

**Resistência a antimicrobianos em contexto de explorações
pecuárias de produção de alimentos para consumo humano
localizadas em Viana do Castelo – A importância da abordagem
“*One Health*” na Promoção da Saúde**

VI Curso de Mestrado em Promoção da Saúde

Ana Filipa da Costa Fernandes Gouveia

Setembro de 2024

**Resistência a antimicrobianos em contexto de explorações
pecuárias de produção de alimentos para consumo humano
localizadas em Viana do Castelo – A importância da abordagem
“*One Health*” na Promoção da Saúde**

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Promoção da Saúde, realizada sob a orientação científica de Professora Doutora Susana Viegas e Professora Doutora Carla Viegas.

Setembro de 2024

Agradecimentos

Os procedimentos laboratoriais foram realizados no laboratório de Microbiologia do H&TRC-ESTeSL (<https://www.estesl.ipl.pt/investigar/HTRC>), no âmbito na área de investigação Saúde Pública e Ocupacional. A investigação foi suportada pelo Instituto Politécnico de Lisboa, Lisbon, Portugal for funding the Projects IPL/IDI&CA2024/WWTPSValor_ESTeSL e IPL/IDI&CA2024/MycoSOS_ESTeSL.

Agradeço às minhas orientadoras por me terem confiado este tema desafiante e emergente em Saúde Pública.

Agradeço à Unidade de Saúde Pública do Alto Minho da Unidade Local de Saúde do Alto Minho EPE pela possibilidade de desenvolver este trabalho.

Agradeço a todos os proprietários das explorações pecuárias pela sua colaboração em todos os momentos.

Resumo

Introdução

A resistência a antibióticos e antifúngicos representa um problema de saúde humana, animal e ambiental. O impacto da resistência antimicrobiana é evidente no presente, mas também nas projeções futuras, ameaçando a vida de milhares de pessoas. Os principais promotores da resistência antimicrobiana são as alterações climáticas e o uso desadequado de antibióticos e antifúngicos em pecuária e na agricultura. O presente trabalho tem como objetivo realizar um diagnóstico de situação sobre a resistência a antimicrobianos em explorações pecuárias de bovinos produtores de alimentos, considerando uma abordagem *One Health* no Alto Minho. Este diagnóstico será concretizado com a avaliação qualitativa e quantitativa de microrganismos resistentes em amostras ambientais e das práticas que contribuem para a resistência antimicrobiana. Pretende-se identificar que medidas de Promoção de Saúde podem ser adotadas envolvendo os intervenientes (produtores e profissionais de saúde pública).

Metodologia

Amostras ambientais de *Electrostatic Dust Cloth*, camas, rações e esfregaços (n= 57) foram alvo de extração e posterior caracterização da carga biológica viável recorrendo a inoculação, quantificação e identificação de fungos e bactérias. A contaminação fúngica incluiu também a identificação de complexos do género *Aspergillus*, triagem de resistência a azóis relevantes para a saúde humana (itraconazol, voriconazol e posaconazol). No que concerne à contaminação bacteriana foi incluída quantificação de bactérias totais e Gram-negativas e identificação de colónias suspeitas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina. A caracterização contextual das explorações pecuárias consistiu na elaboração e preenchimento de um instrumento de recolha de dados por observação e entrevista aos proprietários das explorações pecuárias.

Resultados

Este estudo identificou espécies fúngicas da lista de patógenos prioritários da OMS com potencial para causar infeção em pessoas e animais: *Aspergillus fumigatus*, Mucorales e *Fusarium* sp. Em meios suplementados com azóis cresceram Mucorales, *C. sitophila* e *Geotrichum* sp. A nível bacteriano foram identificadas colónias suspeitas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina em *Electrostatic Dust Cloth*. Os esfregaços e os *Electrostatic Dust Cloth* foram as matrizes com concentrações maiores de bactérias e fungos. *Aspergillus* complexos *Fumigati*, *Flavi*, *Nigri*, *Aspergilli*, *Nidulantes* e *Restricti* foram detetados em amostras ambientais.

Discussão/Conclusões

A deteção de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e espécies fúngicas de importância crítica em amostras ambientais de explorações pecuárias suportam a necessidade de atividades de Promoção da Saúde neste contexto. As descobertas enfatizam a necessidade de uso responsável de antimicrobianos para conter o desenvolvimento de resistência a antibióticos e antifúngicos.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, Fungos, Azóis, Alterações climáticas, One Health

Abstract

Introduction

Resistance to antibiotics and antifungals represents a human, animal, and environmental health problem. The impact of antimicrobial resistance is evident in the present, but also in future projections, threatening the lives of thousands of people. The main promoters of antimicrobial resistance are the climate change and the inappropriate use of antibiotics and antifungals in livestock and agriculture. The present work aims to conduct a situation diagnosis on antimicrobial resistance in food-producing cattle farms, considering a One Health approach in Alto Minho. This diagnosis will be achieved with the qualitative and quantitative assessment of resistant microorganisms in environmental samples and practices that contribute to antimicrobial resistance. The objective is to identify which Health Promotion measures can be adopted by involving the relevant stakeholders (producers and public health professionals).

Methodology

Environmental samples of Electrostatic Dust Cloth, bedding, feed, and swabs (n= 57) were subject to extraction and subsequent characterization of the viable biological load using inoculation, quantification and identification of fungi and bacteria. The fungal contamination included the fungal identification and quantification, the detection of *Aspergillus* sections, screening for resistance to azoles relevant to the human health (itraconazole, voriconazole and posaconazole). Regarding to the bacterial contamination, quantification of total and Gram-negative bacteria and identification of suspected methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonies were included. The contextual characterization of livestock farms involved the preparation and completion of a data collection instrument through observation and interviews with dairy farm owners.

Results

This study identified fungal species on the WHO list of priority pathogens with the potential to cause infection in people and animals: *Aspergillus fumigatus*, Mucorales and *Fusarium* sp. In media supplemented with azoles, it was observed the growth of Mucorales, *C. sitophila* and *Geotrichum* sp.. At the bacterial level, suspicious colonies of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* were identified in Electrostatic Dust Cloth. Swabs and Electrostatic Dust Cloth were the matrices with the highest concentrations of bacteria and fungi. *Aspergillus* section *Fumigati*, *Flavi*, *Nigri*, *Aspergilli*, *Nidulantes* and *Restricti* were detected in environmental samples.

Discussion/Conclusions

The detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and critically important fungal species in environmental samples from livestock farms supports the conclusion that Health Promotion activities are required in this context. The findings emphasize the need for responsible use of antimicrobials to curb the development of antibiotic and antifungal resistance by following a One Health approach.

Keywords: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Fungi, Azoles, Climate change, One Health

Índice

Agradecimentos.....	2
Resumo	3
Lista de figuras	7
Lista de tabelas	8
1. Introdução.....	10
2. Enquadramento teórico	13
2.1. Conceito de resistência a antimicrobianos.....	13
2.2. Dados sobre resistência antimicrobiana	14
2.3. Promotores da resistência antimicrobiana	16
2.4. Alterações climáticas.....	18
2.5. Resistência fúngica	20
2.5.1. Antifúngicos	22
2.6. Patogénicos prioritários da OMS.....	24
2.6.1. <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina	26
2.6.2. <i>Aspergillus</i> sp.	28
2.7. Contaminação e resistência antimicrobiana em contexto de produção animal.....	30
2.8. <i>One Health</i>	34
3. Metodologia	36
3.1. Questão de investigação	36
3.2. Objetivos.....	36
3.3. Hipóteses.....	37
3.4. Desenho de estudo	38
3.4.1. Instrumentos de recolha de dados	38
3.4.2. Seleção, aceitação na participação das explorações e questões éticas	38
3.4.3. Pesquisa bibliográfica.....	39
3.4.4. Instrumento de recolha de dados contextuais das explorações	40
3.4.5. Campanha de amostragem	41
3.4.6. Procedimentos laboratoriais	44
3.5. Análise estatística.....	46

4.	Resultados.....	47
4.1.	Caraterização amostra	47
4.2.	Contaminação bacteriana viável	52
4.2.1.	EDC e ECDT	52
4.2.2.	Camas após o uso e rações.....	53
4.2.3.	Esfregaços.....	54
4.3.	Contaminação fúngica viável	55
4.3.1.	EDC e EDCT	55
4.3.2.	Camas após o uso e rações.....	56
4.3.3.	Esfregaços de superfícies	56
4.4.	Quantificação e identificação/diversidade fúngicas	57
4.5.	Complexos de <i>Aspergillus</i> identificadas nas matrizes	58
4.6.	Crescimento fúngico e resistência fúngica em meios suplementados com azóis	59
4.7.	Estudo da diversidade fúngica: índices de Shannon e Simpson	60
4.8.	Pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina (MRSA).....	61
4.9.	Estudo da relação de variáveis	62
5.	Discussão	62
6.	Conclusão.....	72
7.	Recomendações e proposta de trabalhos futuros	74
	Referências bibliográficas	75
	Apêndice I: Consentimento Informado.....	88
	Apêndice II: Declaração de anonimato e sigilo	96
	Apêndice III: Parecer Final da CEENSP	97
	Apêndice IV: Grelha de observação.....	100
	Apêndice V: Plano de análise de variáveis	110
	Apêndice VI: Avaliação quantitativa e qualitativa de fungos.....	112
	Apêndice VII: Diversidade e prevalência fúngica em meios suplementados com azóis	113
	Apêndice VIII: Índices de Shannon e Simpson	114
	Apêndice IX: MRSA.....	115
	Apêndice X: Estudo da relação de variáveis.....	116

Índice de figuras

Figura 1: Percentagem de isolados resistentes de MRSA em Portugal em 2022; Fonte: Atlas dos dados de vigilância e doenças para resistência antimicrobiana do ECDC; Fonte: ECDC, 2022 ¹¹⁵	27
Figura 2: One Health e área de trabalho; Fonte: Agência Europeia do Ambiente ¹⁵⁰	34
Figura 3: Pontos de amostragem; Fonte: Investigadora	43
Figura 4: Soma de animais registados por espécie a 31 de dezembro de 2023 (Fonte: DGAV)	47
Figura 5: Frequência higienização de utensílios	48
Figura 6: Frequência higienização de bebedouros	49
Figura 7: Frequência higienização de comedouros	49
Figura 9: Frequência higienização de outros espaços (ex. sala de ordenha e tanque leite)	49
Figura 9: Utilização de antibióticos entre janeiro e dezembro de 2023	51
Figura 10: Frequência de formação sobre fatores de risco de disseminação de agentes fúngicos pelos trabalhadores das explorações pecuárias	51
Figura 11: Utilização de equipamentos de proteção individual durante tarefas de trabalho	51
Figura 12: Valores medianos de bactérias totais (TSA) e Gram-negativas (VRBA e MAC) do EDC (UFC/m ² /dia)	52
Figura 13: Valores medianos de bactérias totais (TSA) e Gram-negativas (VRBA e MAC) em EDCT (UFC/m ² /dia ¹)	53
Figura 14: Valores medianos de bactérias totais (TSA) e Gram-negativas (VRBA e MAC) em camas (CFU/g/dia)	53
Figura 15: Valores medianos de bactérias totais (TSA) e Gram-negativas (VRBA e MAC) rações (CFU/g/dia)	54
Figura 16: Valores medianos de bactérias totais (TSA) e Gram-negativas (VRBA e MAC) (CFU/m ²) em swabs de superfícies organizadas por sistema de produção	54
Figura 17: Valores medianos de bactérias totais (TSA) e Gram-negativas (VRBA e MAC) (CFU/m ²) em swabs de superfícies	54
Figura 18: Valores medianos de fungos de amostras de EDC (UFC/m ² /dia ¹) inoculadas em MEA e DG18 a 27°C	55
Figura 19: Valores medianos de fungos de amostras de EDCT (UFC/m ² /dia ¹) inoculadas em MEA e DG18 a 27°C	55
Figura 20: Valores medianos de fungos de amostras de camas e rações (CFU/g ¹) inoculadas em MEA e DG18 a 27°C e 37°C	56
Figura 21: Valores medianos de fungos de amostras de esfregaços de superfícies (CFU/m ²) inoculadas em MEA e DG18	57
Figura 22: Distribuição dos complexos de Aspergillus em MEA e DG18 (27° e 37°C) em EDC, camas, rações e esfregaços colhidos em diferentes áreas das cinco explorações pecuárias	59

Índice de tabelas

Tabela 1: Principais azóis de uso clínico; Fonte: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) ⁹⁷	23
Tabela 2: Lista de patógenos bacterianos e fúngicos prioritários; Fonte OMS ^{45,46}	24
Tabela 3: Fungos prioritários com reservatório ambiental (exemplos); Fonte: Lista de patógenos fúngicos prioritários da OMS para orientar pesquisa, desenvolvimento e ação de saúde pública, OMS, 2022 ⁴⁵	25
Tabela 4: Principais bactérias e fungos associados a doença relacionada com profissionais da saúde animal (veterinários, agricultores); Fonte: Exposição a agentes biológicos e problemas de saúde relacionados em ocupações relacionadas com animais, OSHA-UE, 2019 ^{135,138}	31
Tabela 5: Distribuição de amostras em cada exploração pecuária.	42
Tabela 6: Informação contextual das explorações pecuárias avaliadas	48
Tabela 7: Valores mínimo, máximo, médio e mediana do efetivo pecuário das explorações analisadas	48
Tabela 8: Constituição das rações em cada exploração	50
Tabela 9: Plano de análise de variáveis; Fonte: Investigadora	110
Tabela 10: Distribuição de fungos em MEA e DG18 de amostras de EDC, camas, rações e esfregaços colhidos em diferentes áreas das cinco explorações pecuárias.	112
Tabela 11: Diversidade fúngica na triagem de azol por tipo de produção, em camas e rações (g/dia), esfregaços (UFC/m ²), EDC (UFC/m ² /dia ¹)	113
Tabela 12: Análise da biodiversidade: Índices de Shannon e Simpson	114
Tabela 13: Detecção de amostras suspeitas de MRSA em EDC e EDCT	115
Tabela 14: Estudo da relação da contaminação bacteriana, fúngica e resistência fúngica com a frequência de higienização e de utilização de antibióticos e antifúngicos. Resultados do coeficiente de correlação de Spearman.....	116
Tabela 15: Estudo da relação da contaminação bacteriana, fúngica e resistência fúngica com o tipo de produção e sistema de exploração. Resultados do teste de Mann-Whitney U	116
Tabela 16: Estudo da relação entre contaminação bacteriana, fúngica e resistência fúngica. Resultados do coeficiente de correlação de Spearman	117

Lista de siglas e acrónimos

DG18 – Ágar dicloran-glicerol

DGAV – Direção-Geral da Alimentação e Veterinária

ESVAC – *European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption*

IFI – Infecções Fúngicas Invasivas

ITZ – Itraconazol

MAC – *MacConkey agar*

MEA – Ágar extrato de malte

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina

ODS – Objetivos de Desenvolvimento Sustentável

OMS – Organização Mundial da Saúde

PEPAC – Plano Estratégico da Política Agrícola Comum

PFF – Produtos fitofarmacêuticos

PCZ – Posaconazol

SPSS – *Statistical Package for Social Science*

TSA – Ágar tríptico soja

UE – União Europeia

VCZ – Voriconazol

VRBA – Ágar bile vermelho violeta

1. Introdução

O aumento emergente e constante aparecimento de microrganismos resistentes a múltiplas opções terapêuticas é uma das ameaças globais da atualidade e futuras para a Saúde Pública devido à falta de opções terapêuticas viáveis para tratar certas infecções em humanos e animais. Trata-se de um problema sem fronteiras, afetando todos os continentes, com um efeito devastador em termos de morbidade e mortalidade e custos socioeconômicos elevados para os serviços de saúde¹⁻⁹.

As infecções associadas a bactérias e fungos são uma preocupação crescente de saúde pública global agravadas pela resistência microbiana. A resistência microbiana é impulsionada, em grande medida, pelo uso inadequado de antibióticos e antifúngicos na atividade de produção de animais para consumo humano. Bactérias e fungos resistentes aos antimicrobianos podem ser detetados em pessoas, animais, alimentos, plantas e em todos os reservatórios ambientais (na água, no solo e no ar). A transmissão de microrganismos resistentes acontece em contexto nosocomial, comunitário, e zoonótica, ou seja, em contexto de cuidados de saúde, de pessoa para pessoa, ou entre pessoas e animais, através de contato direto, a partir do consumo de alimentos de origem animal, por meio da cadeia alimentar e inalação¹⁰.

São fatores identificados como promotores do aumento de resistência antimicrobiana à escala global as alterações climáticas e fatores ambientais como o acesso escasso a água potável, saneamento, condições precárias de prevenção e controlo de infeções e doenças em estabelecimentos de saúde e explorações pecuárias, acesso precário a medicamentos, vacinas e diagnósticos de qualidade e incumprimento de requisitos legais¹¹⁻¹⁴.

Na indústria pecuária a resistência antimicrobiana contribui para a queda na produção atribuível a infeções por bactérias e fungos resistentes, impactando no aumento da morbidade e mortalidade dos animais, colocando em perigo a sua saúde e bem-estar, afetando a sua produtividade, atingindo economicamente o setor agrícola e a segurança de toda a cadeia alimentar^{12,15}. O uso em subdoses e doses excessivas, ou em períodos de tempo desadequado de antimicrobianos na agropecuária é um dos fatores que mais influenciam o aumento da incidência de resistência antimicrobiana no contexto da saúde humana. De referir que os mesmos agentes patogénicos afetam o Homem e os animais e ambos utilizam os mesmos tratamentos¹⁶⁻¹⁹.

A resistência antimicrobiana tem sérias implicações na segurança alimentar pois o uso de antimicrobianos na produção de animais para consumo humano, e no seu ambiente, contribui para o surgimento de microrganismos resistentes na cadeia alimentar e constitui uma preocupação em saúde pública. A presença de bactérias e fungos resistentes em sistemas de produção agrícola e cadeias alimentares é uma via potencial de exposição através da alimentação^{1,20,21}.

Ao nível ambiental, a atividade pecuária através da aplicação de resíduos orgânicos para fertilizar os solos agrícolas contribuiu para o desenvolvimento da resistência antimicrobiana através da propagação de bactérias resistentes e dos seus genes no ambiente (solo e aquíferos), contribuindo para a contaminação da cadeia alimentar²²⁻²⁴.

No cenário atual de alterações climáticas prevê-se o aumento do uso destes produtos químicos e a consequente probabilidade de aumento de fungos resistentes. A aplicação de fungicidas, mais precisamente azóis, na agricultura está associado a doença fúngica em humanos em toda a Europa. Os azóis são usados igualmente na clínica no tratamento de doenças provocadas por fungos^{6,25}.

Adicionalmente, as infeções fúngicas recebem menos de 1,5% de todo o financiamento para pesquisas sobre doenças infecciosas e a literatura identifica lacunas de conhecimento sobre a carga global de infeções fúngicas e da sua resistência. As infeções fúngicas afetam principalmente os indivíduos mais suscetíveis que apresentam comorbidades ou sistema imunológico enfraquecido, como por exemplo idosos, crianças e pessoas com diabetes, cancro, entre outros²⁶.

A resistência antimicrobiana, a segurança alimentar, alterações climáticas e promoção da saúde são alguns dos temas de intervenção da *One Health*. A resistência antimicrobiana é considerada a terceira maior ameaça atual para a Saúde Pública e para a conquista dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da Organização das Nações Unidas (ONU)²⁷.

Este é um tema que merece um especial enfoque em Promoção da Saúde por contribuir com conhecimento para a promoção da literacia e educação para a saúde de todos os agentes envolvidos na atividade de produção animal por ser uma atividade económica que contribui para a resistência antimicrobiana caso a utilização de antibióticos e fungicidas não seja realizada de forma criteriosa. O presente trabalho tem como objetivo realizar um diagnóstico de situação sobre a resistência a antimicrobianos em explorações pecuárias de bovinos produtores de alimentos, considerando uma abordagem *One Health*. Este diagnóstico será concretizado com a caracterização da

presença de bactérias e fungos resistentes a antimicrobianos em amostras ambientais recolhidas em explorações pecuárias de produção bovina destinadas à produção de alimentos para consumo humano num concelho da região do Alto Minho. Este estudo exploratório permitirá também caraterizar a situação e conhecer as práticas que podem contribuir para a resistência antimicrobiana na atividade produção de animais e identificar que medidas de promoção de saúde podem ser adotadas envolvendo os intervenientes (produtores e profissionais de saúde pública).

2. Enquadramento teórico

2.1. Conceito de resistência a antimicrobianos

A resistência antimicrobiana é definida como a capacidade de microrganismos (bactérias, fungos, vírus ou parasitas) de resistir à ação de um agente antimicrobiano. Esta resistência acontece como adaptação do microrganismo ao seu ambiente ou à ação de um antimicrobiano²⁸⁻³⁰. Os produtos antimicrobianos, onde se incluem os antibióticos e antifúngicos, são substâncias cuja função é matar ou inibir o crescimento de bactérias e fungos para sanar infeções em pessoas, animais e plantas. A resistência antimicrobiana resulta numa redução ou eliminação da eficácia do agente antimicrobiano para resolver ou prevenir a infeção originada por um microrganismo. A resistência aos antibióticos é a capacidade das bactérias de enfrentar a ação de um antibiótico específico perdendo a capacidade de morte ou de impedir a sua multiplicação³¹⁻³⁴.

A resistência das bactérias a antibióticos e de fungos a antifúngicos, pode ser natural (resistência intrínseca ou inerente) ou originada por alterações genéticas (resistência adquirida). No caso específico das bactérias os genes que codificam a resistência aos antibióticos podem espalhar-se para outras bactérias através de uma troca de material genético (genes de resistência)³⁵.

As bactérias e fungos patogénicos resistentes sobrevivem na presença do antibiótico/antifúngico e continuam a crescer e a multiplicar-se, causando doenças mais prolongadas, ou mesmo a morte aos indivíduos infetados. As infeções causadas por bactérias e fungos resistentes podem exigir mais cuidados, bem como antibióticos alternativos mais caros, exige hospitalizações mais longas e também podem ter efeitos colaterais mais graves^{8,9,36}.

Quando uma bactéria ou fungo apresenta resistência a múltiplas classes de antimicrobianos é chamada de microrganismo multiresistente. A multiresistência é relevante para todos os microrganismos, incluindo bactérias responsáveis por infeções associadas aos cuidados de saúde, microrganismos responsáveis por infeções transmitidas pelos alimentos e pela água. São exemplos de bactérias multiresistentes relevantes para a saúde pública: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) resistente à metilicina (MRSA), Enterococos resistentes à vancomicina, Enterobacteriaceae produtoras de beta-lactamase de largo espetro, *Pseudomonas aeruginosa*

multirresistente e *Clostridium difficile*^{13,19}. Espécies fúngicas como *Aspergillus fumigatus* e *Mucorales* também estão associadas a elevada resistência a antifúngicos como os azóis³⁶⁻⁴⁶.

2.2. Dados sobre resistência antimicrobiana

A problemática da resistência antimicrobiana enquanto ameaça global grave e crescente à saúde humana e animal merece uma ação prioritária. Investir no controlo da resistência antimicrobiana é primordial para controlar os números estimados no impacto na saúde humana:

- Todos os anos 30-35 000 pessoas na União Europeia (UE) e 1,2 milhões de pessoas no mundo, morrem em resultado direta de uma infeção causada por bactérias resistentes aos antibióticos^{47,48}. Até 2050, o número de mortes mundiais associadas a resistência antimicrobiana poderá superar mais de 10 milhões por ano, mais do que o número estimado de mortes por cancro e diabetes^{11,46};
- O modelo de Planeamento Estratégico de Saúde Pública para a Resistência Antimicrobiana da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE), baseado em dados de sistemas de vigilância dos países da OCDE e da UE, prevê que todos os anos, até 2050, morram 79 mil pessoas (22 000 na UE), o que corresponde 2,4 vezes o número de mortes devido à tuberculose, gripe e VIH/SIDA combinados em 2020⁴⁹. Duas em cada três mortes devido a resistência antimicrobiana são na população com mais de 65 anos. Os jovens com menos de 20 anos correspondem a 4% dos afetados e 10% das infeções resistentes ocorrem em crianças com menos de 5 anos de idade⁴⁹;
- Um estudo que avaliou a carga global associada a infeções resistentes a medicamentos, em 88 combinações patógeno-medicamento, estimou que 1,27 milhões das mortes entre o total de 4,95 milhões de mortes foram diretamente atribuíveis à resistência aos antibióticos. Em 2019, a resistência antimicrobiana foi a terceira principal causa de morte, apenas sendo ultrapassada pela doença isquémica do coração e o acidente vascular cerebral^{50,51}.
- Cerca de duas em cada três infeções resistentes (69% na UE/EEE) são adquiridas em contexto comunitário e os restantes em contexto de cuidados de saúde⁴⁹.

- Significam um gasto para os sistemas de saúde e de perda de produtividade na ordem dos 1,5 biliões euros na Europa anualmente⁴⁹;
- A nível económico estarão na génese de uma redução do Produto Interno Bruto de 2% a 3,5% a nível mundial, o equivalente a um custo na ordem dos 100 biliões de dólares, até 2050⁵²;
- Em termos de dias adicionais de internamento por infeções resistentes, estima-se que mais de 32,5 milhões de dias nos países da OCDE, e mais de 9,5 milhões de dias adicionais de hospitalização nos países da UE/EEE, sejam provocados pela resistência antimicrobiana, todos os anos. O tratamento de complicações resultante da resistência antimicrobiana excede em 28,9 mil milhões de dólares por ano, ajustando a paridade do poder de compra nos países da OCDE⁴⁹;
- O impacto da resistência antimicrobiana na participação e produtividade da força de trabalho é estimado em 36,9 mil milhões de dólares, correspondendo a cerca de um quinto do Produto Interno Bruto de Portugal em 2020⁴⁹;
- Em termos financeiros, nos países da OCDE e UE/EEE, os custos anuais para os sistemas de saúde são estimados em aproximadamente 29 mil milhões de dólares em paridade do poder de compra (PPC). Especificamente para os sistemas de saúde europeus, a resistência antimicrobiana significa um custo estimado na ordem dos 11,7 mil milhões de euros por ano. Para Portugal estima-se que anualmente contribua com a morte de pelo menos 702 pessoas e custe ao SNS cerca de 106 milhões de euros⁴⁹;
- Nesta sequência a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2019, declarou a resistência antimicrobiana como uma das dez maiores ameaças mundiais para a saúde pública global ^{3,12}. Em 2022, a Comissão Europeia identificou a resistência antimicrobiana como uma das três mais relevantes ameaças para a saúde dos cidadãos europeus¹²;
- As infeções adquiridas em contexto de cuidados de saúde são responsáveis por cerca de uma em três infeções resistentes, mas significam mais de 60% das mortes relacionadas com a resistência antimicrobiana, embora representem apenas 31% do total de infeções resistentes. A resistência a *Escherichia coli* (*E. coli*) isoladamente representa cerca de um terço de todas as mortes causadas e *Klebsiella pneumoniae* é responsável por cerca de 21% de todas as mortes devido à resistência antimicrobiana. Em contraste, estirpes resistentes de *Salmonella* sp., *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* e *Mycobacterium tuberculosis* representam uma pequena percentagem da carga de resistência

antimicrobiana. As estirpes resistentes de *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *S. aureus* são as principais causas da carga de resistência antimicrobiana, causando quase três em cada quatro mortes devido a infecções resistentes². Em 2019, as proporções de resistência em doze combinações prioritárias de antibióticos e bactérias foram em média de 20% nos países da OCDE e 22% na UE/EEE o que que uma em cada cinco infecções é causada por bactérias multiressistentes ou superbactérias⁴⁹.

2.3. Promotores da resistência antimicrobiana

Em animais produtores de alimentos os antibióticos são usados no tratamento de infecções (terapia antimicrobiana) em animais diagnosticados com evidência clínica de doença infecciosa. No controlo da propagação de infecções (metafilaxia) através da administração de um medicamento a um grupo de animais, com o objetivo de tratar os animais clinicamente doentes e controlar a propagação da doença a animais em contato próximo e em risco e que já podem estar infetados subcl clinicamente (ou seja, ainda não apresentam sinais clínicos). Também é possível administrar antibióticos para prevenir infecções (profilaxia) a um animal ou grupo de animais antes dos sinais clínicos de uma doença, a fim de prevenir a ocorrência de doença ou infecção. Na Europa é proibido a administração de antibióticos com fins de promoção de crescimento, no entanto esta prática ainda ocorre em vários lugares do mundo. ⁵³⁻⁵⁶.

Em bovinos os antibióticos são usados para tratar doenças infecciosas como a mastites, doenças respiratórias, gastrointestinais e de pele, causadas por *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *E. coli*, *Salmonella* sp., *S. aureus* e *Streptococcus* sp. Na Europa, os macrolídeos e as lincosamidas são geralmente utilizados para o tratamento de diversas doenças infecciosas em bovinos (ex. mastites). As tetraciclina são utilizadas para tratar doenças respiratórias, gastrointestinais e de pele em bovinos. Os aminoglicosídeos e os beta-lactâmicos são as moléculas mais frequentemente utilizadas para tratar as mastites e podem permanecer não degradados no leite ou podem ser dispersos no meio ambiente através da aplicação de resíduos orgânicos no solo^{22,57,58}. Cerca de 90%

dos antibióticos são excretados nos resíduos fecais e podem parar no ambiente através da aplicação como fertilizantes orgânicos, através de processos como degradação, sorção em solos, lixiviação em massas de água ^{13,14}

O uso em demasia de antibióticos na pecuária foi um dos principais promotores da emergência e disseminação de resistência antimicrobiana em animais. Os animais são criados para consumo alimentar humano, e o facto deste mercado ter crescido substancialmente nos últimos anos, impulsionou a utilização de antibióticos na pecuária a nível global, para diminuir as infeções bacterianas nestas espécies^{4,5,8,19,59,60}.

A recolha de dados sobre a venda e utilização de antimicrobianos em animais é parte essencial na luta contra a resistência antimicrobiana. Estes dados permitem analisar e identificar tendências no consumo de antimicrobianos em todo o espaço europeu e fornecem dados sobre o impacto das medidas para promover a utilização prudente de agentes antimicrobianos em animais e ajuda a identificar potenciais ações a nível nacional e internacional para apoiar uma diminuição global da resistência antimicrobiana^{60,61}.

A pecuária é responsável pelo consumo de mais da metade de todo o uso de antibióticos, estimado em 131 109 toneladas e mais de 200 000 toneladas, respetivamente entre 2013 e 2030⁶². Estima-se que as vendas globais de antibióticos veterinários em animais produtores de alimentos tenham sofrido uma redução de média de 53% entre 2011 e 2022 (superior a 15% e até 68%)⁵⁶. Nos animais, entre 2000 e 2019, o consumo de antimicrobianos foi reduzido para metade, de 181 para 91 miligramas de antimicrobianos por quilograma de alimento animal e projeta-se que reduza mais 10% até 2035⁴⁹. A nível mundial, o consumo de antibióticos em animais produtores de alimentos é superior ao consumo em humanos, cerca de 73% do total das vendas⁶³. A nível da UE/EEE, em 2017, aproximadamente 70% das substâncias ativas dos agentes antimicrobianos foi vendida para utilização em animais destinados a alimentação humana⁵⁹.

A redução nas vendas de antibióticos contribui para um menor risco das bactérias se tornarem resistentes em pessoas e animais^{13,14}. Esta redução foi particularmente acentuada para os antimicrobianos da categoria B do Grupo de Peritos *ad hoc* de Aconselhamento Antimicrobiano (AMEG - importância crítica na medicina humana)⁶⁴. As vendas de classes de antibióticos considerados extremamente importantes na medicina humana para uso veterinário (por serem antibióticos particularmente importantes na mitigação do risco potencial para a saúde pública) diminuíram visivelmente: as cefalosporinas de 3.^a e 4.^a geração descenderam 49%, as polimixinas 81%, as fluoroquinolonas 25% e as quinolonas 90% categorização do AMEG^{60,64}.

Estes dados do *European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption* (ESVAC) evidenciam os progressos alcançados no cumprimento das metas estabelecidas na Estratégia do Prado ao Prato da Comissão Europeia, Plano de Ação para Poluição Zero^{65,66} e Pacto Ecológico pela Política Agrícola Comum (PEPAC). A Estratégia do Prado ao Prato estabelece a meta a atingir até 2030 de redução em 50% das vendas de antimicrobianos para animais de criação (inclui aquacultura)⁶⁷⁻⁷¹. Em Portugal, a utilização de antimicrobianos pela produção animal (ponderada pela unidade de correção de população - PCU) era superior à média europeia em 2018, 186 PCU, e média da UE-27 (118,3 PCU). Entre 2011 e 2016, as vendas de agentes microbianos aumentaram em 29%, contrastando com uma redução média de 20% na UE. Este objetivo será atingido através da implementação e desenvolvimento das intervenções “Bem-estar animal e uso racional de antimicrobianos” e “agricultura biológica” da PEPAC⁶⁸.

O relatório da *Joint Interagency Antimicrobial Consumption and Resistance Analysis* (JIACRA), da qual fazem parte o Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças (ECDC), a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) e a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) dos anos 2019 e 2021, seguindo a abordagem *One Health*, evidenciou entre outras conclusões que a resistência bacteriana em humanos pode estar ligada à resistência bacteriana em animais produtores de alimentos, e a origem pode ser a alimentação, ou seja, a resistência antimicrobiana diminuiu em países que reduziram o uso de antibióticos em humanos e animais^{53,55,72,73}.

2.4. Alterações climáticas

As alterações climáticas têm influência na dispersão geográfica, sazonalidade, reprodução de bactérias e fungos que estão na origem das doenças infecciosas. A vulnerabilidade da população induzida pelas alterações climáticas e a pressão sobre o abastecimento alimentar podem impactar no aumento do consumo e gestão de antibióticos e antifúngicos, aumentando a probabilidade de aparecimento de microrganismos resistentes e a dispersão para novas latitudes^{59,74}. A evidência sugere que a incidência e a distribuição geográfica das infeções bacterianas e fúngicas estão a expandir globalmente devido às alterações climáticas^{7,75,76}.

O principal resultado das alterações climáticas é o aquecimento global. Este aquecimento, associado ao aumento da frequência de eventos climáticos extremos e secas tem efeitos adversos para a saúde humana e animal e nas culturas vegetais que

forneem alimentos tanto para animais como para as pessoas, podendo potenciar riscos de segurança alimentar. É relevante o facto de os microrganismos serem ubíquos a todas as fases da cadeia alimentar e a contaminação por microrganismos poder ocorrer na fase de cultura (exploração agrícola) e pós-cultura (armazenagem e consumo)⁷⁵.

O aquecimento global está a aumentar a prevalência de agentes patogénicos fúngicos nas culturas e das doenças fúngicas nos seres humanos, à medida que os fungos se adaptam para sobreviver em temperaturas mais quentes. Evidências recentes mostram que temperaturas mais elevadas estão diretamente associadas a níveis mais elevados de resistência em *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *S. aureus*. As principais bactérias de origem alimentar e hídrica, como *Vibrio cholerae*, *Campylobacter* sp., *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp., *E. coli* e *Arcobacter* sp., apresentam cada vez mais resistência a antibióticos clinicamente importantes, facto preditor de que mesmo com as temperaturas mais elevadas se possa observar o aumento da prevalência de infeções microbianas, aumentando consequentemente a sua resistência global^{75,77}.

