JOSÉ AUGUSTO FERRONATTO

**Impacto da oclusão do canal do teto no perfil metagenômico e seu
reflexo na saúde da glândula mamária bovina**

São Paulo

2021

JOSÉ AUGUSTO FERRONATTO

Impacto da oclusão do canal do teto no perfil metagenômico e seu reflexo na saúde da glândula mamária bovina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientadora:

Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva
Della Libera

Coorientadores:

Dr. Fernando Nogueira de Souza
Dr. Márcio Carvalho da Costa

São Paulo

2021

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4055
FMVZ

Ferronato, José Augusto
Impacto da oclusão do canal do teto no perfil metagenômico e seu reflexo na saúde da glândula mamária bovina / José Augusto Ferronato. – 2021.
145 f. ; il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2021.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientadora: Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera.

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Nogueira de Souza.

Prof. Dr. Marcio Carvalho da Costa.

1. Mastite. 2. Microbioma. 3. Saúde da Glândula Mamária. 4. Secreção colostrar. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Maria Aparecida Laet, CRB 5673-8, da FMVZ/USP.

Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Impacto da oclusão do canal do teto no perfil metagenômico e seus reflexos na saúde da glândula mamária bovina", protocolada sob o CEUA nº 7293280218 (ID 007336), sob a responsabilidade de **Alice Maria Melville Paiva Della Libera e equipe; José Augusto Ferronato** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 17/12/2019.

We certify that the proposal "Impact of the ceiling canal occlusion on the metagenomic profile and its reflexes on the health of the bovine mammary gland", utilizing 43 Bovines (43 females), protocol number CEUA 7293280218 (ID 007336), under the responsibility of **Alice Maria Melville Paiva Della Libera and team; José Augusto Ferronato** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 12/17/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **01/2018** a **01/2020**

Área: **Clínica Médica Veterinária**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **12 a 40 meses**

N: **43**

Linhagem: **Holandesas**

Peso: **200 a 550 kg**

Local do experimento: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo - Campus da Capital e Campus de Pirassununga

São Paulo, 22 de março de 2021

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Impacto da Oclusão do Canal do Teto no Perfil Metagenômico e seu Reflexo na Saúde da Glândula Mamária Bovina", protocolada sob o CEUA nº 2214240619, sob a responsabilidade de **Alessandro de Sá Guimarães e equipe; José Augusto Ferronato; Kamila Reis Santos; Fernando Nogueira de Souza** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Gado de Leite (CEUA/EGL) na reunião de 11/09/2019.

We certify that the proposal "Impact of occlusion of teat duct the metagenomic profile and its reflex in health of the bovine mammary gland", utilizing 34 Bovines (34 females), protocol number CEUA 2214240619, under the responsibility of **Alessandro de Sá Guimarães and team; José Augusto Ferronato; Kamila Reis Santos; Fernando Nogueira de Souza** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Embrapa Gado de Leite Corporate (CEUA/EGL) in the meeting of 09/11/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **10/2019** a **12/2019**

Área: **Núcleo de Saúde Animal E Qualidade do Leite**

Origem:	Campo Experimental José Henrique Bruschi		
Espécie:	Bovinos	sexo:	Fêmeas
		idade:	2 a 6 anos
		N:	12
Linhagem:	Holandesa e misto	Peso:	300 a 500 kg
Origem:	Campo Experimental José Henrique Bruschi		
Espécie:	Bovinos	sexo:	Fêmeas
		idade:	1 a 2 anos
		N:	16
Linhagem:	Holandesa e misto	Peso:	200 a 400 kg
Origem:	Campo Experimental José Henrique Bruschi		
Espécie:	Bovinos	sexo:	Fêmeas
		idade:	1 a 2 anos
		N:	6
Linhagem:	Holandesa e misto	Peso:	100 a 200 kg

Local do experimento: Campo Experimental Jose Henrique Bruschi

Juiz de Fora, 17 de setembro de 2019

Dra. Letícia Sayuri Suzuki
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Embrapa Gado de Leite

Virginia de Souza Columbiano Barbosa
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Embrapa Gado de Leite

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: FERRONATTO, José Augusto

Título: **Impacto da oclusão do canal do teto no perfil metagenômico e seu reflexo na saúde da glândula mamária bovina**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Eu dedico essa dissertação aos mestres e amigos,
Fernando Nogueira e Alice Della Libera.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer inicialmente a Deus, por me guiar por esse caminho maravilhoso e desafiador que foi a pós-graduação e por ter me presenteado com pessoas tão especiais caminhando ao meu lado.

Agradeço ao meu pai, Edmilson, por suportar todas as dificuldades, as quais com muito esforço e dedicação conseguimos ultrapassá-las, agradeço ainda pela educação dada e por todo apoio.

Agradeço em especial a minha mãe, Helga. Acredito que a pandemia tenha impactado muito na vida das pessoas ao redor do mundo, a nossa não foi diferente. Algumas decisões são difíceis de serem tomadas, uma mistura de sensações e emoções afloram e nos questionamos se estamos certos ou não. Que montanha russa nós vivemos! Eu tenho muito orgulho de ser seu filho, de ter você do meu lado, de ver seu crescimento e sua força. Só quem acompanhou nossa luta de perto sabe por tudo que passamos e compartilhamos, lembro-me dos momentos de desespero, do choro e da angústia, de dois desesperados e inconformados se apoiando com medo de tudo que ainda estava por vir, de todo o serviço e do cansaço. Mas também me lembro de toda troca, do fortalecimento da nossa relação, da nossa aproximação depois de 10 anos que eu saí de casa, lembro-me de cada riso seu, do orgulho sentido pelo seu crescimento e empoderamento. Mãe, eu lembro de tudo, eu te amo. Obrigado por ser esse meu exemplo de mulher guerreira, determinada, e por tudo que me ensinou se hoje sou o que sou, é apenas um reflexo do que você sempre foi.

As minhas irmãs Carla e Thais, que sempre me incentivaram, me encorajaram, e sem dúvida, ambas têm participação nessa conquista. Aos meus avós Alcides (*in memoriam*) e Terezinha, que a cada volta pra casa era uma alegria sem fim, repleta de bons risos e um carinho imensurável. Ao meu avô Otto (*in memoriam*) pelos bons momentos compartilhados. A minha avó por consideração, Hildegath Buchriegler, por me incentivar, aconselhar e apoiar em todos os momentos.

Agradeço ainda as minhas amigas, Ediane Oliveira, Juliete Gonçalves, Karine Natter e Samara Zanella, vocês foram meu porto seguro durante toda essa

montanha russa de emoções, sempre me dando apoio e palavras de conforto. Sou grato por tudo.

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Alice Della Libera simplesmente por ser quem é uma orientadora sem igual, mãezona, conselheira, amiga, e acima de tudo humana. Grato por tanta troca durante esses anos de pós-graduação. Grato pela equipe incrível que você formou, na qual impôs princípios como: bondade, generosidade, verdade e respeito, os quais foram fundamentais para a boa relação e convívio de todos. Tenho muito orgulho de olhar pra trás e ver o quanto cresci ao seu lado, foram tantos desafios, momentos de choro, dificuldades, apesar de tudo, você sempre estava lá, com os planos A, B, C e D, dizendo: “não deixa a peteca cair” ou ainda: “somos *drag* de rodinhas! Transveste a *drag*, sobe nos patins e vamos lá” eu simplesmente amo. Por mais que as dificuldades estavam presentes, nunca nos faltou o riso, as palavras de alto impacto do seu vocabulário maravilhoso, as brincadeiras, e muito carinho, as palavras de conforto nos momentos difíceis e o seu bom humor incomparável. Te admiro pela pessoa forte que és, fico feliz que os astros tenham permitido que nos cruzássemos novamente nessa vida terrestre.

Agradeço ainda ao meu coorientador Prof. Dr. Fernando Nogueira, por ter acreditado em mim, por vezes que até eu duvidei. Por ser esse ser tão incrível, inteligente e inspirador. Obrigado por acreditar em mim desde o nosso primeiro encontro, lá em 2016, quando tudo ainda era muito incerto pra mim. Sempre me guiou nos melhores caminhos (às vezes turbulentos? Às vezes não, SEMPRE turbulentos, e com muita emoção, mas se fosse diferente não seria tão bom), obrigado por nossa amizade, por todas as palavras de carinho e conforto, por todos os puxões de orelha, sempre me motivando a buscar pelos meus anseios. Você tem uma parcela de culpa gigantesca na conclusão desse mestrado, e eu sou grato demais por isso. A viagem para Cancun vem!

Agradeço a Dra. Maiara Garcia Blagitz, a responsável por me apresentar a USP e a equipe incrível da qual faço parte. Ma, a gente não fazia ideia que aquela possibilidade de análise das suas amostras culminaria com a passagem de seu aluno, para seu colega de equipe. Obrigado por ter me dado essa oportunidade, sou extremamente grato por isso.

Agradeço ainda a minha amiga e colega de equipe Kamila Reis, pessoa de um astral incrível e de bom coração, que tem a melhor risada desse mundo. Ka, obrigado por todos os momentos compartilhados, por todas as risadas, pela amizade que construímos (quando achava que éramos amigos, lá vinha você: migo, vai ter uma prova, chama *Bravus*, quer fazer? Eu prontamente aceitava, e então entendia que você não gostava de mim. haha). Obrigado pelo apoio, companheirismo, pela parceria dos eventos e viagens, e por ser tão paciente comigo. Te admiro muito.

Agradeço a Camila Freitas Batista, minha amiga e colega de equipe. Cá, obrigado por você ser você, sempre tão simples, engraçada, inteligente e muito necessária na vida de todos. Que possamos compartilhar muitos momentos juntos ainda, os amados experimentos noturnos, as várias discussões polêmicas que sempre são pautas, e a comilança, porque o dia que a Ca vem, a gente organiza aquele *break*, com queijos e torradas que só você e a Alice sabem fazer. Tenho muito orgulho de ter você ao meu lado. E lembra que o *Spitz* vem.

Agradeço ainda a irmã caçula que a equipe me deu, Raysa Brenda Marques. Só tenho a agradecer por toda ajuda que você sempre me deu, seja no laboratório, seja nas suas edições incríveis. Espero que possamos compartilhar muito mais dos momentos de alegria, conversa e troca. Quero ouvir você falando: “Égua, mano!” por muito tempo ainda.

Agradeço ao Prof. Dr. Márcio Costa, grande incentivador desse trabalho. Obrigado por todas as discussões e trocas de experiência, seu apoio foi essencial para a conclusão desse trabalho.

Agradeço aos amigos somados no período de pós-graduação, em especial a Carolina dos Anjos e a Sarah Oliveira, obrigado por todos os momentos que passamos juntos, por tornarem essa jornada mais leve e divertida. Obrigada por me ouvirem, me apoiarem, e por sempre me aconselharem sobre os assuntos mais diversos (eu nunca acatei, mas foi importante). Espero que a gente possa trocar muito mais momentos como estes. Vocês são incríveis.

Agradeço ao Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann, por todas as conversas, as risadas, toda a preocupação com a realização do meu mestrado, por me chamar na sua sala e dizer: “José, nós precisamos de um plano B, não vai dar tempo”. Obrigado por todo carinho e por disponibilizar o laboratório em todas as vezes que

precisei. Agradeço também a Gisele e ao Antônio, por todo apoio, ajuda e pelos muitos risos que compartilhamos durante os anos. A ajuda de vocês sempre foi essencial e necessária, grato por tudo.

Agradeço ao Dr. Alessandro de Sá Guimarães, meu supervisor no campo experimental e um dos grandes responsáveis por conseguirmos desenvolver esse projeto. Grato por todo seu apoio, auxílio e preocupação, sem dúvidas sem a sua colaboração não teríamos conseguido finalizar esse processo. Agradeço ainda as Dra. Carla Lange e Dra. Wanessa Carvalho, por possibilitarem o uso do laboratório, bem como, auxílio durante todo período que estive presente. Ainda, no núcleo do campo experimental, não poderia deixar de agradecer aos meus amigos feitos durante o período, Wanessa Teixeira, Lavinea Motta, Bianca Albuquerque, Vanessa Cominato, Luana Gregolin e Allison Queiroz. Obrigado por todo apoio, vocês foram essenciais na coleta de amostras, além, é claro, essenciais por dias de muita alegria, conversas, trocas e muito carinho. Obrigado por tudo.

Agradeço ao Dr. Eduardo Ramos Sanchez, por toda ajuda apoio e ensinamentos trocados durante esse período. Edu, você foi parte crucial nas decisões tomadas nesse trabalho, merece todo meu respeito e admiração. Foram sábados, domingos e feriados, discutindo e testando quais eram as melhores soluções. Obrigado por tudo.

No desafio de sequenciar as amostras do projeto, me deparei com uma equipe incrível, onde pude conhecer o Caio Munhoz, a Camila Moreira e o Paulo Ribolla. Vocês foram insuperáveis durante todos os longos meses de contato, sempre agindo para obtenção de melhores resultados, foram inúmeros testes, re-testes e reuniões com muita frequência. Foi um contato e um carinho com esses dados sem igual. Obrigado a toda equipe por todo suporte nesse período.

Durante esse processo ainda agradeço ao Diego Lisboa e ao Felipe Sant'Anna, que me auxiliaram muito com as análises de bioinformática, bem como, com a interpretação de todas as informações. Grato por todos os momentos, reuniões, discussões, e mais reuniões. Vocês foram fundamentais a esse processo.

Por fim e não menos importante, agradeço as minhas *roommates* Natali Schillemer, Natália Cesnik e Thais Poltronieri, vocês foram essenciais durante esse processo, obrigado por tanto carinho, conversas, festas, conselhos e pela amizade

de cada uma de vocês. Agradeço também a amiga Anna Ketlin Danker, por toda amizade e carinho trocados nesse período, você com toda certeza foi essencial durante essa fase, dona de um bom humor incrível, parceira de todos os momentos. Te admiro muito e sou grato por toda nossa troca. Agradeço também aos demais colegas que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

O presente trabalho foi desenvolvido com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), bolsa de mestrado, número do processo: 2018/03685-8; auxílio pesquisa, número do processo: 2018/04530-8. Bem como, com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

“Quem come do fruto do conhecimento, é sempre expulso de algum paraíso.”

Melanie Klein

RESUMO

FERRONATTO, J.A. **Impacto da oclusão do canal do teto no perfil metagenômico e seu reflexo na saúde da glândula mamária bovina**. 2021. 145. f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

O presente estudo objetivou avaliar a microbiota da glândula mamária bovina por sequenciamento de alto rendimento de amostras de leite e seu potencial reflexo na saúde da glândula mamária. Para tal, o estudo foi dividido em três eixos: 1) avaliação das comunidades bacterianas totais e viáveis de amostras de leite assepticamente coletadas; 2) comunidades bacterianas viáveis presentes no leite coletado do canal do teto por método recomendado pelo *National Mastitis Council*, e por emprego de cânula, assim como diretamente da cisterna da glândula mamária e alvéolo mamário; e 3) impacto da oclusão do canal do teto no período pré-parto em vacas nulíparas sobre as comunidades bacterianas viáveis do leite, e seu reflexo sobre a saúde da glândula mamária no primeiro mês de lactação. No primeiro estudo, foi possível identificar redução de 32,23% no número de unidades taxonômicas operacionais (OTU) de comunidades bacterianas viáveis em relação a comunidades bacterianas totais, devido à redução na abundância e número de *Corynebacterium*-OTU, *Rubrobacter*-OTU, *Pseudomonas*-OTU e *Wolbachia*-OTU, apesar do aumento na abundância e do número de *Bacillus*-OTU. No segundo estudo, foi possível observar maior número de OTU com a coleta tradicional do que a realizada com emprego de cânula, diretamente da cisterna da glândula mamária, e diretamente da porção alveolar, embora menor abundância de *Prevotella*-OTU tenha sido observada na coleta tradicional em comparação com as demais. Finalmente, observou-se que as amostras de colostro oriundas de tetos considerados fechados resultaram em maior número de OTU, assim como maior número e abundância de *Corynebacterium*-OTU. As amostras de colostro que apresentaram resultados negativos no exame microbiológico tiveram maior abundância de *Bacillus*-OTU. Ademais, quartos mamários com baixa contagem de células somáticas foram associados à maior abundância de *Prevotella*-OTU, enquanto maior número de

Staphylococcus-OTU e *Streptococcus*-OTU foram associados à alta contagem de células somáticas. Portanto, o presente estudo demonstrou que a coleta tradicional total pode impactar os resultados da microbiota viável de amostras de leite, levando a interpretações equivocadas. Consequente, é fundamental que o método de coleta e o uso de monoazida de propídio sejam considerados nos estudos de comunidades bacterianas viáveis da glândula mamária. Finalmente, nossos achados apontaram que o microbioma presente no período pré-parto pode afetar a saúde da glândula mamária bovina, com potencial efeito benéfico de bactérias do gênero *Prevotella*.

Palavras-chave: Mastite. Microbioma. Saúde da Glândula Mamária. Secreção colostrar

ABSTRACT

FERRONATTO, J.A. **Impact of teat canal closure on the metagenomics profile of bacterial communities and its effect on udder health**. 2021. 145. f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

The present study aimed to evaluate the microbiota of the bovine mammary gland using high-throughput sequencing analysis of milk samples and assess their potential impact on the udder health. Thus, the study was divided into three axes: 1) determine the total and viable bacterial communities of aseptically collected milk samples; 2) evaluate the viable bacterial communities present in the milk collected from the teat canal as recommended by the National Mastitis Council or using a cannula, as well as, directly from the mammary gland cistern and mammary alveolus; and 3) the impact of the teat end occlusion in the prepartum period in nulliparous cows on viable bacterial communities of milk, and its impact on the udder health in the first month of lactation. In the first study, it was possible to identify that there was a reduction of 32.23% in the number of operational taxonomic units (OTUs) of viable bacterial communities in relation to total bacterial communities, due to the reduction in the abundance and number of *Corynebacterium*-OTUs, *Rubrobacter*-OTUs, *Pseudomonas*-OTUs and *Wolbachia*-OTUs, despite an increase in abundance and the number of *Bacillus*-OTUs. In the second study, it is possible to observe a greater number of OTUs in milk samples originated from traditional collection than those collected using a cannula, directly from the mammary gland cistern, and directly from the alveolus, although a lower abundance of *Prevotella*-OTUs was observed in the traditional collection in compared to the others. Finally, it was observed that the colostrum samples from teat ends considered closed resulted in a greater number of OTUs, as well as a greater number and abundance of *Corynebacterium*-OTUs. Colostrum samples with bacteriological negative results in the microbiological examination had a greater abundance of *Bacillus*-OTUs. Furthermore, udder quarters with low somatic cell count were associated with a greater abundance of *Prevotella*-OTUs, while a greater number of *Staphylococcus*-OTUs and *Streptococcus*-OTUs

were associated with a high somatic cell count. Therefore, the present study demonstrated that the total traditional collection can profoundly impact the results of the viable microbiota of milk samples, leading to misinterpretations, and consequently, it is essential to consider the milk sampling collection method and the use of propidium monoazide in bovine mammary gland studies of viable bacterial communities. Finally, our findings pointed out that the microbiome of the pre-partum period can affect the udder health, with the potential beneficial effect of bacteria of the *Prevotella* bacteria genus.

Keywords: Mastitis. Microbiome. Udder Health. Colostral secretion.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Unidades taxonômicas operacionais (OTU) e abundância relativa das comunidades bacterianas total (PMA-) e viável (PMA+) identificadas em amostras de leite bovino. PMA: monoazida de propídio.50
- Figura 2. Comparação dos microrganismos mais abundantes nas amostras viáveis e totais de leite bovino assepticamente coletado, apresentado em escala de log2.52
- Figura 3 Representação da abundância total de unidades taxonômicas operacionais (OTU) em amostras viáveis e totais de leite bovino assepticamente coletadas.52
- Figura 4. Representação das unidades taxonômicas operacionais (OTU) mais prevalentes em amostras viáveis e totais de leite bovino assepticamente coletadas.53
- Figura 5. Comparação das unidades taxonômicas operacionais (OTU) de comunidades bacterianas totais e viáveis (após tratamento com monoazida de propídio) em amostras de leite assepticamente coletadas ** indica $P = 0,004$54
- Figura 6. Valor absoluto (OTU mL⁻¹) de unidades taxonômica operacionais e abundância (%) de microrganismos viáveis e totais em amostras de leite assepticamente coletadas de vacas leiterias no início da lactação (DEL = 15 dias). 55
- Figura 7. Representação da coleta de leite através do método tradicional, conforme recomendado pelo *National Mastitis Council* (NMC).70
- Figura 8. Representação da coleta de leite através da utilização da cânula intramamária71
- Figura 9. Representação da coleta de leite através do método de punção da cisterna da glândula mamária bovina.72

Figura 10. Unidades taxonômicas operacionais (OTU) e abundância relativa das comunidades bacterianas entre as diferentes técnicas de coletas: 1) coleta tradicional de leite conforme recomendado pelo *National Mastitis Council*; 2) coleta de leite com emprego de uma cânula; 3) coleta de leite diretamente da cisterna da glândula mamária; 4) coleta de leite diretamente da porção alveolar da glândula mamária.80

Figura 11. Comparação dos microrganismos mais abundantes nas amostras coletadas pelo método tradicional x cânula de leite bovino, apresentado em escala de log2.81

Figura 12. Comparação dos microrganismos mais abundantes nas amostras coletadas pelo método tradicional x cisterna de leite bovino, apresentado em escala de log2.82

Figura 13. Comparação dos microrganismos mais abundantes nas amostras coletadas pelo método tradicional x alvéolo de leite bovino, apresentado em escala de log2.83

Figura 14. Comparação dos microrganismos mais abundantes nas amostras coletadas pelo método cânula x cisterna de leite bovino, apresentado em escala de log2.83

Figura 15. Comparação dos microrganismos mais abundantes nas amostras coletadas pelo método cânula x alvéolo de leite bovino, apresentado em escala de log2.84

Figura 16. Comparação dos microrganismos mais abundantes nas amostras coletadas pelo método cisterna x alvéolo de leite bovino, apresentado em escala de log2.84

Figura 17. Representação da abundância total de unidades taxonômicas operacionais (OTU) em amostras de leite bovino coletado por diferentes métodos: 1) coleta tradicional de leite conforme recomendado pelo *National Mastitis Council*; 2) coleta de leite com emprego de uma cânula; 3) coleta de leite diretamente da cisterna da glândula mamária; 4) coleta de leite diretamente da porção alveolar da glândula mamária.....85

Figura 18. Representação das unidades taxonômicas operacionais (OTU) mais prevalentes em amostras de leite bovino coletados por diferentes métodos: 1) coleta tradicional de leite conforme recomendado pelo *National Mastitis Council*; 2) coleta de leite com emprego de uma cânula; 3) coleta de leite diretamente da cisterna da glândula mamária; 4) coleta de leite diretamente da porção alveolar da glândula mamária.86

Figura 19. Comparação das unidades taxonômicas operacionais (OTU) por diferentes métodos de coleta: 1) coleta tradicional de leite conforme recomendado pelo *National Mastitis Council*; 2) coleta de leite com emprego de uma cânula; 3) coleta de leite diretamente da cisterna da glândula mamária; 4) coleta de leite diretamente da porção alveolar da glândula mamária.....86

Figura 20. Valor absoluto (OTU mL⁻¹) de unidades taxonômicas operacionais e abundância (%) de microrganismos identificados por meio de diferentes métodos de coleta: 1) coleta tradicional de leite conforme recomendado pelo *National Mastitis Council*; 2) coleta de leite com emprego de uma cânula; 3) coleta de leite diretamente da cisterna da glândula mamária; 4) coleta de leite diretamente da porção alveolar da glândula mamária.88

Figura 21. Unidades taxonômicas operacionais (OTU) e abundância relativa das comunidades bacterianas identificadas em amostras de secreção colostrar no período pré-parto de novilhas..... 112

Figura 22. Representação da abundância relativa de unidades taxonômicas operacionais (OTU) de todas as comunidades bacterianas em amostras de secreções colostrais bovina assepticamente coletadas.113

Figura 23. Representação da abundância relativa das unidades taxonômicas operacionais (OTU) das comunidades bacterianas mais abundantes em amostras de secreções colostrais bovina assepticamente coletadas.115

Figura 24. Valor absoluto de unidades taxonômica operacionais (OTU mL⁻¹) de *Acinetobacter* e *Corynebacterium*-OTU e abundância (%) de *Corynebacterium*-OTU identificados em secreção colostrar de tetos considerados abertos e fechados no período pré-parto em novilhas.....116

Figura 25. Valor de abundância (%) de *Bacillus* sp. identificado em amostras de leite assepticamente coletadas com resultados positivos ou negativos no exame microbiológico nos primeiros 30 dias de lactação.116

Figura 26. Valor absoluto de unidades taxonômica operacionais (OTU mL⁻¹) de *Staphylococcus*-OTU e *Streptococcus*–OTU, e abundância (%) de *Prevotella*-OTU identificados em relação a alta (acima de 100.000) e baixa (abaixo de 100.000) média geométrica de células somáticas (CCS) no período pós-parto (30 dias) em novilhas.117

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. OBJETIVOS	28
3. REVISÃO DE LITERATURA	29
4. CAPÍTULO 1. DETERMINAÇÃO DE BACTÉRIAS TOTAIS <i>VERSUS</i> VIÁVEIS NO LEITE BOVINO	38
4.1 INTRODUÇÃO	40
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	42
4.2.1 Animais	42
4.2.2 Análise metataxogenômica	44
4.2.3 Reação da cadeia polimerase quantitativa em tempo real (qPCR)	48
4.3 RESULTADOS	50
4.4 DISCUSSÃO	57
4.5 CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
5. CAPÍTULO 2 – A Glândula Mamária BOVINA É estéril? Em QUE NÍVEL?	64
5.1 INTRODUÇÃO	66
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	69
5.2.1 Animais	69

4.2.2 Análise metataxogenômica	74
4.2.3 Reação da cadeia polimerase quantitativa em tempo real (qPCR)	77
5.3 RESULTADOS.....	80
5.4 DISCUSSÃO	89
5.5 CONCLUSÃO	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
 CAPÍTULO 3 - IMPACTO DA OCLUSÃO DO CANAL DO TETO E DAS INFECÇÕES INTRAMAMÁRIAS SOBRE O MICROBIOMA DA SECREÇÃO COLOSTRAL NO PERÍODO PRÉ-PARTO EM NOVILHAS E SEU REFLEXO NA SAÚDE DA GLÂNDULA MAMÁRIA NO PRIMEIRO MÊS DE LACTAÇÃO.....	96
6.1 INTRODUÇÃO	100
6.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	104
6.2.1 Animais	104
4.2.2 Análise metataxogenômica	107
4.2.3 Reação da cadeia polimerase quantitativa em tempo real (qPCR)	110
6.3 RESULTADOS.....	112
6.4 DISCUSSÃO	119
6.5 CONCLUSÃO	121
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	122
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS – INTRODUÇÃO & REVISÃO	126
APÊNDICES	132

1. INTRODUÇÃO

Recentemente, o estudo do microbioma, no qual se investiga a população de microrganismos em um determinado ambiente, tem se destacado no campo da pesquisa básica e aplicada com o avanço de técnicas moleculares (Taponen *et al.*, 2019; Dahlberg *et al.*, 2020; Parente *et al.*, 2020; Porcellato *et al.*, 2020). O motivo pelo qual se busca estudar as populações microbianas presentes em um determinado ambiente é o fato de que alguns microrganismos são responsáveis por promover a saúde, em contraste com outros que estão relacionados ao desenvolvimento de determinadas doenças (Cho & Blaser, 2012; Metzger *et al.*, 2018; Taponen *et al.*, 2019).

