

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

LEITE COMERCIALIZÁVEL, LEITE DE DESCARTE PASTEURIZADO OU NÃO
NA DIETA DE BEZERROS LEITEIROS

Hilton Do Carmo Diniz Neto

Belo Horizonte

2024

Hilton do Carmo Diniz Neto

**LEITE COMERCIALIZÁVEL, LEITE DE DESCARTE PASTEURIZADO OU NÃO
NA DIETA DE BEZERROS LEITEIROS**

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Zootecnia.

Área de concentração: Produção Animal

Orientadora: Sandra Gesteira Coelho

Coorientadora: Mariana Magalhães Campos

Belo Horizonte

FICHA CATALOGRÁFICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Leite comercializável, leite de descarte pasteurizado ou não na dieta de bezerros leiteiros

HILTON DO CARMO DINIZ NETO

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia trinta de janeiro de dois mil e vinte três, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Minas Gerais, constituída pelos seguintes professores:

Carla Maris Machado Bittar

Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - USP

Rafael Alves Azevedo

Alta

Hemilly Cristina Menezes de Sá

Escola de Veterinária da UFMG

Rodrigo Melo Meneses

Escola de Veterinária da UFMG

Sandra Gesteira Coelho – Orientadora

Escola de Veterinária da UFMG

Belo Horizonte, 30 de janeiro 2023

A Deus, pela presença constante em minha vida, aos meus familiares e amigos que me apoiaram e incentivaram em todos os momentos.

Dedico

AGRADECIMENTOS

E lá se passaram 11 anos desde à minha entrada na graduação em Medicina Veterinária na EV-UFG. Uma jornada árdua de muitos desafios, construção e amadurecimento. Nenhum empreendimento é realizado de forma fácil e sem esforço, não é mesmo? Os grandes empreendimentos são construídos em meio a muitas dificuldades: “Ser herói não significa acertar constantemente. É muito mais que isso. O verdadeiro espírito de herói encontra-se na intensa convicção de enfrentar e vencer as dificuldades, em vez de desistir de tudo”.

Na vida, situações inesperadas podem surgir a todo momento. Poderão manifestar obstáculos ou problemas que jamais havíamos imaginado vivenciar. É justamente nesses momentos que revelamos o que verdadeiramente carregamos no coração e quem realmente está do nosso lado. Meus mais sinceros agradecimentos a Deus, que me iluminou e me deu forças nos momentos em que mais precisei. Agradeço à minha família, em especial meu pai, meus irmãos, minha Vó, tias e primos, que estiveram comigo em todos os momentos, mesmo quando eu não estive fisicamente presente.

Um agradecimento ainda mais especial à minha Mãe, mulher de muita perseverança, resiliência e empatia. Mesmo diante de tantos desafios que a vida lhe impôs, nunca mediu esforços para tornar meu sonho em realidade. À minha orientadora, amiga e segunda mãe, professora Sandra Gesteira Coelho. Me faltam palavras para descrever a importância dela em minha vida. A falta das palavras normalmente se traduz em lágrimas de gratidão por tudo que ela representa. Obrigado por trilhar os caminhos da vida comigo e por nunca soltar a minha mão. Obrigado de coração!

Aos Mestres e hoje grandes amigos Lívio Molina, Mônica Cerqueira, Elias Facury, Rodrigo Meneses, Helton Saturnino e Hemilly Menezes pela amizade, experiência, paciência e todos os conselhos em todos os momentos da minha caminhada. À Embrapa Gado de leite, especialmente aos pesquisadores Mariana, Luiz Gustavo e Thierry pela oportunidade. Um agradecimento ainda mais especial à Mariana pela parceria e cumplicidade em todos os momentos. Aos outros incontáveis colaboradores, amigos e companheiros de jornada pelas inúmeras histórias e aprendizados que vou levar para sempre comigo.

Um agradecimento especial a todos os meus amigos, os quais fazem com que minha jornada seja leve e sobretudo muito feliz. Não os nomear seria muito injusto da minha parte. Obrigado Marcellly, Brenda, Larissa, Roberta, Clarissa, Flávia, Mayara, Joana, Helder, Isabela, Hellen,

Eduardo, Bruna e Rafael. Obrigado a todas as pessoas que cruzaram meu caminho nesses últimos 4 anos e que participaram, mesmo que indiretamente, na construção do ser humano que sou hoje.

Um brinde ao tempo, pela sua forma saudável e natural de ensinar. Um brinde ao tempo, por me agraciar com a sabedoria e pela oportunidade de acrescentar tanta essência rotineiramente em minha trajetória.

Um brinde a minha nova fase!

Meus mais sinceros agradecimentos,

Hilton Diniz

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1. Leite de descarte.....	20
2.1.1. Composição nutricional.....	20
2.1.2. Qualidade microbiológica.....	23
2.1.3. Resíduos de antimicrobianos.....	24
2.2. Leite de descarte pasteurizado.....	25
2.2.1. Qualidade microbiológica.....	26
2.2.2. Composição nutricional.....	28
2.2.3. Resíduos de antimicrobianos.....	30
2.2.4. Recontaminação do leite pasteurizado.....	31
2.2.5. Monitoramento do processo de pasteurização.....	32
2.3. Efeitos sobre o consumo e desempenho.....	33
2.4. Efeitos no microbioma do trato gastrointestinal.....	35
2.5. Efeitos nos parâmetros ruminais.....	41
2.6. Efeitos na digestibilidade dos nutrientes.....	42
2.7. Efeitos no desenvolvimento do trato gastrointestinal.....	43
2.8. Efeitos sobre a resistência antimicrobiana.....	44
2.9. Referências bibliográficas.....	48
3. ARTIGO CIENTÍFICO.....	58
Effects of bulk tank milk, waste milk, and pasteurized waste milk on the nutrient utilization, gastrointestinal tract development, and antimicrobial resistance to escherichia coli in pre-weaned dairy calves	
3.1. Abstract.....	59
3.2. Introduction.....	60
3.3. Material and methods.....	62
3.3.1. Animals, treatments and management.....	62

3.3.2. Intake and Performance	63
3.3.3. Digestibility	64
3.3.4. Nutrient Composition Analysis	64
3.3.5. Nutrient Digestibility	65
3.3.6. Euthanasia, Gastrointestinal Tract (GIT), Internal Organs, and Viscera Weight Comparative Slaughter	66
3.3.7. Rumen and cecum pH, NH ₃ , and VFA	66
3.3.8. Histology.....	67
3.3.9. Antimicrobial Susceptibility Testing	68
3.3.10. Statistical Analysis	69
3.4. Results.....	70
3.4.1. Nutrient intake and performance.....	70
3.4.2. Apparent Nutrient Digestibility.....	70
3.4.3. Nitrogen Balance.....	71
3.4.4. Ruminant and Cecum Parameters	71
3.4.5. Gastrointestinal tract development.....	71
3.4.6. Antimicrobial resistance in <i>E. coli</i> isolates.....	72
3.5. Discussion.....	72
3.6. Conclusion.....	78
3.7. Acknowledgments.....	78
3.8. References.....	79
3.9. Tables.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores sugeridos para avaliação da qualidade microbiológica da dieta líquida utilizada para aleitamento de bezerros.....	24
Table 1. Composition of bulk tank milk (BTM), waste milk (WM), and pasteurized waste milk (PWM) and starter during the experimental period.....	85
Table 2. Zone diameters (mm) and interpretative criteria of tested antimicrobial agents used to categorize antimicrobial susceptibility of fecal <i>Escherichia coli</i> isolates in calves (n = 45) fed bulk tank milk, waste milk, and pasteurized waste milk from 4 to 60 days of age.....	86
Table 3. Nutrient intake and performance of dairy calves fed bulk tank milk (BTM), waste milk (WM), and pasteurized waste milk (PWM) in two different periods	87
Table 4. Digestibility of nutrients of dairy calves fed bulk tank milk (BTM), waste milk (WM), and pasteurized waste milk (PWM) in two different periods.....	88
Table 5. Nitrogen balance (g/d/BW ^{0.75}) of dairy calves fed bulk tank milk (BTM), waste milk (WM), and pasteurized waste milk (PWM) in two different periods	89
Table 6. Ruminal and cecum pH, ammonia nitrogen (NH ₃), and volatile fatty acid (VFA) of dairy calves fed bulk tank milk (BTM), waste milk (WM), and pasteurized waste milk (PWM) in two different periods	90
Table 7. Empty body weight (kg); weight of internal organs and viscera and intestines length of dairy calves fed bulk tank milk (BTM), waste milk (WM), and pasteurized waste milk (PWM) in two different periods	91
Table 8. Gastrointestinal tract development of dairy calves fed bulk tank milk (BTM), waste milk (WM), and pasteurized waste milk (PWM) in two different periods	92
Table 9. Prevalence of resistant fecal <i>Escherichia coli</i> isolates of dairy calves fed bulk tank milk (BTM, n = 15), waste milk (WM, n = 15), and pasteurized waste milk (PWM, n = 15) at 3, 30, and 60 days of age	93

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2. Revisão bibliográfica

AGV - Ácidos graxos voláteis;

AMO - Amoxicilina + clavulanato;

AMP - Ampicilina;

CCS - Contagem de células somáticas;

CEF - Ceftiofur;

CEFA - Cefalotina;

COL - Colistina;

COM - Controle;

CP - Comprimento de papila;

CPP - Contagem padrão em placa;

DOX - Doxiciclina;

ENR - Enrofloxacino;

ERI - Eritromicina;

EST - Estreptomicina;

FDA - Fibra em detergente ácido;

FDN - Fibra em detergente neutro;

FLO - Florfenicol;

GEN - Gentamicina;

GOR - Gordura;

IMI - Imipeném;

LA - Leite de descarte acidificado;

LC - Leite comercializável;

LCP - Leite comercializável pasteurizado;

LD - Leite de descarte;

LDP - Leite de descarte pasteurizado;

LP - Largura de papila;

MO - Matéria orgânica

MS - Matéria seca;

OXI - Oxitetraciclina;

PB - Proteína bruta;

PEN - Penicilina;

PIR - Pirlimicina;

SU - Sucedâneo;

SUL - Sulfadimetoxina;

TET - Tetraciclina;

TGI - Trato gastrointestinal;

TRA - Tratado;

TRI - Trimetoprim;

TRI - Trimetoprima.

3. Artigo Científico

BTM - Bulk tank milk;

WM - Waste milk;

PWM - Pasteurized waste milk;

EE - Ether extract;

SCC - Somatic cell count;

IM - Intestinal microbiota;
DM - Dry matter;
DMI - Dry matter intake;
OM - Organic matter;
ADF - Acid detergent fiber;
NDF - Neutral detergent fiber;
GEI - Gross energy intake;
GE - Energy content;
VFA - Volatile fatty acids;
AMP – Ampicillin;
AMO – Amoxicillin;
CEF – Ceftriaxone;
FLO – Florfenicol;
ENR – Enrofloxacin;
STR – Streptomycin;
TET – Tetracycline;
MR - Milk replacer;
PL - Papilla length;
PW - Papilla width.

RESUMO

Mundialmente, a utilização de leite de descarte (LD) no aleitamento de bezerros leiteiros é prática comum, por representar redução de custos nessa fase e por contornar os desafios no tratamento de resíduos. Entretanto, a utilização dessa dieta tem sido alvo de questionamentos, principalmente pela oscilação na sua composição nutricional, elevada carga microbiana e pela presença de resíduos de antimicrobianos, o que poderia impactar negativamente na saúde e no desempenho dos animais. Diante deste desafio, a pasteurização (rápida ou lenta) tem sido utilizada, com foco em eliminar bactérias patogênicas e reduzir a carga microbiana, resultando em menor risco sanitário. Entretanto, essa prática não é capaz de melhorar a qualidade nutricional ou eliminar os resíduos de antimicrobianos. Atualmente, não existe consenso na literatura científica dos efeitos da utilização de LD, pasteurizado ou não, sobre os parâmetros de saúde e desempenho dos animais. Sabe-se que a baixa qualidade nutricional do LD, somado à presença de resíduos de antimicrobianos, podem atuar sobre a composição e estabilidade da microbiota do trato gastrointestinal dos bezerros. Embora mudanças no microbioma dos bezerros tenham sido comumente relatadas, ainda não é possível se as mudanças nessa diversidade resultam em efeitos positivos ou negativos na saúde e desempenho dos bezerros. Porém, a utilização de leite contendo resíduos de antimicrobianos é responsável por aumentar a excreção de bactérias resistentes, a qual parece ser de curta duração e transitória. Este estudo teve como objetivo avaliar o impacto do uso de leite do tanque comercializável (LTC), LD e leite de descarte pasteurizado (LDP) sobre a digestibilidade dos nutrientes, fermentação ruminal e cecal, desenvolvimento do trato gastrointestinal e resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* fecal de bezerros leiteiros em dois períodos (30 e 60 dias de idade). Os bezerros foram agrupados de acordo com peso corporal, proteína sérica e composição racial. Os animais foram distribuídos em três tratamentos: LTC (n = 21), LD de vacas tratadas com antimicrobiano (n = 21) e LDP (leite de descarte submetido à pasteurização em alta temperatura e curto período; n = 21). Para isso, foram utilizados 63 bezerros, sendo: 18 animais (6/tratamento) avaliados no período de 4 a 30 dias e 45 (15/tratamento) de 4 a 60 dias. Durante o período experimental, os animais receberam seis litros de leite dividido em duas refeições, e tiveram acesso *ad libitum* a água e ração, desde o primeiro dia de vida. O consumo de leite e ração foi registrado diariamente. O teste de digestibilidade do trato digestivo total foi realizado dos 25 aos 29 dias de idade (n = 6) e dos 53 aos 57 dias de idade (n = 15). Os animais foram eutanasiados aos 30 ± 1 e 60 ± 1 dia de idade para avaliação da fermentação ruminal e cecal e do desenvolvimento do trato gastrointestinal. O teste de suscetibilidade antimicrobiana foi realizado com 1, 30 e 60

dias de idade (n = 15/tratamento). Para avaliação dos dados, foi utilizado modelo linear de efeitos mistos para parâmetros contínuos e modelos lineares generalizados para avaliações pontuais (software R). Os tratamentos LD e LDP apresentaram menor pH ruminal, maior concentração de acetato ruminal, maior peso do retículo-rúmen e fígado, e maior prevalência de *E. coli* resistente à diversas bases antimicrobianas testadas em comparação com LTC aos 30 e 60 dias. Até os 60 dias, ambos os tratamentos LTC e LD apresentaram maior digestibilidade de extrato etéreo e energia bruta em comparação ao LDP, enquanto os tratamentos LD e LDP apresentaram maior consumo e retenção de nitrogênio em comparação ao LTC. Estes achados sugerem que a pasteurização do leite de descarte afeta negativamente a digestibilidade dos nutrientes e o desempenho dos bezerros, ao mesmo tempo que impacta o desenvolvimento ruminal. Além disso, o uso de leite contendo resíduos de antimicrobianos leva à seleção de *E. coli* resistentes no trato gastrointestinal ao longo do tempo.

Palavras-chave: resistência antimicrobiana, microbioma, rúmen, digestibilidade

ABSTRACT

Worldwide, the use of waste milk (WM) to feed dairy calves is a common practice, as it represents a cost reduction at this stage and overcomes challenges in waste treatment. However, the use of this liquid diet has been questioned, mainly due to fluctuations in its nutritional composition, high microbial load and the presence of antimicrobial residues, which could negatively impact the health and performance of animals. Faced with this challenge, pasteurization (fast or slow) has been used, with a focus on eliminating pathogenic bacteria and reducing the microbial load, resulting in a lower health risk. However, this practice is not capable of improving nutritional quality or eliminating antimicrobial residues. Currently, there is no consensus in the scientific literature on the effects of using WM, pasteurized or not, on animal health and performance parameters. It is known that the low nutritional quality of WM, added to the presence of antimicrobial residues, can affect the composition and stability of the microbiota in the gastrointestinal tract of calves. Although changes in the calf microbiome have been commonly reported, it is not yet possible whether changes in this diversity result in positive or negative effects on calf health and performance. However, the use of milk containing antimicrobial residues is responsible for increasing the excretion of resistant bacteria, which appears to be short-lived and transient. This study aimed to assess the impact of bulk tank milk (BTM), waste milk (WM), and pasteurized waste milk (PWM) on nutrient digestibility, ruminal and cecal fermentation, gastrointestinal tract development, and antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* from dairy calves at two periods (30 and 60 d of age). Calves were grouped according to body weight, serum protein levels, and breed composition. Three treatments were included: BTM (n = 21), WM from cows under antibiotic treatment (n = 21), and PWM (waste milk submitted to high-temperature, short-time pasteurization; n = 21). A total of 63 calves were used, of which: 18 animals (6/treatment) evaluated in the period of 4 - 30 d and 45 (15/treatment) from 4 - 60 d. During the experimental period, a daily intake of 6 L of milk was divided into two equal meals, with *ad libitum* access to water and starter. Milk and feed intakes were recorded daily. Digestibility in the total digestive tract test were conducted from 25 to 29 d of age (n = 6) and from 53 to 57 d of age (n = 15). Animals were euthanized at 30 ± 1 and 60 ± 1 d of age for the assessment of ruminal and cecal fermentation and GIT development. Antimicrobial susceptibility testing was conducted at 1, 30, and 60 d of age (n = 15/treatment). Statistical analysis utilized a linear mixed-effects model for continuous outcomes and generalized linear models for single measurements (R software). Treatments WM and PWM had lower rumen pH, higher ruminal acetate concentration, larger reticulorumen and liver, and

a higher prevalence of fecal-resistant *E. coli* compared to BTM at both 30 and 60 d. Up to 60 d, both BTM and WM treatments exhibited higher digestibility of ether extract and gross energy compared to the PWM, whereas WM and PWM treatments showed increased nitrogen intake and retention compared to the BTM. These findings suggest that pasteurization of waste milk negatively affects nutrient digestibility and calf performance, while also impacting rumen development. Additionally, the use of milk containing antibiotic residue leads to the selection of resistant *E. coli* in the gastrointestinal tract over time.

Keywords: antimicrobial resistance, microbiome, rumen, digestibility

1. INTRODUÇÃO GERAL

O leite de descarte (LD) compreende todo o leite não comercializável, podendo ser, oriundo de vacas tratadas ou em tratamento com medicamentos (mastite clínica, afecções podais, metrite, entre outras afecções), leite de vacas com elevada contagem de células somáticas (CCS), colostro e leite de transição (Aust et al., 2012). Mundialmente, a sua utilização no aleitamento de bezerros é considerada prática comum, por representar redução de custos e contornar os desafios impostos pela implantação de sistemas de tratamentos de resíduos (Brunton et al., 2012). Em fazendas leiteiras dos EUA, o LD é o principal alimento utilizado na dieta líquida de bezerros na fase de aleitamento (40,1%; Urie et al., 2018).

A utilização do LD parece ser alternativa economicamente viável, no entanto, pode representar risco sanitário para os animais, dada a elevada carga microbiana e a presença de resíduos de antimicrobianos (Duse et al., 2013). Além disso, ele apresenta variação em sua composição nutricional, pela presença de colostro de baixa qualidade e leite de transição, bem como das alterações oriundas de afecções, principalmente as mastites, o que torna sua utilização no aleitamento de bezerros questionável (Zou et al., 2017).

Diante deste desafio, a pasteurização do LD tem sido utilizada, com o objetivo de reduzir a carga microbiana e os desafios sanitários no sistema de criação. A pasteurização lenta (63°C por 30 min.) ou rápida (72°C por 15 seg.), podem reduzir expressivamente a carga microbiana e inativar os microrganismos patogênicos presentes no LD (McDonald et al., 2011). Entretanto, esse processo não melhora a qualidade nutricional e não elimina os resíduos de antimicrobianos (Garzon et al., 2020).

A baixa qualidade nutricional do LD, somado à presença de resíduos de antimicrobianos pode atuar sobre a composição e estabilidade da microbiota do trato gastrointestinal (TGI), o que pode exercer efeito negativo sobre o desenvolvimento do mesmo e a digestão dos nutrientes pelos animais. Dennis et al. (2019) observaram menor digestibilidade da matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), fibra em detergente ácido (FDA) e fibra em detergente neutro (FDN) em bezerros que receberam LD contendo resíduos de antimicrobianos.

Além disso, como volumes variáveis de leite podem ser direcionados ao rúmen durante o aleitamento, a presença de LD contendo resíduos de antimicrobianos tem sido associada a alterações na microbiota e no perfil de fermentação ruminal (Li et al., 2019; Zhang et al., 2019). Análises metagenômicas do conteúdo ruminal de bezerros alimentados com LD mostraram

suscetibilidade de determinados filos de bactérias em detrimento de outros menos favoráveis à digestão de nutrientes oriundos de dieta sólida (Naas et al., 2014; Zhang et al., 2019). Essas alterações são suficientes para impactar o desenvolvimento do TGI, principalmente o rúmen (Li et al., 2019; Zhang et al., 2019).

A seleção de bactérias resistentes ocorre, principalmente, quando os antimicrobianos são administrados indiscriminadamente, sem levar em consideração a dosagem e duração do tratamento (Wegener, 2003). A utilização de LD, contendo diferentes resíduos e doses de antimicrobianos, pode promover a seleção de bactérias resistentes (Pereira et al., 2014a) durante a fase de aleitamento.

O entendimento dos efeitos da utilização do LD, pasteurizado ou não, sob parâmetros de desempenho e saúde de bezerros leiteiros é fundamental para que medidas de manejo possam ser tomadas para minimizar os possíveis efeitos negativos desse tipo de prática.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Leite de descarte

O LD compreende todo o leite não comercializável, oriundo de vacas em tratamento com antimicrobianos, antiparasitários, anti-inflamatórios, e aquelas que ainda cumprem período de carência, além do leite de vacas com elevada CCS, colostro e/ou leite de transição (Aust et al., 2012).

Mundialmente, a utilização do LD no aleitamento de bezerros leiteiros, é considerada prática comum e que objetiva reduzir custos com dieta líquida e contornar os desafios impostos pela implantação de sistema de tratamento de resíduos específicos (Brunton et al., 2012). Em fazendas leiteiras dos EUA, o LD é o principal alimento utilizado na dieta líquida de bezerros na fase de aleitamento (40,1%; Urie et al., 2018), semelhante ao observado em fazendas no Brasil (46%; Alta Cria, 2023).

2.1.1. Composição nutricional

A qualidade nutricional da dieta líquida é fundamental para atingir os resultados em saúde e desempenho dos bezerros. No entanto, a qualidade nutricional do LD pode ser variável, principalmente, devido à presença de colostro, leite de transição e/ou leite de vacas com mastite.

O colostro é a primeira secreção da glândula mamária após o parto. Em relação à composição nutricional, ele apresenta baixo percentual de lactose (Kehoe et al., 2007) e elevados percentuais de sais inorgânicos (Holt e Jenness, 1984), responsáveis pela manutenção da pressão osmótica e maior concentração dos constituintes lácteos (Fox, 2009b), uma vez que a lactose é responsável por cerca de 50% da pressão osmótica do leite.