Prevê-se também que a utilização de fungicidas aumente devido ao cenário de alterações climáticas^{76,78}, principalmente em países como Portugal⁷⁹. Como se espera que as alterações climáticas alterem a distribuição geográfica dos microrganismos, os padrões de precipitação e humidade podem potenciar um aumento no uso, doses e frequência de aplicação de fungicidas e o seu consequente impacto nas massas de água superficiais e profundas⁷⁷. Os riscos microbiológicos devido às alterações climáticas estão diretamente relacionados com a segurança dos alimentos para consumo humano e animal, nomeadamente a contaminação por micotoxinas sendo os alimentos para consumo humano e animais produtores de alimentos uma grande preocupação^{76,80,81}. Nomeadamente, já foram detetadas na Europa novas espécies de fungos produtores de micotoxinas no milho e o aumento da contaminação por micotoxinas por fungos xerofílicos no milho na fase de pré-colheita⁸².

Os surtos de doenças fúngicas (blastomicose, coccidiomicose (febre do vale), histoplasmose e esporotricose) podem ocorrer em ambientes de cuidados de saúde e locais de trabalho nomeadamente após eventos climáticos extremos⁸³.

A evidência mostra que as alterações climáticas afetam as condições de vida dos animais de produção pecuária tornando-nos mais susceptíveis as doenças microbianas que afetarão a saúde e o bem-estar animal⁸⁴. Nomeadamente doenças, como a mastite aumentarão a sua incidência pelo que deverão ser implementadas medidas de mitigação e adaptação dos animais ao stresse térmico resultado do aquecimento global

pois como já foi referido altas temperaturas do ar e maior frequência de eventos climáticos extremos e secas podem afetar negativamente a saúde e o bem-estar animal^{75,78,84}.

2.5. Resistência fúngica

A resistência antifúngica é designada como a capacidade de crescer em concentrações de fármacos antifúngicos que interrompem o crescimento e/ou inibem a maioria dos isolados da espécie específica. Algumas espécies fúngicas apresentam resistência intrínseca ou primária a alguns antifúngicos específicos, devido à ligação ineficaz a alvos de fármacos e/ou atividades de efluxo observadas em todos os membros de uma determinada espécie. Por exemplo, todos os isolados de *Aspergillus* sp., *Candida krusei* e a maioria dos isolados de *Candida auris* são intrinsecamente resistentes ao fluconazol. Fungos ambientais como por exemplo, *Mucoromycota*, *Lomentospora* sp. e *Paecilomyces* sp. são resistentes aos azóis. A resistência adquirida refere-se à aquisição de mecanismos de resistência que permitem que as células fúngicas cresçam em concentrações de fármacos antifúngicos mais altas do que os membros da população nativa. A tolerância antifúngica, também denominada de crescimento residual ou heterorresistência, define-se como a capacidade de uma subpopulação de células de um isolado suscetível crescer mais lentamente, na presença de concentrações de fármacos acima das concentrações inibitórias mínimas. A tolerância acontece como uma adaptação genética, fisiológica ou epigenética ao antifúngico^{6,83}. Um dos principais mecanismos de resistência das espécies fúngicas são os associados a mutações no gene *cyp51A* e a mutação TR 34/L98H descrita em isolados clínicos e ambientais em Portugal e na Europa^{25,85}. A resistência e os mecanismos envolvidos no desenvolvimento e transmissão diferem em parte dos observados nas bactérias. Não há evidências neste momento de transferência horizontal de genes ao contrário das bactérias.

A resistência a antifúngicos representa sérios riscos para os seres humanos, bem como para a saúde animal, vegetal e até ambiental. Apesar da crescente preocupação, e a incidência de doenças fúngicas ser elevada as infeções fúngicas ainda estão pouco estudadas. As infeções fúngicas são das causas de morte mais frequentes em todo o mundo apesar da dificuldade do seu diagnóstico, controlo e tratamento. São exemplos de doenças fúngicas mais conhecidas a micose e infeções vaginais (provocadas por *Candida*), pneumonias ambientais, ou seja, adquiridas na comunidade (exemplo

blastomicose, histoplasmose e coccidioidomicose ou febre do Vale), infecções provocadas por bolores existentes em ambientes internos ou externos (mucormicose e a aspergilose)^{86,87}.

No contexto desta ameaça à saúde global, as doenças fúngicas invasivas estão a aumentar globalmente e são consideradas uma grande ameaça à saúde global por serem das principais causas de mortalidade e incapacidade em todo o mundo, particularmente entre populações imunocomprometidas (doença pulmonar obstrutiva crónica, HIV/SIDA, cancro e diabetes)⁸⁸. A pandemia por coronavírus COVID-19 foi associada a um aumento na incidência de infecções fúngicas invasivas como aspergilose, mucormicose e candidemia. Estima-se que globalmente todos os anos^{21,87-89}.

- Infecções fúngicas invasivas provocadas por fungos da ordem Mucorales e dos géneros como *Cryptococcus* sp., *Candida* sp., *Aspergillus* sp., *Histoplasma* sp., *Fusarium* sp., *Coccidioides* sp. e *Paracoccidioides* são capazes de causar uma incidência estimada de 6 casos por 100.000 pessoas por ano, e também estão associadas a morbilidade e mortalidade substanciais em todo o mundo. Mais de 2 113 000 pessoas desenvolvem aspergilose invasiva no contexto de doença pulmonar obstrutiva crónica, cuidados intensivos, cancro do pulmão ou malignidade hematológica, com uma mortalidade anual bruta de 1 801 000 casos (85,2%);
- A incidência anual de aspergilose pulmonar crónica em números absolutos é de 1 837 272, com 340 000 mortes (18,5%). Cerca de 1 565 000 pessoas têm uma infeção sanguínea por *Candida* ou candidíase invasiva todos os anos, com 995 000 mortes (63,6%). A pneumonia por *Pneumocystis* afeta 505 000 pessoas, com 214 000 mortes (42,4%);
- A meningite criptocócica afeta 194 000 pessoas, com 147 000 mortes (75,8%);
- A asma fúngica por sua vez afeta aproximadamente 11,5 milhões de pessoas e pode contribuir anualmente para 46 000 mortes por asma;
- Em todo o mundo, a candidíase invasiva é responsável por cerca de 700 000 casos por ano, sendo geralmente tratada com equinocandinas e azóis. O número crescente dessas espécies também se deve à profilaxia prolongada ou terapia com agentes antifúngicos. Um exemplo de espécie resistente a várias ou todas as classes de antifúngicos disponíveis é *Candida auris*, que é considerada uma levedura emergente multirresistente, apresentando altas taxas de resistência ao fluconazol (87 – 100%);

- Estas estimativas sugerem uma incidência anual de 6,5 milhões de infecções fúngicas invasivas e 3,8 milhões de mortes;
- Em Portugal as infecções fúngicas invasivas (IFI), no período entre junho de 2013 e setembro de 2018 retratam os 52 casos de infecção fúngica invasiva por fungos filamentosos/dimórficos como *Aspergillus* sp. e *Candida* sp., mas fungos como *Mucor* sp., *Absidia* sp., *Fusarium* sp., *Paecilomyces* sp. também têm sido descritos verificando-se aumento destas espécies à resistência adquirida aos azóis. Outros fungos dimórficos endêmicos, como *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, também foram identificados e associados a IFI²⁶.

2.5.1. Antifúngicos

Os antifúngicos de uso clínico podem ser classificados em quatro classes de medicamentos sistémicos: azóis, equinocandinas, pirimidinas e polienos. O surgimento de fungos resistentes é uma grande preocupação para a saúde pública e deve-se à utilização dos antifúngicos, principalmente azóis, como terapia em infecções fúngicas humanas e na proteção das culturas agrícolas⁹⁰. Atualmente, na agricultura para controlar doenças da vinha e os cereais (ex. o míldio e a ferrugem) os azóis são usados em cerca de metade das culturas da UE. Na agricultura os fungicidas são usados para evitar ou controlar o crescimento fúngico em culturas alimentares e rações contaminadas como cereais, leguminosas, frutos de casca rija, podendo facilmente entrar na cadeia alimentar³⁹. Os azóis são igualmente utilizados na indústria das madeiras, e do papel, etc^{39,75,90}.

Os azóis impedem o crescimento do fungo e permanecem ativos na água, no solo e em frutas e vegetais por longos períodos o que pode resultar em efeitos ecológicos adversos⁹⁰. Além disso, o aumento do tempo de exposição dos fungos aos azóis aumenta a pressão de seleção de estirpes resistentes. Os azóis mais comuns utilizados na agricultura (epoxiconazol, difenoconazol, propiconazol, bromuconazol e tebuconazol) e de uso clínico (itraconazol, fluconazol e posaconazol - Tabela 1) possuem estruturas moleculares, modos de ligação e altos níveis de resistência cruzada (resistência a várias substâncias que possuem um mecanismo de ação semelhante) semelhantes, levando ao surgimento de estirpes resistentes e consequente exclusão destes compostos como primeira linha de tratamento de infecções fúngicas em animais e seres humanos. Os compostos mais comuns na UE são os imidazóis, triazóis, fluconazol e tebuconazol⁹¹.

Tabela 1: Principais azóis de uso clínico; Fonte: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)*

Azol	Tratamentos associados
Voriconazol	<i>Candida</i> sp., <i>Cryptococcus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Scedosporium apiospermum</i> (tratamento da aspergilose invasiva e da candidemia em pacientes não neutropênicos, infecções invasivas graves por <i>Candida</i> resistentes ao fluconazol (incluindo <i>C. krusei</i>). Tratamento de infecções fúngicas graves causadas por <i>Scedosporium</i> sp. e <i>Fusarium</i> sp.
Posaconazol	<i>Candida</i> sp., <i>Cryptococcus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., Mucorales e algumas outras leveduras e bolores (Aspergilose invasiva, Fusariose em pacientes com doença que é refratária à anfotericina B ou em pacientes intolerantes à anfotericina B iii) Cromoblastomicose e micetoma)
Itraconazol	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Candida</i> sp., <i>Histoplasma</i> sp., <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> , <i>Cladosporium</i> sp., <i>Blastomyces dermatitidis</i> e várias outras leveduras e fungos (aspergilose humana aguda e crônica incluem <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus terreus</i> e <i>Aspergillus niger</i>)

A exposição de fungos e leveduras clinicamente importantes aos fungicidas azólicos usados na agricultura resulta no surgimento de resistência cruzada aos azóis clínicos^{90,93}. O uso agrícola contribuiu para as taxas crescentes de infecções, nomeadamente por *Aspergillus fumigatus* resistentes a azóis, com taxas de resistência na Europa a azóis de 15–20%. O uso generalizado de fungicidas azólicos na agricultura para prevenir infecções fúngicas em culturas contribuiu para o aumento das taxas de aspergilose resistente (*Aspergillus fumigatus*) em humanos^{25,43,44,75,91,94,95}.

Os azóis enquanto produtos fitofarmacêuticos (PFF) são utilizados na agricultura na fase de pré-colheita, cultivo e pós-colheita para evitar a deterioração fúngica originada por leveduras e no tratamento de infecções em plantas. O uso extensivo de antifúngicos azólicos na agricultura resulta na contaminação do ar, das plantas e do solo visto que são aplicados diretamente no ambiente, potenciando maior pressão de seleção para resistência de patógenos zoonóticos em humanos e animais⁶. A presença de antifúngicos no meio ambiente constitui uma preocupação pela toxicidade que apresentam para os organismos vivos e contribuem para o aparecimento de fungos resistentes aos antifúngicos existentes na clínica e na agricultura. Estes produtos químicos interferem no aumento da resistência de fungos, ao reduzido número de antifúngicos existentes e dificultam o desenvolvimento de novos medicamentos antifúngicos⁹¹.

Em Portugal, em 2022, estavam autorizados para venda 1699 produtos fitofarmacêuticos. Destes os fungicidas representam 66% do total das vendas. O enxofre corresponde a 60% do valor total de fungicidas. Por grupo químico são vendidos em Portugal principalmente os benzimidazóis, imidazois e triazóis⁹⁶.

2.6. Patogénicos prioritários da OMS

A OMS enquanto a maior agência da saúde a nível global publica regularmente uma lista atualizada de patógenos prioritários de bactérias e fungos resistentes que representam uma ameaça para a saúde global e principalmente para populações mais susceptíveis.

Estas listas apresentam como objetivo fortalecer a resposta às infeções e à resistência aos antimicrobianos, auxiliando na pesquisa e no desenvolvimento de novos e eficazes tratamentos⁴⁵. As listas dividem as bactérias e fungos em três categorias de priorização: crítica, alta e média (Tabela 2)^{44,45}. As infeções causadas por patógenos bacterianos e fúngicos apresentam em comum uma carga global significativa de doenças. Os critérios, definições e níveis de priorização são a mortalidade, incidência, carga de saúde não fatal, tendência de resistência, transmissibilidade (evidência de transmissão da bactéria entre diferentes vias, como a transmissão entre humanos e compartimentos animais, alimentares e ambientais), evitabilidade nos cuidados de saúde, grau de severidade da doença causada, tratabilidade^{44,45,97}.

Tabela 2: Lista de patogénicos bacterianos e fúngicos prioritários; Fonte OMS^{44,45}

	Grupo de prioridade crítica	Grupo de prioridade alta	Grupo de prioridade média
Bactérias	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>carbapenem-resistant</i> <i>Enterobacterales</i> third-generation cephalosporin-resistant <i>Enterobacterales</i> carbapenem-resistant	<i>Salmonella</i> Typhi <i>fluoroquinolone-resistant</i> <i>Shigella</i> spp. <i>fluoroquinolone-resistant</i> <i>Enterococcus faecium</i> vancomycin-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> carbapenem-resistant Non-typhoidal <i>Salmonella</i> <i>fluoroquinolone-resistant</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> third-generation cephalosporin, and/or <i>fluoroquinolone-resistant</i> <i>Staphylococcus aureus</i> methicillin-resistant	Group A <i>Streptococci</i> macrolide-resistant <i>Streptococcus pneumoniae</i> macrolide-resistant <i>Haemophilus influenzae</i> ampicillin-resistant Group B <i>Streptococci</i> penicillin-resistant
	<i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Candida auris</i> <i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Candida albicans</i>	<i>Nakaseomyces glabrata</i> (<i>Candida glabrata</i>) <i>Histoplasma</i> sp. <i>Eumycetoma</i> causative agents <i>Mucorales</i> <i>Fusarium</i> sp. <i>Candida tropicalis</i> <i>Candida parapsilosis</i>	<i>Scedosporium</i> spp. <i>Lomentospora prolificans</i> <i>Coccidioides</i> spp. <i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>Candida krusei</i>) <i>Cryptococcus gattii</i> <i>Talaromyces marneffe</i> <i>Pneumocystis jirovecii</i> <i>Paracoccidioides</i> sp.

Na lista de agentes patógenos de alta prioridade estão as bactérias frequentemente identificadas em alimentos contaminados (*Salmonella* sp. e *Shigella* sp.) e a infecções persistentes e multirresistência em ambiente de cuidados de saúde (ex. *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Enterococcus faecium*).

Algumas espécies fúngicas mais resistentes a antifúngicos prioritárias estão associadas a contaminação de vários reservatórios ambientais e ocupacionais (Tabela 3). Destes reservatórios ambientais constam ambientes ocupacionais como atividades ligadas à produção animal, gestão de resíduos, produção de alimentos, entre outros. A exposição a estes patógenos ocorre principalmente através das vias aéreas, contato e ingestão. Espécies fúngicas filamentosas toxigênicas, enquanto fungos saprófitos nas matérias-primas de origem vegetal, como *Aspergillus* sp., e *Fusarium* sp. produzem toxinas naturais, as micotoxinas, como aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxina A, desoxinivalenol, zearalenona e alcalóides do ergot que representam uma preocupação para a saúde humana ou animal.^{98,99}

Tabela 3: Fungos prioritários com reservatório ambiental (exemplos); Fonte: Lista de patógenos fúngicos prioritários da OMS para orientar pesquisa, desenvolvimento e ação de saúde pública, OMS, 2022⁴⁴

<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fungo ambiental onipresente com distribuição global que pode provocar infecções invasivas como a aspergilose (reação alérgica, colonização e doença semi-invasiva até aspergilose invasiva aguda). É inalado do ambiente, causando predominantemente doenças pulmonares, mas pode disseminar para o sistema nervoso central. A aspergilose invasiva resistente aos azóis é uma doença potencialmente fatal e com mortalidade muito elevada. As taxas de mortalidade naqueles com infecção por <i>A. fumigatus</i> resistente a azóis são altas (47–88%). Os dados sobre o tempo total de hospitalização são 21–532 dias. A infecção por <i>A. fumigatus</i> resistente aos azóis continua a aumentar. A evitabilidade é alta.
<i>Histoplasma</i> a sp.	<i>Histoplasma</i> sp. são fungos dimórficos distribuídos globalmente que vivem como fungos no ambiente (solo, excrementos de pássaros e morcegos) com uma forma semelhante a levedura à temperatura corporal humana. A histoplasmose afeta particularmente pacientes imunossuprimidos (mortalidade variando de 21% a 53% em pacientes com HIV). <i>Histoplasma</i> sp. têm potencial para produzir surtos. A medicação de tratamento incluiu anfotericina B seguido de itraconazol, itraconazol. A resistência antifúngica é moderada.
<i>Mucorales</i>	Mucorales (Ordem) infetam particularmente pacientes imunocomprometidos, mas podem ocorrer naqueles com baixa diabetes <i>mellitus</i> controlado e aqueles que sofreram trauma, especialmente pele e tecidos moles lesões. A mucormicose invasiva é uma doença potencialmente fatal e com alta mortalidade (mortalidade que varia de 23% a 80% em pacientes adultos e até 72,7% em pacientes pediátricos). Trata-se de grande grupo e estão distribuídos globalmente, incluindo <i>Rhizopus</i> sp., <i>Mucor</i> sp., <i>Lichtheimia</i> sp., e outros. Podem infetar o hospedeiro humano após a inalação de esporos, produzindo mucormicose. Os Mucorales afetam os pulmões e seios da face, podendo espalhar-se para os olhos, sistema nervoso central e trato gastrointestinal. A taxa de incidência anual global tem vindo a aumentar. São inerentemente resistentes ao fluconazol, voriconazol e equinocandinas.
<i>Fusarium</i> sp.	São saprotróficos, identificados predominantemente no solo, na matéria orgânica decomposta e plantas. Fungos filamentosos distribuídos globalmente, mas ocorrem principalmente em regiões tropicais, identificados em natureza e com capacidade para infetar humanos causando fusariose. A fusariose invasiva é uma doença potencialmente fatal, com mortalidade variando de 43% a 67%. Têm resistência inata a muitos dos agentes antifúngicos disponíveis.

2.6.1. *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

Staphylococcus aureus resistente à meticilina (MRSA) integra o grupo de Alta Prioridade da OMS⁴⁵, enquanto agente patogénico “comunitário”. Efetivamente, a elevada morbilidade, mortalidade e custos de cuidados de saúde são subestimados e são uma preocupação devido à sua prevalência persistente e infeções potencialmente graves. Este agente patogénico está associado a uma das principais causas de infeções em cuidados de saúde e adquiridas na comunidade em todo o mundo. O estudo *Global Burden of Disease* relatou que, em países de rendimento elevado, aproximadamente 50% da carga fatal atribuída à resistência antimicrobiana está ligada a *S. aureus* e *E. coli*^{100–102}

S. aureus é uma bactéria Gram-positiva comensal ubíqua associada a uma série de infeções graves de pele, tecidos moles, sepsia, artrite, pneumonia, bacteremia e intoxicação alimentar, entre outras. Sabe-se que cerca de 30–40% da população está colonizada por essa bactéria. A colonização em animais de criação pode chegar a 50% em aves, 42% em porcos e 23% em bovinos. O problema deste importante patógeno humano está associado ao aumento de espécies altamente resistentes a antibióticos, como a resistência à meticilina, o seu principal antibiótico. *S. aureus* pode ser classificado em duas categorias distintas com base na sua suscetibilidade à meticilina: *S. aureus* suscetível à meticilina (MSSA) e o mais preocupante *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA). O principal mecanismo de resistência à meticilina deve-se à presença de um gene específico (*mecA*) que promove a síntese de proteínas de ligação à penicilina (PBP) com baixa afinidade por moléculas β -lactâmicas. O *S. aureus* pode ser multirresistente a antibiótica como meticilina, vancomicina (glicopeptídeo), daptomicina (lipopeptídeo), linezolid (oxazolidinona), tedizolida (anoxazolidinona), dalbavancina (lipopeptídeo), oritavancina (glicopeptídeo), ceftarolina (antibiótico β -lactâmico), ceftobiprole e carbapenémicos. Portanto, a descoberta e o desenvolvimento de novos agentes antibacterianos para controlar os vários mecanismos de resistência é um passo vital para abordar as infeções por *S. aureus* multirresistentes. Novas descobertas apresentam vários antibacterianos ativos de *S. aureus* multirresistentes como produtos naturais, feniltiazóis, oxazolidinonas, benzimidazóis, chalconas, quinazolinonas^{103–107}.

A bactéria *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) pode ser classificada como associado¹⁰⁸:

- Cuidados de saúde: HA - MRSA (*Hospital-Acquired MRSA*)
- Comunidade: CA - MRSA (*Community Associated Methicillin-resistant S. aureus*)
- Pecuária: LA - MRSA (*livestock-associated methicillin-resistant S. aureus*)

Portugal apresenta taxas elevadas de MRSA sendo necessário e urgente implementar estratégias nos hospitais e também nas áreas veterinárias para reduzir a propagação desta bactéria entre humanos e animais. Em 2022, Portugal apresentou uma das taxas mais elevadas da Europa, 15,2%, ficando em 7.º lugar, apresenta melhoria relativamente ao ano 2015 em que ocupava o 3.º lugar (Figura 1)^{102,109}.

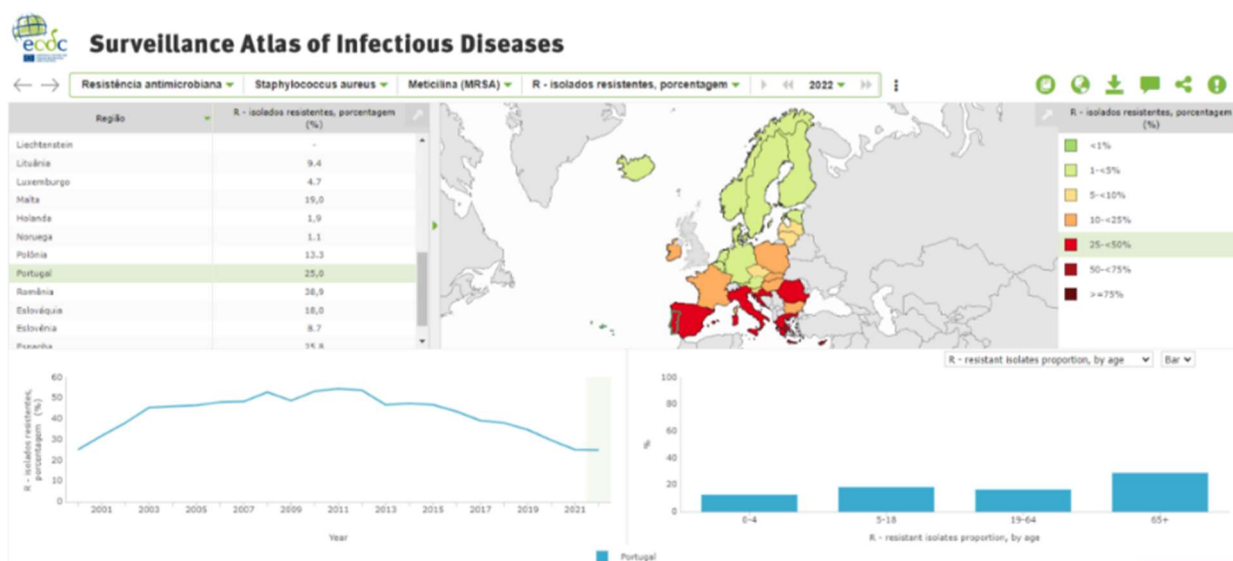


Figura 1: Percentagem de isolados resistentes de MRSA em Portugal em 2022; Fonte: Atlas dos dados de vigilância e doenças para resistência antimicrobiana do ECDC; Fonte: ECDC, 2022¹⁰⁹

Relativamente à transmissão é importante reter que ela ocorre dos animais de produção para os indivíduos (LA-MRSA) essencialmente pelo contato direto com os animais, particularmente com bovinos e suínos, por exposição direta aos animais nos estaleiros (contato próximo e repetido) e pelo contato direto com carne contaminada, a qual pode também ser um veículo de disseminação de MRSA¹⁰⁰. Na Europa, a prevalência de LA-MRSA é de 25% a 86%, principalmente em indivíduos que trabalhem com estes animais (trabalhadores agrícolas e veterinários). Inicialmente a MRSA foi um patógeno exclusivamente humano, até ser isolado numa vaca leiteira, na Bélgica no ano em 1972, e posteriormente em porcos (o seu principal reservatório atualmente), demonstrando a versatilidade para diferentes nichos ecológicos e a adaptabilidade a diferentes espécies hospedeiras^{101,110,111}.

Especificamente, a estirpe CC398 de MRSA surge associada à transmissão através do contato direto com animais vivos (suínos, bovinos, vitelos) e seus ambientes entre gado e trabalhadores agrícolas e veterinários, sendo um risco para a saúde humana. O consumo de antimicrobianos por animais destinados a consumo humano é considerado uma força motriz no surgimento e disseminação do CC398¹⁰⁰. Na exploração, o risco de MRSA é maior em áreas com maior densidade pecuária e em áreas fechadas próximas de terrenos de cultivo onde foram aplicados os resíduos animais como fertilizantes orgânicos. Nos animais produtores de alimentos está na origem de doenças respiratórias e entéricas, infecções de pele e tecidos moles (ex. mastite), infecções da corrente sanguínea e infecções nas articulações e ossos^{86,87}.

2.6.2. *Aspergillus* sp.

Em Portugal o género *Aspergillus* e a espécie mais frequente *Aspergillus fumigatus sensu stricto* é dos fungos ambientais mais relevantes e frequentes em amostras ambientais. O género *Aspergillus* sp. está na origem de infeções como infeções cutâneas, ouvidos e infeções invasivas como aspergilose pulmonar e endocardite¹¹². A frequência na deteção de isolados de *Aspergillus fumigatus* resistentes a azóis aumentou desde 2010. Em Portugal, o complexo *Fumigati* é uma das espécies mais frequentes e resistentes identificadas em contextos clínicos e ambientais¹¹³. Embora várias espécies crípticas dentro do complexo *Fumigati* mostrem resistência intrínseca aos azóis, um factor que impulsiona a resistência (adquirida) é a pressão seletiva derivada do uso extensivo de azóis^{38,40,112,114,115}. Isso é particularmente problemático em ambientes ocupacionais onde altas cargas fúngicas são esperadas e onde há um risco aumentado de exposição e infeção humana. A propagação de *Aspergillus fumigatus* resistente ao triazol ocorre via aérea, mas também foram isolados resistentes em diferentes matrizes ambientais⁹¹. Em Portugal já foram realizados estudos relacionados à exposição ocupacional e interna ao *Aspergillus* e dos seus potenciais efeitos na saúde^{112,114,116–119}.

Em Portugal, Sabino et al. verificou que a frequência de resistência a azóis em *A. fumigatus sensu stricto* em amostras clínicas e ambientais (solo, ar e superfícies de diferentes fontes, incluindo hospitais, residências e estufas) foi de 3%, segundo um estudo realizado pelo Laboratório Nacional de Referência em Micologia Português no período de 2017 – 2018. Nos isolados ambientais foram identificados oito complexos

diferentes de *Aspergillus*: *Fumigati* (n=39), *Nigri* (n=21), *Usti* (n=19), *Nidulantes* (n=12), *Flavi* (n=2), *Circundati* (n=3), *Clavati* (n=1) e *Flavipedes* (n=2) ¹¹⁵.

Outro estudo realizado por Sabino. et al. em Portugal analisou amostras de areia, ar de explorações avícolas e suínas e de superfícies ambiente hospitalar. Nas explorações avícolas os isolados do ar mais representativos foram os complexos *Flavi*, *Fumigati* e *Versicolores*. Nas explorações suínas foram mais frequentes os complexos *Versicolores*, *Flavi* e *Fumigati*. ¹²⁰. A mesma equipa anterior desenvolveu outro estudo para determinar o perfil de suscetibilidade antifúngica de 134 isolados de *Aspergillus* identificados como pertencentes a diferentes complexos e recolhidos em fontes ambientais com alta probabilidade de contaminação relevante para a saúde humana em Portugal (areia, ar, superfícies e lixo de explorações avícolas e suínos, ar e superfícies de ambientes hospitalares e outras fontes alimentares). Nenhum desses isolados resistentes era *A. fumigatus* mas os complexos *Versicolores*, *Nidulantes* e *Aspergillus* ¹¹⁹.

Num outro estudo por Viegas et al. de diagnóstico respiratório desenvolvido em explorações de produção avícola e suína, indústrias especialmente associadas a altos níveis de exposição a fungos recorreu-se a uma metodologia ativa (impactação) e passiva (esfregaços de superfícies e camas) de catorze explorações portuguesas analisadas para estimar a prevalência, quantidade e distribuição de espécies de *Aspergillus*. O total de isolados fúngicos recolhidos (699) foram distribuídos por 40 géneros diferentes, o *Aspergillus* apresentou uma prevalência de 17,6% (média) e em relação apenas às aves a sua prevalência mostrou um valor maior (22,7%). As espécies de *Aspergillus* mais frequentemente isoladas foram *A. versicolor*, *A. flavus* e *A. fumigatus*. Este estudo encontrou uma alta prevalência de sintomas respiratórios em trabalhadores desta indústria com sintomas assinaláveis para alergias, doença pulmonar alérgica e asma, dispneia e sibilância induzida por *Aspergillus* ¹²¹.

Viegas et al. analisou isolados de *A. fumigatus* de ambientes interiores como instalações de saúde, empresa de fabricação de laticínios e uma unidade de triagem de resíduos. No geral, 8,1% dos isolados foram capazes de crescer na presença de pelo menos um azol, e 3% (isolados do ar numa indústria de laticínios e de dispositivos de proteção respiratória filtrantes numa indústria de triagem de resíduos) eram resistentes, portadores da mutação TR₃₄/L98H ^{85,116,122,123}.

2.7. Contaminação e resistência antimicrobiana em contexto de produção animal

A atividade de produção de animais produtores destinados a alimentação tem impacto na dispersão de microrganismos resistentes como bactérias resistentes a antibióticos e fungos resistentes a azóis. O contato dos trabalhadores agrícolas com animais infetados, as suas rações, os alimentos que deles derivam e os seus resíduos pode reintroduzir a resistência antimicrobiana na população humana. Os resíduos orgânicos produzidos pelos animais são utilizados como fertilizantes de solos o que pode originar a contaminação de águas superficiais e subterrâneas por bactérias resistentes²². O ar ambiente circundante das explorações pecuárias é particularmente rico em poeiras orgânicas (aerossóis) contaminadas por bactérias e fungos¹²⁴. A exposição a estes ambientes representa um risco para os animais que podem desenvolver infeções por resistência antimicrobiana diminuindo a sua produtividade e o bem-estar, impactando nos seres humanos que interagem com os animais e os seus ambientes, e para os consumidores a jusante através dos seus produtos alimentares.

A exposição ocupacional a fungos e micotoxinas por parte dos trabalhadores das explorações pecuárias (bovinos, suínos e aves) ocorre durante tarefas que envolvem alta exposição a poeira orgânica, como trabalhos de armazenamento, manuseio de matérias-primas contaminadas (grãos, rações e resíduos), nas tarefas de cuidados diretos aos animais^{123,125}. A exposição de trabalhadores de explorações de produção de leite a fungos nocivos pode ser maior durante as atividades de ordenha, bem como durante o manuseio de ração e silagem e ao espalhar a cama. O tipo de alimentação do gado e o confinamento dos animais influenciam a composição fúngica dos aerossóis^{126–128}.

A Agência Europeia para a Segurança e Saúde no Trabalho (OSHA-EU) identificou os veterinários, agricultores e trabalhadores agrícolas como estando expostos a microrganismos provenientes de animais (pêlos, fluídos corporais e excreções), poeira orgânica das rações e camas que podem estar carregadas de agentes biológicos como fungos (e as suas micotoxinas^{99,125,129}) e bactérias (e as suas endotoxinas)¹³⁰. A exposição destes trabalhadores a bioaerossóis está relacionado a reações de hipersensibilidade, alergia e asma¹³¹. MRSA é um patógeno oportunista para humanos e animais sendo já associada a bioaerossóis provenientes do interior de unidades pecuárias para exteriores representando um risco significativo para a saúde pública. As

unidades pecuárias pelas suas características aumentam o processo de aerossolização ajudando a aumentar a carga de colónias de MRSA no ar ambiente, o que permite a dispersão por distâncias consideráveis. A OSHA-UE identificou as principais bactérias e fungos¹²⁹ associados a doenças infecciosas em ocupações relacionadas com animais de produção apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Principais bactérias e fungos associados a doença relacionada com profissionais da saúde animal (veterinários, agricultores); Fonte: Exposição a agentes biológicos e problemas de saúde relacionados em ocupações relacionadas com animais, OSHA-UE, 2019^{129,132}

Bactérias	Fungos
<i>Bacillus anthracis</i> - Anthrax	<i>Histoplasma capsulatum</i>
<i>Brucella</i> sp. - Brucellosis	<i>Epidermophyton</i> sp. - Dermatomicoses
<i>Campylobacter</i> sp. - Campylobacteriosis	<i>Fusarium</i> sp. - Dermatomicoses
<i>Escherichia coli</i>	<i>Zoophilic dermatophytes</i> - Dermatomicoses
<i>Leptospira</i> sp.	
<i>Listeria monocytogenes</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (MRSA)	
<i>Mycobacterium tuberculosis, bovis, caprae</i>	
<i>Streptococcus</i> sp.	

Várias bactérias foram identificadas com frequência em ambiente de produção alimentar de produção animal, e por serem causadores de doenças transmitidas por alimentos de origem animal associados a resistência antimicrobiana como *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, *E. coli*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp., *S. aureus* e *Enterococcus faecium*¹⁷.

As camas usadas na acomodação dos animais estão identificadas como uma matriz de potencial contaminação microbiana para os animais, para os trabalhadores que as manipulam e para o ambiente mais próximo quando são utilizadas como adubos orgânicos de solo. As camas são regularmente utilizadas na produção animal, nomeadamente na produção avícola, mas também na produção bovina e são constituídas por foragens, resíduos fecais, restos de alimentação, pêlos ou penas. Tal facto garante que a sua composição orgânica abriga uma variedade de patógenos, como vírus, bactérias, parasitas e fungos. Numa revisão sistemática realizada por Gomes et al. chegaram à conclusão que entre a contaminação microbiana em matrizes ambientais as camas dos animais relevaram ser a mais contaminada em comparação com esfregaços de superfícies e rações (entre outras matrizes). Foram detetadas bactérias e fungos patogénicos no ambiente interno e externo das explorações avícolas que podem significar um risco para a saúde ocupacional, para a segurança alimentar e

animais. São exemplos de espécies bacterianas mais dominantes neste *setting* *Salmonella* sp. e *Campylobacter* sp., *E. coli*, *Clostridium perfringens*, *Listeria* sp., *Staphylococci* sp., respectivamente¹¹⁷. A diversidade fúngica detetada incluiu *Penicillium* sp., *Candida albicans*, *Aspergillus* sp. (*Aspergillus terreus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus niveus*), *Scopulariopsis* sp., *Cladosporium* sp., *Trichosporon* sp., *Candida* sp., *Lactobacilos* sp., *Mucor* sp., *Geothricum* sp. e *Rhizopus* sp.^{133–135}.

Um estudo brasileiro analisou qualitativamente e quantitativamente a contaminação microbiana de associados aos bioaerossóis provenientes de águas residuais de bovinos leiteiros aplicados como biofertilizantes, tendo detetado *E. coli* O157:H7, *C. perfringens* e *Cryptosporidium* sp. Os resultados evidenciam a exposição ocupacional e comunitária e a importância do uso de equipamentos de proteção individual para reduzir os riscos ocupacionais. A equipa também concluiu que o risco de exposição era inversamente proporcional à distância das habitações^{136,137}.