Acredita-se que as infecções intramamárias em bovinos são decorrentes da entrada de patógenos causadores de mastite pelo orifício do canal do teto, e, portanto, a glândula mamária é considerada um órgão estéril (Rainard, 2017; Metzger *et al.*, 2018). Este fato é fortemente corroborado pelo sucesso do programa de controle de mastite implementado em vários rebanhos baseado atualmente nos 10 pontos de controle desta doença preconizados pelo *National Mastitis Council* (NMC), que possibilitou o controle efetivo da mastite bovina em vários rebanhos que implementaram adequadamente tais medidas de controle levando a redução expressiva de casos de mastite contagiosa e ambiental (Rainard, 2017).

Contudo, alguns estudos que utilizaram métodos moleculares sugerem que a glândula mamária possui uma microbiota própria (Addis *et al.*, 2016; Friman *et al.*, 2017; Lima *et al.*, 2017; Andrews *et al.*, 2019; Hoque *et al.*, 2020; Oikonomou *et al.*, 2020), e que este órgão não seria estéril. Se provado esse fato, levaria a uma quebra de paradigma, o que colocaria a mastite como uma doença resultado, pelo menos em parte, de uma disbiose, ou seja, a microbiota comensal poderia causar ou favorecer a ocorrência de infecções intramamárias, já que importantes patógenos causadores de mastite como bactérias do gênero *estafilococos* e *estreptococos* já foram identificados por técnicas moleculares no leite de animais considerados sadios (Friman *et al.*, 2017; Andrews *et al.*, 2019; Taponen *et al.*, 2019; Oikonomou *et al.*, 2020).

No entanto, vários aspectos tornam a ideia da existência de uma população de microrganismos comensais na glândula mamária de bovinos inconsistentes. Entre vários, podemos citar: 1) a resposta imune da glândula mamária em bovinos apresenta predomínio de imunoglobulinas do tipo IgG, em contraste com baixas concentrações de IgA e peptídeos antimicrobianos encontrada no leite, contrariando a expectativa de altas concentrações em mucosas de outros órgãos em bovinos e da glândula mamária de várias outras espécies, contrastando, dessa forma, com a possível presença de comunidades microbianas intramamárias, já que se sabe que a microbiota presente em mucosas é responsável por induzir a produção de IgA através de células plasmáticas localizadas na lâmina própria; 2) a expressiva resposta de células epiteliais mamárias a padrões moleculares associados a patógenos, como os lipopolissacarídeos (LPS), ou seja, a glândula mamária é capaz de responder a pequenas quantidades de LPS, além de detectar bactérias e os componentes liberados por elas, resultando em uma expressiva resposta inflamatória. Isso se deve aos receptores do tipo *Toll-like* (TLRs), que são responsáveis em detectar a presença de bactérias e estimular a resposta inflamatória, o que não condiz com a presença de uma microbiota comensal; 3) ausência ou presença de raros folículos linfóides isolados na glândula mamária, e ineficiência da via êntero-mamária em bovinos. Os folículos linfóides isolados são comuns ao longo das mucosas e são coordenados através da exposição a antígenos e microrganismos, porém são raros ao longo da glândula mamária, o que reforça a hipótese de inexistência de uma microbiota; 4) possibilidade de contaminação das amostras de leite (por exemplo, até mesmo aquelas coletadas conforme preconizado pelo NMC) que ao utilizar técnicas moleculares altamente sensíveis na detecção de microrganismos poderia resultar na detecção dos mesmos, ou seja, sugerindo possível contaminação cruzada das amostras de leite utilizada em estudos anteriores; 5) detecção de bactérias mortas ou fragmentos de DNA, e não necessariamente de bactérias viáveis por estas técnicas moleculares; e 6) a incompatibilidade da existência de uma microbiota comensal na glândula mamária frente aos resultados advindos da implementação do plano de controle da mastite estabelecido pelo NMC. Por exemplo, sabe-se que o uso de pós-*dipping* após a ordenha reduz a quantidade de bactérias presentes na pele e auxilia na

prevenção de novas infecções intramamárias pela entrada de patógenos pelo orifício do teto. Dessa forma, a eficácia do pós-*dipping* é amplamente aceita, desacreditando o potencial efeito protetor de uma microbiota existente. Da mesma forma, os tratamentos de vaca seca, os quais baseiam-se no uso de antimicrobianos de longa ação, têm capacidade suficiente para interferir de forma intrínseca na microbiota mamária e a quebra da microbiota por antibacterianos é conhecida como disbiose, a qual pode levar ao aumento da vulnerabilidade a novas infecções intramamárias. No entanto, sabe-se que o tratamento de vaca seca normalmente leva à redução expressiva de novas infecções intramamárias, o que põe em jogo a existência de uma microbiota na glândula mamária de bovinos (Rainard, 2017).

Por outro lado, em desafios experimentais, a carga bacteriana necessária para induzir a resposta inflamatória na glândula mamária de bovinos é drasticamente maior (aproximadamente 1.000 a 10.000 vezes superior) se a glândula mamária for desafiada com bactérias que poderiam ser comensais, como *Staphylococcus aureus* (SNA) (Piccart *et al.*, 2016), quando comparada com patógenos como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (Shkreta *et al.*, 2004 e Moyes *et al.*, 2016). Diante do exposto, os dados inconsistentes da literatura põem em xeque a existência de uma microbiota da glândula mamária bovina, que deve ser melhor investigada. Neste ínterim, o paradigma da esterilidade de outros sistemas orgânicos anteriormente considerados estéreis foi desafiado, como o trato respiratório e reprodutivo, revisando conceitos anteriores bem estabelecidos a este respeito (Santos *et al.*, 2011; Man *et al.*, 2017).

De acordo com Porcellato *et al.* (2020), a mastite é resultante de uma disbiose, ou seja, comunidades bacterianas vivem de forma simbiote na glândula mamária, incluindo microrganismos considerados importantes para a mastite, como, *S. aureus* e *Corynebacterium* sp., e devido a fatores adversos como: modificações na dieta, períodos de grande desafio como o período de transição, e outros, como o maior uso de antimicrobianos, que podem desencadear a disbiose, em que alguns microrganismos se sobressaem através de competição por nutrientes, resultando na doença. Fato que corrobora para essa narrativa, é que quartos com infecção intramamária estabelecida apresentaram uma redução em sua diversidade. No entanto, microrganismos como *S. aureus* e *Corynebacterium* sp. mantiveram-se

presentes, os quais foram identificados em mais de 90% das amostras avaliadas. Diferentemente de outras espécies animais, não há evidências concretas da circulação êntero-mamária em ruminantes (Rainard, 2017; Taponen *et al.*, 2019).

Ademais, o fato de a glândula mamária não se desenvolver como uma mucosa, ou seja, não há interface da glândula mamária com o ambiente externo, até o período próximo ao parto, poderia justificar a resposta imune peculiar da glândula mamária em relação às outras mucosas. Como exemplo, pode ser citado a baixa quantidade de IgA, peptídeos antimicrobianos e folículos linfóides isolados, como descrito por Rainard (2017). Desta forma, pode ser levantada a hipótese de que a glândula mamária de bovinos seja estéril, pelo menos, até a abertura do canal do teto. Portanto, com o advento da possibilidade da abertura do canal do teto com a proximidade da primeira lactação, a colonização do ambiente mamário poderia ocorrer neste momento, o que consequentemente poderia influenciar a ocorrência de novas infecções intramamárias dependendo da microbiota comensal estabelecida. Tal fato implicaria nos programas de controle da mastite que se baseiam quase que exclusivamente no controle da mastite, especialmente em animais lactantes, já que a microbiota que colonizasse esta glândula mamária antes da primeira lactação poderia influenciar toda a vida produtiva do animal.

Para mais, isto possibilitaria o emprego de novas alternativas de controle da mastite com implicações em longo prazo, como já descritas para outros organismos e sistemas (Whiteside *et al.*, 2015). Deste modo, novas propostas surgiram, como o uso de bactérias dos gêneros SNA e bactérias ácido lácticas (BAL), que cada vez mais vem sendo relatadas como responsáveis pela inibição da aderência e internalização bacteriana em células epiteliais mamárias dos principais patógenos causadores da mastite, como por exemplo, *S. aureus*, *Streptococcus uberis* e *Streptococcus agalactiae* (Bouchard *et al.*, 2013; Assis *et al.*, 2015; Bouchard *et al.*, 2015). Além disso, é descrito que alguns isolados de SNA podem apresentar efeito protetor na glândula contra os patógenos principais causadores de mastite (Piepers *et al.*, 2011; De Vliegher *et al.*, 2004; Braem *et al.*, 2014). Alguns estudos apontam que BAL e SNA são capazes de produzir substâncias antagonistas, como bacteriocinas, que levam a inibição dos principais patógenos relacionados à mastite (Nascimento *et al.*, 2005; Braem *et al.*, 2014; Carsson *et al.*, 2017). Outrossim, o

emprego de BAL e SNA como estratégia no controle da mastite bovina poderia ser profícuo, tendo em vista que eles auxiliam na diminuição do uso de antimicrobianos e na redução do surgimento de bactérias resistentes aos antimicrobianos.

Desta forma, se provada a existência de uma microbiota na glândula mamária, os programas de tratamento e prevenção deverão ser revistos, pelo menos em parte, tendo em vista a influência dos microrganismos comensais na imunomodulação da resposta imune na glândula mamária, na competição com microrganismos causadores de mastite, entre outros. Além disto, o impacto dos tratamentos de vaca seca poderia causar efeito negativo sobre a microbiota comensal da glândula mamária, o que pode levar a uma disbiose, e tornar a glândula mais susceptível a novas infecções por patógenos principais como *S. aureus*, *S. uberis* e *E. coli*, após o tratamento, especialmente durante períodos de imunossupressão, como o período pós-parto.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Avaliar a microbiota da glândula mamária bovina por sequenciamento de alto rendimento de amostras de leite e seu potencial reflexo na saúde da glândula mamária.

Objetivos Específicos

- Avaliar as comunidades bacterianas totais e viáveis de amostras de leite assepticamente coletadas;
- Avaliar comunidades bacterianas viáveis presentes no leite coletado do canal do teto por coleta recomendada pelo NMC e por cânula, da cisterna da glândula mamária e alvéolo mamário;
- Avaliar o impacto da oclusão do canal do teto no período pré-parto em vacas nulíparas sobre as comunidades bacterianas viáveis do leite, e seu reflexo sobre a saúde da glândula mamária no primeiro mês de lactação.

Dessa forma, a presente dissertação será apresentada em forma de capítulos e em cada capítulo irá abordar um objetivo específico.

3. REVISÃO DE LITERATURA

A mastite, doença de maior relevância na pecuária leiteira, doença é caracterizada por uma inflamação da glândula mamária, associada ou não à infecção, a qual resulta em alterações na qualidade e quantidade de leite produzido, impactando de forma negativa em toda a cadeia produtiva, desde o produtor, indústria, e consumidor final (Bexiga *et al.*, 2011; Oikonomou *et al.*, 2014; Hiitio *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2016; Lima *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2021). Além disto, a mastite gera custos diretos e indiretos que afetam a lucratividade do produtor, dentre estes, destacam-se: gastos com mão de obra, custos com o tratamento e descarte do leite, os quais se somam com a possibilidade de perda precoce do animal. Ademais, o tratamento com antimicrobianos de forma inadequada, ainda favorece o desenvolvimento de bactérias resistentes, gerando repercussão no contexto da saúde única (Taponen *et al.*, 2019; Oliveira *et al.*, 2021).

Nas últimas décadas, inúmeros pesquisadores têm trabalhado com a doença, a qual ocupa o primeiro lugar em estudos com bovinos leiteiros. Contudo, apesar das inúmeras pesquisas sobre a doença, a mesma continua causando perdas. Isso se deve a uma série de fatores que interferem em uma linearidade da doença (Ruegg *et al.*, 2017; Oikonomou *et al.*, 2020), como por exemplo, grande número de patógenos envolvidos, ambiente, fatores relacionados às condições de saúde do rebanho e do indivíduo, além, daqueles associados aos colaboradores, os quais são encarregados pela gestão de muitos desses pontos, desempenhando papel fundamental na doença. Por conta desses e outros motivos, a mastite é considerada uma doença multifatorial, na qual são necessárias ações combinadas para sanar todos os gargalos e reduzir as perdas (Oikonomou *et al.*, 2014; Taponen *et al.*, 2019).

Dentre os microrganismos associados à doença, destacam-se: *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. uberis*, *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae*, os quais são considerados patógenos principais, devido à patogenicidade, característica essa que se altera de acordo com o agente etiológico (Mahmmod *et al.*, 2015; Lima *et al.*, 2018; Rainard *et al.*, 2018; Vasquez *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2019). Além deste grupo, merecem destaque também os patógenos secundários, aqui representados pelos SNA, que

compõe um grupo com mais de 40 espécies, que diferem de acordo com seu perfil de predominância, podendo ser predominantemente ambiental, oportunistas e adaptadas à glândula mamária (De Vliegher *et al.*, 2012; Braem *et al.*, 2014; Nitz, *et al.*, 2020).

Assim, para o desenvolvimento da mastite é necessário que as bactérias adentrem por via ascendente o canal do teto (Rainard, 2017; Taponen *et al.*, 2019). Na dinâmica de infecção, os microrganismos se deparam com a primeira linha de defesa do sistema imune inato, o tampão de queratina formado após a ordenha, o qual tem a função de impedir a entrada de patógenos ao interior da glândula. No entanto, devido a vários fatores, essa entrada pode ser bem-sucedida, tornando possível a internalização dos microrganismos nas células epiteliais da glândula mamária. Uma vez internalizados, o sistema imune inato passa a contra-atacar por meio dos macrófagos e neutrófilos residentes na glândula, além da sinalização e migração de neutrófilos da corrente sanguínea, gerando como produto dessa interação, o aumento de células somáticas no leite, conotando a presença da doença (Kumar *et al.*, 2011; Sordillo *et al.*, 2018). Ainda na interação entre patógenos e sistema imune, uma vez que a doença não seja contida pelo sistema imune inato, o organismo sinaliza para que o sistema imune adaptativo se torne presente e lance mão de suas linhas de defesa, como por exemplo, os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, e linfócitos B, os quais atuam no recrutamento de novas células de defesa, na eliminação dos patógenos e na produção de anticorpos. Essa ação combinada visa identificar e neutralizar esses componentes estranhos ao hospedeiro. Contudo, nem sempre o sistema imune é capaz de atuar na eliminação dos patógenos, e alguns como, por exemplo, *S. aureus* pode internalizar nas células do hospedeiro e se proteger do sistema imune, reduzindo assim as taxas de cura a este microrganismo (Sordillo *et al.*, 2002; Aitken *et al.*, 2011; Porcherie *et al.*, 2012; Ryman *et al.*, 2015; Sordillo, 2018).

Essa dinâmica de infecção resulta em alterações imediatas na glândula mamária e na qualidade do leite produzido, como por exemplo, ocorrência de dor, hiperemia, edema, alterações visuais no leite secretado, como grumos, flocos, e/ou a presença de sangue no leite, além das alterações de composição, como gordura, proteína e lactose (Pínzson *et al.*, 2011; Jamali *et al.*, 2014).

As mastites podem ser classificadas de acordo com sua origem em ambiental e contagiosa, ou classificadas quanto a sua apresentação, em clínica e subclínica (Santos & Fonseca, 2007; Whelehan *et al.*, 2011). A mastite ambiental agrupa microrganismos que não são adaptados ao animal, sendo associados como oportunistas na glândula. Esses microrganismos estão distribuídos em material de cama, fezes, água e no solo, e sua transmissão ocorre principalmente no momento pós-ordenha, onde a falta de manejo adequado como, por exemplo, o não uso de *pós-dipping* pode permitir a entrada desses patógenos (Jamali *et al.*, 2014). Por outro lado, a mastite contagiosa está associada a microrganismos adaptados ao hospedeiro, muitos dos quais vivem de forma simbiótica na pele e canal do teto. Esses microrganismos têm sua transmissão a partir da glândula mamária infectada durante o período de ordenha devido a práticas ineficientes de ordenha (Melo *et al.*, 2012; Jamali *et al.*, 2014; Mahmmod *et al.*, 2015).

De acordo com o supracitado, a mastite se perfilha ainda em mastite clínica, em que ocorrem alterações visíveis no aspecto do leite e da glândula, como: grumos, pus, dor, hiperemia, entre outros, fazendo com que seja facilmente identificada pelo ordenhador (Lima *et al.*, 2017). Contrapondo os sinais clínicos visuais, a mastite subclínica, tem sua apresentação discreta, em que a principal alteração ocorre no aumento das células somáticas (CCS). Para sua detecção, são necessários testes que auxiliem na identificação, como o *California Mastitis Test* (CMT), o qual pode ser realizado na fazenda a baixo custo, e a CCS por meio de citometria de fluxo, entre outros. Devido a sua apresentação sucinta, a mastite subclínica é responsável por 70% das perdas relacionadas à doença, uma vez que nem sempre é identificada com rapidez, principalmente em fazendas que não realizam diagnóstico, podendo se tornar crônica (Melo *et al.*, 2012; Jamali *et al.*, 2014; Mahmmod *et al.*, 2015; Kalinska *et al.*, 2017).

Outro ponto importante, ao abordar a mastite e que vem ganhando maior visibilidade nos últimos anos, é o aumento nos relatos de mastite em novilhas. Os primeiros relatos datam da década de 40, e desde então se encontra em ascensão (De Vliegher *et al.*, 2012; Narayana *et al.*, 2018; Naviq *et al.*, 2018). Alguns estudos indicam que a incidência de quartos infectados pode variar entre 18 a 80% (Nitz *et al.*, 2020). Dentre os principais patógenos associados à doença, ganham destaque

SNA, os quais podem ser predominantemente ambientais, oportunistas e predominantemente adaptados à glândula mamária (De Vliegher *et al.*, 2012; Braem *et al.*, 2014).

No entanto, os programas comuns de prevenção e controle da doença não abordam a mastite de novilhas em seus protocolos de boas práticas (Nitz *et al.*, 2020). Isto deixa uma lacuna em aberto, uma vez que infecções intramamárias (IIM) antes do parto e no início da lactação podem comprometer o desenvolvimento da glândula. Como consequência, além de afetar negativamente a saúde do úbere, pode aumentar o risco de descarte precoce do animal (Bludau *et al.*, 2014; Naqvi *et al.*, 2018; Nitz *et al.*, 2020).

Nos últimos anos, outro ponto que ganhou visibilidade no cenário da saúde da glândula mamária bovina, foi a utilização de métodos independentes da cultura para a identificação de patógenos, dentre os quais, o sequenciamento de alto rendimento (Oikonomou *et al.*, 2014; Lima *et al.*, 2017). Uma vez que a técnica se tornou menos onerosa e aprimorou a eficiência e precisão do sequenciamento, possibilitou avaliações metataxonômicas em diversos ecossistemas (Costa & Weese, 2019). Essa técnica consiste no sequenciamento do material genético em conjunto, o que permite a obtenção de ampla visão sobre a colonização dos variados nichos (Yap *et al.*, 2020). Através dessa metodologia, inúmeros trabalhos (Oikonomou *et al.*, 2014; Addis *et al.*, 2016; Lima *et al.*, 2017; Taponen *et al.*, 2019; Vasquez *et al.*, 2019; Porcellato *et al.*, 2020), passaram a sugerir que o leite bovino possuía uma microbiota própria, semelhante ao que já foi descrito no leite humano, bem como em outros sistemas. A partir de então, os especialistas da área dividem opiniões sobre o assunto, sem, no entanto, um consenso (Rainard, 2017; Metzger *et al.*, 2018; Taponen *et al.*, 2019; Oikonomou *et al.*, 2020).

Um dos principais motivos pela busca constante em comprovar a presença de populações microbianas decorre do fato de que algumas populações podem ser capazes de promover a saúde, em contrapartida de outras associadas ao desenvolvimento de doenças (Metzger *et al.*, 2018). Assim, questões importantes sobre as semelhanças e diferenças entre indivíduos saudáveis em taxa microbiana e vias funcionais precisam ser abordadas, pois ainda não foram totalmente respondidas (Cho & Blaser, 2012).

Tal discussão ganhou espaço devido ao fato de estudos aplicando a técnica no leite bovino, como o de Oikonomou *et al.* (2014) que após demonstrarem a ocorrência de bactérias capazes de causar mastite em quartos de animais clinicamente sadios e com baixa CCS, sugeriram que estes, possam fazer parte da microbiota do leite. Colocando em dúvida a esterilidade da glândula mamária.

