J F B and Medeiros E S (2020) Evaluation of residues of β -lactam, sulfonamide, tetracycline, quinolone, fluoroquinolone e pyrimidine in raw milk. *Food Science and Technology*, **41** 1-4.
- Vieira S F, Coelho S G, Diniz Neto H C, de Sá H C M, Pereira B P, Albuquerque B S F, Machado F S, Pereira L G R, Tomich T R, Renhe I R T and Campos M M (2021) Effects of bulk tank milk, waste milk, and pasteurized waste milk on the intake, ruminal parameters, blood parameters, health, and performance of dairy calves. *Animals* **11** 1-14.
- Vilela D, Resende J C, Leite J B and Alves E (2017) A evolução do leite no Brasil em cinco décadas 1. *Revista de Política Agrícola*, **26** 5–24.
- WHO (2021) Global shortage of innovative antibiotics fuels emergence and spread of drug-resistance. URL: <https://www.who.int/news/item/15-04-2021-global-shortage-of-innovative-antibiotics-fuels-emergence-and-spread-of-drug-resistance>. Accessed 20/06/2021.
- Zhao W, Choi C Y, Li G, Li H and Shi Z (2021) Pre-weaned dairy calf management practices, morbidity and mortality of bovine respiratory disease and diarrhea in China. *Livestock Science* **251** 1-8.

ARTIGO II

**Uma abordagem em One Health para compreender fatores associados a
distribuição de resistência a antibióticos na cadeia produtiva do leite**

Uma abordagem em One Health para compreender fatores associados a distribuição de resistência a antibióticos na cadeia produtiva do leite

Milimani Andretta¹, Rodrigo Alves Barros¹, Luciano dos Santos Bersot², Luís Augusto Nero^{1*}

¹ Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Veterinária, InsPOA - Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal

² Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, LACOMA - Laboratório de Inspeção e Controle de Qualidade de Alimentos e Água

* Autor para correspondência: LA Nero, Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Veterinária, InsPOA - Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Campus Universitário, s/n, Centro 36570 900 Viçosa MG Brasil.

RESUMO

O uso abusivo e inadequado de antibióticos é uma prática comum na pecuária leiteira do Brasil, usualmente associados a diagnóstico incorreto de doenças infectocontagiosas, sub dosagens e tratamentos incompletos. Apesar de não ser claro o impacto causado devido ao uso de antibióticos, a cadeia produtiva leiteira é uma importante fonte de desenvolvimento e distribuição de microrganismos resistentes a antibióticos, podendo contribuir com as falhas terapêuticas em humanos. Neste sentido, esse estudo teve como objetivo avaliar a potencial associação de características de propriedades rurais leiteiras e a distribuição de resistência a antibióticos, considerando uma abordagem One Health. Vinte (n = 20) propriedades rurais leiteiras foram selecionadas nas regiões de Viçosa, MG (n = 10) e Palotina, PR (n = 10) e seus proprietários entrevistados considerando um questionário epidemiológico contendo questões objetivas relacionadas às características da propriedade rural, produção leiteira, higiene de ordenha e sanidade animal. Amostras de leite, fezes de animais e humanos e água das propriedades rurais selecionadas foram obtidas (n = 340) e submetidas a análises microbiológicas para isolamento de *Escherichia coli*; Os 1.091 isolados obtidos foram caracterizados quanto aos seus perfis de resistência à amoxicilina (AMO), ceftiofur (CEF), ciprofloxacina (CIP), cloranfenicol (CLO), sulfamentaxazol + trimetropima (SUT) e tetraciclina (TET), pelo teste de diluição em ágar. Considerando o número total de animais, as propriedades rurais foram classificadas em pequenas (n = 13), semiextensivas (n = 3) e intensivas (n = 4), todas com características heterogêneas na produção leiteira. Nenhuma propriedade rural indicou controle da incidência de mastite e outras doenças infectocontagiosas e tampouco gastos com medicamentos e perda de animais. Amoxicilina e tetraciclina foram os antibióticos com maiores índices de resistência (37,5% e 36,4%, respectivamente), e ao menos uma propriedade de cada grupo apresentou isolados resistentes. Todos os grupos de propriedades rurais apresentaram isolados de *E. coli* com variados perfis de resistência e com múltipla resistência (MDR). Propriedades rurais de criação intensiva apresentaram o maior percentual de micro-organismos MDR (14,6%) e maior variedade de perfis de MDR. Os perfis de resistência AMO-SUT-TET, AMO-CLO-TET, AMO-CEF-SUT-TET, AMO-CIP-CLO-SUT-TET estiveram presentes em todos os grupos. Considerando os resultados obtidos, é possível concluir que independentemente das características do tamanho e das características das propriedades, as medidas adotadas para evitar o desenvolvimento e distribuição de micro-organismos resistentes não são adotadas de maneira consciente e sistemática. Mais estudos são

necessários, para consolidar um monitoramento efetivo de presença e distribuição de micro-organismos resistentes nos diferentes pontos críticos deste sistema de produção.

Palavras-chave: *Escherichia coli* genérica. Sistema de produção. Enfermidades.

1. INTRODUÇÃO

Apesar de o Brasil ser o 4º maior produtor de leite do mundo e possuir o 3º maior rebanho de bovinos leiteiros, a produtividade nessa atividade é considerada baixa e pouco competitiva no mercado internacional. Uma das razões para esse cenário é o perfil de produção leiteira no Brasil, que é caracterizada por pequenos produtores, com deficiências na implantação de tecnologias e procedimentos higiênicos de ordenha, pouca assistência técnica qualificada e baixo controle de enfermidades nos rebanhos, resultando em uma produção de leite cru relativamente pequena e com pouca qualidade (Andretta et al., 2023). Em contraste, uma pequena parcela de propriedades rurais leiteiras são altamente tecnificadas, com um rígido controle sanitário de seus rebanhos que resulta em alta produtividade e qualidade (Zoccal 2017). Apesar desse contraste, a atividade leiteira é extremamente importante para o Brasil em termos culturais, sociais e econômicos: essa atividade é desenvolvida por 50% das propriedades rurais no Brasil e gera milhares de empregos para a população rural (IBGE-2017).

Segundo Siqueira e Ramalho et al. (2020), o leite está em presente na mesa de 80% da população mundial e representa um importante item da dieta do brasileiro. Essa demanda estimula o desenvolvimento da produção leiteira para um sistema eficiente, com alto padrão de segurança alimentar, abrangendo os aspectos de qualidade, inocuidade, disponibilidade e acessibilidade aos consumidores (Garcia et al., 2019). Assim, o controle de enfermidades nos rebanhos leiteiros é fundamental para a obtenção de leite e derivados que atendam as expectativas dos consumidores. Os antibióticos são amplamente utilizados em rebanhos leiteiros para tratamentos de enfermidades que podem comprometer a qualidade e inocuidade do leite (Abdi et al., 2018). Contudo, o uso abusivo e inadequado de antibióticos é uma prática comum na pecuária leiteira no Brasil, usualmente associados a diagnóstico incorreto, subdosagens e tratamentos incompletos; essas condições são ideais para acelerar a seleção de

bactérias resistentes a antibióticos, o que representa atualmente uma ameaça a saúde pública mundial (Sharma et al., 2018).

As cadeias produtivas de alimentos de origem animal, especialmente leite, são importantes fontes de multiplicação e distribuição de microrganismos resistentes a antibióticos, sendo necessário um controle e monitoramento efetivo nesses sistemas considerando uma abordagem ampla e holística, em sintonia com a perspectiva One Health (Oliveira et al., 2020). Dessa forma, programas de monitoramento devem ser desenvolvidos e aplicados considerando a verificação de organismos resistentes em diferentes pontos da cadeia produtiva do leite, incluindo animais, meio ambiente, trabalhadores, laticínios e produtos finais (Hernando-Amado et al., 2019). Esse monitoramento amplo permite a identificação de principais nichos de consolidação de cepas resistentes, que podem representar fontes de contaminação para os diferentes elementos da cadeia produtiva, assim como para os produtos finais que serão oferecidos aos consumidores (Rajala-schultz et al., 2021). Através desses programas de monitoramento também é possível identificar a emergência de cepas resistentes a múltiplas classes de antibióticos (MDR) ou mesmo organismos resistentes a drogas de uso exclusivo a seres humanos, como colistina (Fuga et al., 2022). O conhecimento da dinâmica de distribuição de microrganismos resistentes em um sistema produtivo é fundamental para o estabelecimento de estratégias de mitigação e controle desses perigos, reduzindo os riscos à saúde pública (Kates et al., 2021).

Considerando a importância da cadeia produtiva do leite na manutenção e distribuição de microrganismos resistentes a antibióticos, esse estudo teve como objetivo avaliar a potencial associação de características de duas regiões produtivas de leite no Brasil com perfis de resistência a antibióticos de isolados de *Escherichia coli* obtidos de diferentes pontos da produção, numa perspectiva One Health.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Avaliação de características da produção leiteira

Produtores de leite das regiões de Viçosa (Minas Gerais) e Palotina (Paraná) foram selecionados para uma avaliação de suas características de produção. A seleção das propriedades rurais incluídas nessa etapa do estudo foi realizada obedecendo aos seguintes critérios: 1) produção leiteira destinada a beneficiamento industrial na região; 2) possibilidade de acesso para realização do estudo; 3) concordância dos produtores para participar do estudo e concessão de amostras. Conforme esses critérios, 20 propriedades rurais foram selecionadas (Viçosa = 10; Palotina = 10) e seus proprietários entrevistados considerando um questionário epidemiológico contendo questões objetivas relacionadas às características da propriedade rural, produção leiteira, higiene de ordenha e sanidade animal (Tabela 1).