Por outro lado, Madsen et al. (2004) relataram maior concentração de proteína no colostro quando comparado ao leite comercializável (LC). O aumento no teor de proteína se deve a dois principais fatores: maior concentração dos constituintes lácteos, o que resulta no aumento das concentrações de caseína (Sobczuk-Szul et al., 2013), e aumento da permeabilidade vascular (Zhang et al., 2011), com passagem de imunoglobulinas, principalmente IgG, IgM e IgA (Smolenski et al., 2007), e albumina (Zhang et al., 2011), da corrente sanguínea para a glândula mamária.

Assim como para a proteína, a concentração de gordura no colostro é superior à observada no LC (Morrill et al., 2012). Ao avaliar o perfil de ácidos graxos presentes no colostro observa-

se predomínio de ácidos graxos de cadeia longa (C12 - C18) (Palmquist et al., 1993) em decorrência do balanço energético negativo dos animais, que resulta na mobilização de ácidos graxos do tecido adiposo, sendo os mesmos, incorporados à gordura do leite (Belyea e Adams, 1990).

Já nos casos de LD oriundo de animais com mastite, observa-se aumento nos teores de proteína do leite atribuído ao influxo de proteínas presentes no sangue (principalmente albumina) para a glândula mamária. Porém, diferente do que ocorre na colostrogênese, esse aumento está associado à redução nos teores de caseína (Auldist e Hubble, 1998), devido ao comprometimento da integridade do epitélio mamário por toxinas microbianas e abertura das junções celulares. Enquanto isso, a redução nos teores de caseína se deve, principalmente, à degradação da caseína pelas proteinases produzidas por microrganismos causadores de mastite, pelos leucócitos, além de redução na síntese e secreção de caseína em resposta aos danos funcionais das células epiteliais mamárias.

Como as proteínas, a concentração de lactose também reduz no leite de vacas com mastite (Shuster et al., 1991; Ogola et al., 2007). A redução nos teores de lactose possivelmente se deve a quatro mecanismos principais: danos às células epiteliais alveolares (Bruckmaier et al., 2004); danos às junções celulares, com passagem de lactose pela via paracelular (Auldist et al., 1995); fermentação por microrganismos causadores de mastite (Auldist et al., 1995) e aumento nas concentrações de íons potássio, sódio, cloreto e bicarbonato, como forma de manter o equilíbrio osmótico.

Ao avaliar os efeitos da inflamação da glândula mamária sobre a gordura do leite, os resultados da literatura científica ainda são controversos. A redução observada nos estudos é justificada devido à ação de lipases sintetizadas por leucócitos durante o processo inflamatório, que resultam em quebra de triglicerídeos, oxidação de ácidos graxos e produção de componentes responsáveis por sabores desagradáveis (Auldist et al., 1995; Auldist e Hubble, 1998). Em contrapartida, o aumento nos teores de gordura observado nos trabalhos científicos é justificado pela redução na concentração de lactose e, conseqüentemente, do volume de leite produzido, o que permite maior concentração da gordura (Pyorala, 2003; Bruckmaier et al., 2004).

Nos sistemas de criação que utilizam LC, a concentração de sólidos totais no leite varia relativamente pouco. O LC apresenta aproximadamente 12,5% de sólidos totais, sendo 3,7% de gordura, 3,2% de proteína e 4,6% de lactose. Dada a relevância de uma alimentação estável

para os bezerros na fase de aleitamento, com o objetivo de maximizar o desempenho dos animais durante essa fase, estudos para avaliar a variação na composição do LD tornaram-se alvo de pesquisa em todo o mundo (Moore et al., 2009).

Moore et al. (2009) avaliaram a qualidade nutricional do LD pela concentração de sólidos totais (ST - gordura e sólidos não gordurosos). Eles coletaram amostras de LD em 12 fazendas, sendo observadas variações de 5,1 a 13,5% nos teores de ST. Seis fazendas apresentaram valores de ST abaixo de 12%. Segundo os autores, esses resultados se devem à contaminação por água no LD, comum nas fazendas leiteiras durante o processo de retirar o conteúdo de leite remanescente que permanece nas tubulações da ordenha.

Em contrapartida, Zou et al. (2017) avaliaram a composição do LC, LD, LDP e leite de descarte acidificado (LA) e não observaram alteração no teor de proteína, enquanto o teor de gordura do LD (6,3%) foi superior ao observado para o LC, LDP e LA (4,2; 4,5 e 4,3%, respectivamente). Segundo os autores, os elevados teores de gordura observados no LD se devem à presença de colostro e/ou leite de transição, que é uma prática comum nas fazendas.

Vieira et al. (2021) avaliaram a qualidade nutricional do LD, LC e LDP e observaram maior teor de gordura para o tratamento LC (4,2%) e LD (4,1%) em comparação com o LDP (3,7%). O LD e o LDP apresentaram maiores teores de proteína bruta (3,4 e 3,4%, respectivamente) e nitrogênio não proteico (0,13 e 0,12%, respectivamente) comparado ao LC (3,3% e 0,1%, respectivamente). A concentração de lactose foi maior no tratamento LC (4,4%) do que nos tratamentos LD e LDP (4,3%). Curiosamente, não foram observadas diferenças entre os grupos para a concentração de caseína.

O volume de colostro, leite de transição e de leite de vacas com mastite, é o principal fator que determina variações nos teores de sólidos totais do LD. Assim, a sua utilização no aleitamento de bezerros traz o grande desafio da variação dos constituintes lácteos, o que dificulta os ajustes nutricionais das dietas por exigir correção/padronização pela adição de quantidades específicas de sucedâneo/corretores do leite, de composição e formulação conhecidas para manutenção dos teores esperados (Moore et al., 2009). Atualmente, a estimativa da concentração de sólidos totais no LD na própria fazenda pode ser realizada com auxílio do refratômetro, Brix óptico ou digital. Contudo, sem o auxílio de tal ferramenta, essas variações implicam em oscilações importante nas concentrações dos nutrientes e consequente variação no desempenho dos bezerros.

2.1.2. Qualidade microbiológica

Quando se trata de LD, uma das principais preocupações está relacionada a contaminação por microrganismos. Fatores como a liberação de bactérias presentes no leite, decorrentes de processos inflamatórios e/ou infecciosos, além de maus hábitos de higiene, manuseio e armazenamento desse alimento (Moore et al., 2009) podem favorecer o aumento da carga microbiana no produto (Elizondo-Salazar et al., 2010; Aust et al., 2012).

A qualidade microbiológica do LD foi alvo de pesquisas científicas a partir década de 90, quando Selim e Cullor (1997) observaram presença de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Streptococcus* spp., e *Staphylococcus* spp. em amostras de LD. Segundo os autores, a presença desses patógenos no LD poderia estar vinculada à ocorrência de diarreia e outras doenças no sistema de criação.

A partir desse trabalho, pesquisas subsequentes caracterizaram a qualidade microbiológica do LD utilizado nos trabalhos de pesquisa. Moore et al. (2009) avaliaram a qualidade microbiológica do LD utilizado no aleitamento de bezerros em propriedades de cria e recria de bezerros leiteiros. Os pesquisadores avaliaram amostras de leite de 12 fazendas fornecedoras de LD e observaram elevada quantidade de coliformes e crescimento misto em toda a superfície das placas, de tal forma que não foi possível realizar a contagem. Não foram observados crescimento de *Salmonella* spp. e *Mycoplasma* spp.

Elizondo-Salazar et al. (2010) avaliaram a qualidade microbiológica de LD de seis fazendas da Pensilvânia, EUA. Não foram encontrados *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* nas amostras. Porém, foram observados valores médios de contagem padrão em placa (CPP) de 64,7 UFC/ml; *Streptococcus* ambientais de 18,3 UFC/ml; *Streptococcus* coagulase negativo de 5,4 UFC/ml, coliformes totais de 900 UFC/ml e bactérias gram-negativas não coliformes de 28,4 UFC/ml. Semelhante a esses resultados, Aust et al. (2012) também observaram valores elevados de CPP ($6,6 \times 10^4$ UFC/ml), bactérias termodúricas ($1,4 \times 10^2$ UFC/ml) e coliformes totais ($6,5 \times 10^2$ UFC/ml) em amostras de LD.

Os valores aceitáveis de qualidade microbiológica da dieta líquida de bezerros ainda não foram completamente estabelecidos na literatura científica e observa-se grande divergência entre pesquisadores. McGuirk (2003) e Godden et al. (2005) sugeriram alguns parâmetros importantes que devem ser considerados (**Tabela 1**).

Tabela 1: Valores sugeridos para avaliação da qualidade microbiológica da dieta líquida utilizada para aleitamento de bezerros

Parâmetro	Quantidade (UFC/mL)	Referência
Contagem padrão em placa (CPP)	< 10.000	McGuirk, 2003
Contagem padrão em placa (CPP)	< 20.000	Godden et al., 2005
<i>Streptococcus</i> ambientais	< 5.000	McGuirk, 2003
<i>Streptococcus</i> coagulase negativo	< 5.000	McGuirk, 2003
Bactérias gram-negativas não coliformes	< 5.000	McGuirk, 2003
Coliformes totais	Ausente	McGuirk, 2003

De forma geral, os resultados de trabalhos científicos supracitados demonstram valores piores nos parâmetros de qualidade microbiológica do LD descritos na tabela 1. Isso realça a real preocupação com o risco de transmissão de doenças e perda em desempenho para os animais que recebem LD.

2.1.3. Resíduos de antimicrobianos

A presença de resíduos de antimicrobianos no LD depende, principalmente, das bases farmacológicas utilizadas na propriedade e da contribuição do leite de vacas em tratamento de afecções, além dos animais já tratados, mas que ainda cumprem período de carência dos medicamentos utilizados.

A mastite é uma das principais afecções que acomete bovinos leiteiros, sendo o motivo mais frequente de tratamento com antimicrobianos (Pol e Ruegg, 2007; Saini et al., 2012). De forma geral, os antimicrobianos intramamários aprovados para tratamento de mastite clínica são direcionados aos gêneros *Streptococcus* e *Staphylococcus*, comuns na etiologia das afecções. Nos EUA, apenas duas classes antimicrobianas estão liberadas para uso, dentre elas, a dos beta-lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas) e lincosamida (pirlicimicina) (FDA). Entretanto, no Brasil, além dos beta-lactâmicos, outras classes de antimicrobianos e alguns fármacos são registrados no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e permitidos para esse fim. Entre os principais fármacos utilizados no Brasil, estão os beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e tetraciclina (Netto et al., 2005).

Além dos antimicrobianos intramamários, ainda é comum a realização de antibioticoterapia sistêmica para tratamento de casos clínicos de grau 1 e 2 (penicilina e ceftiofur), mesmo havendo contraindicação devido às baixas concentrações terapêuticas que atingem na glândula mamária.

Pereira et al. (2014b) foram os pioneiros em elucidar qualitativamente a presença de resíduos de antimicrobianos no LD utilizado no aleitamento de bezerros em fazendas leiteiras em Nova York, EUA. Os beta-lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas) foram os principais fármacos presentes nas amostras de LD, sendo utilizados, principalmente, para tratamento de mastite, doença respiratória e metrite.

Li et al. (2019) avaliaram quantitativamente e qualitativamente a presença de resíduo de antimicrobianos no LD em uma fazenda na China. Os pesquisadores relataram concentrações de penicilina ($0,024 \pm 0,034$ mg/L; média \pm desvio padrão); estreptomicina ($0,019 \pm 0,008$ mg/L); tetraciclina ($0,08 \pm 0,05$ mg/L) e ceftiofur ($0,76 \pm 0,43$ mg/L). Como esperado, o elevado desvio padrão observado nos parâmetros indica grande variação na concentração dos resíduos presentes no LD.

No Brasil não há informação na literatura científica que caracterize qualitativamente e quantitativamente a presença de resíduos de antimicrobianos presentes em amostra de LD. Entretanto, espera-se que grande variedade de resíduos estejam presentes nas amostras de LD, dada a variedade de fármacos utilizados nas propriedades nos diferentes protocolos de tratamento de afecções do rebanho.

A utilização de LD contendo resíduos de antimicrobianos no aleitamento de bezerros tornou-se preocupação mundial, principalmente, devido à ocorrência de resistência bacteriana (Oliver et al., 2011). Com isso, a literatura científica se concentrou em avaliar a resistência bacteriana em sistema de aleitamento no qual utiliza-se LD, já tendo sido observados padrões de resistência para *E. coli* (Pereira et al., 2014a, Tempini et al., 2018) e *Salmonella* spp. (Edrington et al., 2012).

2.2. Leite de descarte pasteurizado

A pasteurização é o processo no qual o leite é aquecido sob condições específicas de temperatura e tempo, cujo objetivo visa reduzir/eliminar agentes microbianos. Por isso, sua utilização surgiu como alternativa para reduzir a carga microbiana presente no LD, e com isso,

buscar amenizar a propagação de doenças no sistema de criação (Godden et al., 2005). Atualmente, existem dois métodos de pasteurização que podem ser utilizados:

- ✓ Pasteurização lenta: processo no qual o leite é pasteurizado em baixa temperatura por longo período (63°C por 30 min; Godden et al., 2005), e em seguida, é resfriado rapidamente para temperatura de fornecimento aos bezerros ou para armazenamento;
- ✓ Pasteurização rápida: processo no qual o leite é pasteurizado em alta temperatura por curto intervalo de tempo (72°C por 15 seg), sendo geralmente realizada por meio de sistema de fluxo contínuo (Godden et al., 2005). Este tipo de sistema também é capaz de resfriar o leite após o processo para ser utilizado no fornecimento aos bezerros ou para armazenamento.

Ambos os processos são capazes de reduzir a carga microbiana presente no leite. A escolha do equipamento varia de acordo com as necessidades da propriedade, o grau de investimento e orientações do técnico responsável.

2.2.1. Qualidade microbiológica

O leite, mesmo quando produzido em circunstâncias ideais de higiene, possui uma microbiota diversa que reflete todo o sistema de produção em que o animal se encontra (manejo, ambiente de permanência e instalações). Por isso, ampla gama de bactérias gram-positivas, gram-negativas, bactérias deteriorantes e organismos comensais podem normalmente ser encontradas nesse alimento.

A ingestão direta de alguns destes microrganismos, especialmente os patogênicos, pode resultar em disbiose, que são distúrbios do equilíbrio da microbiota do hospedeiro. Por sua vez, a disbiose está intimamente relacionada ao desequilíbrio da função imune e pode assim, ocasionar doenças, queda no desempenho e morte do animal. A pasteurização tem sido uma das principais estratégias para controlar esse desafio. O processo é capaz de eliminar 99,9% dos agentes patogênicos, responsáveis pela ocorrência de doenças nos bezerros e reduzir significativamente a carga microbiana do leite (Godden et al., 2005; Jorgensen et al., 2006).

Parte dos trabalhos científicos se concentraram em avaliar a eficiência do processo de pasteurização na eliminação de bactérias patogênicas. Sabe-se que a pasteurização é eficaz na eliminação de agentes como *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma bovis* e *Mycobacterium californicum* (Butler et al., 2000; Stabel, 2001; Stabel, 2004), que são bactérias comumente implicadas na ocorrência de doenças em bezerros.

A redução da carga microbiana do LD pela pasteurização está bem fundamentada na literatura científica, porém os resultados ainda são muito variáveis. Alguns trabalhos mostram reduções na carga bacteriana de 4 a 7 log¹⁰, cerca de 98 a 99% da carga bacteriana total (Grant et al., 1996; Godden et al., 2005). Entretanto, Ruzante et al. (2008) observaram menor redução na carga microbiana em quatro fazendas na região da Califórnia, EUA cerca de 2,6 – 4,7 log¹⁰. É importante observar que a redução quantitativa dos microrganismos é proporcional à carga microbiana do LD no início do processo, portanto, os cuidados básicos de higiene na obtenção e manuseio deste leite não devem ser negligenciados.

Jorgensen et al. (2006) avaliaram a qualidade microbiológica do LDP em 31 fazendas comerciais em Wisconsin, EUA. Foram observadas elevadas cargas bacterianas no leite após a pasteurização em 12,9% das fazendas avaliadas, indicando o desafio da realização do processo. Segundo os autores, essa variabilidade nos resultados se deve à temperatura atingida durante o processo e rotina de limpeza do equipamento. Contudo, em outras propriedades, esse crescimento pode estar relacionado aos cuidados de armazenamento e distribuição do LDP até o momento do fornecimento aos bezerros. Já na avaliação da qualidade microbiológica do LDP em seis fazendas no centro da Pensilvânia, EUA (Elizondo-Salazar et al., 2010), foi observada redução de 99,9% da carga bacteriana (redução de 5 log¹⁰) após o processo de pasteurização. Entretanto, os pesquisadores ressaltam a grande variação que pode ser encontrada entre fazendas. Cerca de 96% das amostras apresentaram valores de CPP abaixo de 20.000 UFC/mL, atualmente aceito como ideal (Tabela 1).

Aust et al. (2012) avaliaram a qualidade microbiológica do LD, LDP, LC e leite comercializável pasteurizado (LCP) utilizados no aleitamento de bezerros. Os pesquisadores realizaram a pasteurização rápida e lenta do leite. O LD, LDP, LC e LCP apresentaram valores de CPP de (6,6 x 10⁴; 1,2 x 10³; 3,6 x 10⁴ e 2,3 x 10³ UFC/mL, respectivamente); microrganismos termodúricos (1,4 x 10²; 3,8 x 10²; 1,8 x 10³ e 8,1 x 10² UFC/mL, respectivamente) e coliformes totais (6,5 x 10²; < 10¹; 8,2 x 10¹ e < 10¹ UFC/mL, respectivamente). O processo de pasteurização foi capaz de reduzir a CPP na ordem de 0,8 - 2,1 log¹⁰. Entretanto, neste mesmo trabalho, os autores relataram contaminação do leite pós-pasteurização ao se utilizar o carrinho e baldes de distribuição de leite, o que segundo os autores, é um desafio comumente enfrentado pelas fazendas. Neste trabalho, a redução observada na carga microbiana do LDP ainda ultrapassa os valores recomendados por McGuirk, (2003) e Godden et al. (2005).

Com o objetivo de padronizar a qualidade microbiológica e reduzir os problemas associados à eficiência do processo de pasteurização, James (2015) propôs alguns parâmetros de qualidade. Segundo o autor, a CPP (UFC/mL) em amostra de LD antes da pasteurização deve ser de até 500.000; logo após a pasteurização, fornecida ao primeiro bezerro, de até 20.000 e de 100.000 ao ser fornecido ao último bezerro. Em relação à composição do leite, o autor propôs valores mínimos de 12%, 3,5% e 3% para sólidos totais, gordura e proteína, respectivamente.

Embora observe-se grande variação na eficiência do processo de pasteurização, em geral, a redução da carga microbiana é significativa e melhora as condições sanitárias do LD no que diz respeito à contaminação por agentes patogênicos importantes, como *E.coli*, *Salmonella* spp., *Mycoplasma bovis* e *Mycobacterium bovis*, patógenos comumente associados à ocorrência de doenças nas bezerras. A eficiência do processo depende de fatores como manejo do pasteurizador, treinamento de mão de obra e, principalmente, higienização durante todo o processo, de modo que o controle de todas as etapas é fundamental.

2.2.2. Composição nutricional

O processo de pasteurização do leite pode resultar em alterações nutricionais, com possibilidade de comprometimento da qualidade do produto. Grande parte dos trabalhos científicos se concentram em avaliar o processo de pasteurização do LC utilizado para consumo humano. De certa forma, o entendimento desses efeitos é fundamental, uma vez que os processos se assemelham e os resultados poderiam ser extrapolados para a criação de bezerros.

Durante o processamento térmico as proteínas passam por várias alterações químicas e físicas, dentre elas: desnaturação, glicosilação, racemização e formação de ligações iso-peptídicas (Borad et al., 2017). A desnaturação das proteínas ocorre na faixa de temperatura de 62 a 78°C (Singh e Havea, 2003), sendo mais sensíveis as imunoglobulinas, seguidas de albumina, β -lactoglobulina, α -lactalbumina e caseína. Entretanto, a temperatura da pasteurização rápida não é capaz de prejudicar a bioatividade das proteínas (Finot, 1997).

Ao se tratar de proteínas, a principal preocupação existente após o processamento térmico é a indisponibilidade do aminoácido lisina pela ocorrência da reação de Maillard. Essa reação se caracteriza pela interação entre a lisina e a lactose (açúcar redutor), com formação de pigmentos amarronzados denominados melanoidinas, os quais indisponibilizam a lisina para

ser aproveitada pelo organismo. Entretanto, a pasteurização lenta e rápida do leite apresenta efeitos insignificantes na disponibilidade da lisina (Borad et al., 2017).

Os teores de gordura do leite e as concentrações de ácidos graxos livres podem ser afetados pelo processo de pasteurização/armazenamento (Santos et al., 2003). Embora o processo térmico possa inativar a maior parte das lipases presentes no leite, não é possível inativá-las completamente. Além disso, as lipases produzidas pelas células somáticas podem contribuir significativamente para a lipólise da gordura do leite durante o processo de armazenamento (Azzara e Dimick, 1985), o que compromete ainda mais a qualidade quando trabalhamos com pasteurização de LD, no qual, em geral, a CCS é significativamente elevada.

Após a pasteurização, a ação das lipases remanescentes resulta na redução dos teores de gordura (3,5% para LC e 3,0% para leite pasteurizado) e aumento nas concentrações de ácido palmítico (18:0), oleico (18:1), esteárico (18:0) e mirístico (14:0) (Pestana et al., 2015). No entanto, esse resultado é controverso. Nos trabalhos de Zhu et al. (2020) e Xu et al. (2020) não foram observadas influência da pasteurização rápida no perfil de ácidos graxos do leite e na qualidade nutricional e funcional do LDP (bioatividade).

O leite é fonte de vitaminas hidrossolúveis, como riboflavina (vitamina B2), ácido ascórbico (vitamina C) e ácido pantotênico (vitamina B5). Segundo Bendicho et al. (2002), vitaminas hidrossolúveis são mais sensíveis ao tratamento térmico do que as lipossolúveis, o que resultaria em maior perda das mesmas no processo de pasteurização. Os resultados ainda são controversos quanto à manutenção de vitaminas no leite. De acordo com Macdonald et al. (2011), o processo de pasteurização reduz as concentrações de vitaminas B2 e E, e durante o processamento/armazenamento observa-se perda de vitaminas lábeis como A e D (Cappozzo et al., 2015). Entretanto, Zhu et al. (2020) não relataram alterações nas concentrações de vitamina B12 e B2, resultados consistentes aos observados por Andersson e Oste (1994) e Bendicho et al. (2002).

Ao avaliar características organolépticas do leite pasteurizado, o processo de pasteurização/armazenamento do LC destinado ao consumo humano está relacionado com aumento nos teores de compostos como: acetona, butanona, pentanal e etanol (Rashid et al., 2019). O aumento de alguns desses compostos se deve à β -oxidação induzida pelo calor, seguida de descarboxilação, cuja taxa estaria relacionada à temperatura de pasteurização (Chugh et al., 2014). O aumento desses compostos estaria relacionado ao sabor desagradável do leite (Gandy et al., 2008).