Um estudo teve como objetivo avaliar a composição bacteriana e a resistência antimicrobiana de equipamentos de salas de ordenha, determinando o risco potencial de contaminação bacteriana no leite cru durante o processo de ordenha e a transmissão de bactérias resistentes a antimicrobianos por meio do consumo de laticínios. Este estudo descobriu que *Bacillus* sp. foram as bactérias mais prevalentes identificadas e que uma proporção significativa dessas bactérias mostrou resistência considerável a vários antibióticos (ex. lincomicina, sulfadiazina e estreptomicina). Vários genes de resistência antimicrobiana também foram detetados, indicando a transmissão potencial de bactérias resistentes a antimicrobianos nas amostras de leite. Essas descobertas ressaltam a necessidade de aprimorar os protocolos de desinfecção em explorações leiteiras e equipamentos de ordenha. Os resultados acentuam o perigo duradouro de disseminar bactérias resistentes a antimicrobianos por meio de fontes de leite contaminadas¹³⁸.

No Canadá Hamza et al. estudaram a diversidade fúngica em aerossóis de vacarias de produção leiteira tendo verificado que a exposição humana a fungos nocivos pode ser maior durante as atividades de ordenha (automática ou manual), bem como durante o manuseio de ração e silagem e ao espalhar a cama. Os géneros mais abundantes em cada exploração foram *Aspergillus* (espécie *Aspergillus fumigatus*), *Penicillium* sp., *Wallemia* sp., *Aureobasidium* sp., Pleosporales e Tremellomycetes¹²⁶.

Outro estudo realizado na Roménia identificou géneros fúngicos em amostras de ar, nomeadamente *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Scopulariopsis* sp. A contaminação bacteriana incluía bactérias, *Staphylococcus* (*Streptococcus bovis* e *Streptococcus pneumoniae*), *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, bactérias Gram-negativas (*Enterobacter agglomerans*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* e *Pseudomonas* sp.)¹³⁹.

Num estudo desenvolvido em estábulos franceses nas amostras de poeira os fungos mais frequentemente identificados foram *Eurotium* (principalmente *Eurotium amstelodami* e *Eurotium umbrosum*, *Aspergillus* (10,5% e 10,4%) e *Penicillium* (7,0% e 10,4%). Foram também identificados outros fungos dos géneros *Mucor* sp., *Rhizopus* sp., *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Aureobasidium* sp., *Cladosporium* sp.¹⁴⁰.

Numa perspetiva *One Health* e com o objetivo de caraterizar e detetar as ligações zoonóticas do MRSA nas interfaces vaca-ambiente-humano um estudo realizado em estábulos de explorações de produção de leite detetou em amostras de leite cru, esfregaços nasais de vaca e humanos e no ar, uma prevalência global de MRSA de 13,4% (n=271/636). Mas foram nas amostras ambientais que se identificou a prevalência mais elevada (19,3%), enfatizando o papel potencial do ambiente agrícola na transmissão de MRSA. A prevalência em esfregaços nasais de vaca e esfregaços nasais humanos foi de 13,3% (n = 35/263) e 15,1% (n = 8/53), respetivamente. Mais se assinala que neste estudo os isolados apresentaram resistência total aos principais antibióticos (oxacilina, amoxicilina, vancomicina).

Outro estudo avaliou a prevalência de colonização por LA-MRSA em indivíduos que estão de forma ocupacional expostos a animais para consumo humano e demonstrou que os indivíduos com contato diário em contexto ocupacional com o gado têm cerca de 9% mais probabilidades (15% no caso de produtores de suínos) de serem colonizados por MRSA do que indivíduos sem contato com estes animais. Esta colonização depende de vários fatores gerais como a região geográfica, a quantidade de animais expostos, condições sanitárias do local, produção intensiva ou extensiva, e fatores individuais de uso de antimicrobianos e de internamento anterior por MRSA.

2.8. One Health

O conceito *One Health*, também designado como “Uma Só Saúde”, é definida pelo Painel de especialistas de alto nível da *One Health*, “*One Health High-Level Expert Panel*”, constituída pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, a Organização Mundial para a Saúde Animal, o Programa das Nações Unidas para o Ambiente e a Organização Mundial da Saúde como “uma abordagem integrada e unificadora que visa equilibrar e otimizar de forma sustentável a saúde de pessoas, animais e ecossistemas. Reconhece que a saúde dos seres humanos, animais domésticos e selvagens, plantas e o ambiente mais amplo (incluindo ecossistemas) estão intimamente ligados e interdependentes”¹⁴¹. A aliança quadripartida reconhece a urgência e a complexidade dos desafios para a saúde da interface Ambiente, Homem e Animais.

A OMS defende que a abordagem *One Health* é a solução global para a prevenção, vigilância e ação perante a resistência antimicrobiana⁸. O combate da resistência antimicrobiana exige a cooperação e o trabalho conjunto entre autoridades na área da saúde pública, alimentar, veterinária e ambiental, mas também médicos veterinários, agricultores. A adoção de uma abordagem multissetorial, envolvendo todas seções da saúde é fundamental para enfrentar aos complexos fatores determinantes da resistência antimicrobiana na saúde humana, na saúde animal, nos sistemas agroalimentares e no ambiente^{56,142}. As áreas de trabalho em que uma abordagem *One Health* é particularmente relevante incluem a segurança alimentar, controlo de doenças zoonóticas, saúde ambiental e resistência antimicrobiana (Figura 2). A abordagem *One Health* é considerada a mais adequada para enfrentar os desafios da resistência antimicrobiana pois reconhece-se que todos os setores da saúde humana, a saúde animal e o ambiente estão intimamente ligados entre si e que não é possível isolar cada um no combate à resistência antimicrobiana ¹⁴³



Figura 2: One Health e área de trabalho; Fonte: Agência Europeia do Ambiente¹⁴⁴

Os Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Agenda 2030 da ONU contextualizam a resistência antimicrobiana como uma questão social e de saúde pública global que repercute negativamente para o seu alcance devido à sua influência sobre os cuidados à saúde humanos e dos animais. Este estudo permite obter conhecimento acerca dos fatores a resistência aos antimicrobianos para que seja possível mitigar os efeitos da resistência antimicrobiana e promover a Saúde e o Bem-Estar dos seres humanos e dos animais de produção²⁷. Esse trabalho encontra-se alinhado com os ODS uma vez que a problemáticas da resistência antimicrobiana compromete a execução dos objetivos relacionados com a saúde humana, produção de alimentos, a pureza da água, alterações climáticas e o crescimento económico, tocando em vários ODS. Para a OMS, a resistência antimicrobiana é um obstáculo ao cumprimento dos ODS 3 (Saúde e Bem-Estar) e contribuiu também para o alcance do ODS 1 (Erradicação da Pobreza), do ODS 2 (Fome Zero e Agricultura Sustentável), do ODS 6 (Água Potável e Saneamento), do ODS 8 (Trabalho Digno e Crescimento Económico), do ODS 10 (Reduzir as Desigualdades), do ODS 12 (Produção e Consumo Sustentáveis) e do ODS 13 (Ação Climática), ODS 15 (Proteger a Vida Terrestre) que poderiam sofrer os impactos da resistência antimicrobiana.

3. Metodologia

3.1. Questão de investigação

Quais as ações de promoção de saúde e prevenção da doença mais relevantes para prevenir as resistências a antimicrobianos na atividade de explorações pecuárias de bovinos produtores de alimentos destinados a consumo humano num concelho do Alto Minho?

3.2. Objetivos

Objetivo Geral

Caraterizar a presença de microrganismos (bactérias e fungos) resistentes a antimicrobianos em cinco explorações pecuárias de produção de bovinos em Portugal e contribuir para a prevenção das resistências a antimicrobianos.

Objetivos específicos

- Compreender o perfil de utilização de antimicrobianos em contexto da produção animal durante 12 meses
- Descrever as variáveis ambientais que promovem a contaminação de vacarias por microrganismos resistentes a antimicrobianos
- Analisar a contaminação bacteriana e fúngica de amostras recolhidas no ambiente das vacarias e respetivas resistências a antimicrobianos
- Identificar as medidas de prevenção a adotar nas explorações consideradas no estudo
- Identificar as medidas de promoção da saúde mais relevantes a implementar na atividade pecuária

3.3. Hipóteses

Este estudo vai ser desenvolvido com base nas hipóteses de investigação:

- A contagem de microrganismos está correlacionada com o sistema de produção (intensivo e extensivo)
- A contagem de microrganismos em meios suplementados com azóis está correlacionada com o sistema de produção (intensivo e extensivo)
- A contagem de microrganismos está correlacionada com a frequência de higienização de comedouros/bebedouros/utensílios
- A contagem de microrganismos está correlacionada com matriz de amostragem
- A contagem de microrganismos está correlacionada com a frequência de utilização de antimicrobianos
- A contagem de microrganismos em meios suplementados com azóis está correlacionada com a frequência de utilização de antimicrobianos
- A contagem de microrganismos em meios está correlacionada com a frequência de higienização de comedouros, bebedouros e utensílios

3.4. Desenho de estudo

3.4.1. Instrumentos de recolha de dados

O estudo desenvolvido é do tipo exploratório, descritivo e observacional. Para melhor estudar a questão e as hipóteses foram recolhidos dados através de um instrumento de recolha de dados contextuais das explorações pecuárias, foi realizada uma campanha de recolha de amostras ambientais que foram alvo de procedimentos laboratoriais para caracterização de contaminação qualitativa e quantitativa microbiana viável (quantificação de bactérias e quantificação e identificação de fungos, perfil de resistência aos azóis e pesquisa de MRSA). Os dados foram alvo de análise descritiva e estatística.

De referir que os procedimentos laboratoriais foram realizados no laboratório de Microbiologia do H&TRC-ESTeSL da área de investigação Saúde Pública e Ocupacional do Instituto Politécnico de Lisboa. O trabalho de terreno que inclui a campanha amostral e recolha de dados das explorações foram realizados pela investigadora.

3.4.2. Seleção, aceitação na participação das explorações e questões éticas

A produção de bovinos foi selecionada por ser a mais relevante para a economia na localidade, segundo dados recolhidos junto das delegações locais da Direção-Geral da Alimentação e Veterinária e Direção Regional de Agricultura e Pescas do Norte. O concelho em particular foi selecionado por conveniência por motivo de proximidade e fácil acesso. A Cooperativa agrícola local facultou os contatos de proprietários das explorações existentes no concelho. Deste concelho foram escolhidas aleatoriamente as cinco explorações mais antigas de produção exclusiva de bovinos produtores de alimentos para consumo humano (carne e leite).

O contato inicial com os proprietários das explorações pecuárias iniciou-se através de uma conversa informal, onde foi explicado sumariamente o projeto e a sua finalidade. A oficialização da aceitação por parte das entidades incluiu a entrega, preenchimento e assinatura de um Consentimento Informado (Apêndice I: Consentimento Informado) que será arquivado por cinco anos. Ao consentimento informado foi adicionado um folheto

com “Informações para os Participantes” com a descrição da problemática para a saúde pública e da metodologia da investigação numa linguagem simples e clara. Foi entregue também uma Declaração de anonimato e sigilo assinada e datada pela investigadora de forma a garantir o compromisso com a privacidade e a confidencialidade, preservando integralmente o anonimato e o sigilo de todos dos dados (denominação, localização, amostras) (Apêndice II: Declaração de anonimato e sigilo).

Foi garantida a rastreabilidade de amostras e informações contextuais uma vez que os dados recolhidos para o propósito desta investigação foram registados, armazenados e analisados com anonimização. Foi utilizada uma convenção padronizada para atribuir códigos de identificação únicos a todas as explorações e amostras recolhidas. A identificação da amostra (I.D.) foi composta pela indicação do ambiente/indústria/meio-ambiente, da matriz para identificar o tipo de amostra colhida (letras indicando o tipo de matriz) e da área de amostragem (letras indicando a área).

Em todas as etapas deste estudo serão salvaguardados os procedimentos éticos e assegurada a proteção da reputação e o bom nome das instituições e dos participantes no estudo. Os participantes foram esclarecidos quanto aos objetivos, natureza do estudo e o âmbito da sua participação. A participação voluntária e a possibilidade de desistência dos participantes em qualquer momento foi garantida.

A Comissão de Ética da Escola Nacional de Saúde Pública (CE-ENSP) deu ao presente estudo parecer final n.º 21/2024 (Apêndice III: Parecer Final da CEENSP).

3.4.3. Pesquisa bibliográfica

Para estudar as variáveis que interferem como a questão da resistência antimicrobiana foram realizadas pesquisas em bases de dados variadas com informação sobre saúde animal, segurança alimentar e segurança e saúde no trabalho, nomeadamente *PubMed*, *PubMedCentral*, *Sciencedirect*, e exemplos de termos usados na pesquisa foram “*One Health*”, “Resistência antimicrobiana”, “bovinos”, “estábulo”, “contaminação antimicrobiana” “contaminação bacteriana”, “contaminação fúngica”. A pesquisa incluiu igualmente entidades como Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Direção Geral de Alimentação e Veterinária, Direção Geral de Saúde, INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P., enquadramento jurídico nacional e europeu, manuais de boas práticas e bem-estar animal.

3.4.4. Instrumento de recolha de dados contextuais das explorações

O ambiente das explorações pecuárias é complexo e rico numa grande variedade de bactérias e fungos, é constituído por diferentes áreas de trabalho internas (sala de ordenha, estábulos, zonas sociais), ambiente exterior e o seu ambiente envolvente. Cada exploração possui características próprias de gestão e manejo animal, gestão de antimicrobianos e resíduos pecuários. Foi elaborado um instrumento de recolha de dados por inquérito e observação. Esta grelha permitiu o levantamento contextual de cada exploração pecuária e recolha de dados sobre factores ambientais, frequência de higienização de equipamentos e instalações, utilização de antibióticos em animais, uso de fungicidas em alguma fase produtiva de rações, práticas de fertilização com resíduos orgânicos, biossegurança da exploração, doença animal, saúde ocupacional.

Sabe-se que na exploração pecuária o controlo de factores ambientais contribui para manter animais saudáveis e produtivos, diminui o desenvolvimento de doença infecciosa e consequente o uso de antibióticos em bovinos¹³⁵. As adoções de boas práticas de criação promovem o bem-estar animal, a saúde e a sua produtividade. São medidas básicas e fundamentais de prevenção de doenças infecciosas em exploração pecuária de uma forma geral^{18,84,145–150}.

- Boas condições de criação dos animais como a qualidade nutricional da alimentação e água de qualidade, bem-estar e conforto das vacas;
- Zonas de sombra, pouco ruído e boa ventilação ajudam a reduzir o *stress* térmico, problemas de saúde como a mastite, doenças respiratórias e melhoram a produção de leite;
- Higienização de as instalações e equipamentos que estão em contacto com os animais evitam a contaminação por bactérias que causam doenças infecciosas como as mastites e doenças respiratórias;
- A implementação de um sistema de biossegurança eficaz que impeça a entrada de doenças exteriores à exploração (por exemplo, inseminação artificial e quarentena para novos animais);
- Sistema de vacinação eficaz implementado;
- A condicionamento em boas condições de humidade e temperatura das rações e camas de ser acondicionadas

Nesta sequência foi elaborado um instrumento de recolha de dados de cada exploração pecuária de forma a obter informação contextual e de práticas de manejo animal e de

gestão antimicrobiana. A elaboração foi baseada na consulta de regulamentos europeus, legislação nacional, manuais de boas práticas da atividade e outras referências bibliográficas variadas. A ficha de registo (

Apêndice IV: Grelha de **observação**) foi organizada em cinco áreas de acordo com a temática deste trabalho:

- 1) Caraterização da exploração
- 2) Gestão das condições higiosanitárias e de bem-estar animal
- 3) Medidas de gestão e controlo da doença animal
- 4) Gestão da segurança e saúde do trabalho
- 5) Gestão de Efluentes Pecuários

Em cada exploração pecuária foram recolhidos dados qualitativos e quantitativos por preenchimento do inquérito por questionário, inicialmente realizado no terreno, através da observação direta, análise documental e entrevista aos proprietários, em altura posterior às colheitas das amostras. Os dados foram transpostos para a aplicação *Microsofts Forms®* e convertidos em *Microsoft Excel®*.

3.4.5. Campanha de amostragem

Para cumprir o objetivo deste estudo de avaliar a contaminação microbiana em explorações pecuárias recorreu-se a um protocolo multi-abordagem utilizando métodos de amostragem passivos. Os métodos de amostragem passivos são considerados os mais adequados para caraterizar a microrganismos existentes em ambientes de alta carga como se pode considerar as explorações de produção animal^{20,128,151–155}.

As amostras recolhidas são obtidas através *Electrostatic Dust Cloths (Procter & Gamble Company, Lisboa, Portugal)* (EDC - panos eletrostáticos contra poeira)^{152,156}, EDC fixados em vestuário de trabalho (EDCT), rações alimentícias, camas após o uso, esfregaços de superfícies de comedouros (cornadis ou trancadores), bebedouros, salas de ordenha de leite e de zonas de contato em espaços sociais (escritório e vestiário). Excetuando os EDC, que foram colocados em superfícies das explorações durante 14/15 dias, todas as restantes amostras foram obtidas no decorrer das atividades normais de cada exploração. Foram recolhidas um total de cinquenta amostras individuais nas cinco explorações seguindo a distribuição da Tabela 5.

Tabela 5: Distribuição de amostras em cada exploração pecuária.

Matriz	ID Exploração pecuária				
	V1	V2	V3	V4	V5
Camas Após Uso (n=)	2	1	0	2	0
EDC (n=)	2	1	1	3	2
EDCT (n=)	1	0	0	1	0
Ração (n=)	5	3	3	3	3
Swabs (n=)	4	1	2	6	4
Total	14	6	6	15	9

A amostragem foi realizada de acordo com boas práticas de higiene ocupacionais e microbiológicas. Todos os materiais como zaragatoas, placas de *Petri* e tubos *Falcon* foram tratados como descartáveis (somente para uso único), a fim de evitar qualquer possível contaminação cruzada. O manuseamento de amostras recolhidas foi realizado sempre com um novo par de luvas descartáveis sem talco e seguindo as regras de segurança e práticas de higiene. A manipulação das amostras foi feita de forma a minimizar a contaminação cruzada entre amostras.

Os EDC's (área de exposição de superfície de 0,0014m² e 0,0064 m²) foram colocados em superfícies elevadas (altura de 1,5 – 2,5 m), sem perturbações de fluxo de ar, para captar partículas de poeira transportada pelo ar durante um período de 14/15 dias de forma permitir conhecer a exposição por inalação (Figura 3)^{152,157–159}. Após colheita o EDC foi fechado na placa de Petri com tampa e registado o número exato de dias de amostragem.

Os EDCT foram colocados, através de um alfinete desinfetado com álcool a 70°, nos casacos dos trabalhadores principais responsáveis pela alimentação, limpeza dos espaços, saúde animal e bem-estar animal, preparação e administração das rações, durante um turno de trabalho (aproximadamente 7/8 horas) (Figura 3). No final do tempo de amostragem, o EDCT foi colocado em saco esterilizado^{158–161}.

As amostras de esfregaços com zaragatoas foram realizadas com base a Norma ISO 18593:2004, Microbiologia de Alimentos e Alimentos para Animais, para Métodos Horizontais para Técnicas de Amostragem de Superfícies Utilizando Placas de Contato e zaragatoas¹⁶². Humedeceu-se as zaragatoas esterilizadas em água esterilizada. Em seguida, colocou-se o quadrado 10 x 10 cm de material inoxidável (acetato) desinfetado com álcool a 70% entre utilizações na superfície em análise e esfregou-se o interior com o cotonete e coloque-se no tubo esterilizado do cotonete. Foram recolhidos esfregaços

nas superfícies de comedouros, bebedouros, salas de ordenhas, de escritório e vestiário, quando existentes (Figura 3).

As amostras de camas e rações com cerca de 5 gramas de camas usados pelos animais nas últimas horas foram recolhidas com luvas esterilizadas para saco esterilizado. As amostras de camas e rações recolhidas representam a realidade de cada vacaria (Figura 3)^{99,117}.

As amostras foram recolhidas nos dias 5 e 6 de dezembro e deram entrada no laboratório no dia 7 de dezembro de 2023. Todas as amostras após uso colhidas foram conservadas e transportadas para o laboratório em sacos ou tubos esterilizados sob refrigeração (0-4°C) até chegada ao laboratório para posterior análise⁹⁹.



Figura 3: Pontos de amostragem; Fonte: Investigadora

3.4.6. Procedimentos laboratoriais

a) Quantificação de bactérias e quantificação e identificação de fungos

As amostras foram extraídas no momento da chegada ao laboratório, conforme descrito anteriormente por Viegas et al.¹⁶³. As amostras de todas as explorações pecuárias foram lavadas com solução salina Tween 80 0,05% (0,9% NaCl) (250 rpm, 30 minutos), como se explica de seguida:

- Para cada 1 g da ração colhida foi extraída 9,1 mL de solução;
- Extraiu-se a o pó colocando cada EDC e EDCT restante em tubo Falcon de 50 mL com 10 mL e 25 mL de solução, respetivamente;
- Cortou-se cada esfregaço em *Eppendorf* de 2 mL com 1 mL de solução;

Os extratos obtidos foram semeados (150 µl) em meios de cultura seletivos para fungos, a saber: ágar extrato de malte (MEA) suplementado com cloranfenicol (0,05%) e ágar dicloran-glicerol (DG18). As bactérias foram semeadas em meio de ágar triptico soja (TSA) suplementado com nistatina (0,2%), ágar bile vermelho violeta (VRBA) e *MacConkey agar* (MAC) incubados em condições ótimas de temperatura e tempo para fungos e bactérias. O DG18 foi utilizado devido à sua capacidade de restringir o tamanho da colónia de géneros de rápido crescimento, permitindo uma caracterização mais completa do crescimento fúngico em matrizes complexas, como amostras ambientais e de substrato. As temperaturas de incubação foram 30°C, 27-37°C, 27°C, 37°C respetivamente para TSA, DG18, MEA e VRBA/MAC. A quantificação da contaminação microbiana seguiu os procedimentos publicados anteriormente por Viegas et al.³⁷. Após incubação de MEA e DG18 a 27°C, e DG18 a 37°C por 5 a 7 dias para fungos. Em TSA, VRBA e MAC a 30° e 37°C por 7 dias para bactérias coliformes totais, coliformes Gram-negativas (bactérias Gram-negativas), respetivamente. Foram calculadas densidades de biocarga (unidades formadoras de colónias, UFC/m², UFC/g¹, UFC/m², UFC/m²/dia¹). O crescimento a estas temperaturas está justificado com o crescimento a mesma temperatura basal do corpo humano.

b) Perfil de resistência aos azóis

Os EDC, camas e rações foram rastreados quanto à resistência antifúngica em relação a uma concentração de três antifúngicos diferentes suplementados em meio de ágar *Sabouraud* seguindo orientações de *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST9)*¹⁶⁴. Este método é validado para a triagem de resistência a azol por detecção fenotípica de isolados de *Aspergillus fumigatus*, com base no uso de placas contendo ágar suplementados com itraconazol (ITZ) (4 mg/L), voriconazol (VCZ) (2 mg/L) e posaconazol (PCZ) (0,5 mg/L, opcional) e uma placa de controlo de ágar sem fármacos (SDA). Resumidamente, 150 µl de suspensão de lavagem de amostra foram inoculados em placas de Petri contendo o meio suplementado com azol e foram incubados a 27°C por 48h, conforme relatado anteriormente por Viegas et al.¹⁶⁵.

As espécies/complexos de fungos, quanto à resistência antifúngica, foram identificadas microscopicamente por uma especialista de micologia ambiental por meio de características macro e microscópicas, conforme observado por *De Hoog et al.*¹⁶⁶ no Atlas de fungos ambientais.

Todas as placas foram incubadas a 27°C e examinadas para densidades de *Aspergillus* sp. (unidades formadoras de colónias, UFC/m², UFC/m², UFC/g¹) após 48h (triagem de resistência a azol) e 5–7 dias (MEA e DG18 a 27°C e 37° C). Essa temperatura foi selecionada para permitir a identificação de todos os fungos nas amostras, para uma caracterização mais ampla da contaminação fúngica, além de *Aspergillus* complexo *Fumigati*. Os mesmos extratos também foram utilizados para a detecção dos complexos fúngicos selecionadas (*Aspergillus* complexos *Circumdati*, *Flavi*, *Fumigati* e *Nidulantes*) seguindo procedimentos de Viegas et al.^{37,165}.

c) Pesquisa de MRSA

Os EDC foram alvo de identificação de *S. aureus*, tendo para isso sido inoculados em ágar Columbia, com 5% de sangue de carneiro e *Chromid*® MRSA, e então incubadas por 24 e 48 h a 37 °C. As colónias suspeitas foram isoladas e a identificação realizada através de um teste de catalase, usando um *Slidex Staph Kit* (Biomerieux ref #73115) e *Slidex MRSA detetion Test Kit* (Biomerieux ref #73117). Neste trabalho, controlos positivos (colheita de laboratório de MRSA) e negativas (*S. aureus* ATCC 25923) foram incluídas como controlos positivos e negativos^{37,107}.

3.5. Análise estatística

Os dados recolhidos foram analisados com base num plano de análise de variáveis (Apêndice V: Plano de análise de variáveis) que inclui uma sintaxe em *Microsoft Excel* e a ferramenta de análise estatística utilizada para a análise de dados foi o *Software Package for Social Science V. 29.0* para *Windows*. Os resultados foram considerados significativos para um nível de significância de 5%.

Para testar a normalidade dos dados foi utilizado o teste de *Shapiro-Wilk*. Para estudar a relação entre a contaminação bacteriana, contaminação fúngica e triagem de resistência a azóis, em cada matriz em análise foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman, uma vez que não foi verificada a suposição de normalidade. O coeficiente de correlação de *Spearman* foi também utilizado para estudar a relação da contaminação bacteriana, fúngica e resistência fúngica com a frequência de higienização e de utilização de antibióticos e antifúngicos. As variáveis de contaminação microbiológica e do perfil de resistência fúngica foram também comparadas entre o tipo de produção/sistema de exploração recorrendo ao teste de *Mann-Whitney U*, uma vez que não foi verificada a suposição de normalidade.

Para avaliar a diversidade de espécies fúngicas foram utilizados os índices de Simpson e Shannon dados pelas fórmulas:

$$\text{Shannon Index (H)} = - \sum_{i=1}^s p_i \ln(p_i)$$

$$\text{Simpson Index (D)} = \frac{1}{\sum_{i=1}^s p_i^2}$$

Onde p_i é a proporção (n_i/n) de isolados de uma determinada espécie identificadas (n_i) dividida pelo número total de isolados identificadas (n).

Os cálculos das concentrações têm por base protocolos internos ao laboratório.

Para caracterização dos dados da amostra foi utilizada estatística descritiva para análises de frequência (n , %) e representações gráficas de acordo com a natureza dos dados.

4. Resultados

4.1. Caracterização amostra

As explorações pecuárias seleccionadas localizam-se num concelho do distrito de Viana do Castelo, na Região do Norte de Portugal, na sub-região Minho-Lima e na Região Agrária de Entre Douro e Minho. O clima local é marcado pelo vale do rio Minho e pelo sistema montanhoso norte sul. A temperatura média anual é superior a 12,5°C. A pluviosidade média anual varia entre os 1400 – 1800 mm, integrando-se o concelho numa das áreas mais húmidas do noroeste português (150 dias de chuva). A economia do concelho é especialmente centrada na indústria e turismo. Apesar da agricultura não ser a base da economia local, existem no concelho empresas de pequena e média envergadura, principalmente de cariz familiar. Nas localidades mais próximas existem várias explorações agrárias principalmente de vinha, fruta e flores ornamentais.

Este estudo centrou-se em cinco explorações pecuárias de criação de bovinos (n = 5) produtores de carne (n = 3) e leite (n = 2), como atividade dominante (Tabela 6). No concelho estavam registadas, a 31 de dezembro de 2023, 34 marcas de exploração, num total de 355 animais, segundo dados cedidos pela Direção Geral Alimentação Veterinária (Figura 4).

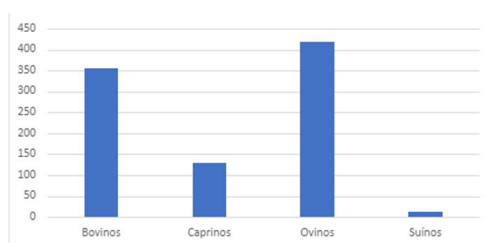


Figura 4: Soma de animais registados por espécie a 31 de dezembro de 2023 (Fonte: DGAV)

O enquadramento das explorações é meio rural (100%) e a produção é contínua ao longo do ano em todas elas (100%). Três apresentam um estilo de produção do tipo extensivo, com criação ao ar livre e tem acesso permanente ao pasto (60%) e duas são do tipo intensivo e criação interna/com estabulação (40%). As explorações possuíam entre 1 e 4 funcionários em contato direto com os animais. Três das explorações (60%) têm natureza jurídica de pessoa singular cuja atividade pecuária é um suplemento a outra atividade profissional. As duas restantes (40%) têm uma natureza cujo produtor/titular da empresa é uma pessoa coletiva e cuja atividade principal é a atividade

pecuária. Na Tabela 6 descrevem-se de forma sumária as principais informações sobre o espaço de cada exploração para definição de locais de colheita.

Tabela 6: Informação contextual das explorações pecuárias avaliadas

ID	Sistema de exploração	Tipo produção dominante	Tipo de criação	Natureza jurídica	Efetivo pecuário	N.º trabalhadores	Estábulo principal	Estábulo secundário	Sala ordenha e sala tanque leite	Zona armazenagem em rações
V1	Intensivo	Leite	Interna / Estabulada	Pessoa coletiva	170	4	Sim	Sim	Sim	Sim
V4					150	4	Sim	Sim	Sim	Sim
V2					20	1	Sim	Não	Não aplicável	Sim
V3	Extensivo	Carne	Criação ao ar livre	Pessoa singular	5	1	Sim	Não	Não aplicável	Sim
V5					9	1	Sim	Sim	Não aplicável	Sim

O efetivo pecuário (cabeças de gado) que inclui bezerros, vacas, touros, bois, novilhos (as), vitelos (as), vacas aleitantes apresenta os seguintes valores médios, mediana e valores mínimos e máximos (Tabela 7).

Tabela 7: Valores mínimo, máximo, médio e mediana do efetivo pecuário das explorações analisadas

Média	70,80
Mediana	20,00
Mínimo	5
Máximo	170

Em termos de condições higio-sanitárias e de bem-estar animal verificou-se que os hábitos de utilização de biocidas na higienização de utensílios de trabalho (ex. pás) ocorre com frequência e várias vezes ao dia em duas explorações (40%), duas realizam higienização ocasionalmente (40%) e uma não tem qualquer procedimento de higienização (Figura 5). Mais de assinala que a higienização “várias vezes por dia” está associada a explorações de regime intensivo e de produção de leite.

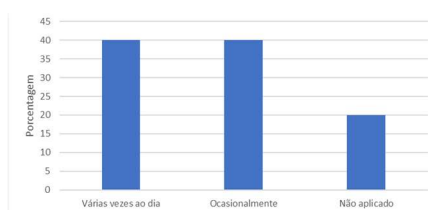


Figura 5: Frequência higienização de utensílios

Verificou-se que as duas explorações pecuárias de regime intensivo realizam higienização com produtos biocidas “várias vezes ao dia” (40%) dos bebedouros de água dos seus animais uma dela realiza ocasionalmente (20%), outra nunca realiza (20%) e numa dela não existem bebedouros pois a fonte de água é uma linha água

natural existente no prado onde os animais circulam (Figura 6). Os proprietários das explorações referiram que os produtos biocidas usados na higienização são produtos como hipoclorito de sódio, ácido paracético de uso industrial/específico para esta atividade (*Deosan Deogen*).

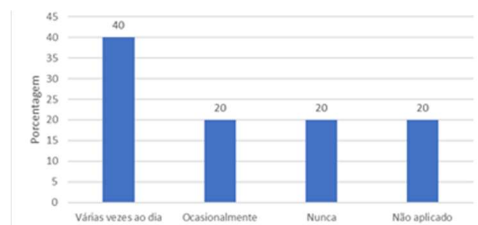


Figura 6: Frequência higienização de bebedouros

Relativamente aos comedouros dos animais registou-se que em duas explorações de regime intensivo a higienização dos comedouros é realizada várias vezes ao dia (40%) e nas três de regime extensivo não são realizados procedimentos de higienização dos comedouros (Figura 7).

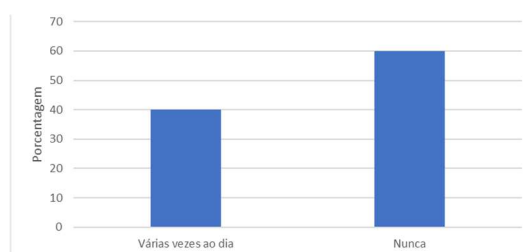


Figura 7: Frequência higienização de comedouros

A higienização de outros espaços, como a sala de ordenha e tanque de leite, é realizado nas duas explorações de regime intensivo (40%) e com frequência de “várias vezes ao dia” (Figura 8).

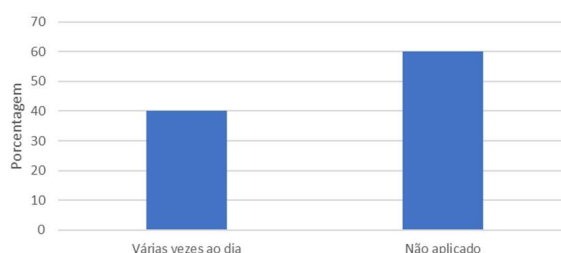


Figura 8: Frequência higienização de outros espaços (ex. sala de ordenha e tanque leite)

As instalações permitem, de acordo com a infraestrutura existentes, estabelecimento de uma forma geral a manutenção de boas condições de temperatura, humidade, iluminação e ventilação das instalações em 100% das explorações.

Em todas as explorações a alimentação é mista e incluiu ração, palhas, feno, silagem. A preparação e distribuição das rações são tarefa executada pelos trabalhadores das explorações. Nas três explorações de sistemas de produção extensivo os animais têm acesso a pastagem natural como alimentação (60%).

Segue-se na Tabela 8 uma descrição das rações existentes no momento da colheita de amostras em cada exploração pecuária.

Tabela 8: Constituição das rações em cada exploração

Produção intensiva		Produção extensiva		
V1	V4	V2	V3	V5
Grão cereais Palha Silagem Farinha Milho	Ração cereais Feno Silagem Palha Farinha	Silagem Palha Ração Pastagem	Silagem Palha Pastagem	Silagem Palha Pastagem

Em quatro explorações as camas dos animais são constituídas por palha e apenas numa era usado restos de madeira provenientes de uma serração local (serrim) nas camas de vacas adultas. Desconhece-se a procedência desta madeira nomeadamente se é tratada com antifúngicos.

As rações (palhas e fenos) são acondicionados em locais fechados, mas ventilados em todas as explorações (100%). Não foram visualizados vestígios de presença de fungos nos fardos.

Os produtores referiram não usarem fungicidas nas suas explorações. O proprietário da exploração pecuária identificada como V1 referiu a aplicação de um produto fungicida de nome comercial *Mycofix*®, cuja função obtida junto do meio eletrónico do fornecedor é de desactivador de micotoxinas e é aplicado diretamente na ração dos animais. O proprietário referiu que a última utilização foi antes do ano de 2019. Efetivamente, em 2019 um ano climático mais favorável (seca) ao desenvolvimento de doenças controladas por fungicidas ⁹⁶.