Tabela 1: Informações básicas presentes no questionário epidemiológico utilizado como referencial durante as entrevistas realizadas com proprietários de propriedades rurais leiteiras (n = 20) localizadas nas regiões de Viçosa (Minas Gerais) e Palotina (Paraná).

Grupo	Informações básicas	Respostas
Propriedade	Tamanho	Numérico (n)
	Número de animais (total)	Numérico (n)
	Raça do rebanho bovino	Descritivo
	Alimentação animal	Descritivo
Produção	Sistema produtivo	Descritivo
	Animais em lactação	Numérico (n)
	Volume de produção	Numérico (L)
	Número diário de ordenhas	Numérico (n)
	Estrutura da sala de ordenha	Descritivo
	Limpeza dos utensílios	Descritivo

	Origem da água utilizada	Descritivo
Higiene de ordenha	Descarte de jatos iniciais	Descritivo
	Pré e pós-dipping	Descritivo
	California Mastitis Test	Descritivo
	Ordenar os animais no momento da ordenha	Descritivo
	Registros de animais com mastite	Descritivo
Sanidade animal	Doenças mais frequentes	Descritivo
	Uso de antimicrobianos	Descritivo
	Tratamentos alternativos	Descritivo
	Destino do leite com resíduos	Descritivo
	Descarte de animais devido a doenças	Descritivo

As informações obtidas foram organizadas planilhas no software Microsoft Excel (Microsoft, Seattle, WA, EUA), para permitir associações entre as mesmas e com dados relacionados a resistência a antibióticos descritos a seguir.

2.2. Avaliação da distribuição de resistência a antibióticos nas cadeias produtivas de leite

As propriedades rurais selecionadas na etapa anterior do estudo foram submetidas a coleta de amostras para isolamento de *Escherichia coli*, microrganismo indicador de resistência a antibióticos (Mikula et al., 2014). Assim, em cada propriedade rural as seguintes amostras foram coletadas: leite do tanque de resfriamento, água utilizada para a limpeza da sala de ordenha, fezes de animais (animais em lactação = 10; bezerras = 5) e fezes de funcionários (um indivíduo por propriedade).

Após homogeneização e com o auxílio de uma concha estéril, leite do tanque de resfriamento foi coletado e armazenado em frasco estéril 50 mL. A água proveniente da torneira localizada na sala de ordenha foi coletada e armazenada em frasco estéril (50 mL). Em casos

de água tratada, foi adicionada solução de tiosulfato de sódio a 1% ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). A coleta de fezes dos animais foi realizada com a introdução e imediata retirada de *swab* na ampola retal do animal (um *swab* para cada animal) e estes foram inseridos em tubos individuais com meio de transporte Cary Blair (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) para posterior análise. Já a coleta de fezes dos funcionários/proprietários foi realizada pelos próprios indivíduos, onde após assinar um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE): cada indivíduo recebeu um manual contendo as instruções para a realização da coleta, um frasco específico para coletar as fezes, um *swab* estéril e um tubo com meio de transporte Cary Blair (Kasvi).

As amostras de foram armazenadas em caixa isotérmica refrigerada e imediatamente transportadas aos laboratórios das regiões incluídas no estudo: Laboratório de Inspeção e Controle de Qualidade de Alimentos e Água (LACOMA, UFPR, Palotina, PR) e Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (InsPOA, UFV, Viçosa, MG).

Para o processamento das amostras, alíquotas de 25 mL das amostras de leite e água foram submetidos a uma etapa de pré-enriquecimento em 225 mL de Água Peptonada Tamponada (APT – Oxoid, Ltd., Basingstoke, Inglaterra) permanecendo incubadas overnight a 36 °C, seguido de semeadura por esgotamento em ágar MacConkey (Oxoid) e incubação a 36 °C por 24 h. Os *swabs* contendo amostras de fezes não passaram pela etapa de pré-enriquecimento e foram estriadas diretamente em ágar MacConkey (Oxoid), e incubadas sob as mesmas condições das amostras de leite e água.

Após incubação, as placas de ágar MacConkey foram examinadas para verificação da presença de colônias com morfologia típica de enterobactérias (vermelhas, devido a fermentação da lactose, lac+, usualmente circundadas por uma zona de precipitação). O critério de seleção de colônias a serem submetidas a testes bioquímicos para identificação foi o seguinte: 1) placas apenas com colônias lac+: 5 colônias; 2) placas com colônias lac+ e lac-: 4 colônias lac+ e 1 colônia lac-; 3) placas apenas com colônias lac-: 3 colônias. Todas as colônias

selecionadas foram estocadas ágar tripticase de soja (TSA, Oxoid) e submetidas a testes bioquímicos IMViC para identificação (FDA, 2015). Os testes e resultados considerados para *E. coli* foram: citrato (negativo), indol (positivo), motilidade (variável), H₂S (negativo); ureia (negativo); vermelho de metila (positivo) e Voges-Proskauer (negativo).

Os isolados identificados como *E. coli* foram avaliados quanto aos seus perfis de resistência a diferentes antibióticos, pela técnica de diluição em ágar (CLSI 2021). Os princípios ativos selecionados pertencentes às famílias mais utilizadas na produção animal: amoxicilina (AMO), ceftiofur (CEF), ciprofloxacina (CIP), cloranfenicol (CLO), sulfametoxazol + trimetropima (SUT) e tetraciclina (TET). Os isolados foram transferidos para infusão de cérebro e coração (brain and hearth infusion, BHI, Oxoid), incubados a 36 °C overnight e as culturas obtidas diluídas em caldo Mueller Hinton (MH, Oxoid) até atingir uma turbidez próxima ao tudo 0.5 da escala de McFarland. Em seguida, alíquotas de 200 µL das culturas foram transferidas para placas de 96 poços e, com o auxílio de um *pin replicator*, aproximadamente 2µL de cada isolado foi transferido para placas com 50 mL ágar MH (Oxoid) suplementados com antibióticos indicados (Sigma, St. Louis, MO, EUA), em diferentes concentrações de *breakpoint*, para permitir a identificação de isolados resistentes ou susceptíveis (Tabela 2). As placas foram incubadas a 35 °C por 20 h, quando foram examinadas para a verificação de crescimento de colônias no local da inoculação, conforme critérios de interpretação descritos no CLSI (2018 e 2021). Isolados com resistência a três ou mais classes foram considerados MDR (Bae et al., 2005), *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle.

Tabela 2: Antibióticos e concentrações (µg/mL) utilizadas para interpretação de isolados de *Escherichia coli* obtidos da cadeia produtiva de leite (n = 1.091) quanto a resistência (R) e susceptibilidade (S) através da técnica de breakpoint.

Antibióticos	Classificação (CLSI 2021)	
	S	R

Amoxicilina	< 8	> 8
Ceftiofur*	≤ 2	≥ 8
Ciprofloxacina	≤ 0.25	≥ 1
Cloranfenicol	≤ 8	≥ 32
Trimetropim / Sulfametoxazol	≤ 2/38	> 4/76
Tetraciclina	≤ 4	≥ 16

* CLSI (2018)

2.3 Análise de dados

As propriedades rurais incluídas no estudo foram agrupadas conforme o número total de bovinos no estabelecimento, de acordo com Andretta et al. (2022). Neste contexto, propriedades rurais com até 70 bovinos foram classificadas como pequenas propriedades (grupo 1); propriedades entre 71 e 100 bovinos foram agrupadas como criação semiextensiva (grupo 2) e as fazendas com 101 ou mais bovinos foram classificadas no como propriedades de produção intensiva (grupo 3). Com os resultados da avaliação do perfil de resistência a antibióticos, realizado nas amostras coletadas nas propriedades, associou-se características de produção, ordenha, higiene e sanidade animal, com a presença de micro-organismos resistentes, MDR e perfis de MDR. A partir deste momento, alguns aspectos foram postos em evidência a fim de identificar padrões e divergências, não apenas nas condutas como também nos padrões de resistência antimicrobiana entre os grupos.

2.4 Aspectos éticos

As coletas de fezes dos animais foram aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor Palotina da UFPR (Protocolo n° 34/2019 - CEUA/Palotina) em 23/09/2019 (anexo 2) e na Universidade Federal de Viçosa as coletas foram aprovadas pelo CEUA/UFV (Protocolo n° ZB9B641D - CEUA/UFV) (anexo 3). As amostras de humanos foram autorizadas

pelo parecer consubstanciado protocolado pelo número 3.454.359 e os participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo estudo realizado anteriormente sobre a produção de leite no Brasil, as propriedades leiteiras brasileiras são caracterizadas em pequenas propriedades, produção semiextensiva e especializada e/ou intensiva. Propriedades pequenas e de produção semiextensiva, produzem uma média de 12 L/vaca/dia e juntas correspondem a 99,3% das propriedades produtoras de leite, sendo responsáveis por 84% da produção nacional (Andretta et al., 2023). Nesse contexto, Das 20 propriedades, 13 foram classificadas como pequenas propriedades, três como propriedades semiextensivas e quatro como intensivas.

Considerando os resultados obtidos, as pequenas propriedades possuem entre 10 e 36 vacas em lactação com uma média de 15 a 25 L de leite/vaca e com um volume entre 150 e 700 L de leite/dia. Coincidentemente, as propriedades semiextensivas têm uma quantidade de vacas em lactação que varia entre 15 a 36 animais e com média de produção semelhante as pequenas propriedades, variando de 150 a 1000 L de leite/dia. Já estabelecimentos de produção intensiva possuem entre 43 e 180 animais em lactação, com uma média de produção de 30 a 40 L/vaca/dia e conseqüentemente um volume maior, variando de 600 a 5000 L de leite/dia. Isso evidencia que apesar da produção leiteira por animal ter sido mais alta do que a média nacional (20 L/vaca/dia), pequenas propriedades e de produção semiextensiva corresponderam a 80% das propriedades estudadas (n = 16) e 20% (n = 4) são consideradas de criação intensiva.