Se comprovado, isto colocaria a mastite como resultado de uma disbiose na qual, o equilíbrio do microbioma dentro do úbere é dinâmico, muito frágil e sujeito a vários fatores associados ao hospedeiro e ao ambiente, podendo gerar a mastite (Porcellato *et al.*, 2020). Nesse sentido, a microbiota comensal poderia causar ou favorecer a ocorrência da infecção intramamária, uma vez que patógenos de grande relevância como estafilococos e estreptococos já foram identificados por meio de técnicas moleculares no leite de animais sadios (Oikonomou *et al.*, 2014; Addis *et al.*, 2016; Lima *et al.*, 2017; Andrews *et al.*, 2019). Corroboram com a ideia de que a mastite é resultante de uma disbiose, estudos como o de Porcellato *et al.* (2020) e Oikonomou *et al.* (2020), os quais observaram que animais com mastite apresentaram uma carga bacteriana menos diversa, do que quando comparados com quartos saudáveis.

A comunidade simbiote detectada na glândula mamária por meio de tal técnica pode ser chamada de microbioma, sendo que cada nicho da estrutura apresenta sua especificidade, o leite, por exemplo, pode ser um importante indicador da saúde da glândula mamária, visto que é sintetizado nos alvéolos e percorre inúmeras estruturas como a cisterna e o canal do teto (Costa & Weese, 2019; Porcellato *et al.*, 2020).

Contrariando estes achados, pesquisadores, como Rainard (2017), Metzger *et al.* (2018) e Taponen *et al.* (2019), sugerem que tais dados devem ser analisados com muita cautela, uma vez que, vários fatores podem afetar os resultados obtidos. Entre esses fatores, pela possibilidade de detecção de DNA não viável e por meio da sensibilidade da técnica, há grandes chances de ocorrência de contaminações durante a coleta e/ou durante as etapas laboratoriais subsequentes. Este fato também é discutido por Taponen *et al.* (2019) que sugerem que embora as técnicas independentes de cultura representem uma abordagem que fornece várias

informações, é necessário uma avaliação crítica sob as metodologias utilizadas e as armadilhas durante todo o processo, incluindo até mesmo, as formas de análise.

Nesse sentido, com uma metodologia composta de lacunas em aberto, pesquisadores como, McArdle *et al.* (2020) sugerem o uso de substâncias que causem a depleção controlada do material genético do hospedeiro, a fim de evitar a alta proporção de genética hospedeira, a qual em altas concentrações, pode reduzir a sensibilidade de detecção de abundâncias ocorrentes em menor quantidade, elevando o número de unidades taxonômicas operacionais (OTU) não detectadas (Dahlberg *et al.*, 2020).

Ainda sobre o aperfeiçoamento da técnica, a monoazida de propídio (PMA) se apresenta como uma opção para a realização da depleção seletiva, uma vez que se liga a membrana de células danificadas, quando fotoinduzida, impedindo a amplificação na reação em cadeia da polimerase (PCR), permitindo que fragmentos de DNA e DNA proveniente de bactérias viáveis sejam detectados, gerando um resultado com maior margem de segurança (Heise *et al.*, 2016; Fu *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2019).

Com a crescente evolução das ciências ômicas, apresentou-se uma variedade de opções e abordagens que possibilitam uma caracterização detalhada das amostras, proporcionando reunir dados de caráter taxonômico, composição do seu potencial funcional e moléculas produzidas como resultado do seu funcionamento (Addis *et al.*, 2016; Andrews *et al.*, 2019; Oikonomou *et al.*, 2020). Assim, para compreender os dados metagenômicos, é importante entender como estes são obtidos (Metzger *et al.*, 2018; Taponen *et al.*, 2019).

A caracterização de conjunto de genomas microbianos, geralmente é baseada no sequenciamento alvo de 16S rDNA. Esses genes são os mais conservados em todas as bactérias, porém, estes carregam regiões hipervariáveis (Addis *et al.*, 2016). Nos estudos com 16S rDNA, um par de *primers* é projetado para se acoplar a regiões conservadas e assim amplificar as regiões variáveis, as quais são responsáveis por capturar as informações taxonômicas, por meio dos *amplicons*. O sequenciamento desse conjunto amplificado de fragmentos de 16S rDNA permite a leitura de seus *táxons* específicos, e assim, a abundância de cada

táxon pode ser estimada (Schloss *et al.*, 2009; Caporaso *et al.*, 2012). As regiões que possuem variações são identificadas de V1-V9, as quais são usadas para caracterizar grupos taxonômicos distintos entre si, permitindo, dessa forma, estimar a distância filogenética entre eles. Assim, para que amostras sejam caracterizadas como grupo taxonômico diferente é necessário obter um resultado menor que 97% de similaridade (Addis *et al.*, 2016; Costa & Weese, 2019). Desse modo, quando ultrapassados os 97% de similaridade são necessárias outras metodologias para classificação diferencial. Contudo, a metagenômica de 16S não possui poder filogenético para diferenciar em nível de espécie. Assim, a escolha da região e do conjunto de *primers* para amplificá-la é de extrema importância, impactando diretamente no resultado obtido. As regiões hipervariáveis utilizadas na caracterização de microbiota bacteriana são a V3 e V4 (Addis *et al.*, 2016; Almeida, 2017; Oikonomou *et al.*, 2020).

Entretanto, conforme já mencionado, a possibilidade de contaminações e/ou perdas podem comprometer o processo de análise metagenômica, uma vez que por alguma intercorrência, podem ser obtidos resultados super ou subestimados. Com a etapa do processamento de DNA isso não difere inclusive etapas como a amplificação das sequências obtidas através da PCR são associadas à perda da diversidade tidas como um ponto crítico nesse tipo de análise (Eisenhofer *et al.*, 2018; Dahlberg *et al.*, 2019).

Existem diversas plataformas que são capazes de realizar essa análise e o interesse pelo uso da plataforma Illumina tem crescido a cada ano (Bartram *et al.*, 2011; Caporaso *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2011). Isso ocorre porque ao utilizar a tecnologia do sequenciamento de nova geração de alto desempenho, essa plataforma gera menor custo por sequência, quando comparada com outras, e é capaz de produzir uma diversidade microbiana de alto rendimento e com alta cobertura (Caporaso *et al.*, 2012; Nakazato *et al.*, 2013; Ross *et al.*, 2013).

A obtenção dos dados metagenômicos se divide em seis pontos: coleta das amostras; extração do DNA; amplificação do DNA por meio da PCR, formação de bibliotecas e de sequenciamento de uma região do gene 16S rRNA e posterior

análise (Metzger *et al.*, 2018). Dentre todas essas etapas alguns cuidados devem ser tomados, principalmente naquelas que possuem manipulação em excesso, como é o caso da extração de DNA, uma vez que a quantidade e a pureza do material extraído vão impactar a qualidade dos passos seguintes (Bag *et al.*, 2016).

Durante a etapa de amplificações, um dos grandes cuidados é com a formação de quimeras, a qual é difícil de diferenciar das sequências originais, podendo superestimar a diversidade da amostra. Esse erro deve ser removido durante a etapa de controle de qualidade, após o alinhamento das sequências com os bancos de dados públicos. Dentre as plataformas mais utilizadas para a análise de bioinformática, destacam-se o Mothur e o Illumina (Schloss *et al.*, 2009). Nessas plataformas os dados são alinhados de acordo com bancos de dados públicos. Posterior, conforme já mencionado, as amostras passam por um controle de qualidade, onde são identificadas e removidas as sequências de quimeras (Caporaso *et al.*, 2010).

As sequências que passarem pelo teste são agrupadas em OTU, de acordo com sua similaridade. Após, as OTU são comparadas a uma base de dados conhecida para a caracterização taxonômica (Quast *et al.*, 2013). Obtidos os resultados, é necessário analisá-los por testes que levam em consideração a diversidade dos microrganismos e a diferença entre eles. Dentre essas avaliações, ganham destaque as chamadas alfa e beta diversidade. A alfa diversidade é a que descreve as características individuais de cada amostra, podendo ser avaliada por diferentes abordagens, relacionando com medidas de riqueza, diversidade e uniformidade. A riqueza refere-se ao número de *táxons* presentes em uma comunidade. Já a uniformidade, representa como cada *táxon* está distribuído dentro de uma comunidade. Enquanto, a diversidade são índices que consideram não somente os *táxons* presentes na comunidade (riqueza), mas também sua uniformidade (Costa *et al.*, 2015; Oulas *et al.*, 2015; Costa & Weese, 2019). Por outro lado, a beta diversidade realiza a comparação entre comunidades, geralmente levando a taxonomia em consideração.

A partir disso, podem ser utilizados diversos índices para extrapolar as avaliações de riqueza, como por exemplo, Chao, ou avaliar a diversidade, como Shannon e Simpson. Além desse, outro conceito importante é a abundância, a qual está relacionada com abundância de um gênero em determinada amostra, ou seja, quanto maior o número de indivíduos em um gênero, mais abundante ele será. A análise de Coordenadas Principais (PCoA) é usada para avaliar a diversidade beta presente entre as comunidades. Essa análise processa os valores extraídos em uma matriz de similaridade ou distância, podendo ser utilizada até mesmo quando as relações entre variáveis não são lineares. Outros importantes testes referem-se às análises estatísticas com o AMOVA e a Parsimônia. Este último é um método não paramétrico usado para determinar a diferença evolutiva entre as amostras, caracterizando comunidades diferentes. Já o AMOVA determina se existem diferentes graus genéticos entre e dentro das amostras (Costa *et al.*, 2015; Costa & Weese, 2019).

Apesar do sequenciamento de última geração ser amplamente utilizado em estudos que avaliam a microbiota, ainda, existem algumas limitações da técnica que podem influenciar na sua aplicabilidade (Taponen *et al.*, 2019; Oikonomou *et al.*, 2020; Porcellato *et al.*, 2020; Oliveira *et al.*, 2021). Entre as limitações, ganham destaque a ausência de quantificação absoluta (contagem total de bactérias) e viés de seleção, a qual pode ocorrer em várias etapas, como por exemplo, na seleção dos *primers*, extração do DNA, parâmetros de bioinformática, entre outros, superestimando ou subestimando a real diversidade. A principal limitação da técnica é o tamanho do fragmento de DNA que ele sequênciava, limitando a classificação em nível de gênero por exemplo. Ademais, quanto menor a abundância de determinadas populações, maior será a chance de sub-representação. Não se sabe ao certo quantas bactérias são necessárias em uma comunidade para que sejam detectadas, comumente, quanto menor o número de ciclos da PCR, menor será o viés de detecção (Costa & Weese, 2019).

4. CAPÍTULO 1. DETERMINAÇÃO DE BACTÉRIAS TOTAIS *VERSUS* VIÁVEIS NO LEITE BOVINO

RESUMO

A mastite é a doença de maior impacto na bovinocultura leiteira. Com o avançar das técnicas de sequenciamento de última geração, vários estudos passaram a aplicar essa tecnologia para a glândula mamária bovina e a partir de então, sugerir que ela tenha uma microbiota própria. Contudo, um grande gargalo desses estudos é a possibilidade de detecção de bactérias mortas, as quais não têm uma representação biológica efetiva. Assim, através do uso de monoazida de propídio (PMA) que é capaz de se ligar a membrana de células danificadas, não permitindo com que essas amplifiquem, é possível realizar o sequenciamento de alto rendimento apenas de comunidades bacterianas viáveis. Diante deste cenário, nos propusemos a abordar essa questão, com o objetivo de avaliar o impacto das bactérias mortas no microbioma do leite bovino assepticamente coletado, permitindo a comparação entre a microbiota total e viável. As amostras de leite bovino de oito animais (32 quartos mamários) foram assepticamente coletadas para o exame microbiológico, análise de metataxogenômica e contagem de células somáticas. No presente estudo, foi possível observar que das 32 amostras, em apenas 23 (71,88%) foi possível fazer o sequenciamento de alto rendimento. Das amostras não sequenciadas, 7 (21,88%) eram do grupo tratado com PMA (viáveis), e duas (6,25%) pertenciam ao grupo não tratado com PMA (totais). Além disso, foi possível avaliar que houve redução de 32,23% em unidades taxonômicas operacionais totais (OTU), em relação às amostras não tratadas com PMA. Ademais, foi observada a redução no número de *Bacillus*-OTU e *Prevotella*-OTU, contrário ao aumento no número de *Corynebacterium*-OTU, *Rubrobacter*-OTU, *Pseudomonas*-OTU e *Wolbachia*-OTU. Assim, podemos concluir que a distinção das populações viáveis em análises de metataxogenômica é fundamental, e impacta profundamente os resultados encontrados, permitindo assim resultados mais fidedignos.

Palavras-chave: Mastite. Microbioma. Viabilidade. Monoazida de propídio (PMA).

CHAPTER 1. DETERMINATION OF TOTAL VERSUS VIABLE BACTERIA IN BOVINE MILK

ABSTRACT

Mastitis is a disease with the greatest global impact on dairy cattle. With the advancement of the latest high-throughput sequencing techniques, several studies started to apply this technology to study the bovine mammary gland, which suggested that it has its own microbiota. However, a major gap in these studies is the possibility of detecting dead bacteria, which could have critical biological implications impact. Thus, through the use of propidium monoazide (PMA), which is able to bind to the membrane of damaged cells, not allowing them to amplify, and then the high-throughput sequencing is only possible for viable bacterial communities. In view of this scenario, we aimed to assess the impact of dead bacteria on the aseptically collected bovine milk microbiome, allowing the comparison between the total and viable microbiota. Samples of bovine milk from eight animals (32 mammary quarters) were aseptically collected for microbiological examination, metataxogenomics analysis and somatic cell count. In the present study, it was possible to observe that of the 32 samples, only 23 (71.88%) were successful in high-throughput sequencing. Of the non-sequenced samples, 7 (21.88%) were from the group treated with PMA (viable microbiota) and 2 (6.25%) belonged to the group not treated with PMA (total microbiota). Here, it was possible to evaluate that there was an average reduction of 32.23% in total operational taxonomic units (OTU), in relation to samples not treated with PMA. In addition, a reduction in the number of *Bacillus*-OTU and *Prevotella*-OTU was observed, in contrast to an increase in the number of *Corynebacterium*-OTU, *Rubrobacter*-OTU, *Pseudomonas*-OTU and *Wolbachia*-OTU. Thus, we can conclude that the distinction of viable populations in the metataxogenomic analysis is fundamental, and deeply impacts the results found, thus allowing a more reliable result.

Keywords: Mastitis. Microbioma. Viability. Propidium monoazide (PMA).

4.1 INTRODUÇÃO

A mastite, doença de maior impacto na produção leiteira, é responsável por onerosas perdas que afetam toda a cadeia produtiva, desde o produtor até a indústria. Dentre alguns dos prejuízos causados, destacam-se as alterações na qualidade e na quantidade de leite produzido, mão de obra, custos com veterinário, descarte do leite, uso de antimicrobianos, podendo ainda levar ao descarte precoce do animal (Lima *et al.*, 2017; Ruegg *et al.*, 2017; Taponen *et al.*, 2019; Oikonomou *et al.*, 2020).

Com o avançar dos anos e o aprimoramento das técnicas de sequenciamento, levantou-se o questionamento sobre a esterilidade da glândula mamária bovina, uma vez que outros órgãos foram desafiados, nos quais levantou-se a possibilidade de uma microbiota própria (Oikonomou *et al.*, 2014; Addis *et al.*, 2016; Catozzi *et al.*, 2017; Lima *et al.*, 2017; Derakhshani *et al.*, 2018).

Embora não exista consenso entre pesquisadores sobre o tema (Rainard, 2017; Oikonomou *et al.*, 2020), há crescente interesse em compreender se há uma microbiota própria, e caso exista, de que forma essa pode interferir na saúde desses animais, bem como qual é a sua importância durante a dinâmica das infecções intramamárias. Recentemente, levantaram-se evidências de que a saúde da glândula mamária pode estar associada a uma disbiose, na qual, o equilíbrio do microbioma dentro do úbere é dinâmico, muito frágil e sujeito a vários fatores associados ao hospedeiro e ao ambiente (Porcellato *et al.*, 2020).

Um grande gargalo desses estudos é a possibilidade de detecção de DNA de bactérias mortas (Rainard, 2017) que podem ser oriundo da fagocitose alcançando a glândula por rota endógena, ou ainda por translocação de outras partes do corpo, como do intestino e/ou rúmen (Porcellato *et al.*, 2020), com especulação de que alguns microrganismos conseguem viajar por meio dos nódulos linfáticos mesentéricos, chegar à glândula mamária. Embora haja especulações sobre os mecanismos envolvidos em torno da capacidade desses microrganismos em transpassar a barreira intestinal, muitos pesquisadores acreditam que esse fato está associado ao sistema imune, principalmente às células dendríticas, as quais podem abrigar bactérias comensais vivas e carregá-las até os linfonodos, onde essas podem

se espalhar por diversas superfícies mucosas, incluindo a glândula mamária. Para, além disso, alguns pesquisadores vão além e ressaltam a possibilidade de que não existem nichos microbianos distintos, mas sim, uma rede de interrelações microbianas em todo organismo, a qual está em constante intercâmbio (Addis *et al.*, 2016).

Desse modo, com o intuito de identificar bactérias viáveis e aprimorar os resultados, têm buscado metodologias que possibilitem a obtenção de resultados mais fidedignos. Dentre eles, a monoazida de propídio (PMA) que permeia na membrana de células danificadas, e assim, quando a azida for fotoinduzida ela se liga ao DNA, e impede que o DNA de células mortas seja amplificado na reação em cadeia da polimerase (PCR), proporcionando a amplificação apenas de DNA de bactérias viáveis (Fu *et al.*, 2018). Além disso, já utilizaram PMA para avaliar a microbiota viável em diversos ambientes, como trato respiratório e cavidade oral (Zhang *et al.*, 2015; Ilijazovic *et al.*, 2021).

A utilização do sequenciamento de 16S rRNA de forma direta para a análise metagenômica é comum, mas, fica sujeita a resultados superestimados, uma vez que há a possibilidade de identificação de DNA de células mortas, sendo que a proporção e distribuição da microbiota morta dificilmente são equivalentes com a microbiota viva (Heise *et al.*, 2016; Fu *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2019). Entretanto, até onde se sabe, não existem trabalhos que avaliaram as comunidades bacterianas exclusivamente viáveis no leite bovino.

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o impacto das bactérias mortas no microbioma do leite bovino assepticamente coletado, permitindo a comparação entre a microbiota total e viável.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi submetido à comissão de Ética no uso de animais – CEUA, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), sob protocolo n. 7293280218. O trabalho também foi submetido à CEUA da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), sob protocolo n. 2214240619.

4.2.1 ANIMAIS

O presente estudo foi realizado na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA – Juiz de Fora/Minas Gerais. Foram utilizadas oito vacas primíparas, de raça holandesa, com 15 dias em lactação (DEL). Destes animais, foram coletadas assepticamente amostras de leite de cada quarto mamário para o exame microbiológico, análise de metataxogenômica e contagem de células somáticas (CCS).

Coleta de amostras de leite

Inicialmente, foi realizado o teste da caneca do fundo escuro para identificar a presença de coágulos, flocos ou secreções anormais que poderiam estar presentes no leite, indicando alteração de sua composição. Depois de descartados os três primeiros jatos de leite, a assepsia das extremidades dos tetos foi realizada utilizando algodão umedecido em álcool a 70%, e amostras de leite individuais de cada quarto mamário foram coletadas assepticamente em frascos estéreis (cat. n. 14-956-6A, Fisher Scientific, Pensilvânia, EUA) para análise bacteriológica (aproximadamente 3 mL). As amostras foram enviadas para o Laboratório de Pesquisa em Qualidade do Leite – Qualileite - na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ/USP - Pirassununga/São Paulo.

Posteriormente, realizou-se a coleta para análise metataxogenômica na qual se repetiu a assepsia das extremidades dos tetos com algodão umedecido em álcool a 70%. As amostras de leite individuais de cada quarto mamário foram coletadas

aspticamente em frascos estéreis (cat. n. 14-956-6A, Fisher Scientific, Pensilvânia, EUA) e, para essa análise foram coletados aproximadamente, 2 mL. As amostras foram enviadas para a empresa de Biotecnologia Pesquisa e Inovação - BPI - Botucatu/São Paulo, em caixas isotérmicas contendo gelo.

Na sequência, foram coletadas ainda amostras de leite individuais de cada quarto mamário para análise de CCS e composição do leite. Para tal, foram coletados 40 mL de leite em cada quarto mamário em frascos estéreis contendo bronopol e enviados ao Laboratório de Qualidade do Leite da Empresa Brasileira de Pesquisa em Agropecuária – EMBRAPA – Juiz de Fora/MG, em caixas isotérmicas contendo gelo.

Contagem de células somáticas

As amostras para CCS foram coletadas em um frasco de 40 mL contendo o conservante bronopol (2-bromo-2-nitropano-1,3-diol) e foram analisadas pelo princípio de citometria de fluxo em equipamento eletrônico Bentley CombSystem 2300 calibrada (Chaska, EUA), segundo ISO (2006).

Exame bacteriológico do leite

A análise bacteriológica foi realizada através do cultivo de 10 µL de acordo Oliver *et al.* (2004) e 100 µL (com o intuito de aumentar a sensibilidade) de leite em ágar sangue de carneiro desfibrinado (5%), os quais foram incubados a 37 °C por 24 a 72 horas. A identificação bacteriana foi determinada utilizando espectrometria de massa com analisador de tempo de voo e ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS), conforme descrito por Barcelos *et al.* (2019). Brevemente, com o auxílio de uma alça descartável, foram selecionadas cinco colônias bacterianas puras e isoladas, as quais foram adicionadas a tubo cônico contendo 300 µL de água Milli-Q autoclavada e 900 µL de etanol, foram homogeneizadas em vortex durante um minuto. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 13.000 x g por dois minutos, foi realizado o descarte do sobrenadante e os sedimentos bacterianos, foram secos à temperatura ambiente

durante 5 a 10 minutos. Em seguida, foi adicionada uma solução de ácido fórmico a 70% de acordo com o tamanho do sedimento bacteriano para sua completa dissolução. Na sequência, foi adicionado acetonitrila a 100%, a qual foi acrescentada de acordo com o volume de ácido fórmico, entre a adição dos reagentes, aguardou-se 10 minutos. Após, realizou-se nova centrifugação, a 13.000 x g por dois minutos, para separar as células bacterianas do sobrenadante. O volume de 1 µL de cada extrato bacteriano foi aplicado sob uma placa de aço para secar em temperatura ambiente por 15 minutos. As manchas secas foram eluídas com 1 µL de solução de matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico-HCCA) diluído em 50% de acetonitrila e 2,5% de ácido trifluoroacético. Após, as placas foram secas novamente a temperatura ambiente. Em seguida, o equipamento foi calibrado, tanto com controle positivo (*E. coli*), quanto com a solução matriz e ácido fórmico, e então as amostras foram analisadas.

Além disso, para a obtenção das unidades formadoras de colônias (UFC) das amostras de leite foi realizada inoculação de 100 µL de leite em placa por meio de alça de Drigalski, já para as amostras de 10 µL foi utilizada a técnica de esgotamento. As amostras de leite inoculadas com 100 µL de leite que apresentaram elevada (acima de 300 UFC) contagem bacteriana foram diluídas de forma seriada 1:10.

4.2.2 ANÁLISE METATAXOGENÔMICA

Preparação das amostras

Conforme recomendado por Oikonomou *et al.* (2014), previamente à extração de DNA, as amostras passaram pela etapa de remoção de gordura, na qual 1 mL de leite foi centrifugado a 8.000 x g durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente, o sobrenadante e a gordura foram descartados e o *pellet* foi ressuspensão em PBS estéril (cat. n.14200075, ThermoFisher - EUA). Essa etapa foi repetida três vezes, seguida por novas centrifugações a cada ressuspensão (8.000 x g durante 5 minutos a 4°C). Ao final, foi ressuspensa em 250 µL de PBS e submetida o tratamento com

PMA (determinação de comunidade bacteriana viável), e/ou extração de DNA (sem tratamento com PMA – comunidade bacteriana total).