Os trabalhos que avaliaram a qualidade nutricional do LDP se fundamentaram, principalmente, nos valores de gordura, proteína e lactose (Jorgensen et al., 2006; Zou et al., 2017), sem análises mais específicas dos possíveis efeitos da pasteurização sobre a composição, estrutura e função desses constituintes.

Trabalho conduzido por Jorgensen et al. (2006) avaliou a composição nutricional do LD e LDP. Os autores não observaram alterações nos valores de proteína (3,5%), gordura (3,9%) e lactose (4,4%) entre os grupos, o que demonstra ausência de efeito da pasteurização sobre a composição do leite. Neste estudo, os elevados valores de proteína e gordura observados no LD e LDP se deve à contribuição de colostro de baixa qualidade e/ou leite de transição presente nas amostras.

Por outro lado, Zou et al. (2017) relataram teores de gordura do LD superiores aos observados para o LC e LDP (6,3; 4,2; e 4,5%, respectivamente). Resultados estes inesperados, uma vez que os pesquisadores pasteurizaram o LD proveniente da mesma amostra de LD cru. Entretanto, a ação das lipases remanescentes pode ter resultado nos valores de gordura mais baixos. Não foram observadas alterações nos teores de proteína entre os grupos LC, LD e LDP.

Os trabalhos científicos com avaliações mais específicas, se concentraram em avaliar os efeitos da pasteurização nos constituintes do leite destinado ao consumo humano. De certa forma, os resultados observados nesses estudos poderiam ser utilizados quando se trabalha com pasteurização do LD nas fazendas. Porém, diante da diferença de qualidade do produto alvo do processamento e pouco conhecimento sobre o papel da composição do LD, são necessários estudos específicos para orientação e compreensão do setor e da comunidade científica.

2.2.3. Resíduos de antimicrobianos

A presença de resíduo de antimicrobianos no LD é uma preocupação mundial crescente, dado o aumento dos casos de bactérias multirresistentes envolvidas em problemas sanitários inerentes a humanos e animais (Oliver et al., 2011).

Tecnicamente, o tratamento térmico por pasteurização não é capaz de inativar e degradar os resíduos de antimicrobianos (Zorraquino et al., 2008; Roca et al., 2010; Roca et al., 2011). Entretanto, mesmo antimicrobianos da mesma classe, com a mesma estrutura, podem exibir grandes diferenças na estabilidade térmica (Kellnerová et al., 2014), o que pode justificar os diferentes resultados encontrados na literatura científica.

Devido ao uso frequente dos β -lactâmicos na Medicina Veterinária, a literatura científica se concentrou em estudar os efeitos do tratamento térmico do leite sobre seus resíduos. O primeiro estudo sobre a inativação de antimicrobianos no leite foi realizado por Shahani et al. (1956). Nesse trabalho os pesquisadores avaliaram a inativação da penicilina presente no leite após o processo de pasteurização lenta e observaram inativação de apenas 8% de toda a penicilina da amostra.

Segundo Zorraquino et al. (2008), o tratamento térmico da pasteurização lenta não foi capaz de inativar penicilinas e cefalosporinas em amostras de leite. De acordo com os pesquisadores, somente temperaturas mais altas (120°C por 20 min) seriam capazes de inativar significativamente as penicilinas (65%) e cefalosporinas (90%). Entretanto, nesta temperatura, as alterações nutricionais seriam tão intensas que poderiam prejudicar a qualidade nutricional do produto.

De forma geral, o processo de pasteurização não é capaz de inativar os resíduos de antimicrobianos presentes no LD. Com isso, práticas que reduzam o risco de ocorrência de doenças, principalmente as mastites e a necessidade de utilização de antimicrobianos nas fazendas devem ser tomadas (Tempini et al., 2018), com o objetivo de reduzir a utilização de antimicrobianos na produção animal.

2.2.4. Recontaminação do leite pasteurizado

Bactérias termodúricas e alguns microrganismos resistentes a altas temperaturas são capazes de sobreviver às temperaturas aplicadas no processo de pasteurização, porém, são incapazes de sobreviver à temperatura de refrigeração de 4°C (Gleeson et al., 2013). Diante disso, após o processo de pasteurização, o leite deve ser mantido sob temperatura de refrigeração até ser utilizado no aleitamento dos bezerros, caso não seja fornecido imediatamente.

Ainda assim, é importante ressaltar que falhas no processo de pasteurização, no resfriamento do LP e na higienização dos equipamentos podem levar à recontaminação e crescimento de bactérias, incluindo as psicrotolerantes. As bactérias psicrotolerantes são resistentes à temperatura de refrigeração e podem se multiplicar no leite pasteurizado refrigerado. Nesse grupo, as mais relevantes são: *Pseudomonas*, coliformes, bactérias gram-negativas e bactérias gram-positivas formadoras de esporos (Martin et al., 2018). Segundo Trmčić et al. (2015), as *Pseudomonas* são capazes de aumentar sua população para valores

superiores a $4 \log^{10}$ UFC /mL, acima de 21 dias de armazenamento, quando mantidas em temperatura de 6°C. No entanto, geralmente o LDP nas fazendas permanece refrigerado por períodos curtos, no máximo de um a dois dias. Diferentemente das *Pseudomonas*, os coliformes são capazes de fermentar a lactose para produzir gás e ácido em 48 horas, em temperatura de 32 - 35°C (Davidson et al., 2004), o que os torna mais preocupante quando se utiliza LDP no aleitamento dos bezerros.

A recontaminação do leite após o processo de pasteurização pode ser responsável por grande parte da variação nos resultados de CPP observados nos trabalhos científicos. Para contornar esse problema, atenção especial deve ser dada em todo o processo de pasteurização, como no resfriamento para armazenamento do leite e na higienização de todos os equipamentos/ utensílios utilizados. Além desses cuidados, a qualidade microbiológica do LD obtido nas fazendas é fundamental para que a pasteurização cumpra a meta de atingir CPP inferior a 20.000 UFC/mL, uma vez que a eficiência do processo de pasteurização não é 100%.

2.2.5. Monitoramento do processo de pasteurização

Existem algumas estratégias que podem ser utilizadas a campo para avaliar a eficácia do tratamento térmico do leite, dentre elas estão o teste enzimático CPP.

✓ Teste enzimático: Fosfatase e peroxidase

A fosfatase alcalina é uma enzima naturalmente presente no leite cru, inativada após o tratamento térmico. A temperatura de inativação da fosfatase alcalina é um pouco mais alta do que a temperatura necessária para a destruição de bactérias patogênicas (Fox e Kelly, 2006). Dessa forma, a ausência dessa enzima no leite pasteurizado é um indicador aceito para avaliação da eficiência da pasteurização durante o tratamento térmico do leite (Rampling et al., 2004).

A peroxidase é outra enzima presente no leite cru. Entretanto, diferentemente da fosfatase alcalina, ela é resistente à temperatura de pasteurização, sendo inativada somente em temperatura superior à 78°C (Seifu et al., 2005). A ausência de peroxidase sugere que o tratamento térmico foi superior à temperatura indicada para pasteurização, o que pode comprometer a qualidade nutricional do produto.

O teste pode ser facilmente realizado à nível de campo utilizando-se tiras reativas baseado em resultados colorimétricos quanto a presença ou ausência de fosfatase e peroxidase.

✓ Contagem padrão em placa

É realizada pela análise de amostras de leite pré-pasteurização e pós-pasteurização (imediatamente após o processo e antes do fornecimento aos bezerros). Recomenda-se que o leite pasteurizado contenha valores < 20.000 UFC/mL. Os valores de CPP das amostras pós-pasteurização imediata dependem dos valores obtidos nas amostras pré-pasteurização, e serão influenciados pelas condições de obtenção do leite (James, 2015).

Da mesma forma que o teste anterior, a avaliação de CPP pode ser facilmente realizada nas fazendas. As amostras devem ser coletadas semanalmente para a realização da CPP (UFC/mL) na própria fazenda (cultura “on-farm”) ou em um laboratório que presta esse tipo de serviço.

Independentemente do método, o controle da eficiência do processo de pasteurização deve ser realizado semanalmente para que, em caso de resultados de não conformidade, medidas corretivas e preventivas sejam tomadas rapidamente, para reduzir o impacto negativo sobre a saúde e desempenho dos animais.

2.3. Efeitos sobre o consumo e desempenho

Os efeitos da utilização de LD sobre os parâmetros de consumo, desempenho e saúde de bezerros começou a ser alvo de pesquisas na década de 70. Acreditava-se que fatores como a elevada contaminação bacteriana, desbalanço nutricional e presença de resíduo de antimicrobianos no LD influenciariam esses parâmetros. Entretanto, a literatura científica apresentava resultados controversos (Chardavoyne et al., 1979; Wray et al., 1990; Selim e Cullor, 1997) e durante muitos anos, o risco sanitário associado à utilização do LD na dieta dos bezerros foi questionado. Diante desse desafio, processos como acidificação e pasteurização começaram a ser utilizados, com o objetivo de controlar a contaminação microbiana do leite.

Um dos primeiros trabalhos científicos que avaliou a utilização de LDP no aleitamento de bezerros foi realizado por Godden et al. (2005). Foram utilizados 438 bezerros, distribuídos em dois tratamentos: controle: sucedâneo (n = 215) com 20% de proteína bruta (PB) e 20% gordura, e grupo tratado: LDP (n = 223; pasteurização lenta). Os grupos receberam o mesmo volume de dieta líquida em duas refeições diárias (1,9; 2,4 e 2,8 L/refeição) de acordo com a temperatura do ambiente. O grupo LDP comparado ao controle apresentou maior peso ao desaleitamento (66,8 contra 60,8 kg), maior ganho de peso (0,47 contra 0,35 kg/d) e menor idade ao desaleitamento (46,1 contra 47,3 d). Segundo os autores, a diferença observada no desempenho decorreu da menor ocorrência de doenças no grupo LDP e, principalmente, aos

maiores teores de sólidos totais fornecidos, uma vez que o LPD possuía em sua composição colostro e leite de transição. Entretanto, neste trabalho, não foram realizadas análises para composição do leite, o que dificulta o entendimento dos resultados. Além disso, os pesquisadores utilizaram sucedâneo no grupo controle, o que compromete a qualidade da comparação entre os tratamentos realizados.

Diferentemente do estudo anterior, Aust et al. (2012) utilizaram 114 bezerros distribuídos em quatro tratamentos: LD, LDP, LC e LCP. Foram realizadas as pasteurizações rápida e lenta. Os animais receberam 4,5 L de dieta líquida/d, em duas refeições, durante o período de 3 a 56 dias de idade. A partir do primeiro dia de idade os animais receberam feno e somente a partir do oitavo dia receberam concentrado peletizado (16,8 %PB e 4,5% GOR). Não foram observadas diferenças entre os tratamentos para as seguintes variáveis: consumo de dieta líquida total; consumo total de concentrado; ganho de peso 0 a 14 dias, 15 a 28 dias e de 29 a 56 dias. Segundo os autores, a ausência de diferença estatística observada no trabalho possivelmente se deve à intensa higienização das instalações, o que reduziu o desafio de contaminação dos animais e a contaminação do leite pós-pasteurização (baldes de alimentação), o que, possivelmente, “mascarou” as vantagens do processo.

Zou et al. (2017) avaliaram a utilização de LC, LD e LDP no aleitamento de bezerros de 2 a 21 dias de idade. O LD foi com pasteurização rápida. Os animais receberam 6, 7 e 8 L de leite/d (2 a 8; 9 a 15 e 16 a 21 dias, respectivamente). Os animais do grupo LD e LDP apresentaram maior ganho de peso médio diário (525 e 454 g/d; respectivamente), comparado ao grupo LC (258 g/d). Em relação ao consumo de concentrado, os animais do grupo LC apresentaram consumo semelhante ao grupo LDP, entretanto superiores aos observados no grupo LD. Segundo os autores, o maior ganho de peso observado no grupo LD e LDP foi devido aos elevados teores de gordura e à redução da carga microbiana do leite, respectivamente. Entretanto, cabe ressaltar que nesse estudo não foram observadas alterações no escore de diarreia e no número de animais com diarreia entre os tratamentos.

Vieira et al. (2021) avaliaram os efeitos da utilização de LC, LD e LDP (n = 15 animais/tratamento). Os animais receberam 6L de leite/d dos 4 aos 60 dias de idade. O grupo LC apresentou maior consumo de MS de leite (772,3 g/MS/d), seguido do LD (764,2 g/MS/d) e LDP (740,8 g/MS/d). Entretanto, não foram observadas diferenças entre os grupos LC, LD e LDP no consumo de concentrado e na ingestão de MS total. Também não foram observadas diferenças para ganho de peso; circunferência torácica; altura de cernelha; altura do quadril e

largura do quadril entre os grupos. Neste estudo, para compensar as diferenças observadas no consumo de MS total de leite, os animais aumentaram o consumo de concentrado para atender as exigências nutricionais.

As diferenças no delineamento experimental dos trabalhos científicos dificultam as conclusões acerca da utilização de LD e LDP no desempenho e saúde dos animais. De forma geral, a literatura científica ainda apresenta resultados controversos. Ao se tratar de LD, tais achados, possivelmente, se devem à maior concentração de sólidos totais devido à contribuição de colostro e/ou leite de transição. Isso resultaria em melhores desempenhos e na saúde, “mascarando” os efeitos deletérios da contaminação microbiana e pela presença de resíduos de antimicrobianos. Já em relação ao LDP, problemas na eficiência do processo de pasteurização e efeitos sobre os constituintes lácteos são fatores que poderiam mascarar os efeitos benéficos sobre o desempenho e saúde dos animais.

2.4. Efeitos no microbioma do trato gastrointestinal

Durante muitos anos, acreditou-se que o estabelecimento da microbiota do TGI iniciava-se a partir do parto, através do contato do bezerro com o canal vaginal, fezes, pele e saliva da mãe, ambiente e ao ingerir o colostro. Entretanto, pesquisas recentes detectaram a presença de bactérias metanogênicas e fibrolíticas no rúmen e fezes de bezerros menos de 20 minutos após seu nascimento, sugerindo que o estabelecimento se dá antes mesmo da ocorrência do parto (Guzman et al., 2015; Malmuthuge et al., 2015). Além disso, sabe-se que fatores como dieta, idade, estação do ano e região geográfica podem influenciar no estabelecimento e composição da microbiota do TGI do recém-nascido (Malmuthuge et al., 2015).

Estudos científicos concentraram-se em avaliar a microbiota do TGI do rúmen, por ser responsável pela produção de ácidos graxos voláteis (AGV) e proteína microbiana (Khan et al., 2011), essenciais para o metabolismo dos ruminantes. Após o nascimento, nos primeiros três dias de vida do bezerro, o filo Proteobactéria é o mais abundante no rúmen (Jiao et al., 2015). As Proteobactérias são bactérias aeróbias, responsáveis por utilizar o oxigênio presente no rúmen e criar condições adequadas para o estabelecimento de comunidades anaeróbias (Cheng et al., 1979). Com concentrações mais baixas de oxigênio no rúmen, observa-se redução na abundância de Proteobactérias e aumento de Firmicutes e Bacteroidetes (Jiao et al., 2015). Por volta da primeira e segunda semana de idade, as bactérias e fungos celulolíticos já podem ser encontrados no rúmen (Fonty et al., 1987), enquanto os protozoários ciliados, da segunda para a terceira semana (Fonty et al., 1988).

Com o avançar da idade dos bezerros e o aumento progressivo no consumo de concentrado, observa-se elevada proliferação, diversidade e riqueza de bactérias no rúmen (Malmuthuge et al., 2014). Entretanto, após o desaleitamento, observa-se redução acentuada na diversidade microbiana devido às mudanças repentinas no ambiente ruminal (Meale et al., 2016). Acredita-se que a microbiota ruminal só se estabiliza por volta de seis meses de idade (Jami et al., 2013; Meale et al., 2017).

Quanto ao intestino, a natureza e abundância da microbiota são fundamentais, uma vez que sintetizam moléculas imunogênicas que estimulam o desenvolvimento de mecanismos de defesa dos animais (YáñezRuiz et al., 2015). Inicialmente, os estudos que avaliaram a microbiota intestinal em bezerros se concentraram na microbiota das fezes, tratando-a como sendo representativa do intestino grosso. Nestes estudos, os principais filos encontrados foram os Bacteroidetes, Proteobactérias e Firmicutes (Oikonomou et al., 2013; Meale et al., 2016). Malmuthuge et al. (2014) avaliaram a microbiota de secções do TGI (rúmen, jejuno, íleo, ceco e cólon) em bezerros na fase de aleitamento. Os pesquisadores observaram variações nas diferentes secções avaliadas, mas de forma geral, encontraram elevada abundância de Bacteroidetes no intestino grosso e Firmicutes no intestino delgado.

Com o avanço nas tecnologias para avaliação do microbioma do TGI, a identificação de potenciais fatores que poderiam de certa forma interferir na microbiota passaram a ser alvo de estudos científicos. A pasteurização do LD é responsável por eliminar bactérias patogênicas (Stabel et al., 2004) e reduzir significativamente a carga bacteriana total (Ruzante et al., 2008), entretanto, também é capaz de eliminar bactérias benéficas, importantes na maturidade e manutenção da função do TGI, além de auxiliar o organismo na prevenção contra a colonização por agentes patogênicos.

Diante disso, experimento conduzido por Edrington et al. (2012) avaliou o efeito isolado da carga microbiana sobre a diversidade de bactérias e a população de *Salmonella spp.* nas fezes de bezerros alimentados com LD e LDP. Para isso, foram coletadas amostras de fezes na 1ª e 2ª semanas de idade, e no 1º, 2º, 4º e 6º mês para sequenciamento microbiano. O grupo LDP apresentou maior diversidade bacteriana em todos os períodos de avaliação, exceto na primeira semana. Entretanto, segundo esses pesquisadores, essa maior diversidade não era esperada, mas poderia estar relacionada à contaminação pós-pasteurização, comum quando se trabalha com esse processo (Ruzante et al., 2008). Aos seis meses de idade, os animais do grupo LDP apresentaram microbioma mais estável (população bacteriana semelhante) comparado ao LD.

Foi observada a presença de *Salmonella* spp. somente na primeira semana de idade dos bezerros do grupo LD, o que indica maior risco de ocorrência de doença durante esse período e a importância da pasteurização.

Quanto aos resíduos de antimicrobianos, Pereira et al. (2016) avaliaram o efeito isolado da utilização de leite contendo baixa concentração de antimicrobianos sobre o microbioma do TGI de bezerros. Para isso, foram utilizados 30 bezerros distribuídos em dois grupos: controle (CON- receberam leite comercializável) e tratado (TRA- leite comercializável com adição de baixas concentrações de ceftiofur- 0.1 µg/ml, penicilinas- 0.005 µg/ml, ampicilinas- 0.01 µg/ml e oxitetraciclina- 0.3 µg/ml), antimicrobianos encontrados por Pereira et al. (2014b) em fazendas de Nova York. Os animais receberam 3,8 litros de leite/dia durante seis semanas. Do sétimo ao 42º dia de idade os bezerros receberam concentrado peletizado (18% PB e 3% GOR). Amostras de fezes foram coletadas semanalmente para realização do sequenciamento bacteriano.

Os principais filos encontrados nas amostras foram: Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobactéria, Verrucomicrobia e Tenericutes. Não foram observadas diferenças entre os grupos na abundância relativa de bactérias, índice de riqueza Chao 1 e Shannon. Os pesquisadores observaram menor abundância para o gênero *Streptococcus* spp. (CON = 0,02 e TRA = 0,004; $P = 0,004$) e *Clostridium* spp. (CON = 0,008 e TRA = 0,004; $P = 0,03$) no grupo TRA. A concentração dos antimicrobianos utilizados foi padronizada de acordo com o padrão proposto pelo FDA dos EUA. Possivelmente, a concentração utilizada, inferior ao praticado nas fazendas, não foi suficiente para provocar efeitos expressivos sobre o microbioma fecal.

Embora grande parte dos trabalhos científicos tenha avaliado os efeitos da utilização de LD e LDP sobre o microbioma de bezerros pelas fezes, sua utilização tem sido questionada (Dias et al., 2018), uma vez que, a capacidade de avaliação dos efeitos do tratamento sobre o microbioma específico de porções anteriores do TGI é perdida.

Diante deste questionamento, Deng et al. (2017) avaliaram a utilização de LC, LD e LDP sobre o microbioma do conteúdo do rúmen, ceco, colón e fezes. Os pesquisadores utilizaram 84 bezerros, avaliados durante 42 dias. Os animais foram distribuídos igualmente nos tratamentos e receberam 5,6 litros de leite/dia, em duas refeições. Foi fornecido concentrado peletizado (19,9 % PB e 2,4% GOR) a partir do quarto dia de vida dos animais. Três bezerros/tratamento foram eutanasiados aos 21 dias de idade para amostragem do conteúdo do rúmen, ceco, colón e fezes, para realização do sequenciamento microbiano.

Nas amostras de rúmen, os grupos LD e LDP apresentaram maior abundância relativa de bactérias, comparado ao LC ($P < 0,05$). Entretanto, não foram observadas diferenças no índice de riqueza Chao 1 e Shannon. Independentemente do grupo de tratamento, os filos Bacteroidetes, Firmicutes e Proteobactéria foram os predominantes. Os gêneros *Fibrobacter*, *Megasphaera* e *Mitsuokella* foram observados em menor abundância no grupo LD, enquanto o grupo LDP apresentou menor abundância de *Fibrobacter* e *Mitsuokella* e o grupo LD apresentou maior abundância de *Oscillospira*, em comparação ao grupo LC.

Segundo esses pesquisadores, a ausência de antimicrobianos no grupo LC permitiu maior abundância do gênero *Fibrobacter*. As bactérias desse gênero são responsáveis por degradar a fibra e polissacarídeos da dieta, o que pode resultar em aumentos na concentração de ácidos graxos voláteis (AGV) no rúmen, enquanto no grupo LD, a abundância de *Oscillospira* foi relacionada à presença de bactérias patogênicas no leite. Entretanto, essas bactérias são capazes de utilizar o glicerol e têm sido associadas com maior produção de propionato e butirato no rúmen, o que poderia ser benéfico ao se tratar de desenvolvimento desse órgão.

Ainda neste trabalho, não foram observadas diferenças na abundância relativa de bactérias, índice de riqueza Chao 1 e Shannon do conteúdo cecal entre os grupos. Os filos predominantes no grupo LD e LDP foram os Bacteroidetes e Firmicutes, enquanto no grupo LC, Fusobactéria. Na avaliação de gênero, *Prevotella* apresentou maior predominância no grupo LD e LDP, enquanto no grupo LC o gênero mais predominante foi *Fusobacterium*. O grupo LDP apresentou maior abundância de *Ruminococcus*, *Megamonas* e *Oxalobacter*. Certos membros dos *Ruminococcus* são responsáveis por produzir ácidos graxos de cadeia curta, importante fonte de energia para os ruminantes. Além disso, o gênero *Oxalobacter* possui importante ação simbiótica com o hospedeiro, uma vez que regula a homeostase do ácido oxálico.