O manejo das propriedades tem consequência direta em diversos aspectos do setor. Além de influenciar diretamente a qualidade final dos produtos gerados, um manejo eficiente fornece qualidade de vida para os animais e trabalhadores do local. Neste sentido, constatou-se

que com exceção das duas propriedades com maior volume de produção, todas as outras (n = 18) têm o proprietário residindo no local, estando diretamente presente e envolvido com a atividade leiteira. Os estudos de produtividade e desempenho de uma propriedade leiteira normalmente estão relacionados com aspectos econômicos; contudo, faz-se necessário considerar aspectos regionais, culturais, governamentais e socioambientais (Zanin et al., 2020). A heterogeneidade dos grupos de propriedades leiteiras neste estudo deixa isso bastante evidente, onde propriedades menores, com menos infraestrutura e menor acesso a tecnologias apresentaram uma maior produtividade, que pode ser associada a determinados aspectos, como raças de rebanhos, manejos e boas práticas de higiene.

Girolando, Holandês, Gir e Jersolando foram as raças predominantes nas propriedades rurais incluídas no estudo. Algumas raças possuem maior aptidão leiteira do que outras. Neste sentido, foi observada uma variação das raças escolhidas para a produção, com predominância de Jersey, Holandês e cruzas em Palotina, e Holandês e Girolando em Viçosa. De acordo com Zoccal (2017), holandês é a raça leiteira predominante no Brasil. Ainda, em países de clima tropical é interessante fazer cruzamento de raças com características diferentes, como *Bos taurus* e *Bos indicus*, melhorando assim a aptidão leiteira, produtividade, resistência ao estresse térmico e às possíveis doenças dos bovinos, principalmente relacionados a condições climáticas (Ramirez-Rivera et al., 2019).

As fazendas possuíam ordenha mecânica do tipo balde ao pé ou canalizada. Das 13 pequenas propriedades, 11 (84,6%) são de ordenha mecânica do tipo balde ao pé; das propriedades semiextensivas e intensivas, duas possuem ordenha mecânica do tipo balde ao pé (28,6%) e as restantes são do tipo canalizada (n = 5, 72,4%). Apesar da utilização ordenha mecânica do tipo balde ao pé ter sido predominante, pelo menos uma propriedade de cada grupo possuía ordenha mecânica do tipo canalizada. Com relação às práticas de ordenha, 90% das propriedades (n = 18) ordenham seus animais duas vezes ao dia, 5% (1 pequena propriedade)

ordenha uma vez ao dia e outros 5% (uma propriedade de criação intensiva) ordenha seus animais três vezes ao dia. Esta mesma propriedade é a única em que a Unidade de Beneficiamento de Leite e Derivados coleta o leite a cada 24 h, e não a cada 48 h como as demais.

Além disso, 10 das pequenas propriedades (76,9%), uma propriedade de criação semiextensiva (33,33%) e uma propriedade de criação intensiva (25%) alimentavam as vacas durante a ordenha. Todos relataram higienizar e limpar os equipamentos logo após a ordenha e animais como cães, gatos e galinhas estão presentes na sala de ordenha de 16 propriedades (80%). Em todas as propriedades leiteiras, independentemente do grupo, concentrado e leite eram oferecidos como alimentação para as bezerras, variando principalmente a fonte proteica entre silagem (n = 10, 50%), feno (n = 9, 45%) e pasto (n = 1, 5%). Boas práticas na ordenha são primordiais, não apenas para otimizar as atividades e obter um produto de melhor qualidade, como também para prevenir a transmissão e persistência de agentes patogênicos, visando evitar doenças e gastos desnecessários. Neste contexto, alimentar as vacas após a ordenha é uma importante ferramenta para evitar a contaminação do úbere por patógenos ambientais (Zigo et al., 2021). Componentes estruturais, como o tipo de ordenha, são fatores tecnológicos e que indicam o nível de tecnificação de uma propriedade; entretanto, caso não seja calibrada e higienizada da maneira correta, a ordenha mecânica pode piorar a qualidade do leite e causar lesões nos tetos e no úbere, deixando o canal aberto ininterruptamente e facilitando o desenvolvimento de mastite devido a proliferação de patógenos (Odorčić et al., 2019).

Os níveis de produção, a qualidade do leite e sanidade do rebanho são afetados principalmente pelo estágio da lactação, idade das vacas, número de lactações, estação do ano, qualidade e eficiência nos processos de ordenha, intervalos de ordenha, e mesmo assim, a mastite é o principal fator limitante (Souza et al., 2016; Picinin et al., 2019). Com relação às possíveis medidas preventivas para evitar o contágio e disseminação de mastite bovina nos

rebanhos, todas as propriedades de criação semiextensiva ordenam os animais a serem ordenhados, desprezam os três primeiros jatos e realizam o pré e pós-dipping, enquanto 12 (84,6%) das pequenas propriedades e 2 (66,6%) das propriedades de criação intensiva realizam essas práticas. Em relação ao pré e pós-dipping, apenas 6 das pequenas propriedades (46,15%) executam o pré-dipping e 10 (76,9%) aplicam o pós-dipping; uma única propriedade semiextensiva (25%) não realiza esses procedimentos. Esses resultados também foram heterogêneos com relação ao California Mastitis Test (CMT), uma vez que todos os grupos possuem ao menos uma propriedade que não realiza o teste.

Esses resultados indicam a falta de padronização dos procedimentos mínimos recomendados para um bom manejo de ordenha da maioria das propriedades. Em experimento realizado em fazenda brasileira em 2017, foi constatado que após a implementação de programas de higiene, aplicação de pré e pós-dipping e realização de teste semanal com CMT houve uma queda de 92% nas contagens de células somáticas (CCS), variando de 2.764.000 CS/mL para 227.730 CS/mL, indicando uma redução nos índices de mastite subclínica no rebanho e melhoria da qualidade do leite (Mendes et al., 2021). Outro estudo também evidenciou que as boas práticas na ordenha, como métodos de desinfecção, reduzem a CCS no tanque de expansão, uma vez que dois modelos lineares mistos comprovaram que a não utilização de pré e pós-dipping aumentou em 27 e 45% a CCS no tanque, respectivamente (Reyes et al., 2017). A realização desses procedimentos mantém o ambiente de ordenha e os animais saudáveis, com conseqüente redução da utilização de antibióticos e o descarte de leite residual, auxiliando positivamente na saúde dos funcionários.

Os produtores foram questionados quanto a presença de mastite nos rebanhos e quatro proprietários de pequenas propriedades (30,77%) foram os únicos que afirmaram fazer o controle de mastite e não detectaram a doença nos seus rebanhos. Entretanto, todos informaram ter realizado algum tipo de tratamento com a utilização de antibióticos. A utilização de

homeopáticos também foi presente no questionário, 69,2% das pequenas propriedades (9 de 13 propriedades) e uma propriedade semiextensiva (33,3%) lançam mão desta alternativa, enquanto que nenhuma propriedade de criação intensiva utiliza estas substâncias. Ao pesquisar sobre a eficácia dos homeopáticos no tratamento de mastite clínica em uma fazenda com mais de 1,565 vacas em lactação, Ebert et al. (2017) comprovaram que não houve evolução no tratamento de mastite entre os animais tratados com homeopáticos (combinação de nosódios com *Streptococcinum*, *Staphylococcinum*, *Pyrogenium*, e *E. coli*) e alopáticos aos que não recebiam tratamento.

Em 12 das 20 propriedades rurais (60%), os proprietários relataram não saber o custo com doenças e medicações; nas demais esses valores eram apenas estimados (n = 8, 40%). Nesse contexto, em nenhum estabelecimento existia o registro de animais enfermos, óbitos e possíveis doenças que tenham acometido o rebanho nos últimos dois anos. Diarreia dos bezerros foi uma das doenças relatadas por todos os grupos, seguido de pneumonia e laminite. Dois entrevistados (10%) não sabem das doenças que acometeram seus animais (ambas de criação semiextensiva) e uma propriedade de criação intensiva (5%) afirma que não ocorrem doenças no seu rebanho.

Neste contexto, não controlar os gastos e incidências de doenças nos seus rebanhos evidencia que não há uma preocupação ou consciência por parte dos produtores entrevistados sobre a utilização de medicamentos e tampouco as consequências desta conduta, seja para o próprio rebanho ou para a população. Sabe-se que na cadeia produtiva leiteira, além de assegurar a saúde e bem estar dos animais, substâncias farmacológicas são utilizadas como medida econômica, utilizando-os na prevenção das doenças (Redding et al., 2018). Entretanto, o uso intensivo e descontrolado de antibióticos, como doses sub-terapêuticas, não apenas em animais como também em humanos tem levado a uma pressão seletiva de micro-organismos,

com consequente sobrevivência e perpetuação de bactérias resistentes a antibióticos (Garcia et al., 2019).