Ao nível de aplicação animal de biocidas os proprietários referiram a aplicação de produtos antissépticos como “Betadine” (substância ativa Iodopovidona) e “Terramicina” (substância ativa: cloridrato de oxitetraciclina), com base em indicações do médico veterinário assistente.

O uso de antibióticos no período de janeiro e dezembro de 2023 foi mencionado nas duas explorações intensivas (40%) (Figura 9). No entanto, apenas o livro de registo de medicamentos da exploração V2 foi analisado e a patologia mais registada foi mastite.

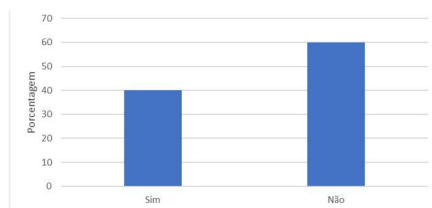


Figura 9: Utilização de antibióticos entre janeiro e dezembro de 2023

No momento de recolha de amostras e de recolha de dados das explorações Não se verificou a utilização de antibióticos. A exploração identificada como V1 tinha registo de utilização de antibióticos no período de janeiro a dezembro de 2023 em tratamentos de masmite, "*Synulox LC* suspensão intramamária para bovinos em lactação", "*PENDISTREP* suspensão injetável" e "*Pathozone*", cujas substâncias antimicrobianas são amoxicilina-ácido clavulânico, dihidroestreptomicina, cefoperazona, respetivamente (dados DGAV). A exploração V4 não cedeu os dados em tempo útil. Nenhuma exploração fez uso de ração medicamentosa (100%).

Em duas explorações (40%) pelo menos um dos funcionários das explorações possuíam formação sobre os fatores de risco que contribuem para a disseminação dos principais agentes infecciosos obtida em contexto de formação profissional ou superior (Figura 10). Esta formação foi administrada no âmbito de ensino profissional e em licenciatura a área agrícola.

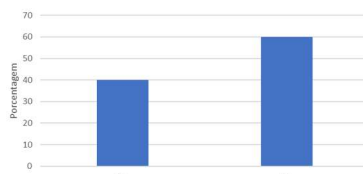


Figura 10: Frequência de formação sobre fatores de risco de disseminação de agentes fúngicos pelos trabalhadores das explorações pecuárias

Em três explorações (60%) verificou-se a utilização de fatos, calçado e luvas como equipamentos de proteção individual ocorre (Figura 11). Não se verificou o uso de máscara.

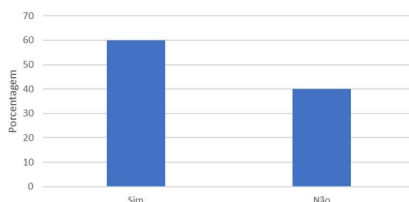


Figura 11: Utilização de equipamentos de protecção individual durante tarefas de trabalho

Todos os proprietários das vacarias (100%) referiram a utilização de resíduos orgânicos de estrume e/ou chorumes para adubar os seus terrenos nas proximidades das explorações (uso pelo próprio) em meses como abril, maio e outubro.

4.2. Contaminação bacteriana viável

4.2.1. EDC e ECdT

A Figura 12 retrata a contaminação bacteriana em TSA, VRBA e MAC em EDC nas cinco explorações pecuárias (V1 a V5). A contaminação bacteriana nos meios de cultura contagem total de bactérias TSA, contagem de Gram negativas em VRBA e MAC nos EDC foi mais intensa nas explorações de produção intensiva (V1 e V4). Para TSA os valores variaram entre $1,91 \times 10^2$ CFU/m² e $1,17 \times 10^3$ CFU/m², para as vacarias V2 e V1, respetivamente. Para VRBA os valores variaram entre 0 e $5,66 \times 10^2$ CFU/m², para as vacarias V3 e V1, respetivamente. Para MAC os valores variam entre 0 e $1,81 \times 10^3$ CFU/m² na vacaria V5. Em TSA os valores de contaminação são mais elevados em V1, enquanto em VRBA e em MAC foram em V4 e V5.

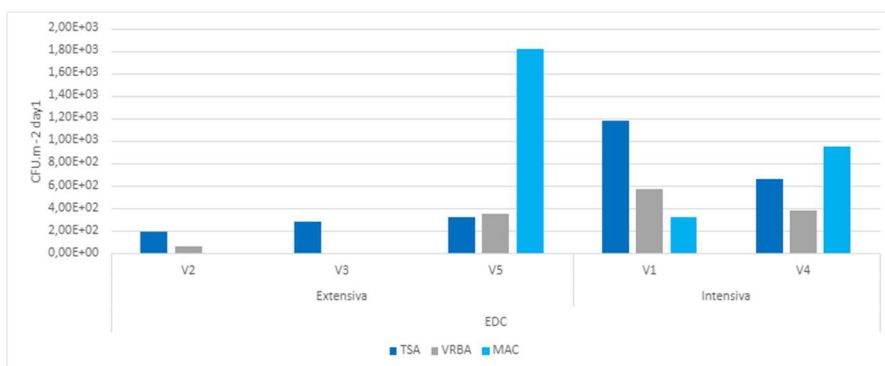


Figura 12: Valores medianos de bactérias totais (TSA) e Gram-negativas (VRBA e MAC) do EDC (UFC/m²/dia)

Os EDCT apresentam valores médios iguais em TSA ($1,41 \times 10$ CFU/m²) por um dia de trabalho (8h) nas vacarias V1 e V4. Em VRBA os valores médios variam entre $1,00 \times 10$ CFU/m² e $2,00 \times 10$ CFU/m² (Figura 13). Não se observou crescimento de MAC.

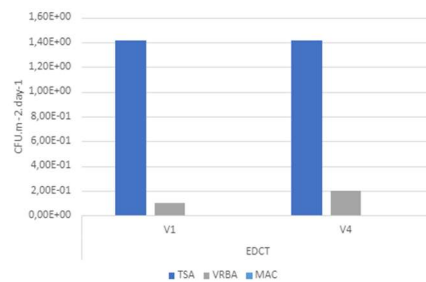


Figura 13: Valores medianos de bactérias totais (TSA) e Gram-negativas (VRBA e MAC) em EDCT (UFC/m²/dia1).

4.2.2. Camas após o uso e rações

A Figura 14 retrata a contaminação bacteriana das camas em TSA, VRBA e MAC em EDC nas explorações pecuárias V1 a V4. Na vacaria V5 não foram recolhidas camas por questões de segurança no momento da colheita de amostras. Em TSA os valores foram de $8,70 \times 10^1$ CFU/g/dia nas quatro explorações onde foram retiradas amostras de CAU. Em meio VRBA os valores variaram entre $2,30 \times 10^1$ CFU/g/dia e $8,55 \times 10^1$ CFU/g/1, na V4 e V1 respetivamente. Os valores em MAC variaram entre $2,90 \times 10^1$ CFU/g/1 dia e $6,54 \times 10^2$ CFU/g/dia, na vacaria V4 e V1 respetivamente. Destaca-se a vacaria V2 no seu valor em MAC. Em VRBA os valores de contaminação são mais elevados em V1, enquanto em MAC foram em V2.

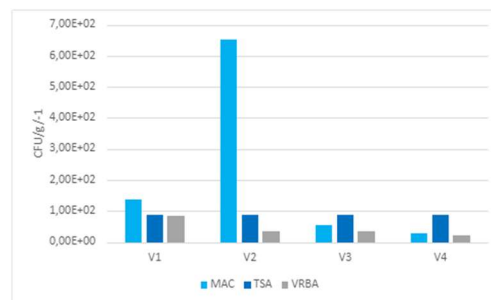


Figura 14: Valores medianos de bactérias totais (TSA) e Gram-negativas (VRBA e MAC) em camas (CFU/g/dia).

Nas rações (Figura 15) em MAC os valores variam entre $1,80 \times 10^1$ CFU/g/dia e $3,02 \times 10^2$ CFU/g/dia, nas vacarias V3 e V2 respetivamente. Enquanto em TSA os valores variaram entre $6,27 \times 10^1$ CFU/g/dia e $1,92 \times 10^2$ CFU/g/dia, nas vacarias V3 e V4 respetivamente. Os valores em VRBA variaram entre $1,57 \times 10^1$ CFU/g/dia e $1,29 \times 10^2$ CFU/g/dia, nas vacarias V3 e V4 respetivamente. Em TSA os valores de contaminação são mais elevados em V4, enquanto em VRBA e em MAC foram em V5 e V2.

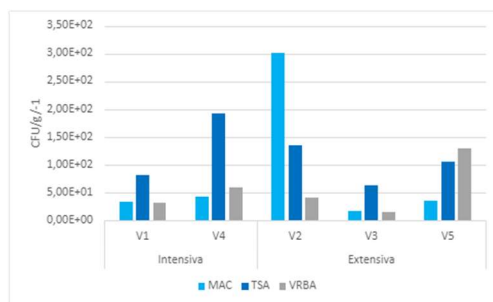


Figura 15: Valores medianos de bactérias totais (TSA) e Gram-negativas (VRBA e MAC) rações (CFU/g/dia)

4.2.3. Esfregaços

As Figura 16 e Figura 17 representam os valores de contaminação organizados por sistema de produção e por meio de culta nas cinco explorações pecuárias. Para TSA os valores médios variaram entre $2,00 \times 10^5$ CFU/m² e $1,20 \times 10^6$ CFU/m², nas vacarias V2 e na V4, respetivamente. Em meio VRBA os valores variaram entre $3,00 \times 10^4$ CFU/m² e $2,75 \times 10^5$ CFU/m², nas vacarias V2 e na V3, respetivamente. Os valores em MAC variaram entre $4,00 \times 10^4$ CFU/m² dia e $3,09 \times 10^6$ CFU/m², nas vacarias V2 e na V4, respetivamente. Em TSA os valores de contaminação são mais elevados em V4, enquanto em VRBA e em MAC foram em V1 e V3 e V5, respetivamente.

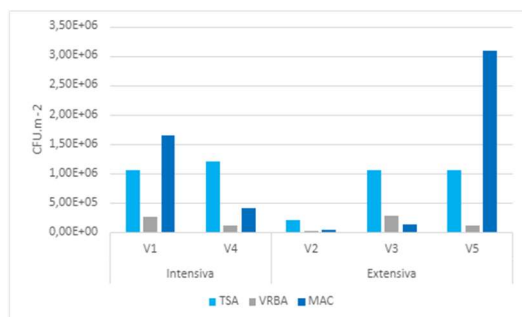


Figura 16: Valores medianos de bactérias totais (TSA) e Gram-negativas (VRBA e MAC) (CFU/m²) em swabs de superfícies organizadas por sistema de produção

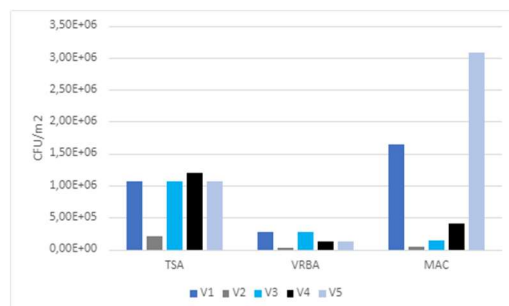


Figura 17: Valores medianos de bactérias totais (TSA) e Gram-negativas (VRBA e MAC) (CFU/m²) em swabs de superfícies

4.3. Contaminação fúngica viável

4.3.1. EDC e EDCT

Em relação à carga fúngica em EDC colocados nas superfícies ao ar livre nas cinco vacarias, em MEA, os valores variaram entre $7,08 \times 10^0$ UFC/m², detetado na V3 e $5,03 \times 10^1$ UFC/m², na vacaria V4 (Figura 18). Em DG18 a 27°C foi na V2 que foi detetado o valor mais alto, $3,00 \times 10^2$ UFC/m², e na vacaria V1 o menor valor $1,42 \times 10^1$ UFC/m². Em MEA os valores de contaminação são mais elevados em V4, enquanto em DG18 foram em V2.

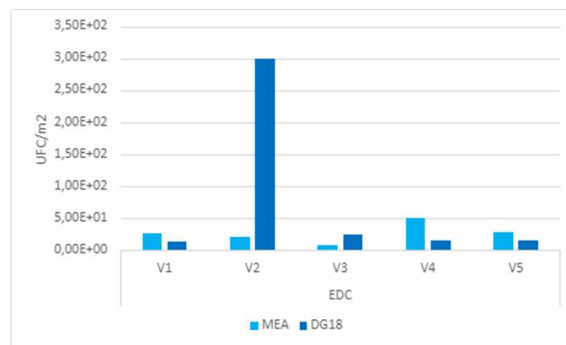


Figura 18: Valores medianos de fungos de amostras de EDC (UFC/m²/dia¹) inoculadas em MEA e DG18 a 27°C.

Nos EDCT não houve crescimento fúngico em DG18 a 27°C. Em MEA a contaminação fúngica variou entre $4,17 \times 10^2$ e $1,18 \times 10^1$ UFC/m² nas vacarias V1 e V4, respetivamente (Figura 19).

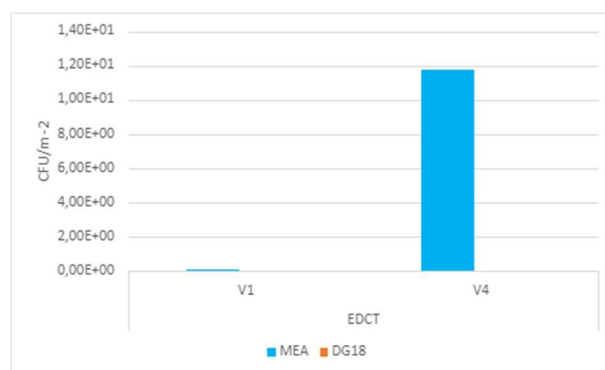


Figura 19: Valores medianos de fungos de amostras de EDCT (UFC/m²/dia¹) inoculadas em MEA e DG18 a 27°C.

4.3.2. Camas após o uso e rações

Nas amostras de camas após o uso (Figura 20), em MEA os valores médios de contaminação fúngica variaram entre $1,00 \times 10^0$ CFU/g¹ e $9,75 \times 10^0$ CFU/g¹ nas explorações V4 e V1, respetivamente. Em DG18 a 27°C as contagens variaram entre $1,75 \times 10^0$ CFU/g¹ e $2,00 \times 10^1$ CFU/g¹ nas explorações V4 e V2, respetivamente. Em DG18 a 37°C as contagens variaram entre $1,00 \times 10^0$ CFU/g¹ e $8,00 \times 10^0$ CFU/g¹ nas explorações V4 e V1, respetivamente. Em MEA os valores de contaminação são mais elevados em V1, enquanto em DG18 27°C e DG18 37°C foram em V3 e V1, respetivamente.

Nas amostras de ração (Figura 20), em MEA os valores médios de contaminação fúngica variaram entre $1,00 \times 10^0$ CFU/g¹ e $1,58 \times 10^1$ CFU/g¹ nas explorações V4 e V2, respetivamente. Em DG18 a 27°C as contagens variaram entre $2,17 \times 10^0$ CFU/g¹ e $8,67 \times 10^0$ CFU/g¹ nas explorações V1 e V2, respetivamente. Em DG18 a 37°C as contagens variaram entre $1,00 \times 10^0$ CFU/g¹ e $4,00 \times 10^0$ CFU/g¹ nas explorações V1/V2 e V5, respetivamente. Em MEA os valores de contaminação são mais elevados em V2, enquanto em DG18 27°C e DG18 37°C foram em V3 e V1, respetivamente.

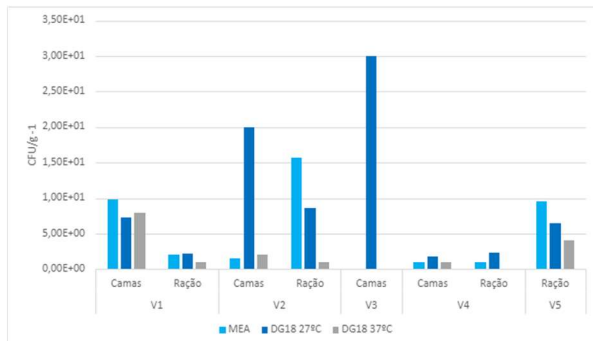


Figura 20: Valores medianos de fungos de amostras de camas e rações (CFU/g¹) inoculadas em MEA e DG18 a 27°C e 37°C

4.3.3. Esfregaços de superfícies

Nas amostras esfregaços (Figura 21) em MEA os valores médios de contaminação fúngica variaram entre $1,25 \times 10^4$ CFU/m² e $7,67 \times 10^4$ CFU/m² nas explorações V3 e V5, respetivamente. Em DG18 a 27°C a contaminação varia entre $1,67 \times 10^4$ CFU/m² e $7,83 \times 10^4$ CFU/m² nas explorações V3 e V5, respetivamente. Em DG18 a 37°C a

contaminação varia entre $2,50 \times 10^4$ CFU/m² e $6,33 \times 10^4$ CFU/m² nas explorações V3 e V4, respetivamente. Em MEA os valores de contaminação são mais elevados em V5, enquanto em DG18 27°C e DG18 37°C foram em V5 e V4, respetivamente.

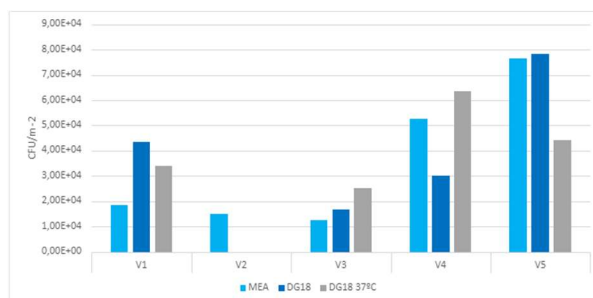


Figura 21: Valores medianos de fungos de amostras de esfregaços de superfícies (CFU/m²) inoculadas em MEA e DG18

4.4. Quantificação e identificação/diversidade fúngicas

No Apêndice VI: Avaliação quantitativa e qualitativa de fungos, na Tabela 10 estão representados a prevalência e a caracterização fúngica nas amostras ambientais. Nos EDC *Penicillium* sp. foi o género mais prevalente em MEA e DG 18 a 27°C e 37°C (100% na V3 e 92% na V1). Nos EDCT foi o género *Penicillium* sp. o mais prevalente em MEA (80% na V1) e *Aspergillus* sp. em DG 18 a 37°C (100% na V4). No meio DG 18 a 27°C não houve crescimento. Nas camas o género *Aspergillus* sp. foi o mais dominante em MEA (100% na V4), DG 18 a 27°C e 37°C (100% na V2). Em DG 18 a 27°C na V3 foi *Penicillium* sp. o único em crescimento (100%). Nas rações *Aspergillus* sp. foi mais comum (100% na V2) em MEA e DG 18 a 27°C e *Fusarium verticillioides* a espécie em DG 18 a 37°C (100% na V2). Nos esfregaços *Aspergillus* sp. foi frequente em MEA e DG 18 a 37°C (91% na V5 e 100% na V3) e *Penicillium* sp. em DG 18 a 27°C (100% em V3). Fungos ambientais, como o género *Lichthiemia* sp., da ordem Mucorales, o género *Paecilomyces* sp., *Aureobasidium* sp., e a espécie *Monascus ruber* cresceram em MEA e DG18 37°C, na V1, V4, V5, respetivamente.

4.5. Complexos de *Aspergillus* identificadas nas matrizes

A Figura 22 mostra os complexos toxigênicos de *Aspergillus* detetados nas matrizes recolhidas, em MEA, DG18 27°C e DG 18 37°C. Foram identificados cinco complexos de *Aspergillus* no MEA, DG18 (27°C) e DG 18 (37°C). Em MEA os complexos identificados foram *Fumigati*, *Flavi*, *Nigri*, *Aspergilli* e *Nidulantes*. Em DG18 (27°C) os complexos identificados foram *Fumigati*, *Aspergilli*, *Nigri*, *Nidulantes* e *Flavi*. Em DG 18 a 37°C os complexos identificados foram *Fumigati*, *Flavi*, *Nigri*, *Restricti* e *Aspergilli*.

Em MEA o complexo prevalente foi o *Fumigati* com 100% em amostras de EDC, rações e zaragatoas na V5, *Nigri* nas amostras de camas e rações (100% na V4 e V2) e *Aspergilli* em amostra de ração (100% na V1). O complexo *Nidulante* foi identificada numa amostra de EDCT em V1 (100%).

Em DG 18 a 27°C os complexos *Aspergilli*, *Nigri* e *Fumigati* foram identificados em 100% das amostras de ração na V1, cama na V2 e EDC, ração e esfregaço na V5. O complexo *Flavi* foi identificado numa amostra de zaragatoa na V1 com 67% de prevalência.

Em DG 18 a 37°C o complexo prevalente foi *Fumigati* com 100% de amostras de zaragatoas, camas e EDC nas vacarias V1, V3, V4 e V5. O complexo *Restricti* foi identificado na amostra de ração na vacaria V1 (100%). O complexo *Aspergilli* foi identificado na amostra de EDCT na V4.

Nos EDC o complexo prevalente foi *Fumigati*, com 100%, em MEA na V5, DG18 a 27°C na V5 e DG18 38°C na V4. O complexo *Fumigati* foi o seguinte mais prevalente com 75 % em MEA na V1.

Nos EDCT os complexos *Nidulantes* e *Aspergilli* são os mais prevalentes (100%) em MEA (V1 e V4) e DG 18 a 37°C (V4).

Nas amostras de camas o complexo *Flavi* foi identificado em MEA na vacaria V4 (100%). O complexo *Nigri* foi identificada em MEA e DG18 a 27°C, na vacaria V2 (100%). O complexo *Fumigati* foi identificada em DG18 a 37°C na vacaria V4 (100%).

Nas amostras de ração o complexo *Aspergilli* na V1, em MEA e DG18 27°C foi a única a ser identificado (100%). O complexo *Nigri* foi identificado em MEA e DG18 a 27°C na vacaria V4 (100%). O complexo *Fumigati* foi identificado em MEA e DG18 a 27°C na vacaria V5 (100%). O complexo *Restricti* foi identificado em DG18 a 37°C na V1. Na amostra de ração na V2 o complexo *Flavi* foi a mais prevalente com 80%, seguida de *Fumigati* com 20%, em MEA. A amostra de ração na V2, em DG18 a 27°C apresentou

quatro complexo *Aspergilli*, *Fumigati*, *Nidulantes* e *Nigri* (28%, 6%, 6% e 60%, respectivamente).

Nos esfregaços *Fumigati* foi o único complexo identificado na V5 (MEA e DG18 a 27°C), na V4 (DG18 a 37°C) e nas V4 e V5 (DG18 a 37°C). Os complexos *Nigri* e *Flavi* são os seguintes mais prevalentes, com 50% e 68%, em MEA na V1 e DG18 a 27°C na V1, respectivamente.

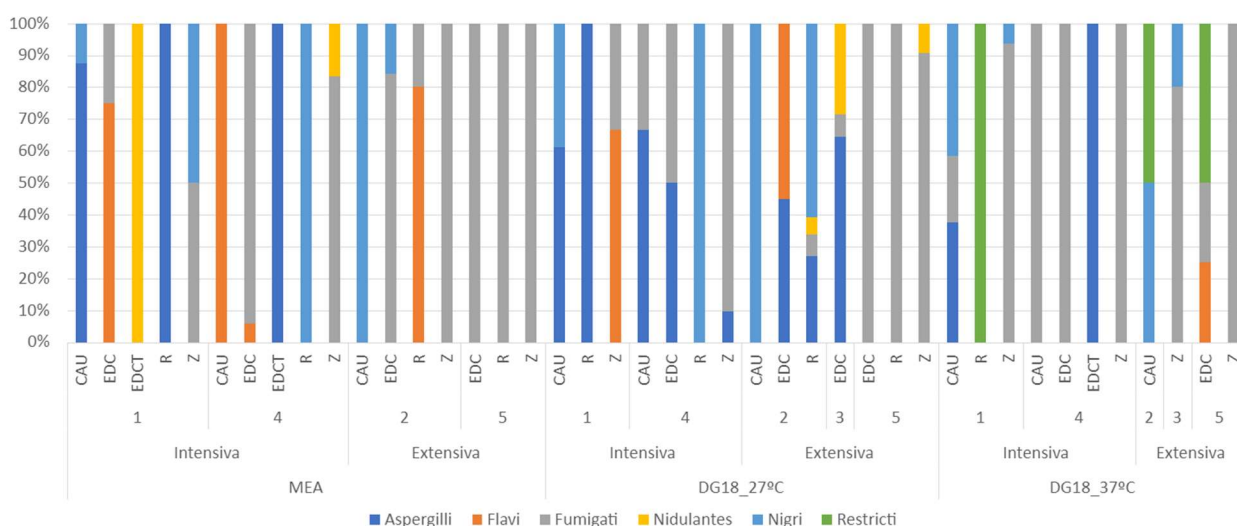


Figura 22: Distribuição dos complexos de *Aspergillus* em MEA e DG18 (27° e 37°C) em EDC, camas, rações e esfregaços colhidos em diferentes áreas das cinco explorações pecuárias.

4.6. Crescimento fúngico e resistência fúngica em meios suplementados com azóis

As amostras de EDC, EDCT, camas, rações e esfregaços foram avaliados quanto à resistência aos azóis. Os resultados da quantificação e identificação fúngica da triagem em *Sabouraud* dextrose agar (SDA), e SDA suplementado com Itraconazole (ITZ), Voriconazole (VCZ) e Posaconazole (PCZ) são apresentados no

Legenda: CAU – Camas Após Uso; EDC - Electrostatic Dust *Cloths*; R – Ração; Z – Zaragatoa

Apêndice VII: Diversidade e prevalência fúngica em meios suplementados com azóis e na Tabela 11 Em todos os casos a carga fúngica foi menor em meios SDA suplementados com azóis.

Foi observada reduzida suscetibilidade a ITZ em EDC, a VCZ e PCZ em camas e rações. Em relação à diversidade fúngica em amostras de EDC e rações, as espécies *Aspergillus* sp., *C. sitophila*, *Mucor* sp. foram prevalentes (respectivamente 100%).

Nos meios suplementados ITZ, VCZ e PCZ os géneros *Geotrichum* sp. e *Mucor* sp. mais prevalentes (100% respetivamente) em camas, rações e EDC.

Em SDA foi identificada a maior diversidade fúngica (número de espécies diferentes) nos dois tipos de exploração pecuário. Os géneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram identificados apenas em SDA em EDC e EDCT. Em explorações de regime intensivo (V1 e V4) foram identificadas *Aspergillus* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp., *Geotrichum* sp., *C. sitophila*. Em explorações de regime extensivo foram identificadas: *Aspergillus* sp., *Mucor* sp., *C. sitophila*. Em ITZ apenas surgiu o género *Mucor* sp. em EDC. Em PCZ cresceu apenas *Geotrichum* sp. em amostra de cama. Em VCZ em vacarias de regime intensivo cresceu *Geotrichum* sp. em amostra de cama. Em explorações pecuárias de regime extensivo cresceram fungos dos géneros *Mucor* sp., *Geotrichum* sp. e espécie *C. sitophila*.

O *Aspergillus* sp. também foi identificado em EDC e EDCT (100% e 65% em SDA), com um complexo identificado. O crescimento de *Aspergillus* complexo *Fumigati* foi identificado em EDC das explorações pecuárias V3 e V5 (100%) e EDCT (100%) na V4 em meio SDA.

4.7. Estudo da diversidade fúngica

No Apêndice VIII: Índices de *Shannon* e *Simpson* e na Tabela 12 estão representados os índices de diversidade fúngica de Shannon (H) e Simpson (D) em todas as matrizes e em cada meio de crescimento fúngico e meio suplementados com azóis. Em MEA foi detetada maior diversidade fúngica em zaragatoa da V3 (Índice de Shannon (H) = 0,6, Índice de Simpson (D) = 2,9) em comparação com DG 18 onde esta diversidade se manifestou num EDC da V4 (Índice de Shannon (H) = 1,13, Índice de Simpson (D) = 2,50) e em DG 18 a 37°C foi evidenciada numa amostra de ração da V1 (Índice de Shannon (H) = 1,04, Índice de Simpson (D) = 2,67).

Ao analisar a diversidade fúngica em meios suplementados com azóis foi em VCZ, numa amostra de ração na V5 que se detetou maior diversidade fúngica (Índice de Shannon (H) = 1,00, Índice de Simpson (D) = 2,47) e no meio SDA numa amostra de EDC da V5 que surgiram os índices mais expressivos (Índice de Shannon (H) = 0,56, Índice de Simpson (D) = 1,60).

4.8. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA)

As pesquisas de MRSA foram realizadas exclusivamente em amostras de EDC e EDCT e foram detetadas três amostras suspeitas, tal como observado na Tabela 13 do

Apêndice IX: . Em EDCT foi detetada uma amostra suspeita (não concluída) de MRSA, mais precisamente na vacaria V4. Nos nove EDC analisados foram detetadas duas amostras suspeitas (não concluídas) de MRSA, nas vacarias V1 e V5, mais especificamente na sala de ordenha e num pequeno estábulo fechado, respetivamente. A prevalência de amostras de EDC suspeitas de MRSA foi de 22% (2 das 9 amostras).

4.9. Estudo da relação de variáveis

Foram detetadas correlações estatisticamente significativas nas seguintes matrizes e meios de cultura (Tabela 14):

- Nos EDC, em sentido positivo de intensidade moderada entre a contagem bacteriana de VRBA e MAC ($r_s=0,672$, $p= 0,46$);
- Nas rações:
 - o No sentido positivo de intensidade moderada entre TSA, VRBA ($r_s = 0,554$, $p= 0,021$).
 - o Foi igualmente detetada correlação na contaminação bacteriana em TSA com MAC ($r_s = 0,599$, $p = 0,011$)
 - o Encontrou-se correlação estatisticamente significativa de intensidade forte de contaminação bacteriana em VRBA com meio MAC ($r_s = 0,920$, $p < 0,001$).
- contaminação fúngica em MEA com meio DG 18 ($r_s = 0,591$, $p = 0,013$) e DG 18 37°C ($r_s = 0,573$, $p = 0,016$);
- Nas zaragatoas foi encontrada correlação estatisticamente significativa de contaminação bacteriana em meio VRBA com meio MAC ($r_s = 0,743$, $p < 0,001$);
- Foi também possível estabelecer que maiores contaminações fúngicas em DG 18 37°C estão relacionados com maiores valores de resistência a azóis em meio suplementado com VCZ.

Pode-se afirmar que existe correlação estatisticamente significativa entre frequência de higienização de utensílios e a resistência em meio ITZ ($r_s = 0,406$, $p = 0,05$), e que maior frequência de higienização de utensílios e bebedouros está relacionado com menor frequência de utilização de antibióticos e antifúngicos (Tabela 15).

Não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas entre contaminação fúngica, bacteriana e resistência entre o tipo de produção/sistema de produção (valor de $p > 0.05$) (Tabela 16).

5. Discussão

O uso desadequado de antimicrobianos na atividade pecuária está identificada como sendo um dos principais promotores da resistência antimicrobiana com as consequências já descritas neste trabalho⁴⁴.

A vertente ambiental da *One Health* é a menos estudada e urge a necessidade de maior atenção, pois sabe-se que é um dos principais promotores da resistência antimicrobiana na saúde humana e animal^{97,167–169}. A presença de antimicrobianos no ambiente é um dos principais fatores que conduzem à disseminação de microrganismos resistentes que afetam pessoas, animais e os recursos ambientais^{30,167}. A correlação entre a saúde humana, a saúde animal e o meio ambiente é evidenciada não só em estudos, como as catástrofes naturais, surtos e epidemias que ocorrem nestes últimos anos^{144,167}. Este trabalho teve como finalidade contribuir com evidencia que sustenta o conhecimento numa das principais atividades potenciadoras da resistência antimicrobiana e com poucos estudos concretizados em contexto nacional tendo, por isso, o caráter de inovação da temática.

Este trabalho apresentou como objetivo principal caraterizar a presença de microrganismos (bactérias e fungos) resistentes a antimicrobianos em cinco explorações pecuárias de produção de bovinos numa região de Portugal e contribuir para a prevenção da resistência a antimicrobianos através da identificação de medidas de promoção de saúde mais relevantes que podem ser implementadas através de projetos de sensibilização e aumento da literacia dos utilizadores dos espaços levando a alterações de comportamentos de risco por comportamentos promotores de saúde (práticas de promoção e proteção da saúde ocupacional e da segurança alimentar e ambiental). Para atingir os objetivos propostos este trabalho integrou uma abordagem alargada de amostragem passiva para caraterização de bioaerossóis recorrendo a EDC e EDCT, esfregaços de superfícies, bem como materiais de camas e rações dos animais. A metodologia passiva aliada a métodos de microbiologia clássica revelou-se adequada para obter dados de avaliação da microbiota viável e crítica na saúde, bem como de triagem de resistência fúngica aos azóis e identificar a presença suspeita de MRSA^{107,152}. A amostragem passiva tem como vantagens a simplicidade da aplicação, ser económica, menos invasiva e permitir caraterizar a contaminação num período de tempo mais alargado do ambiente avaliado¹⁵⁶. Esta metodologia já foi realizada em estudos ocupacionais em território português e apresenta a vantagem de permitir uma melhor caraterização dos riscos para a saúde humana, animal e ambiental, sendo facilmente reproduzível em vários contextos^{107,117,118,121,128,152,153,155,170–172}.

Apesar do número restrito de explorações pecuárias este estudo permitiu confirmar uma elevada exposição neste contexto a patógenos prioritários para a saúde humana e animal, nomeadamente fungos associados a resistência (ordem Mucorales e géneros *Aspergillus* sp. e *Fusarium* sp.), bem como a presença suspeita de MRSA em amostras ambientais. A vigilância da resistência antifúngica é particularmente importante em ambientes com elevada probabilidade de contaminação, mas também devido ao aumento previsto da prevalência de fungos resistentes como consequência indireta das alterações climáticas^{75,76,81}.

A vertente laboratorial ficou a cargo de especialistas na área da microbiologia do laboratório de Microbiologia do H&TRC-ESTeSL do Instituto Politécnico de Lisboa, área de investigação Saúde Pública e Ocupacional. A caracterização contextual das explorações, campanha de amostragem e a análise de dados microbianos foi realizada pela investigadora. Com a elaboração de um instrumento de recolha de dados, elaborado para este trabalho, pretendeu-se contribuir com uma ferramenta auxiliar para estudos académicos futuros e para prática uniformizada em Saúde Pública em contexto de serviços locais (

Apêndice IV: Grelha de **observação**).

Este estudo integrou explorações de regime intensivo e extensivo, de produção de carne e leite, propositadamente de forma a obter uma representação mais abrangente e representativa da realidade de uma zona geográfica específica da contaminação microbiana, de crescimento em meios suplementados com azóis e MRSA. A investigação existente atualmente incide com particular atenção para a análise em contexto de explorações industriais de produção de leite.

A utilização de antimicrobianos foi analisada em termos retrospectivos, de janeiro a dezembro de 2023. Não foram registados uso de fungicidas, em animais, no seu ambiente, ou em culturas de rações para os animais neste período de tempo. No entanto, a utilização de um produto químico com a função de inibição de micotoxinas foi referida como realizada esporadicamente quando as rações que são administradas aos animais apresentam vestígios de micotoxinas (exploração pecuária V2). Contudo, uma vez que a aplicação de fungicidas como produtos fitofarmacêuticos ocorre diretamente nas plantações não se pode excluir a possibilidade de disseminação destes produtos químicos provenientes de produções agrícolas das proximidades por via aérea, nomeadamente se a aplicação não respeitar os critérios de aplicação em função do clima (ventos, por exemplo). Em relação à aplicação de antibióticos, foi verificada a sua utilização nas duas explorações pecuárias de regime intensivo e de produção leiteira. Verificou-se que as substâncias antimicrobianas utilizadas pela V1 são substâncias

classificadas como de importância crítica para a medicina humana e de acordo com o risco de resistência antimicrobiana, de uso comum em uso humano e animais produtores de alimentos, para as organizações como a OMS e Organização Mundial da Saúde Animal (classe de antimicrobianos - exemplos de antimicrobianos): penicilinas - amoxicilina-ácido clavulânico, Aminoglicósidos - dihidroestreptomicina, Cefalosporinas (3.^a, 4.^a e 5.^a geração) - cefoperazona. Estas substâncias categorizadas na lista AMEG como de C-Precaução e B-Restringir^{63,173}.