No cólon, não foram observadas diferenças na abundância relativa de bactérias, índice de riqueza Chao 1 e Shannon entre os grupos. Os Bacteroidetes e Firmicutes foram os filos predominantes no grupo LD e LDP, enquanto Proteobactéria no grupo LC. No grupo LDP, foi observado predomínio dos gêneros *Prevotella*, *Faecalibacterium* e *Bacteroides*, enquanto no grupo LC, *Prevotella*, *Fusobacterium* e *Bacteroides*; e no grupo LD *Prevotella* foram os predominantes. O grupo LD apresentou maior abundância de *Odoribacter* e *Prevotella* comparado ao grupo LC e LDP.

Como no ceco e cólon, nas amostras de fezes não foram observadas diferenças na abundância relativa de bactérias, índice de riqueza Chao 1 e Shannon entre os grupos. Os Bacteroidetes e Firmicutes foram os filos predominantes nos grupos de tratamento. Semelhante ao observado no cólon, o grupo LDP, apresentou predomínio dos gêneros *Prevotella*, *Bacteroides* e *Faecalibacterium*; o grupo LC, *Prevotella*, *Bacteroides* e *Fusobacterium*; e o grupo LD *Prevotella*. O grupo LD apresentou maior abundância de *Odoribacter* comparado ao grupo LC e LDP.

De forma geral, neste estudo, os pesquisadores observaram aumento de dois filos e 10 gêneros no grupo LD, em comparação ao LC e LDP. Estes filos e gêneros são: Tenericutes, *Clostridium*, *Oscillospira*, *Anaerovibrio* e *Ruminobacter* no rúmen; Bacteroidetes, *Odoribacter* e *Holdemanian* no ceco; *Prevotella*, *Odoribacter*, *Parabacteroides* e *Stenotrophomonas* no cólon. Além das alterações observadas na microbiota das diferentes porções do TGI, os pesquisadores encontraram alterações na expressão de genes relacionados a doenças metabólicas no ceco e nas fezes dos bezerros aleitados com LD. Segundo os pesquisadores, esses resultados não favorecem a utilização de LD nas fazendas leiteiras.

O trabalho de Deng et al. (2017) foi relevante para o entendimento dos efeitos da utilização de LD e LDP em vários compartimentos do TGI, principalmente quando se trabalha com rúmen. Embora o leite se acumule e seja digerido no abomaso devido ao reflexo de goteira esofágica, é possível, e até mesmo comum, que volumes variáveis de leite sejam direcionados para o rúmen, mesmo que em pequenas quantidades. Quando os bezerros são aleitados em baldes contendo bicos, há passagem de leite para o rúmen da ordem de 0 - 20% (Berends et al., 2012 e Ellingsen et al., 2016). Enquanto isso, quando se trabalha com aleitamento em baldes sem bicos esse valor pode ser ainda maior, entre 17 - 35% do volume total de leite ingerido (Suárez et al., 2007, Labussière et al., 2014). Dessa forma, a utilização de LD e LDP poderia influenciar o estabelecimento e desenvolvimento do microbioma do rúmen.

Para melhor compreensão dessa influência, Zhang et al. (2019) avaliaram os efeitos da utilização de LC, LD e SU sobre o microbioma do rúmen. Os pesquisadores utilizaram 54 bezerros (n = 18 animais/tratamento). Os animais receberam volume de leite referente a 12% do peso vivo, divididos em duas refeições diárias. Três animais de cada grupo foram eutanasiados aos 58 d de idade para coleta de amostras de líquido ruminal para análise de microbioma. Bacteroidetes foi o filo predominante entre as amostras (65,61%), seguido por Firmicutes (20,6%), Proteobactéria (9,99%) e Tenericutes (1,20%). O grupo LD apresentou

maior riqueza de bactérias (Chao 1) comparado ao grupo LC ($P = 0,03$). Não foram observadas diferenças entre os grupos na diversidade Shannon. O grupo LD apresentou menor abundância de *Prevotella*, possivelmente devido à presença de antimicrobianos no leite utilizado. Neste trabalho, o baixo número de animais utilizado nas análises de microbioma ($n = 3$), possivelmente dificultou a observação de maiores diferenças entre os grupos.

Diferente do trabalho anterior, Li et al. (2019) tinham como objetivo avaliar os efeitos isolados dos antimicrobianos no microbioma ruminal. Para isso, os pesquisadores utilizaram 20 bezerros Holandês distribuídos em dois grupos: controle (CON) em que os animais receberam sucedâneo de leite e tratado (TRA) em que os animais receberam o mesmo sucedâneo, porém com adição de antimicrobianos (penicilina, estreptomicina, tetraciclina e ceftiofur). A concentração dos antimicrobianos utilizada foi baseada em análise quantitativa de resíduo de antibiótico presente no LD de uma fazenda na região. Os animais receberam 4, 6 e 8 litros de sucedâneo por dia em duas refeições (2 - 5; 6 - 14 e 15 - 35 dias; respectivamente). O concentrado foi fornecido desde o primeiro dia de idade (22,9% PB e 3,5% GOR). Aos 35 dias de idade, 16 bezerros ($n =$ oito/tratamento) foram eutanasiados e cinco amostras/tratamento foram coletadas para avaliação do microbioma.

Ao avaliar a diversidade bacteriana no rúmen, não foram observadas diferenças entre os grupos no índice de diversidade Chao 1 e Shannon. Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobactéria, Synergistetes e Actinobacteria foram os cinco principais filos bacterianos encontrados em ambos os grupos, sem diferença na abundância relativa entre eles. Em relação ao gênero, o grupo TRA apresentou menor abundância de *Prevotella* ($P = 0,036$) e maior de *Acetivomaculum* ($P = 0,046$) comparado ao grupo CON. Segundo os pesquisadores, os resultados observados de *Prevotella* eram esperados, uma vez que, a mesma é sensível à penicilina e tetraciclinas (Falagas e Siakavellas, 2000). Entretanto, o aumento da abundância de *Acetivomaculum* não era esperado, uma vez que são considerados sensíveis aos antimicrobianos utilizados.

A avaliação do microbioma de compartimentos específicos do TGI é fundamental para melhor entendimento dos efeitos do LD e LDP sobre a saúde e desempenho dos animais. Porém, mais estudos que envolvam o tratamento com LC devem ser realizados, a fim de que se compreenda melhor a própria dinâmica natural da população microbiana nesses compartimentos.

Outro fator, complexo, mas que deve ser considerado por pesquisas futuras é a possibilidade de se trabalhar com maior quantidade de animais por tratamento. Muitos estudos

encontraram ausência ou pequena diferença estatística no microbioma entre os tratamentos. A quantidade de animais nos estudos pode ser um viés e deve ser levada em consideração durante a realização do delineamento experimental.

2.5. Efeitos nos parâmetros ruminais

Poucos trabalhos avaliaram os efeitos da utilização de LD contendo resíduo de antimicrobianos sobre os parâmetros ruminais. Sabe-se que pequena quantidade de leite passa para o rúmen, durante o aleitamento dos bezerros (Berends et al., 2012 e Ellingsen et al., 2016). Dessa forma, alterações no microbioma decorrente à presença de resíduos de antimicrobianos poderiam afetar diretamente os parâmetros ruminais.

O primeiro trabalho que avaliou os efeitos da utilização de LD nos parâmetros ruminais foi conduzido por Zhang et al. (2019). Os pesquisadores tinham como objetivo principal entender os efeitos da utilização de antimicrobiano no leite sobre o desenvolvimento ruminal. Um total de 54 bezerros foram distribuídos nos grupos: LC, LD e sucedâneo. Os animais receberam 12% do peso corporal em leite, em duas refeições diárias. Amostras de líquido ruminal foram coletadas aos 60 e 180 dias para avaliação do pH e concentração de amônia e AGV. Aos 60 dias de idade, foram observadas alterações na concentração de AGV total entre os grupos LD, LC e SU (39,2; 40,4 e 62,1 mmol/L, respectivamente), sendo o maior valor observado no grupo sucedâneo. Nesse mesmo período, o grupo LD apresentou maior concentração de isovalerato (3,0%, comparado ao grupo LC e SU (1,6 e 1,4%, respectivamente). A maior concentração desse AGV observada no grupo LD pode ser devido à fermentação do leite com elevada concentração de proteína no rúmen, uma vez que o isovalerato é gerado a partir da leucina. Aos 180 dias, o grupo LD e LC apresentaram concentrações de propionato semelhantes (25,5 e 25,4%, respectivamente), e superiores ao observado no sucedâneo (19,1%).

Diferente do estudo anterior, Li et al. (2019) avaliaram os parâmetros ruminais em bezerros mais jovens, aos 15, 25 e 35 dias de idade, aleitados com sucedâneo sem antimicrobianos (controle) e sucedâneo com adição de penicilina, estreptomicina, tetraciclina e ceftiofur (sucedâneo + antimicrobiano). Não foram observadas diferenças entre os tratamentos no pH, concentração de ácido propiônico, butírico, isovalérico, valérico, concentração total de AGV e amônia. Foi observada diferença entre os grupos apenas na concentração de ácido acético, tendo sido maior no grupo sucedâneo + antimicrobiano em relação ao controle (33,7 e 24,8, respectivamente). Segundo os autores, a alta concentração de ácido acético pode estar

relacionada com a presença de penicilina no sucedâneo, que tem demonstrado aumentar a concentração em condição de anaerobiose (Xiong et al., 2017). Em relação aos diferentes tempos de coleta, na medida que a idade dos animais avançou observou-se aumento de todos os AGV avaliados, condizente com o aumento no consumo de alimentos sólidos durante essa fase (Robinson et al., 1986).

Vieira et al. (2021) avaliaram os efeitos da de LC, LD e LDP sobre os parâmetros ruminiais de bezerros leiteiros. Amostras de líquido ruminal foram coletadas de todos os animais (n = 15/tratamento), semanalmente, dos 4 aos 60 dias de idade. Os autores não observaram alterações entre os grupos nos valores de pH), amônia e butirato. Entretanto, o grupo LDP apresentou maior concentração de acetato (38,4) e propionato (26,2) comparado aos grupos LC (33,0 e 21,6; respectivamente) e LD (32,8 e 21,2; respectivamente).

2.6.Efeitos na digestibilidade dos nutrientes

Poucos trabalhos avaliaram os efeitos da utilização de leite com resíduo de antimicrobianos sobre a digestibilidade de nutrientes. Contudo, o avanço da utilização de técnicas de sequenciamento microbiano permitiu melhor entendimento dos efeitos do LD sobre o microbioma do TGI, e com isso, trouxe a hipótese de que alterações no microbioma poderiam influenciar a digestão dos nutrientes pelos animais (Dennis et al., 2019).

Os efeitos de antimicrobianos presentes no sucedâneo (neomicina e oxitetraciclina) sobre a digestibilidade dos nutrientes foram estudados por Dennis et al. (2019). Foram utilizados 32 bezerros, distribuídos em dois grupos de: Controle (sucedâneo de 25% PB e 18% GOR) e grupo tratado (sucedâneo com adição de neomicina-oxitetraciclina na dose de 1,4 g/kg). Durante o período de aleitamento, os animais receberam 0,66 kg de MS/d de sucedâneo de 3 a 39 dias, duas vezes ao dia e 0,33 kg de 40 a 43 dias, uma vez ao dia. Foi fornecido concentrado texturizado desde o primeiro dia de idade (20% PB). Após o desaleitamento, cinco bezerros/tratamento foram utilizados para a realização do ensaio de digestibilidade. Não foram observadas diferenças na ingestão de MS entre os grupos, nem na digestibilidade de PB, amido e da gordura. Entretanto, foi possível observar diferença entre os grupos controle e o sucedâneo + antimicrobiano para digestibilidade da MS (74,4 e 71,3%); MO (76,2 e 72,8%); FDA (20,6 e 8,2%) e FDN (27,9 e 16,9%), respectivamente. Segundo os pesquisadores, os resultados encontrados, possivelmente, se devem à ação dos antimicrobianos sobre a microbiota do TGI,

principalmente no rúmen. Sabe-se que o filo Bacteroidetes é o mais susceptível quando se utiliza LD contendo resíduo de antimicrobianos (Li et al., 2017). Segundo Rey et al. (2014) cerca de 50% da abundância de filios bacterianos no microbioma do rúmen tem como origem os Bacteroidetes. Muitas espécies de bactérias presentes neste filo utilizam carboidratos complexos e celulose como substrato, o que poderia explicar os resultados encontrados no estudo de Dennis et al. (2019). Entretanto, nenhum estudo até o presente momento realizou análise de microbioma e digestibilidade em um mesmo experimento, o que de certa forma, dificulta o entendimento dos resultados.

2.7. Efeitos no desenvolvimento do trato gastrointestinal

O desenvolvimento do rúmen ocorre gradualmente, com o consumo progressivo de dieta sólida e estabelecimento da fermentação ruminal, que faz com que o rúmen passe por desenvolvimento físico e metabólico (Baldwin et al., 2004). Para isso é necessário, o estabelecimento do ecossistema microbiano, vascularização do epitélio, muscularização, desenvolvimento das papilas e motilidade do rúmen. Esses fatores podem ser influenciados por: nutrientes fornecidos a partir da dieta líquida, concentrado, volumoso, aditivos alimentar e por manejo alimentar (Diao et al., 2019).

Dessa forma, a presença de resíduo antimicrobianos no leite poderia comprometer o microbioma ruminal e conseqüentemente, seu desenvolvimento. Os chineses foram os pioneiros ao elucidar os efeitos do LD contendo resíduo antimicrobianos no desenvolvimento do TGI de bezerros (Zhang et al., 2019). Nesse trabalho, Zhang et al. (2019) avaliaram os parâmetros de desenvolvimento do TGI de bezerros aleitados com LC, LD e sucedâneo. Em cada tratamento, três animais foram eutanasiados aos 58 dias de idade. Os pré-estômagos foram pesados e expressos em porcentagem de peso corporal do animal. Posteriormente, cada compartimento foi individualizado e pesado, sendo expresso em porcentagem do peso do pré-estômago. Os grupos LC e sucedâneo apresentaram maior peso dos pré-estômagos (2,1 e 2,1%, respectivamente) comparados ao grupo LD (1,2%). Não foram observadas diferenças no peso do retículo e omaso entre os tratamentos. Ao realizar a avaliação do peso do rúmen, o grupo LC e sucedâneo apresentaram valores superiores comparado ao grupo LD (51,8; 55,0 e 42,0%, respectivamente). Entretanto, o oposto foi observado para abomaso, sendo observado maior peso no grupo LD em comparação ao LC e sucedâneo (36,9; 28,4 e 25,5%, respectivamente). Segundo os pesquisadores, o maior consumo de concentrado observado nos grupos LC e sucedâneo possivelmente permitiu o maior desenvolvimento ruminal observado.

Por outro lado, Li et al. (2019) realizaram análises mais específicas para avaliar o desenvolvimento do rúmen. Os autores utilizaram 20 bezerros Holandês distribuídos em dois grupos: controle (sucedâneo) e tratado (sucedâneo + antimicrobianos - penicilina, estreptomicina, tetraciclina e ceftiofur). Os animais receberam 4, 6 e 8 L/d (2 a 5; 6 a 14 e 15 a 35 dias; respectivamente), em duas refeições. O concentrado foi fornecido desde o primeiro dia de idade (22,9% PB e 3,5% gordura). Aos 35 dias de idade, 16 bezerros (oito por tratamento) foram eutanasiados para coleta de amostra do rúmen (saco dorsal e ventral) para realização de histologia. Não foram observadas alterações no comprimento de papila e largura de papila no saco dorsal. Foi observado maior comprimento de papila no saco ventral do grupo sucedâneo + antimicrobiano comparado ao controle (451,2 e 346,5 μm), sem alterações significativas na largura de papila. Segundo os autores, a diferença encontrada no comprimento de papila do saco ventral poderia ser explicada pela concentração de AGV no rúmen dos animais, entretanto, não foram observadas diferenças entre os grupos na concentração total de AGV. A avaliação da concentração de insulina poderia ter auxiliado nesse entendimento, uma vez que, esta pode influenciar na superfície de absorção do epitélio ruminal (Hugi et al., 1997), porém, não foi mensurada neste estudo.

A literatura científica é incipiente ao se tratar de efeitos da utilização de LD sobre a composição corporal e desenvolvimento do TGI de bezerros. De certa forma, as alterações no microbioma do TGI e conseqüentemente no padrão de fermentação pode influenciar estes parâmetros, o que justifica a necessidade de mais trabalhos serem desenvolvidos nessa área.

2.8. Efeitos sobre a resistência antimicrobiana

A resistência antimicrobiana tem sido uma das grandes preocupações mundial, devido aos efeitos adversos na saúde humana e animal (Wernli et al., 2011). A ocorrência de resistência antimicrobiana na produção animal está relacionada principalmente ao uso indiscriminado de antimicrobianos (Singer et al., 2008). No entanto, outros possíveis fatores associados à dieta, manejo e ambiente da fazenda, também têm sido relacionados com a ocorrência de resistência dentro dos rebanhos (Pereira et al., 2014a; Maynou et al., 2017a).

No que se refere à dieta, a utilização de LD contendo resíduos antimicrobianos é alvo de preocupação. Embora as concentrações de antimicrobianos presentes no LD sejam variáveis, o seu uso pode exercer pressão seletiva, favorecendo o surgimento e disseminação de bactérias resistentes na microbiota intestinal de bezerros. Desde a década de 80 a 90, pesquisadores têm buscado entender melhor os efeitos da utilização de LD sobre a ocorrência de bactérias

resistentes na criação de bezerros (Wray et al., 1990). Em estudo pioneiro, Wray et al. (1990) não observaram aumento da resistência à estreptomicina em isolados de *E. coli* fecal em bezerros que receberam LD comparado à utilização de sucedâneo. Entretanto, o baixo número de animais utilizados no estudo dificulta a avaliação e o entendimento dos dados.

Desde então, uma série de pesquisas foram realizadas em para determinar os efeitos da utilização de leite contendo resíduo de antimicrobianos na alimentação de bezerros sobre a ocorrência de resistência antimicrobiana a curto, médio e a longo prazo. Maynou et al. (2017a) avaliaram a ocorrência de resistência antimicrobiana à *E. coli* fecal em oito fazendas comerciais na região de Girona, Espanha. Do total, quatro fazendas utilizavam apenas sucedâneo e as outras quatro utilizavam LD. Em cada fazenda, foram coletadas amostras de fezes de 20 ± 5 bezerras com $42 \pm 3,2$ dias de idade. Todos os animais tratados com antimicrobianos injetáveis foram excluídos do estudo. Amostras de fezes de 10 ± 3 bezerras com $1,3 \pm 0,1$ anos e que não tinham sido tratadas com antimicrobianos durante todo este período também foram coletadas. Além disso, para avaliar a aquisição de bactérias resistentes de outras fontes, foram coletadas amostras de fezes das vacas no momento do parto, de 5 ± 1 bezerras no nascimento e na sexta semana de idade e do ambiente (local do parto, local de alojamento das bezerras e área em que as bezerras se alimentam). Para avaliar a susceptibilidade a *E. coli*, foi realizado o teste de difusão em disco utilizando os antimicrobianos: amoxicilina + clavulanato (AMO), ceftiofur (CEF), colistina (COL), doxiciclina (DOX), enrofloxacino (ENR), eritromicina (ERI), florfenicol (FLO), imipeném (IMI) e estreptomicina (EST). Independentemente do tratamento, nenhum isolado de *E. coli* fecal foi resistente ao IMI. Não houve diferença entre os tratamentos ao avaliar *E. coli* resistente a ERI (91,1 e 90,2%, respectivamente), DOX (45,4 e 45,2%, respectivamente), AMO (1,7 e 1,1%, respectivamente), CEF (0,8 e 2,7%, respectivamente) e COL (8,0 e 6,0%, respectivamente). Por outro lado, o grupo LD apresentou maior prevalência de *E. coli* fecal resistente a ENR (26,6 e 5,6%, respectivamente), FLO (39,4 e 8,9%, respectivamente) e EST (73,5 e 40,5%, respectivamente), comparado ao grupo sucedâneo. Dois destes antimicrobianos eram comumente utilizados nas propriedades para tratamento de afecções como mastite, diarreias e pneumonias. Entretanto, o FLO era utilizado em apenas uma fazenda do estudo, e de certa forma, não era esperado o aparecimento de resistência nas outras fazendas. Entretanto, segundo Gow et al. (2008), o uso de um antimicrobiano específico pode selecionar bactérias resistentes a outros antimicrobianos dentro de uma população bacteriana pela disseminação horizontal de resistência, usando elementos genéticos, como os plasmídeos.

No trabalho de Maynou et al. (2017a), do nascimento à sexta semana de idade, não foram encontradas amostras de *E.coli* fecal resistentes a AMO, CEF, COL, FLO e ERI. Entretanto, a prevalência de *E.coli* fecal resistente a ENR e aumentou de 0 a 6 semanas e para EST, foi observada redução de 0 a 6 semanas. Não houve interação entre os tratamentos e idade dos bezerros ($1,3 \pm 0,1$ anos) para qualquer um dos agentes antimicrobianos testados. Das amostras de *E. coli*, 48 amostras resistentes foram isoladas das vacas e dos bezerros ao nascimento, dos quais 81,3% apresentaram resistência a DOX, ERI e EST. Foram isoladas 472 amostras do ambiente e das fezes de bezerros do nascimento à sexta semana. Deste total, 43,4% apresentaram resistência a ERI, e 17,9% apresentaram resistência a DOX. A transmissão de bactérias resistentes também pode ocorrer da vaca para bezerro no momento do parto (Watson et al., 2012), do ambiente de criação e do alimento utilizado (Sayah et al., 2005; Novais et al., 2013). Entretanto, isso não foi observado no presente estudo, uma vez que, não foi observado padrão de resistência entre isolados de *E.coli*. Possivelmente, o baixo número de amostras utilizado no estudo, dificultou a observação dessa associação esperada.