Todos os produtores tinham ciência da necessidade de aguardar o período de carência, mas apenas em uma pequena propriedade foi relatado o descarte do leite em esgoto (n = 1, 5%), enquanto que nas demais (n = 19, 95%) foi relatado o fornecimento do leite de descarte a outros animais, como bezerros, gatos, cachorros ou galinhas. O leite de vacas em tratamento não deve ser destinado ao consumo humano, pois além de possuir resíduos de antibióticos, também pode ser um veículo de patógenos. Desta forma, leite proveniente de animais em tratamento com antibióticos deve ser descartado e usualmente é destinado à alimentação de bezerros, culminando na manutenção desses resíduos no ambiente (Garcia et al., 2019). Não obstante, a pecuária leiteira, assim como outros setores da produção animal, é responsável por disseminar uma infinidade de bactérias que são excretadas diariamente no ambiente a partir das secreções e dejetos dos animais. Diante desse cenário, a disseminação de microrganismos resistentes a antibióticos e o contato com resíduos de antibióticos pode ser um problema ocupacional, já que funcionários, proprietários e veterinários estão frequentemente expostos ao ambiente de produção, seja através do manejo, exposição à poeira, água contaminada, fezes de animais e consequentemente a sua microbiota (Roberts et al., 2018). Essa interação tornou-se evidente quando pesquisadores encontraram cepas de origem hospitalar, como *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina (MRSA), no rebanho bovino, enquanto outros estudos isolaram cepas de origem animal em humanos que nunca estiveram em contato direto com animais de produção (Sharma et al., 2018).

A falta de registro de doenças, utilização e gastos com medicamentos em todas as propriedades rurais, independentemente do seu volume de produção e condição econômica, evidenciam que os proprietários não têm o controle de qualidade e rentabilidade da atividade. A ausência dessas informações é preocupante, uma vez que esses aspectos são fundamentais

para o controle de enfermidades e da produção leiteira. Especialmente em países com clima tropical, como o Brasil, fatores ambientais e relacionados a produção leiteira possuem impacto direto na qualidade do leite e em indicadores reprodutivos, resultando em queda do desempenho produtivo e maior susceptibilidade a enfermidades, com consequente perdas econômicas relevantes (Picinin et al., 2019).

Uma das medidas econômicas utilizadas para aperfeiçoar a produção animal é a adoção de fármacos, não somente de forma terapêutica como também profilática. Na indústria leiteira, antibióticos são as substâncias químicas mais utilizadas, principalmente em casos de mastite bovina, problemas respiratórios, podais, gastrointestinais e demais doenças infecciosas (Abdi et al., 2018). De acordo com a literatura, para tratamentos em geral, os antibióticos mais utilizados na cadeia produtiva leiteira pertencem à classe dos β -lactâmicos, fluorquinolonas, aminoglicosídeos e penicilinas (González et al., 2010; Kuipers et al., 2016; Stevens et al., 2016; More et al., 2017; Abdi et al., 2018; Manga et al., 2019). Uma ampla variedade dessas substâncias é utilizada para tratamentos de mastite, principalmente cefalosporinas, lincosamidas, aminoglicosídeos, penicilinas, tetraciclina e macrolídeos (Kuipers et al., 2016; More et al., 2017; Abdi et al., 2018; Manga et al., 2019). Tetraciclina e β -lactâmicos usualmente são aplicados para casos de laminitis no rebanho leiteiro, enquanto cefalosporinas, tetraciclina e associações com penicilinas são utilizadas para metrite, doenças respiratórias e enterite (González Pereyra et al., 2015; Obaidat et al., 2018; Ma et al., 2018).

Apesar de não controlarem o uso de medicamentos e seus gastos, os proprietários recordavam-se de alguns antibióticos que haviam utilizado ao longo dos dois últimos anos. Propriedades de criação intensiva foram as que utilizaram uma maior variedade de princípios ativos, dentre eles: amoxicilina, enrofloxacina, sulfametoxazol + trimetopim, tilosina, ciprofloxacina, espiramicina, neomicina, cefalexina, ampicilina, florfenicol e uma combinação entre tetraciclina, neomicina e bacitracina. Propriedades pequenas e semiextensiva utilizavam

combinações de antibióticos, como neomicina e espiramicina, sulfametoxazol e sulfatiazina, além de tetraciclina, penicilinas, gentamicinas.

Na Tabela 3 está representado o número de isolados foram resistentes aos antibióticos. Nota-se que apenas uma propriedade não apresentou isolados resistentes (5%). Em contrapartida, ao menos uma propriedade de cada grupo obteve isolados resistentes a todos os antibióticos. Considerando o total de propriedades, foram encontrados isolados resistentes a amoxicilina e tetraciclina em 90% delas (n = 18). Poucos estabelecimentos apresentaram isolados resistentes a ciprofloxacina, com micro-organismos resistentes em sete propriedades (30%) e com baixos índices de resistência. Coincidentemente, a presença de micro-organismos resistentes a Ceftiofur foi relativamente baixa (menos de 20% dos isolados em todos os grupos), o que é questionável: ceftiofur é uma cefalosporina de 3ª geração, amplamente distribuída para uso veterinário, principalmente em casos de metrite, doenças respiratórias (Obaidat et al., 2018). Por possuir um baixo nível residual e tempo curto de administração, ceftiofur é bastante empregado em bovinos leiteiros, porquanto não há necessidade de descarte do leite (Mcewen and Collignon, 2017).

Tabela 3: Isolados de *Escherichia coli* obtidos em grupos de propriedades leiteiras (pequenas propriedades (PP), de criação semiextensiva (PCSE) e de criação intensiva (PCI)) e que apresentaram resistência aos respectivos antibióticos: amoxicilina (AMO), ceftiofur (CEF), ciprofloxacina (CIP), cloranfenicol (CLO), sulfametoxazol + trimetopim (SUT) e tetraciclina (TET).

Propriedades	Isolados (n)	AMO (%)	CEF (%)	CIP (%)	CLO (%)	SUT (%)	TET (%)
P1	56	21 (37,5%)	0	7 (12,5%)	3 (5,3%)	4 (7,1%)	6 (10,7%)
P2	59	6 (10,7%)	0	0	0	0	0
P3	62	15 (24,2%)	0	0	0	0	1 (1,6%)
P5	52	13 (25%)	0	2 (3,8%)	2 (3,8%)	3 (5,8%)	5 (9,6%)
P6	45	0	0	0	0	0	0
P7	48	1 (2,1%)	0	0	0	1 (2,1%)	2 (4,2%)

	P8	58	4 (6,7%)	0	0	0	3 (5,2%)	3 (5,2%)
	P9	38	7 (18,4%)	1 (2,6%)	0	2 (5,3%)	9 (23,7%)	9 (23,7%)
	P12	59	3 (5,1%)	1 (1,7%)	0	2 (3,4%)	2 (3,4%)	4 (6,8%)
	P14	51	3 (5,9%)	0	0	0	3 (5,9%)	4 (7,8%)
	P16	46	0	0	0	0	0	4 (8,7%)
	P19	35	2 (5,7%)	2 (5,7%)	0	0	1 (2,8%)	1 (2,8%)
	P20	54	8 (14,8%)	5 (9,2%)	0	9 (16,7%)	10 (18,5%)	14 (26%)
	<i>total</i>	<i>673</i>	<i>83 (12,3%)</i>	<i>9 (1,3%)</i>	<i>9 (1,33%)</i>	<i>18 (2,7%)</i>	<i>36 (5,4%)</i>	<i>53 (50,9%)</i>
PCSE	P10	42	4 (9,5%)	0	0	3 (7,1%)	1 (2,4%)	3 (7,1%)
	P13	64	7 (11%)	2 (3,1%)	2 (3,1%)	3 (4,7%)	2 (3,1%)	8 (12,5%)
	P18	66	6 (9,1%)	2 (3%)	0	0	2 (3%)	9 (13,6%)
	<i>total</i>	<i>172</i>	<i>17 (23,6%)</i>	<i>4 (2,3%)</i>	<i>2 (1,2%)</i>	<i>6 (3,5%)</i>	<i>5 (2,9%)</i>	<i>20 (11,6%)</i>
PCI	P4	44	7 (15,9%)	0	0	0	1 (2,3%)	7 (15,9%)
	P11	69	16 (23,2%)	13 (18,8%)	7 (10,1%)	14 (20,3%)	15 (21,7%)	22 (31,9%)
	P15	67	7 (10,4%)	5 (7,5%)	1 (1,5%)	8 (11,9%)	9 (13,4%)	10 (14,9%)
	P17	66	13 (19,7%)	2 (3%)	5 (7,6%)	5 (7,6%)	18 (27,3%)	23 (36,5%)
	<i>total</i>	<i>246</i>	<i>43 (17,5%)</i>	<i>20 (8,1%)</i>	<i>13 (5,3%)</i>	<i>27 (11%)</i>	<i>43 (17,5%)</i>	<i>52 (25,2%)</i>

Outros trabalhos evidenciam que a alta frequência resistência a amoxicilina e tetraciclina é comum, seja em pequenas propriedades ou fazendas de criação intensiva. Em trabalho realizado com propriedades de criação intensiva no sudeste do Chile, isolados de *E. coli* obtidos de amostras de bezerros doentes, saudáveis e da cama do confinamento também apresentaram altas frequências de resistência a amoxicilina e oxitetraciclina (92% e 53%, respectivamente) (Astorga et al., 2019). Uma pesquisa realizada em pequenas propriedades no Brasil também encontrou isolados com maior índice de resistência a estes mesmos princípios ativos (39% de resistência a tetraciclina e 36,6% a amoxicilina), evidenciando a ampla utilização desses antibióticos na cadeia produtiva do leite (Lopes et al., 2022). Tetraciclina são antibióticos amplamente utilizados na medicina veterinária e humana devido ao amplo espectro

de atuação e por serem eficazes contra espiroquetas, bactérias intracelulares obrigatórias e alguns protozoários (Grossman et al., 2016).