Além disso, como em todas as outras etapas, nessa também optamos em minimizar o máximo possível os contaminantes ambientais e a contaminação cruzada. Para tal, foram utilizados tubos cônicos de 1,5 mL estéreis, livres de DNA e RNA (cat. n. MCT-150-C, Axygen, Arizona, EUA), assim como ponteiras (10, 200, 1000 μ L, cat. n. TF-300-R-S, TF-200-R-S, TF-1000-R-S, Axygen, Arizona, EUA, respectivamente), todas estéreis, livres de DNA e RNA, e com filtro. Além disso, conforme descrito por Eisenhofer *et al.* (2018), antes da utilização da cabine de fluxo laminar a mesma era severamente higienizada com hipoclorito de sódio a 3% e álcool 70%. Somado a isso, todos os utensílios utilizados para o processamento eram higienizados com álcool 70% e alocados na cabine de fluxo e submetidos ao processo de irradiação ultravioleta (UV) por 20 minutos. Este processo era repetido no início e ao final do dia. Por fim, somado a todos estes passos, tomamos o cuidado de uma única pessoa realizar a coleta e o processamento de todo material. O executor usou vestimentas adequadas (jaleco, touca, luva e máscara descartáveis), a fim de promover a redução máxima de contaminação ambiental.

Tratamento com *PMA Dye*

Nós utilizamos o *PMA Dye* em nossas amostras, seguindo o protocolo descrito por Fu *et al.* (2018), com algumas modificações propostas por Zhao *et al.* (2019), conforme descritos a seguir.

O PMAxx 20 mM em água (cat. n. 40069, Biotium, Califórnia, EUA) foi dissolvido em 20% de dimetilsulfóxido (DMSO) (cat. n. D8418, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) para obter uma solução estoque 10X, a qual foi armazenada a 20 °C no escuro. A concentração de PMA em todas as amostras foi ajustada para 100 μ mol L⁻¹ (25 μ L de PMAxx em 225 μ L da amostra) e depois incubada por 20 minutos no escuro. Para a ativação do PMA, as amostras foram expostas ao dispositivo de fotólise PMA Lite Led (cat. n. E90002, Biotium, Califórnia, EUA), por 15 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 10.000 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas duas vezes com PBS

(cat. n. 14200075, Thermo Fisher, EUA). Em seguida, as amostras foram armazenadas a -20° C para posterior extração de DNA.

Extração do DNA

O DNA das amostras do leite foi extraído utilizando o kit PowerSoil DNA Isolation kit (cat. n. 12888-100, Qiagen, EUA seguindo instruções do manual do fabricante. A qualidade e quantidade do DNA extraído foi determinada por espectrofotometria, por meio do equipamento NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific).

Amplificação região 16S (V3-V4)

As reações de PCR foram feitas tendo como volume final 20 µL, contendo 10 µL de GoTaq® Colorless Master Mix 2x (Promega, USL), 1 µL (concentração de 10µM) de oligonucleotídeo *forward*, 1 µL (concentração de 10 µM) de oligonucleotídeo *reverse* e 8 µL de DNA genômico. Para a amplificação foram utilizados os *primers* descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para na amplificação das regiões V3 e V4 para a quantificação absoluta de DNA.

Iniciador	Sequência 5'-3'
16S V3-V4 F	5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3'
16S V3-V4 R	5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3'

Fonte: Ferronato (2021).

Legenda: F: *forward*, R: *reverse*.

O programa de amplificação consistiu em desnaturação inicial a 95 °C por 3 minutos, seguida por 27 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 30 segundos extensão a 72 °C por 30 segundos e uma

extensão final a 72 °C por 5 minutos. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems). Após reação de amplificação de cada amostra comprovamos a amplificação, através de eletroforese em gel de agarose 2% corado com UniSafe Dye 0,03% (v/v). ~600pb (tamanho do *amplicon*).

Reação de Indexação

Nesta etapa foram inseridos os indexadores nos adaptadores comuns que são necessários para a geração de *clusters* e sequenciamento das amostras. A reação de indexação foi realizada seguindo o protocolo do kit Nextera XT Index (Illumina). O programa de amplificação consistiu de incubação a 72 °C por 3 minutos, desnaturação inicial a 95 °C por 30 segundos, seguidos de 12 ciclos de 95 °C por 10 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos e extensão final a 72 °C por 5 minutos. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems).

Purificação e Quantificação da Biblioteca

As bibliotecas geradas foram submetidas às etapas de purificação utilizando *bead* magnética Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter), para remoção de fragmentos muito pequenos da população total de moléculas e restos de *primers*. Após, realizou-se a quantificação das bibliotecas de sequenciamento de alto rendimento pela metodologia de PCR Tempo Real, utilizando o equipamento QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) e kit KAPA Library Quantification Kit - Illumina/Universal (Roche), segundo o protocolo do fabricante. Gerou-se *pool* equimolar de DNA pela normalização de todas as amostras a 4nM para realização do sequenciamento utilizando-se o sistema Illumina MiSeq de sequenciamento de nova geração (Illumina® Sequencing) e kit MiSeq Reagent V2 500 ciclos – leitura de 2 x 250pb.

4.2.3 REAÇÃO DA CADEIA POLIMERASE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (QPCR)

Quantificação 16S no DNA total via qPCR

O DNA passou também por quantificação absoluta por qPCR. As reações de qPCR foram realizadas tendo volume final de 10 µL, contendo 5 µL de PowerUp SYBR Green Master Mix (ThermoFisher Scientific), 1,0 µL de oligonucleotídeo *forward* à 10 µM, 1,0 µL de oligonucleotídeo *reverse* à 10 µM e 3,0 µL de DNA diluído 1:10. As sequências dos oligonucleotídeos utilizadas são as mesmas listadas na Tabela 2.

Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para na amplificação das regiões V3 e V4 para a quantificação absoluta DNA.

Iniciador	Sequência 5'-3'
GenBac1055f	ATGGCTGTCGTCAGCT
GenBac1392r	ACGGGCGGTGTGTAC

Fonte: Ferronato (2021).

Legenda: F: *forward*, R: *reverse*.

O programa de quantificação consistiu em incubação inicial para ativação da UDG a 50 °C por 2 minutos, desnaturação inicial a 95 °C por 10 minutos, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos, anelamento a 58 °C por 1 minuto, e curva de *melting* seguindo o recomendado pelo kit PowerUp SYBR Green Master Mix (ThermoFisher Scientific). As reações de quantificação foram conduzidas no termociclador QuantStudio 3 Real-Time PCR System (AppliedBiosystems). A concentração foi estimada através da quantificação da curva padrão (pontos seriados 1:10) do plasmídeo pCR®2.1 (Invitrogen) com a inserção do gene 16S rRNA da família *Peptococcaceae* sp. (Acesso: KJ522755).

Processamento Bioinformático das sequências obtidas

As análises foram realizadas no ambiente do R Studio Versão 1.4.1103 sendo o principal pacote o "phyloseq" do R de acordo com o manual Github para importação e análise dos dados. Foi realizada a normalização das amostras pelo tamanho máximo de *reads*. Para plotar os gráficos de abundância, foram filtrados os OTU que estavam entre os 20% mais abundantes e usadas à função "plot_bar". A curva de rarefação foi feita pela opção "rarecurve" do phyloseq. Para plotar os heatmaps, foram utilizados a função "plot_heatmap" usando o método "NMDS" e distância de "bray" (Bray-Curtis). A alpha diversidade foi feita com a função "estimate_richness" e as imagens pela função "plot_richness". Para a beta diversidade foi utilizada a distância de "bray" e plotado por PCOA com a função "plot_ordination". Foi ainda realizado teste Permanova (Análise Anova Permutacional) usando a função "adonis" do pacote "vegan". Por fim, foi feito o teste de abundância diferenciada das OTU pelo DESeq2 entre todos os grupos.

Para a análise estatística e comparação dos resultados da microbiota total e viável, o programa estatístico GraphPad 9.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA) foi utilizado. Inicialmente, para comparação dos dados entre os grupos amostrais, a exemplo: comparação entre amostras de leite total e viáveis foi aplicado o teste de Shapiro Wilk. As variáveis não paramétricas foram submetidas ao teste de Wilcoxon e as paramétricas ao teste de estatístico T de *Student* para amostras pareadas. O valor de $P \leq 0,05$ foi considerado como significativo.

4.3 RESULTADOS

No presente estudo, das 32 amostras de leite oriundas de quartos mamários de oito animais, 71,88% (23 amostras) foram sequenciadas. Das amostras que não foram sequenciadas, 21,88% (7 de 32 amostras) pertenciam ao grupo tratado com PMA (viáveis), e 6,25 % (2 de 32 amostras), ao grupo não tratado com PMA (totais). Os dados de CCS, qPCR e do exame microbiológico estão apresentados no Apêndice 1 na seção de Apêndices.

Os resultados da diversidade microbiana total e viável (abundância e número de OTU) das amostras de leite podem ser observados na Figura 1 e a representação em escala logarítmica (2) dos microrganismos mais prevalentes em amostras viáveis e totais do leite assepticamente coletado está descrita na Figura 2.

Figura 1 Unidades taxonômicas operacionais (OTU) e abundância relativa das comunidades bacterianas total (PMA-) e viável (PMA+) identificadas em amostras de leite bovino. PMA: monoazida de propídio.

Fonte: Ferronato (2021).

Figura 2. Comparação dos microrganismos mais abundantes nas amostras viáveis e totais de leite bovino assepticamente coletado, apresentado em escala de log2.

Fonte: Ferronato (2021).

Na Figura 3, é possível observar a abundância total de OTU presentes em amostras viáveis e totais de leite bovino. Já na Figura 4, são demonstradas as OTU de maior abundância em amostras viáveis e totais de leite bovino.

Figura 3 Representação da abundância total de unidades taxonômicas operacionais (OTU) em amostras viáveis e totais de leite bovino assepticamente coletadas.

Fonte: Ferronato (2021).

Figura 4. Representação das unidades taxonômicas operacionais (OTU) mais prevalentes em amostras viáveis e totais de leite bovino assepticamente coletadas.

Fonte: Ferronato (2021).

Assim, avaliando os resultados obtidos, foi possível verificar redução (32,23 %) das unidades taxonômicas operacionais (OTU) de comunidades bacterianas viáveis (após tratamento com monoazida de propídio; 9.444 ± 884 OTU) quando comparado com comunidades bacterianas totais (1394 ± 847) em amostras de leite assepticamente coletadas (Figura 5).

Figura 5. Comparação das unidades taxonômicas operacionais (OTU) de comunidades bacterianas totais e viáveis (após tratamento com monoazida de propídio) em amostras de leite assepticamente coletadas ** indica $P = 0,004$.

Fonte: Ferronato (2021).

Ademais, quando avaliamos o número de OTU e a abundância de cada comunidade bacteriana, observamos redução no número de *Bacillus*-OTU, e respectiva abundância, assim como, observado com a *Prevotella*. (Figura 3). Por outro lado, houve aumento significativo do número de *Corynebacterium*-OTU, *Rubrobacter*-OTU, *Pseudomonas*-OTU e *Wolbachia*-OTU, e respectiva abundância (Figura 6).

Figura 6. Valor absoluto (OTU mL⁻¹) de unidades taxonômica operacionais e abundância (%) de microrganismos viáveis e totais em amostras de leite assepticamente coletadas de vacas leiteiras no início da lactação (DEL = 15 dias).

Valores com * indicam diferença estatística. * P 0,0313 **P 0,0021 – 0,0071 ***P 0,0004 ****P <0,0001 Ns: não significativo.

V= viáveis; T = totais

Fonte: Ferronato (2021).

4.4 DISCUSSÃO

Recentemente, nota-se grande interesse no estudo da microbiota da glândula mamária conforme publicação de vários trabalhos nos últimos anos (Taponen *et al.*, 2019; Parente *et al.*, 2020; Porcellato *et al.*, 2020; Tilocca *et al.*, 2020). No entanto, uma importante limitação descrita na literatura sobre a compreensão da complexidade da microbiota da glândula mamária refere-se à detecção de bactérias mortas ou fragmentos bacterianos (Rainard, 2017; Oikonomou *et al.*, 2020), e ainda ao fato que a comparação entre a população bacteriana total apresenta resultados discrepantes quando métodos dependentes e independentes de cultura são aplicados (Oikonomou *et al.*, 2020). Deste modo, a exclusão de bactérias mortas ou fragmentos com o emprego do PMA utilizando metodologia independente de cultura pode aprofundar nosso conhecimento sobre a microbiota da glândula mamária já que bactérias fastidiosas e/ou anaeróbicas obrigatórias (ex. *Bifidobacterium*) podem não ser detectadas em métodos dependente de cultura (Addis *et al.*, 2016). Assim, o presente estudo demonstrou que o emprego do PMA para a detecção apenas de microrganismos viáveis resultou em redução expressiva do número total de OTU, sugerindo que cerca de 1/3 das bactérias detectadas no leite em estudos anteriores de metataxogenômica podem estar relacionadas a bactérias mortas ou a fragmentos de DNA.

Neste contexto, uma redução representativa na população de *Bacillus*-OTU foi observada com diminuição média de aproximadamente 50,93 vezes na abundância e de 48,47 vezes no número de OTU. Esta bactéria já foi detectada em vários estudos que avaliaram o microbioma de amostras de leite assepticamente coletadas de quartos mamários (Oikonomou *et al.*, 2014; Addis *et al.*, 2016; Parente *et al.*, 2020) e de tanque de expansão (Oliveira *et al.*, 2021). *Bacillus* spp. é um patógeno aeróbio, capaz de formar biofilme dentro de tubulações e equipamentos, podendo deteriorar o leite. Além disso, é amplamente distribuída no ambiente, sendo considerado um microrganismo contaminante, o qual é difícil determinar a origem da contaminação.

Similarmente, houve redução de 68,66 vezes na abundância de *Prevotella*-OTU. Este microrganismo já foi detectado em amostras de leite humano (Khodayar-Pardo *et al.*, 2014), e em leite bovino (Hoque *et al.*, 2019). *Prevotella* sp. é um patógeno Gram-negativo que faz parte da microbiota oral, vaginal e intestinal. Seus efeitos na microbiota do hospedeiro, no entanto, ainda não são totalmente compreendidos e interpretações conflitantes têm sido relatadas. Alguns estudos sugerem que *Prevotella* sp. são microrganismos benéficos que colonizam humanos por grandes períodos. Enquanto outros o associam com doenças autoimunes, resistência à insulina e inflamação intestinal (Iljazovic *et al.*, 2021).

Um importante achado do presente estudo com potencial impacto positivo sobre a microbiota da glândula mamária é o aumento de aproximadamente de 16,11 e 18,43 vezes na abundância e número de OTU, respectivamente, nas amostras de leite coletadas assepticamente tratadas com PMA. Neste contexto, *Corynebacterium* sp. já foi identificado como sendo parte da microbiota do útero e canal do teto bovino, por tal motivo, se espera identificá-lo na microbiota do leite. Conforme descrito por Porcellato *et al.* (2020), sugere-se que este faça parte da microbiota no úbere bovino. Seu papel nesse nicho ainda é desconhecido. Assim, especula-se que ele pode ter efeito protetor contra patógenos da mastite por competição, como já demonstrado contra *Staphylococcus* sp. (Addis *et al.*, 2016), corroborado com a observação de Porcellato *et al.* (2020), que ao avaliarem quartos mamários em disbiose, observaram que os índices de *Corynebacterium* sp. encontravam-se em constante decréscimo, em contraste com o crescente predomínio de *Staphylococcus* sp. Além disso, outros estudos sugerem que este pode também apresentar potencial efeito imunomodulador (Blagitiz *et al.*, 2013; Blagitiz *et al.*, 2015), reforçando a ideia de ser uma bactéria comensal da glândula mamária (Addis *et al.*, 2016; Oikonomou *et al.*, 2020; Porcellato *et al.*, 2020) com potencial efeito benéfico.

Curiosamente, nosso estudo foi o primeiro estudo a detectar *Wolbachia*-OTU, bactéria Gram-negativa, amplamente disseminada no ambiente, associada de forma comensal a artrópodes e nematoides filariais, desempenhando papel fundamental na sobrevivência e reprodução dos nematoides, tornando-se alvo potencial para combate a filariose (Landmann, 2019). Destacamos ainda que o uso do PMA, e, portanto, a detecção de apenas bactérias viáveis, levou ao aumento

médio de 113,44 vezes abundância ($10,21 \% \pm 2,33$ versus $0,09 \% \pm 0,04$) e de 189,67 vezes número médio de OTU ($1542 \pm 323,2$ versus $8,13 \pm 3,74$) deste microrganismo. Portanto, uma bactéria que não era praticamente detectável passou a ter um protagonismo importante, e pode explicar o fato desta bactéria não ser descrita nos estudos anteriores, e, portanto, negligenciada, apesar de ser potencialmente originária de contaminações cruzadas, já que é amplamente encontrada no ambiente.

Outro microrganismo que teve aumento de 144,29 e 20,67 vezes abundância e número de OTU, respectivamente, foi *Rubrobacter*-OTU. Esta bactéria já foi identificada em amostras de quartos mamários bovinos coletados assepticamente em estudos anteriores (Addis *et al.*, 2016; Dahlberg *et al.*, 2020; Hoque *et al.*, 2020). É um gênero de *Actinobacteria*, microrganismo Gram-positivo presente no solo que possui perfil radiotolerante.

A amostragem de amostras de leite é um ponto limitante e desafiador nos estudos de microbiota do leite em bovinos (Rainard, 2017; Oikonomou *et al.*, 2020). Neste contexto, o presente estudo apontou aumento de aproximadamente 12,56 vezes e 31,34 vezes na abundância e número de OTU de *Pseudomonas*, respectivamente, em amostras de leite tratadas com PMA. Portanto, o emprego do PMA não reduz o impacto de contaminantes nas amostras, e a entrada de contaminantes em amostras de leite pode ser detectada e impactar de forma significativa na microbiota do leite mesmo quando se limita a detecção apenas de microrganismos viáveis. *Pseudomonas*-OTU já foi detectada em vários estudos com elevados valores de abundância (Addis *et al.*, 2016; Derakhshani *et al.*, 2018; Metzger *et al.*, 2018; Oikonomou *et al.*, 2020). *Pseudomonas* sp. já foi relatada em estudos com microbioma de leite bovino, a qual geralmente está associada a contaminante ambiental (Metzger *et al.*, 2018; Oikonomou *et al.*, 2020). Trata-se de bactéria bastante comum em fontes de água e reagentes de laboratório (Metzger *et al.*, 2018). Apesar disso, é considerada um potencial agente etiológico da mastite bovina (Metzger *et al.*, 2018; Taponen *et al.*, 2019).

Dessa forma, o presente estudo ressalta que a avaliação de bactérias viáveis no leite bovino é essencial para a obtenção de resultados fidedignos. De acordo com Fu *et al.* (2018), não há como evitar a perda de bactérias viáveis, uma vez que essa

ocorre nas etapas de pré-tratamento das amostras, por meio de processos prejudiciais, como por exemplo, a exposição ao oxigênio. Corroborando com isso, bactérias mortas presentes no leite, interferem na análise de bactérias viáveis, uma vez que resultam em uma representação imprecisa de microrganismos vivos.

4.5 CONCLUSÃO

Os estudos sobre o microbioma no leite bovino são recentes, apesar dos inúmeros trabalhos publicados, pouco pode ser afirmado, uma vez que, alguns pontos ainda não foram elucidados, como por exemplo, a avaliação das populações viáveis. Fato que é de extrema importância devido à interferência causada através de resultados biologicamente não compatíveis. O uso de PMA na avaliação de bactérias viáveis pode ser um trampolim para futuras pesquisas sobre viabilidade e a dinâmica desses microrganismos na glândula mamária bovina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDIS, M.F.; TANCA, A.; UZAU, S.; OIKONOMOU, G.; BICALHO, R.C.; MORONI, P. The bovine milk microbiota: insights and perspectives from the –omics studies. **Molecular Biosystems**, 12:2359, 2016.

BARCELOS, M.M.; MARTINS, L.; GRENFELL, R.C.; JULIANO, L.; ANDERSON, K.L.; SANTOS, M.V.; GONCALVES, J.L. Comparison of standard and on-plate extraction protocols for identification of mastitis-causing bacteria by MALDI-TOF MS. **Brazilian Journal of Microbiology**. 2019.

BLAGITZ, M.G.; SOUZA, F. N. ; SANTOS, B. P. ; BATISTA, C. F. ; PARRA, A. C. ; AZEVEDO, L. F. F. ; MELVILLE, P. A. ; BENITES, N. R. ; DELLA LIBERA, A. M. M. P. Function of milk polymorphonuclear neutrophil leukocytes in bovine mammary glands infected with *Corynebacterium bovis*. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 3750-3757, 2013.

BLAGITZ, M. G.; SOUZA, F. N. ; BATISTA, C. F. ; DINIZ, S. A. ; AZEVEDO, L. F. F. ; SILVA, M. X. ; HADDAD, J. P. A. ; HEINEMANN, M. B. ; CERQUEIRA, M. M. O. P. ; DELLA LIBERA, A. M. M. P. Flow cytometric analysis: Interdependence of healthy and infected udder quarters. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 2401-2408, 2015.

CATOZZI, C.; SANCHEZ BONASTRE, A.; FRANCINO, O.; LECCHI, C.; DE CARLO, E.; VECCHIO, D.; MARTUCCIELLO, A.; FRAULO, P.; BRONZO, V.; CUSCO, A.; D'ANDREANO, S.; CECILIANI, F. The microbiota of water buffalo milk during mastitis. **PloS One**, v. 12, n. 9, p. 1 – 20. 2017.

DAHLBERG, J.; WILLIAMS, J.E.; MCGUIRE, M.A.; PETERSON, H.K.; OSTENSSON, K.; AGENAS, S.; DICKSVED, J.; WALLER, P.K. Microbiota of bovine milk, teat skin, and teat canal: Similarity and variation due to sampling technique and milk fraction. **Journal of Dairy Science**, v. 103, p. 7322-7330, 2020.

DERAKHSHANI, H.; FEHR, K.B.; SEPEHRI, S.; FRANCOZ, D.; DE BUCK, J.; BARKEMA, H.W.; PLAIZIER, J.C.; KHAFIPOUR, E. Invited review: Microbiota of the bovine udder: Contributing factors and potential implications for udder health and mastitis susceptibility. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 1-21, 2018.

EISENHOFER, R.; MINICH, J.J.; MAROTZ, C.; COOPER, A.; KNIGHT, R.; WEYRICH, L.S. Contamination in Low Microbial Biomass Microbiome Studies: Issues and Recommendations. **Cell Press Reviews**. n.1637, p. 13, 2018.

FU, X.; ZENG, B.; WANG, P.; WANG, L.; WEN, B.; LI, J.; LIU, H.; BAI, S.; JIA, G. Microbiome of total versus live bacteria in the gut of rex rabbits. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1-10, 2018.

HEISE, J.; NEGA, M.; ALAWI, M.; WAGNER, D. Propidium monoazide treatment to distinguish between live and dead methanogens in pure cultures and environmental samples. **Journal of Microbiological Methods**. V. 121, p – 11-23. 2016.

HOQUE, M.N.; ISTIAQ, A.; CLEMENT, R.A.; SULTANA, M.; CRANDALL, K.A.; SIDDIKI, A.Z.; HOSSAIN, M.A. Metagenomic deep sequencing reveals association of microbiome signature with functional biases in bovine mastitis. **Scientific Reports**, v. 9, 2019.

HOQUE, N.M.; ISTIAQ, A.; CLEMENT, R.A.; GIBSON, K.M.; SAHA, O.; ISLAM, O.K.; ABIR, R.A.; SULTANA, M.; SIDDIKI, A.Z.; CRANDALL, K.A.; HOSSAIN, A.M. Insights Into the Resistome of Bovine Clinical Mastitis Microbiome, a Key Factor in Disease Complication. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 860, 2020.

ILJAZOVIC, A.; ROY, U.; G;ALVEZ, E.J.C.; LESKER, T.R.; ZHAO, B.; GRONOW, A.; AMEND, L.; WILL, S.E.; HOFMANN, J.D.; PILS, M.C.; SCHMIDT-HOHAGEN, K.; NEUMANN-SCHAAL, M.; STROWIG, T. Perturbation of the gut microbiome by *Prevotella* spp. enhances host susceptibility to mucosal inflammation. **Mucosal Immunology**, v. 14, p. 113- 124, 2021.