Em outro estudo, sob condições experimentais mais controladas, Maynou et al. (2017b) avaliaram a ocorrência de resistência a antimicrobianos de bezerros alimentados com sucedâneo (n = 26) e LDP (n = 26). Amostras de fezes foram coletadas diretamente do reto, com auxílio de swab, aos 3, 35 e aos 56 dias de idade. Para o teste de susceptibilidade (disco de antibiograma) foram utilizados 12 diferentes bases, dentre elas: ampicilina (AMP), cefalotina (CEFA), CEF, ENR, FLO, penicilina (PEN), pirlimicina (PIR), trimetoprim (TRI), IMI, EST, ERI e tetraciclina (TET). Ao longo do estudo, todos os animais tratados com antimicrobianos injetáveis foram excluídos do experimento. Um total de 178 colônias de *E. coli* foram isoladas, sendo 28 isolados dos animais com 3 dias (sucedâneo = 12 e LPD = 16), 75 isolados aos 35 dias (sucedâneo = 30 e LPD = 45) e 75 isolados aos 56 dias (Sucedâneo = 30 e LPD = 45). Independentemente do tratamento, grande parte dos isolados de *E.coli* apresentaram resistência à ERI (98,9%), PEN (100%) e PIR (99,4%). Segundo os autores, esses resultados se devem ao espectro de atividade destes antimicrobianos. Os antimicrobianos pertencentes às classes de lincosamida e macrolídeos são ativos contra bactérias Gram-positivas e têm pouco efeito inibitório contra isolados da família *Enterobacteriaceae* (ex: *E.coli*).

Porém, Maynou et al. (2017b) observaram resistência para ENR e IMI. O grupo LDP apresentou maior porcentagem de *E.coli* resistente ao CEF e FLO (42,2 e 21,5%, respectivamente) comparado ao grupo sucedâneo (3,0 e 8,7%, respectivamente). Essa maior resistência observada no grupo LDP era esperada, uma vez que os antimicrobianos pertencentes

à família dos β -lactâmicos eram comumente utilizados no tratamento de vacas com mastite e outras doenças no rebanho. Curiosamente, o FLO não foi utilizado no tratamento de afecções no rebanho, portanto não estava presente no LDP, sendo sua presença oriunda de uma possível co-seleção de resistência. Não foram observadas diferenças entre os tratamentos SU e LDP ao comparar a prevalência de *E. coli* resistente a AMP e CEFA. Ao considerar o efeito apenas de idade, a prevalência de *E. coli* resistente a CEF aumentou de 0 a 35 dias e reduziu de 35 a 56 dias (3,0; 47,6; 10,8%, respectivamente). Para FLO, a maior prevalência foi observada com 35 e 56 dias, comparado ao 0 (26,8 e 3,1%, respectivamente), enquanto para TET e EST, a prevalência aumentou de 0 para 35 e 56 dias (TET- 52,5; 74,5 e 86,9% e EST - 34,0; 64,1 e 55,7%, respectivamente). Neste trabalho, a utilização de animais de três diferentes fazendas comerciais pode ter interferido nos resultados observados, uma vez que a ocorrência de resistência pode estar relacionada ao fator ambiental.

Em um trabalho maior, em 15 rebanhos, Foutz et al. (2018) avaliaram os efeitos da utilização de LDP (n = 5), sucedâneo com antimicrobiano (n = 5) e sucedâneo (n = 5) na resistência antimicrobiana em bezerros leiteiros. Para isso, os autores coletaram fezes de 25 bezerros/tratamento (cinco bezerros/fazenda) no aleitamento, na 1^a, 3^a e 5^a semana de idade, e no pós-desaleitamento, na 16^a de idade. Isolados de *E. coli* das fezes foram avaliados para resistência a oito bases de antimicrobianos: AMP, CEF, ENR, FLO, gentamicina (GEN), oxitetraciclina (OXI), sulfadimetoxina (SUL) e trimetoprima (TRI). Grande parte dos isolados de *E. coli* (70%) foram resistentes à SUL e 44% para FLO. Apenas 33, 27, 18 e 0,7% dos isolados de *E. coli* foram resistentes a TRI, CEF, GEN e ENR, respectivamente. Todos os isolados foram susceptíveis ou tiveram suscetibilidade intermediária à AMP e OXI. Na 1^a e 3^a semana de idade dos bezerros foi observado elevado escore de resistência antimicrobiana de *E. coli* fecal do grupo sucedâneo + antimicrobiano e LDP. Na quinta semana, o escore de resistência foi maior para bezerros do grupo sucedâneo + antimicrobiano, seguido por LDP e sucedâneo. Entretanto, na semana de avaliação após o desaleitamento, não houve diferença no escore de resistência entre os grupos avaliados. Como esperado, após o desaleitamento, a exposição aos antimicrobianos comumente presentes na dieta líquida é menor, e reduz a pressão de seleção de bactérias resistentes no trato gastrointestinal.

A grande variabilidade dos resultados dos estudos incluídos nesta revisão pode ser explicada por uma variedade de fatores, como: delineamento experimental, número de animais avaliados, período de amostragem, condição de coleta de amostras e eficiência da pasteurização. Além disso, a composição do LD e LDP em relação ao aspecto nutricional e

presença de antimicrobianos é um fator complicador adicional que deve ser levado em consideração.

Embora mudanças no microbioma dos bezerros tenham sido comumente relatadas após a utilização de dieta líquida contendo resíduos de antimicrobianos, não é possível afirmar se essas mudanças na diversidade resultam em efeitos positivos ou negativos na saúde e desempenho dos bezerros. A utilização de LD contendo resíduos de antimicrobianos na dieta líquida de bezerros é responsável por aumentar a excreção de bactérias resistentes. Entretanto, tal excreção parece ser de curta duração e transitória. A pasteurização do LD não interfere significativamente na qualidade nutricional e na eliminação de antimicrobianos presentes no leite. Entretanto, é capaz de eliminar bactérias patogênicas como *Mycobacterium avium subesp. Paratuberculose*, *Salmonella spp.* e *Mycoplasma spp.*, sendo fundamental no controle de tais afecções nos rebanhos.

2.9. Referências bibliográficas

- ANDERSSON, I.; OSTE, R. Nutritional quality of pasteurized milk. Vitamin B12, folate and ascorbic acid content during storage. *Int. Dairy J.*, v.4, p.161-172, 1994.
- AULDIST, M.J.; HUBBLE, I.B. Effects of mastitis on raw milk and dairy products. *Australian. Int. J. Dairy Technol.*, v.53, p.28-36, 1998.
- AULDIST, M.J. et al. Changes in the composition of milk from healthy and mastitic dairy cows during the lactation cycle. *Aust. J. Exp. Agric.*, v.35, p.427-436, 1995.
- AUST, V.K. et al. Feeding untreated and pasteurized waste milk and bulk milk to calves: Effects on calf performance, health status and antibiotic resistance of fecal bacteria. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, v.97, p.1091-1103, 2013.
- AZZARA, C.D.; DIMICK, P.S. Lipoprotein lipase activity of milk from cows with prolonged subclinical mastitis. *J. Dairy Sci.*, v.68, p.3171-3175, 1985.
- BALDWIN, R.L. et al. Rumen development, intestinal growth and hepatic metabolism in the pre- and postweaning ruminant. *J. Dairy Sci.*, v.87, p.55-65, 2004.
- BELYEA, R.L.; ADAMS, M.W. Energy and nitrogen utilization of high versus low producing dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.73, p.1023-1030, 1990.
- BENDICHO, S. et al. Effect of high intensity pulsed electric fields and heat treatments on vitamins of milk. *J. Dairy Res.*, v.69, p.113-123, 2002.

BERENDS, H. et al. Effects of early rumen development and solid feed composition on growth performance and abomasal health in veal calves. *J. Dairy Sci.*, v.95, p.3190-3199, 2012.

BORAD, S.G.; KUMAR, A.; SINGH, A.K. Effect of processing on nutritive values of milk protein. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v.57, p.3690-3702, 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento- MAPA. Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal- PNCR. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 02 de março de 2020.

BRUCKMAIER, R.M.; ONTSOUKA, O.E.; BLUM, J.W. Fractionized milk composition in dairy cows with subclinical mastitis. *Vet. Med.*, v.8, p.283-290, 2004.

BRUNTON, L.A. et al. A survey of antimicrobial usage on dairy farms and waste milk feeding practices in England and Wales. *Vet. Rec.*, v.171, p.296-302, 2012.

BUTLER, J.A. et al. Pasteurization of discard mycoplasma mastitic milk used to feed calves: Thermal effects on various mycoplasma. *J. Dairy Sci.*, v.83, p.2285-2288, 2000.

CAPPOZZO, J.C.; KOUTCHMA, T.; BARNES, G. Chemical characterization of milk after treatment with thermal (HTST and UHT) and nonthermal (turbulent flow ultraviolet) processing technologies. *J. Dairy Sci.*, v.98, p.5068-5079, 2015.

CHARDAVOYNE, J.R. et al. Waste milk from antibiotic treated cows as feed for young calves. *J. Dairy Sci.*, v.62, p.1285-1289, 1979.

CHENG, K.J.; MCCOWAN, R.P.; COSTERTON, J.W. Adherent epithelial bacteria in ruminants and their roles in digestive tract function. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.32, p.139-148, 1979.

CHUGH, A. et al. Change in color and volatile composition of skim milk processed with pulsed electric field and microfiltration treatments or heat pasteurization. *Foods.*, v.3, p.250-268, 2014.

DAVIDSON, P.; ROTH, L.; GAMBREL-LENARZ, S. Coliform and other indicator bacteria. In *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. 17th ed. H. M. Wehr and J. F. Frank, ed. American Public Health Association, Washington, DC, p.187-226, 2004.

DENG, Y.F. et al. Influence of dairy by-product waste milk on the microbiomes of different gastrointestinal tract components in pre-weaned dairy calves. *Sci Rep.*, v.7, p.1-13, 2017.

DENNIS, T.S. et al. Effects of milk replacer feeding rate and long-term antibiotic inclusion in milk replacer on performance and nutrient digestibility of Holstein dairy calves up to 4 months of age. *J. Dairy Sci.*, v.102, p.2094-2102, 2019.

DIAO, Q.; ZHANG, R. FU, T. Review of strategies to promote rumen development in calves. *Animals.*, v.9, p.490, 2019.

- DIAS, J. et al. Bacterial community dynamics across the gastrointestinal tracts of dairy calves during preweaning development. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.84, p.2617-2675, 2018.
- DUSE, A et al. Farming practices in Sweden related to feeding milk and colostrum from cows treated with antimicrobials to dairy calves. *Acta Vet. Scand.* v.55, p.49-57, 2013.
- EDRINGTON, T.S. et al. Age and diet effects on fecal populations and antibiotic resistance of a multi-drug resistant *Escherichia coli* in dairy calves. *Agric. Food Anal. Bacteriol.*, v.2, p.162-174, 2012.
- ELIZONDO-SALAZAR, J.A.; JONES, C.M.; HEINRICHS, A.J. Evaluation of calf milk pasteurization systems on 6 Pennsylvania dairy farms. *J. Dairy Sci.*, v.93, p.5509-5513, 2010.
- ELLINGSEN, K. et al. The effect of large milk meals on digestive physiology and behaviour in dairy calves. *Physiol. Behav.*, v.154, p.169-174, 2016.
- FALAGAS, M.E.; SIAKAVELLAS, E. *Bacteroides*, *Prevotella*, and *Porphyromonas* species: A review of antibiotic resistance and therapeutic options. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, v.15, p.1-9, 2000.
- FDA (Food and Drug Administration). US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Rockville, MD.
- FINOT, P.A. effects of processing and storage on the nutritional value of food proteins. In: food proteins and their applications, pp. 551-577. Damodaran, S. and Paraf, A., Eds., Marcel Dekker, New York, 1997.
- FONTY, G. Establishment of ciliate protozoa in the rumen of conventional and conventionalized lambs: Influence of diet and management conditions. *Can. J. Microbiol.*, v.34, p.235-241, 1988.
- FONTY, G. Establishment of the microflora and anaerobic fungi in the rumen of lambs. *J. Gen. Microbiol.*, v.133, p.1835-1843, 1987.
- FOUTZ, C.A. et al. Exposure to antimicrobials through the milk diet or systemic therapy is associated with a transient increase in antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* of dairy calves. *J. Dairy Sci.*, v.101, p.10126-10141, 2018.
- FOX, P. F. Lactose: chemistry and properties. In: McSweeney PLH, Fox PF (eds) Advanced dairy chemistry, volume 3: lactose, water, salts and minor constituents. Springer, New York, 2009b.
- FOX, P.F.; KELLY, A.L. Indigenous enzymes in milk: overview and historical aspects- Part 2. *Int. Dairy J.*, v.16, p.517-532, 2006.

- GANDY, A.L. et al. The effect of pasteurization temperature on consumer acceptability, sensory characteristics, volatile compound composition, and shelf-life of fluid milk. *J. Dairy Sci.*, v.91, p.1769-1777, 2008.
- GARZON, A. et al. Evaluation of heat and pH treatments on degradation of ceftiofur in whole milk. *Frontiers in veterinary science.*, v.7, p.288, 2020.
- GLEESON, D.; O'CONNELL, A.; JORDAN, K. Review of potential sources and control of thermotolerant bacteria in bulk-tank milk. *Ir. J. Agric. Food Res.*, v.52, p.217-227, 2013.
- GODDEN, S.M. et al. Economic analysis of feeding pasteurized nonsaleable milk versus conventional milk replacer to dairy calves. *J Am Vet Med Assoc.*, v.226, p.1547-54, 2005.
- GOW, S.P. et al. Associations between antimicrobial resistance genes in fecal generic *Escherichia coli* isolates from cow-calf herds in western Canada. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.74, p.3658-3666, 2008.
- GRANT, I.R.; BALL, H.J.; ROWE, M.T. Thermal inactivation of several *Mycobacterium* spp in milk by pasteurization. *Lett Appl Microbiol.*, v.22, p.253-256, 1996.
- GUZMAN, C.E. Presence of selected methanogens, fibrolytic bacteria, and Proteobacteria in the gastrointestinal tract of neonatal dairy calves from birth to 72 hours. *PLoS One.*, v.10, e0133048, 2015.
- HOLT, C.; JENNESS, R. Interrelationships of constituents and partition of salts in milk samples from eight species. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.77, p.275-282, 1984.
- HUGI, D.; BRUCKMAIER, R.M.; BLUM, J.W. Insulin resistance, hyperglycemia, glucosuria, and galactosuria in intensively milk-fed calves: Dependency on age and effects of high lactose intake. *J. Anim. Sci.*, v.75, p.469-482, 1997.
- JAMES, R.E. Protocols a priority for on-farm pasteurizers. *Hoard's dairyman.*, p.371, 2015.
- JAMI, E. Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. *ISME J.* 7., v.7, p.1069-1079, 2013.
- JIAO, J. Taxonomic identification of ruminal epithelial bacterial diversity during rumen development in goats. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.81, p.3502-3509, 2015.
- JORGENSEN, M.A.; HOFFMAN, P.C.; NYTES, A.J. Case study: A field survey of on-farm milk pasteurization efficacy. *Prof. Anim. Sci.*, v.22, p.472-476, 2006.

- KEHOE, S.I.; JAYARAO, B.M.; HEINRICHS, A.J. A survey of bovine colostrum composition and colostrum management practices on Pennsylvania farms. *J. Dairy Sci.*, v.90, p.4108-4116, 2007.
- KELLNEROVÁ, E.; NAVRÁTILOVÁ, P.; BORKOVCOVÁ, I. Effect of pasteurization on the residues of tetracyclines in milk. *Acta Vet Brno.*, v.83, p.21-26, 2014.
- KHAN, M.A.; WEARY, D.M.; VON KEYSERLINGK, M.A.G. Invited review: Effects of milk ration on solid feed intake, weaning, and performance in dairy heifers. *J. Dairy Sci.*, v.94, p.1071-1081, 2011.
- LABUSSIÈRE, E. et al. Estimation of milk leakage into the rumen of milk-fed calves through an indirect and repeatable method. *Animal.*, v.8, p.1643-1652, 2014.
- LI, J.H. et al. Effects of antibiotic residues in milk on growth, ruminal fermentation, and microbial community of preweaning dairy calves. *J. Dairy Sci.*, v.102, p.2298-2307, 2019.
- LI, W. et al. Metagenomic analysis reveals the influences of milk containing antibiotics on the rumen microbes of calves. *Arch. Microbiol.*, v.199, p.433-443, 2017.
- MACDONALD, L.E. et al. A systematic review and meta-analysis of the effects of pasteurization on milk vitamins, and evidence for raw milk consumption and other health-related outcomes. *J. Food Prot.*, v.74, p.1814-1832. 2011.
- MADSEN, B.D. et al. Physical properties of mammary secretions in relation to chemical changes during transition from colostrum to milk. *J. Dairy Res.*, v.71, p.263-272, 2004.
- MALMUTHUGE, N.; GRIEBEL, P.J.; GUAN, L.L. Taxonomic identification of commensal bacteria associated with the mucosa and digesta throughout the gastrointestinal tracts of preweaned calves. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.80, p.2021-2028, 2014.
- MALMUTHUGE, N.; GRIEBEL, P.J.; GUAN, L.L. The gut microbiome and its potential role in the development and function of newborn calf gastrointestinal tract. *Front. Vet. Sci.*, v.2, p.36, 2015
- MARTIN, N.H.; BOOR, K.J.; WIEDMANN, M. Symposium review: Effect of post-pasteurization contamination on fluid milk quality. *J. Dairy Sci.*, v.101, p.861-870, 2018.
- MAYNOU, G.; BACH, A.; TERRÉ, M. Feeding of waste milk to Holstein calves affects antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and *Pasteurella multocida* isolated from fecal and nasal swabs. *J. Dairy Sci.*, v.100, p.2682-2694, 2017a.

- MAYNOU, G. et al. Effects of feeding pasteurized nonsaleable milk to dairy calves on phenotypes and genotypes of antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* isolates before and after weaning. *J. Dairy Sci.* v.100, p.7967-7979, 2017b.
- MCGUIRK, S.M. et al. Solving Calf Morbidity and Mortality Problems. In: American Association of Bovine Practitioners, Preconvention Seminar 7: Dairy Herd Problem Investigation Strategies 36th Annual Conference, 2003.
- MEALE, S.J. Development of ruminal and fecal microbiomes are affected by weaning but not weaning strategy in dairy calves. *Front. Microbiol.*, v.7, p.582, 2016.
- MEALE, S.J. Weaning age influences the severity of gastrointestinal microbiome shifts in dairy calves. *Sci. Rep.*, v.7, p.198, 2017.
- MOORE, D.A. et al. Quality assessments of waste milk at a calf ranch. *J. Dairy. Sci.*, v.92, p.3503-3509, 2009.
- MORRILL, K.M. et al. Nationwide evaluation of quality and composition of colostrum on dairy farms in the United States. *J. Dairy Sci.*, v.95, p.3997-4005, 2012.
- NASEM - National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. Nutrient Requirements of Dairy Cattle: Eighth Revised Edition. Washington, DC: The National Academies Press. 2021.
- NAAS, A.E. et al. Do rumen Bacteroidetes utilize an alternative mechanism for cellulose degradation? *MBio.*, v.5, p.01401-01414, 2014.
- NETTO, D.P. et al. Levantamento dos principais fármacos utilizados no rebanho leiteiro do Estado do Paraná. *Acta Sci. Anim.*, v.27, p.145-151, 2005.
- NOVAIS, C. et al. Spread of multidrug-resistant *Enterococcus* to animals and humans: An underestimated role for the pig farm environment. *J. Antimicrob. Chemother.*, v.68, p.2746-2754, 2013.
- NRC. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- OGOLA, H.; SHITANDI, A.; NANUA, J. Effect of mastitis on raw milk compositional quality. *J. Vet. Sci.*, v.8, p.237-242, 2007.
- OIKONOMOU, G. Fecal microbial diversity in pre-weaned dairy calves as described by pyrosequencing of metagenomic 16S rDNA. Associations of *Faecalibacterium* species with health and growth. *PLoS One.*, v.8, e63157, 2013.

OLIVER, S.P.; MURINDA, S.E.; JAYARAO, B.M. Impact of antibiotic use in adult dairy cows on antimicrobial resistance of veterinary and human pathogens: A comprehensive review. *Foodborne Pathog. Dis.*, v.8, p.337-355, 2011.

PALMQUIST, D.L.; BEAULIEU, A.D.; BARBANO, D.M. Feed and animal factors influencing milk fat composition. *J. Dairy Sci.*, v.76, p.1753-1771, 1993.

PEREIRA, R.V. et al. In vivo selection of resistant *E. coli* after ingestion of milk with added drug residues. *PLoS One.*, 9:e115223, 2014a.

PEREIRA, R.V. et al. Multiresidue screening of milk withheld for sale at dairy farms in central New York State. *J. Dairy Sci.*, v.97, p.1513-1519, 2014b.

PEREIRA, R.V.V. et al. Ingestion of milk containing very low concentration of antimicrobials: longitudinal effect on fecal microbiota composition in preweaned calves. *PLoS One.*, 11:e 0147525, 2016.

PESTANA, J.M. et al. Effects of pasteurization and ultra-high temperature processes on proximate composition and fatty acid profile in bovine milk. *Am. J. Food Technol.*, v.10, p.265-272, 2015.

POL, M.; RUEGG, P.L. Treatment practices and quantification of antimicrobial drug usage in conventional and organic dairy farms in Wisconsin. *Dairy Sci.*, v.90, p.249-261, 2007.

PYÖRÄLÄ, S. et al. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Vet. Res.*, v.34, p.564-578, 2003.

RAMPLING, A.M.; GREENWOOD, M.H.; DAVIES, G.E.N. Use of a fluorometric test for bovine alkaline phosphatase to demonstrate under pasteurization of skimmed milk and cream. *Int. Dairy J.*, v.14, p.691-695, 2004.

RASHID, A. et al. Measurement of off-flavoring volatile compounds and microbial load as a probable marker for keeping quality of pasteurized milk. *Appl. Sci.*, v.9, p.959-975, 2019.

REY, M. et al. Establishment of ruminal bacteria community in dairy calves from birth to weaning is sequential. *J. Appl. Microbiol.*, v.116, p.245-257, 2014.

ROBINSON, P.H.; TAMMINGA, S.; VAN VUUREN, A.M. Influence of declining level of feed intake and varying the proportion of starch in the concentrate on rumen fermentation in dairy cows. *Livest. Prod. Sci.*, v.15, p.173-189, 1986.

ROCA, M. et al. Effect of heat treatments on stability of β -lactams in milk. *J. Dairy Sci.*, v.94, p.1155-1164, 2011.

ROCA, M. et al. Effect of heating on the stability of quinolones in milk. *J. Agric. Food Chem.*, v.58, p.5427-5431, 2010.

RUZANTE, J.M. et al. Isolation of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* from waste milk delivered to California calf ranches. *Foodborne Pathog. Dis.*, v.5, p.681-686, 2008.

SAINI, V. et al. Antimicrobial use on Canadian dairy farms. *J. Dairy Sci.*, v.95, p.1209-1221, 2012.

SANTOS, M.V.; MA, Y.; BARBANO, D.M. Effect of somatic cell count on proteolysis and lipolysis in pasteurized fluid milk during shelf-life storage. *J. Dairy Sci.*, v.86, p.2491-2503, 2003.

SAYAH, R.S. et al. Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic and wild animal fecal samples, human septage, and surface water. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.71, p.1394-1404, 2005.

SEIFU, E.; BUYS, E.M.; DONKIN, E.F. Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications: A review. *Trends Food Sci. Technol.*, v.16, p.137-154, 2005.