Considerando que a resistência antimicrobiana pode ser intrínseca, adquirida ou adaptativa (Holmes et al., 2015), a presença de *E. coli* genéricas apresentando resistência a determinadas classes de antimicrobianos pode ser um fator preocupante, uma vez que essas bactérias são comensais do trato gastrointestinal (TGI) de humanos e animais e além de estarem em quantidade abundante no ambiente, ainda estão correlacionadas com a pressão seletiva imposta pela exposição dos seus hospedeiros aos antimicrobianos, tornando-se um fator de risco para o desenvolvimento de resistência a antibióticos em micro-organismos com potencial patogênico e/ou zoonótico (Hanon et al., 2015; Obaidat et al., 2018). O leite cru pode ser um veículo para bactérias resistentes, facilitando disseminação e incorporação de genes de resistência antimicrobiana na microbiota do ser humano (Chajęcka-Wierżękowska et al., 2019). No Brasil, os requisitos regionais e critérios para a produção de alimentos seguros (saúde e higiene na produção dos animais, controle dos parâmetros biológicos), permitem que sejam comercializados queijos artesanais produzidos com leite cru (BRASIL, 2018).

A utilização de antibióticos em fazendas agropecuárias tem sido identificada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um potencial risco de desenvolvimento de MRA (Bryan et al., 2016). Afinal, a maioria dos antimicrobianos utilizados em gado leiteiro pertence a classes que também são importantes na medicina humana (Garcia et al., 2019). Os genes associados a resistência a antibióticos podem ser transferidos à microbiota autóctone de homem, animais e do ambiente, podendo introduzir material genético de cepas multirresistentes e representando um risco direto à saúde do consumidor, devido à redução da eficácia de tratamentos (Tóth et al., 2020). Diante disso, na Tabela 4 é possível perceber que todos os grupos apresentaram variados perfis de resistência e isolados de *E. coli* considerados MDR, obtidos de vacas, bezerras, leite de conjunto e humanos que trabalham nas propriedades. Propriedades

leiteiras de criação intensiva apresentaram o maior percentual de micro-organismos MDR (14,6%) e coincidentemente, o mesmo grupo obteve a maior variedade de perfis de MDR e com isolados resistentes a todos os antibióticos. Os perfis AMO-SUT-TET, AMO-CLO-TET, AMO-CEF-SUT-TET, AMO-CIP-CLO-SUT-TET estiveram presentes em todos os grupos.

Em pesquisa semelhante, objetivou-se identificar a presença de *E. coli* MDR em ambiente leiteiro (bezerros com diarreia, bezerros saudáveis e cama). Foram obtidos 349 isolados de 20 propriedades leiteiras no Chile, os quais foram submetidos ao teste de difusão em disco para caracterizar a susceptibilidade antimicrobiana frente a 7 famílias de princípios ativos: amoxicilina, ceftiofur, enrofloxacino, florfenicol, gentamicina, oxitetraciclina e sulfametoxazol + trimetopima. Estes pesquisadores encontraram 26 perfis de MDR, com 8 isolados (2,3%) resistentes a todos os princípios ativos, com 5 perfis semelhantes aos encontrados neste estudo (AMO-CEF-SUT-TET, AMO-CLO-SUT-TET, AMO-CLO-TET, AMO-CEF-TET, AMO-SUT-TET (Astorga et al., 2019).

Tabela 4: Número de isolados de *Escherichia coli*, oriundos da cadeia produtiva leiteira, que foram caracterizados como multidroga resistentes (MDR) e os perfis de resistência identificados nos grupos de pequenas propriedades (PP), de criação semiextensiva (PCSE) e de criação intensiva (PCI).

Grupo	Perfil de resistência	n (%)
PP	AMO-SUT-TET	3 (18,7%)
	AMO-CIP-SUT	2 (15,4%)
	AMO-CLO-SUT	1 (6,2%)
	CIP-CLO-SUT	1 (6,2%)
	AMO-CLO-TET	1 (6,2%)
	AMO-CEF-SUT-TET	2 (12,5%)
	AMO-CLO-SUT-TET	2 (12,5%)
	AMO-CEF-CLO-SUT-TET	3 (18,7%)
	AMO-CIP-CLO-SUT-TET	1 (6,2%)
Total		16 (100%)

PCSE	AMO-SUT-TET	1 (20%)
	AMO-CLO-TET	2 (40%)
	AMO-CEF-SUT-TET	1 (20%)
	AMO-CIP-CLO-SUT-TET	1 (20%)
Total		5 (100%)
PCI	AMO-SUT-TET	1 (7,1%)
	AMO-CEF-TET	1 (7,1%)
	AMO-CLO-TET	1 (7,1%)
	AMO-CEF-SUT-TET	2 (14,3%)
	AMO-CLO-SUT-TET	2 (14,3%)
	AMO-CIP-SUT-TET	2 (14,3%)
	AMO-CEF-CLO-SUT-TET	2 (14,3%)
	AMO-CEF-CIP-SUT-TET	1 (7,1%)
	AMO-CEF-CIP-CLO-SUT-TET	2 (14,3%)
Total		14 (100%)

Antibióticos pesquisados: AMO (amoxicilina); CEF (ceftiofur); CIP (ciprofloxacina); CLO (cloranfenicol); SUT (sulfametaxazol/trimetropima) e TET (tetraciclina).

Nota-se que as propriedades de criação intensiva foram as que utilizaram maior variedade de antibióticos e apresentaram maior porcentagem de isolados MDR. Isso acontece porque quando antibióticos são utilizados corriqueiramente, há uma pressão seletiva entre as bactérias, que respondem expressando fenotipicamente seus genes de resistência antimicrobiana (GRA), sobrevivendo bactérias mais resistentes. (Martínez et al., 2014). Em pesquisa realizada com diversas fazendas leiteiras nos EUA, quase 40% dos isolados comensais de *E. coli* apresentaram MDR, com resistência a streptomomicina, tetraciclina, ampicilina, kanamicina, cloranfenicol, gentamicina, ciprofloxacina e ceftriaxone (Obaidat et al., 2018). Outra pesquisa com isolados comensais de secreções orgânicas do gado bovino apresentou elevada resistência a ampicilina, ácido nalidíxico, sulfametoxazol + timetoprim e tetraciclina (Navajas-Benito et al., 2017). Pesquisadores analisaram fezes de bezerros que recebiam leite

de descarte e verificaram a presença de *E. coli* com mais de 90% de resistência a eritromicina e penicilina e pirilimicina (Maynou et al., 2017).

A resistência de microrganismos comensais do TGI de bovinos é uma preocupação, visto que estes são reservatórios primários de patógenos, responsáveis por surtos e casos de toxinfecções alimentares em humanos, e que podem ser veiculados pelo leite e outros produtos de origem animal, como *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* e *E. coli* O157:H7 (Obaidat and Stringer, 2019). Mesmo que genes de resistência possam não ter relação com a virulência do patógeno, infecções causadas por patógenos resistentes levam a resultados adversos até duas vezes maiores quando comparados a infecções causadas por bactérias sensíveis, aumentando índices de morbidade e mortalidade, prejuízos econômicos (custos com equipamentos, pessoal e testes adicionais), além de aumento de gastos com triagem e uso de substâncias com maior toxicidade (Friedman et al., 2015). Essa correlação entre humanos e animais evidencia a necessidade de avaliar o impacto da utilização de antimicrobianos na produção animal, buscando possíveis formas de evitar que a resistência antimicrobiana se torne um problema de saúde pública.

CONCLUSÃO

As propriedades rurais produtoras de leite das regiões estudadas, independente do nível de tecnificação e tamanho, apresentam problemas similares em relação ao registro e tratamento de enfermidades, em especial mastite. Conseqüentemente, nota-se a disseminação de *E. coli* com diferentes perfis de resistência em toda a cadeia produtiva, incluindo MDR, o que pode representar um risco à saúde pública, seja por contato direto dos humanos com os animais, ou através de produtos finais. Estudos mais detalhados são necessários para identificar os

elementos genéticos relacionados à resistência, sua dinâmica de transmissão na cadeia produtiva leiteira e sua relação com a produção animal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdi, R.D., Gillespie, B.E., Vaughn, J., Merrill, C., Headrick, S.I., Ensermu, D.B., D'Souza, D.H., Agga, G.E., Almeida, R.A., Oliver, S.P., Kerro Dego, O., 2018. Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus aureus* Isolates from Dairy Cows and Genetic Diversity of Resistant Isolates. *Foodborne Pathog. Dis.* 15, 449–458. <https://doi.org/10.1089/fpd.2017.2362>
- Andretta, M., Call, D.R., Nero, L.A., 2023. Insights into antibiotic use in Brazilian dairy production. *Int. J. Dairy Technol.* 76, 28–37. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12914>
- Astorga, F., Navarrete-Talloni, M.J., Miró, M.P., Bravo, V., Toro, M., Blondel, C.J., Hervé-Claude, L.P., 2019. Antimicrobial resistance in *E. coli* isolated from dairy calves and bedding material. *Heliyon*, 5, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02773>
- Bae, W., Kaya, K.N., Hancock, D.D., Call, D.R., Park, Y.H., Besser, T.E., 2005. Prevalence and antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter* spp. from cattle farms in Washington State. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 169–174. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.169-174.2005>
- BRASIL 2018. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. Aprova os Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. Diário Oficial na União; 2018.
- Bryan, M., Hea, S.Y., Bryan, M., Hea, S.Y., 2016. A survey of antimicrobial use in dairy cows from farms in four regions of New Zealand Scientific Article A survey of antimicrobial use in dairy cows from farms in four regions of New Zealand. *New Zel. Vet. J.* 0169, 93–98. <https://doi.org/10.1080/00480169.2016.1256794>