A prática de aplicação de resíduos orgânicos (estrumes e chorumes) como fertilizantes de solo foi verificada nas cinco explorações estudadas, sendo esta uma prática comum em todo o país e, por isso, encontra-se regulamentada através de legislação nacional e no Novo Regime do Exercício da Atividade Pecuária (ex. cultivo do milho usados como ração de animais)¹⁷⁴⁻¹⁷⁶.

Não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas entre contaminação fúngica, bacteriana e resistência e o tipo de produção/sistema de produção. Possivelmente, o facto de as explorações pecuárias estudadas serem empresas familiares, muito comum no contexto geográfico, e com um pequeno número de pessoas e menos avançadas em termos estruturais e de níveis de higiene, pode ter contribuído para os resultados (Apêndice X: Estudo da relação de variáveis).

As amostras de EDC, EDCT, esfregaços, rações e camas mostraram-se mais representativas em termos de contaminação bacteriana com maior percentagem de bactérias em TSA, VRBA e MAC do que crescimento fúngico em MEA e DG 18 27° e 37°C. Os resultados deste estudo demonstram contaminação em todas as matrizes analisados por bactérias Gram-negativas. Na lista de patogénicos prioritários da OMS estão incluídas bactérias Gram-negativas, que são uma ameaça para a saúde humana por serem resistentes a antibióticos e serem capazes de transmitir essa resistência, tais como: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*^{45,177,178}. A utilização de meios para crescimento de bactérias Gram-negativas é de extrema relevância para a Saúde Pública uma vez que permite a monitorização da contaminação que pode ser útil para a identificação das medidas corretivas necessárias e melhoria de medidas de prevenção. Neste estudo foram utilizados meios com especificidade para Gram-negativas (VRBA e MAC), nos quais foi observado crescimento bacteriano em particular em esfregaços de superfícies e EDC (Figura 12 e Figura 16). Realça-se a mais-valia para a avaliação bacteriana da análise destas matrizes na caracterização microbiana neste contexto.

Foram observadas práticas que podem contribuir para a contaminação e transmissão bacteriana com potencial para estar na origem de doença e aumentar a necessidade de uso de antibióticos. Verificou-se a utilização de panos comuns, e não de uso exclusivo em cada animal, na limpeza dos tetos das vacas leiteiras na sala de ordenha. Esta prática demonstra uma baixa percepção de risco, mas com potencial para mudança de comportamento¹⁷⁹.

A dispersão e os padrões de contaminação microbiana são condicionados por diferentes variáveis, tanto dos microrganismos, quanto fatores ambientais como por exemplo: humidade relativa, temperatura, tipo de exploração, tipo de produção, condições estruturais das explorações pecuárias, condições de ventilação, procedimentos de higienização e desinfecção dos materiais e espaços, materiais de camas e rações, tipo e número de animais e pessoal, contaminação cruzada de fontes externas^{126,180}.

Este estudo identificou espécies fúngicas da “Lista de patógenos Prioridade fúngica da OMS para orientar a pesquisa, desenvolvimento e ação de saúde pública” da OMS: *Aspergillus fumigatus*, Mucorales (*Rhizopus* sp., *Mucor* sp., *Lichtheimia* sp.) e *Fusarium* sp. (*Fusarium verticillioides* e *Fusarium graminearum*), que fazem parte dos grupos de prioridade crítica e alta, respetivamente (Tabela 10 do Apêndice VI: Avaliação quantitativa e qualitativa de fungos)⁴⁴. A identificação em amostras de camas, rações e EDC, corroboram a necessidade de intervir neste ambiente interno específico.

Espécies pertencentes ao género *Aspergillus* complexo *Fumigati* foram observadas em todas as matrizes e devem ser destacadas, uma vez que constam da lista de prioridades fúngicas da OMS e este complexo foi listado no grupo de prioridade crítica devido a critérios específicos, relacionados com relevância clínica, resistência antifúngica, mortes, incidência anual, complicações e sequelas^{21,44}. A identificação destas espécies fúngicas potencialmente patogénicas/toxigénicas por amostragem passiva justificam uma intervenção nas explorações pecuárias, uma vez que podem ser aerossolizadas durante a execução das atividades próprias de cuidado de animais aumentando a exposição por inalação de trabalhadores e dos ambientes próximas às explorações. Os complexos *Fumigati* e *Nigri* têm elevado potencial citotóxico e podem causar problemas de saúde aos indivíduos expostos uma vez que foram identificados em DG18 a 37°C, temperatura basal humana, o que pode significar uma possível colonização e infeção em indivíduos. O presente estudo seguiu a tendência de estudos anteriores com identificação de complexos de *Aspergillus* (*Fumigati*, *Nigri*, *Aspergilli*, *Flavi* e *Restricti*) noutras atividades ocupacionais nomeadamente de produção animal e rações^{41,113,115,117,120,182,183}. O complexo *Fumigati* pode causar infeções

invasivas graves, está associado à resistência antifúngica e representa uma ameaça ao sucesso no tratamento da aspergilose invasiva por azóis^{36,113}. Em vacas prenhas, a presença de *Aspergillus fumigatus* pode infectar o útero e, através da placenta, desenvolver-se no feto causando o aborto. Estima-se que 64% de abortos em bovinos se devem a este fungo. Efetivamente, em animais as espécies do género *Aspergillus* sp. mais importantes sob o ponto de vista de patogenicidade são as *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans* e *A. terreus*¹⁴⁸. Estas espécies podem ser identificadas na vegetação em decomposição, ensilagem, alimentos para animais e em condições de temperatura e humidade favoráveis ao seu desenvolvimento também são observadas nestes substratos¹⁸². Esta descoberta reforça o uso deste complexo na atividade de produção animal como sentinela para contaminação fúngica toxigénica perigosa e com implicações clínicas^{40,183}.

No presente estudo, não foram detetados *Aspergillus* sp. em meios suplementados com azol, apesar da sua identificação em ambientes ocupacionais portugueses. A ausência de crescimento de *Aspergillus* em meio suplementado com azol encontrado neste estudo não significa que não existem isolados ambientais resistentes a azol neste tipo de atividade^{40,114,181}. O crescimento de *Aspergillus* sp. foi observado em SDA, mas não em meio suplementado com azol (Tabela 11 do Apêndice VII: Diversidade e prevalência fúngica em meios suplementados com azóis). Estes resultados podem ser decorrentes do número de amostras recolhidas (n=50) podendo o resultado ser diferente em amostras com um número mais expressivo. No entanto, outros fungos como *Mucor* sp., *C. sitophila* e *Geotrichum* sp. foram identificados em meios suplementados, em amostras de camas, rações e EDC, apresentando menor suscetibilidade aos azóis (Tabela 11). Estes dois por terem crescimento rápido podem inibir o crescimento de fungos com relevância clínica como é o caso do *Aspergillus* complexo *Fumigati*¹⁸⁴⁻¹⁸⁶.

A presença desses fungos em triazóis pode sugerir a presença de resistência multiazólica. O crescimento de Mucorales que são intrinsecamente resistentes a medicamentos antifúngicos azólicos como voriconazol pode ser devido ao desenvolvimento de resistência secundária a antifúngicos à base de azóis^{44,114,187}. A Ordem Mucorales tem relevância clínica, especialmente em pacientes imunocomprometidos, com diabetes e lesões cutâneas e está na origem de mucormicose^{36,44}. Esta resistência é uma preocupação ambiental, mas também uma ameaça ao tratamento de infeção mucormicose que apresenta limitadas opções terapêuticas. O crescimento de Mucorales em meio suplementados com azóis já foi reportado em Portugal em vários ambientes internos, incluindo criação de suínos por

Viegas et al.^{114,187}. Em Portugal no período de 2013-2018 algumas IFI estiveram associadas a *Mucor* sp. resistente²⁶. O crescimento em azóis de *Geotrichum* sp. detetados em amostras ambientais e a infeções oportunistas como geotricose chamam a atenção para um problema para saúde dos trabalhadores. Crescimento de *C. sitophila* em meios suplementados já foi detetado em Portugal num estudo desenvolvido por Viegas et al. numa empresa da área da gestão de resíduos¹⁸⁸. A microbiota capaz de crescer em meios de triagem de azóis pode estar subestimada, pois há competição por nutrientes entre espécies fúngicas em cultura e entre espécies com crescimento mais rápido.

A presença de fungos toxigénicos produtores de micotoxinas tais como (géneros *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp. e *Alternaria* sp.) em todas as matrizes analisadas pode indicar a presença provável de micotoxinas como aflatoxinas, ocratoxina A, patulina, fumonisinas, zearalenona e nivalenol/desoxinivalenol que podem contaminar o leite produzido pelas vacas das explorações estudadas⁹⁸. As micotoxinas presentes nas rações de animais provocam efeitos adversos na saúde de seres humanos e animais, têm uma ação cancerígena, neurotóxica ou teratogénica^{93,99,103,189–191}. A exposição a micotoxinas ocorre principalmente através da inalação em contexto de atividades ocupacionais ou pela ingestão de produtos alimentares como produtos vegetais e consumo de produtos alimentares de origem animal como o leite¹⁹². As micotoxinas são estáveis mesmo em temperaturas elevadas sendo, portanto, uma preocupação de segurança alimentar. Em animais, o consumo de rações contaminadas por micotoxinas condiciona o rendimento da produção animal e afeta a saúde e bem-estar dos animais pois contribui para a perda de peso corporal, diminuição da capacidade reprodutiva, danos em órgãos vitais, aumento de doenças associadas à imunossupressão e até morte¹⁹³. Vários estudos realizados em ambiente de produção de aves e suínos realizados em contexto português denotaram a ocorrência de aflatoxinas, com casos relatados de inalação de aflatoxina B1 por trabalhadores¹²⁵, bem como a presença de conídios de *Aspergillus* sp. no ar¹⁹⁴. Num estudo realizado em Portugal, por Viegas et al. confirmou-se que as rações de animais produtores de leite estão contaminadas com micotoxinas, afetando a saúde dos animais e a possivelmente a qualidade do leite. Todas as amostras analisadas apresentaram contaminação por pelo menos duas micotoxinas e no máximo treze micotoxinas na mesma amostra. Foram detetadas micotoxinas como zearalenona, desoxinivalenol e ocratoxina A¹⁹².

Os resíduos orgânicos são compostos por restos de camas e rações, resíduos fecais dos animais que podem conter resíduos de antibióticos, e são aplicados nos terrenos

das redondezas das explorações como fertilizante do solo que será utilizado para produção de alimentos para os animais²². A aplicação dos resíduos orgânicos em campos agrícolas é um potencial problema de saúde pública para o ambiente mais próximo das explorações onde foi desenvolvido o estudo, uma vez que foram isolados queratinofílicos (géneros *Fusarium* sp.) e toxigénicos (géneros *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp.) nas amostras ambientais com possibilidade de aerossolização das poeiras contaminadas¹⁹⁵.

A bactéria *S. aureus* resistente à metilina (MRSA) é um desafio e uma preocupação para a saúde pública pela prevalência em interfaces humanas, animais e ambientais. Faz parte da lista da OMS de bactérias e tem um nível alto de transmissibilidade em contexto comunitário⁴⁵. A deteção de MRSA em amostras de EDC levanta problemas de saúde ocupacional e de saúde pública (Tabela 13 do Apêndice IX: MRSA). A deteção suspeita nos EDCT de MRSA na exploração pecuária V4 levanta a necessidade de vigilância médica regular da saúde de trabalhadores agrícolas. Estes trabalhadores poderão estar colonizados e serem portadores assintomáticos de MRSA podendo-o transmitir na comunidade. Um estudo português de Oliveira et al. em vários ambientes ocupacionais, incluindo um ambiente de produção animal, detetou elevadas prevalências de portadores assintomáticos em particular trabalhadores de suínos (8% MSSA e 46% MRSA)¹⁰⁷.

O uso de equipamentos de proteção individual para as vias respiratórias não foi observado nas cinco explorações. O uso destes equipamentos não é de fácil adesão pelos trabalhadores agrícolas, como foi identificado pela OSHA-UE¹²⁹. Um dos motivos para a fraca adesão aos equipamentos de proteção individual poderá estar relacionado com o desconhecimento dos riscos a que se encontram expostos e pelos custos na sua aquisição¹³⁰. A OSHA-UE recomenda os serviços de saúde ocupacional a realizar exames de saúde aos agricultores quanto à presença de bactérias multirresistentes (como MRSA)^{129,130}. As amostras EDC e EDCT suspeitas de contaminação por MRSA evidenciaram a exposição por parte de trabalhadores, animais e ambiente, lançando a necessidade de mais estudos para tirar conclusões relativas ao nível de risco a que estes estão expostos. Chama-se a atenção para a suspeita de MRSA na exploração pecuária V5, do tipo extensivo, e que não faz uso de antibióticos. Este resultado revela a necessidade de mais estudos para a pesquisa da incidência de MRSA em atividade de produção de animais.

O estudo da relação da contaminação bacteriana, fúngica e resistência fúngica com a frequência de higienização e de utilização de antibióticos mostrou que existe uma

correlação estatisticamente significativa entre a frequência de higienização de utensílios e resistência em meio ITZ, e que maior frequência de higienização de utensílios e bebedouros está relacionado com menor frequência de utilização de antibióticos. Tal evidência mostra que a higienização do ambiente com produtos adequados pode ser eficaz na diminuição de uso de antibióticos (Tabela 14 do Apêndice X: Estudo da relação de variáveis).

Os dados obtidos revelaram a necessidade de uma intervenção em promoção da saúde e prevenção da doença. Este estudo permitiu identificar reservatórios de agentes patógenos nas diferentes explorações pecuárias e mostrou a necessidade de implementar estratégias de redução de patógenos específicos. Em termos de promoção da saúde destaca-se a necessidade de ações que protejam os trabalhadores, a segurança alimentar e a sustentabilidade ambiental⁸. Sugere-se a implementação de programas de promoção da saúde, com enfoque na saúde ocupacional, incidindo nas tarefas que representam maior risco para o trabalhador, tais como a adoção de boas práticas de higiene ambiental e de gestão dos efluentes pecuários para fertilização do solo, higiene de superfícies, lavagem de mãos, formação sobre execução de tarefas de maior propensão para a libertação de poeiras como a movimentação de camas e rações, informações sobre acondicionamento de rações e camas, promoção da ventilação em espaços interiores ^{8,22,40,126,129,130,132,196}.

Tendo em conta os dados da exposição microbiana, chama-se a atenção para a importância do uso de equipamentos de proteção, como especial ênfase para o uso de equipamentos de proteção das vias respiratórias, em complemento com informação de literacia sobre práticas que minimizem a exposição a poeiras e bioaerossóis. A necessidade de educação e formação destinada ao trabalhador agrícola também não pode esquecer a gestão de uso de antibióticos e alternativas como melhoria do bem-estar animal¹³⁰. O ensino de boas práticas de promoção da saúde ocupacional deve começar nas escolas profissionais, mas deve abranger todas as faixas etárias visto que esta atividade é executada predominantemente por trabalhadores de faixas etárias mais velhas e sem formação formal, segundo dados do Recenseamento Agrícola de 2019¹⁹⁷.

Limitações do estudo:

A conformidade dos valores de contaminação microbiana com o quadro jurídico português dos resultados não pode ser confirmada pois não foram aplicados métodos de amostragem ativos de ar¹⁹⁸.

O estudo da correlação de variáveis ambientais com as variáveis de ventilação, temperatura e humidade, em conjunto com os dados microbiológicos, forneceriam uma visão mais profunda dos espaços analisados. Os dados podem também estar subestimados uma vez que apenas uma pequena parcela da contaminação microbiana identificada no ar é cultivável. A campanha de colheita foi realizada no fim do outono pelo que se encontram em falta a análise de dados noutras estações do ano principalmente em estações mais quentes. A temperatura e humidade são fatores cruciais para o desenvolvimento dos microrganismos e as variações sazonais podem influenciar o desenvolvimento dos microrganismos¹⁸². Um estudo de Costa et al. refere que em Portugal a resistência antimicrobiana está associada ao verão¹⁹⁹.

São igualmente potenciais limitações deste trabalho o reduzido número de explorações pecuárias avaliadas e o acesso a instalações de produção pecuária de pequena e média dimensão de uma zona geográfica em particular.

Os resultados apresentados refletem a realidade de uma determinada região portuguesa muito específica, eventualmente diferente de outras regiões do país. As rações e camas que foram analisadas são as existentes no contexto e no momento das colheitas, pelo que podem ser diferentes dependendo da região do país e mesmo da altura do ano.

6. Conclusão

A resistência antimicrobiana em explorações pecuárias de produção de alimentos para consumo humano em Viana do Castelo, é uma preocupação crescente. A abordagem *One Health* é essencial nesse contexto uma vez que reconhece a interdependência entre a saúde humana, animal e ambiental. A implementação da abordagem *One Health* em promoção da saúde é crucial para combater a resistência a antimicrobianos em explorações pecuárias pois esta abordagem integradora pretende melhorar o uso responsável de antimicrobianos, proteger a saúde animal, humana e ambiental, e garantir a produção sustentável de alimentos de origem animal.

A promoção da saúde neste contexto específico, depende de esforços coordenados de todos os intervenientes desde o agricultor, veterinário, a todas as entidades locais e nacionais para a adoção de práticas mais sustentáveis e seguras de produção de alimentos de origem animal.

As ações de promoção da saúde mais relevantes neste contexto específico mais relevantes passam pela educação e conscientização através de formação contínua de agricultores e veterinários sobre o impacto da resistência antimicrobiana e sobre o uso correto de antimicrobianos, a importância da higiene e biossegurança nas explorações, melhoria do bem-estar animal alternativas aos antimicrobianos e a gestão sustentável dos efluentes pecuários produzidos. A promoção da saúde ocupacional neste contexto merece especial enfoque.

Ações/campanhas de sensibilização voltadas para o consumidor podem incentivar a procura de produtos de origem animal criados de forma sustentável, incentivando práticas de produção mais responsáveis por parte dos agricultores, tal como acontece com a agricultura biológica.

É estrategicamente prioritário incentivar a colaboração intersectorial com autoridades de saúde pública, animal, ambiental e produtores para garantir uma abordagem conjunta e mais eficaz contra a resistência antimicrobiana.

A criação de sistemas de monitorização sobre o uso de antimicrobianos e a presença de microrganismos resistentes na exploração pecuária e no meio ambiente envolvente (solo e água) é fundamental para evitar que a resistência se dissemine para além das explorações pecuárias.

Por fim, a criação de políticas locais de uso responsável de antimicrobianos através do desenvolvimento de regulamentos que considerem as especificidades relativas à saúde humana, animal e ambiental de determinada região para a determinação das restrições ao uso de antimicrobianos (antibióticos e fungicidas) alinhados com as diretrizes nacionais e europeias permitirá uma ação potencialmente mais eficaz e eficiente na diminuição deste grave problema de saúde pública.

Em suma, as ações de promoção da saúde primordiais a salientar são a prevenção da doença através da vigilância em saúde dos trabalhadores e do ambiente. A proteção da saúde através de medidas legais, políticas, fiscais e estruturais. E educação para a saúde através de informação, aconselhamento e desenvolvimento de competências de todos os intervenientes.

7. Recomendações e proposta de trabalhos futuros

Os resultados desta pesquisa serão disponibilizados futuramente a diferentes *stakeholders* com o objetivo de apoiar decisões políticas relativas à resistência antimicrobiana, mas também de proteção da saúde em Portugal.

Os resultados deste estudo podem incentivar a realização de mais estudos em matrizes ambientais para pesquisa de fungos prioritários. Mais pesquisas sobre a relação entre a resistência aos azóis e os fungos micotoxigénicos em ambiente de produção animal são necessárias para retirar melhores conclusões para a saúde ocupacional e ambiental. A caracterização do perfil de utilização de fungicidas em ambiente de produção agropecuária é uma área de estudo que merece mais atenção.

Os novos estudos de caracterização microbiana devem incluir a vigilância da saúde dos trabalhadores nomeadamente da sintomatologia respiratória, tal como foi realizado por Viegas et al. em contexto de exploração aviárias²⁰⁰.

Sugere-se que as amostras de MRSA confirmadas sejam sujeitas a testes de biologia molecular para avaliação a origem do clone da estirpe (HA-MRSA, CA-MRSA ou LA-MRSA). Recomenda-se a realização de esfregaços nasofaríngeos nos trabalhadores de forma confirmar se estes trabalhadores estão colonizados, tal com realizado por Oliveira et al.⁹⁹.

Sugere-se também a realização futura de teste de suscetibilidade antimicrobiana das amostras ambientais a antibióticos, justificando a continuidade do projeto neste e noutros *settings*;

Apesar de terem sido realizadas colheitas destinadas a investigação de micotoxinas e endotoxinas nas amostras, e por questões de tempo insuficiente, o resultado destas análises serão apresentados em produção científica futura.

Propõe-se a avaliação futura do nível citotoxicidade das matrizes recolhidas para determinar o impacto dos contaminantes na saúde humana, tal como realizado por Viegas et al.¹⁷³.

Referências bibliográficas

1. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Ficha informativa para especialistas - Resistência antimicrobiana [Internet]. 2008 [citado 7 de Agosto de 2024]. Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-resistance/facts/factsheets/experts>
2. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Avaliação da carga sanitária das infeções por bactérias resistentes a antibióticos na UE/EEE, 2016-2020 [Internet]. 2022 [citado 7 de Agosto de 2024]. Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/health-burden-infections-antibiotic-resistant-bacteria-2016-2020>
3. Comissão Europeia. Ação da UE em matéria de resistência aos antimicrobianos [Internet]. [citado 7 de Agosto de 2024]. Disponível em: https://health.ec.europa.eu/antimicrobial-resistance/eu-action-antimicrobial-resistance_pt?prefLang=pt
4. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). About Antimicrobial Resistance | Antimicrobial Resistance | CDC [Internet]. 2024 [citado 13 de Agosto de 2024]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/antimicrobial-resistance/about/index.html>
5. Consilium - Conselho da União Europeia. Cinco razões para nos preocuparmos com a resistência aos agentes antimicrobianos (RAM) - Consilium [Internet]. [citado 13 de Agosto de 2024]. Disponível em: <https://www.consilium.europa.eu/pt/infographics/antimicrobial-resistance/>
6. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Antimicrobial-Resistant Fungal Diseases | Fungal Diseases | CDC [Internet]. 2024 [citado 13 de Agosto de 2024]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/fungal/antimicrobial-resistant-fungi/index.html>
7. Escola Nacional de Saúde Pública. White Paper LEADING THE WAY TO A HEALTHY FUTURE Inovação ao serviço da Saúde Pública. 2024 [citado 18 de Setembro de 2024]; Disponível em: <https://doi.org/10.34619/7z7m-xyme>
8. Organização Mundial da Saúde. Library Cataloguing-in-Publication Data Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. 2015 [citado 18 de Setembro de 2024]; Disponível em: www.paprika-annecy.com
9. Direção-Geral da Saúde/Programa de Prevenção e Controlo das Infeções e Resistência aos Antimicrobianos Direção Geral de Alimentação e Veterinária Agência Portuguesa do Ambiente. Plano Nacional de Combate à Resistência aos Antimicrobianos 2019-2023 Âmbito do Conceito «Uma só Saúde». 2019 [citado 14 de Setembro de 2024]; Disponível em: www.dgs.pt
10. CDC: Centers for Disease Control and Prevention. How Antibiotic Resistance Spreads. 2024 [citado 13 de Agosto de 2024]; Disponível em: <https://www.cdc.gov/antimicrobial-resistance/media/pdfs/How-Germs-Fight-Back-Against-Antibiotics-P.pdf>
11. Organização Mundial da Saúde. Antimicrobial resistance [Internet]. 2021 [citado 11 de Junho de 2023]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
12. Comissão Europeia. EUR-Lex - 52023DC0191 - PT - EUR-Lex [Internet]. 2023 [citado 11 de Junho de 2023]. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:52023DC0191>
13. Agência Europeia do Ambiente. Antimicrobianos veterinários no ambiente da Europa: uma perspectiva de Saúde Única — Agência Europeia do Ambiente [Internet]. [citado 19 de Setembro de 2024]. Disponível em: <https://www.eea.europa.eu/publications/veterinary-antimicrobials-in-europes-environment>
14. Agência Europeia do Ambiente. A redução do uso e a melhoria do monitoramento podem ajudar a combater a poluição antimicrobiana da pecuária e da piscicultura | Página inicial da Agência Europeia do Ambiente [Internet]. [citado 19 de Setembro de 2024]. Disponível em: <https://www.eea.europa.eu/en/newsroom/news/tackle-antimicrobial-pollution-from-livestock-fish-farming>
15. Organização Mundial de Saúde Animal. Resistência antimicrobiana - WOAH - World Organisation for Animal Health [Internet]. 2023 [citado 11 de Junho de 2023]. Disponível em: <https://www.woah.org/en/what-we-do/global-initiatives/antimicrobial-resistance/>
16. Direção Geral da Saúde. Programa de Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos Antimicrobianos [Internet]. 2021 [citado 11 de Junho de 2023]. Disponível em: <https://www.dgs.pt/ms/15/pagina.aspx?ur=1&id=5514>
17. Almansour AM, Alhadlaq MA, Alzahrani KO, Mukhtar LE, Alharbi AL, Alajel SM. The Silent Threat: Antimicrobial-Resistant Pathogens in Food-Producing Animals and Their Impact on Public Health. Microorganisms, Vol 11, Page 2127 [Internet]. 22 de Agosto de 2023 [citado 13 de Agosto de 2024];11(9):2127. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/11/9/2127/htm>
18. Comunicação da Comissão — Orientações para a utilização prudente de agentes antimicrobianos na medicina veterinária. [citado 13 de Agosto de 2024]; Disponível em: http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/antimicrobial_resistance/index_en.htm

19. Allel K, Day L, Hamilton A, Lin L, Furuya-Kanamori L, Moore CE, et al. Global antimicrobial-resistance drivers: an ecological country-level study at the human–animal interface. *Lancet Planet Health* [Internet]. 1 de Abril de 2023 [citado 19 de Setembro de 2024];7(4):e291–303. Disponível em: <http://www.thelancet.com/article/S2542519623000268/fulltext>
20. Sousa P, Viegas C. Fungal exposure in agricultural environments: a review. *Encyclopedia of mycology* [Internet]. 1 de Janeiro de 2021 [citado 14 de Agosto de 2024];2:116–24. Disponível em: <https://repositorio.ipl.pt/handle/10400.21/12226>
21. Pepi M, Barretta R, Simões D, De Andrade E, Sabino R. Fungi in a One Health Perspective. *Encyclopedia* 2023, Vol 3, Pages 900-918 [Internet]. 23 de Julho de 2023 [citado 19 de Julho de 2024];3(3):900–18. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2673-8392/3/3/64/htm>
22. Singer AC, Shaw H, Rhodes V, Hart A. Review of antimicrobial resistance in the environment and its relevance to environmental regulators. *Front Microbiol* [Internet]. 2016 [citado 19 de Julho de 2024];7:219380. Disponível em: www.frontiersin.org
23. Agência Europeia do Ambiente. A redução do uso e a melhoria do monitoramento podem ajudar a combater a poluição antimicrobiana da pecuária e da piscicultura | Página inicial da Agência Europeia do Ambiente [Internet]. 2024 [citado 13 de Agosto de 2024]. Disponível em: <https://www.eea.europa.eu/en/newsroom/news/tackle-antimicrobial-pollution-from-livestock-fish-farming>
24. de Matos Nascimento A, de Paula VR, Dias EHO, da Costa Carneiro J, Otenio MH. Quantitative microbial risk assessment of occupational and public risks associated with bioaerosols generated during the application of dairy cattle wastewater as biofertilizer. *Science of The Total Environment*. 25 de Novembro de 2020;745:140711.
25. Prigitano A, Venier V, Cogliati M, De Lorenzis G, Esposto MC, Tortorano AM. Azole-resistant *aspergillus fumigatus* in the environment of Northern Italy, May 2011 to June 2012. *Eurosurveillance* [Internet]. 27 de Março de 2014 [citado 14 de Agosto de 2024];19(12):20747. Disponível em: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES2014.19.12.20747>
26. Veríssimo C, Toscano C, Ferreira T, Abreu G, Simões H, Diogo J, et al. Etiologia das infeções fúngicas invasivas e subcutâneas: análise dos dados da Rede Nacional de Vigilância Laboratorial das Infeções Fúngicas Invasivas e Subcutâneas (IFIs), 2013-2018. 2019 [citado 13 de Agosto de 2024];39–44. Disponível em: <https://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/6393>
27. BCSD Portugal. ODS • Objetivos Desenvolvimento Sustentável [Internet]. [citado 7 de Agosto de 2024]. Disponível em: <https://ods.pt/>
28. Centro de Informação Europeia Jacques Delors. Uma Só Saúde / Resistência aos Agentes Antimicrobianos | Eurocid - Informação europeia ao cidadão [Internet]. 2022 [citado 11 de Junho de 2023]. Disponível em: <https://eurocid.mne.gov.pt/saude-resistencia-antimicrobiana-oh-amr>
29. Direção Geral de Veterinária. Uma Só Saúde – DGAV [Internet]. 2022 [citado 11 de Junho de 2023]. Disponível em: <https://www.dgav.pt/acessorapido/conteudo/uma-so-saude/>
30. The One Health European Joint Programme (OHEJP). One Health EJP. <https://onehealthjp.eu> [Internet]. 2018 [citado 11 de Junho de 2023]; Disponível em: <https://onehealthjp.eu>
31. Reygaert WC. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol* [Internet]. 2018 [citado 13 de Agosto de 2024];4(3):482. Disponível em: <https://pmc/articles/PMC6604941/>
32. Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*. 12 de Fevereiro de 2022;399(10325):629–55.
33. European Food Safety Authority. Antimicrobial resistance [Internet]. 2024 [citado 13 de Agosto de 2024]. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/antimicrobial-resistance>
34. Food and Agriculture Organization of the United Nations World Health Organization. Foodborne antimicrobial resistance – Compendium of Codex standards. First revision. Codex Alimentarius Commission. Rome. Foodborne antimicrobial resistance [Internet]. 2023 [citado 13 de Agosto de 2024]; Disponível em: <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/ebcf2f59-ce5e-4974-ba2d-cb8ae65aa8af/content>
35. Martinez JL. General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discov Today Technol*. 1 de Março de 2014;11(1):33–9.
36. Sabino R, Veríssimo C, Martins C, Brandão J. Infecção fúngica em Portugal - o gigante adormecido. *Infecção & Sepsis* [Internet]. 2016 [citado 15 de Setembro de 2024];1:19–27. Disponível em: <https://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/4183>
37. Viegas C, Gomes B, Dias M, Carolino E, Caetano LA. *Aspergillus section fumigati* in firefighter headquarters. *Microorganisms* [Internet]. 1 de Outubro de 2021 [citado 15 de Agosto de 2024];9(10):2112. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/10/2112/htm>
38. Viegas C, Twarużek M, Almeida B, Dias M, Ribeiro E, Carolino E, et al. Cytotoxicity of *Aspergillus Section Fumigati* Isolated from Health Care Environments. *J Fungi (Basel)* [Internet]. 1 de Outubro de 2021 [citado 13 de Setembro de 2024];7(10). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34682260/>

39. Rivelli Zea SM, Toyotome T. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* as an emerging worldwide pathogen. *Microbiol Immunol* [Internet]. 1 de Março de 2022 [citado 14 de Agosto de 2024];66(3):135–44. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1348-0421.12957>
40. Sabino R, Veríssimo C, Viegas C, Viegas S, Brandão J, Alves-Correia M, et al. The role of occupational *Aspergillus* exposure in the development of diseases. *Med Mycol* [Internet]. 1 de Abril de 2019 [citado 13 de Setembro de 2024];57(Supplement_2):S196–205. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30816970/>
41. Dias M, Gomes B, Pena P, Cervantes R, Caetano LA, Carolino E, et al. Exposure to azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in Portuguese sawmills [Internet]. 2023 [citado 14 de Agosto de 2024]. Disponível em: <https://repositorio.ipl.pt/handle/10400.21/17349>
42. Sabino R, Veríssimo C, Viegas C, Viegas S, Brandão J, Alves-Correia M, et al. The role of occupational *Aspergillus* exposure in the development of diseases. *Med Mycol* [Internet]. 1 de Abril de 2019 [citado 14 de Agosto de 2024];57(Supplement_2):S196–205. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1093/mmy/myy090>
43. Gonçalves P, Melo A, Dias M, Almeida B, Caetano LA, Veríssimo C, et al. Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Harboring the TR34/L98H Mutation: First Report in Portugal in Environmental Samples. *Microorganisms* 2021, Vol 9, Page 57 [Internet]. 28 de Dezembro de 2020 [citado 14 de Agosto de 2024];9(1):57. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/1/57/htm>
44. Organização Mundial da Saúde (OMS). Lista de patógenos fúngicos prioritários da OMS para orientar pesquisa, desenvolvimento e ação de saúde pública [Internet]. Edição ISBN:978-92-4-006024-1. 2022 [citado 19 de Julho de 2024]. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241?fbclid=IwAR1nUaygK632qmR7w2Gy4MgQ-X5KwvC2gVBqzG8Dkfl9cqdaWhYDjrzdqF0>
45. Organização Mundial de Saúde (OMS). WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024 Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. 2024 [citado 19 de Julho de 2024];(Edição ISBN:978-92-4-009346-1):72. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>
46. Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet* [Internet]. 12 de Fevereiro de 2022 [citado 14 de Agosto de 2024];399(10325):629–55. Disponível em: <http://www.thelancet.com/article/S0140673621027240/fulltext>
47. Merk H, Diaz Höberg L, Plachouras D, Suetens C, Monnet DL. Assessing the health burden of infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU/EEA, 2016–2020. [citado 11 de Junho de 2023]; Disponível em: www.ecdc.europa.eu
48. Comissão Europeia. Ação da UE em matéria de resistência aos antimicrobianos - Comissão Europeia [Internet]. 2024 [citado 7 de Agosto de 2024]. Disponível em: https://health.ec.europa.eu/antimicrobial-resistance/eu-action-antimicrobial-resistance_pt?prefLang=pt
49. Economic Cooperation and Development (OECD). Adotando uma estrutura de saúde única para combater a resistência antimicrobiana | Estudos de política de saúde da OCDE | OECD iLibrary [Internet]. 2023 [citado 19 de Julho de 2024]. Disponível em: https://www.oecd-ilibrary.org/social-issues-migration-health/embracing-a-one-health-framework-to-fight-antimicrobial-resistance_ce44c755-en
50. Murray C, Ikuta K, Bukosia J, Carvalheiro C, Criollo-Mora E, De Luca M, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet* [Internet]. 12 de Fevereiro de 2022 [citado 11 de Junho de 2023];399(10325):629–55. Disponível em: <https://www.woah.org/en/what-we-do/global-initiatives/antimicrobial-resistance/>
51. Tribunal de Contas Europeu. Relatório Especial: Atuação contra a resistência antimicrobiana [Internet]. 2019 [citado 11 de Junho de 2023]. Disponível em: <https://op.europa.eu/webpub/eca/special-reports/amr-18-2019/pt/index.html>
52. Comissão Europeia. Perguntas frequentes: Recomendação sobre o reforço das ações da UE para combater a RAM numa abordagem «Uma Só Saúde» [Internet]. [citado 11 de Junho de 2023]. Disponível em: https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/qanda_23_1845
53. European Food Safety Authority. Fourth joint inter-agency report on integrated analysis of antimicrobial consumption and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals in the European Union (JIACRA IV – 2019–2021) | EFSA [Internet]. 2024 [citado 7 de Agosto de 2024]. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/plain-language-summary/fourth-joint-inter-agency-report-integrated-analysis-antimicrobial>
54. Koutsoumanis K, Allende A, Álvarez-Ordóñez A, Bolton D, Bover-Cid S, Chemaly M, et al. Role played by the environment in the emergence and spread of antimicrobial resistance (AMR) through the food chain. *EFSA Journal* [Internet]. 1 de Junho de 2021 [citado 15 de Agosto de 2024];19(6):e06651. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2903/j.efsa.2021.6651>
55. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial consumption and resistance in bacteria from humans and food-producing animals: Fourth joint inter-agency report on integrated analysis of antimicrobial agent consumption and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals in the EU/EEA JIACRA IV – 2019–2021. 2024 [citado 14 de Agosto de 2024]; Disponível em:

- <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-consumption-and-resistance-bacteria-humans-and-food-producing>
56. OCDE/ECDC/EFSA/EMA. Antimicrobial Resistance in the EU/EEA A One Health Response. 2022 [citado 19 de Julho de 2024]; Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-eueea-one-health-response>
 57. Vercelli C, Gambino G, Amadori M, Re G. Implications of Veterinary Medicine in the comprehension and stewardship of antimicrobial resistance phenomenon. From the origin till nowadays. *Vet Anim Sci.* 1 de Junho de 2022;16:100249.
 58. de Matos Nascimento A, de Paula VR, Dias EHO, da Costa Carneiro J, Otenio MH. Quantitative microbial risk assessment of occupational and public risks associated with bioaerosols generated during the application of dairy cattle wastewater as biofertilizer. *Science of The Total Environment.* 25 de Novembro de 2020;745:140711.
 59. Van Boeckel TP, Brower C, Gilbert M, Grenfell BT, Levin SA, Robinson TP, et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 5 de Maio de 2015 [citado 13 de Agosto de 2024];112(18):5649–54. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1503141112>
 60. Direção-Geral de Alimentação e Veterinária e DGAMV – Divisão de Gestão e Autorização de Medicamentos Veterinários. Relatório Nacional de Monitorização do Consumo de Antimicrobianos Ano 2022. 2024;
 61. European Centre for Disease Prevention and Control. Ficha informativa para especialistas - Resistência antimicrobiana [Internet]. 2008 [citado 14 de Agosto de 2024]. Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-resistance/facts/factsheets/experts>
 62. Van Boeckel TP, Pires J, Silvester R, Zhao C, Song J, Criscuolo NG, et al. Global trends in antimicrobial resistance in animals in low- And middle-income countries. *Science* (1979) [Internet]. 20 de Setembro de 2019 [citado 19 de Julho de 2024];365(6459). Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aaw1944>
 63. Van Boeckel TP, Glennon EE, Chen D, Gilbert M, Robinson TP, Grenfell BT, et al. Reducing antimicrobial use in food animals. *Science* (1979) [Internet]. 29 de Setembro de 2017 [citado 19 de Julho de 2024];357(6358):1350–2. Disponível em: www.oecd-ilibrary.org/content/
 64. Antimicrobial Advice ad hoc Expert Group (AMEG). Categorisation of antibiotics in the European Union. [citado 19 de Julho de 2024]; Disponível em: <https://bit.ly/30ZEuRi>
 65. Comissão Europeia. Comunicação da Comissão ao Parlamento Europeu, ao Conselho, ao Comité Económico e Social Europeu e ao Comité as Regiões Caminho para um Planeta Saudável para Todos Plano de Ação da UE: «Rumo à Poluição Zero do Ar, da Água e do Solo». 2021 [citado 19 de Julho de 2024]; Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:52021DC0400>
 66. Comissão Europeia. Estratégia do Prado ao Prato [Internet]. [citado 7 de Agosto de 2024]. Disponível em: https://food.ec.europa.eu/horizontal-topics/farm-fork-strategy_en?prefLang=pt
 67. Portaria n.º 54-E/2023, de 27 de fevereiro - Diário da República n.º 41/2023, 1.º Suplemento, Série I de 2023-02-27, páginas 164 - 221 [Internet]. [citado 14 de Agosto de 2024]. Disponível em: <https://diariodarepublica.pt/dr/detalhe/portaria/54-e-2023-207942899>
 68. Comissão Europeia. Métodos e práticas agrícolas sustentáveis [Internet]. 2024 [citado 14 de Agosto de 2024]. Disponível em: https://agriculture.ec.europa.eu/sustainability/environmental-sustainability/sustainable-agricultural-practices-and-methods_pt
 69. Comissão Europeia. EUR-Lex - 52020DC0381 - PT - EUR-Lex - Comunicação da Comissão ao Parlamento Europeu, ao Conselho, ao Comité Económico e Social Europeu e ao Comité Das Regiões Uma estratégia do Prado ao Prato para um sistema alimentar justo, saudável e amigo do ambiente [Internet]. 2020 [citado 14 de Agosto de 2024]. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:52020DC0381>
 70. Comissão Europeia. EUR-Lex - 52021DC0400 - PT - EUR-Lex - Comunicação da Comissão ao Parlamento Europeu, ao Conselho, ao Comité Económico e Social Europeu e ao Comité das Regiões Caminho para um Planeta Saudável para Todos Plano de Ação da UE: «Rumo à Poluição Zero do Ar, da Água e do Solo» [Internet]. 2021 [citado 14 de Agosto de 2024]. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A52021DC0400&qid=1623311742827>
 71. Comissão Europeia. Estratégia do Prado ao Prato [Internet]. 2022 [citado 14 de Agosto de 2024]. Disponível em: https://food.ec.europa.eu/horizontal-topics/farm-fork-strategy_en
 72. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Simplified summary: JIACRA IV, 2019-2021. 2024 [citado 7 de Agosto de 2024]; Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/simplified-summary-jiacra-iv-2019-2021>
 73. Antimicrobial consumption and resistance in bacteria from humans and food-producing animals: Fourth joint inter-agency report on integrated analysis of antimicrobial agent consumption and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals in the EU/EEA JIACRA IV – 2019–2021. *EFSA Journal.* 1 de Fevereiro de 2024;22(2).
 74. Economic Cooperation and Development (OECD). Embracing a One Health Framework to Fight Antimicrobial Resistance [Internet]. OECD; 2023 [citado 1 de Maio de 2024]. (OECD Health Policy Studies). Disponível em: https://www.oecd-ilibrary.org/social-issues-migration-health/embracing-a-one-health-framework-to-fight-antimicrobial-resistance_ce44c755-en

75. Valério E, Brandão J, Rebelo H. Impacto das alterações climáticas na saúde ambiental: possíveis efeitos em One Health Impact of climate change on environmental health: possible effects on One Health. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. [citado 15 de Agosto de 2024]; Disponível em: www.insa.pt
76. Viegas C. Climate change influence in fungi [Internet]. European Journal of Public Health, Volume 31 Supplement 3, 2021. 2021 [citado 14 de Agosto de 2024]. Disponível em: <https://repositorio.ipl.pt/handle/10400.21/13935>
77. Duchenne-Moutien RA, Neetoo H. Climate Change and Emerging Food Safety Issues: A Review. J Food Prot. 1 de Novembro de 2021;84(11):1884–97.
78. Maggiore A, Afonso A, Barrucci F, Sanctis G De. Climate change as a driver of emerging risks for food and feed safety, plant, animal health and nutritional quality. EFSA Supporting Publications [Internet]. 25 de Junho de 2020 [citado 19 de Julho de 2024];17(6). Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/en-1881>
79. Campos I, Guerra J, Ferreira JG, Schmidt L, Alves F, Vizinho A, et al. Understanding climate change policy and action in Portuguese municipalities: A survey. Land use policy. 1 de Março de 2017;62:68–78.
80. Duchenne-Moutien RA, Neetoo H. Climate Change and Emerging Food Safety Issues: A Review. J Food Prot. 1 de Novembro de 2021;84(11):1884–97.
81. Viegas C, Viegas S. Climate change and the impact on fungi and mycotoxins. 2024 [citado 14 de Agosto de 2024]; Disponível em: <https://repositorio.ipl.pt/handle/10400.21/17528>
82. Moretti A, Pascale M, Logrieco AF. Mycotoxin risks under a climate change scenario in Europe. Trends Food Sci Technol. 1 de Fevereiro de 2019;84:38–40.
83. Orientação para Investigar Surtos de Doenças Fúngicas | Doenças Fúngicas | CDC [Internet]. [citado 15 de Agosto de 2024]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/fungal/php/guidance-investigating-outbreaks/index.html>
84. Lacetera N. Impact of climate change on animal health and welfare. Animal Frontiers [Internet]. 3 de Janeiro de 2019 [citado 19 de Julho de 2024];9(1):26–31. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1093/af/vfy030>
85. Gonçalves P, Melo A, Dias M, Almeida B, Caetano LA, Veríssimo C, et al. Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Harboring the TR34/L98H Mutation: First Report in Portugal in Environmental Samples. Microorganisms 2021, Vol 9, Page 57 [Internet]. 28 de Dezembro de 2020 [citado 14 de Agosto de 2024];9(1):57. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/1/57/htm>
86. CDC: Centers for Disease Control and Prevention. Types of Fungal Diseases | Fungal Diseases [Internet]. 2024 [citado 14 de Agosto de 2024]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/fungal/about/types-of-fungal-diseases.html>
87. Denning DW. Global incidence and mortality of severe fungal disease. Lancet Infect Dis [Internet]. 1 de Julho de 2024 [citado 14 de Agosto de 2024];24(7):e428–38. Disponível em: <http://www.thelancet.com/article/S1473309923006928/fulltext>
88. CDC: Centers for Disease Control and Prevention. Doenças fúngicas e COVID-19 | Doenças fúngicas [Internet]. 2024 [citado 14 de Agosto de 2024]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/fungal/hcp/covid-fungal/index.html>
89. Nucci M, Barreiros G, Guimarães LF, Deriquehem VAS, Castiñeiras AC, Nouér SA. Increased incidence of candidemia in a tertiary care hospital with the COVID-19 pandemic. Mycoses. 1 de Fevereiro de 2021;64(2):152–6.
90. Fisher MC, Hawkins NJ, Sanglard D, Gurr SJ. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. Science (1979) [Internet]. 18 de Maio de 2018 [citado 15 de Agosto de 2024];360(6390):739–42. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aap7999>
91. Fisher MC, Alastruey-Izquierdo A, Berman J, Bicanic T, Bignell EM, Bowyer P, et al. Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health. Nat Rev Microbiol [Internet]. 1 de Setembro de 2022 [citado 14 de Agosto de 2024];20(9):557. Disponível em: <https://pmc/articles/PMC8962932/>
92. Comité Européen de Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana - EUCAST. EUCAST: Rationale documents for antifungals [Internet]. 2017 [citado 14 de Agosto de 2024]. Disponível em: https://www.eucast.org/astoffungi/rationale_documents_for_antifungals
93. Azevedo MM, Faria-Ramos I, Cruz LC, Pina-Vaz C, Gonçalves Rodrigues A. Genesis of Azole Antifungal Resistance from Agriculture to Clinical Settings. J Agric Food Chem [Internet]. 2 de Setembro de 2015 [citado 14 de Agosto de 2024];63(34):7463–8. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.5b02728>
94. Azevedo MM, Faria-Ramos I, Cruz LC, Pina-Vaz C, Gonçalves Rodrigues A. Genesis of Azole Antifungal Resistance from Agriculture to Clinical Settings. J Agric Food Chem [Internet]. 2 de Setembro de 2015 [citado 19 de Julho de 2024];63(34):7463–8. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.5b02728>
95. Perlin DS, Rautemaa-Richardson R, Alastruey-Izquierdo A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. Lancet Infect Dis [Internet]. 1 de Dezembro de 2017 [citado 14 de Agosto de 2024];17(12):e383–92. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28774698/>
96. Direção-Geral de Alimentação e Veterinária e DGAMV – Divisão de Gestão e Autorização de Medicamentos Veterinários. Vendas de Produtos Fitofarmacêuticos | Relatório 2022 [Internet]. 2024 [citado 14 de Agosto de 2024]. Disponível em: <https://www.dgav.pt/destaques/noticias/vendas-de-produtos-fitofarmaceuticos-relatorio-2022/>

97. Koutsoumanis K, Allende A, Álvarez-Ordóñez A, Bolton D, Bover-Cid S, Chemaly M, et al. Role played by the environment in the emergence and spread of antimicrobial resistance (AMR) through the food chain. *EFSA Journal* [Internet]. 1 de Junho de 2021 [citado 14 de Agosto de 2024];19(6):e06651. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2903/j.efsa.2021.6651>
98. Viegas S, Viegas C, Martins C, Assunção R. Occupational Exposure to Mycotoxins—Different Sampling Strategies Telling a Common Story Regarding Occupational Studies Performed in Portugal (2012–2020). *Toxins* 2020, Vol 12, Page 513 [Internet]. 11 de Agosto de 2020 [citado 19 de Julho de 2024];12(8):513. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6651/12/8/513/html>
99. Viegas S, Assunção R, Martins C, Nunes C, Osteresch B, Twarużek M, et al. Occupational Exposure to Mycotoxins in Swine Production: Environmental and Biological Monitoring Approaches. *Toxins* 2019, Vol 11, Page 78 [Internet]. 1 de Fevereiro de 2019 [citado 19 de Julho de 2024];11(2):78. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6651/11/2/78/html>
100. Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA). Monitoring MRSA [Internet]. 2024 [citado 19 de Julho de 2024]. Disponível em: <https://storymaps.arcgis.com/stories/44bf62260fce477eb91435ea9c07e349>
101. Vandenesch F, Etienne J. Prevenção da transmissão dos *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina na população geral. *Eurosurveillance* [Internet]. 1 de Novembro de 2004 [citado 11 de Setembro de 2024];9(11):1–2. Disponível em: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/esm.09.11.00483-pt>
102. Manageiro V, Paiva J, Caniça M. Vigilância da resistência aos antibióticos em Portugal de 2015 a 2022. 2023 [citado 11 de Setembro de 2024]; Disponível em: www.insa.pt
103. Gatadi S, Madhavi Y V., Chopra S, Nanduri S. Promising antibacterial agents against multidrug resistant *Staphylococcus aureus*. *Bioorg Chem*. 1 de Novembro de 2019;92:103252.
104. Matuszewska M, Murray GGR, Harrison EM, Holmes MA, Weinert LA. The Evolutionary Genomics of Host Specificity in *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol*. 1 de Junho de 2020;28(6):465–77.
105. Kawada-Matsuo M, Komatsuzawan H. Factors affecting susceptibility of *Staphylococcus aureus* to antibacterial agents. *J Oral Biosci*. 1 de Maio de 2012;54(2):86–91.
106. Martin E, Lina G, Dumitrescu O. STAPHYLOCOCCUS | *Staphylococcus aureus*. *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*. 1 de Janeiro de 2014;501–7.
107. Oliveira K, Viegas C, Ribeiro E. MRSA Colonization in Workers from Different Occupational Environments—A One Health Approach Perspective. *Atmosphere* 2022, Vol 13, Page 658 [Internet]. 21 de Abril de 2022 [citado 11 de Setembro de 2024];13(5):658. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4433/13/5/658/html>
108. Aerts M, Battisti A, Hendriksen R, Larsen J, Nilsson O, Abrahantes JC, et al. Technical specifications for a baseline survey on the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in pigs. *EFSA Journal*. 1 de Outubro de 2022;20(10).
109. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Atlas de Vigilância de Doenças Infecciosas [Internet]. 2022 [citado 7 de Agosto de 2024]. Disponível em: <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>
110. Kinross PTN, Petersen A, Skov R, Van Hauwermeiren E, Pantosti A, Laurent F, et al. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among human MRSA isolates, European Union/European Economic Area countries, 2013. *Eurosurveillance* [Internet]. 2 de Novembro de 2017 [citado 11 de Setembro de 2024];22(44):16–00696. Disponível em: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.44.16-00696>
111. Springer B, Orendi U, Much P, Höger G, Ruppitsch W, Krziwanek K, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A new zoonotic agent? *Wien Klin Wochenschr* [Internet]. Fevereiro de 2009 [citado 11 de Setembro de 2024];121(3–4):86–90. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00508-008-1126-y>
112. Viegas C, Faria T, Caetano LA, Carolino E, Gomes AQ, Viegas S. *Aspergillus* spp. prevalence in different Portuguese occupational environments: What is the real scenario in high load settings? *J Occup Environ Hyg* [Internet]. 3 de Outubro de 2017 [citado 13 de Setembro de 2024];14(10):771–85. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28609213/>
113. Sabino R. *Aspergillus* and Health. *Microorganisms* 2022, Vol 10, Page 538 [Internet]. 28 de Fevereiro de 2022 [citado 19 de Setembro de 2024];10(3):538. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/10/3/538/html>
114. Dias M, Gomes B, Pena P, Cervantes R, Caetano LA, Carolino E, et al. Exposure to azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in Portuguese sawmills. 2023 [citado 14 de Agosto de 2024]; Disponível em: <https://repositorio.ipl.pt/handle/10400.21/17349>
115. Sabino R, Gonçalves P, Melo AM, Simões D, Oliveira M, Francisco M, et al. Trends on *Aspergillus* Epidemiology—Perspectives from a National Reference Laboratory Surveillance Program. *Journal of Fungi* 2021, Vol 7, Page 28 [Internet]. 6 de Janeiro de 2021 [citado 14 de Agosto de 2024];7(1):28. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2309-608X/7/1/28/html>
116. Simões D, Aranha Caetano L, Veríssimo C, Viegas C, Sabino R. *Aspergillus* collected in specific indoor settings: their molecular identification and susceptibility pattern. *Int J Environ Health Res* [Internet]. 3 de Abril de 2021 [citado 14 de Agosto de 2024];31(3):248–57. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09603123.2019.1650903>

117. Gomes B, Pena P, Cervantes R, Dias M, Viegas C. Microbial Contamination of Bedding Material: One Health in Poultry Production. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 1 de Dezembro de 2022 [citado 22 de Junho de 2023];19(24):16508. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1660-4601/19/24/16508/html>
118. Viegas C, Caetano LA, Viegas S. Occupational exposure to *Aspergillus section Fumigati*: Tackling the knowledge gap in Portugal. *Environ Res* [Internet]. 1 de Março de 2021 [citado 13 de Setembro de 2024];194. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33440201/>
119. Sabino R, Carolino E, Veríssimo C, Martinez M, Clemons K V., Stevens DA. Antifungal susceptibility of 175 *Aspergillus* isolates from various clinical and environmental sources. *Med Mycol* [Internet]. 1 de Outubro de 2016 [citado 15 de Agosto de 2024];54(7):740–56. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1093/mmy/myw024>
120. Sabino R, Veríssimo C, Parada H, Brandão J, Viegas C, Carolino E, et al. Molecular screening of 246 Portuguese *Aspergillus* isolates among different clinical and environmental sources. *Med Mycol* [Internet]. 1 de Julho de 2014 [citado 14 de Agosto de 2024];52(5):519–29. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1093/mmy/myu006>
121. Sabino R, Mateus V, Viegas S, Veríssimo C, Viegas C. Possible respiratory infection due to *Aspergillus* in workers from swineries and poultry. 5th Advances Against Aspergillosis, 26-28 janeiro 2012 [Internet]. 26 de Janeiro de 2012 [citado 14 de Agosto de 2024]; Disponível em: <https://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/1152>
122. Viegas C, Faria T, Caetano LA, Carolino E, Gomes AQ, Viegas S. *Aspergillus* spp. prevalence in different Portuguese occupational environments: What is the real scenario in high load settings? *J Occup Environ Hyg* [Internet]. 3 de Outubro de 2017 [citado 14 de Agosto de 2024];14(10):771–85. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28609213/>
123. Sabino R, Veríssimo C, Viegas C, Viegas S, Brandão J, Alves-Correia M, et al. The role of occupational *Aspergillus* exposure in the development of diseases. *Med Mycol* [Internet]. 1 de Abril de 2019 [citado 18 de Setembro de 2024];57(Supplement_2):S196–205. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1093/mmy/myy090>
124. He Y, Yuan Q, Mathieu J, Stadler L, Senehi N, Sun R, et al. Antibiotic resistance genes from livestock waste: occurrence, dissemination, and treatment. *npj Clean Water* 2020 3:1 [Internet]. 19 de Fevereiro de 2020 [citado 19 de Julho de 2024];3(1):1–11. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41545-020-0051-0>
125. Viegas S, Viegas C, Oppliger A. Occupational Exposure to Mycotoxins: Current Knowledge and Prospects. *Ann Work Expo Health* [Internet]. 15 de Outubro de 2018 [citado 19 de Julho de 2024];62(8):923–41. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1093/annweh/wxy070>
126. Mbareche H, Veillette M, Bilodeau GJ, Duchaine C. Fungal aerosols at dairy farms using molecular and culture techniques. *Science of The Total Environment*. 25 de Fevereiro de 2019;653:253–63.
127. Kotimaa MH, Oksanen L, Koskela P. Materiais de alimentação e cama como fontes de exposição microbiana em fazendas de laticínios. *Scandinavian Journal of Work, Meio Ambiente & Saúde*. 1991;17(2):117–22.
128. Viegas C, Faria T, Carolino E, Sabino R, Gomes AQ, Viegas S. Occupational exposure to fungi and particles in animal feed industry. *Med Pr* [Internet]. 2016 [citado 13 de Setembro de 2024];67(2):143–54. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27221292/>
129. Agência Europeia para a Segurança e Saúde no Trabalho. Agentes biológicos e prevenção de doenças relacionadas com o trabalho: uma revisão | Segurança e saúde no trabalho EU-OSHA [Internet]. 2021 [citado 14 de Agosto de 2024]. Disponível em: <https://osha.europa.eu/en/publications/review-specific-work-related-diseases-due-biological-agents>
130. Agência Europeia para a Segurança e Saúde no Trabalho. Exposição a agentes biológicos e problemas de saúde relacionados em ocupações relacionadas com animais. 2017 [citado 19 de Julho de 2024]; Disponível em: <https://osha.europa.eu/en/publications/exposure-biological-agents-and-related-health-problems-animal-related-occupations>
131. Pinto D, Rodrigues F, Baptista JS. Sampling methods for an accurate mycobiota occupational exposure assessment: overview of several ongoing projects. *Occupational Safety and Hygiene VI - Selected contributions from the International Symposium Occupational Safety and Hygiene, SHO 2018* [Internet]. 2018 [citado 19 de Julho de 2024];7–11. Disponível em: <https://repositorio.ipl.pt/handle/10400.21/9037>
132. Agência Europeia para a Segurança e Saúde no Trabalho. Segurança e saúde nas cadeias de abastecimento do setor agroalimentar: o poder de combinar a governação contratual e relacional | Segurança e saúde no trabalho EU-OSHA [Internet]. [citado 14 de Agosto de 2024]. Disponível em: <https://osha.europa.eu/en/publications/safety-and-health-agri-food-sector-supply-chains-power-combining-contractual-and-relational-governance>
133. Koutsoumanis K, Allende A, Álvarez-Ordóñez A, Bolton D, Bover-Cid S, Chemaly M, et al. Role played by the environment in the emergence and spread of antimicrobial resistance (AMR) through the food chain. *EFSA Journal* [Internet]. 1 de Junho de 2021 [citado 19 de Julho de 2024];19(6):e06651. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2903/j.efsa.2021.6651>
134. Samreen, Ahmad I, Malak HA, Abulreesh HH. Environmental antimicrobial resistance and its drivers: a potential threat to public health. *J Glob Antimicrob Resist*. 1 de Dezembro de 2021;27:101–11.
135. Quintana ÁR, Seseña S, Garzón A, Arias R. Factors Affecting Levels of Airborne Bacteria in Dairy Farms: A Review. *Animals (Basel)* [Internet]. 1 de Março de 2020 [citado 14 de Agosto de 2024];10(3). Disponível em: [/pmc/articles/PMC7142656/](https://pmc/articles/PMC7142656/)

136. de Matos Nascimento A, de Paula VR, Dias EHO, da Costa Carneiro J, Otenio MH. Quantitative microbial risk assessment of occupational and public risks associated with bioaerosols generated during the application of dairy cattle wastewater as biofertilizer. *Science of The Total Environment*. 25 de Novembro de 2020;745:140711.
137. Thiel N, Münch S, Behrens W, Junker V, Faust M, Biniash O, et al. Airborne bacterial emission fluxes from manure-fertilized agricultural soil. *Microb Biotechnol* [Internet]. 1 de Setembro de 2020 [citado 15 de Agosto de 2024];13(5):1631. Disponível em: /pmc/articles/PMC7415373/
138. Yan G, Wang S, Cui Y, Xue K, Liu Y, Liu J. Bacterial Diversity and Antimicrobial Resistance of Microorganisms Isolated from Teat Cup Liners in Dairy Farms in Shandong Province, China. *Animals* [Internet]. 1 de Agosto de 2024 [citado 14 de Agosto de 2024];14(15):2167. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2615/14/15/2167/htm>
139. Popescu S, Borda C, Diugan EA. Microbiological air quality in tie-stall dairy barns and some factors that influence it. *Afr J Agric Res* [Internet]. 26 de Dezembro de 2011 [citado 14 de Agosto de 2024];6(32):6726–34. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/271229293_Microbiological_air_quality_in_tie-stall_dairy_barns_and_some_factors_that_influence_it
140. Normand AC, Vacheyrou M, Sudre B, Heederik DJJ, Piarroux R. Assessment of dust sampling methods for the study of cultivable- microorganism exposure in stables. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. Dezembro de 2009 [citado 19 de Julho de 2024];75(24):7617–23. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.01414-09>
141. Painel de especialistas de alto nível da One Health. The One Health Definition and Principles Developed by OHLEP Translations. 2023;
142. CDC: Centers for Disease Control and Prevention. Sobre One Health | One Health [Internet]. 2024 [citado 13 de Agosto de 2024]. Disponível em: https://www.cdc.gov/one-health/about/?CDC_AAref_Val=https://www.cdc.gov/onehealth/basics/index.html
143. Adisasmito WB, Almuhairi S, Behravesch CB, Biliogui P, Bukachi SA, Casas N, et al. One Health: A new definition for a sustainable and healthy future. *PLoS Pathog* [Internet]. 1 de Junho de 2022 [citado 15 de Agosto de 2024];18(6). Disponível em: <https://www.eea.europa.eu/en/topics/at-a-glance/health/one-health>
144. One Health | Página inicial da Agência Europeia do Ambiente [Internet]. [citado 15 de Agosto de 2024]. Disponível em: <https://www.eea.europa.eu/en/topics/at-a-glance/health/one-health>
145. Direção Geral de Alimentação e Veterinária/ Confederação dos Agricultores de Portugal. Manual de Bem-Estar Animal. 2018 [citado 14 de Agosto de 2024]; Disponível em: https://www.dgav.pt/wp-content/uploads/2021/01/Manual_BE-5.pdf
146. Quadro de boas práticas para o uso de antimicrobianos em animais produtores de alimentos na UE – Alcançando o próximo nível | EPRUMA [Internet]. [citado 14 de Agosto de 2024]. Disponível em: <https://epruma.eu/home/best-practice-guides/best-practice-framework-for-the-use-of-antimicrobials-in-food-producing-animals-in-the-eu-reaching-for-the-next-level/>
147. Organização Mundial da Saúde e Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura. Codex Alimentarius - Code of Practice to Minimize and Contain Foodborne Antimicrobial Resistance - CXC 61-2005. 2021 [citado 14 de Setembro de 2024]; Disponível em: https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXC%2B61-2005%252FCXC_061e.pdf
148. Botelho A. Os Fungos como Agentes Patogénicos dos Animais (Dossier Técnico). Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P. [Internet]. 2021 [citado 19 de Julho de 2024]. Disponível em: <https://www.inia.pt/divulgacao/publicacoes-bd/os-fungos-como-agentes-patogenicos-dos-animais>
149. Direção Geral de Alimentação e Veterinária. Plano de Ação Nacional para a Redução do Uso de Antibióticos nos Animais. 2014 [citado 14 de Agosto de 2024]; Disponível em: <https://www.dgav.pt/wp-content/uploads/2021/03/PANRUA-PLANO-DE-ACCAO-2014.pdf>
150. Organización Mundial de Sanidad Animal. Acceso en línea al Código Terrestre [Internet]. 2024 [citado 14 de Setembro de 2024]. Disponível em: <https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-codigo-terrestre/>
151. Rittscher AE, Vlasblom AA, Duim B, Scherpenisse P, Van Schothorst I, Wouters I, et al. A comparison of passive and active dust sampling methods for measuring airborne methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farms. *Ann Work Expo Health* [Internet]. 1 de Outubro de 2023 [citado 19 de Julho de 2024];67(8):1004. Disponível em: /pmc/articles/PMC10516621/
152. Viegas C, Dias M, Viegas S. Electrostatic Dust Cloth: A Useful Passive Sampling Method When Assessing Exposure to Fungi Demonstrated in Studies Developed in Portugal (2018–2021). *Pathogens* 2022, Vol 11, Page 345 [Internet]. 12 de Março de 2022 [citado 19 de Julho de 2024];11(3):345. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-0817/11/3/345/htm>
153. Viegas C, Malta-Vacas J, Sabino R, Viegas S, Veríssimo C. Accessing indoor fungal contamination using conventional and molecular methods in Portuguese poultries. *Environ Monit Assess* [Internet]. 2014 [citado 13 de Setembro de 2024];186(3):1951–9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24214296/>

154. Viegas S, Assunção R, Twarużek M, Kosicki R, Grajewski J, Viegas C. Mycotoxins feed contamination in a dairy farm: potential implications for milk contamination and workers' exposure in a One Health approach. *J Sci Food Agric* [Internet]. 1 de Fevereiro de 2020 [citado 15 de Agosto de 2024];100(3):1118–23. Disponível em: <https://repositorio.ipl.pt/handle/10400.21/10713>
155. Viegas C, Carolino E, Malta-Vacas J, Sabino R, Viegas S, Veríssimo C. Fungal Contamination of Poultry Litter: A Public Health Problem. *J Toxicol Environ Health A*. 16 de Setembro de 2012;75(22–23):1341–50.
156. Viegas C, Dias M, Viegas S. Electrostatic Dust Cloth: A Useful Passive Sampling Method When Assessing Exposure to Fungi Demonstrated in Studies Developed in Portugal (2018–2021). *Pathogens* 2022, Vol 11, Page 345 [Internet]. 12 de Março de 2022 [citado 19 de Julho de 2024];11(3):345. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-0817/11/3/345/htm>
157. Viegas C, Monteiro A, Caetano LA, Faria T, Carolino E, Viegas S. Electrostatic Dust Cloth: A Passive Screening Method to Assess Occupational Exposure to Organic Dust in Bakeries. *Atmosphere* 2018, Vol 9, Page 64 [Internet]. 12 de Fevereiro de 2018 [citado 19 de Setembro de 2024];9(2):64. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4433/9/2/64/htm>
158. Viegas C, Santos P, Almeida B, Monteiro A, Carolino E, Gomes AQ, et al. Electrostatic dust collector: a passive screening method to assess occupational exposure to organic dust in primary health care centers. *Air Qual Atmos Health* [Internet]. 9 de Maio de 2019 [citado 19 de Setembro de 2024];12(5):573–83. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11869-018-0650-9>
159. Feld L, Bay H, Angen Ø, Larsen AR, Madsen AM. Survival of LA-MRSA in Dust from Swine Farms. *Ann Work Expo Health* [Internet]. 13 de Fevereiro de 2018 [citado 19 de Setembro de 2024];62(2):147–56. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1093/annweh/wxx108>
160. Madsen AM, Rasmussen PU, Frederiksen MW. Accumulation of microorganisms on work clothes of workers collecting different types of waste – A feasibility study. *Waste Management*. 15 de Fevereiro de 2022;139:250–7.
161. Madsen AM, Rasmussen PU, Frederiksen MW. Accumulation of microorganisms on work clothes of workers collecting different types of waste – A feasibility study. *Waste Management*. 15 de Fevereiro de 2022;139:250–7.
162. ISO - International Organization for Standardization. ISO 18593:2004(en), Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs [Internet]. 2004 [citado 19 de Julho de 2024]. Disponível em: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:18593:ed-1:v1:en>
163. Viegas C, Gomes B, Pimenta R, Dias M, Cervantes R, Caetano LA, et al. Microbial contamination in firefighter Headquarters': A neglected occupational exposure scenario. *Build Environ*. 1 de Abril de 2022;213:108862.
164. European Committee on Antimicrobial Susceptibility... - Google Académico [Internet]. [citado 19 de Julho de 2024]. Disponível em: https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=The%20European%20Committee%20on%20Antimicrobial%20Susceptibility%20Testing.%20Routine%20and%20extended%20internal%20quality%20control%20for%20MIC%20determination%20and%20agar%20dilution%20for%20yeasts.%20moulds%20and%20dermatophytes%20as%20recommended%20by%20EUCAST.%20Version%205.0&publication_year=2020&author=EUCAST
165. Viegas C, Pena P, Dias M, Gomes B, Cervantes R, Carolino E, et al. Microbial contamination in waste collection: Unveiling this Portuguese occupational exposure scenario. *J Environ Manage*. 15 de Julho de 2022;314:115086.
166. Hoog S, Josep G, Josepa G, Sarah A. Atlas de Fungos Clínicos [Internet]. [citado 19 de Julho de 2024]. Disponível em: <https://www.atlasclinfungi.org/>
167. Agência Europeia do Ambiente. Health | European Environment Agency's home page [Internet]. 2024 [citado 14 de Agosto de 2024]. Disponível em: <https://www.eea.europa.eu/en/topics/at-a-glance/health>
168. United Nations Environment Programme (UNEP). Fronteiras 2017: Questões Emergentes de Preocupação Ambiental | UNEP - UN Environment Programme [Internet]. [citado 14 de Agosto de 2024]. Disponível em: <https://www.unep.org/pt-br/resources/fronteiras-2017-questoes-emergentes-de-preocupacao-ambiental>
169. Viegas C, Viegas S. Special Issue "Antimicrobial Resistance: From the Environment to Human Health". *Microorganisms* [Internet]. 2021 [citado 13 de Setembro de 2024];9(4). Disponível em: <https://pmc/articles/PMC8065737/>
170. Caetano LA, Faria T, Batista AC, Viegas S, Viegas C. Assessment of occupational exposure to azole resistant fungi in 10 Portuguese bakeries. *AIMS Microbiol* [Internet]. 2017 [citado 13 de Setembro de 2024];3(4):960–75. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31294200/>
171. Viegas C, Faria T, Monteiro A, Caetano LA, Carolino E, Gomes AQ, et al. A Novel Multi-Approach Protocol for the Characterization of Occupational Exposure to Organic Dust-Swine Production Case Study. *Toxics* [Internet]. 2017 [citado 13 de Setembro de 2024];6(1). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29280976/>
172. Viegas S, Veiga L, Malta-Vacas J, Sabino R, Figueiredo P, Almeida A, et al. Occupational exposure to aflatoxin (AFB1) in poultry production [Internet]. 2012 [citado 15 de Agosto de 2024]. Disponível em: <https://repositorio.ipl.pt/handle/10400.21/1541>