SELIM, S.A.; CULLOR, J.S. Number of viable bacteria and presumptive antibiotic residues in milk fed to calves on commercial dairies. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.211, p.1029-1035, 1997.

SHAHANI, K.M. et al. Stability of small concentrations of penicillin in milk as affected by heat treatment and storage. *J. Dairy Sci.*, v.39, p.971-977, 1956.

SHUSTER, D.E. et al. Suppression of milk production during endotoxin-induced mastitis. *J. Dairy Sci.*, v.74, p.3763-3774, 1991.

SINGER, R. S.; PATTERSON, S.K.; WALLACE, R.L. Effects of therapeutic ceftiofur administration to dairy cattle on *Escherichia coli* dynamics in the intestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.74, p.6956 - 6962, 2008.

SINGH, H.; HAVEA, P. Thermal denaturation, aggregation and gelation of whey proteins. In: *Advanced Dairy Chemistry Vol. 1: Proteins*, pp. 1263. Fox, P. F. Ed. III, Elsevier Science Publishers, London, 2003.

SMOLENSKI, G. et al. Characterization of host defense proteins in milk using a proteomic approach. *J. Proteome Res.*, v.6, p.207-215, 2007.

SOBCZUK-SZUL, M. et al. Changes in the bioactive protein concentrations in the bovine colostrum of Jersey and Polish Holstein-Friesian cows. *Turk J. Vet. Anim. Sci.*, v.37, p.43-49, 2013.

STABEL, J.R. et al. Destruction of *Mycobacterium paratuberculosis*, *Salmonella* spp., and *Mycoplasma* spp. in raw milk by a commercial on-farm high temperature, short-time pasteurizer. *J. Dairy Sci.*, v.87, p.2177-2183, 2004.

STABEL, J.R. et al. On-farm batch pasteurization destroys *Mycobacterium paratuberculosis* in waste milk. *J. Dairy Sci.*, v.84, p.524-527, 2001.

SUÁREZ, B.J. et al. Effect of roughage source and roughage to concentrate ratio on animal performance and rumen development in veal calves. *J. Dairy Sci.*, v.90, p.2390-2403, 2007.

TEMPINI, P.N. et al. Multidrug residues and antimicrobial resistance patterns in waste milk from dairy farms in Central California. *J. Dairy Sci.*, v.101, p.8110-8122, 2018.

TRMČIĆ, A. et al. A standard bacterial isolate set for research on contemporary dairy spoilage. *J. Dairy Sci.*, v.98, p.5806-5817, 2015.

VIEIRA, S.F. et al. 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.*, v.11, p.3552, 2021.

XIONG, Y.; HARB, M.; HONG, P.Y. Performance and microbial community variations of anaerobic digesters under increasing tetracycline concentrations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.101, p.5505-5517, 2017.

XU, Q.B. et al. Short communication: Decrease of lipid profiles in cow milk by ultra-high-temperature treatment but not by pasteurization. *J. Dairy. Sci.*, v.103, p.1900-1907, 2020.

YÁÑEZ-RUIZ, D.R.; ABECIA, L.; NEWBOLD, C.J. Manipulating rumen microbiome and fermentation through interventions during early life: A review. *Front. Microbiol.*, v.6, p.1133, 2015.

WATSON, E. et al. Epidemiology of extended spectrum beta-lactamase *E. coli* (CTX-M-15) on a commercial dairy farm. *Vet. Microbiol.*, v.154, p.339-346, 2012.

WRAY, C.; FURNISS, S.; BENHAM, C.L. Feeding antibiotic contaminated WM to calves effects on physical performance and antibiotic sensitivity of gut flora. *Br. Vet. J.*, v.146, p.80-87, 1990.

WEGENER, H.C. Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Curr Opin Microbiol.*, v.6, p.439-445, 2003.

WERNLI, D. et al. The application of the International Health Regulations to the Global Threat of antimicrobial resistance. *PLoS Med.*, v.8, p.1-6, 2011.

ZHANG, L.Y. et al. Comparative proteomic analysis of changes in the bovine whey proteome during the transition from colostrum to milk. *Asian Aus. J. Anim. Sci.*, v.24, p.272-278, 2011.

ZHANG, R. et al. Early feeding regime of waste milk, milk, and milk replacer for calves has different effects on rumen fermentation and the bacterial community. *Animals.*, v.9, p.443, 2019.

ZHU, D. et al. Effects of the vat pasteurization process and refrigerated storage on the bovine milk metabolome. *J. Dairy. Sci.*, v.103, p.2077-2088, 2020.

ZORRAQUINO, M.A. et al. Heat inactivation of beta-lactam antibiotics in milk. *J. Food Prot.*, v.71, p.1193-1198, 2008.

ZOU, Y. et al. Effects of feeding untreated, pasteurized and acidified waste milk and bunk tank milk on the performance, serum metabolic profiles, immunity, and intestinal development in Holstein calves. *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, v.8, p.53, 2017.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo publicado no Journal of Dairy Science em abril de 2024

INTERPRETATIVE SUMMARY

Effects of bulk tank milk, waste milk, and pasteurized waste milk on nutrient utilization, gastrointestinal tract development, and antimicrobial resistance to *E. coli* in pre-weaned dairy calves. *Diniz Neto et al.* Waste milk is frequently used in calf-rearing programs worldwide, with pasteurization employed to reduce the number of bacteria. Despite its widespread use, nutritional value of pasteurized waste milk for calf feeding and its implications for calf health remain contentious. This study investigated the effects of bulk tank milk, waste milk, and pasteurized waste milk utilization on nutrient digestibility, ruminal and cecal fermentation, organ development, and antimicrobial resistance in dairy calves fed up to 30 and 60 d of age.

RUNNING HEAD: PASTEURIZED AND WASTE MILK FOR CALVES

Effects of bulk tank milk, waste milk, and pasteurized waste milk on the nutrient utilization, gastrointestinal tract development, and antimicrobial resistance to *Escherichia coli* in pre-weaned dairy calves

H. C. Diniz Neto¹, S. G. Coelho¹, J. P. Campolina¹, S. F. Vieira¹, M. C. Lombardi², B. P. Pereira³, B. S. F. Albuquerque³, S. F. Costa⁴, A. S. Guimarães³, M. A. V. P. Brito³, C. S. Silva³, F. S. Machado³, T. R. Tomich³ and M. M. Campos^{*3}

¹Departamento de Zootecnia, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 30161-970

²Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 30161-970

³Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil, 36038-330

⁴Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil, 30161-970

*Corresponding author: mariana.campos@embrapa.br

ABSTRACT

This study aimed to assess the impact of bulk tank milk (**BTM**), waste milk (**WM**), and pasteurized waste milk (**PWM**) on nutrient digestibility, ruminal and cecal fermentation, gastrointestinal tract (**GIT**) development, and antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* from dairy calves at two periods (30 and 60 d of age). Calves were grouped according to body weight, serum protein levels, and breed composition. Three treatments were included: BTM (n = 21), WM from cows under antibiotic treatment (n = 21), and PWM (waste milk submitted to high-temperature, short-time pasteurization; n = 21). A total of 63 calves were used, of which: 18 animals (6/treatment) evaluated in the period of 4 - 30 d and 45 (15/treatment) from 4 - 60 d. During the experimental period, a daily intake of 6 L of milk was divided into two equal meals, with *ad libitum* access to water and starter. Milk and feed intakes were recorded daily. Digestibility in the total digestive tract test were conducted from 25 to 29 d of age (n = 6) and from 53 to 57 d of age (n = 15). Animals were euthanized at 30 ± 1 and 60 ± 1 d of age for the assessment of ruminal and cecal fermentation and GIT development. Antimicrobial susceptibility testing was conducted at 1, 30, and 60 d of age (n = 15/treatment). Statistical

analysis utilized a linear mixed-effects model for continuous outcomes and generalized linear models for single measurements (R software). Treatments WM and PWM had lower rumen pH, higher ruminal acetate concentration, larger reticulorumen and liver, and a higher prevalence of fecal-resistant *E. coli* compared to BTM at both 30 and 60 d. Up to 60 d, both BTM and WM treatments exhibited higher digestibility of ether extract and gross energy compared to the PWM, whereas WM and PWM treatments showed increased nitrogen intake and retention compared to the BTM. These findings suggest that pasteurization of waste milk negatively affects nutrient digestibility and calf performance, while also impacting rumen development. Additionally, the use of milk containing antibiotic residue leads to the selection of resistant *E. coli* in the GIT over time.

Keywords: calf feeding strategies, nutrient partitioning, rational use of antimicrobials, rumen development, volatile fatty acids

INTRODUCTION

Waste milk (**WM**) encompasses colostrum and milk derived from cows undergoing treatment for several ailments, including clinical mastitis, foot and reproductive diseases, and other related conditions (Aust et al., 2019). Additionally, this category further encompasses milk with an elevated somatic cell count (**SCC**), rendering it unsuitable for commercial use (Aust et al., 2013). Worldwide, the use of WM in suckling programs is considered a common practice (Brunton et al., 2012). For example, in US dairy operations, the WM was the main dietary used in the liquid diet of calves (40.1%) (Urie et al., 2018). The predominant use of WM in rearing programs serves as an economical feed alternative and eliminates the need for specific waste treatment systems designed to mitigate the risks associated with microbial contamination and drug residues disposal in the environment (Brunton et al., 2012).

The indiscriminate use of antimicrobials and deviations from prescribed treatment protocols represent significant contributors to the emergence of resistant bacteria in animal

production (Wegener, 2003). Thus, feeding WM to pre-weaning calves introduces an additional risk factor for the development of microbial resistance (Pereira et al., 2014; Zhang et al., 2022). To minimize the risks related to the presence of microorganisms, pasteurization (fast or slow) has been used to improve WM quality due to the ability to inactivate pathogenic microorganisms and reduce the total microbial load (McDonald et al., 2011). Nevertheless, pasteurization is not able to reduce antimicrobial residues (Garzon et al., 2020).

In addition to these considerations, it has been acknowledged that the quality of WM exhibits significant variability (Moore et al., 2009) and influences the composition and stability of the intestinal microbiota (**IM**) in calves (Maynou et al., 2019; Penati et al., 2021). Dennis et al. (2019) were pioneers in investigating the nutritional responses of calves fed WM, observing lower digestibility of dry matter (**DM**), organic matter (**OM**), acid detergent fiber (**ADF**), and neutral detergent fiber (**NDF**) in calves receiving WM containing antibiotics. Antibiotic residues have also been implicated in altered rumen microbiota and rumen fermentation profile due to variable quantities of WM reaching the rumen during feeding (Li et al., 2019; Zhang et al., 2019). Metagenomic analysis of rumen contents from calves fed WM not only revealed the impact of antibiotic residues on nutrient digestion of the solid diet but also highlighted the susceptibility of bacterial phyla to these residues (Naas et al., 2014; Zhang et al., 2019). These alterations are substantial enough to affect the development of the gastrointestinal tract (**GIT**), particularly the rumen (Li et al., 2019; Zhang et al., 2019). Despite these observations, scientific studies evaluating such effects remain limited.

The objective of this study was to assess the impact of utilizing bulk tank milk (**BTM**), waste milk (**WM**), and pasteurized waste milk (**PWM**) on nutrient digestibility, ruminal and cecal fermentation, organ development, and antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* in dairy calves. The research was structured around the following hypotheses: i) the incorporation of WM and PWM for calf feeding influences nutrient digestibility through

alterations in the fermentation pattern; ii) WM and PWM exert detrimental effects on organ development, particularly the rumen; and iii) calves fed with WM and PWM exhibit a higher prevalence of fecal *E. coli* resistant to various antimicrobial drugs.

MATERIAL AND METHODS

The experimental procedures employed in this study were approved by the Ethics Committee on Animal Use of Embrapa Dairy Cattle (CEUA number: 9849040419). The research was conducted over a period of 101 days on the Embrapa Dairy Cattle Experimental Farm (herd size: 400 animals) located in Coronel Pacheco, Minas Gerais, Brazil.

Animals, treatments, and management

A total of 63 male Holstein × Gyr crossbred dairy calves were used in the study. Immediately following birth, newborn animals were separated from their dams and had their umbilical cord immersed in a 10% iodine solution for 3 consecutive days. Within the first 6 h of life, the calves were weighed and provided with colostrum equivalent to 10% of their body weight, with a Brix concentration of 25%. Colostrum with a result Brix < 25 was enriched using a colostrum replacer (Saskatoon Colostrum Company, Saskatoon, Canada) until reaching a Brix value of 25%.

During the initial 3 d, calves were accommodated in individual suspended cages (1.50 m × 0.80 m; Intergado Ltda, Contagem, Brazil) with hay bedding, and fed with 6 L/d of transition milk from their dams (0800 and 1600 h), offered via commercial milk feeders (Milkbar, Waipu, New Zealand). Water was provided *ad libitum* from the first day. Blood samples were collected 48 h post-birth to evaluate passive immune transfer through total serum protein. Subsequently, samples were centrifuged (1800 g x 10 min) at room temperature (22 - 25°C), and total serum protein levels were quantified using an electronic refractometer (Serum protein REF-301; Biocotek, Beilun, Ningbo, China). No differences in passive immune transfer ($P = 0.97$) and

initial weight ($P = 0.98$) were observed between treatments. The total serum protein concentrations were 6.63, 6.63 and 6.58 g/dL and initial weight 37.36, 37.03 and 37.08 kg for calves in the BTM, WM, and PWM groups, respectively.

On their fourth day of age, calves were randomly assigned based on body weight, serum protein levels, and breed composition to the following experimental treatments: (i) bulk tank milk (**BTM**, $n = 21$), (ii) waste milk from cows subjected to antimicrobial treatments (cows with clinical mastitis, placental retention, metritis, or foot infections (**WM**, $n = 21$), (iii) pasteurized waste milk (waste milk processed for 15 seconds at 72 to 75°C (West, Juiz de Fora, Brazil), **PWM**, $n = 21$). Following this process, a milk sample was assessed for pasteurization efficiency by investigating peroxidase and phosphatase enzymes (CapLab, Ipiranga, São Paulo, Brazil), and it was only used after confirming the absence of phosphatase and the presence of peroxidase. Calves in the PWM treatment had their first meal immediately after pasteurization (milk temperature of 38°C). The remaining milk was refrigerated for 6 h (4°C) until the second meal.

The study included two periods: Period 1, comprising 18 animals ($n = 6/\text{treatment}$), assessed over 4 to 30 d; and Period 2, consisting of 45 animals ($n = 15/\text{treatment}$), underwent evaluation for an extended duration of 4 to 60 d. During the experimental period, animals were housed in individual sand-bedded pens (1.25 × 1.75 m, tethered with 1.2 m long chains). The pens were separated by masonry plates to prevent cross-contamination between animals in different treatments, and each treatment had its dedicated utensils.

In all experimental periods, calves received 6 L/d of milk, divided into two meals (BTM at 0900 and 1500 h; WM at 1000 and 1600 h; and PWM at 1100 and 1700 h) in calf milk feeders (Milkbar). A solid diet was offered *ad libitum* from the fourth day of age. The diet consisted of ground corn, soybean meal, mineral and vitamin supplements (**Table 1**).

Intake and Performance

Feed intake (milk and starter) was measured daily by calculating the difference between the amount of dry matter (**DM**) in the provided milk and solid feed and the amount refused. The total dry matter intake (**DMI**) was determined by summing the DMI of milk and starter. Body weight was measured on the fourth and seventh days of age and then weekly thereafter. Feeding efficiency (**FE**) was calculated by dividing the mean of average daily gain (**ADG**) by the total DMI.

Digestibility

The digestibility assay was conducted during two periods: from 25 to 29 d of age (n = 6/treatment) and from 53 to 57 d of age (n = 15/treatment). For four consecutive days (25 - 28 and 53 - 56 of age), the animals were housed in individual pens equipped with a rubber mat (WingFlex, Kraiburg TPE GmbH & Co., Waldkraiburg, Germany) for feces collection. The total feces samples from each animal were collected daily, weighed, and frozen at -20°C. On the last day (29 and 57 of age), the animals were transferred to metabolic cages (1.50 m × 0.80 m, Intergado Ltda., Contagem, Brazil) for total urine and fecal collection. A tray placed below the cage drained all urine into 5 L containers, which were stored in coolers with ice. The total urine volume, weight, and density were measured, and a 50 mL sample was collected and stored at -20°C. Samples of the supplied starter and feed refusals were collected daily, and the equivalent amounts from each total daily sample were combined to create one sample per animal.

Nutrient Composition Analysis

Samples of milk supplied were collected daily for analysis of total solids, CP, lactose, and fat (**Table 1**) using infrared spectroscopy (Bentley model 2000, Bentley Instruments Inc., Chaska, Minnesota, USA).

The starter samples from the entire experimental period and fecal samples from the digestibility assay were dried at 55°C for 72 h and ground through a 1-mm sieve using a Wiley mill (model 3, Arthur H. Thomas Co., Philadelphia, Pennsylvania, USA). After drying and grinding, 25 g of each sample were used to create a composite sample, representative of the digestibility test. The starter and fecal samples were analyzed for DM (Method 934.01), CP (Method 988.05), ether extract (EE, Method 988.05), and ash (Method 942.05), according to AOAC International (2012). Neutral detergent fiber and ADF contents were determined according to the method described by Van Soest et al. (1991). The gross energy was measured by an adiabatic bomb calorimeter (IKA - C5000, IKA® Works, Staufen, Germany).

Urinary nitrogen and energy were analyzed using the Kjeldahl method (AOAC International., 2012) and adiabatic bomb calorimeter (IKA - C5000, IKA® Works, Staufen, Germany), respectively.

Nutrient Digestibility

The DMI of each nutrient was calculated by summing the intake of each supplied component (milk and starter) and their respective DM and nutrient content, while subtracting the amounts of DM and nutrients obtained from refusals.

The apparent digestibility of nutrients (g/kg of DM) was determined using the amount consumed and the amount of each nutritional component recovered in the feces. Nitrogen balance was calculated as the difference between dietary nitrogen intake and nitrogen excreted in feces and urine. Gross energy intake (GEI) was calculated by the difference between the gross energy content (GE) of each of the components supplied in the diet (milk and concentrate). The GE content in milk was calculated according to the equation proposed by Drackley (2008): $GE \text{ (Mcal / kg of milk)} = (0.0911 \times \% \text{ fat}) + (0.0586 \times \% \text{ protein}) + (0.0395 \times \% \text{ lactose})$

Euthanasia, Gastrointestinal Tract (GIT), Internal Organs, and Viscera Weight Comparative Slaughter

The animals were randomly selected to be euthanized at 30 ± 1 d ($n = 6/\text{treatment}$) and 60 ± 1 d ($n = 15/\text{treatment}$) for organ weighing and collection of samples for histological development evaluation. The animals were euthanized in the morning, before morning feeding, following the protocols of the Brazilian Federal Council of Veterinary Medicine (CFMV, 2013). The euthanasia procedure was conducted with sedation (0.05 mg/kg of intramuscular xylazine), followed by intravenous anesthesia (0.1 mg/kg ketamine) and the application of 20 mL of lidocaine via the foramen magnum. Euthanasia confirmation was established through cardiopulmonary auscultation and absence of the corneal reflex. The abdominal cavity was opened and each organ of the GIT (reticulorumen, omasum, abomasum, small and large intestine), was isolated by lashing to preserve the contents, removed, and weighed. The GIT organs were then emptied, washed, and weighed again. Additional organs, such as the tongue, heart, lung, pancreas, liver, bladder, spleen, kidneys, and perirenal, omental, and mesenteric fat were also weighed. The organ weights were computed relative to the empty animal weight, defined as the total weight of the animal before euthanasia minus the sum of the weight of visceral content and the weight of organs. The weight of the visceral content was determined by subtracting the weight of the empty GIT from the weight of the full GIT.

Rumen and cecum pH, NH₃, and VFA

The rumen and cecum were promptly isolated upon opening the abdominal cavity. After isolating the organs, a sample of the contents of the rumen and cecum were collected (50 mL). After collection, the sample was filtered through gauze, and the pH was measured immediately (Mettler Toledo, Columbus, Ohio, United States).

For determination of N-NH₃ and volatile fatty acids (VFA) concentrations, 5 and 10 mL of the filtered content samples from the rumen and cecum were acidified with 1 mL of sulfuric acid (50%) and 1 mL of metaphosphoric acid (20%). The quantification of N-NH₃ was performed according to the colorimetric distillation method proposed by Chaney and Marbach (1962). Absorbance was measured at 630 nm (Thermo Fisher Scientific, Madison, USA) after the Kjeldahl test with magnesium oxide and calcium chloride, following method 920.03 (AOAC, 1980). For VFA analysis the samples were centrifuged (1,800 g x 10 min) at room temperature (22 - 25°C), and subsequently analyzed by high-performance liquid chromatography (Waters Alliance e2695 Chromatograph, Waters Technologies do Brazil LTDA, Barueri, SP, Brazil).

Histology

Immediately after slaughter, samples were collected for histological comparison from various sections of the dorsal sac and ventral sac of the rumen, omasum, abomasum, and portions of the small intestine including the duodenum, jejunum, and ileum. These samples were then fixed in formalin and kept in an ethanol solution. Afterwards, they were embedded in paraffin blocks and sectioned into 5 µm thick sections (microtome Olympus, Tokyo, Japan), and affixed to a glass slide for microscopy, stained with hematoxylin-eosin. Microscopic images were captured using a microscope equipped with a camera (Olympus CX31 and Olympus OSIS SC30, Tokyo, Japan).

Morphometric analyses were carried out using AxioVision Software 4.8.2–06/2010 (Images Carl Zeiss Systems, Jena, Germany) to evaluate: papillae height (ventral and dorsal sac of the rumen, and omasum); villus height (duodenum and ileum); papillae area (ventral and dorsal sac of the rumen, and omasum); villi area (duodenum and ileum); depth of the crypt (abomasum); gland depth (abomasum, duodenum, ileum, and colon) and cell proliferation

(abomasum, duodenum, ileum, and colon). To determine the rate of cell division known as the mitotic index, 2,000 cells from the basal layer of the epithelium of the rumen ventral and dorsal sac and omasum were counted., including those with a nucleus in mitosis. The mitotic index was calculated as the ratio between the number of dividing nuclei, and the total number of nuclei (Costa et al., 2008), indicating possible adaptations of the rumen mucosa dietary changes.

Antimicrobial Susceptibility Testing

Fecal samples were directly collected from the rectal ampulla from 45 calves (15 per treatment) at 1, 30, and 60 d of age. The collected samples were stored in sterile 70-mL bottles (Prolab, São Paulo, Brazil) and frozen at -80°C. Stool samples were cultured on MacConkey Agar and incubated for 18 to 24 h at 37°C. After the incubation period, three potential *E. coli* isolates were selected from each sample based on morphological characteristics and cultured on Columbia Agar for 18 to 24 h. Molecular identification was performed using PCR (Juck et al., 1996).