- Chajęcka-Wieręckowska, W., Zaderańska, A., Gajęwska, J., 2019. International Journal of Food Microbiology *S. epidermidis* strains from artisanal cheese made from unpasteurized milk in Poland - Genetic characterization of antimicrobial resistance and virulence determinants. Int. J. Food Microbiol. 294, 55–59. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.02.004>
- CLSI.2018. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. CLSI document Vet08-Ed.4. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
- CLSI.2021. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI document M100-Ed.31. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2021.
- Ebert, F., Staufenbiel, R., Simons, J., Pieper, L., 2017. Randomized, blinded, controlled clinical trial shows no benefit of homeopathic mastitis treatment in dairy cows. J. Dairy Sci. 100, 4857–4867. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11805>
- Friedman, N.D., Temkin, E., Carmeli, Y., 2015. The negative impact of antibiotic resistance. Clin. Microbiol. Infect. 22, 416–422. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.12.002>
- Fuga, B., Sellera, F.P., Cerdeira, L., Esposito, F., Cardoso, B., Fontana, H., Moura, Q., Cardenas-Arias, A., Sano, E., Ribas, R.M., Carvalho, A.C., Tognim, M.C.B., de Moraes, M.M.C., Quaresma, A.J.P.G., Santana, Â.P., Reis, J.N., Pilonetto, M., Vespero, E.C., Bonelli, R.R., Cerqueira, A.M.F., Sincero, T.C.M., Lincopan, N., 2022. WHO Critical Priority *Escherichia coli* as One Health Challenge for a Post-Pandemic Scenario: Genomic Surveillance and Analysis of Current Trends in Brazil. Microbiol. Spectr. 10. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01256-21>
- Garcia, Sara N, Osburn, B.I., Cullor, J.S., 2019. A one health perspective on dairy production and dairy food safety. One Heal. 7, 100086. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2019.100086>

- Garcia, Sara N., Osburn, B.I., Cullor, J.S., 2019. A one health perspective on dairy production and dairy food safety. *One Heal.* 7, 100086. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2019.100086>
- González-Pereyra, V., Pol, M., Pastorino, F., Herrero, A., 2015. Quantification of antimicrobial usage in dairy cows and preweaned calves in Argentina. *Prev. Vet. Med.* 122, 273–279. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.10.019>
- González, M.S., Steiner, A., Gassner, B., Regula, G., 2010. Antimicrobial use in Swiss dairy farms: Quantification and evaluation of data quality. *Prev. Vet. Med.* 95, 50–63. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.03.004>
- Grossman, T.H., 2016. Tetracycline Antibiotics and Resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6, 1–24. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025387>
- Hanon, J.B., Jaspers, S., Butaye, P., Wattiau, P., Méroc, E., Aerts, M., Imberechts, H., Vermeersch, K., Van der Stede, Y., 2015. A trend analysis of antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* from several livestock species in Belgium (2011-2014). *Prev. Vet. Med.* 122, 443–452. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.09.001>
- Hernando-Amado, S., Coque, T.M., Baquero, F., Martínez, J.L., 2019. Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nat. Microbiol.* 4, 1432–1442. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0503-9>
- Holmes, A.H., Moore, L.S.P., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., Guerin, P.J., Piddock, L.J. V, 2015. Antimicrobials: access and sustainable effectiveness 2 Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet* 6736, 176–187. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00473-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00473-0)
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. SIFRA. Pesquisa da Pecuária Municipal e Censo Agropecuário. Accessed in 25 jun 2021. [.https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6913#resultado](https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6913#resultado).

- Kates, A.E., Knobloch, M.J., Konkel, A., Young, A., Steinberger, A., Shutske, J., Ruegg, P.L., Sethi, A.K., Goldberg, T., de Campos, J.L., Suen, G., Safdar, N., 2021. Wisconsin dairy farm worker perceptions and practices related to antibiotic use, resistance, and infection prevention using a systems engineering framework. *PLoS One* 16, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0258290>
- Kuipers, A., Koops, W.J., Wemmenhove, H., 2016. Antibiotic use in dairy herds in the Netherlands from 2005 to 2012. *J. Dairy Sci.* 99, 1632–1648. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8428>
- Lopes, T.S., Fussieger, C., Rizzo, F.A., Silveira, S., Lunge, V.R., Streck, A.F., 2022. Species identification and antimicrobial susceptibility profile of bacteria associated with cow mastitis in southern Brazil. *Pesqui. Vet. Bras.* 42. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-6958>
- Ma, Z., Ginn, A., Kang, M., Galvão, K.N., Jeong, K.C., 2018. Genomic and Virulence Characterization of Intrauterine Pathogenic *Escherichia coli* With Multi-Drug Resistance Isolated From Cow Uteri With Metritis. *Front. Microbiol.* 9, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03137>
- Manga, I., Hasman, H., Smidkova, J., Medvecký, M., Dolejska, M., Cizek, A., 2019. Fecal carriage and whole-genome sequencing-assisted characterization of CMY-2 beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in calves at czech dairy cow farm. *Foodborne Pathog. Dis.* 16, 42–53. <https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2531>
- Martínez, J.L., Coque, T.M., Baquero, F., 2014. What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes. *Nat. Publ. Gr.* 1–8. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3399>
- Maynou, G., Migura-Garcia, L., Chester-Jones, H., Ziegler, D., Bach, A., Terré, M., 2017. Effects of feeding pasteurized waste milk to dairy calves on phenotypes and genotypes of

- antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* isolates before and after weaning. *J. Dairy Sci.* 100, 7967–7979. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13040>
- Mcewen, S.A., Collignon, P.J., 2017. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Antimicrob. Resist. Bact. from Livest. Companion Anim.* <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017>
- Mendes, A.R., Simonelli, S.M., Eduardo, V., Silva, G., 2021. Dairy quality management promotes economic and environmental gains. *Res. Soc. And Dev.* 10, 1–11. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i2.12250>
- Mikula, P., Kalhotka, L., Jancula, D., Zezulka, S., Korinkova, R., Cenry, J., Marsalek, B., Toman, P., 2014. Evaluation of antibacterial properties of novel phthalocyanines against *Escherichia coli* – comparison of analytical methods. *J. of Photochemistry and Photobiology.* 38, 230-239. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.04.014>
- More, S.J., Clegg, T.A., McCoy, F., 2017. The use of national-level data to describe trends in intramammary antimicrobial usage on Irish dairy farms from 2003 to 2015. *J. Dairy Sci.* 100, 6400–6413. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12068>
- Navajas-Benito, E.V., Alonso, C.A., Sanz, S., Olarte, C., Martínez-Olarte, R., Hidalgo-Sanz, S., Somalo, S., Torres, C., 2017. Molecular characterization of antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains from a dairy cattle farm and its surroundings. *J. Sci. Food Agric.* 97, 362–365. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7709>
- Obaidat, M.M., Bani Salman, A.E., Davis, M.A., Roess, A.A., 2018. Major diseases, extensive misuse, and high antimicrobial resistance of *Escherichia coli* in large- and small-scale dairy cattle farms in Jordan. *J. Dairy Sci.* 101, 2324–2334. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13665>
- Obaidat, M.M., Stringer, A.P., 2019. Prevalence, molecular characterization, and antimicrobial resistance profiles of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, and *Escherichia coli*

- O157:H7 on dairy cattle farms in Jordan. *J. Dairy Sci.* 102, 8710–8720.
<https://doi.org/10.3168/jds.2019-16461>
- Odorčić, M., Rasmussen, M.D., Paulrud, C.O., Bruckmaier, R.M., 2019. Review: Milking machine settings, teat condition and milking efficiency in dairy cows. *Animal* 13, S94–S99. <https://doi.org/10.1017/S1751731119000417>
- Oliveira, V.H.S., Dall Agnol, A.M., Fritzen, J.T.T., Lorenzetti, E., Alfieri, A.A., Alfieri, A.F., 2020. Microbial diversity involved in the etiology of a bovine respiratory disease outbreak in a dairy calf rearing unit. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 71. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2020.101494>
- Picinin, L.C.A., Bordignon-Luiz, M.T., Cerqueira, M.M.O.P., Toaldo, I.M., Souza, F.N., Leite, M.O., Fonseca, L.M., Lana, A.M.Q., 2019. Effect of seasonal conditions and milk management practices on bulk milk quality in Minas Gerais State - Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 71, 1355–1363. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10063>
- Rajala-schultz, P., Nødtvedt, A., Halasa, T., Waller, K.P., 2021. Prudent Use of Antibiotics in Dairy Cows: The Nordic Approach to Udder Health 8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.623998>
- Ramirez-Rivera, E.J., Rodríguez-Miranda, J., Huerta-Mora, I.R., Cárdenas-Cágal, A., Juárez-Barrientos, J.M., 2019. Tropical milk production systems and milk quality: a review. *Trop. An. Health and Prod.* 51, 1295–1305. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-01922-1>
- Redding, L.E., Bender, J., Baker, L., 2018. Quantification of antibiotic use on dairy farms in Pennsylvania. *J. Dairy Sci.* 102, 1494–1507. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15224>
- Reyes, J., Sanchez, J., Stryhn, H., Ortiz, T., Olivera, M., Keefe, G.P., 2017. Influence of milking method, disinfection and herd management practices on bulk tank milk somatic cell counts in tropical dairy herds in Colombia. *Vet. J.* 220, 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.12.011>