173. Volkov S. WHO List of Medically Important Antimicrobials A risk management tool for mitigating antimicrobial resistance due to non-human use. 2024 [citado 14 de Agosto de 2024]; Disponível em: <https://iris.who.int/>.
174. Moreira O, Cruz V, Trindade H, Nunes R, Murta D, Menino R, et al. Gestão dos fluxos gerados na atividade agropecuária ii Editores. [citado 15 de Setembro de 2024]; Disponível em: <https://projects.inia.pt/goefluentes>
175. Diário da República, 1.a série AMBIENTE E AÇÃO CLIMÁTICA E AGRICULTURA.
176. Borges P, Teles C, João D, Salgueiro A, Moreira Da Fonseca P. Manual de Gestão Sustentável de Efluentes Pecuários no âmbito do NREAP. 2022;
177. Murinda SE, Nguyen LT, Nam HM, Almeida RA, Headrick SJ, Oliver SP. Detection of sorbitol-negative and sorbitol-positive Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, and *Salmonella* spp. in dairy farm environmental samples. *Foodborne Pathog Dis* [Internet]. 2004 [citado 19 de Julho de 2024];1(2):97–104. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15992268/>
178. Denissen J, Reyneke B, Waso-Reyneke M, Havenga B, Barnard T, Khan S, et al. Prevalence of ESKAPE pathogens in the environment: Antibiotic resistance status, community-acquired infection and risk to human health. *Int J Hyg Environ Health*. 1 de Julho de 2022;244:114006.
179. European Platform for the Responsible Use of Medicines in Animals (EPRUMA). Quadro de boas práticas para o uso de antimicrobianos em animais produtores de alimentos na UE – Alcançando o próximo nível [Internet]. 2020 [citado 14 de Agosto de 2024]. Disponível em: <https://epruma.eu/home/best-practice-guides/best-practice-framework-for-the-use-of-antimicrobials-in-food-producing-animals-in-the-eu-reaching-for-the-next-level/>
180. World Health Organization Regional Office for Europe. WHO guidelines for indoor air quality:dampness and mould. World Health Organization [Internet]. 2009 [citado 19 de Julho de 2024];228. Disponível em: https://books.google.com/books/about/WHO_Guidelines_for_Indoor_Air_Quality.html?hl=es&id=PxB8UUHihWgC
181. Sabino RM V., Viegas S, Veríssimo C, Viegas C. Possível infecção respiratória por *Aspergillus* em trabalhadores de suínos e aves [Internet]. 2012 [citado 14 de Agosto de 2024]. Disponível em: <https://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/1152>
182. Agência Portuguesa do Ambiente e Laboratório Referência do Ambiente. Qualidade do Ar em Espaços Interiores – Um Guia Técnico [Internet]. 2009 [citado 19 de Julho de 2024]. Disponível em: <https://www.voltimum.pt/biblioteca/qualidade-do-ar-em-espacos-interiores>
183. Viegas C, Dias M, Carolino E, Sabino R. Culture Media and Sampling Collection Method for *Aspergillus* spp. Assessment: Tackling the Gap between Recommendations and the Scientific Evidence. *Atmosphere* 2021, Vol 12, Page 23 [Internet]. 26 de Dezembro de 2020 [citado 19 de Julho de 2024];12(1):23. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4433/12/1/23/htm>
184. Viegas C, Pena P, Dias M, Gomes B, Cervantes R, Carolino E, et al. Microbial contamination in waste collection: Unveiling this Portuguese occupational exposure scenario. *J Environ Manage* [Internet]. 15 de Julho de 2022 [citado 13 de Setembro de 2024];314. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35483278/>
185. Viegas C, Faria T, Caetano LA, Loeffler J, Springer J. Mucorales prevalence and azole-resistance surveillance on different indoor environments: a menace to be tackled [Internet]. 2018 [citado 13 de Setembro de 2024]. Disponível em: <https://repositorio.ipl.pt/handle/10400.21/9211>
186. Caetano LA, Gomes B, Dias M, Pena P, Cervantes R, Viegas C. Azole-resistance of Mucorales order in three occupational environments and potential health risks for workers. 2022 [citado 14 de Agosto de 2024]; Disponível em: <https://repositorio.ipl.pt/handle/10400.21/14393>
187. Viegas C, Faria T, Caetano LA, Loeffler J, Springer J. Mucorales prevalence and azole-resistance surveillance on different indoor environments: a menace to be tackled. 2018 [citado 13 de Setembro de 2024]; Disponível em: <https://repositorio.ipl.pt/handle/10400.21/9211>
188. Viegas C, Dias M, Almeida B, Aranha Caetano L, Carolino E, Quintal Gomes A, et al. Are workers from waste sorting industry really protected by wearing Filtering Respiratory Protective Devices? The gap between the myth and reality. *Waste Management*. 1 de Fevereiro de 2020;102:856–67.
189. Agência Internacional de Pesquisa sobre o Cancro (IARC). Agentes classificados pelas monografias do IARC, volumes 1–136 – Monografias do IARC sobre a identificação de riscos cancerígenos para humanos [Internet]. [citado 19 de Julho de 2024]. Disponível em: <https://monographs.iarc.who.int/agents-classified-by-the-iarc/>
190. Toxinas Fusarium. [citado 14 de Setembro de 2024]; Disponível em: <http://www.fao.org/fao-who->
191. Sassahara M, Yanaka EK, Netto DP. Ocorrência de aflatoxina e zearalenona em alimentos destinados ao gado leiteiro na Região Norte do Estado do Paraná. *Semin Cienc Agrar* [Internet]. 10 de Maio de 2003 [citado 14 de Agosto de 2024];24(1):63–72. Disponível em: <https://ojs.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/2117>
192. Viegas S, Twarużek M, Kosicki R, Grajewski J, Viegas C. Multi-mycotoxin occurrence in feed: the case of one dairy farm located in Portugal. 2019 [citado 14 de Agosto de 2024]; Disponível em: <https://repositorio.ipl.pt/handle/10400.21/10041>

193. Pepi M, Barretta R, Simões D, De Andrade E, Sabino R. Fungi in a One Health Perspective. Encyclopedia 2023, Vol 3, Pages 900-918 [Internet]. 23 de Julho de 2023 [citado 19 de Julho de 2024];3(3):900–18. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2673-8392/3/3/64/htm>
194. Vaičiulienė G, Bakutis B, Jovaišienė J, Falkauskas R, Gerulis G, Kerzienė S, et al. Prevalence of Mycotoxins and Endotoxins in Total Mixed Rations and Different Types of Ensiled Forages for Dairy Cows in Lithuania. Toxins (Basel) [Internet]. 1 de Dezembro de 2021 [citado 14 de Agosto de 2024];13(12). Disponível em: </pmc/articles/PMC8707214/>
195. Gomes B, Pena P, Cervantes R, Dias M, Viegas C. Microbial Contamination of Bedding Material: One Health in Poultry Production. Int J Environ Res Public Health [Internet]. 1 de Dezembro de 2022 [citado 13 de Setembro de 2024];19(24). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36554388/>
196. Sabino R, Faisca VM, Carolino E, Veríssimo C, Viegas C. Occupational exposure to Aspergillus by swine and poultry farm workers in Portugal. J Toxicol Environ Health A [Internet]. 1 de Janeiro de 2012 [citado 13 de Setembro de 2024];75(22–23):1381–91. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23095156/>
197. Instituto Nacional de Estatística. Recenseamento Agrícola. Análise dos principais resultados : 2019. Lisboa: INE, 2021. 2021 [citado 17 de Setembro de 2024]; Disponível em: https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_boui=437178558&PUBLICACOESmodo=2
198. Portaria n.o 138-G/2021 | DR: Estabelece os requisitos para a avaliação da qualidade do ar interior nos edifícios de comércio e serviços, incluindo os limiares de proteção, condições de referência e critérios de conformidade, e a respetiva metodologia para a medição dos poluentes e para a fiscalização do cumprimento das normas aprovadas [Internet]. [citado 19 de Julho de 2024]. Disponível em: <https://diariodarepublica.pt/dr/detalhe/portaria/138-g-2021-166296490>
199. Costa M, Cara d'Anjo A, Cardo M, Leite A. Zoonotic bacteria in the food chain: antimicrobial resistance and associated factors in Portugal. Eur J Public Health [Internet]. 1 de Setembro de 2020 [citado 15 de Setembro de 2024];30(Supplement_5). Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1093/eurpub/ckaa166.237>
200. Viegas S, Faisca VM, Dias H, Clérigo A, Carolino E, Viegas C. Occupational Exposure to Poultry Dust and Effects on the Respiratory System in Workers. J Toxicol Environ Health A [Internet]. 15 de Fevereiro de 2013 [citado 19 de Setembro de 2024];76(4–5):230–9. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15287394.2013.757199>
201. Comissão Europeia. Regulamento (UE) 2016/429 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 9 de março de 2016, relativo às doenças animais transmissíveis e que altera e revoga determinados atos no domínio da saúde animal («Lei da Saúde Animal») (Texto relevante para efeitos do EEE) [Internet]. 2016 [citado 14 de Agosto de 2024]. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2016/429/oj/por>
202. Odey TOJ, Tanimowo WO, Afolabi KO, Jahid IK, Reuben RC. Antimicrobial use and resistance in food animal production: food safety and associated concerns in Sub-Saharan Africa. International Microbiology 2023 27:1 [Internet]. 6 de Dezembro de 2023 [citado 14 de Agosto de 2024];27(1):1–23. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10123-023-00462-x>
203. Diário da República. Portaria n.o 42/2015, de 19 de fevereiro: Estabelece as normas regulamentares aplicáveis à atividade de detenção e produção pecuária, ou atividades complementares, de bovinos, ovinos, caprinos e cervídeos e revoga a Portaria n.o 638/2009, de 9 de junho [Internet]. [citado 14 de Agosto de 2024]. Disponível em: <https://diariodarepublica.pt/dr/detalhe/portaria/42-2015-66536462>
204. Direção Geral de Alimentação e Veterinária. Manual de Boas Práticas – Utilização de Antimicrobianos em Animais Produtores de Géneros Alimentícios [Internet]. 2021 [citado 14 de Agosto de 2024]. Disponível em: <https://www.dgav.pt/destaques/noticias/manual-de-boas-praticas-utilizacao-de-antimicrobianos-em-animais-produtores-de-generos-alimenticios/>
205. Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura e Organização Mundial da Saúde. Codex Alimentarius: Guidelines on Integrated Monitoring and Surveillance of Foodborne Antimicrobial Resistance CXG 94-2021. 2021 [citado 14 de Agosto de 2024]; Disponível em: https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXG%2B94-2021%252FCXG_94e.pdf
206. Confederação dos Agricultores de Portugal/ Direção Geral de Alimentação e Veterinária. Manual de biossegurança em sistema de produção pecuária em regime extensivo. 2023 [citado 14 de Agosto de 2024]; Disponível em: https://www.cap.pt/storage/app/media/pdf/manual_biosseguranca_producao_pecuaria.pdf
207. Carmo LP, Nielsen LR, Alban L, da Costa PM, Schüpbach-Regula G, Magouras I. Veterinary expert opinion on potential drivers and opportunities for changing antimicrobial usage practices in livestock in Denmark, Portugal, and Switzerland. Front Vet Sci [Internet]. 1 de Março de 2018 [citado 14 de Agosto de 2024];5(MAR):320502. Disponível em: www.frontiersin.org
208. FAO and WHO. Foodborne antimicrobial resistance – Compendium of Codex standards. First revision. Codex Alimentarius Commission. Rome. Foodborne antimicrobial resistance. 16 de Fevereiro de 2023;
209. McEwen SA, Fedorka-Cray PJ. Antimicrobial Use and Resistance in Animals. Clinical Infectious Diseases [Internet]. 1 de Junho de 2002 [citado 14 de Agosto de 2024];34(Supplement_3):S93–106. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1086/340246>

210. Collignon P, Beggs JJ, Walsh TR, Gandra S, Laxminarayan R. Anthropological and socioeconomic factors contributing to global antimicrobial resistance: a univariate and multivariable analysis. *Lancet Planet Health* [Internet]. 1 de Setembro de 2018 [citado 14 de Agosto de 2024];2(9):e398–405. Disponível em: <http://www.thelancet.com/article/S2542519618301864/fulltext>
211. Diário da República. Decreto-Lei n.º 314/2009, de 28 de outubro: Transpõe para a ordem jurídica nacional a Directiva n.º 2009/9/CE, da Comissão, de 10 de Fevereiro, que altera a Directiva n.º 2001/82/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 6 de Novembro, que estabelece um código comunitário relativo aos medicamentos veterinários, e procede à primeira alteração ao Decreto-Lei n.º 148/2008, de 29 de Julho [Internet]. [citado 14 de Agosto de 2024]. Disponível em: <https://diariodarepublica.pt/dr/detalhe/decreto-lei/314-2009-483106>
212. Decreto-Lei n.º 243/86, de 20 de agosto - Aprova o Regulamento Geral de Higiene e Segurança do Trabalho nos Estabelecimentos Comerciais, de Escritório e Serviços [Internet]. [citado 17 de Setembro de 2024]. Disponível em: <https://diariodarepublica.pt/dr/detalhe/decreto-lei/243-1986-219080>
213. Diário da República. Portaria n.º 79/2022, de 3 de fevereiro: Define o regime aplicável à gestão de efluentes pecuários, revogando as Portarias n.ºs Portaria n.º 631/2009, de 9 de junho, e Portaria n.º 114-A/2011, de 23 de março [Internet]. [citado 14 de Agosto de 2024]. Disponível em: <https://diariodarepublica.pt/dr/detalhe/portaria/79-2022-178602023>
214. Agência Europeia para a Segurança e Saúde no Trabalho. Exposição a agentes biológicos e problemas de saúde relacionados em ocupações relacionadas com animais | Segurança e saúde no trabalho EU-OSHA [Internet]. [citado 17 de Setembro de 2024]. Disponível em: <https://osha.europa.eu/en/publications/exposure-biological-agents-and-related-health-problems-animal-related-occupations>

Apêndices

Apêndice I: Consentimento Informado

Declaração de consentimento informado para participantes legalmente capazes de dar consentimento

Identificação do participante

Nome	
Código do participante	
Empresa	
Telefone	
Correio eletrónico	

Identificação do Estudante / Investigador

Nome	Ana Filipa Costa Fernandes Gouveia
Instituição e Departamento	Escola Nacional de Saúde Pública
Telefone	925756911
Correio eletrónico	afc.gouveia@ensp.unl.pt

Declaração de consentimento informado do participante

Código do participante (apenas para uso interno):	
1	Confirmando que a estudante da Escola Nacional de Saúde Pública da Universidade NOVA de Lisboa, Ana Filipa Fernandes, forneceu informações claras sobre os objetivos e procedimentos do projeto e que li e compreendi o folheto "Informações para os Participantes", nomeadamente que a Universidade NOVA de Lisboa, representada pela Escola Nacional de Saúde Pública, enquanto Unidade Orgânica, é a responsável pelo tratamento. Tive a oportunidade de analisar as informações, fazer perguntas e receber respostas satisfatórias. ☐ SIM ☐ NÃO
2	Compreendo que, a minha participação na pesquisa é voluntária conforme definido no folheto "Informações para os Participantes" e que posso desistir a qualquer altura (sem ter que indicar qualquer motivo). A equipa de investigação mantém, no entanto, o direito de utilizar quaisquer amostras colhidas antes da desistência, de forma anónima. Entendo que não terei nenhum benefício financeiro ao participar deste estudo e que não terei de pagar pela minha participação. ☐ SIM ☐ NÃO
3	Compreendo que, se decidir sair do estudo, a retirada do consentimento não afetará a legalidade do tratamento com base no consentimento antes da sua retirada. Assim, a equipa de investigação manterá o direito de usar os meus dados, colhidos antes da minha saída do estudo, desde que estes dados sejam anonimizados (o meu nome será substituído por um código e a chave do código será destruída), não havendo forma de me reidentificarem. ☐ SIM ☐ NÃO
5	Declaro que compreendo que posso exercer os meus direitos contactando Ana Filipa Fernandes, através do e-mail afc.gouveia@ensp.unl.pt. ☐ SIM ☐ NÃO

7	Autorizo a Ana Filipa Fernandes a entrar em contacto comigo durante o horário de trabalho para colher amostras.	☐ SIM ☐ NÃO
8	Autorizo que Ana Filipa Fernandes tenha acesso exclusivo às informações de identificação da minha exploração pecuária e anonimizará (através de codificação) os meus dados e amostras de acordo com as salvaguardas atualmente disponíveis e no melhor da sua capacidade, de tal forma que outros usuários dos meus dados não os possam rastrear até mim.	☐ SIM ☐ NÃO
9	Autorizo que a Ana Filipa Fernandes tenha o direito de transferir a(s) amostra(s), de forma codificada para proteger a identidade, para laboratórios especializados para analisar as amostras recolhidas na minha exploração pecuária.	☐ SIM ☐ NÃO
11	Autorizo que durante o presente estudo, a Escola Nacional de Saúde Pública da Universidade NOVA de Lisboa tenha o direito de usar e armazenar a(s) amostras ambientais da minha exploração pecuária (e.g. EDC, camas após o uso, rações, esfregaços de comedouros e bebedouros) codificadas e dados anonimizados.	☐ SIM ☐ NÃO
12	Após a conclusão do projeto, serei informado sobre as minhas opções em relação às sobras de amostra(s). Eu escolho: ☐ Solicito o descarte de qualquer amostra(s) restante(s). ☐ Autorizo a que as amostras codificadas sejam armazenadas para futuros projetos relacionados a saúde pública e a saúde ambiental, que mantenham os padrões éticos reconhecidos para pesquisa científica (aprovados por um comité de ética) e os critérios de adequação do projeto.	☐ SIM ☐ NÃO

13	Autorizo o uso de máquina fotográfica da seguinte forma (marque a opção relevante): ☐ Não desejo que a minha exploração seja fotografada durante a visita de investigação. ☐ Autorizo que a minha exploração seja fotografada na condição que as fotografias sejam editadas de forma a proteger a identidade em quaisquer relatórios e apresentações publicadas.	☐ SIM ☐ NÃO
14	Compreendo que tenho o direito de receber os resultados e indico a minha preferência da seguinte forma (marque apenas uma opção): ☐ Desejo receber os resultados da minha exploração. ☐ Desejo receber os resultados da minha exploração somente se estes excederem os valores de orientação baseados na saúde utilizados no estudo (quando aplicável). Assim, a estudante da Escola Nacional de Saúde Pública da Universidade NOVA de Lisboa e o seu representante, Professora Susana Viegas, poderão contactar-me no futuro para informar-me dos resultados. ☐ Não desejo receber os resultados. Não entrem em contacto comigo.	☐ SIM ☐ NÃO
16	Autorizo que o/a Escola Nacional de Saúde Pública da Universidade NOVA de Lisboa, entrem em contacto comigo no futuro para fins de pesquisa relacionada com a saúde pública e a saúde ambiental. Os meus dados de contacto podem ser armazenados exclusivamente para este fim e não serão divulgados a terceiros.	☐ SIM ☐ NÃO

A minha assinatura abaixo indica que consinto participar no estudo, nos termos acima indicados:			
Nome do Participante	Assinatura do Participante	Local	Data (DD/MM/AAAA)

Declaração do investigador/da pessoa que recolhe o consentimento

Eu, Ana Filipa Costa Fernandes Gouveia, certifiquei-me, dentro das minhas possibilidades, que o participante compreendeu o projeto que está a ser desenvolvido, objetivos e importância da sua participação, bem como tivessem a oportunidade de fazer perguntas sobre o estudo e obter respostas verdadeiras.

Confirmo que o(a) participante não foi coagido(a) a dar consentimento e que o mesmo foi dado livre e voluntariamente e sem qualquer objeção levantada.

Uma cópia deste Certificado de Consentimento Livre e Esclarecido foi fornecida ao participante.

Nome do investigador/pessoa que recolhe o consentimento	Assinatura do investigador/pessoa que recolhe o consentimento	Local	Data (DD/MM/AAAA)
--	---	-------	----------------------

Código do participante/proprietário da exploração pecuária (apenas para uso interno):

Informação para Participantes

A Resistência Antimicrobiana (RAM) pode descrever-se como a capacidade dos microrganismos (bactérias, fungos, vírus e parasitas) se tornarem resistentes (mortos ou inativados) a um antimicrobiano (substância utilizada para tratar infeções e inclui antibióticos, fungicidas, desinfetantes e antissépticos) ao qual eram anteriormente suscetíveis, como consequência de seleção natural e mutação genética. O aumento emergente e constante do aparecimento de microrganismos resistentes a múltiplas opções terapêuticas é uma das maiores ameaças globais atuais devido à falta de opções terapêuticas viáveis para tratar certas infeções em humanos e animais. Atualmente é possível estimar que relativamente a este problema:

1. Todos os anos 30 000 a 35 000 pessoas na União Europeia, e 1,2 milhões de pessoas no mundo, morrem em consequência direta de uma infeção causada por bactérias resistentes aos antibióticos. Até 2050, o número de mortes mundiais associadas a RAM poderá atingir mais de 10 milhões por ano, mais do que o número estimado de mortes por cancro e diabetes;
2. A Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2019, declarou a RAM como uma das dez maiores ameaças mundiais para a saúde pública global;
3. Em 2022, a Comissão Europeia identificou a RAM como uma das três principais ameaças para a saúde dos cidadãos europeus.

A propagação de microrganismos resistentes acontece através do contato entre pessoas, entre pessoas e animais, bem como através do consumo de alimentos de origem animal. A atividade de produção de animais para alimentação humana está identificada como dos principais impulsionadores do aumento das infeções causados por microrganismos com RAM incluem especialmente o uso elevado e inadequado de antibióticos, mas também fatores ambientais como falta de acesso a água potável, saneamento e higiene bem-estar animal. Os microrganismos existem em todas as superfícies, materiais que entram em contato com os animais e com as pessoas que trabalham em contato direto, e mesmo no ar ambiente. Pretende-se com este estudo perceber que microrganismos estão presentes no ambiente directo, e se estes apresentam resistências aos principais antifúngicos azólicos usados em saúde humana. Este estudo é assim importante para entender a sua exposição a bactérias e fungos causadores de doenças, dos seus animais, mas também do ambiente das redondezas da sua exploração, nomeadamente através da aerossilização e do uso de resíduos orgânicos enquanto fertilizantes no solo.

Pretendo também caracterizar a situação no nosso concelho em específico e conhecer as práticas que podem contribuir para as RAM, e identificar que medidas podem ser adotadas envolvendo-o a si também.

Convido a participar neste estudo que abrange a saúde humana, animal e ambiental que será inovador para Portugal. Por favor, leia as informações apresentadas a seguir para entender as razões para o desenvolvimento deste estudo e o que envolve. Terei muito prazer em responder a quaisquer dúvidas ou preocupações que possam surgir.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da Escola Nacional de Saúde Pública.

Porque estou a ser convidado?

A produção de bovinos foi selecionada por ser a mais relevante para a economia do distrito de Viana do Castelo, e concelho de XXXX, segundo dados recolhidos pela estudante/investigadora junto das delegações locais da Direção-Geral da Alimentação e Veterinária e Direção Regional de Agricultura e Pescas do Norte. O concelho em particular foi selecionado por conveniência por motivo de proximidade e fácil acesso da investigadora. Deste concelho foram escolhidas aleatoriamente as cinco explorações mais antigas de produção exclusiva de bovinos produtores de alimentos para consumo humano (carne e leite).

O que devo fazer se concordar em participar?

Não precisa alterar a sua rotina habitual, pois o estudo irá decorrer durante o horário normal de trabalho. Se decidir participar, deverá confirmar o seu consentimento, preenchendo e assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido em Anexo. Terá tempo para fazer quaisquer perguntas que possa ter e receber respostas. A colheita de amostras e preenchimento do questionário em colaboração com os investigadores serão realizadas em horário da sua disponibilidade.

Que amostras serão recolhidas?

A recolha de dados engloba:

4. A colheita de amostras ambientais realizadas pela investigadora/estudante. As amostras recolhidas provêm de Electrostatic Dust Cloths (EDC - panos eletrostáticos contra poeira) colocados em superfícies das explorações, em EDC fixados em vestuário usado durante um dia de trabalho, rações alimentícias, camas usadas pelos animais e esfregaços de superfícies de comedouros, bebedouros, salas de ordenha de leite e de zonas de contato em espaços sociais (escritório e vestiário), caso existam.
5. A investigadora/estudante irá preencher um questionário que inclui tópicos como a caracterização da exploração, gestão das condições higiosanitárias e de bem-estar animal, medidas de gestão e controlo da doença animal, gestão da segurança e saúde do trabalho e gestão de efluentes pecuários. O preenchimento será feito por observação directa, bem como em colaboração do proprietário da exploração e/ou pessoal que executa as atividades de gestão pecuária e animal.
6. Opcionalmente e, somente se assim o consentir, poderão ser tiradas fotografias para documentar a sua área e práticas de trabalho. As fotografias serão tiradas de forma a proteger a sua exploração pecuária.

O que irá acontecer com as amostras, dados e resultados recolhidos da minha exploração pecuária?

As amostras e dados serão utilizados apenas de acordo com o seu consentimento informado e de uma forma que proteja a privacidade. Os resultados divulgados do estudo não irão identificar a sua exploração de forma alguma. As suas amostras e dados recolhidos sobre a sua exploração serão codificados, armazenados e usados exclusivamente para fins de pesquisa.

As amostras serão analisadas em laboratório parceiro do projeto e especializado para análise. As suas amostras serão examinadas para medir a exposição a microrganismos (bactérias e fungos).

Os resultados obtidos poderão ser úteis para verificar se existe risco de exposição a microrganismos resistentes a antimicrobianos por si, pelos seus animais, bem como o ambiente circundante das explorações através da aplicação de matéria orgânica nos solos como fertilizante. A ligação entre a contaminação microbiológica e os dados sobre a sua exploração ajudaram a estabelecer uma relação entre si. A finalidade será a construção de um instrumento de promoção da saúde que poderá ajudar a tomar melhores decisões dirigido aos profissionais expostos.

Prevê-se que a conclusão do estudo será no final de XXX de 2024.

Porque é que precisam do meu consentimento?

O seu consentimento por escrito confirma que se voluntaria para participar do estudo, entende o que lhe é exigido e as respetivas razões. O Certificado de Consentimento Livre e Esclarecido, que deverá preencher e assinar antes de participar do estudo, será arquivado pela estudante durante cinco anos.

Como serei beneficiado se participar?

A sua participação no estudo é voluntária. O estudo ajudará a desenvolver práticas de trabalho seguras no seu local de trabalho, recolher informações sobre a sua exposição biológica e obterá orientação sobre como reduzir essa exposição.

Pode sempre entrar em contato com A.F.C.F.G..

Telefone:

Email:

afc.gouveia@ensp.unl.pt

Obrigado por ler este folheto e por considerar juntar-se ao estudo!

Apêndice II: Declaração de anonimato e sigilo

Declaração de anonimato e sigilo

Eu, Ana Filipa da Costa Fernandes Gouveia, enquanto estudante do curso de Mestrado em Promoção da Saúde da Escola Nacional de Saúde Pública da Universidade Nova de Lisboa, encontro-me a desenvolver uma dissertação sobre o tema da “Resistência a antimicrobianos nas explorações pecuárias de produção animal para consumo humano no distrito de Viana do Castelo, segundo uma abordagem “Uma Só Saúde”. A sua exploração pecuária foi selecionada para participar de forma voluntária. Declaro:

- O compromisso com a privacidade e a confidencialidade dos dados, preservando integralmente o anonimato e o sigilo dos dados obtidos;
- Os dados obtidos neste estudo serão utilizados exclusivamente para fins académicos;
- A dos resultados do estudo seguirá os princípios de anonimato e sigilo, pelo que os dados serão anonimizados.

Assino este termo para salvaguardar seus direitos.

A mestranda,

Ana Filipa da Costa Fernandes Gouveia

Telefone:

e-mail:

Apêndice III: Parecer Final da CEENSP



PARECER FINAL da CEENSP

Resposta ao Pedido de Parecer CEENSP nº21/2024

Nome do Investigador:

ANA FILIPA COSTA FERNANDES GOUVEIA

Dissertação de Mestrado:

UMA SÓ SAÚDE: RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS NA PRODUÇÃO DE ANIMAIS PARA CONSUMO HUMANO NO DISTRITO DE VIANA DO CASTELO

QUADRO I

De acordo com a informação e documentos disponibilizados pelo/a(s) Requerente, sou de parecer que este projeto cumpre os requisitos éticos de investigação:	Sim	Não	Não se aplica	Observações/ Pedidos de esclarecimento/ Fundamentação
1. Com seres humanos (incluindo quando aplicável a participantes menores, incapazes ou vulneráveis)	X			
2. Com Células/ tecidos Humanos			X	
3. Quanto à proteção de dados pessoais	X			
4. Quanto ao envolvimento de países terceiros.			X	
5. Quanto à utilização / recurso a animais.			X	
6. Que diz respeito à proteção do ambiente, saúde e segurança.	X			
7. Com foco exclusivo em aplicações civis.	X			
8. De salvaguarda para o potencial risco de utilização indevida.	X			

Parecer/Decisão:

Positivo	X
Intermédio, com pedido de esclarecimentos/alterações	
Negativo	

Fundamentação conclusiva (tendo em conta o que já foi dito no quadro I):

O presente estudo tem como objetivos:

- Conhecer a realidade da utilização de antimicrobianos em contexto da produção animal no distrito de Viana do Castelo
- Identificar os fatores que promovem a dispersão de resistências antimicrobianas no contexto da produção de animais
- Construir um instrumento de apoio para melhoria das competências de tomada das melhores decisões, dirigida aos profissionais da área de produção de animais (ex. póster, folhetos, boletins informativos, plano de formação, outro)

O estudo irá desenvolver-se em explorações pecuárias e envolve:

- colheita de amostras ambientais realizadas pela investigadora/estudante, que derivam de Electrostatic Dust Cloths (EDC - panos eletrostáticos contra poeira) colocados em superfícies das explorações, em EDC-tshirt fixados em vestuário usado durante um dia de trabalho, rações alimentícias dos bovinos, camas usadas pelos animais e esfregaços de superfícies de comedouros, bebedouros, salas de ordenha de leite e de zonas de contato em espaços sociais (escritório e vestiário).
- recolha de dados qualitativos por preenchimento de uma ficha de registo em contexto de observação direta, entrevistas aos proprietários das explorações pecuárias selecionadas e análise documental de bibliografia e legislação na área.

Os dados qualitativos a recolher irão incidir nos tópicos de caracterização da exploração, gestão das condições higiosanitárias e de bem-estar animal, medidas de gestão e controlo da doença animal, gestão da segurança e saúde do trabalho e gestão de efluentes pecuários.

O protocolo refere que será obtido o consentimento informado por parte dos proprietários das explorações, com o compromisso de garantia do anonimato, privacidade e

confidencialidade dos dados, nomeadamente no que respeita à denominação, localização, amostras e resultados. Neste contexto, é do nosso entender que este estudo não apresenta quaisquer questões éticas.

Reserva:

A CE-ENSP enfatiza que a aprovação de um estudo não significa que venha a ter qualquer responsabilidade por danos ou outros atos ilícitos que possam vir a ser praticados no âmbito do mesmo. As opiniões apresentadas nas publicações, relatórios ao governo ou outros resultados desta investigação são da responsabilidade exclusiva dos investigadores.