ISO 13366-2/International Dairy Federation (IDF) 148-2 – Milk – Enumeration of somatic cells –Part 2: Guidance on the operation of fluoro-opto-electronic counters. Brussels, Belgium, 2006.16p.

KHODAYAR-PARDO, P.; PASCUAL, M.L.; COLLADO, M.C.; COSTA. M. Impact of lactation stage, gestational age and mode of delivery on breast milk microbiota. **Journal of Perinatology**, v. 34, p. 599-605, 2014.

LANDMANN, F. The Wolbachia endosymbionts. **American Society for Microbiology**, v. 7, 2019.

LIMA, S.F; TEIXEIRA, A.G; LIMA, F. S; GANDA, E.K; HIGGINS, C.H; OIKONOMOU, G; BICALHO, R.C. The bovine colostrum microbiome and its association with clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 4, p. 3031-3042, 2017.

METZGER, S.A.; HERNANDEZ, L.L.; SUEN, G.; RUEGG, P. Understanding the Milk Microbiota. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, v. 34, P. 427–438, 2018.

OIKONOMOU, G.; BICALHO, M.L.; MEIRA, E.; ROSSI, R.E.; FODITSCH, C.; MACHADO, V.S.; TEIXEIRA, A.G.V.; SANTISTEBAN, C.; SCHUKKEN, Y.H.; BICALHO, R.C. Microbiota of cow's milk; distinguishing healthy, sub-clinically and clinically diseases quarters. **PloS One**,v. 9, 2014.

OIKONOMOU, G.; ADDIS, M.F.; CHASSARD, C.; NADER-MACIAS, M.E.F.; GRANT, I.; DELBES, C.; BOGNI, C.I.; LOIR, Y.L.; EVEN, S. Milk microbiota: What are we exactly talking about? **Frontiers in Microbiology**,v. 11, p. 60, 2020.

OLIVEIRA, A.C.D.; SOUZA, F.N.; SANTÁNNA, F.M.; FAÚLA, L.L.; CHANDE, C.G.; CORTEZ, A.; DELLA LIBERA, A.M.M.P.; COSTA, M.; SOUZA, M.R.; HEINEMANN, M.B.; CERQUEIRA, M.O.P. Temporal and geographical comparison of bulk tank milk and water microbiota composition in Brazilian dairy farms. **Food Microbiology**. 2021.

OLIVER, S.P.; LEWIS, M. J.; GILLESPIE, B.E.; DOWLEN, H.H.; JAENICKE, E.C.; ROBERTS, R.K. Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection and Determination of Milk Quality. 4th ed. Verona, **WI: National Mastitis Council**, 47 p., 2004.

PARENTE, E.; RICCIARDI, A.; ZOTTA, T. The microbiota of dairy milk: A review. **International Dairy Journal**, v. 107, 2020.

PORCELLATO, D.; MEISAL, R.; BOMBELLI, A.; NARVHUS, J. A core microbiota dominates a rich microbial diversity in the bovine udder and may indicate presence of dysbiosis. **Scientific Reports**, n. 10, p. 21608, 2020.

RAINARD, P. Mammary microbiota of dairy ruminants: fact or fiction. **Veterinary Research**, v. 48, 2017.

RUEGG, P.L. A 100 Year Review: mastitis detection management, and prevention. **Journal of Dairy Science**. v. 100, p. 10381-10397. 2017.

TAPONEN, S.; McGUINNESS, D.; HIITIO, H.; SIMOJOKI, H.; ZADOKS, R.; PYORALA, S. Bovine milk microbiome: a more complex issue than expected. **Veterinary Research**. v. 50, n. 44. 2019.

TILOCCA, B.; CONSTANZO, N.; MORITTU, V.M.; SPINA, A.A.; SOGGIU, A.; BRITTI, D.; RONCADA, P.; PIRAS, C. Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. **Journal of Proteomics**, v. 210, 2020.

ZHANG, X. ET AL. The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. **Nature Medicine**, v.21, p. 895–905, 2015.

ZHAO, Y.; CHEN, H.; LIU, H.; CAI, J.; MENG, L.; DONG, L.; ZHENG, N.; WANG, J.; WANG, C. Quantitative polymerase chain reaction coupled with sodium dodecyl sulfate and propidium monoazide for detection of viable *Streptococcus agalactiae* in Milk. **Frontiers in Microbiology**. v. 10, n. 661. 2019.

5. CAPÍTULO 2 – A GLÂNDULA MAMÁRIA BOVINA É ESTÉRIL? EM QUE NÍVEL?

RESUMO

Com o avanço das técnicas moleculares, questionou-se se a glândula mamária é estéril. Assim, inúmeros pesquisadores sugerem que exista uma microbiota, o que divide a opinião dos especialistas. Ao contrário, de quem acredita na existência da microbiota, alguns questionamentos são feitos, principalmente em relação à sensibilidade da análise, uma vez que o método de coleta tradicional, amplamente utilizado nesses estudos, pode permitir a presença de microrganismos contaminantes. Para tal, o presente estudo teve como objetivo avaliar por meio de diferentes técnicas de coleta de leite a existência de uma microbiota própria na glândula mamária bovina, e caso exista, até que porção ela está presente. Para isso, utilizamos oito animais (32 quartos mamários), nos quais foram aplicadas diferentes técnicas de obtenção do material: coleta tradicional, coleta com o emprego de uma cânula, coleta de leite direta da cisterna da glândula e coleta de leite alveolar. Além disso, todas as amostras foram tratadas com monoazida de propídio (PMA), com o intuito de identificar apenas comunidades bacterianas viáveis. Foi possível sequenciar 21,88% (7 amostras de 32) das amostras de leite coletadas por método tradicional, 40,63% (13 amostras de 32) das amostras de leite coletadas com emprego de cânula, 25% (8 amostras de 32) das amostras de leite coletadas diretamente da cisterna da glândula mamária, e 34,37% (11 amostras de 32) das amostras de leite coletadas diretamente da porção alveolar. Dessa forma, foi possível comparar os métodos de coleta de 28,13% (9 amostras de 32). Observou-se um maior número de unidades taxonômicas operacionais com a coleta tradicional do que com emprego de cânula, diretamente da cisterna da glândula mamária, e diretamente da porção alveolar, embora menor abundância de *Prevotella*-OTU observado na coleta tradicional em comparação com as demais. Conclui-se que a metodologia utilizada para a coleta de amostras impacta fortemente sobre os resultados do sequenciamento de alto rendimento, corroborando com a existência de uma microbiota própria da glândula mamária.

Palavras-chave: Alvéolo. Metagenômica. Cisterna da glândula mamária.

CHAPTER 2 - IS THE BOVINE MAMMARY GLAND STERILE? AT WHAT LEVEL?

ABSTRACT

With the advancement of molecular techniques, the mammary gland sterility was put in check. Thus, several researchers suggested that bovine mammary gland has its own microbiota, which divides the opinion of experts. In this regard, some researchers have argued many questions, mainly regarding the sensitivity of the analysis, since the (traditional) collection method, widely used in these studies, is permissive to the presence of contaminants. Thus, the present study aimed to evaluate through different milk collection techniques, the existence of bovine mammary gland owns' microbiota, and if it exists, to what extent it is present. For this, we used eight animals (32 udder quarters), in which different milk collection techniques, as following: traditional collection, collection with the use of a cannula, milk collection directly from the mammary gland cistern and from alveolus. In addition, all samples were treated with propidium monoazide (PMA), in order to identify only viable bacterial communities. In the present study, it was possible to sequence 21.88% (7 samples of 32) of milk samples collected by traditional method, 40.63% (13 samples of 32) of milk samples collected using a cannula, 25% (8 32) samples of milk samples collected directly from the mammary gland cistern, and 34.37% (11 samples of 32) of milk samples collected directly from the alveolar portion. Thus, it was possible to compare the collection methods of 28.13% (9 samples out of 32). In the present study, it was possible to observe a greater number of taxonomic operational units with traditional collection than those collected using a cannula, directly from the cistern of the mammary gland, and directly from the alveolar portion, although less abundance of *Prevotella*-OTU observed in the traditional collection in comparison with the others. Thus, we can conclude that the methodology used for sample collection has a strong impact on high-throughput sequencing outcomes, corroborating the existence of a mammary gland microbiota.

Keywords: Alveolus. Metagenomics. Mammary Gland Cistern.

5.1 INTRODUÇÃO

O leite bovino tem sua origem nas células mioepiteliais no alvéolo, é secretado através dos ductos maiores e menores até a cisterna da glândula, e em seguida é drenado até a cisterna do teto, e a partir disso, é exteriorizado (Couture & Moulon, 2005). Até alguns anos atrás, acreditava-se que a glândula mamária fosse estéril, e a mastite se desenvolveria a partir da entrada de patógenos por via ascendente ao interior da glândula, desenvolvendo assim, a doença (Rainard, 2017). Contudo, com o avanço das técnicas moleculares, muitos pesquisadores passaram a questionar se a glândula mamária é estéril, devido à identificação de populações microbianas na glândula mamária bovina (Oikonomou *et al.*, 2014; Addis *et al.*, 2016). Desse modo, inúmeros pesquisadores vêm buscando responder a grande questão, afinal, a glândula mamária bovina, é estéril? Além disso, outras dúvidas como se possui uma microbiota própria e até que porção ocorre essa colonização têm sido levantadas.

Na tentativa de responder essa questão, muitos cientistas passaram a utilizar o sequenciamento de nova geração para avaliar a possibilidade e/ou sustentar a existência de comunidades microbianas presentes na glândula mamária bovina. Recentemente, vários pesquisadores vêm apresentando dados de populações comensais na glândula mamária (Oikonomou *et al.*, 2014; Addis *et al.*, 2016; Lima *et al.*, 2017; Catozzi *et al.*, 2017; Derakhshani *et al.*, 2018), ao mesmo tempo em que pesquisadores contrários à ideia de uma microbiota própria, levantam pontos que podem impactar e/ou colocar em dúvida os dados apresentados nos trabalhos anteriores. A exemplo, a facilidade de contaminação das amostras, seja na coleta, ou na extração de DNA, fato esse que ainda perturba muitos pesquisadores (Rainard, 2017; Taponen *et al.*, 2019; Porcellato *et al.*, 2020).

Uma das grandes questões acerca dos resultados encontrados, diz respeito à forma de coleta dessas amostras, uma vez que em grande parte dos trabalhos o procedimento é realizado segundo o método preconizado pelo *National Mastitis Council* (NMC), ou seja, “coleta tradicional” (Dahlberg *et al.*, 2020). Isto tem levado alguns pesquisadores a questionarem qual é a melhor técnica de coleta desse material. Devido a essas questões, pesquisadores como Friman *et al.* (2017)

avaliaram a coleta de leite por meio da cânula intramamária e observaram a decrescente quantidade de espécies microbianas nas amostras coletas por meio desta técnica, incluindo *Staphylococcus* sp., e *Streptococcus* sp., provando que amostras coletadas pelo método tradicional possuem uma maior chance de contaminação, quando comparadas a coleta através do uso de cânula.

De modo semelhante, Andrews *et al.* (2019) utilizaram a coleta por meio de cânula, a qual passou por adaptações, em que após a inserção da cânula no canal do teto, era introduzido um catéter com cerca de 14 centímetros que possibilitou aos autores, realizarem a coleta direto da cisterna da glândula. Quando avaliados os resultados dessa adaptação de técnica, observou-se um maior valor de *Turicibacter* sp. e *Clostridium* sp., os quais não têm grande representatividade em amostras coletadas pelo método tradicional.

Do mesmo modo, Hiitio *et al.* (2016), foi além, desafiando a coleta através de punção direta da cisterna da glândula mamária, na qual pode-se observar que a não coleta através do canal do teto reduziu significativamente a quantidade de microrganismos encontrados, dentre os quais *Staphylococcus* sp. Um dado que chama atenção é que a coleta tradicional teve mais que o dobro desse microrganismo quando comparada à técnica por punção da cisterna da glândula, corroborando que grande parte dos *Staphylococcus* sp., identificados em amostras tradicionais, tem sua origem no ápice e/ou canal do teto.

Fato semelhante foi observado por Metzger *et al.* (2018) que, após fazerem amostragem por punção da cisterna da glândula mamária, observaram redução no número de microrganismos identificados quando comparada com a coleta tradicional. Entre os microrganismos identificados que apresentaram redução de seu número, destacam-se *Staphylococcus* sp. e *Corynebacterium* sp. Além disso, algo que é consenso entre os pesquisadores, refere-se ao fato de que como não há um padrão definido de coleta de leite para análise metataxonômica, isto dificulta a comparação entre seus resultados, uma vez que esses podem apresentar limitações de acordo com a técnica de coleta. Assim, ambos os pesquisadores ressaltam que a técnica utilizada para amostragem é fundamental para um resultado preciso e fidedigno (Hiitio *et al.*, 2016; Friman *et al.*, 2017; Metzger *et al.*, 2018; Andrews *et al.*, 2019; Dalberg *et al.*, 2020).

Ressaltamos algumas lacunas existentes nos trabalhos metataxonômicos, como por exemplo, o baixo número de trabalhos que utilizam as técnicas de coleta através de cânula (Friman *et al.*, 2017; Andrews *et al.*, 2019; Dalberg *et al.*, 2020), ou punção da cisterna da glândula mamária (Hiitio *et al.*, 2016; Metzger *et al.*, 2018). Adicionalmente, outros métodos de coleta como, por exemplo, coleta de leite alveolar em bovinos nunca foram descritos assim como, nunca foi realizada a avaliação de microbiota viável no leite bovino.

Perante o exposto, o objetivo do trabalho foi avaliar por meio de diferentes técnicas de coleta de leite, a existência de uma microbiota própria na glândula mamária bovina, e caso exista, até que porção ela está presente.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi submetido à comissão de Ética no uso de animais – CEUA, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), sob protocolo n. 7293280218. O trabalho também foi submetido à CEUA da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), sob protocolo n. 2214240619.

5.2.1 ANIMAIS

O presente estudo foi realizado na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA – Juiz de Fora/Minas Gerais. Foram utilizadas oito vacas primíparas, de raça holandesa, com 15 dias em lactação (DEL). Destes animais, foram coletadas assepticamente amostras de leite de cada quarto mamário para o exame microbiológico, análise de metataxogenômica e contagem de células somáticas (CCS).

Coleta de amostras de leite

Inicialmente, foi realizado o teste da caneca do fundo escuro para identificar a presença de coágulos, flocos ou secreções anormais que poderiam estar presentes no leite, indicando alteração de sua composição. Depois de descartados os três primeiros jatos de leite, a assepsia das extremidades dos tetos foi realizada utilizando algodão umedecido em álcool a 70%, e amostras de leite individuais de cada quarto mamário foram coletadas assepticamente em frascos estéreis (cat. n. 14-956-6A, Fisher Scientific, Pensilvânia, EUA) para análise bacteriológica (aproximadamente 3 mL). As amostras foram enviadas para o Laboratório de Pesquisa em Qualidade do Leite – Qualileite - na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ/USP - Pirassununga/São Paulo.

Posteriormente, realizou-se a coleta para análise metataxogenômica na qual se repetiu a assepsia das extremidades dos tetos com algodão umedecido em álcool a 70%. As amostras de leite individuais de cada quarto mamário foram coletadas

aspticamente em frascos estéreis (cat. n. 14-956-6A, Fisher Scientific, Pensilvânia, EUA) e, para essa análise foram coletados aproximadamente, 2 mL. As amostras foram enviadas para a empresa de Biotecnologia Pesquisa e Inovação - BPI - Botucatu/São Paulo, em caixas isotérmicas contendo gelo.

Na sequência, foram coletadas ainda amostras de leite individuais de cada quarto mamário para análise de CCS e composição do leite. Para tal, foram coletados 40 mL de leite em cada quarto mamário em frascos estéreis contendo bronopol e enviados ao Laboratório de Qualidade do Leite da Empresa Brasileira de Pesquisa em Agropecuária – EMBRAPA – Juiz de Fora/MG, em caixas isotérmicas contendo gelo.

Tradicional

Inicialmente, foi realizado o teste da caneca do fundo escuro para identificar a presença de coágulos, flóculos ou secreções anormais que poderiam estar presentes no leite, indicando alteração de sua composição. Depois de descartados os três primeiros jatos de leite, a assepsia das extremidades dos tetos foi realizada utilizando algodão umedecido em álcool a 70%, e as amostras de leite individuais de cada quarto mamário foram coletadas aspticamente em frascos estéreis (cat. n. 14-956-6A, Fisher Scientific, Pensilvânia, EUA) para análise bacteriológica - aproximadamente 3 mL (Lima *et al.*, 2017).

Figura 7. Representação da coleta de leite através do método tradicional, conforme recomendado pelo *National Mastitis Council* (NMC).

Fonte: Dahlberg *et al.* (2020).

Cânula

Na sequência as extremidades dos tetos foram novamente higienizadas com algodão umedecido em álcool a 70%. Foi inserida a cânula (cat. n. Z-99055, Keratelin Milk Canula, Alemanha) no interior do canal do teto para coleta asséptica de aproximadamente 3 mL para análise bacteriológica (Bexiga *et al.*, 2011) de amostras de leite individuais de cada quarto mamário em frascos estéreis (cat. n. 14-956-6A, Fisher Scientific, Pensilvânia, EUA).

Figura 8. Representação da coleta de leite através da utilização da cânula intramamária

Fonte: Friman *et al.* (2017).

Punção da cisterna da glândula mamária

A punção da cisterna seguiu conforme descrito por Hiitio *et al.* (2016). Previamente a cisterna da glândula recebeu uma camada de pomada de lidocaína, a qual ficou agindo de três a cinco minutos. Na sequência, uma gaze embebida em álcool 70 % foi utilizada para limpar a região. O movimento se repetiu duas vezes até que o ponto de coleta ficasse visivelmente limpo. Em seguida, realizou-se a assepsia da região com auxílio de algodão umedecido em álcool a 70%. Posteriormente, equipado com agulha acoplada ao canhão de coleta a vácuo a mesma foi inserida na cisterna, com o cuidado de desviar da vascularização visível. Foi inserido o tubo de coleta a vácuo sem aditivo (cat. n. FL2-004S, Forlab, São Paulo, Brasil) e foram coletados aproximadamente 3 mL.

Figura 9. Representação da coleta de leite através do método de punção da cisterna da glândula mamária bovina.

Fonte: Ferronato (2021).

Punção alveolar

Para a punção alveolar, seguiram-se os passos da punção de cisterna. Previamente, o alvéolo foi localizado com o auxílio de imagem ultrassonográfica e,

na sequência, o local recebeu uma camada de pomada de lidocaína, a qual ficou agindo de três a cinco minutos. Depois, uma gaze embebida em álcool 70 % foi utilizada para limpar a região e o movimento se repetiu duas vezes, até que o ponto de coleta ficasse visivelmente limpo. Em seguida, realizou-se a assepsia da região com auxílio de algodão umedecido em álcool a 70%. Posteriormente equipado com agulha acoplada ao canhão de coleta a vácuo, a mesma foi inserida na cisterna, com o cuidado de desviar da vascularização visível. Por fim, foi inserido o tubo de coleta a vácuo sem aditivo (cat. n. FL2-004S, Forlab, São Paulo, Brasil) e foram coletados aproximadamente 3 mL.

Contagem de células somáticas

As amostras para CCS foram coletadas em um frasco de 40 mL contendo o conservante bronopol (2-bromo-2-nitropano-1,3-diol) e foram analisadas pelo princípio de citometria de fluxo em equipamento eletrônico Bentley CombSystem 2300 calibrada (Chaska, EUA), segundo ISO (2006).

Exame bacteriológico do leite

A análise bacteriológica foi realizada através do cultivo de 10 µL de acordo Oliver *et al.* (2004) e 100 µL (com o intuito de aumentar a sensibilidade) de leite em ágar sangue de carneiro desfibrinado (5%), os quais foram incubados a 37 °C por 24 a 72 horas. A identificação bacteriana foi determinada utilizando espectrometria de massa com analisador de tempo de voo e ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS), conforme descrito por Barcelos *et al.* (2019). Brevemente, com o auxílio de uma alça descartável, foram selecionadas cinco colônias bacterianas puras e isoladas, as quais foram adicionadas a tubo cônico contendo 300 µL de água Milli-Q autoclavada e 900 µL de etanol, foram homogeneizadas em vortex durante um minuto. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 13.000 x g por dois minutos, foi realizado o descarte do sobrenadante e os sedimentos bacterianos, foram secos à temperatura ambiente durante 5 a 10 minutos. Em seguida, foi adicionada uma solução de ácido fórmico a

70% de acordo com o tamanho do sedimento bacteriano para sua completa dissolução. Na sequência, foi adicionado acetonitrila a 100%, a qual foi acrescentada de acordo com o volume de ácido fórmico, entre a adição dos reagentes, aguardou-se 10 minutos. Após, realizou-se nova centrifugação, a 13.000 x g por dois minutos, para separar as células bacterianas do sobrenadante. O volume de 1 µL de cada extrato bacteriano foi aplicado sob uma placa de aço para secar em temperatura ambiente por 15 minutos. As manchas secas foram eluídas com 1 µL de solução de matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico-HCCA) diluído em 50% de acetonitrila e 2,5% de ácido trifluoroacético. Após, as placas foram secas novamente a temperatura ambiente. Em seguida, o equipamento foi calibrado, tanto com controle positivo (*E. coli*), quanto com a solução matriz e ácido fórmico, e então as amostras foram analisadas.

Além disso, para a obtenção das unidades formadoras de colônias (UFC) das amostras de leite foi realizada inoculação de 100 µL de leite em placa por meio de alça de Drigalski, já para as amostras de 10 µL foi utilizada a técnica de esgotamento. As amostras de leite inoculadas com 100 µL de leite que apresentaram elevada (acima de 300 UFC) contagem bacteriana foram diluídas de forma seriada 1:10.

4.2.2 ANÁLISE METATAXOGENÔMICA

Preparação das amostras

Conforme recomendado por Oikonomou *et al.* (2014), previamente à extração de DNA, as amostras passaram pela etapa de remoção de gordura, na qual 1 mL de leite foi centrifugado a 8.000 x g durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente, o sobrenadante e a gordura foram descartados e o *pellet* foi ressuspensão em PBS estéril (cat. n.14200075, ThermoFisher - EUA). Essa etapa foi repetida três vezes, seguida por novas centrifugações a cada ressuspensão (8.000 x g durante 5 minutos a 4°C). Ao final, foi ressuspensão em 250 µL de PBS e submetida o tratamento com PMA (determinação de comunidade bacteriana viável), e/ou extração de DNA (sem tratamento com PMA – comunidade bacteriana total).

Além disso, como em todas as outras etapas, nessa também optamos em minimizar o máximo possível os contaminantes ambientais e a contaminação cruzada. Para tal, foram utilizados tubos cônicos de 1,5 mL estéreis, livres de DNA e RNA (cat. n. MCT-150-C, Axygen, Arizona, EUA), assim como ponteiros (10, 200, 1000 μ L, cat. n. TF-300-R-S, TF-200-R-S, TF-1000-R-S, Axygen, Arizona, EUA, respectivamente), todas estéreis, livres de DNA e RNA, e com filtro. Além disso, conforme descrito por Eisenhofer *et al.* (2018), antes da utilização da cabine de fluxo laminar a mesma era severamente higienizada com hipoclorito de sódio a 3% e álcool 70%. Somado a isso, todos os utensílios utilizados para o processamento eram higienizados com álcool 70% e alocados na cabine de fluxo e submetidos ao processo de irradiação ultravioleta (UV) por 20 minutos. Este processo era repetido no início e ao final do dia. Por fim, somado a todos estes passos, tomamos o cuidado de uma única pessoa realizar a coleta e o processamento de todo material. O executor usou vestimentas adequadas (jaleco, touca, luva e máscara descartáveis), a fim de promover a redução máxima de contaminação ambiental.

Tratamento com *PMA Dye*

Nós utilizamos o *PMA Dye* em nossas amostras, seguindo o protocolo descrito por Fu *et al.* (2018), com algumas modificações propostas por Zhao *et al.* (2019), conforme descritos a seguir.