- Roberts, M.C., Garland-Lewis, G., Trufan, S., Meschke, S.J., Fowler, H., Shean, R.C., Greninger, A.L., Rabinowitz, P.M., 2018. Distribution of *Staphylococcus* species in dairy cows, workers and shared farm environments. *FEMS Microbiol. Lett.* 365, 1–7. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny146>
- Sharma, C., Rokana, N., Chandra, M., Singh, B.P., Gulhane, R.D., Gill, J.P.S.R., Pallab Puniya, Kumar, A., Harsh, P., 2018. Antimicrobial Resistance : Its Surveillance, Impact, and Alternative Management Strategies in Dairy Animals. *Frontiers in Vet. Sci.* 4, 1–27. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00237>
- Siqueira, K.B e Ramalho, C. F. Cresce o consumo de lácteos no Brasil. *Anuário Leite 2020*, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, p 32-33, 2020.
- Souza, F.N., Cunha, A.F., Rosa, D.L.S.O., Brito, M.A. V., Guimarães, A.S., Mendonça, L.C., Souza, G.N., Lage, A.P., Blagitz, M.G., Della Libera, A.M.M.P., Heinemann, M.B., Cerqueira, M.M.O.P., 2016. Somatic cell count and mastitis pathogen detection in composite and single or duplicate quarter milk samples. *Pesq. Vet. Bras.* 36, 811–818. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016000900004>
- Stevens, M., Piepers, S., Supré, K., Dewulf, J., de Vliegher, S., 2016. Quantification of antimicrobial consumption in adult cattle on dairy herds in Flanders, Belgium, and associations with udder health, milk quality, and production performance. *J. Dairy Sci.* 99, 2118–2130. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10199>
- Tóth, A.G., Csabai, I., Krikó, E., Dóra, T., Maróti, G., Patai, Á. V, Makrai, L., Géza, S., Sol, N., 2020. Antimicrobial resistance genes in raw milk for human consumption. *Sci. Rep.* 10, 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63675-4>
- Zanin, A., Dal Magro, C.B., Bugalho, D.K., Morlin, F., Afonso, P., Sztando, A., 2020. Driving sustainability in dairy farming from a TBL perspective: Insights from a case study in the

West Region of Santa Catarina, Brazil. *Sustain.* 12, 1–18.

<https://doi.org/10.3390/su12156038>

Zigo, F., Vasil', M., Ondrašovičová, S., Výrostková, J., Bujok, J., Pecka-Kielb, E., 2021.

Maintaining Optimal Mammary Gland Health and Prevention of Mastitis. *Front. Vet. Sci.*


8, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.607311>

Zoccal R (2017) Produção mundial e brasileira de leite . In *Produção, Processamento e*

fiscalização de Leite e Derivados , pp. 85 – 96 . LA Nero , AG Cruz e LS Bersot , eds. São

Paulo : Ateneu.

PUBLICAÇÕES

 **Further culture-independent characterization of the lactic microbiota of Serro artisanal cheese**

Artigo publicado na *Brazilian Journal of Microbiology*, 53, 1593–1598 (2022).

DOI: doi.org/10.1007/s42770-022-00778-2

Letícia Rocha Ferreira^{1,2}, Thaiza Teixeira de Almeida^{1,2}, Milimani Andretta¹, Luana Martins Perin¹, Anderson Carlos Camargo^{1,2}, Antônio Fernandes de Carvalho², Luís Augusto Nero¹

¹ Departamento de Veterinária, InsPOA – Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Universidade Federal de Viçosa, Campus Universitário, Viçosa MG 36570 900, Brazil

² Departamento de Tecnologia de Alimentos, Inovaleite – Laboratório de Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, Universidade Federal de Viçosa, Campus Universitário, Viçosa MG 36570 900, Brazil

Abstract

This study aimed to provide a further characterization of the lactic microbiota present in Minas artisanal cheese (MAC) from the Serro region by using culture-independent methods, as a complementary analysis of a previous study. The total DNA extracted from MAC samples (n = 55) was subjected to repetitive extragenic palindromic-PCR (rep-PCR) and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE). Rep-PCR analysis showed that core microbiota of Serro MAC was closely related, independent of the production town, farm size, or time of production. The sequencing of PCR-DGGE bands identified the prevalence of *Lactococcus lactis* in all samples, and *Streptococcus salivarius* was also identified. Thus, we conclude that when more accurate methods are unavailable, rep-PCR can be used as a culture-independent method to demonstrate if the microbiota is closely related or not among the samples. PCR-DGGE results also matched to the main findings of high-throughput sequencing, previously presented, confirming its confidence to detect the main microbial groups present in the raw milk cheeses.

✚ **Presence and growth prediction of *Staphylococcus* spp. and *Staphylococcus aureus* in Minas Frescal cheese, a soft fresh cheese produced in Brazil**

Artigo publicado na *Journal of Dairy Science*, 104(12), 12312–12320, 2021.

DOI: doi.org/10.3168/jds.2021-20633


Mirian P. Silva^{1,2}, Antonio F. Carvalho², Milimani Andretta¹, Luís A. Nero¹

¹ Departamento de Veterinária, InsPOA – Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Universidade Federal de Viçosa, Campus Universitário, Viçosa MG 36570 900, Brazil

² Departamento de Tecnologia de Alimentos, Inovaleite – Laboratório de Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, Universidade Federal de Viçosa, Campus Universitário, Viçosa MG 36570 900, Brazil

Abstract

Physical-chemical characteristics of Minas Frescal cheese (MFC) favor the growth of *Staphylococcus* spp. and allow the production of enterotoxins by specific strains. Here, we aimed to characterize the physical-chemical aspects (pH, storage temperature, and salt content) and the presence of *Staphylococcus* spp. in MFC samples (n = 50) to support a modeling study for the growth by this microorganism. Coagulase-positive staphylococci isolates were obtained and subjected to PCR assays to identify them as *Staphylococcus aureus* (*nuc*) and to detect staphylococcal enterotoxin-related genes (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*). *Staphylococcus aureus* growth kinetics (maximum growth rate, Grmax, and lag time) were predicted based on ComBase model and MFC physical-chemical aspects. Mean counts of *Staphylococcus* spp. ranged from 3.3 to 6.7 log cfu/g, indicating poor hygiene practices during production. Selected isolates (n = 10) were identified as *S. aureus*, but none presented classical enterotoxin-related genes. pH, temperature, and salt content ranged from 5.80 to 6.62, 5 °C to 12 °C, and 0.85% to 1.70%, respectively. The Grmax values ranged from 0.012 to 0.419 log cfu/g per h. Independent of the storage temperature, the lowest Grmax values (0.012 to 0.372 log cfu/h) were obtained at pH 5.80 associated with salt content of 1.7%; independent of the pH and salt content, the best temperature to avoid staphylococcal growth was 7.5 °C. Hygienic conditions during MFC production must be adopted to avoid staphylococcal contamination, and storage at temperatures lower than 7.5 °C can prevent staphylococcal growth and the potential production of enterotoxins.

 **Lactic microbiota of the minas artisanal cheese produced in the serro region, Minas Gerais, Brazil**

Artigo publicado na *LWT - Food Science and Technology*, 148, 111698, 2021.

DOI: doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111698

Luís Augusto Nero^a, Milimani Andretta^a, Thaiza T. Almeida^{a,b}, Leticia R. Ferreira^{a,b}, Anderson C. Camargo^{a,b}, Ricardo S. Yamatogi^a, Antonio F. Carvalho^b, Douglas R. Call^c


^a Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Veterinária, InsPOA - Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Campus Universitário, Centro, Viçosa, MG, 36570 900, Brazil

^b Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Inovaleite - Laboratório de Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, Campus Universitário, Centro, Viçosa, MG, 36570 900, Brazil

^c Washington State University, Paul G. Allen School for Global Animal Health, 240 SE Ott Road PO Box 647090, 99164-7090, Pullman, WA, USA

Abstract

The lactic microbiota of the Minas artisanal cheese (MAC) produced in the Serro region was characterized by culture-dependent and -independent methods. Samples of Serro MAC (n = 55) were obtained and plated for lactic acid bacteria (LAB) enumeration. Isolates (n = 176) were subsequently identified by 16S rRNA sequencing as lactobacilli, *Lactococcus lactis* and *Enterococcus* sp. LAB counts and the distribution of identified species did not differ by producer city, producer farm size, starter culture and time of production (P > 0.05). DNA from samples was subjected to high-throughput 16S rRNA sequencing and *L. lactis* was the predominant species in all samples. Alpha-diversity indices (species number, diversity, richness) and beta-diversity analysis did not differ between samples (P > 0.05). Core microbiota for all cheese samples included *L. lactis*, *Streptococcus salivarius*, *S. thermophilus* and *Acinetobacter johnsonii*. Here, we were able to show that lactobacilli and *L. lactis* are the dominant lactic groups and species in the Serro MAC, supporting the establishment of a typical microbial signature for this cheese.

 **The complex microbiota of artisanal cheeses interferes in the performance of enumeration protocols for lactic acid bacteria and staphylococci**

Artigo publicado na *International Dairy Journal*, 109, 104791, 2020.

DOI: doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104791


Thaiza Teixeira de Almeida^{a,b}, Milimani Andretta^a, Leticia Rocha Ferreira^{a,b}, Antonio Fernandes de Carvalho^b, Luís Augusto Nero^a

^a Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Veterinária, Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal - InsPOA, Campus Universitário, Centro, 36570-900, Viçosa MG Brazil

^b Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Laboratório de Pesquisa em Leites e Derivados - INOVALEITE, Campus Universitário, Centro, 36570-900, Viçosa MG Brazil

Abstract

We assessed the interference of a complex food microbiota, present in Minas artisanal cheese (MAC) produced in the Serro region, on the performance of enumeration protocols for lactic acid bacteria (LAB) and staphylococci. Initially, 140 isolates were obtained from 6 Serro MAC samples and plated for enumeration of LAB (3 variations of MRS, M17 and Petrifilm™ LAB) and staphylococci (Baird–Parker and Petrifilm™ STX); some target isolates did not grow or present atypical morphologies in their selective protocols. Then, Serro MAC samples (n = 55) were obtained and plated for LAB and staphylococci based on the same protocols: 2569 isolates were obtained from LAB and 1164 from staphylococci protocols: Petrifilm™ LAB presented the highest frequencies of LAB-confirmed colonies, as Petrifilm™ STX for staphylococci (p < 0.05).