Aprovado na reunião plenária da CE-ENSP de 17 de abril de 2023

A Presidente da CE-ENSP



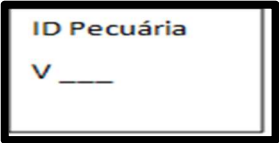
Prof.ª Doutora Paula Lobato de Faria

Apêndice IV: Grelha de observação

Instrumento de recolha de dados por entrevista

(específico para exploração pecuária destinada a bovinos)

Data: __ / __ / 2024



1. Caraterização da exploração	Fundamentação da inclusão
Nome exploração: Nome proprietário/ detentor dos animais: Morada: Localização GPS: Área exploração: ha Área envolvente: ☐ Urbana ☐ Rural	Caraterização geral da exploração A utilização de antibióticos está correlacionada com a localização, os agricultores de zonas urbanas apresentavam uma utilização mais prudente de antibióticos do que das zonas rurais ^{201,202}
Ano de início de atividade	Análise da antiguidade da empresa
Produtor/Titular ☐ Pessoa singular ☐ Pessoa Coletiva	
Classificação da atividade pecuária Classe: ☐ I ☐ II ☐ III Sistema de exploração ☐ Extensiva ☐ Intensiva ☐ Intensiva ao ar livre Tipo de criação: ☐ Interna ☐ Criação ao ar livre ☐ Acesso livre	Classificação regulamentar sobre a atividade pecuária; No regime extensivo/explorações ao ar livre, o risco de introdução e disseminação de doenças associadas é superior em comparação às explorações onde os animais são alojados; Em termos de biossegurança a produção em ambiente interno permite condições aos animais menos dependentes no clima exterior e diminuiu a exposição a infeções externas. A produção interna facilita a limpeza e desinfeção adequadas das instalações. Na produção externa a limpeza é um desafio, sendo mesmo impossível a desinfeção;

	O alojamento em grupo é preferido do ponto de vista do bem-estar animal. ^{145–147,201,203–205}
Sistema de produção ☐ Contínua ☐ Produção lote <i>all-in/all-out</i>	É uma medida de biossegurança. No estilo de produção em lote ou <i>all-in/all-out</i> há um período sem animais alojados em instalações. Permite que no período de ausência de animais de criação, a pressão de infecção do grupo anterior reduzirá rapidamente, especialmente após a limpeza-desinfecção-secagem adequadas, aumentando a sua eficácia. Na produção contínua os animais estão todo o seu ciclo de vida na exploração pecuária. ^{203,206}
Espécie de Animais N.º vacas ____ N.º Touros ____ N.º Bois ____ N.º Novilhos (as) ____ N.º Vitelos (as) ____ N.º Vacas aleitante ____ Total efectivo pecuário: ____ Raça: ☐ Minhota ☐ Outras	Identificação e caracterização do efetivo animal no momento das colheitas de amostras; As espécies autóctones são mais resistentes a doenças e <i>stress</i>; Em caso de efetivos maiores de animais há mais contatos com o exterior da exploração, através do movimento de animais, fornecedores, veterinários, bem como maiores contatos entre os animais propiciando a transmissão, aumentando a probabilidade de introdução de agentes patogénicos. ^{146,203,206,207}
Tipo de produção ☐ Produção de Leite ☐ Produção de carne	As explorações pecuárias são classificadas no tipo de produção ou orientação zootécnica ²⁰³
Permite o acesso a animais selvagens: ☐ Sim ☐ Não	Sendo uma medida de biossegurança, a delimitação da propriedade evita o contato com animais selvagens portadores de doenças, em especial durante a alimentação e abeberamento dos animais, evita a entrada e fuga de animais e consequentemente a entrada e difusão de doenças infetocontagiosas e parasitárias ^{145,147,203–206,208}
Existência de barreira sanitária ☐ Sim ☐ Não	
Ausência de fontes de poluição na envolvente ☐ Sim ☐ Não	

2. Gestão das condições higiosanitárias e de bem-estar animal	Fundamentação da inclusão
Água ☐ Rede Pública de abastecimento ☐ Rede Privada (Exemplos: regueiro, nascente, mina, outros) Controlo da qualidade da água de origem privada? ☐ Sim ☐ Não Data da última análise de água: ____ / ____ / 20__	A qualidade da água fornecida aos animais condiciona a saúde dos mesmos; A água usada na exploração deverá estar livre de contaminação, sendo aconselhável ser testada microbiologicamente com regularidade para verificar a potabilidade, caso a origem não seja a rede de abastecimento público ^{207,209,210}
Esgoto doméstico ☐ Rede Pública ☐ Rede Privada ☐ Não aplicável	O esgoto doméstico das instalações das atividades da pecuária deve ser encaminhado para um destino adequado de preferência rede pública
Higiene de utensílios e equipamentos ☐ Várias vezes ao dia ☐ Diária ☐ Ocasional ☐ Nunca ☐ Não aplicável	A introdução de boas práticas de higiene e manejo reduzem a necessidade de utilização de antimicrobianos; A higienização de todas as superfícies em contatos direto e indireto com os animais condicionam a propagação de doenças; A limpeza e desinfecção são componentes importantes da biossegurança por permitirem uma redução significativa da pressão de infeção Os animais podem ser expostos a doenças através de várias fontes de infeção como os fomites, equipamentos e vestuário dos trabalhadores da exploração pecuária; Como parte da biossegurança a identificação de todos os produtos de higiene animal, equipamentos e instalações com efeito de redução e eliminação microbiológica; Existência de registos dos produtos e biocidas desinfetantes (nome comercial) e procedimento de aplicação ^{146,201,204,207}
Higiene dos bebedouros ☐ Várias vezes ao dia ☐ Diária ☐ Ocasional ☐ Nunca ☐ Não aplicável	
Higiene dos comedouros ☐ Várias vezes ao dia ☐ Diária ☐ Ocasional ☐ Nunca ☐ Não aplicável	
Higienização de outras áreas: ☐ Pisos ☐ Sala Ordenha ☐ Tanque de leite ☐ Outros _____ ☐ Não aplicável Frequência: ☐ Várias vezes ao dia ☐ Diária ☐ Ocasional ☐ Nunca ☐ Não aplicável	
Em geral, as instalações reservadas ao alojamento dos animais (no interior do estábulo) permitem boas condições de lavagem e desinfecção: ☐ Sim ☐ Não	

Biocidas utilizados nas instalações e no ambiente, nas atividades relacionadas e em superfícies em contato com os géneros alimentícios e alimentos para animais, bem como na água de bebida para animais: Nome comercial: _____ Existência de fichas de dados segurança: ☐ Sim ☐ Não	
Existência de registos de produtos e biocidas desinfetantes (nome comercial) e respetiva concentração a utilizar, pessoal encarregado de o executar e datas e atividades executadas ☐ Sim ☐ Não	
A instalação permite estabelecimento e manutenção de boas condições de temperatura, humidade, iluminação e ventilação das instalações: ☐ Sim ☐ Não	A temperatura, humidade, ventilação, iluminação das instalações interferem com o conforto dos animais e com a disseminação de doenças (ex. pneumonia em vitelos) ^{145,146,203,204,209}
Camas: ☐ Serrim ☐ Palha ☐ Matos ☐ Outros _____ ☐ Uso de secante	O material do alojamento dos animais permite uma melhor limpeza e desinfecção e, por conseguinte, a prevenção e controlo de doenças;
Piso: ☐ Cimento ☐ Terra ☐ Outros _____	O contato com camas contaminadas é um fator de risco para a disseminação de doença ²⁰⁶
Alimentação ☐ Farinha cereais ☐ Silo (milho, erva, girassol) ☐ Feno ☐ Palha ☐ Pastagem ☐ Ração ☐ Mista	Em conjunto com o programa de vacinação, o reforço alimentar nutricionalmente equilibrado aumenta a imunidade natural. A nutrição, incluindo a água potável, tem um impacto importante na saúde dos animais. Isso permitirá que o animal mantenha um nível adequado de saúde e bem-estar, por exemplo, e ser rica em minerais, vitaminas, proteínas, energia, fibras, etc. A qualidade microbiológica da alimentação entregue aos animais também é de importância crítica ^{146,147,205,208}
Acondicionamento/armazenamento das rações ☐ Ar livre ☐ Local fechado e ventilado Local limpo e seco, protegido da luz solar direta ☐ Sim ☐ Não Em local exclusivamente para este fim e protegido de possíveis fontes de contaminação ☐ Sim ☐ Não	
Ração apresenta vestígios de fungos ☐ Sim ☐ Não	
Verificação do estado das embalagens de alimentação dos animais no momento da receção ☐ Sim ☐ Não	Evitar contaminação cruzada entre produtos ^{98,99,125,192}

Existência de separação física no acondicionamento de produtos de uso animal e de uso agrícola (ex. fitofarmacêuticos) ☐ Sim ☐ Não	
3. Medidas de gestão e controlo da doença animal	Fundamentação da inclusão
Existência de registos da aplicação de medicamentos veterinários nas explorações pecuárias ☐ Sim ☐ Não	Verificação da utilização de medicação na exploração pecuária no momento das colheitas ambientais; Recolha de informação sobre a utilização de medicamentos veterinários, desde a prescrição e aquisição/comercialização, até à utilização; Verificação da identificação inequívoca dos medicamentos antimicrobianos, da doença a tratar ou prevenir; A interação contínua entre os agricultores e detentores dos animais permite deteção precoce de surtos de doenças e a gestão oportuna dos casos; A formação de todos os produtores e funcionários de explorações sobre os fatores de risco que contribuem para a disseminação dos principais agentes infecciosos que afetam a saúde e bem-estar animais e a rentabilidade das explorações é uma medida de biossegurança; O fornecimento de alimentos medicamentosos é permitida apenas com prescrição do médico veterinário assistente 146,204,206,207,209,211
Tipo de antibióticos utilizados ☐ Antibióticos orais ☐ Antibióticos injetáveis ☐ Antibióticos em pomada Antibióticos utilizados: _____	
Fungicidas: ☐ Sim ☐ Não Fungicidas utilizados: _____ (substância ativa e/ou nome comercial) ☐ Limpeza das instalações ☐ Higiene dos animais ☐ Outros: _____ (ex. rações)	
Patologia registada: ☐ Gastrointestinal ☐ Glândula mamária ☐ Músculo-esquelético ☐ Neurológico ☐ Reprodutivo ☐ Respiratório ☐ Septicemia/múltiplos órgãos ☐ Pele/ocular e urinário	
Toma de antibióticos no momento? ☐ Sim ☐ Não Última administração de antibióticos: __/__/20__ Última administração de fungicidas: __/__/20__	
Prescrição: ☐ Manual ☐ Eletrónica	
Registo dos medicamentos que administram naqueles animais ☐ Atualizado ☐ Sim ☐ Não ☐ Eletrónico ☐ Físico	
Registo das visitas efetuadas pelo médico veterinário à exploração ☐ Sim ☐ Não	

Sala/armário de medicamentos: ☐ Sim ☐ Não Rede de frio: ☐ Sim ☐ Não	
Uso de produtos biocidas de uso direto no animal (Nome comercial) ☐ Sim ☐ Não ☐ Bactericidas _____ ☐ Fungicidas _____ ☐ Viricidas _____ Função do uso: Existência de fichas de dados segurança: ☐ Sim ☐ Não	
Utilização de alimentos medicamentosos com antimicrobianos ☐ Sim ☐ Não	
Destino dos resíduos embalagem de antibióticos e biocidas: ☐ Farmácia comunitária ☐ Lixo comum ☐ _____	
Pessoal possui formação sobre os fatores de risco que contribuem para a disseminação dos principais agentes infecciosos ☐ Sim ☐ Não	

4. Gestão da segurança e saúde do trabalho	Fundamentação da inclusão
N.º trabalhadores _____	
Uso de equipamentos de proteção individual ☐ Sim ☐ Não Equipamentos de proteção individual usados ☐ Fato ☐ Luvas ☐ Máscara ☐ Calçado	Os EPI protegem o trabalhador exposto por contato direto a animais portadores de microrganismos resistentes; A formação profissional para a minimização da exposição via ocupacional a riscos biológicos provenientes da atividade de criação animal; Os EPI de todos os trabalhadores e equipamentos em contato com animais infectados, bem como as poeiras e bioaerossóis provenientes do solo, resíduos, camas, rações ou água contaminados com os agentes patogênicos; A criação de animais foi considerada uma profissão de alto risco por exposição a contaminantes biológicos ^{129,130,132,206,212}
Existência de vestiários ☐ Sim ☐ Não ☐ Não aplicável	
Existência de chuveiro ☐ Sim ☐ Não	
Serviço de segurança e saúde no trabalho ☐ Sim ☐ Não ☐ Não aplicável	
Medicina do trabalho ☐ Sim ☐ Não ☐ Não aplicável	

5. Gestão de Efluentes Pecuários	Fundamentação da inclusão
Sistema de recolha e drenagem dos efluentes pecuários constituídos por coletores fechados, para reservatórios ou sistemas adequados de gestão de efluentes ☐ Sim ☐ Não	A gestão ambiental dos resíduos líquidos e sólidos é comprovadamente uma medida de prevenção da resistência antimicrobiana; É frequente a reciclagem de efluentes pecuários enquanto fertilizante orgânico; A sua aplicação pode originar contaminação das massas de água superficiais e/ou lençóis freáticos; Circulação de microrganismos RAM para o ambiente ^{176,178,203,206,213,214}
Armazenamento de efluentes pecuários em fossa, lagoa, tanque ou outro reservatório ☐ Sim ☐ Não	
Destino final deste tipo de resíduos: ☐ Rede pública de abastecimento de águas residuais ☐ Rede privada EP	
As estruturas de armazenamento de efluentes pecuários devem ser impermeabilizadas de forma a garantir a estanquidade na base e nas paredes laterais, para evitar infiltrações ou derrames que possam originar a contaminação das massas de água superficiais e subterrâneas e, preferencialmente, cobertas ☐ Sim ☐ Não	
Local de armazenamento interdito aos animais de produção ou em locais onde estejam armazenados alimentos para os mesmos ☐ Sim ☐ Não	
Reutilização do EP como fertilizante para efeito de valorização agrícola: ☐ Sim ☐ Não Terreno nas proximidades da EP ☐ Sim ☐ Não Meses de aplicação: _____ Destino Final ☐ Uso pelo próprio ☐ Venda	

Descrição do espaço

Técnico/a de Saúde Ambiental
Responsável pelo preenchimento

Data: __/__/2024

Apêndice V: Plano de análise de variáveis

O plano de operacionalização das variáveis para caracterização da amostra, gestão de efluentes pecuários, gestão de pessoal, condições higiosanitárias, resultados de contaminação bacteriana, fúngica e contaminação fúngica em meios suplementados com azóis

Tabela 9: Plano de análise de variáveis; Fonte: Investigadora

Nome da variável	Descrição da variável	Definição	Valores	Tipo de valores/escala
ID_ep	Identificador da exploração pecuária	Independente	1 – V1 2 – V2 3 – V3 4 – V4 5 – V5	Qualitativa nominal
enquadramento	Área envolvente	Independente	1 - Rural 2 - Urbana	Qualitativa nominal
sistemaexploracao	Sistema de exploração	Independente	1 - Extensiva 2 - Intensiva 3 - Intensiva ao ar livre	Qualitativa nominal
efetivopecuario	Total efetivo pecuário	Independente	1-250	Quantitativa discreta
producao	Tipo de produção	Independente	1 - Leite 2 - Carne	Qualitativa nominal
criacao	Tipo de criação	Independente	1 - Interna 2 - Criação ao ar livre 3 - Acesso livre	Qualitativa nominal
freqhigutensilio	Frequência de higiene de utensílios e equipamentos	Independente	1 - Várias vezes ao dia 2 - Diária 3 - Ocasionalmente 4 - Nunca 5 - Não aplicado	Qualitativa ordinal
freqhigibebed	Higiene dos bebedouros	Independente	1 - Várias vezes ao dia 2 - Diária 3 - Ocasionalmente 4 - Nunca 5 - Não aplicado	Qualitativa ordinal
freqhigicome	Higiene dos comedouros	Independente	1 - Várias vezes ao dia 2 - Diária 3 - Ocasionalmente 4 - Nunca 5 - Não aplicado	Qualitativa ordinal
freqhigioutros	Higienização de outras áreas	Independente	1 - Várias vezes ao dia 2 - Diária 3 - Ocasionalmente 4 - Nunca 5 - Não aplicado	Qualitativa ordinal
condicoesambientais	Condições de temperatura, humidade, iluminação e ventilação das instalações	Independente	1 - Sim 2 - Não	Qualitativa nominal
camas	Material das camas	Independente	1 - Serrim 2 - Palha 3 - Matos 4 - Outros	Qualitativa nominal
alimentacao	Material de alimentação animal	Independente	1 - Farinha cereais 2 - Silagem (milho, erva, girassol) 3 - Feno 4 - Palha 5 - Pastagem 6 - Ração 7 - Mista	Qualitativa nominal
acondicionamentoracao	Acondicionamento/armazenamento das rações	Independente	1 - Ar livre	Qualitativa nominal

2 - Local fechado e ventilado				
condicoesarmazenamento	Local limpo e seco, protegido da luz solar direta	Independente	1 - Sim 2 - Não	Qualitativa nominal
usoantifungicoscultura	Utilização de produtos antifúngicos e/ou nas culturas de produção de milho utilizado nas rações	Independente	1 - Sim 2 - Não	Qualitativa nominal
frequetilantf	Toma de antifúngicos nos últimos 12 meses	Independente	1-300	Quantitativa discreta
antibioticos	Toma de antibióticos nos últimos 12 meses	Independente	1 - Sim 2 - Não	Qualitativa nominal
frequetilantib	Toma de antibióticos nos últimos 12 meses	Independente	1-300	Quantitativa discreta
alimentacaomedicamentosa	Utilização de alimentos medicamentosos com antimicrobianos	Independente	1 - Sim 2 - Não	Qualitativa nominal
formacao	Pessoal possui formação sobre os fatores de risco que contribuem para a disseminação dos principais agentes infecciosos	Independente	1 - Sim 2 - Não	Qualitativa nominal
trabalhadores	N.º trabalhadores	Independente	1-10	Quantitativa discreta
usoepi	Uso de equipamentos de proteção individual	Independente	1 - Sim 2 - Não	Qualitativa nominal
epiusados	Equipamentos de proteção individual usados	Independente	1 - Fato 2 - Luvas 3 - Máscara 4 - Calçado	Qualitativa nominal
efluentepecuario	Utilização do efluente pecuário como fertilizante para efeito de valorização agrícola	Independente	1 - Sim 2 - Não	Qualitativa nominal
destinoeflpec	Destinatário final do efluente pecuário	Independente	1 - Uso pelo próprio 2 - Venda	Qualitativa nominal
TSA_CFU TSA_CFU.m ² VRBA_CF VRBA_CFU.m ² MAC_CF MAC_CFU.m ²	Contaminação bacteriana	Dependente	0 - ∞	Quantitativa discreta
MEA_CFU MEA_CFU.m ² DG18_CFU DG18_CFU.m ² DG18 37°C_CFU DG18 37°C_CFU.m ²	Contaminação fúngica	Dependente	0 - ∞	Quantitativa discreta
SAB_CFU SAB_CFU.m ² ITRA_CFU ITRA_CFU.m ² VORI_CF VORI_CFU.m ² POSA_CF POSA_CFU.m ²	Contaminação fúngica em meios suplementados com azóis	Dependente	0 - ∞	Quantitativa discreta
frequetilantib	Frequência utilização de antifúngicos	Dependente	0 - ∞	Quantitativa discreta
frequetilantf	Frequência utilização de antibióticos	Dependente	0 - ∞	Quantitativa discreta
Matrix_CODE	Matriz em análise	Dependente	1 – EDC 2 - EDCT 3 - Camas 4 - Ração 5 - Zaragatoa	Qualitativa nominal

Apêndice VI: Avaliação quantitativa e qualitativa de fungos

Tabela 10: Distribuição de fungos em MEA e DG18 de amostras de EDC, camas, rações e esfregaços colhidos em diferentes áreas das cinco explorações pecuárias.

Sistema de produção	Matriz	ID	MEA			DG18 (27°C)			DG18 (37°C)		
			ID	CFU.m ²	%	ID	CFU.m ²	%	ID	CFU.m ²	%
Intensiva	CAU	1	<i>Alternaria</i> sp.	1.60E+01	41	<i>Mucor</i> sp.	5.00E+00	17	<i>Chrysonilia sitophila</i>	1.60E+01	40
			<i>Penicillium</i> sp.	7.00E+00	18	<i>Penicillium</i> sp.	6.00E+00	21	<i>Aspergillus</i> sp.	2.40E+01	60
			<i>Aspergillus</i> sp.	1.60E+01	41	<i>Aspergillus</i> sp.	1.80E+01	62			
		4	<i>Aspergillus</i> sp.	1.00E+00	100	<i>Fusarium Graminearum</i>	2.00E+00	29	<i>Aspergillus</i> sp.	1.00E+00	100
						<i>Penicillium</i> sp.	2.00E+00	29			
						<i>Aspergillus</i> sp.	3.00E+00	43			
	EDC	1	<i>Mucor</i> sp.	1.52E+01	9	<i>Cladosporium</i> sp.	7.58E+00	8	<i>Mucor</i> sp.	3.79E+01	63
			<i>Penicillium</i> sp.	1.29E+02	74	<i>Penicillium</i> sp.	8.34E+01	92	<i>Penicillium</i> sp.	2.27E+01	38
			<i>Aspergillus</i> sp.	3.03E+01	17						
		4	<i>Chrysonilia sitophila</i>	7.58E+00	2	<i>Alternaria</i> sp.	1.52E+01	10	<i>Fusarium verticillioides</i>	1.21E+02	62
			<i>Cladosporium</i> sp.	2.27E+01	5	<i>Cladosporium</i> sp.	7.58E+00	5	<i>Mucor</i> sp.	7.58E+00	4
			<i>Penicillium</i> sp.	3.26E+02	67	<i>Mucor</i> sp.	7.58E+00	5	<i>Penicillium</i> sp.	6.07E+01	31
	EDCT	1	<i>Aspergillus</i> sp.	1.29E+02	27	<i>Penicillium</i> sp.	2.27E+01	15	<i>Aspergillus</i> sp.	7.58E+00	4
						<i>Rhizopus</i> sp.	3.79E+01	25			
						<i>Aspergillus</i> sp.	6.07E+01	40			
		4	<i>Penicillium</i> sp.	1.00E-01	80						
			<i>Aspergillus</i> sp.	2.50E-02	20				<i>Aspergillus</i> sp.	1.00E-01	100
			<i>Cladosporium</i> sp.	2.50E-02	20						
	R	1	<i>Penicillium</i> sp.	7.51E-02	60	<i>Lichthimia</i> sp.	2.00E+00	15	<i>Mucor</i> sp.	2.00E+00	50
			<i>Aspergillus</i> sp.	2.50E-02	20	<i>Mucor</i> sp.	2.00E+00	15	<i>Aspergillus</i> sp.	2.00E+00	50
			<i>Cladosporium</i> sp.	1.00E+00	6	<i>Penicillium</i> sp.	1.00E+00	8			
		4	<i>Mucor</i> sp.	1.00E+00	6	<i>Aspergillus</i> sp.	8.00E+00	62			
			<i>Penicillium</i> sp.	1.10E+01	69						
			<i>Rhizopus</i> sp.	1.00E+00	6	<i>C. sitophila</i>	3.00E+00	19			
Extensiva	CAU	1	<i>Aspergillus</i> sp.	2.00E+00	13	<i>F. graminearum</i>	1.00E+00	6			
			<i>Aspergillus</i> sp.	1.00E+00	100	<i>Mucor</i> sp.	1.00E+01	63			
						<i>Aspergillus</i> sp.	2.00E+00	13			
		4	<i>Cladosporium</i> sp.	1.00E+04	8	<i>Cladosporium</i> sp.	2.00E+05	77	<i>Penicillium</i> sp.	1.00E+04	6
			<i>Paecilomyces</i> sp.	1.00E+04	8	<i>Penicillium</i> sp.	3.00E+04	12	<i>Aspergillus</i> sp.	1.60E+05	94
			<i>Penicillium</i> sp.	9.00E+04	69	<i>Aspergillus</i> sp.	3.00E+04	12			
	Z	1	<i>Aspergillus</i> sp.	2.00E+04	15						
			<i>Alternaria</i> sp.	1.00E+04	2	<i>Cladosporium</i> sp.	6.00E+04	20	<i>Penicillium</i> sp.	3.00E+04	16
			<i>Aureobasidium</i> sp.	3.00E+04	5	<i>Penicillium</i> sp.	3.00E+04	10	<i>Aspergillus</i> sp.	1.60E+05	84
		4	<i>Cladosporium</i> sp.	4.30E+05	68	<i>Aspergillus</i> sp.	2.10E+05	70			
			<i>Penicillium</i> sp.	4.00E+04	6						
			<i>Aspergillus</i> sp.	1.20E+05	19						
	EDC	2	<i>Penicillium</i> sp.	1.00E+00	33	<i>Aspergillus</i> sp.	4.00E+01	100	<i>Aspergillus</i> sp.	4.00E+00	100
			<i>Aspergillus</i> sp.	2.00E+00	67	<i>Penicillium</i> sp.	3.00E+01	100			
			<i>Mucor</i> sp.	1.52E+01	10	<i>Cladosporium</i> sp.	1.84E+03	82	<i>Penicillium</i> sp.	7.58E+00	100
		3	<i>Aspergillus</i> sp.	1.44E+02	90	<i>Mucor</i> sp.	7.58E+00	7			
						<i>Penicillium</i> sp.	1.67E+02	1			
						<i>Phoma</i> sp.	1.52E+01	1			
	R	2	<i>Penicillium</i> sp.	4.55E+01	100	<i>Aspergillus</i> sp.	2.20E+02	10			
						<i>Penicillium</i> sp.	5.31E+01	33			
						<i>Aspergillus</i> sp.	1.06E+02	67			
		5	<i>Mucor</i> sp.	3.79E+01	45	<i>Mucor</i> sp.	2.27E+01	50	<i>Fusarium verticillioides</i>	2.27E+01	16
			<i>Aspergillus</i> sp.	4.55E+01	55	<i>Aspergillus</i> sp.	2.27E+01	50	<i>Mucor</i> sp.	3.03E+01	21
									<i>Aspergillus</i> sp.	9.10E+01	63
	Z	2	<i>Penicillium</i> sp.	2.00E+00	3	<i>Penicillium</i> sp.	3.00E+00	4	<i>Fusarium verticillioides</i>	2.00E+00	100
			<i>Rhizopus</i> sp.	1.00E+00	2	<i>Rhizopus</i> sp.	1.00E+00	1			
			<i>Aspergillus</i> sp.	6.00E+01	95	<i>Aspergillus</i> sp.	7.40E+01	95			
		5	<i>Mucor</i> sp.	1.70E+01	89	<i>Penicillium</i> sp.	1.00E+00	8	<i>Fusarium verticillioides</i>	1.20E+01	100
			<i>Aspergillus</i> sp.	2.00E+00	11	<i>Aspergillus</i> sp.	1.20E+01	92			
			<i>Mucor</i> sp.	1.00E+04	33						
	CAU	2	<i>Aspergillus</i> sp.	2.00E+04	67						
			<i>Cladosporium</i> sp.	1.00E+04	20	<i>Penicillium</i> sp.	5.00E+04	100	<i>Aspergillus</i> sp.	5.00E+04	100
			<i>Penicillium</i> sp.	2.00E+04	40						
		3	<i>Phoma</i> sp.	2.00E+04	40						
			<i>Alternaria</i> sp.	1.00E+04	2	<i>Mucor</i> sp.	1.50E+05	32	<i>Monascus ruber</i>	2.00E+04	6
			<i>Mucor</i> sp.	3.00E+04	7	<i>Aspergillus</i> sp.	3.20E+05	68	<i>Mucor</i> sp.	6.00E+04	19
	EDC	5	<i>Aspergillus</i> sp.	4.20E+05	91				<i>Paecilomyces</i> sp.	3.00E+04	10
									<i>Aspergillus</i> sp.	2.00E+05	65
		2									

Legenda: CAU – Camas Após Uso; EDC - *Electrostatic Dust Cloths*; R – Ração; Z – Zaragatoa

Apêndice VII: Diversidade e prevalência fúngica em meios suplementados com azóis

Tabela 11: Diversidade fúngica na triagem de azol por tipo de produção, em camas e rações (g/dia), esfregaços (UFC/m²), EDC (UFC/m²/dia¹)

Sistema de produção	Matriz	ID	SDA			ITZ			VCZ			PCZ		
			ID	CFU.m ² /day/g ¹	%	ID	CFU.m ² /day/g ¹	%	ID	CFU.m ² /day/g ¹	%	ID	CFU.m ² /day/g ¹	%
Intensiva	EDCT	4	<i>Aspergillus</i> sp.	5.01E-02	100									
		1	<i>Mucor</i> sp.	3.03E+01	80									
	EDC	4	<i>Penicillium</i> sp.	7.58E+00	20									
		1							<i>Geotrichum</i> sp.	1.70E+01	100	<i>Geotrichum</i> sp.	1.00E+00	100
	CAU	4	<i>Geotrichum</i> sp.	4.00E+00	80									
			<i>Rhizopus</i> sp.	1.00E+00	20									
Extensiva	R	4	<i>C. sitophila</i>	5.30E+01	100									
		2	<i>Mucor</i> sp.	1.52E+01	100									
		3	<i>Aspergillus</i> sp.	7.58E+00	100									
	EDC		<i>C. sitophila</i>	4.55E+01	35	<i>Mucor</i> sp.	1.52E+01	100						
		5	<i>Aspergillus</i> sp.	8.34E+01	65									
	CAU	2							<i>Mucor</i> sp.	5.00E+00	100			
		2	<i>Mucor</i> sp.	1.00E+00	100									
		3	<i>C. sitophila</i>	2.00E+00	100									
	R		<i>C. sitophila</i>	2.00E+00	100				<i>Mucor</i> sp.	1.40E+01		<i>C. sitophila</i>	1.00E+01	
		5							<i>Geotrichum</i> sp.	2.90E+01				

CFU, colony forming unit; EDC, Electrostatic dust collector; SDA, Sabouraud dextrose agar; ICZ, itraconazole-supplemented SDA; VCZ, voriconazole-supplemented SDA; PCZ, posaconazole-supplemented SDA.

Apêndice VIII: Índices de *Shannon* e *Simpson*

Tabela 12: Análise da biodiversidade: Índices de *Shannon* e *Simpson*

MEA			DG18			DG 18 37°C			SDA			VCZ		
Matriz ID	Índice de <i>Shanon</i> (H)	Índice de <i>Simpson</i> (D)	Matriz ID	Índice de <i>Shanon</i> (H)	Índice de <i>Simpson</i> (D)	Matriz ID	Índice de <i>Shanon</i> (H)	Índice de <i>Simpson</i> (D)	Matriz ID	Índice de <i>Shanon</i> (H)	Índice de <i>Simpson</i> (D)	Matriz ID	Índice de <i>Shanon</i> (H)	Índice de <i>Simpson</i> (D)
EDCT 1	0,50	1,47	EDC 5	0,69	2,00	EDC 5	0,91	2,14	CAU 4	0,50	1,47	R 5	1	2,47
EDCT 4	0,95	2,27	EDC 4	0,60	2,90	EDC 4	0,91	2,10	EDC 5	0,56	1,60			
EDC 5	0,69	1,98	EDC 3	0,69	2,00	EDC 1	0,66	1,88						
EDC 4	0,83	1,91	EDC 2	0,64	1,46	CAU 1	0,67	1,92						
EDC 3	***	***	EDC 1	0,29	1,18	R 1	1,04	2,67						
EDC 2	0,31	1,21	CAU 1	0,81	2,37	Z 1	0,22	1,12						
EDC 1	0,74	1,71	CAU 4	1,08	2,88	Z 4	0,44	1,36						
CAU 1	1,04	2,71	R 5	0,27	1,17	Z 5	1,00	2,14						
CAU 2	0,64	1,80	R 4	1,04	2,25									
CAU 4	***	***	R 2	0,25	1,12									
R 5	0,60	2,30	R 1	1,07	2,32									
R 4	***	***	Z 1	0,70	1,12									
R 2	0,26	1,13	Z 4	0,80	1,12									
R 1	1,04	2,00	Z 5	0,63	1,12									
R 2	***	***												
Z 1	0,94	1,94												
Z 2	0,64	1,80												
Z 3	1,05	2,78												
Z 4	1,07	2,06												
Z 5	0,34	1,19												

Apêndice IX: MRSA

Tabela 13: Detecção de amostras suspeitas de MRSA em EDC e EDCT

ID	Matriz	Local	CFU	CFU/m²	Cor	ID	
1	EDCT	Trabalhador	28	100,90	azul	S. aureus	
			70	252,25	branco	NA	
			8	28,83	cinzento	NA	
			2	7,21	bege	NA	
			22	79,28	Rosa	Suspeita MRSA	
4			53	190,99	azul	S. aureus	
15			54,05	branco	NA		
7			25,23	cinzento	NA		
1			3,60	bege	NA		
4			EDC	Estábulo	Inconclusivo (Inc)		azul
	Inc			branco			
3	43	154,954955		Azul			
	Estábulo	22		79,27927928	Branco		
4		Inc			Azul		
	Sala de Ordenha	Inc			Branco		
		2		7,207207207	Branca		
1		Inc			Azul		
	Estábulo	Inc			Branco		
		5		18,01801802	Rosa	Suspeita MRSA	
1		Sala de Ordenha		Inc	Azul		
		Inc			Branco		
		1		3,603603604	Branca		
2		Estábulo		Inc	Azul		
		Inc			Branco		
		15		54,05405405	Rosa	Suspeita MRSA	
5		Estábulo fechado		Inc	Azul		
				Inc	Branco		
				10	36,03603604	Branca	
4		Vestiário		Inc	Azul		
			Inc	Branco			
5			Inc	Azul			
		Estábulo aberto	Inc	Branco			

Apêndice X: Estudo da relação de variáveis

Tabela 14: Estudo da relação da contaminação bacteriana, fúngica e resistência fúngica com a frequência de higienização e de utilização de antibióticos e antifúngicos. Resultados do coeficiente de correlação de *Spearman*

	Frequência de higienização dos utensílios	Frequência de higienização de bebedouros	Frequência de higienização de comedouros	Frequência de higienização de outros (salas de ordenha, entre outros)	Frequência de utilização de antibióticos	Frequência de utilização de antifúngicos
<i>TSA_CFU.m²</i>	0,081	-0,040	-0,054		-0,025	0,186
<i>VRBA_CFU.m²</i>	0,278	0,099	0,112		-0,006	-0,266
<i>MAC_CFU.m²</i>	0,204	0,057	0,055		-0,028	-0,078
<i>MEA_CFU.m²</i>	0,173	-0,043	0,057		-0,058	-0,021
<i>DG18_CFU.m²</i>	0,166	0,034	0,067		-0,096	0,036
<i>DG18 37°C_CFU.m²</i>	0,257	-0,073	0,008		0,068	-0,162
<i>SDA_CFU.m²</i>	0,202	0,062	0,112		-0,267	0,299
<i>ITZ_CFU.m²</i>	,406*	0,188	0,196		-0,181	-0,104
<i>VCZ_CFU.m²</i>	0,195	0,022	0,122		-0,056	-0,193
<i>PCZ_CFU.m²</i>	-0,107	-0,134	-0,155		0,228	-0,104
Frequência de higienização dos utensílios	1,000	1,000**	1,000**		-,787**	-,450**
Frequência de higienização de bebedouros	1,000**	1,000	,977**		-,859**	-,513**
Frequência de higienização de comedouros	1,000**	,977**	1,000		-,918**	-,562**
Frequência de higienização de outros (salas de ordenha, entre outros)						
Frequência de utilização de antibióticos	-,787**	-,859**	-,918**		1,000	0,188

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed). * . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed)

Tabela 15: Estudo da relação da contaminação bacteriana, fúngica e resistência fúngica com o tipo de produção e sistema de exploração. Resultados do teste de *Mann-Whitney U*

		Tipo de produção	N	Ordens		Estatística de teste	
				Média das ordens	Soma das ordens	Mann-Whitney U	p
Bactérias	TSA_CFU.m²	Leite	29	26,67	773,50	299,500	0,703
		Carne	22	25,11	552,50		
		Total	51				
	VRBA_CFU.m²	Leite	29	24,57	712,50	277,500	0,428
		Carne	22	27,89	613,50		
		Total	51				
	MAC_CFU.m²	Leite	29	25,31	734,00	299,000	0,698
		Carne	22	26,91	592,00		
		Total	51				
Fungos	MEA_CFU.m²	Leite	29	25,28	733,00	298,000	0,687
		Carne	22	26,95	593,00		
		Total	51				
	DG18_CFU.m²	Leite	29	25,17	730,00	295,000	0,638
		Carne	22	27,09	596,00		
		Total	51				
	DG18 37°C_CFU.m²	Leite	29	25,91	751,50	316,500	0,961
		Carne	22	26,11	574,50		
		Total	51				
Resistência Fúngica	SDA_CFU.m²	Leite	19	16,61	315,50	125,500	0,521
		Carne	15	18,63	279,50		
		Total	34				
	ITZ_CFU.m²	Leite	19	17,00	323,00	133,000	0,260
		Carne	15	18,13	272,00		
		Total	34				
	VCZ_CFU.m²	Leite	18	16,47	296,50	125,500	0,491
		Carne	15	17,63	264,50		
		Total	33				
PCZ_CFU.m²	Leite	19	17,89	340,00	135,000	0,374	
	Carne	15	17,00	255,00			
	Total	34					

Tabela 16: Estudo da relação entre contaminação bacteriana, fúngica e resistência fúngica. Resultados do coeficiente de correlação de Spearman

		VRBA_C FU.m ²	MAC_C FU.m ²	MEA_C FU.m ²	DG18_C FU.m ²	DG18 37°C_C FU.m ²	SDA_C FU.m ²	ITZ_CF U.m ²	VCZ_CF U.m ²	PCZ_CF U.m ²
EDC	TSA_CFU.m ²	0,100	0,254	-0,033	0,034	0,176	-0,026	-0,411		
	VRBA_CFU.m ²		,672*	0,059	-0,449	0,329	0,549	0,138		
	MAC_CFU.m ²			0,288	-0,554	0,521	0,443	0,557		
	MEA_CFU.m ²				0,332	0,664	0,513	0,548		
	DG18_CFU.m ²					0,335	-0,013	-0,420		
	DG18						0,293	0,276		
	37°C_CFU.m ²							0,211		
	SDA_CFU.m ²									
Camas	ITZ_CFU.m ²									
	VCZ_CFU.m ²									
	TSA_CFU.m ²									
	VRBA_CFU.m ²		0,718	0,514	-0,169	0,435	-0,500		0,000	0,000
	MAC_CFU.m ²			0,647	-0,213	0,688	-0,575		0,323	-0,139
	MEA_CFU.m ²			1,000	-0,058	0,672	-0,566		0,377	0,133
	DG18_CFU.m ²			-0,058	1,000	-0,618	-0,338		-0,439	-0,393
	DG18			0,672	-0,618	1,000	-0,470		,836*	0,539
Ração	37°C_CFU.m ²			-0,566	-0,338	-0,470	1,000		-0,480	-0,310
	SDA_CFU.m ²									
	ITZ_CFU.m ²									
	VCZ_CFU.m ²									0,775
	TSA_CFU.m ²	,554*	,599*	-0,196	0,234	0,051	0,360		0,269	
	VRBA_CFU.m ²		,920**	-0,068	0,293	0,405	0,029		0,424	
	MAC_CFU.m ²			0,033	0,403	0,365	-0,005		0,211	
	MEA_CFU.m ²				,591*	,573*	-0,089		-0,216	
Zaragatoa	DG18_CFU.m ²					0,283	0,006		-0,240	
	DG18						-0,030		0,462	
	37°C_CFU.m ²								0,295	
	SDA_CFU.m ²									
	ITZ_CFU.m ²									
	VCZ_CFU.m ²									
	TSA_CFU.m ²	-0,311	-0,275	0,164	-0,076	-0,388				
	VRBA_CFU.m ²		,743**	0,245	0,049	0,160				
	MAC_CFU.m ²			0,183	-0,019	-0,105				
	MEA_CFU.m ²				-0,121	-0,141				
	DG18_CFU.m ²					0,184				
	DG18									
	37°C_CFU.m ²									
	SDA_CFU.m ²									
	ITZ_CFU.m ²									
	VCZ_CFU.m ²									

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).