The antimicrobials selected for evaluation were based on the antimicrobials used in the treatment protocols for cows that had their milk discarded during the experimental period. These included ampicillin (**AMP**), amoxicillin (**AMO**), ceftiofur (**CEF**), florfenicol (**FLO**), enrofloxacin (**ENR**), streptomycin (**STR**) and tetracycline (**TET**). The susceptibility test of *E. coli* isolates was conducted by the disk diffusion test. Each bacterium isolated from the pure culture was suspended in 2 mL of sterile NaCl solution (0.9%) and adjusted spectrophotometrically to an absorbance of 0.08 to 0.10 at 625 nm. The *E. coli* samples were inoculated onto plates containing Mueller-Hinton Agar (Oxoid), covering the entire surface. The antimicrobials AMP (10 µg), AMO (10 µg), CEF (30 µg), FLO (30 µg), ENR (5 µg), STR (10 µg) and TET (10 µg) were tested. The plates were then incubated at 16 to 18 h to 37°C for

subsequent reading. The inhibition halo around each disc was measured in millimeters and classified into one of the categories (resistant, sensitive, or intermediate, **Table 2**).

Statistical Analysis

Data were analyzed using R software (R Core Team, 2019 - version 4.1.2). Power analysis was conducted to determine the appropriate sample size using a power of 80% and a significance level of 0.05. The analysis indicated that the noticeable difference for the parameter with the highest variation (VFA concentration in the rumen and cecum contents) would be observable with 6 calves per group. The data were segmented into two periods: 4 - 30 d of age (n = 6/treatment) and 4 - 60 d of age (n = 15/treatment).

The data collected was summarized by period (Period 1 – Calves from 4 to 30 days; and Period 2 – Calves from 4 to 60 days). A randomized complete experimental design was implemented to test the hypothesis of the effect of milk type in each outcome. Continuous outcomes such as nutrient intake, performance, antimicrobial resistance in *E. coli* isolates were analyzed independently using a linear mixed model (nlme package). Each independent outcome was modeled as a function of the following fixed effects: treatment, breed composition, day, and their interaction were included as factors for fixed effects, with animals as random effects. Birth weight and total serum protein were tested as covariates and included in the model only if found to be significant ($p < 0.05$). For variables such as digestibility, nitrogen balance, ruminal and cecum characteristics (pH, NH₃, and VFA), empty body weight, the weight of organs and viscera, intestines length, and GIT development were analyzed using a generalized linear model.

All models underwent graphical verification for normality and homoscedasticity of residuals and were tested using the Shapiro-Wilk and Bartlett tests, respectively. A 95%

confidence interval was employed to assess the null hypothesis, and *P*-values were determined using the Tukey test. A *P*-value ≤ 0.05 was considered statistically significant for all analyses.

RESULTS

Nutrient intake and performance

Up to 30 d of age (Period 1), the daily milk intake in the PWM treatment was 5% lower compared to the WM and BTM treatments (774.57 g DM/d; *P* < 0.05, **Table 3**). However, no differences were observed across treatments for starter intake, total DMI, and ADG with final BW at 30 d (**Tables 3 and 4**).

Similar trends were observed for calves evaluated up to 60 d of age (Period 2). There were no significant effects of treatments on starter intake and total DMI. Nevertheless, milk intake by PWM-fed calves was significantly lower with around 4% less compared to those receiving WM and BTM (*P* < 0.05). Additionally, WM-fed calves exhibited a similar ADG to those fed BTM, but 14% higher ADG than calves receiving PWM (*P* < 0.05, **Table 3**). However, the final BW at 60 d of age did not exhibit any significant differences across treatments (**Table 4**).

Apparent Nutrient Digestibility

For Period 1, no differences in nutrient digestibility were observed among BTM, WM, and PWM treatments for digestibility of DM, OM, CP, EE, and GE, respectively (**Table 4**).

Similar results were observed in Period 2. There were no differences between BTM, WM, and PWM treatments for digestibility of DM, OM, and CP (*P* > 0.05; **Table 4**). However, the BTM and WM treatments exhibit higher digestibility of EE (96.29 and 95.55%; *P* < 0.01) and GE (94.96 and 94.87%, respectively; *P* = 0.01) compared to the PWM (93.28 and 93.35%, respectively).

Nitrogen Balance

Calves from Period 1 did not exhibit any differences in nitrogen balance across treatments ($P > 0.05$; **Table 5**). However, calves in Period 2 fed WM and PWM exhibited 13.5% and 15.6% higher nitrogen intake ($P = 0.02$) and 14.6% and 12.0% higher nitrogen retention respectively ($P = 0.04$) compared to those fed BTM. No differences in fecal nitrogen content and urine nitrogen were observed among the BTM, WM, and PWM treatments ($P > 0.05$; **Table 5**).

Ruminal and Cecum Parameters

Dietary treatment did not have a significant impact ($P > 0.05$) on the rumen and cecum fermentation parameters of calves from Period 1 (**Table 6**). Nevertheless, in Period 2, calves receiving PWM had lower rumen pH (5.03) compared to those receiving the BTM (5.58, $P < 0.01$). The same pattern was observed in ruminal acetate concentration, where PWM-fed animals had higher rumen acetate concentration than calves fed the BTM ($P < 0.01$, **Table 6**).

Gastrointestinal Tract Development

In Period 1, no discernible differences were observed between treatments for empty body weight, weight of internal organs and viscera, and intestines length (**Table 7**). Similar results were observed in Period 2, with exceptions noted for reticulorumen, liver, omental, and perirenal fat weight. The WM- and PWM-treated calves exhibited 16% and 15% higher weights for reticulorumen ($P = 0.01$) and 6% and 8% larger livers ($P < 0.01$), respectively, compared to calves in the BTM treatment (**Table 7**). Furthermore, the BTM and WM treatments presented 25% and 13% greater weight of omental fat and 42% and 21% higher perirenal fat, respectively, in comparison to PWM ($P < 0.01$, **Table 7**).

Dietary treatment did not exert a significant influence on various aspects of GIT histology development, including papilla height (ventral and dorsal rumen sac, and omasum); villus height (duodenum and ileum); papillae area (ventral and dorsal sac of the rumen, and omasum); villi area (duodenum and ileum); crypt depth (abomasum); glandular epithelium depth (abomasum, duodenum, ileum, and colon), and cell proliferation (abomasum, duodenum, ileum, and colon). Therefore, there were no notable effects on the GIT development of calves up to 30 or 60 d of age (**Table 8**).

Antimicrobial Resistance of E. coli Isolates

No fecal *E. coli* isolate showed resistance to STR (**Table 9**). There were no observed treatment effects or treatment x week interactions for FLO resistance. Additionally, no isolated effects of treatments or treatment x week interactions were noted on the prevalence on the resistant fecal *E. coli* across AMO, AMP, CEF, ENR, and TET at 3 d of age. At 30 d of age, the WM and PWM treatments exhibited a higher prevalence of resistant fecal *E. coli* compared to BTM for AMO; AMP, CEF; ENR, and TET. Similar patterns were observed at 60 d of age, in which the WM and PWM treatments showed a higher prevalence of resistant fecal *E. coli* compared to BTM for AMO; AMP; CEF and ENR.

DISCUSSION

This study aimed to explore the association between different types of milk (BTM, WM, and PWM) in the liquid diet of pre-weaned calves and their impact on calf development and performance. This research is unique in its simultaneous evaluation of these milk types over two distinct periods (30 and 60 d), assessing nutrient digestibility, ruminal and cecal fermentation, GIT development, and antimicrobial-resistant fecal *E. coli* of dairy calves. Our key findings include: (i) PWM-fed calves consumed less milk solids than those on BTM and WM, and presented lower EE digestibility at 60 d of age; (ii) Milk type influenced ruminal pH

and acetate concentration; (iii) BTM-fed calves exhibited lighter reticulum-rumen and livers, while PWM-fed calves had reduced omental and perirenal fat; (iv) Calves fed WM and PWM demonstrated a higher prevalence of resistant fecal *E. coli* at both 30 and 60 d. Specifically, WM-fed calves showed resistance to five out of seven tested antimicrobials, while PWM-fed calves demonstrated resistance to four out of seven antimicrobials.

In our study, we hypothesized that the provision of WM and PWM may alter nutrient digestibility. Our observations partially support this hypothesis, as calves fed PWM (but not WM) exhibited lower EE and GE digestibility values. The lower digestibility of EE and GE observed in the PWM treatment in Period 2 (4 – 60 d) can be attributed to the effects of thermal processing on milk fat content and fatty acid composition. In PWM, fat content tends to decrease due to the fat adherence to the container surface after processing (Pestana et al., 2015). Additionally, thermal processing may lead to oxidative losses of unsaturated lipids such as linoleic (C18:2 n-6) and arachidonic acid (C20:4 n-6), as well as certain saturated fatty acids like butyric acid (C4:0), caproic acid (C6:0), and caprylic acid (C8:0) (Fidler et al., 2001; Pestana et al., 2015). In calves, triglycerides present in the liquid diet undergo enzymatic hydrolysis in the abomasum, forming free fatty acids and 2-monoglyceride, both of which require long-chain fatty acids for chain formation. These molecules are then incorporated into the micelles for absorption in the small intestine. The stability of fat micelles, which are crucial for absorption, depends on the presence of 2-monoglyceride molecules and bile salts. However, the reduction of long-chain unsaturated fatty acids in the diet may compromise the total apparent digestibility in the GIT due to insufficient 2-monoglyceride formation for micelle incorporation (Spanski et al., 1997).

Sixty-day-old calves fed WM and PWM consumed, on average, 6 g/BW^{0.75}/d more nitrogen than calves receiving BTM, likely attributable to the differences in CP intake previously reported by Vieira et al. (2021). They have demonstrated that calves fed WM and

PWM had higher CP intake (57.35 g/d and 59.22 g/d) between 53 and 60 d of age compared to those in the BTM treatment (50.75 g/d). Furthermore, the higher nitrogen intake and lack of differences in CP digestibility by WM- and PWM-fed calves may elucidate the greater nitrogen retention observed in animals receiving these treatments.

During suckling, a relatively small quantity of milk enters the rumen (Berends et al., 2012; Ellingsen et al., 2016). Antibiotics present in WM reaching the rumen can exert detrimental effects on rumen fermentation by directly impacting microorganisms (Owens and Basalan, 2016). However, in the first weeks of life, calves still possess a rudimentary microbiota and rumen epithelium (Diao et al., 2019), which likely contributed to the similar fermentation pattern observed for animals evaluated at the 30-day mark in our study. On the other hand, older calves exhibit a more developed epithelium and microbiota, making modifications of the rumen fermentation pattern more easily detected. Accordingly, 60-day-old calves subjected to the PWM treatment had higher concentrations of acetic acid and lower pH values compared to the BTM treatment. This difference may be attributed to penicillin/streptomycin present in the WM, which has been shown to increase acetate concentrations under anaerobic conditions (Wasserman et al., 1952; Xiong et al., 2017). Our results align with Li et al. (2019), who evaluated the effects of several antibiotics in the milk replacer on the rumen fermentation pattern of pre-weaning calves, observing increased acetic acid concentration in the rumen. Thus, the effect of the antibiotics in the rumen is believed to influence specific microbial abundance groups and, consequently, result in different ruminal fermentation patterns and ruminal pH levels (Zhang et al., 2019).

The absorption of VFAs through the ruminal epithelium provides the chemical stimuli required for epithelium proliferation (Diao et al., 2019). In the present study, the higher reticulorumen weight observed for calves fed WM and PWM at 60 d may be partially attributed to differences in starter consumption, known to influence VFA synthesis and overall rumen

development. However, this observation does not fully account for the greater reticulorumen development in calves fed WM and PWM. The stimulatory effects of VFAs on papillae and proliferation are specific, with butyrate being a potent stimulator, followed by propionate (Tamate et al., 1962). In our work, we did not observe significant treatment effects on butyrate and propionate concentrations. While these specific VFAs are recognized for their crucial roles in stimulating papillae and the proliferation of the ruminal epithelium, it is essential to consider that factors beyond VFA levels may contribute to the observed differences in reticulorumen development among calves fed WM and PWM within 60 d of age. Considering that Li et al. (2019) suggest that the development of ruminal papillae may be more closely associated with blood insulin levels, a deeper exploration into research would be interesting to examine the effects of insulin on ruminal development in calves, particularly under conditions resembling those in our study.

Additionally, Nishihara et al. (2019) uncovered molecular insights into ruminal development in young calves by linking the growth of rumen papillae to the expression of genes associated with insulin-like growth factors (IGFs) synthesis in the ruminal epithelium. Previous investigations (Li et al., 2019; Zhang et al., 2019) have associated distinctions in GIT development among pre-weaning calves fed BTM, WM, and milk replacer with starter intake, often without significant alterations in VFA production. Specifically, Zhang et al. (2019) explored the GIT development of calves fed BTM, WM, and milk replacer, finding that calves fed BTM and milk replacer exhibited higher pre-stomach weight and rumen weight compared to the those fed WM due to increased starter consumption.

On the other hand, Li et al. (2019) evaluated the rumen development of calves receiving milk replacer without antibiotics or milk replacer containing antibiotics and found no significant histological differences in papillae length and papillae width in the dorsal sac. However, a higher papillae length was observed in the ventral sac of the group treated with milk replacer

containing antibiotics. The authors suggested that the difference in the ventral sac histology could be elucidated by the ruminal concentration of VFAs, despite no discernible difference in total VFA concentrations between treatments.

In our investigation, greater liver weight was only observed in calves from the WM and PWM treatments at the 60-day mark. The liver serves as a primary site for the metabolism of antibiotics, where these antimicrobials undergo transformation into active or inactive metabolites through enzymatic processes, contingent upon the specific drug administered (Linhares et al., 1998). We posit that the daily antibiotic consumption by the animals may have imposed an additional load on liver function, potentially contributing to the higher organ weight values observed in WM and PWM-fed calves in our study. Moreover, the greater deposition of omental and perirenal fat observed in the BTM and WM treatments was likely linked to higher fat intake over the experimental period (Vieira et al., 2021) and greater deposition at these specific anatomical sites.

The presence of antimicrobial residues in WM raises significant concerns within the scientific community. Despite the potential fluctuations in antimicrobial levels in WM, its use poses a risk by exerting selective pressure, fostering the emergence and spread of resistant bacteria in the intestinal microbiota of calves (Maynou et al., 2017a; Firth et al., 2021; Zhang et al., 2022). In our study, both WM and PWM treatments exhibited a higher prevalence of fecal *E. coli* resistant to amoxicillin-clavulanic acid, AMP, CEF, ENR, and TET. Notably, the majority of treatments administered in the cow herd, including those for mastitis, retained placenta, and metritis, involved beta-lactams and TEC. Maynou et al. (2017b) reported an increased prevalence of *E. coli* resistant to CEF and FLO in the group of animals receiving PWM, as these two antimicrobials were among the most frequently administered for treating diseases within the herd. Similarly, Foutz et al. (2018) observed a higher prevalence of fecal *E. coli* resistant to AMP, CEF, ENR, FLO, gentamicin, oxytetracycline, sulfadimethoxine, and

trimethoprim in animals that received PWM and MR containing antibiotics. These findings underscore the potential role of milk types in contributing to the dissemination of antimicrobial resistance.

In our study, the emergence of fecal *E. coli* resistant to FLO was unexpected, as this drug was not used in animal treatment protocols. Nevertheless, all treatments exhibited FLO-resistant fecal *E. coli* at 30 and 60 d of age. Previous studies have suggested that resistance to FLO in *E. coli* isolates has been mediated by the floR gene (White et al., 2000; Doublet, 2002). When evaluated in conjunction with mobile genetic elements, the floR gene has been found alongside other resistance genes, heightening the risk of co-selection and horizontal dissemination of resistant *E. coli* (Meunier et al., 2010). Consistent with our findings, Maynou et al. (2017b) also observed FLO-resistant fecal *E. coli* in the PWM treatment, despite the absence of antibiotic use for treating conditions in the herd. This highlights the possibility of resistance dissemination, even in scenarios where the antibiotic is not directly used in specific treatments.

Exposure to antibiotics typically found in the liquid diet diminishes following weaning, thereby reducing the selection pressure and, consequently, the emergence of resistant bacteria in the GIT (Foutz et al., 2018). However, in our study, all experimental animals were euthanized at 60 d for assessments of organ and viscera development. As a result, we advocate for future research that tracks animals in transition from liquid to solid diets beyond weaning. Understanding the impact of antibiotic residues is crucial for developing new feeding and residue-disposal strategies within calf-rearing systems.

It's important to acknowledge certain limitations of the study that may benefit from future investigation. We anticipated variations in milk composition among treatments, which could influence the animal's microbiota and development. Adjusting the milk replacer to stabilize its nutritional values could potentially provide insights into this impact. However, the

primary aim of our study was to compare different types of liquid diets as they are typically provided on farms. Therefore, altering the nutritional content would have deviated from the original study objective. Additionally, since calves were born sequentially over a two-month period and enrolled at different times into the trial, the antimicrobial treatments administered to the herd may have varied over time. Consequently, the spectrum of antimicrobials contained in WM and PWM treatments might have fluctuated throughout the observation period.

CONCLUSIONS

Pasteurizing waste milk has adverse effects on nutrient digestibility of calves, potentially compromising their performance. Nevertheless, the changes in ruminal fermentation patterns hint at a potential impact on rumen development. The use of waste milk for calf feeding may contribute to the gradual selection of resistant fecal *E. coli* in the GIT over time, posing a potential threat to the effectiveness of disease treatments within the herd. The identification of florfenicol-resistant *E. coli* suggests that other factors beyond direct antibiotic exposure may be involved, such as the horizontal bacterial transfer from the environment or direct contact with other animals.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors declare they have no conflicts of interest. Gratitude is extended to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Belo Horizonte, Brazil), for funding this study. Additional appreciation goes to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasília, Brazil), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG, Minas Gerais, Brazil), Universidade Federal de Lavras (UFLA, Minas Gerais, Brazil), Instituto de Laticínios Cândido Tostes (EPAMIG, Minas Gerais, Brazil), and Embrapa Gado de Leite (Minas Gerais, Brazil) for providing the necessary infrastructure to carry out this project.

REFERENCES

- AOAC International. 2012. Official Methods of Analysis. 19 th. AOAC International, Gaithersburg, MD.
- Aust, V., K. Knappstein, H. -J. Kunz, H. Kaspar, J. Wallmann, and M. Kaske. 2013. Feeding untreated and pasteurized waste milk and bulk milk to calves: effects on calf performance, health status and antibiotic resistance of faecal bacteria. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 97:1091–1103. doi:10.1111/jpn.12019.
- Berends, H., C.G. van Reenen, N. Stockhofe-Zurwieden, and W.J.J. Gerrits. 2012. Effects of early rumen development and solid feed composition on growth performance and abomasal health in veal calves. *J. Dairy Sci.* 95:3190–3199. doi:10.3168/jds.2011-4643.
- CFMV, C.F. de M.V. 2013. Guia Brasileiro de Boas Práticas Para Eutanásia Em Animais - Conceitos e Procedimentos. 1st ed. CFMV, Brasília.
- Chaney, A.L., and E.P. Marbach. 1962. Modified Reagents for Determination of Urea and Ammonia. *Clin. Chem.* 8:130 LP – 132.
- CLSI. 2008. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 18th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.
- CLSI. 2013. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard. VET01–A4. 4th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.
- CLSI. 2014. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 24th Informational Supplement. 24th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.
- Costa, S.F., M.N. Pereira, L.Q. Melo, J.C. Resende Júnior, and M.L. Chaves. 2008. Alterações morfológicas induzidas por butirato, propionato e lactato sobre a mucosa ruminal e a epiderme de bezerros: I Aspectos histológicos. *Arq. Bras. Med. Veterinária e Zootec.* 60:1–9. doi:10.1590/S0102-09352008000100001.

- Dennis, T.S., F.X. Suarez-Mena, W. Hu, T.M. Hill, J.D. Quigley, and R.L. Schlotterbeck. 2019. Effects of milk replacer feeding rate and long-term antibiotic inclusion in milk replacer on performance and nutrient digestibility of Holstein dairy calves up to 4 months of age. *J. Dairy Sci.* 102:2094–2102. doi:10.3168/jds.2018-15652.
- Diao, Q., R. Zhang, and T. Fu. 2019. Review of Strategies to Promote Rumen Development in Calves. *Animals* 9:490. doi:10.3390/ani9080490.
- Doublet, B. 2002. Molecular analysis of chromosomally florfenicol-resistant *Escherichia coli* isolates from France and Germany. *J. Antimicrob. Chemother.* 49:49–54. doi:10.1093/jac/49.1.49.
- Drackley, J.K. 2008. Calf nutrition from birth to breeding. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 24:55–86. doi:10.1016/j.cvfa.2008.01.001.
- Ellingsen, K., C.M. Mejdell, N. Ottesen, S. Larsen, and A.M. Grøndahl. 2016. The effect of large milk meals on digestive physiology and behaviour in dairy calves. *Physiol. Behav.* 154:169–174. doi:10.1016/j.physbeh.2015.11.025.
- Fidler, N., T.U. Sauerwald, H. Demmelair, and B. Koletzko. 2001. Fat content and fatty acid composition of fresh, pasteurized, or sterilized human milk.
- Firth, C., K. Kremer, T. Werner, and A. Käsbohrer. 2021. The effects of feeding waste milk containing antimicrobial residues on dairy calf health. *Pathogens* 10:112. doi:10.3390/pathogens10020112.
- Foutz, C.A., S.M. Godden, J.B. Bender, F. Diez-Gonzalez, M. Akhtar, and A. Vatulin. 2018. Exposure to antimicrobials through the milk diet or systemic therapy is associated with a transient increase in antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* of dairy calves. *J. Dairy Sci.* 101:10126–10141. doi:10.3168/jds.2018-14598.
- Juck, D., J. Ingram, M. Prévost, J. Coallier, and C. Greer. 1996. Nested PCR protocol for the rapid detection of *Escherichia coli* in potable water. *Can. J. Microbiol.* 42:862–866.

doi:10.1139/m96-110.