 **Short communication: Potential use of passion fruit (*Passiflora cincinnata*) as a biopreservative in the production of coalho cheese, a traditional Brazilian cheese**

Artigo publicado na *Journal of Dairy Science*, 102, 3082–3087, 2020.

DOI: doi.org/10.3168/jds.2019-17791

Camila F. Costa¹, Andressa Fusieger², Milimani Andretta³, Anderson Carlos Camargo³, Antônio Fernandes de Carvalho², Daniel R. Menezes¹, Luís Augusto Nero³

¹ Departamento Medicina Veterinária, UNIVASF, Petrolina 56304 917 PE Brazil

² Departamento Tecnologia de Alimentos, UFV, Viçosa 36570 900 MG Brazil

³ Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa 36570 900 MG Brazil

Abstract

Passion fruit (*Passiflora cincinnata* Mast.) is a native fruit from the Caatinga, a typical ecoregion in northeastern Brazil, and it has potential for use by the food and pharmaceutical industries. In this study, we characterized the antimicrobial activity of *P. cincinnata* and its application in the production of coalho cheese, a traditional Brazilian product. Aqueous extract of *P. cincinnata* exhibited high inhibitory activity against *Listeria* spp. (n = 4, reference strains), *Staphylococcus aureus* (n = 3, reference strains), and multidrug-resistant *Staph. aureus* (n = 8), and low inhibitory activity against lactic acid bacteria (LAB, n = 3, reference strains). Based on these results, we produced coalho cheese using goat milk with and without (control) passion fruit. Cheeses were stored at 10°C for 14 d and populations of mesophilic aerobes, *Staph. aureus*, and presumptive LAB were monitored at d 1, 7 and 14. The passion fruit cheese had lower counts of mesophilic aerobes, *Staph. aureus* (after 7 and 14 d), and presumptive LAB (after 14 d) than the control cheese. Adding ground passion fruit contributed to a reduction of *Staph. aureus* counts in goat cheese, although these differences were not significant. These results indicated the inhibitory potential of passion fruit and its potential use for controlling microbial populations in a cheese model; further studies are needed to characterize the active molecules that are responsible for such activity.

ANEXOS

ANEXO 1: Protocolo nº 34/2019 -Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor Palotina da UFPR (CEUA/Palotina).

Ministério da Educação Universidade
Federal do Paraná Setor Palotina
Comissão de Ética no Uso de Animais



Certificado

Certificamos que o Protocolo nº 34/2019 referente ao projeto de pesquisa Uma abordagem em one health para estabelecer as potenciais rotas de distribuição de resistência a antibióticos na cadeia produtiva leiteira sob responsabilidade do Prof. Luciano dos Santos Bersot, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor Palotina da UFPR (CEUA/Palotina) em 23/09/2019.

O Docente responsável pelo envio do formulário deve estar ciente de que deve:

- informar qualquer intercorrência, efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo;
- informar sobre a necessidade de modificações ou emendas ao protocolo que foi descrito e aprovado, identificando a parte do protocolo a ser modificada e apresentando justificativas claras


Palotina, 23 de setembro de 2019

Certificate

Certify that the Protocol n. 34/2019 regarding the research project A one health approach to establish potential antibiotic resistance distribution routes in the dairy supply chain of Luciano dos Santos Bersot is according to the Ethical Principles of Animal Experimentation adopted by the National

Council for Animal Experiments Control (CONCEA) and was APPROVED by the Ethics Committee on Animal Use of the UFPR – Setor Palotina (CEUA / Palotina) in Sept 23, 2019.

Palotina, September 23, 2019.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'G. Alberton', written over a horizontal line.

Prof. Geraldo Camilo Alberton

Coordenador/Coordinator

CEUA/Palotina – UFPR

ANEXO 2: Protocolo nº 53/2019: Comissão de Ética no Uso de Animais – UFV.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
PRÓ REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA
Campus Universitário - Viçosa, MG - 36370-900 - Telefone: (31) 3612.2313

Viçosa, 19 de novembro de 2019

Ilmo. Prof.
Ricardo Seiti Yamatogi
Coordenador do projeto
DVT/UFV

Sr. Coordenador,

Após avaliação da Metodologia utilizada no Projeto de Pesquisa intitulado "Uma abordagem em *one health* para estabelecer as potenciais rotas de distribuição de resistência e antibióticos na cadeia produtiva leiteira", aqui nomeado Processo 53/2019, a CEUA/UFV emite parecer favorável ao protocolo de utilização de animais proposto, tendo como base para análise a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, bem como a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI.

Acresce a esse Parecer a exigência de Relatório Final de Atividades conforme itens a seguir:

RESUMO DOS RESULTADOS FINAIS OBTIDOS A PARTIR DOS EXPERIMENTOS
ENVOLVENDO A UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS NO PROJETO DE PESQUISA

- 1 Número do protocolo de submissão do projeto de pesquisa à CEUA/UFV;
- 2 Metodologia completa obrigatoriamente com:
 - Local (is) Geral (is) e específico (s) oficial (is) onde ocorreu a experimentação;
 - O nome científico do animal em questão;
 - Número total de animais utilizados na pesquisa.
- 3 Resultados;
- 4 Nome do Coordenador do Projeto:
Assinatura:
- 5 Nome do Responsável Técnico:
Assinatura:

Inscrição em CRMV:


Prof.ª Silvia Almeida Cardoso
Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV

ANEXO 3: Questionário epidemiológico utilizado como referência nas entrevistas realizadas com os proprietários das propriedades rurais.

QUESTIONÁRIO

Uma abordagem em *one health* para estabelecer as potenciais rotas de distribuição de resistência a antibióticos na cadeia produtiva leiteira.

DATA DA ENTREVISTA: ____/____/2019

Nome do entrevistado: _____

Endereço: _____

Telefone: (____) _____

Onde a família reside?

- Propriedade onde trabalha
 Outra propriedade rural
 Cidade

Há quantos anos trabalha na atividade agropecuária? _____

Área total da propriedade rural (em ha): _____

Qual o sistema de produção?

- Extensivo Semi-intensivo Intensivo

Qual o manejo alimentar aplicado às bezerras até o desmame?

- Feno Silagem Concentrado Leite *in natura* Leite em pó
 Aleitamento natural-com a vaca Leite de descarte Outro _____

As bezerras desmamadas permanecem junto com as em aleitamento? _____

Com que idade as bezerras iniciam a vida reprodutiva?

- 8 meses
 1 ano
 1 ano e meio
 Outro _____

Há mastite no rebanho?

	Qual a frequência? <i>[número de animais infectados ao longo de 12 meses]</i>	
	Inverno	Verão
a) Sim, muito frequente		
b) Sim, frequente		
c) Sim, pouco frequente		
d) Não		

Utiliza Homeopatia ou Fitoterapia para tratar dos animais?

Sim Não

O Sr. trata mastite no seu rebanho?

Sim Não

- a) Quem realiza o tratamento? _____
- b) Quantos casos tratou nos últimos 2 anos? _____
- c) Quanto gastou em tratamento nesse período aproximadamente em R\$? _____
- d) Quantos animais teve de descartar por esse motivo nos últimos 5 anos? _____

Que outras doenças o senhor tratou com antibióticos nos últimos 2 anos?

O Sr. tem anotado quais foram os antibióticos utilizados para tratamento nos últimos 2 anos?

Sim Não Quais: _____

Qual é o destino do leite de descarte, durante o período de carência?

Fornece aos bezerros

Fornece a outros animais

Descarta nos córregos

Outro _____

O Sr. alimenta as vacas em períodos próximos à ordenha?

- Sim, durante a ordenha
 Sim, após a ordenha
 Não

O Sr. possui resfriador de leite na propriedade?

- Sim, qual o tipo? _____
 Não, por quê? _____

O leite permanece na propriedade por quanto tempo?

- 24 horas
 48 horas

Em que momento é realizada a limpeza do resfriador?

- A cada saída do leite
 1x por semana
 1x a cada 15 dias
 Mais tempo

Como é realizada a limpeza dos utensílios de ordenha?

De onde provém a água para a lavagem dos utensílios? Esta água recebe algum tratamento?

- Poço artesiano Outros _____
 Tratada Não tratada Desconhece

Qual é o local onde as vacas dormem?

- Pasto
 Campo próximo estábulo
 Estábulo. Qual o tipo de cama? _____
 Outro _____

Utiliza sal mineral/proteico para a alimentação animal?

- Sim Não
- Às vezes. Frequência? _____
- Sal mineral
- Proteico

Utiliza subprodutos ou restos de culturas agrícolas na alimentação animal?

- Sim, qual (ais)? _____
- Algumas vezes, qual (ais)? _____
- Não

Eu _____, CPF _____

estou ciente de que respondi esse formulário, o qual faz parte do projeto de pesquisa “Uma abordagem em *one health* para estabelecer as potenciais rotas de distribuição de resistência a antibióticos na cadeia produtiva leiteira.” e que posso obter uma cópia do mesmo entrando em contato com a representante Milimani Andretta, de telefone (55)9 9178-2971.