O PMAxx 20 mM em água (cat. n. 40069, Biotium, Califórnia, EUA) foi dissolvido em 20% de dimetilsulfóxido (DMSO) (cat. n. D8418, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) para obter uma solução estoque 10X, a qual foi armazenada a 20 °C no escuro. A concentração de PMA em todas as amostras foi ajustada para 100 μ mol L⁻¹ (25 μ L de PMAxx em 225 μ L da amostra) e depois incubada por 20 minutos no escuro. Para a ativação do PMA, as amostras foram expostas ao dispositivo de fotólise PMA Lite Led (cat. n. E90002, Biotium, Califórnia, EUA), por 15 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 10.000 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas duas vezes com PBS (cat. n. 14200075, Thermo Fisher, EUA). Em seguida, as amostras foram armazenadas a -20° C para posterior extração de DNA.

Extração do DNA

O DNA das amostras do leite foi extraído utilizando o kit PowerSoil DNA Isolation kit (cat. n. 12888-100, Qiagen, EUA seguindo instruções do manual do fabricante. A qualidade e quantidade do DNA extraído foi determinada por espectrofotometria, por meio do equipamento NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific).

Amplificação região 16S (V3-V4)

As reações de PCR foram feitas tendo como volume final 20 µL, contendo 10 µL de GoTaq® Colorless Master Mix 2x (Promega, USL), 1 µL (concentração de 10µM) de oligonucleotídeo *forward*, 1 µL (concentração de 10 µM) de oligonucleotídeo *reverse* e 8 µL de DNA genômico. Para a amplificação foram utilizados os *primers* descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para na amplificação das regiões V3 e V4 para a quantificação absoluta de DNA.

Iniciador	Sequência 5'-3'
16S V3-V4 F	5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3'
16S V3-V4 R	5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3'

Fonte: Ferronato (2021).

Legenda: F: *forward*, R: *reverse*.

O programa de amplificação consistiu em desnaturação inicial a 95 °C por 3 minutos, seguida por 27 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 30 segundos extensão a 72 °C por 30 segundos e uma extensão final a 72 °C por 5 minutos. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems). Após reação de

amplificação de cada amostra comprovamos à amplificação, através de eletroforese em gel de agarose 2% corado com UniSafe Dye 0,03% (v/v). ~600pb (tamanho do *amplicon*).

Reação de Indexação

Nesta etapa foram inseridos os indexadores nos adaptadores comuns que são necessários para a geração de *clusters* e sequenciamento das amostras. A reação de indexação foi realizada seguindo o protocolo do kit Nextera XT Index (Illumina). O programa de amplificação consistiu de incubação a 72 °C por 3 minutos, desnaturação inicial a 95 °C por 30 segundos, seguidos de 12 ciclos de 95 °C por 10 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos e extensão final a 72 °C por 5 minutos. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems).

Purificação e Quantificação da Biblioteca

As bibliotecas geradas foram submetidas às etapas de purificação utilizando *bead* magnética Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter), para remoção de fragmentos muito pequenos da população total de moléculas e restos de *primers*. Após, realizou-se a quantificação das bibliotecas de sequenciamento de alto rendimento pela metodologia de PCR Tempo Real, utilizando o equipamento QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) e kit KAPA Library Quantification Kit - Illumina/Universal (Roche), segundo o protocolo do fabricante. Gerou-se *pool* equimolar de DNA pela normalização de todas as amostras a 4nM para realização do sequenciamento utilizando-se o sistema Illumina MiSeq de sequenciamento de nova geração (Illumina® Sequencing) e kit MiSeq Reagent V2 500 ciclos – leitura de 2 x 250pb.

4.2.3 REAÇÃO DA CADEIA POLIMERASE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (QPCR)

Quantificação 16S no DNA total via qPCR

O DNA passou também por quantificação absoluta por qPCR. As reações de qPCR foram realizadas tendo volume final de 10 μ L, contendo 5 μ L de PowerUp SYBR Green Master Mix (ThermoFisher Scientific), 1,0 μ L de oligonucleotídeo *forward* à 10 μ M, 1,0 μ L de oligonucleotídeo *reverse* à 10 μ M e 3,0 μ L de DNA diluído 1:10. As sequências dos oligonucleotídeos utilizadas são as mesmas listadas na Tabela 2.

Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para na amplificação das regiões V3 e V4 para a quantificação absoluta DNA.

Iniciador	Sequência 5'-3'
GenBac1055f	ATGGCTGTCGTCAGCT
GenBac1392r	ACGGGCGGTGTGTAC

Fonte: Ferronato (2021).

Legenda: F: *forward*, R: *reverse*.

O programa de quantificação consistiu em incubação inicial para ativação da UDG a 50 °C por 2 minutos, desnaturação inicial a 95 °C por 10 minutos, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos, anelamento a 58 °C por 1 minuto, e curva de *melting* seguindo o recomendado pelo kit PowerUp SYBR Green Master Mix (ThermoFisher Scientific). As reações de quantificação foram conduzidas no termociclador QuantStudio 3 Real-Time PCR System (AppliedBiosystems). A concentração foi estimada através da quantificação da curva padrão (pontos seriados 1:10) do plasmídeo pCR[®]2.1 (Invitrogen) com a inserção do gene 16S rRNA da família *Peptococcaceae* sp. (Acesso: KJ522755).

Processamento Bioinformático das sequências obtidas

As análises foram realizadas no ambiente do R Studio Versão 1.4.1103 sendo o principal pacote o "phyloseq" do R de acordo com o manual Github para importação e análise dos dados. Foi realizada a normalização das amostras pelo tamanho máximo de *reads*. Para plotar os gráficos de abundância, foram filtrados os OTU que estavam entre os 20% mais abundantes e usadas à função "plot_bar". A curva de rarefação foi feita pela opção "rarecurve" do phyloseq. Para plotar os heatmaps, foram utilizados a função "plot_heatmap" usando o método "NMDS" e distância de "bray" (Bray-Curtis). A alpha diversidade foi feita com a função "estimate_richness" e as imagens pela função "plot_richness". Para a beta diversidade foi utilizada a distância de "bray" e plotado por PCOA com a função "plot_ordination". Foi ainda realizado teste Permanova (Análise Anova Permutacional) usando a função "adonis" do pacote "vegan". Por fim, foi feito o teste de abundância diferenciada das OTU pelo DESeq2 entre todos os grupos.

Para a análise estatística e comparação dos resultados da microbiota total e viável, o programa estatístico GraphPad 9.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA) foi utilizado. Inicialmente, para comparação dos dados entre os grupos amostrais, a exemplo: comparação entre amostras de leite total e viáveis foi aplicado o teste de Shapiro Wilk. As variáveis não paramétricas foram submetidas ao teste de Wilcoxon e as paramétricas ao teste de estatístico T de *Student* para amostras pareadas. O valor de $P \leq 0,05$ foi considerado como significativo.

5.3 RESULTADOS

No presente estudo, das 32 amostras de leite oriundas de oito animais, 28,13% (9 quartos) foram sequenciadas. Das amostras que não foram sequenciadas, 21,88 % (7 amostras de 32) são oriundas da coleta tradicional; 40,63% (13 amostras de 32) são oriundas de coleta através do uso da cânula; 25% (8 amostras de 32) são oriundas de coleta por punção da cisterna da glândula e 34,37% (11 amostras de 32) são oriundas de coleta alveolar. Os dados da CCS, qPCR e do exame microbiológico estão apresentados no Apêndice 2 na sessão Apêndices.

Os resultados da diversidade microbiana (abundância e número de OTU) das amostras de leite coletadas por diferentes técnicas (tradicional, cânula, cisterna e alvéolo) podem ser observados na Figura 10.

Figura 10. Unidades taxonômicas operacionais (OTU) e abundância relativa das comunidades bacterianas entre as diferentes técnicas de coletas: 1) coleta tradicional de leite conforme recomendado pelo *National Mastitis Council*; 2) coleta de leite com emprego de uma cânula; 3) coleta de leite diretamente da cisterna da glândula mamária; 4) coleta de leite diretamente da porção alveolar da glândula mamária.

Fonte: Ferronato (2021).

A seguir, está representada a comparação dos microrganismos mais relevantes entre coleta tradicional x cânula (Figura 11); tradicional x cisterna (Figura 12); tradicional x alvéolo (Figura 13); cânula x cisterna (Figura 14); cânula x alvéolo (Figura 15) e cisterna x alvéolo (Figura 16), todas em escala logarítmica (2).

Figura 11. Comparação dos microrganismos mais abundantes nas amostras coletadas pelo método tradicional x cânula de leite bovino, apresentado em escala de log2.

Fonte: Ferronato (2021).

Figura 12. Comparação dos microrganismos mais abundantes nas amostras coletadas pelo método tradicional x cisterna de leite bovino, apresentado em escala de log2.

Fonte: Ferronato (2021).

Figura 13. Comparação dos microrganismos mais abundantes nas amostras coletadas pelo método tradicional x alvéolo de leite bovino, apresentado em escala de log2.

Fonte: Ferronato (2021).

Figura 14. Comparação dos microrganismos mais abundantes nas amostras coletadas pelo método cânula x cisterna de leite bovino, apresentado em escala de log2.

Fonte: Ferronato (2021).

Figura 15. Comparação dos microrganismos mais abundantes nas amostras coletadas pelo método cânula x alvéolo de leite bovino, apresentado em escala de log2.

Fonte: Ferronato (2021).

Figura 16. Comparação dos microrganismos mais abundantes nas amostras coletadas pelo método cisterna x alvéolo de leite bovino, apresentado em escala de log2.

Fonte: Ferronato (2021).

Na Figura 17 é representada a abundância total de OTU em amostras de leite bovino coletadas por diferentes métodos (tradicional, cânula, cisterna e alvéolo) e na Figura 18, podem, ainda, ser observadas as OTU mais prevalentes em amostras de leite coletadas por diferentes métodos (tradicional, cânula, cisterna e alvéolo).

Figura 17. Representação da abundância total de unidades taxonômicas operacionais (OTU) em amostras de leite bovino coletado por diferentes métodos: 1) coleta tradicional de leite conforme recomendado pelo *National Mastitis Council*; 2) coleta de leite com emprego de uma cânula; 3) coleta de leite diretamente da cisterna da glândula mamária; 4) coleta de leite diretamente da porção alveolar da glândula mamária.

Fonte: Ferronato (2021).

Figura 18. Representação das unidades taxonômicas operacionais (OTU) mais prevalentes em amostras de leite bovino coletados por diferentes métodos: 1) coleta tradicional de leite conforme recomendado pelo *National Mastitis Council*; 2) coleta de leite com emprego de uma cânula; 3) coleta de leite diretamente da cisterna da glândula mamária; 4) coleta de leite diretamente da porção alveolar da glândula mamária.

Fonte: Ferronato (2021).

A coleta tradicional de leite conforme recomendado pelo NMC apresentou maior número de OTU que as coletas de amostras de leite com o emprego de uma cânula ($P = 0,02$), assim como diretamente da cisterna da glândula mamária ($P = 0,0002$) e da coleta alveolar ($P = 0,002$) (Figura 19).

Figura 19. Comparação das unidades taxonômicas operacionais (OTU) por diferentes métodos de coleta: 1) coleta tradicional de leite conforme recomendado pelo *National Mastitis Council*; 2) coleta de leite com emprego de uma cânula; 3) coleta de leite diretamente da cisterna da glândula mamária; 4) coleta de leite diretamente da porção alveolar da glândula mamária.

*Diferença estatística $P = 0,0330$ ** $P = 0,0044$ *** $P = 0,0005$ **** $P < 0,0001$

Fonte: Ferronato (2021).

Um importante achado do presente estudo foi a maior abundância de *Prevotella*-OTU nas amostras de leite coletadas com o emprego de uma cândia ($P = 0,03$; 82,63 vezes maior), assim como diretamente da cisterna da glândula mamária ($P = 0,03$; 44,92 vezes maior) e da coleta alveolar ($P = 0,04$; 56,53 vezes maior) que do a coleta tradicional (Figura 20). Similarmente, as amostras de leite coletadas com o emprego de uma cândia ($P = 0,03$; 10,82 vezes maior) apresentaram maior OTU que da coleta tradicional, além de tendência a maior número de OTU da coleta alveolar ($P = 0,07$; 7,54 vezes maior) que a coleta tradicional (Figura 20).

No presente estudo foi também observada menor abundância de *Wolbachia*-OTU na coleta diretamente da porção alveolar que a coleta tradicional ($P = 0,01$; 24,57 vezes maior), apesar de tendência a menor abundância deste microrganismo na cisterna da glândula mamária ($P = 0,055$; 3,03 vezes maior) que a coleta tradicional (Figura 20). Finalmente, maior abundância de *Acinetobacter*-OTU foi encontrada em amostras de leite coletadas diretamente da cisterna da glândula mamária que com o auxílio de uma cândia ($P = 0,03$; 9,67 vezes maior), além de tendência de menor abundância de *Acinetobacter*-OTU em amostras de leite coletadas diretamente da porção alveolar ($P = 0,06$; 10,73 vezes maior) (Figura 20).

Figura 20. Valor absoluto (OTU mL⁻¹) de unidades taxonômicas operacionais e abundância (%) de microrganismos identificados por meio de diferentes métodos de coleta: 1) coleta tradicional de leite conforme recomendado pelo *National Mastitis Council*; 2) coleta de leite com emprego de uma cânula; 3) coleta de leite diretamente da cisterna da glândula mamária; 4) coleta de leite diretamente da porção alveolar da glândula mamária.

Valores com * indicam diferença estatística *P = 0,0117 – 0,0391

Fonte: Ferronato (2021).

5.4 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a coleta tradicional recomendada pelo NMC, apesar de ser realizada pela maioria dos estudos publicados sobre o assunto (Oikomonou *et al.*, 2014; Dahlberg *et al.*, 2019; Taponen *et al.*, 2019; Vasquez *et al.*, 2019; Oikomonou *et al.* 2020; Porcellato *et al.*, 2020), impacta de forma expressiva a diversidade de amostras. Portanto, tais resultados devem ser criteriosamente revistos, conforme proposto por Rainard (2017), Metzger *et al.* (2018) e Taponen *et al.* (2019). No entanto, não encontramos diferenças entre os resultados da diversidade das comunidades bacterianas analisadas quando as amostras de leite foram oriundas do canal do teto coletadas com o emprego de uma cânula, e aquelas coletadas diretamente da cisterna e da porção alveolar da glândula mamária, que devem ser consideradas como de baixa massa, devido ao baixo número de OTU, o que torna ainda mais desafiador o estudo da microbiota da glândula mamária bovina. Desta forma, uma série de cuidados devem ser tomados quando se trabalha com amostras de baixa biomassa (Glassing *et al.*, 2016; Eisenhofer *et al.*, 2018; Stinson *et al.*, 2018; Dahlberg *et al.*, 2019).

Apesar da coleta de amostras de leite com o emprego de cânula (Friman *et al.*, 2017) e da cisterna da glândula mamária (Hiitio *et al.*, 2016) ter sido alvo de estudos anteriores, este é o primeiro estudo que buscou avaliar a microbiota da glândula mamária da porção mais profunda do úbere, ou seja, da porção alveolar. Ademais, este é o primeiro estudo que avaliou apenas as comunidades bacterianas viáveis de amostras de leite coletadas de diferentes formas e nichos da glândula mamária, o que torna os resultados mais fidedignos já que o material genético de fragmentos de DNA e bactérias mortas não é amplificado.

Um fato que nos chamou a atenção e que corrobora, pelo menos em parte, a existência de uma microbiota própria da glândula mamária foi a maior abundância em número de *Prevotella*-OTU. Neste cenário, destacamos que este microrganismo já foi detectado em amostras de leite humano, considerado benéfico, pois colonizam humanos por longos períodos de tempo (Khodayar-Pardo *et al.*, 2014). No entanto, são poucas as pesquisas que identificaram esse microrganismo em bovinos

(Falentin, *et al.*, 2016; Lima *et al.*, 2017; Hoque *et al.*, 2020). *Prevotella* sp. é um patógeno Gram-negativo comumente identificado na microbiota oral de humanos (Cabrera-Rubio *et al.*, 2012), fato que justificaria sua presença no leite humano, uma vez que as mães estão em constante amamentação. Os efeitos desse microrganismo ainda não são totalmente compreendidos e interpretações conflitantes têm sido relatadas. Na maioria dos artigos publicados, relata-se a presença do microrganismo associada ao desenvolvimento de doenças autoimunes, diabetes e inflamação intestinal (Leite *et al.*, 2017; Iljazovic *et al.*, 2021).

Em camundongos, foi curiosamente observado que *Prevotella* sp., junto com bactérias filamentosas segmentadas e *Helicobacter* sp. estão entre as mais abundantes bactérias revestidas com imunoglobulina do tipo IgA (Iljazovic *et al.*, 2021) que está associada à resposta de mucosa, trazendo para a discussão questões levantadas por Rainard (2017) e Metzger *et al.* (2018) sobre a caracterização da glândula mamária bovina devido ao seu predomínio de imunoglobulinas do tipo IgG, o que contraria a resposta de mucosa que possui predomínio de IgA.

Estudos avaliando a relação de *Prevotella* sp. com doença inflamatória intestinal, como o de Leite *et al.* (2017) demonstram que *Prevotella* sp. ativa predominantemente os receptores *Toll-Like* (TLR)2 e induz resposta de Th17 pró-inflamatória. Além disso, esse microrganismo pode induzir a secreção de interleucinas IL-6 e IL-8 através das células epiteliais, favorecendo resposta do tipo Th17 e recrutamento de neutrófilos, culminando assim, na inflamação da mucosa intestinal que gera uma disseminação sistêmica de mediadores inflamatórios, possibilitando o aumento da permeabilidade intestinal e translocação de produtos bacterianos que amplificam e promovem a inflamação sistêmica (Larsen *et al.*, 2017).

Por meio desses achados, é questionável se esse comportamento da *Prevotella* sp. observado em doença inflamatória intestinal pode ocorrer na glândula mamária bovina, uma vez que poucos estudos anteriores detectaram esse microrganismo. No entanto, esses estudos não avaliaram apenas a população viável, e conforme já citado, as populações totais podem interferir de forma negativa nos resultados obtidos. Além disso, é importante questionar qual é o real papel da

Prevotella sp. frente ao sistema imune. Estaria esse microrganismo relacionado com a microbiota própria do leite bovino?

5.5 CONCLUSÃO

Desse modo, os estudos sobre o microbioma do leite bovino são recentes, e ainda precisam ser melhor compreendidos, uma vez que, inúmeros fatores podem afetar o resultado obtido, desde as metodologias para obtenção das amostras, até a forma como estas são avaliadas. Ademais, ressaltamos que a avaliação de comunidades viáveis é fundamental para obtenção de resultados condizentes, e a partir destes, possam ser definidos os microrganismos envolvidos na microbiota do leite bovino, bem como, qual o papel desses na mastite bovina. Por fim, esperamos que a partir do nosso estudo, outros venham avaliar a microbiota viável podendo elucidar melhor a real função da *Prevotella* sp, presente no leite bovino.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDIS, M.F.; TANCA, A.; UZAU, S.; OIKONOMOU, G.; BICALHO, R.C.; MORONI, P. The bovine milk microbiota: insights and perspectives from the -omics studies. **Molecular Biosystems**, 12:2359, 2016.

ANDREWS, T.; NEHER, D.A.; WEICHT, T.R.; BARLOW, J.W. Mammary microbiome of lactating organic dairy cows varies by time, tissue site, and infection status. **Plos One**, v. 14, p. 11, 2019.

BARCELOS, M.M.; MARTINS, L.; GRENFELL, R.C.; JULIANO, L.; ANDERSON, K.L.; SANTOS, M.V.; GONCALVES, J.L. Comparison of standard and on-plate extraction protocols for identification of mastitis-causing bacteria by MALDI-TOF MS. **Brazilian Journal of Microbiology**. 2019.

BEXIGA, R.; PEREIRA, H.; PEREIRA, O.; LEITÃO, A.; CARNEIRO, C.; ELLIS, K, A.; VILELA, C. Observed reduction in recovery of *Corynebacterium* spp. From bovine milk samples by use of a teat cannula. **Journal of Dairy Research**, v. 78, p. 9-14, 2011.

CABRERA-RUBIO, R.; COLLADO, M.C.; LAITINEN, K.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E.; MIRA, A. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 96, n. 544-551, 2012.

CATOZZI, C.; SANCHEZ BONASTRE, A.; FRANCINO, O.; LECCHI, C.; DE CARLO, E.; VECCHIO, D.; MARTUCCIELLO, A.; FRAULO, P.; BRONZO, V.; CUSCO, A.; D'ANDREANO, S.; CECILIANI, F. The microbiota of water buffalo milk during mastitis. **PloS One**, v. 12, n. 9, p. 1 – 20. 2017.

COUTURE, Y.; MOULON, P.Y. Procedures and surgeries of the teat. **Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice**. V. 21, p. 173-204, 2005.

DAHLBERG, J.; SUN, L.; WALLER, K.P.; OSTENSSON, K.; MCGUIRE, M.; AGENAS, S.; DICKSVED, J. Microbiota data from low biomass milk samples is markedly affected by laboratory and reagent contamination. **Plos One**, V. 14, n. 6, p 1-17. 2019.

DAHLBERG, J.; WILLIAMS, J.E.; MCGUIRE, M.A.; PETERSON, H.K.; OSTENSSON, K.; AGENAS, S.; DICKSVED, J.; WALLER, P.K. Microbiota of bovine milk, teat skin, and teat canal: Similarity and variation due to sampling technique and milk fraction. **Journal of Dairy Science**, v. 103, p. 7322-7330, 2020.

DERAKHSHANI, H.; FEHR, K.B.; SEPEHRI, S.; FRANCOZ, D.; DE BUCK, J.; BARKEMA, H.W.; PLAIZIER, J.C.; KHAFIPOUR, E. Invited review: Microbiota of the

bovine udder: Contributing factors and potential implications for udder health and mastitis susceptibility. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 1-21, 2018.

EISENHOFER, R.; MINICH, J.J.; MAROTZ, C.; COOPER, A.; KNIGHT, R.; WEYRICH, L.S. Contamination in Low Microbial Biomass Microbiome Studies: Issues and Recommendations. **Cell Press Reviews**. n.1637, p. 13, 2018.

FALENTIN, H.; RAULT, L.; NICOLAS, A.; BOUCHARD, D.S.; LASSALAS, J.; LAMBERTON, P.; AUBRY, J.M.; MARNET, P.G.; LOIR, Y.L.; EVEN, S. Bovine Teat Microbiome Analysis Revealed Reduced Alpha Diversity and Significant Changes in Taxonomic Profiles in Quarters with a History of Mastitis. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2017.

FRIMAN, M.; HIITIO, H.; NIEMI, M.; HOLOPAINEN, J.; PYÖRÄLÄ, S.; SIMOJOKI, H. The effect of a canula milking sampling technique on the microbiological diagnosis of bovine mastitis. **The Veterinary Journal**, v. 2, n. 26, p. 57 -61. 2017.

FU, X.; ZENG, B.; WANG, P.; WANG, L.; WEN, B.; LI, J.; LIU, H.; BAI, S.; JIA, G. Microbiome of total versus live bacteria in the gut of rex rabbits. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1-10, 2018.

GLASSING, A.; DOWD, S.E.; GALANDIUK, S.; DAVIS, B.; CHIODINI, R.J. Inherent bacterial DNA contamination of extraction and sequencing reagents may affect interpretation of microbiota in low bacterial biomass samples. **Gut Pathogens**, p. 8-24, 2016.

HIITIO, H.; SIMOJOKI, H.; KALMUS, P.; HOLOPAINEN, J.; PYORALA, S.; TAPONEN, S. The effect of sampling technique on PCR-based bacteriological results of bovine milk samples. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 6532-6541, 2016.

HOQUE, N.M.; ISTIAQ, A.; CLEMENT, R.A.; GIBSON, K.M.; SAHA, O.; ISLAM, O.K.; ABIR, R.A.; SULTANA, M.; SIDDIKI, A.Z.; CRANDALL, K.A.; HOSSAIN, A.M. Insights Into the Resistome of Bovine Clinical Mastitis Microbiome, a Key Factor in Disease Complication. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 860, 2020.