- Li, J.H., M.H. Yousif, Z.Q. Li, Z.H. Wu, S.L. Li, H.J. Yang, Y.J. Wang, and Z.J. Cao. 2019. Effects of antibiotic residues in milk on growth, ruminal fermentation, and microbial community of preweaning dairy calves. *J. Dairy Sci.* 102:2298–2307. doi:10.3168/jds.2018-15506.
- Linhares, M.C., L.F. Harran, T.J. Strelevitz, J.W. Gauthier, M.J. Cole, R.L. Hassfurther, and J.E. Risk. 1998. Disposition and metabolism of the novel macrolide antibiotic CP-163505 in cattle. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 21:99–106. doi:10.1046/j.1365-2885.1998.00125.x.
- Maynou, G., A. Bach, and M. Terré. 2017a. Feeding of waste milk to Holstein calves affects antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and *Pasteurella multocida* isolated from fecal and nasal swabs. *J. Dairy Sci.* 100:2682–2694. doi:10.3168/jds.2016-11891.
- Maynou, G., H. Chester-Jones, A. Bach, and M. Terré. 2019. Feeding pasteurized waste milk to preweaned dairy calves changes fecal and upper respiratory tract microbiota. *Front. Vet. Sci.* 6:1–10. doi:10.3389/fvets.2019.00159.
- Maynou, G., L. Migura-Garcia, H. Chester-Jones, D. Ziegler, A. Bach, and M. Terré. 2017b. 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. doi:10.3168/jds.2017-13040.
- Meunier, D., E. Jouy, C. Lazizzera, B. Doublet, M. Kobisch, A. Cloeckaert, and J.-Y. Madec. 2010. Plasmid-borne florfenicol and ceftiofur resistance encoded by the *floR* and *blaCMY-2* genes in *Escherichia coli* isolates from diseased cattle in France. *J. Med. Microbiol.* 59:467–471. doi:10.1099/jmm.0.016162-0.
- Moore, D.A., J. Taylor, M.L. Hartman, and W.M. Sischo. 2009. Quality assessments of waste milk at a calf ranch. *J. Dairy Sci.* 92:3503–3509. doi:10.3168/jds.2008-1623.
- Naas, A.E., A.K. Mackenzie, J. Mravec, J. Schückel, W.G.T. Willats, V.G.H. Eijnsink, and P.B.

- Pope. 2014. Do Rumen bacteroidetes utilize an alternative mechanism for cellulose degradation?. *MBio* 5. doi:10.1128/mBio.01401-14.
- Nishihara, K., Y. Suzuki, D. Kim, and S. Roh. 2019. Growth of rumen papillae in weaned calves is associated with lower expression of insulin-like growth factor-binding proteins 2, 3, and 6. *Anim. Sci. J.* 90:1287–1292. doi:10.1111/asj.13270.
- Owens, F.N., and M. Basalan. 2016. *Ruminal Fermentation*. Springer International Publishing, Cham.
- Penati, M., G. Sala, F. Biscarini, A. Boccardo, V. Bronzo, B. Castiglioni, P. Cremonesi, P. Moroni, D. Pravettoni, and M.F. Addis. 2021. Feeding pre-weaned calves with waste milk containing antibiotic residues is related to a higher incidence of diarrhea and alterations in the fecal microbiota. *Front. Vet. Sci.* 8:1–13. doi:10.3389/fvets.2021.650150.
- Pereira, R.V.V., J.D. Siler, R.C. Bicalho, and L.D. Warnick. 2014. In vivo selection of resistant *E. coli* after ingestion of milk with added drug residues. *PLoS One* 9:e115223. doi:10.1371/journal.pone.0115223.
- Pestana, J.M., A. Gennari, B.W. Monteiro, D.N. Lehn, and C.F.V. Souza. 2015. Effects of pasteurization and ultra-high temperature processes on proximate composition and fatty acid profile in bovine milk. *Am. J. Food Technol.* 10:265–272. doi:10.3923/ajft.2015.265.272.
- Van Soest, P.J., J.B. Robertson, and B.A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583–3597. doi:10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2.
- Spanski, N.A., J.K. Drackley, C.L. Davis, and E.H. Jaster. 1997. Utilization of supplemental triglycerides or free fatty acids by calves from 4 to 10 weeks of age. *J. Dairy Sci.* 80:573–585. doi:10.3168/jds.S0022-0302(97)75973-3.
- Tamate, H., A.D. McGilliard, N.L. Jacobson, and R. Getty. 1962. Effect of various dietaries on

- the anatomical development of the stomach in the calf. *J. Dairy Sci.* 45:408–420. doi:10.3168/jds.S0022-0302(62)89406-5.
- Urie, N.J., J.E. Lombard, C.B. Shivley, C.A. Koprak, A.E. Adams, T.J. Earleywine, J.D. Olson, and F.B. Garry. 2018. Preweaned heifer management on US dairy operations: Part I. Descriptive characteristics of preweaned heifer raising practices. *J. Dairy Sci.* 101:9168–9184. doi:10.3168/jds.2017-14010.
- Vieira, S. de F., S.G. Coelho, H. do C. Diniz Neto, H.C.M. de Sá, B.P. Pereira, B.S.F. Albuquerque, F.S. Machado, L.G.R. Pereira, T.R. Tomich, I.R.T. Renhe, and M.M. Campos. 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* 11:3552. doi:10.3390/ani11123552.
- Wasserman, R.H., C.W. Duncan, E.S. Churchill, and C.F. Huffman. 1952. The effect of antibiotics on in vitro cellulose digestion by rumen microorganisms. *J. Dairy Sci.* 35:571–580. doi:10.3168/jds.S0022-0302(52)93739-9.
- Wegener, H.C. 2003. Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Curr. Opin. Microbiol.* 6:439–445. doi:10.1016/j.mib.2003.09.009.
- White, D.G., C. Hudson, J.J. Maurer, S. Ayers, S. Zhao, M.D. Lee, L. Bolton, T. Foley, and J. Sherwood. 2000. Characterization of chloramphenicol and florfenicol resistance in *Escherichia coli* associated with bovine diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 38:4593–4598. doi:10.1128/JCM.38.12.4593-4598.2000.
- Xiong, Y., M. Harb, and P.-Y. Hong. 2017. Performance and microbial community variations of anaerobic digesters under increasing tetracycline concentrations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101:5505–5517. doi:10.1007/s00253-017-8253-1.
- Zhang, R., W. Zhang, Y. Bi, Y. Tu, Y. Beckers, H. Du, and Q. Diao. 2019. Early feeding regime of waste milk, milk, and milk replacer for calves has different effects on rumen

fermentation and the bacterial community. *Animals* 9:443. doi:10.3390/ani9070443.

Zhang, X., X. Yi, H. Zhuang, Z. Deng, and C. Ma. 2022. Invited Review: Antimicrobial use and antimicrobial resistance in pathogens associated with diarrhea and pneumonia in dairy calves. *Animals* 12:771. doi:10.3390/ani12060771.

TABLES

Table 1. Composition of bulk tank milk (BTM), waste milk (WM), and pasteurized waste milk (PWM) and starter during the experimental period

Item (%) ¹	Treatment ²			Starter ³
	BTM	WM	PWM	
DM	13.04 ± 0.58a	12.82 ± 0.64b	12.48 ± 0.53c	94.53
Fat	4.24 ± 0.54a	4.10 ± 0.58a	3.76 ± 0.43b	3.14
CP	3.30 ± 0.27b	3.46 ± 0.44a	3.49 ± 0.29a	19.06
Casein	2.71 ± 0.19	2.64 ± 0.36	2.53 ± 0.44	-
Non-protein nitrogen	0.10 ± 0.01b	0.13 ± 0.02a	0.12 ± 0.02a	-
Lactose	4.46 ± 0.12a	4.33 ± 0.20b	4.33 ± 0.17b	-
Ash	0.69 ± 0.03b	0.72 ± 0.04a	0.73 ± 0.03a	8.81
NDF	-	-	-	12.70
ADF	-	-	-	5.60
GE (Kcal/kg)	-	-	-	4168.63

¹DM: Dry Matter; CP: Crude Protein; NDF: Neutral Detergent Fiber; ADF: Acid Detergent Fiber; GE: Gross Energy;

²Means followed by a lowercase letter represent statistical difference between treatments ($p < 0.05$; Tukey test);

³Basic composition: soybean meal, ground corn, and mineral (Prima/DSM, São Paulo, Brazil).

Table 2. Zone diameters (mm) and interpretative criteria of tested antimicrobial agents used to categorize antimicrobial susceptibility of fecal *Escherichia coli* isolates in calves (n = 45) fed bulk tank milk, waste milk, and pasteurized waste milk from 4 to 60 days of age

Antimicrobial agents tested¹	Resistant	Intermediate	Susceptible
Amoxicillin-clavulanic acid (AMO)	≤ 13	14 - 17	≥ 18
Ampicillin (AMP)	≤ 13	14 - 16	≥ 17
Ceftiofur (CEF)	≤ 17	18 - 20	≥ 21
Florfenicol (FLO)	≤ 14	15 - 18	≥ 19
Enrofloxacin (ENR)	≤ 16	17 - 20	≥ 21
Streptomycin (STR)	≤ 11	12 - 14	≥ 15
Tetracycline (TET)	≤ 11	12 - 14	≥ 15

¹Interpretation of results based on the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008, 2013, 2014).

Table 3. Nutrient intake and performance of dairy calves fed bulk tank milk (BTM), waste milk (WM), and pasteurized waste milk (PWM) in two different periods

Item ¹	Calves (30 d) ²			SEM	P-value ⁴	Calves (60 d) ³			SEM	P-value ⁴
	BTM	WM	PWM			BTM	WM	PWM		
Dry matter intake										
Milk, g/d	774.57 a	765.21 a	743.40 b	2.57	< 0.01	777.03 a	769.44 a	746.67 b	2.57	< 0.01
Starter, g/d	39.35	56.57	37.99	16.05	0.66	129.59	164.60	181.27	21.11	0.22
Total, g/d	808.89	818.24	775.51	14.45	0.12	895.09	910.73	900.24	21.95	0.87
Performance										
ADG, g/d	545.00	533.34	531.66	0.04	0.97	670.00 ab	707.33 a	618.00 b	0.02	0.04
ADG/TDMI	0.67	0.64	0.68	0.05	0.41	0.76	0.78	0.69	0.01	0.38

¹ADG/TDMI: calculated by dividing ADG (g) by total DMI;

²Calves (30 d): calves raised from 4 – 30 d (n = 6/treatment);

³Calves (60 d): calves raised from 4 – 60 d (n = 15/treatment);

⁴Means followed by “a”, “b” lowercase letters represent statistical difference between treatments ($P < 0.05$; Tukey test).

Table 4. Digestibility of nutrients of dairy calves fed bulk tank milk (BTM), waste milk (WM), and pasteurized waste milk (PWM) in two different periods

Item ¹	Calves (30 d) ²			SEM	<i>P</i> -value ⁴	Calves (60 d) ³			SEM	<i>P</i> -value ⁴
	BTM	WM	PWM			BTM	WM	PWM		
BW, kg	50.74	50.91	49.26	2.69	0.89	76.03	77.43	74.09	0.82	0.77
DMI, kg/d	854.25	870.45	824.44	29.5	0.55	1070.00	1167.00	1170.01	23.01	0.28
Digestibility, %										
DM	85.24	85.09	89.97	20.38	0.19	88.65	88.10	87.08	26.70	0.61
OM	93.92	94.38	94.84	0.81	0.76	95.22	94.94	93.78	3.73	0.06
CP	88.87	87.66	89.01	20.02	0.87	91.70	92.59	91.30	11.00	0.44
EE	95.52	96.50	95.768	5.55	0.30	96.29 a	95.55 a	93.28 b	7.53	< 0.01
GE	93.48	94.53	94.37	8.77	0.66	94.39 a	94.87 a	93.53 b	3.51	0.01

¹BW: Body weight; DMI: Dry matter intake; DM: Dry matter; OM: Organic matter; CP: Crude protein; EE: Ether extract and GE: Gross Energy;

²Calves (30 d): male calves raised from 4 – 30 d (n = 6/treatment);

³Calves (60 d): male calves raised from 4 – 60 d (n = 15/treatment).

⁴Means followed by “a”, “b” lowercase letters represent statistical difference between treatments ($P < 0.05$; Tukey test).

Table 5. Nitrogen balance (g/d/BW^{0.75}) of dairy calves fed bulk tank milk (BTM), waste milk (WM), and pasteurized waste milk (PWM) in two different periods

Item	Calves (30 d) ¹			SEM	P-value ³	Calves (60 d) ²			SEM	P-value ³
	BTM	WM	PWM			BTM	WM	PWM		
Nitrogen Balance (g/BW ^{0.75} /d)										
Nitrogen intake	1.29	1.36	1.33	0.06	0.80	1.63 b	1.82 a	1.91 a	0.05	< 0.01
Feces nitrogen	0.15	0.16	0.15	0.02	0.75	0.12	0.14	0.17	0.01	0.31
Urine nitrogen	0.16	0.13	0.24	0.03	0.09	0.28	0.31	0.39	0.02	0.07
Retained nitrogen	0.98	1.07	0.94	0.07	0.51	1.20 b	1.36 a	1.35 a	0.04	0.03

¹Calves (30 d): calves raised from 4 – 30 d (n = 6/treatment);

²Calves (60 d): calves raised from 4 – 60 d (n = 15/treatment);

³Means followed by “a”, “b” lowercase letters represent statistical difference between treatments ($P < 0.05$; Tukey test).

Table 6. Ruminal and cecum pH, ammonia nitrogen (NH₃), and volatile fatty acid (VFA) of dairy calves fed bulk tank milk (BTM), waste milk (WM), and pasteurized waste milk (PWM) in two different periods

Item	Calves (30 d) ¹			SEM	P – value ³	Calves (60 d) ²			SEM	P – value ³
	BHM	WM	PWM			BHM	WM	PWM		
Rumen										
pH	5.70	5.71	5.66	0.26	0.99	5.58 a	5.48 ab	5.03 b	0.13	0.01
Ammonia-N (mg/dL)	19.88	18.55	27.16	4.97	0.46	26.88	25.20	27.02	4.62	0.95
VFA (μmol/mL)										
Acetic (C2)	24.13	39.76	30.63	6.97	0.31	40.62 b	44.26 ab	55.03 a	3.53	0.01
Propionic (C3)	12.61	23.58	20.48	4.55	0.25	32.56	33.03	37.82	3.67	0.54
Butyric (C4)	3.18	5.53	4.24	1.12	0.36	7.21	6.82	9.11	0.86	0.15
C2:C3	2.04	1.66	1.55	0.18	0.29	1.41	1.33	1.28	0.07	0.47
Cecum										
pH	6.42	5.72	5.85	0.23	0.20	6.41	6.55	6.35	0.27	0.46
Ammonia-N (mg/dL)	21.87	19.82	30.38	4.65	0.28	17.35	19.65	20.41	4.82	0.51
VFA (μmol/mL)										
Acetic (C2)	30.06	30.44	42.09	5.50	0.28	35.21	35.22	38.15	1.84	0.79
Propionic (C3)	11.34	13.87	23.27	4.03	0.15	14.66	16.44	17.72	2.22	0.58
Butyric (C4)	5.10	5.41	8.26	0.86	0.06	5.01	4.91	5.11	1.63	0.96
C2:C3	2.79	2.57	1.97	0.40	0.37	2.47	2.19	2.41	0.36	0.48

¹Calves (30 d): calves raised from 4 – 30 d (n = 6/treatment);

²Calves (60 d): calves raised from 4 – 60 d (n = 15/treatment);

³Means followed by “a”, “b” lowercase letters represent statistical difference between treatments ($P < 0.05$; Tukey test).

Table 7. Empty body weight (kg); weight of internal organs and viscera and intestines length of dairy calves fed bulk tank milk (BTM), waste milk (WM), and pasteurized waste milk (PWM) in two different periods

Item	Calves (30 d) ¹			SEM	<i>P</i> – value ³	Calves (60 d) ²			SEM	<i>P</i> – value ³
	BTM	WM	PWM			BTM	WM	PWM		
Empty BW (kg)	51.81	51.77	49.46	2.58	0.72	73.15	73.66	70.17	4.81	0.08
Organ weight (% of empty BW)										
Reticulo-rumen	0.65	0.73	0.71	0.036	0.28	1.06 b	1.26 a	1.24 a	0.181	0.01
Omasum	0.17	0.17	0.18	0.012	0.99	0.20	0.21	0.22	0.001	0.38
Abomasum	0.52	0.53	0.60	0.028	0.11	0.50	0.48	0.49	0.002	0.33
Small intestine	3.63	3.66	3.28	0.148	0.18	2.94	2.69	3.02	0.071	0.06
Large intestine	1.06	1.8	1.03	0.042	0.07	1.21	1.17	1.19	0.011	0.79
Bladder	0.07	0.08	0.08	0.005	0.38	0.06	0.07	0.07	0.001	0.07
Liver	2.55	2.57	2.58	0.089	0.97	2.15 b	2.29 a	2.34 a	0.012	< 0.01
Spleen	0.38	0.47	0.56	0.053	0.11	0.52	0.51	0.57	0.021	0.19
Kidneys	0.49	0.50	0.56	0.034	0.40	0.47	0.51	0.52	0.003	0.11
Pancreas	0.06	0.07	0.07	0.003	0.14	0.08	0.08	0.08	0.001	0.38
Heart	0.68	0.71	0.72	0.026	0.60	0.63	0.63	0.66	0.003	0.09
Omental fat	0.41	0.40	0.39	0.034	0.97	0.61 a	0.53 a	0.46 b	0.009	< 0.01
Perirenal fat	0.63	0.62	0.50	0.064	0.22	0.82 a	0.61 a	0.48 b	0.011	< 0.01
Mesenteric fat	0.51	0.55	0.47	0.025	0.11	0.57	0.51	0.51	0.006	0.27
Tongue	0.43	0.44	0.46	0.014	0.26	0.47	0.45	0.47	0.001	0.46
Length (m)										
Small intestine	23.07	22.84	21.97	0.842	0.62	22.96	23.02	23.46	2.461	0.97
Large intestine	2.58	2.68	2.62	0.121	0.83	3.09	3.15	3.24	0.131	0.78

¹Calves (30 d): calves raised from 4 – 30 d (n = 6/treatment);

²Calves (60 d): calves raised from 4 – 60 d (n = 15/treatment);

³ Means followed by “a”, “b” lowercase letters represent statistical difference between treatments (*P* < 0.05; Tukey test).

Table 8. Gastrointestinal tract development of dairy calves fed bulk tank milk (BTM), waste milk (WM), and pasteurized waste milk (PWM) in two different periods

Item ¹	Calves (30 d) ²			SEM	P – value	Calves (60 d) ³			SEM	P – value
	BTM	WM	PWM			BTM	WM	PWM		
Height (µm)										
Ruminal papillae DS	199.52	170.95	222.42	40.54	0.62	235.97	209.69	258.32	52.9	0.37
Ruminal papillae VS	140.74	191.46	128.61	29.18	0.27	219.86	263.13	233.41	61.9	0.23
Omasum papillae	138.48	179.04	190.81	23.98	0.32	205.41	219.65	213.52	56.7	0.89
Duodenum villi	151.88	126.51	140.15	11.65	0.31	136.87	160.88	144.05	8.86	0.09
Ileum villi	139.89	114.01	119.27	9.12	0.14	134.94	144.23	138.75	8.16	0.61
Area (µm²)										
Ruminal papillae DS	30.79	26.02	43.98	10.58	0.44	50.14	40.49	65.34	4.62	0.71
Ruminal papillae VS	15.90	33.17	20.93	6.47	0.18	34.98	43.12	33.09	4.11	0.56
Omasum papillae	12.19	19.66	21.86	3.67	0.20	26.41	32.91	26.34	2.03	0.41
Duodenum villi	7.83	5.65	5.81	0.74	0.15	5.29	7.48	6.71	0.42	0.14
Ileum villi	6.31	4.77	5.58	0.73	0.35	6.07	6.66	7.05	3.72	0.41
Crypt depth										
Abomasum	114.79	94.18	111.17	9.76	0.29	99.27	110.64	108.77	5.6	0.54
Depth gland (µm)										
Abomasum	96.03	75.61	80.62	9.98	0.35	62.54	63.59	70.54	13.21	0.38
Duodenum	93.03	96.10	80.75	7.07	0.29	102.79	92.11	108.67	7.66	0.32
Ileum	85.38	78.05	92.44	7.89	0.45	84.32	86.09	96.72	3.41	0.17
Colon	389.95	392.63	352.79	19.57	0.30	363.03	351.56	330.52	24.9	0.24
Cell proliferation (n°)										
Abomasum	1.01	0.60	0.16	0.47	0.48	1.9	0.91	1.54	0.24	0.39
Duodenum	22.66	22.83	17.66	3.19	0.45	18.43	20.08	25.47	1.26	0.24
Ileum	15.00	11.83	12.33	2.26	0.58	14.21	14.14	16.53	0.72	0.61
Colon	8.83	3.75	7.16	1.50	0.11	4.54	6.69	5.69	0.17	0.41
Mitotic index (%)										
Rumen DS	0.59	0.54	0.46	0.16	0.84	0.46	0.47	0.49	0.07	0.96
Rumen VS	0.67	0.45	0.44	0.13	0.53	0.69	0.65	0.67	0.09	0.93
Omasum	0.99	0.86	1.01	0.17	0.81	0.85	0.91	0.92	0.11	0.82

¹DS: dorsal rumen sac and VS: ventral rumen sac;

²Calves (30 d): calves raised from 4 – 30 d (n = 6/treatment);

³Calves (60 d): calves raised from 4 – 30 d (n = 15/treatment).

1 **Table 9.** Prevalence of resistant fecal *Escherichia coli* isolates of dairy calves fed bulk tank milk (BTM, n = 15), waste milk (WM, n = 15), and
 2 pasteurized waste milk (PWM, n = 15) at 3, 30, and 60 days of age

Item ¹	BTM ²			WM ²			PWM ²			SEM	P – value ²		
	Day 3, %	Day 30, %	Day 60, %	Day 3, %	Day 30, %	Day 60, %	Day 3, %	Day 30, %	Day 60, %		T	D	T x D
AMO	24.92 Aa	11.11 Bb	16.66 Bb	44.44 Ab	67.74 Aa	55.88 Aa	37.51 Ab	72.72 Aa	55.00 Aa	3.27	0.05	0.03	< 0.01
AMP	29.26 Aa	11.11 Bb	14.28 Bab	41.66 Ab	70.96 Aa	55.88 Aab	25.00 Ab	72.72 Aa	50.00 Aa	3.98	0.04	0.04	< 0.01
CEF	0.00 A	2.77 B	0.00 B	5.55 A	48.38 A	32.35 A	7.50 A	57.57 A	30.00 A	5.76	0.03	0.54	< 0.01
FLO	0.00	2.77	2.38	0.00	3.22	5.88	0.00	18.18	10.00	3.84	0.99	0.21	0.14
ENR	2.43 Aa	0.00 Ba	2.38 Ca	5.55 Ab	58.06 Aa	58.82 Aa	2.50 Ac	75.75 Aa	40.00 Bb	4.49	0.04	0.62	< 0.01
STR	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-	-	-	-
TET	53.65 Aa	41.66 Ba	42.85 Ba	66.66 Ab	96.77 Aa	70.58 Ab	45.00 Ab	96.96 Aa	75.00 Aa	6.39	0.02	0.57	< 0.01

3 ¹AMO: amoxicillin-clavulanic acid; AMP: ampicillin; CEF: ceftiofur; FLO: florfenicol; ENR: enrofloxacin; STR: streptomycin and TET: tetracycline;

4 ²Percentage of resistant *E.coli* based on the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008, 2013, 2014);

5 ³T: treatment effect; D: day effect and T x D: treatment by day interactions. Means followed by “a”, “b” lowercase letters representing statistical
 6 difference between time (days). While the means followed by “A”, “B” uppercase letters represent differences between treatments. ($P < 0.05$;
 7 Tukey test.