ILJAZOVIC, A.; ROY, U.; G;ALVEZ, E.J.C.; LESKER, T.R.; ZHAO, B.; GRONOW, A.; AMEND, L.; WILL, S.E.; HOFMANN, J.D.; PILS, M.C.; SCHMIDT-HOHAGEN, K.; NEUMANN-SCHAAL, M.; STROWIG, T. Perturbation of the gut microbiome by *Prevotella* spp. enhances host susceptibility to mucosal inflammation. **Mucosal Immunology**, v. 14, p. 113- 124, 2021.

ISO 13366-2/International Dairy Federation (IDF) 148-2 – Milk – Enumeration of somatic cells – Part 2: Guidance on the operation of fluoro-opto-electronic counters. Brussels, Belgium, 2006.16p.

KHODAYAR-PARDO, P.; PASCUAL, M.L.; COLLADO, M.C.; COSTA, M. Impact of lactation stage, gestational age and mode of delivery on breast milk microbiota. **Journal of Perinatology**, v. 34, p. 599-605, 2014.

LARSEN, J.J. The Immune Response to Prevotella Bacteria in Chronic Inflammatory Disease. **Immunology**, v. 151, p. 363-374, 2017.

LEITE, A.Z.; RODRIGUES, N.C.; GONZAGA, M.I.; PAIOLO, J.C.C.; SOUZA, C.A.; STEFANUTTO, N.A.V.; OMORI, W.P.; PINHEIRO, D.G.; BRISTOTTI, J.L.; MATHEUCCI, E.J.; MARIANO, V.S.; OLIVEIRA, G.L.V. Detection of increased Plasma interleukin-6 levels and Prevalence of Prevotella copri and Bacteroides vulgatus in the Feces of Type 2 Diabetes Patients. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 2017.

LIMA, S.F; TEIXEIRA, A.G; LIMA, F. S; GANDA, E.K; HIGGINS, C.H; OIKONOMOU, G; BICALHO, R.C. The bovine colostrum microbiome and its association with clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 4, p. 3031-3042, 2017.

METZGER, S.A.; HERNANDEZ, L.L.; SUEN, G.; RUEGG, P. Understanding the Milk Microbiota. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, v. 34, P. 427–438, 2018.

OIKONOMOU, G.; BICALHO, M.L.; MEIRA, E.; ROSSI, R.E.; FODITSCH, C.; MACHADO, V.S.; TEIXEIRA, A.G.V.; SANTISTEBAN, C.; SCHUKKEN, Y.H.; BICALHO, R.C. Microbiota of cow's milk; distinguishing healthy, sub-clinically and clinically diseases quarters. **PloS One**, 9(11):e85904, 2014.

OIKONOMOU, G.; ADDIS, M.F.; CHASSARD, C.; NADER-MACIAS, M.E.F.; GRANT, I.; DELBES, C.; BOGNI, C.I.; LOIR, Y.L.; EVEN, S. Milk microbiota: What are we exactly talking about? **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 60, 2020.

OLIVER, S.P.; LEWIS, M. J.; GILLESPIE, B.E.; DOWLEN, H.H.; JAENICKE, E.C.; ROBERTS, R.K. Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection and Determination of Milk Quality. 4th ed. Verona, WI: **National Mastitis Council**, 47 p., 2004..

PORCELLATO, D.; MEISAL, R.; BOMBELLI, A.; NARVHUS, J. A core microbiota dominates a rich microbial diversity in the bovine udder and may indicate presence of dysbiosis. **Scientific Reports**, n. 10, p. 21608, 2020.

RAINARD, P. Mammary microbiota of dairy ruminants: fact or fiction. **Veterinary Research**, v. 48, n. 1, 2017.

STINSON, L.F.; KEELAN, J.A.; PAYNE, M.S. Identification and removal of contaminating microbial DNA from PCR reagents: impact on low-biomass microbiome analyses. **Letters in Applied Microbiology**, v. 68, p. 2-8, 2018.

TAPONEN, S.; McGUINNESS, D.; HIITIO, H.; SIMOJOKI, H.; ZADOKS, R.; PYORALA, S. Bovine milk microbiome: a more complex issue than expected. **Veterinary Research**. v. 50, n. 44. 2019.

VASQUEZ, A.K.; GANDA, E.K.; CAPEL, M.B.; EICKER, S.; VIRKLER, P.D.; BICALHO, R.C.; NYDAM, D.V. The microbiome *Escherichia coli* and culture-negative non severe clinical mastitis: Characterization and associations with linear score and milk production. **Journal of Dairy Science**, v. 102, p. 578-594, 2019.

ZHAO, Y.; CHEN, H.; LIU, H.; CAI, J.; MENG, L.; DONG, L.; ZHENG, N.; WANG, J.; WANG, C. Quantitative polymerase chain reaction coupled with sodium dodecyl sulfate and propidium monoazide for detection of viable *Streptococcus agalactiae* in Milk. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 661. 2019.

CAPÍTULO 3 - IMPACTO DA OCLUSÃO DO CANAL DO TETO E DAS INFECÇÕES INTRAMAMÁRIAS SOBRE O MICROBIOMA DA SECREÇÃO COLOSTRAL NO PERÍODO PRÉ-PARTO EM NOVILHAS E SEU REFLEXO NA SAÚDE DA GLÂNDULA MAMÁRIA NO PRIMEIRO MÊS DE LACTAÇÃO

RESUMO

Nos últimos anos, tivemos inúmeros trabalhos apresentando questões sobre mastite em novilhas que ainda é mais desafiadora, uma vez que esses animais ainda estão em fase de crescimento e o acometimento nessa fase gera impactos negativos sobre toda sua vida produtiva. Com a popularização das técnicas de sequenciamento de nova geração, houve interesse em avaliar a metagenômica do colostro bovino. Dados os fatos, é conhecido que com aproximação do parto, pode ocorrer a perda do tampão de queratina, o qual pode facilitar a colonização bacteriana. Assim, espera-se que as populações que se instalam na glândula nesse período, possam impactar de forma benéfica ou não, durante toda a vida produtiva desse animal. Portanto, o presente estudo objetivou avaliar o impacto da oclusão do canal do teto sobre o microbioma da secreção colostrar no período pré-parto em novilhas e seu reflexo na saúde da glândula mamária no primeiro mês de lactação. No presente estudo, acompanhamos dez animais no período de pré-parto ($\pm$ 4 dias), classificando os tetos como abertos e fechados, e coletando a secreção colostrar para análise metagenômica, bem como, o acompanhamento desses animais durante o primeiro mês de lactação. Obteve-se sucesso no sequenciamento de 37,5% (15 amostras de 40), sendo possível êxito no sequenciamento em 87,5% (7 amostras de 8) das amostras de colostro obtidas de tetos classificados como abertos, embora apenas 25% (8 amostras de 32) foram sequenciadas nos tetos considerados como fechados. As amostras de colostro oriundas de tetos considerados fechados resultaram em maior número de unidades taxonômicas operacionais (OTU) e maior número e abundância de *Corynebacterium*-OTU. As amostras de colostro que apresentaram resultados negativos no exame microbiológico negativo tiveram maior abundância de *Bacillus*-OTU. Ademais, quartos mamários com baixa contagem de células somáticas (CCS) foram associados à maior abundância de *Prevotella*-OTU,

enquanto maior número de *Staphylococcus*-OTU e *Streptococcus*-OTU foram associados à alta contagem de células somáticas. Portanto, o presente estudo apontou que a microbiota presente no período pré-parto pode afetar a saúde da glândula mamária bovina.

Palavras-chave: Mastite. Metagenômica. Secreção colostrar. Saúde da Glândula Mamária.

CHAPTER 3 - IMPACT OF CEILING CANAL OCCLUSION AND INTRAMAMMARY INFECTIONS ON THE MICROBIOME OF COLOSTRAL SECRETION IN THE PREPARTUM PERIOD IN HEIFERS AND THEIR IMPACT ON THE HEALTH OF THE MAMMARY GLAND IN THE FIRST MONTH OF LACTATION

ABSTRACT

In the last few years, several studies have addressed the impact of mastitis in heifers, which is even more challenging, since these animals are still in the growth phase. Thus, mastitis in heifers could profoundly negative impact the udder health in entire productive life. With the popularization of new generation sequencing techniques, there was an interest in evaluating the metagenomics of bovine colostrum. Given the facts, it is known that with the approach of parturition, the loss of keratin plug can occur, which opens doors for bacterial colonization. Thus, it is expected that populations that settle in the gland during this period, may have a beneficial or negative impact, throughout the productive life of this animal. Therefore, the present study aimed to evaluate the impact of the teat canal occlusion on the microbiome of colostrum secretion in the prepartum period in heifers and its impact on the health of the mammary gland in the first month of lactation. In the present study, we followed ten animals in the prepartum period ($\pm$ 4 days), and after discriminating the teat ends as open or closed, the colostrum secretion from each udder quarter were collection for metagenomic analysis. Afterwards, the udder health was monitored during the first lactation month by milk collection for bacteriological analysis and somatic cell count. Sequencing was successful in 37.5% (15 samples out of 40), and sequencing was possible in 87.5% (7 samples out of 8) of colostrum samples obtained from teat ends classified as open, although only 25% (8 samples of 32) were sequenced in the teat ends considered closed. Colostrum samples from teat ends considered closed resulted in a greater number of operational taxonomic units (OTU) and a greater number and abundance of *Corynebacterium*-OTU. Colostrum samples that showed negative results in the negative microbiological examination had a greater abundance of *Bacillus*-OTU. Furthermore, udder quarters with low somatic cell count (CCS) in the first month of lactation were associated with a greater

abundance of *Prevotella*-OTU, while a greater number of *Staphylococcus*-OTU and *Streptococcus*-OTU were related with a high somatic cell count. Therefore, the present study pointed out that the microbiota present in the prepartum period can strongly affect the bovine mammary gland health.

Keywords: Mastitis. Metagenomics. Colostral secretion. Udder health.

6.1 INTRODUÇÃO

O colostro é a secreção produzida pela glândula mamária nos primeiros dias após o parto e, além disso, é reconhecido por sua composição rica em nutrientes, fatores de crescimento e fonte de imunoglobulinas ao recém-nascido, o qual é deficitário destas na espécie bovina, devido à barreira estabelecida pela placenta do tipo cotiledonária que impede trocas materno-fetais (Lima *et al.*, 2017; Playford *et al.*, 2021). Tal ingestão, para além da nutrição, tem papel importante na transferência de imunidade passiva nos primeiros momentos de vida do bezerro.

Nos últimos anos, tem sido crescente o número de estudos que relatam a ocorrência de mastite em novilha (Naqvi *et al.*, 2018; Narayana *et al.*, 2018; Nitz *et al.*, 2020). problema esse que preocupa e ameaça a produção e saúde do úbere durante toda sua vida produtiva (De Vlieghe *et al.*, 2012; Nitz *et al.*, 2020). A doença geralmente está associada a patógenos do gênero estafilococos, principalmente estafilococos não-*aureus* (SNA) (De Vlieghe *et al.*, 2012). O impacto gerado em cada animal difere, uma vez que esse é influenciado por fatores como: forma de apresentação da mastite (clínica ou subclínica), patogenicidade do agente causador (patógenos principais ou secundários), tempo de início da infecção até o parto, cura ou persistência da infecção após o início da produção de leite e imunidade do hospedeiro. A presença da doença nesse grupo é justificada por fatores como: mamada cruzada, presença de moscas, mistura de lotes, no qual há a presença de animais mais velhos, e ainda, a falta de higiene ambiental (De Vlieghe *et al.*, 2012; Bludau *et al.*, 2014).

Além da reconhecida função de transferência de imunidade, com a ascensão da metagenômica, o colostro ganhou espaço em estudos sobre microbiota e associações com a saúde futura da bezerra. Alguns pesquisadores defendem que o colostro abriga uma microbiota benéfica como microrganismos dos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (Lindner *et al.*, 2011) que são amplamente utilizados como microrganismos com potencial probiótico. Corroborando com essa ideia, estudos com colostro e/ou leite humano demonstram haver uma microbiota própria (Khodayar-Pardo *et al.*, 2014). Ademais, esses estudos demonstram que a microbiota presente no colostro difere da presente no leite. Dado este fato,

pesquisadores como Lima *et al.* (2017) passaram a avaliar a microbiota do colostro bovino, a fim de melhorar a compreensão em relação a diversidade microbiana, caracterizando-as e identificando os perfis bacterianos associados à infecção da glândula mamária logo após o parto.

Além disso, também se construiu a hipótese de que a ocorrência de mastite em novilhas pode estar relacionada à disbiose, visto que, em períodos como o pós-parto, em associação com balanço energético negativo, há imunossupressão a qual pode contribuir para o desbalanço da microbiota presente, ocasionando a doença. Em concomitância à detecção de determinados microrganismos em certos nichos, tal como *Firmicutes* no canal do teto e leite, *Proteobacteria* no canal do teto, *Bacteroidetes* no leite e *Actinobacteria* no canal do teto e no leite, também houve a constatação que, dadas as diferenças entre os microrganismos colonizadores da glândula mamária e do canal do teto, o leite pode atuar como um meio de seleção, permitindo o crescimento apenas de alguns tipos de bactérias (Derakhshani *et al.*, 2020).

Para o levantamento de tal hipótese, muito tem se discutido sobre as técnicas utilizadas para extração e amplificação de DNA de amostras, uma vez que tanto contaminações como a presença de material genético morto podem gerar interferência nos resultados. Nesse sentido, Oikonomou *et al.* (2020) citam o uso de monoazida de propídio (PMA) para separação de material genético viável e não viável. No entanto, nesse mesmo estudo, há evidências de problemas na análise de microbiota do colostro geradas por fatores como a fração de leite utilizada para análise, kit de purificação de DNA utilizado, região genética considerada para amplificação, *primers* e número de ciclos utilizados na PCR e, por fim, a plataforma de sequenciamento genético utilizada para identificação do microbioma da amostra em questão. Nesse sentido, é possível concluir que o colostro, enquanto material de análise, ainda deve ser alvo de estudos metagenômicos futuros para aprimoramento de técnica e, conseqüentemente, descobrimento de novas informações.

Para além dos problemas detectados, estudos anteriores fornecem o conhecimento inicial sobre o assunto evidenciando, por exemplo, a maior diversidade no perfil taxonômico encontrado em amostras de colostro obtidas de

primíparas em comparação com múltíparas, o qual, em conjunto com a alfa diversidade da amostra, relaciona-se com o estágio de lactação, apresentando, ainda, variações durante a primeira semana pós-parto (Lima *et al.*, 2017). Nesse sentido, é importante salientar que tais variações podem estar relacionadas com a ocorrência de infecções intramamárias em eventos lactacionais anteriores e o uso de antimicrobianoterapia (Hang *et al.*, 2021). Além disso, também foi demonstrado que fatores inerentes ao hospedeiro - como sua fisiologia, ambiente e tipo de manejo, também impactam na microbiota detectada em sua glândula mamária (Demme & Albegaz, 2015).

Ademais, também foi constatado que aqueles quartos de vacas acometidos por mastite subclínica demonstraram menor riqueza de OTU em suas amostras (Andrews *et al.*, 2019; Taponen *et al.*, 2019) o que demonstra o impacto de uma infecção e tratamento desta no cenário de produção, predominantemente, com o uso de antibioticoterapia. Tal uso contribui para a redução no número de microrganismos nas microbiotas, o que pode explicar a divergência entre as riquezas de amostras infectadas. Em relação ao colostro, a maior diversidade no perfil taxonômico é encontrada em amostras obtidas de primíparas em comparação com múltíparas, o que, em conjunto com a alfa diversidade da amostra, relaciona-se com o estágio de lactação, apresentando, ainda, variações durante a primeira semana pós-parto (Oikonomou *et al.*, 2020).

Em adição, também é possível observar que, além de se relacionar com o ambiente em que o animal está inserido, a microbiota também demonstra resiliência no que diz respeito à recuperação de sua composição após momentos de decréscimo, tal como durante a realização da terapia da vaca seca, o que a define como uma dinâmica de comunidade, capaz de ser modelada por inúmeros fatores (Taponen *et al.*, 2019). À exemplo disso, Oikonomou *et al.* (2020) também constataram que a ocorrência de mastite altera a composição da microbiota da glândula mamária, reduzindo a riqueza desta em detrimento do aumento da abundância de microrganismos relacionados à afecção e, consequentemente, desequilibra aquela encontrada nos nichos, leite e/ou colostro. Somando-se a isso, outro grande desafio, é em torno da perda do tampão de queratina durante o período

de pré-parto. Segundo Volker & Friedrich (2009), com a proximidade ao parto e com o rápido desenvolvimento da glândula mamária em novilhas, o aumento e a pressão do úbere podem levar à perda do tampão de queratina e a uma porta de entrada para microrganismos, com infecções intramamárias ainda no período pré-parto. Ademais, de acordo com Taponen *et al.* (2019), animais múltiparos, quando passam por um processo de secagem ineficiente, resultam em altas contagens de células somáticas no pós-parto, assim como, maior probabilidade de desenvolvimento da doença, uma vez que esse é o período de maior desafio, impactando negativamente durante toda vida produtiva desses animais. Acredita-se que novilhas que têm a perda do tampão de queratina no período de pré-parto apresentem um perfil semelhante, uma vez, que essa perda facilita a entrada de patógenos, podendo levar a infecção nesse período e culminar em impactos negativos durante toda vida produtiva desses animais. Assim, ressaltamos que não há trabalhos que evidenciem a avaliação da secreção colostrar em animais nulíparos.

Deste modo, o presente estudo teve como objetivo avaliar o impacto da oclusão do canal do teto sobre o microbioma da secreção colostrar no período pré-parto em novilhas e seu reflexo na saúde da glândula mamária no primeiro mês de lactação.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi submetido à comissão de Ética no uso de animais – CEUA, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), sob protocolo n. 7293280218. O trabalho também foi submetido à CEUA da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), sob protocolo n. 2214240619.

6.2.1 ANIMAIS

O presente estudo foi realizado na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA – Juiz de Fora/Minas Gerais. Foram utilizadas dez novilhas (animais nulíparos), de raça holandesa, as quais foram avaliadas quanto à abertura do canal do teto durante o período pré-parto (média 4 dias, mínimo= 2 dias e máximo= 9 dias). A abertura do canal do teto foi inicialmente avaliada por inspeção visual conforme descrito por Kromker e Friedrich (2009) e confirmada através do exame ultrassonográfico (Franz *et al.*, 2009).

A partir disto, os tetos foram classificados em “abertos” e “fechados” e realizadas as coletas da secreção mamária de todos os quartos mamários. As amostras de secreção mamária foram coletadas assepticamente de cada quarto mamário para o exame microbiológico e análise de metataxogenômica. Após o parto realizaram-se ainda coletas de amostras de leite e/ou colostro para exame microbiológico e contagem de células somáticas (CCS) em cinco momentos, sendo eles: M1) dia do parto; M2) três; M3) sete; M4) quinze e M5) trinta dias pós-parto. Além disto, durante este período foi realizado o teste da caneca de fundo escuro em todas as ordenhas para detecção da mastite clínica e determinação da incidência de mastite clínica, além da coleta de amostras de leite dos casos de mastite clínica para o cultivo microbiológico. Assim, foi possível determinar a relação da saúde da glândula mamária no período pós-parto - período de maior susceptibilidade a novas infecções intramamárias.

Coleta de amostras de leite e colostro

Inicialmente, foi realizado o teste da caneca do fundo escuro para identificar a presença de coágulos, flocos ou secreções anormais que poderiam estar presentes no leite, indicando alteração de sua composição. Depois de descartados os três primeiros jatos de leite, a assepsia das extremidades dos tetos foi realizada utilizando algodão umedecido em álcool a 70%, e amostras de leite individuais de cada quarto mamário foram coletadas assepticamente em frascos estéreis (cat. n. 14-956-6A, Fisher Scientific, Pensilvânia, EUA) para análise bacteriológica (aproximadamente 3 mL). As amostras foram enviadas para o Laboratório de Pesquisa em Qualidade do Leite – Qualileite - na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ/USP - Pirassununga/São Paulo.

Posteriormente, realizou-se a coleta para análise metataxogenômica na qual se repetiu a assepsia das extremidades dos tetos com algodão umedecido em álcool a 70%. As amostras de leite individuais de cada quarto mamário foram coletadas assepticamente em frascos estéreis (cat. n. 14-956-6A, Fisher Scientific, Pensilvânia, EUA) e, para essa análise foram coletados aproximadamente, 2 mL. As amostras foram enviadas para a empresa de Biotecnologia Pesquisa e Inovação - BPI - Botucatu/São Paulo, em caixas isotérmicas contendo gelo.

Na sequência, foram coletadas ainda amostras de leite individuais de cada quarto mamário para análise de CCS e composição do leite. Para tal, foram coletados 40 mL de leite em cada quarto mamário em frascos estéreis contendo bronopol e enviados ao Laboratório de Qualidade do Leite da Empresa Brasileira de Pesquisa em Agropecuária – EMBRAPA – Juiz de Fora/MG, em caixas isotérmicas contendo gelo.

Contagem de células somáticas

As amostras para CCS foram coletadas em um frasco de 40 mL contendo o conservante bronopol (2-bromo-2-nitropano-1,3-diol) e foram analisadas pelo princípio de citometria de fluxo em equipamento eletrônico Bentley CombSystem 2300 calibrada (Chaska, EUA), segundo ISO (2006).

Exame bacteriológico do leite

A análise bacteriológica foi realizada através do cultivo de 10 µL de acordo Oliver *et al.* (2004) e 100 µL (com o intuito de aumentar a sensibilidade) de leite em ágar sangue de carneiro desfibrinado (5%), os quais foram incubados a 37 °C por 24 a 72 horas. A identificação bacteriana foi determinada utilizando espectrometria de massa com analisador de tempo de voo e ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS), conforme descrito por Barcelos *et al.* (2019). Brevemente, com o auxílio de uma alça descartável, foram selecionadas cinco colônias bacterianas puras e isoladas, as quais foram adicionadas a tubo cônico contendo 300 µL de água Milli-Q autoclavada e 900 µL de etanol, foram homogeneizadas em vortex durante um minuto. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 13.000 x g por dois minutos, foi realizado o descarte do sobrenadante e os sedimentos bacterianos, foram secos à temperatura ambiente durante 5 a 10 minutos. Em seguida, foi adicionada uma solução de ácido fórmico a 70% de acordo com o tamanho do sedimento bacteriano para sua completa dissolução. Na sequência, foi adicionado acetonitrila a 100%, a qual foi acrescentada de acordo com o volume de ácido fórmico, entre a adição dos reagentes, aguardou-se 10 minutos. Após, realizou-se nova centrifugação, a 13.000 x g por dois minutos, para separar as células bacterianas do sobrenadante. O volume de 1 µL de cada extrato bacteriano foi aplicado sob uma placa de aço para secar em temperatura ambiente por 15 minutos. As manchas secas foram eluídas com 1 µL de solução de matriz (ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico-HCCA) diluído em 50% de acetonitrila e 2,5% de ácido trifluoroacético. Após, as placas foram secas novamente a temperatura ambiente. Em seguida, o equipamento foi calibrado, tanto com controle positivo (*E. coli*), quanto com a solução matriz e ácido fórmico, e então as amostras foram analisadas.

Além disso, para a obtenção das unidades formadoras de colônias (UFC) das amostras de leite e colostro foi realizada inoculação de 100 µL de leite em placa por meio de alça de Drigalski, já para as amostras de 10 µL foi utilizada a técnica de esgotamento. As amostras de leite inoculadas com 100 µL de leite que apresentaram elevada (acima de 300 UFC) contagem bacteriana foram diluídas de forma seriada 1:10.

4.2.2 ANÁLISE METATAXOGENÔMICA

Preparação das amostras

Conforme recomendado por Oikonomou *et al.* (2014), previamente à extração de DNA, as amostras passaram pela etapa de remoção de gordura, na qual 1 mL de leite foi centrifugado a 8.000 x g durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente, o sobrenadante e a gordura foram descartados e o *pellet* foi ressuspensão em PBS estéril (cat. n.14200075, ThermoFisher - EUA). Essa etapa foi repetida três vezes, seguida por novas centrifugações a cada ressuspensão (8.000 x g durante 5 minutos a 4°C). Ao final, foi ressuspensa em 250 µL de PBS e submetida o tratamento com PMA (determinação de comunidade bacteriana viável), e/ou extração de DNA (sem tratamento com PMA – comunidade bacteriana total).

Além disso, como em todas as outras etapas, nessa também optamos em minimizar o máximo possível os contaminantes ambientais e a contaminação cruzada. Para tal, foram utilizados tubos cônicos de 1,5 mL estéreis, livres de DNA e RNA (cat. n. MCT-150-C, Axygen, Arizona, EUA), assim como ponteiras (10, 200, 1000 µL, cat. n. TF-300-R-S, TF-200-R-S, TF-1000-R-S, Axygen, Arizona, EUA, respectivamente), todas estéreis, livres de DNA e RNA, e com filtro. Além disso, conforme descrito por Eisenhofer *et al.* (2018), antes da utilização da cabine de fluxo laminar a mesma era severamente higienizada com hipoclorito de sódio a 3% e álcool 70%. Somado a isso, todos os utensílios utilizados para o processamento eram higienizados com álcool 70% e alocados na cabine de fluxo e submetidos ao processo de irradiação ultravioleta (UV) por 20 minutos. Este processo era repetido no início e ao final do dia. Por fim, somado a todos estes passos, tomamos o cuidado de uma única pessoa realizar a coleta e o processamento de todo material. O executor usou vestimentas adequadas (jaleco, touca, luva e máscara descartáveis), a fim de promover a redução máxima de contaminação ambiental.

Tratamento com *PMA Dye*

Nós utilizamos o *PMA Dye* em nossas amostras, seguindo o protocolo descrito por Fu *et al.* (2018), com algumas modificações propostas por Zhao *et al.* (2019), conforme descritos a seguir.

O PMAxx 20 mM em água (cat. n. 40069, Biotium, Califórnia, EUA) foi dissolvido em 20% de dimetilsulfóxido (DMSO) (cat. n. D8418, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) para obter uma solução estoque 10X, a qual foi armazenada a 20 °C no escuro. A concentração de PMA em todas as amostras foi ajustada para 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (25 μL de PMAxx em 225 μL da amostra) e depois incubada por 20 minutos no escuro. Para a ativação do PMA, as amostras foram expostas ao dispositivo de fotólise PMA Lite Led (cat. n. E90002, Biotium, Califórnia, EUA), por 15 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 10.000 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas duas vezes com PBS (cat. n. 14200075, Thermo Fisher, EUA). Em seguida, as amostras foram armazenadas a -20° C para posterior extração de DNA.

Extração do DNA

O DNA das amostras do leite foi extraído utilizando o kit PowerSoil DNA Isolation kit (cat. n. 12888-100, Qiagen, EUA seguindo instruções do manual do fabricante. A qualidade e quantidade do DNA extraído foi determinada por espectrofotometria, por meio do equipamento NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific).

Amplificação região 16S (V3-V4)

As reações de PCR foram feitas tendo como volume final 20 μL , contendo 10 μL de GoTaq® Colorless Master Mix 2x (Promega, USL), 1 μL (concentração de 10 μM) de oligonucleotídeo *forward*, 1 μL (concentração de 10 μM) de oligonucleotídeo *reverse* e 8 μL de DNA genômico. Para a amplificação foram utilizados os *primers* descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para na amplificação das regiões V3 e V4 para a quantificação absoluta de DNA.

Iniciador	Sequência 5'-3'
16S V3-V4 F	5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3'
16S V3-V4 R	5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3'

Fonte: Ferronato (2021).

Legenda: F: *forward*, R: *reverse*.

O programa de amplificação consistiu em desnaturação inicial a 95 °C por 3 minutos, seguida por 27 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 30 segundos extensão a 72 °C por 30 segundos e uma extensão final a 72 °C por 5 minutos. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems). Após reação de amplificação de cada amostra comprovamos a amplificação, através de eletroforese em gel de agarose 2% corado com UniSafe Dye 0,03% (v/v). ~600pb (tamanho do *amplicon*).

Reação de Indexação

Nesta etapa foram inseridos os indexadores nos adaptadores comuns que são necessários para a geração de *clusters* e sequenciamento das amostras. A reação de indexação foi realizada seguindo o protocolo do kit Nextera XT Index (Illumina). O programa de amplificação consistiu de incubação a 72 °C por 3 minutos, desnaturação inicial a 95 °C por 30 segundos, seguidos de 12 ciclos de 95 °C por 10 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos e extensão final a 72 °C por 5 minutos. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems).

Purificação e Quantificação da Biblioteca

As bibliotecas geradas foram submetidas às etapas de purificação utilizando *bead* magnética Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter), para remoção de

fragmentos muito pequenos da população total de moléculas e restos de *primers*. Após, realizou-se a quantificação das bibliotecas de sequenciamento de alto rendimento pela metodologia de PCR Tempo Real, utilizando o equipamento QuantStudio 3 Real-Time PCR System (AppliedBiosystems) e kit KAPA Library Quantification Kit - Illumina/Universal (Roche), segundo o protocolo do fabricante. Gerou-se *pool* equimolar de DNA pela normalização de todas as amostras a 4nM para realização do sequenciamento utilizando-se o sistema Illumina MiSeq de sequenciamento de nova geração (Illumina® Sequencing) e kit MiSeq Reagent V2 500 ciclos – leitura de 2 x 250pb.

4.2.3 REAÇÃO DA CADEIA POLIMERASE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (QPCR)

Quantificação 16S no DNA total via qPCR

O DNA passou também por quantificação absoluta por qPCR. As reações de qPCR foram realizadas tendo volume final de 10 µL, contendo 5 µL de PowerUp SYBR Green Master Mix (ThermoFisher Scientific), 1,0 µL de oligonucleotídeo *forward* à 10 µM, 1,0 µL de oligonucleotídeo *reverse* à 10 µM e 3,0 µL de DNA diluído 1:10. As sequências dos oligonucleotídeos utilizadas são as mesmas listadas na Tabela 2.

Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para na amplificação das regiões V3 e V4 para a quantificação absoluta DNA.

Iniciador	Sequência 5'-3'
GenBac1055f	ATGGCTGTCGTCAGCT
GenBac1392r	ACGGGCGGTGTGTAC

Fonte: Ferronato (2021).

Legenda: F: *forward*, R: *reverse*.

O programa de quantificação consistiu em incubação inicial para ativação da UDG a 50 °C por 2 minutos, desnaturação inicial a 95 °C por 10 minutos, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos, anelamento a 58 °C por 1 minuto, e curva de *melting* seguindo o recomendado pelo kit PowerUp SYBR Green Master Mix (ThermoFisher Scientific). As reações de quantificação foram conduzidas no termociclador QuantStudio 3 Real-Time PCR System (AppliedBiosystems). A concentração foi estimada através da quantificação da curva padrão (pontos seriados 1:10) do plasmídeo pCR®2.1 (Invitrogen) com a inserção do gene 16S rRNA da família *Peptococcaceae* sp. (Acesso: KJ522755).

Processamento Bioinformático das sequências obtidas

As análises foram realizadas no ambiente do R Studio Versão 1.4.1103 sendo o principal pacote o "phyloseq" do R de acordo com o manual Github para importação e análise dos dados. Foi realizada a normalização das amostras pelo tamanho máximo de *reads*. Para plotar os gráficos de abundância, foram filtrados os OTU que estavam entre os 20% mais abundantes e usadas à função "plot_bar". A curva de rarefação foi feita pela opção "rarecurve" do phyloseq. Para plotar os heatmaps, foram utilizados a função "plot_heatmap" usando o método "NMDS" e distância de "bray" (Bray-Curtis). A alpha diversidade foi feita com a função "estimate_richness" e as imagens pela função "plot_richness". Para a beta diversidade foi utilizada a distância de "bray" e plotado por PCOA com a função "plot_ordination". Foi ainda realizado teste Permanova (Análise Anova Permutacional) usando a função "adonis" do pacote "vegan". Por fim, foi feito o teste de abundância diferenciada das OTU pelo DESeq2 entre todos os grupos.

Para a análise estatística e comparação dos resultados da microbiota total e viável, o programa estatístico GraphPad 9.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA) foi utilizado. Inicialmente, para comparação dos dados entre os grupos amostrais, a exemplo: comparação entre amostras de leite total e viáveis foi aplicado o teste de Shapiro Wilk. As variáveis não paramétricas foram submetidas ao teste de Wilcoxon e as paramétricas ao teste de estatístico T de *Student* para amostras pareadas. O valor de $P \leq 0,05$ foi considerado como significativo.

6.3 RESULTADOS

Neste estudo, das 40 amostras de leite e colostro oriundas de quartos mamários de dez animais, 37,5% (15 amostras de 40) obtiveram sequenciamento. Das amostras que não foram sequenciadas, 40% (16 amostras de 40) eram oriundas de quatro animais. Assim, as 15 amostras analisadas representam apenas seis animais. Além disso, quando avaliado o número de tetos classificados como, abertos e fechados, que foram sequenciados, é possível inferir que, 87,5% (7 amostras de 8), dos tetos classificados como abertos obtiveram sequenciamento. Já os tetos classificados como fechados, apenas 25% (8 amostras de 32), foram sequenciados. Os dados da CCS, qPCR e do exame microbiológico estão apresentados no Apêndice 3 na sessão Apêndices.

Os resultados da diversidade microbiana (abundância e número de OTU) na secreção colostrar no período pré-parto de novilhas pode ser observada na Figura 21, abaixo. Além disso, é possível observar (Figura 22) a abundância relativa de OTU em secreção colostrar. De mesmo modo (Figura 23), pode-se observar a abundância relativa de OTU dos microrganismos mais relevantes em amostras de secreção colostrar bovina.

Figura 21. Unidades taxonômicas operacionais (OTU) e abundância relativa das comunidades bacterianas identificadas em amostras de secreção colostrar no período pré-parto de novilhas.

Fonte: Ferronato, (2021).

Figura 22. Representação da abundância relativa de unidades taxonômicas operacionais (OTU) de todas as comunidades bacterianas em amostras de secreções colostrais bovina assepticamente coletadas.

Figura 23. Representação da abundância relativa das unidades taxonômicas operacionais (OTU) das comunidades bacterianas mais abundantes em amostras de secreções colostrais bovina assepticamente coletadas.

Fonte: Ferronato, (2021).

No presente estudo foi possível identificar que as amostras de secreções colostrais das novilhas que apresentaram tetos fechados no período pré-parto apresentam maior abundância e número de *Corynebacterium*-OTU e maior número de *Acinetobacter*-OTU (Figura 24). No momento da coleta, as amostras de secreção colostril com ausência de crescimento no exame bacteriológico apresentaram maior abundância de *Bacillus*-OTU (Figura 25). Ademais, após o parto, os animais que apresentaram alta CCS no leite no período pós-parto (primeiros 30 dias de lactação) apresentaram maior número de *Staphylococcus*-OTU e *Streptococcus*-OTU (Figura 26) nas secreções colostrais no período pré-parto, enquanto aqueles quartos mamários com baixa CCS apresentaram maior abundância de *Prevotella*-OTU (Figura 26).

Figura 24. Valor absoluto de unidades taxonômica operacionais (OTU mL⁻¹) de *Acinetobacter* e *Corynebacterium*-OTU e abundância (%) de *Corynebacterium*-OTU identificados em secreção colostril de tetos considerados abertos e fechados no período pré-parto em novilhas.

* indica *P 0,0263 – 0,0281 **P 0,0034

Fonte: Ferronato, (2021).

Figura 25. Valor de abundância (%) de *Bacillus* sp. identificado em amostras de leite assepticamente coletadas com resultados positivos ou negativos no exame microbiológico nos primeiros 30 dias de lactação.

* indica *P = 0,0143

Fonte: Ferronato, (2021).

Figura 26. Valor absoluto de unidades taxonômica operacional (OTU mL⁻¹) de *Staphylococcus*-OTU e *Streptococcus*-OTU, e abundância (%) de *Prevotella*-OTU identificados em relação a alta (acima de 100.000) e baixa (abaixo de 100.000) média geométrica de células somáticas (CCS) no período pós-parto (30 dias) em novilhas.

* indica *P = 0,0200 – 0,0386 **P = 0,0037

Fonte: Ferronato, (2021).

Além disso, quando avaliados os dez animais durante o primeiro mês de lactação em relação à saúde da glândula mamária, foi possível observar que três animais, apresentaram casos de mastite clínica, todos estes classificados com teto fechado durante o período pré-parto. O primeiro caso foi identificado em quarto posterior direito, sete dias pós-parto, no exame microbiológico não houve crescimento bacteriano. Foi realizado tratamento com antibiótico intramamário a base de ciprofloxacino durante 5 dias, conforme protocolo padrão adotado na fazenda. Contudo, o animal teve recidiva na semana seguinte, apresentando cultura microbiológica positiva (7.400 UFC em 100 µL) para *S. aureus*. De mesmo modo, foi realizado tratamento com antibiótico intramamário a base de ciprofloxacino durante 5 dias, não apresentando mais mastite clínica pós tratamento, fato verificado na coleta 30 dias pós-parto, onde o animal apresentou cultura microbiológica negativa.

O segundo caso foi identificado em quarto anterior esquerdo, 15 dias pós-parto e o animal apresentou cultura positiva (520 UFC em 100 µL) para *S. chromogenes*. Do mesmo modo, o tratamento foi feito conforme protocolo padrão adotado na fazenda (ciprofloxacino durante 5 dias). Após o tratamento o animal não apresentou novos episódios de mastite até os 30 dias pós-parto, fato comprovado com o resultado negativo da cultura microbiológica nessa mesma data. O último caso foi identificado durante a data da última coleta, 30 dias pós-parto, em quarto anterior esquerdo. O quarto teve cultura positiva (2 UFC em 100 µL) para *Bacillus pumillis* e na mesma data foi iniciado o mesmo tratamento utilizado nos casos anteriores.

6.4 DISCUSSÃO

O presente estudo foi pioneiro na avaliação de comunidades bacterianas viáveis em amostras de secreções colostrais provenientes de quartos mamários de novilhas (animais nulíparos). Diante disto, foi possível identificar que os quartos mamários de novilhas com tetos considerados fechados apresentaram menor número de OTU de *Corynebacterium*-OTU e *Acinetobacter*-OTU. Além disto, na maioria dos quartos (75%) não foi possível obter sucesso na etapa de amplificação (pré-PCR) para posterior análise da microbiota. Portanto, considerando que não há interface entre a glândula mamária até a abertura do canal do teto, nossos achados sugerem que o ambiente mamário até a abertura do canal do teto é estéril ou apresenta biomassa extremamente pequena, o que pode explicar as profundas discussões sobre o tema propostas por Rainard, (2017).

Corynebacterium sp. é uma bactéria que está associada a colonização da pele do teto (Falentin *et al.*, 2016), e, portanto, quando ocorre a abertura do canal do teto, pode ocorrer colonização do mesmo. *Corynebacterium* sp. é um microrganismo Gram-positivo identificado anteriormente em estudos de metagenômica (Oikonomou *et al.*, 2014; Addis *et al.*, 2016; Falentin *et al.*, 2016; Lima *et al.*, 2017). É frequentemente associado a infecções intramamárias (IIM) em bovinos devido à colonização do canal do teto, facilitando a IIM. Fato curioso sobre o microrganismo, é que já foi proposto que quartos infectados com ele são menos propensos a desenvolver infecções subsequentes por microrganismos primários associados à mastite, como *S. aureus* e *S. agalactiae* (Braem *et al.*, 2012). Alguns estudos (Braem *et al.*, 2012; Oikonomou *et al.*, 2014; Falentin *et al.*, 2016; Porcellato *et al.*, 2020) indicam forte relação entre *Corynebacterium* sp. e *S. aureus* encontrados em amostras de leite. Contudo, Porcellato *et al.* (2020) relatam que quartos mamários com disbiose apresentam uma redução de *Corynebacterium* sp., e aumento de microrganismos como *Streptococcus* sp. Em leite humano, conforme sugerido por Sam Ma *et al.* (2015), *Staphylococcus* sp. e *Corynebacterium* sp. têm uma correlação negativa frente a microbiota considerada benigna, podendo, assim, causar à disbiose e resultar em mastite. Outro microrganismo identificado foi *Acinetobacter* sp., o qual já foi relatado em colostro de animais primíparos (Lima *et*

al.; 2017). Do mesmo modo que *Corynebacterium* sp., *Acinetobacter* sp. está também associado à colonização da pele da glândula mamária e canal do teto (Derakhshani *et al.*, 2018), aumentando assim as chances de IIM por esses patógenos. Deve-se ressaltar, no entanto, que ainda se sabe muito pouco sobre sua real atuação no leite bovino.

Um importante achado do presente estudo foi que quartos mamários que apresentaram maior abundância de *Prevotella*-OTU resultaram em menores valores de CCS nos primeiros trinta dias de lactação, o que corrobora com achados que sustentam que esta bactéria pode estar associada à microbiota própria da glândula mamária. De acordo com o descrito por Iljazovic *et al.* (2021) em estudos com humanos, essa bactéria é revestida de imunoglobulinas do tipo IgA, essa associada à resposta de mucosa. Além disso, ela é capaz de induzir resposta de Th17, bem como, a secreção de IL-6 e IL-8, facilitando o recrutamento de neutrófilos (Larsen *et al.*, 2017; Leite *et al.*, 2017). Portanto, destacamos o efeito benéfico para a saúde do úbere. Poucos trabalhos têm relatado a presença deste microrganismo no leite bovino (Falentin *et al.*, 2016; Lima *et al.*, 2017; Hoque *et al.*, 2020), o que provavelmente se deve ao fato desta bactéria ser uma bactéria anaeróbica, e portanto, não há um ambiente para seu crescimento em exames bacteriológicos rotineiros, como aqueles recomendados pelo NMC. Neste contexto, destacamos que a glândula mamária é um ambiente onde predomina a anaerobiose (Le Marechal *et al.*, 2009). Diante do exposto, fica claro o potencial deste microrganismo para a glândula mamária, apesar de ser uma bactéria negligenciada por décadas pela comunidade científica.

Por outro lado, as bactérias do gênero estafilococos e estreptococos foram associadas à alta CCS nos primeiros trinta dias de lactação. Esses microrganismos já foram identificados anteriormente em trabalhos com metagenômica do colostro (Lima *et al.*, 2017; Hoque *et al.*, 2020; Nitz *et al.*, 2020), demonstrando inclusive que *Staphylococcus* sp. foi o gênero mais abundante na maioria dos trabalhos que avaliaram o colostro, independente de quarto, paridade e *status* de mastite. Fato esse pode ser justificado pelo menos em partes, uma vez que esse microrganismo está presente como comensal da pele do teto, facilitando a sua identificação, ainda mais, quando as amostras são coletadas por método tradicional, conforme NMC.

Corroborando isso, Hiitio *et al.* (2016) demonstraram que o método de coleta influencia os resultados obtidos, uma vez que, das amostras coletadas pelo método tradicional, essas tiveram mais que o dobro de identificação de *Staphylococcus* sp. quando comparadas ao método de punção da cisterna da glândula. Vale ressaltar que ambos os microrganismos são considerados patógenos primários da mastite, os quais podem levar a aumentos significativos nos valores de CCS (Narayana *et al.*, 2018). Ademais, animais que apresentam uma microbiota com esses patógenos têm maiores chance de desenvolverem uma IIM logo após o parto (Taponen *et al.*, 2019; Nitz *et al.*, 2020).

Adicionalmente, o presente estudo apontou que *Bacillus*-OTU foi associado a resultados negativos no exame bacteriológico de secreções colostrais no período pré-parto, apesar de ser uma bactéria amplamente encontrada no ambiente (Metzger *et al.*, 2018). De acordo com Oikonomou *et al.* (2014), este microrganismo foi um dos gêneros mais abundantes encontrados em animais definidos como saudáveis. Contudo, ainda não é bem clara a importância desse microrganismo na dinâmica da glândula mamária, uma vez que o mesmo está associado a contaminações.

6.5 CONCLUSÃO

Ressaltamos que os estudos com metagenômica do colostro são muito recentes, e ainda há um baixo número de publicações. Não há nenhum processo de padronização das formas de coleta, extração e análise dos resultados, impossibilitando algumas comparações entre os trabalhos. Apesar do baixo número de trabalhos focados na microbiota do colostro é importante que essas inferências sejam realizadas, para subsidiar novos estudos. É importante ressaltar a necessidade de avaliação das populações viáveis presentes no colostro/leite bovino, uma vez que essas impactam nos resultados obtidos, bem como, o método de aquisição das amostras. Ressaltamos que são necessários mais estudos enfatizando o papel de alguns microrganismos aqui encontrados, como por exemplo, *Prevotella* sp. e *Bacillus* sp..

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDIS, M.F.; TANCA, A.; UZAU, S.; OIKONOMOU, G.; BICALHO, R.C.; MORONI, P. The bovine milk microbiota: insights and perspectives from the –omics studies. **Molecular Biosystems**, 12:2359, 2016.

ANDREWS, T.; NEHER, D.A.; WEICHT, T.R.; BARLOW, J.W. Mammary microbiome of lactating organic dairy cows varies by time, tissue site, and infection status. **Plos One**, v. 14, p. 11, 2019.

BARCELOS, M.M.; MARTINS, L.; GRENFELL, R.C.; JULIANO, L.; ANDERSON, K.L.; SANTOS, M.V.; GONCALVES, J.L. Comparison of standard and on-plate extraction protocols for identification of mastitis-causing bacteria by MALDI-TOF MS. **Brazilian Journal of Microbiology**. 2019.

BRAEM, G., DE VliegHER, S., VERBIST, B., HEYNDRICKX, M., LEROY, F., AND DE VUYST, L. Culture-independent exploration of the teat apex microbiota of dairy cows reveals a wide bacterial species diversity. **Veterinary Microbiology**. 157, 383–390. 2011.

BLUDAU, M.J.; MAESCHLI, A.; LEIBER, F.; STEINER, A.; KLOCKE, P. Mastitis in dairy heifers: Prevalence and risk factors. **The Veterinary Journal**, v. 202, p. 566-572, 2014.

DE VliegHER, S.; OPSOMER, G.; VANROLLEGHEM, L.A.; DEVRIESE, L.A.; SAMPIMON, O.C.; SOL, J.; BARKEMA, H.W.; HAESEBROUCK, F.; DE KRUIF, A. In vitro growth inhibition of major mastitis pathogens by *Staphylococcus chromogenes* originating from teat apices of dairy heifers. **Veterinary Microbiology**, 101:215-221, 2004.

DEMME, B., e S. ABEGAZ. Isolation and identification of major bacterial pathogen from clinical mastitis cow raw milk in Addis Ababa, Ethiopia. **Academic Journal Animal Diseases**, v. 4, p. 44-51, 2015.

DERAKHSHANI, H.; FEHR, K.B.; SEPEHRI, S.; FRANCOZ, D.; DE BUCK, J.; BARKEMA, H.W.; PLAIZIER, J.C.; KHAFIPOUR, E. Invited review: Microbiota of the bovine udder: Contributing factors and potential implications for udder health and mastitis susceptibility. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 1-21, 2018.

FU, X.; ZENG, B.; WANG, P.; WANG, L.; WEN, B.; LI, J.; LIU, H.; BAI, S.; JIA, G. Microbiome of total versus live bacteria in the gut of rex rabbits. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1-10, 2018.

FALENTIN, H.; RAULT, L.; NICOLAS, A.; BOUCHARD, D.S.; LASSALAS, J.; LAMBERTON, P.; AUBRY, J.M.; MARNET, P.G.; LOIR, Y.L.; EVEN, S. Bovine Teat Microbiome Analysis Revealed Reduced Alpha Diversity and Significant Changes in

Taxonomic Profiles in Quarters with a History of Mastitis. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2017.

HANG, B. P. T.; WREDLE, E.; DICKSVED, J. Analysis of the developing gut microbiota in young dairy calves—impact of colostrum microbiota and gut disturbances. **Tropical Animal Health and Production**, v. 53, 2021.

HIITIO, H.; SIMOJOKI, H.; KALMUS, P.; HOLOPAINEN, J.; PYORALA, S.; TAPONEN, S. The effect of sampling technique on PCR-based bacteriological results of bovine milk samples. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 6532-6541, 2016.

HOQUE, N.M.; ISTIAQ, A.; CLEMENT, R.A.; GIBSON, K.M.; SAHA, O.; ISLAM, O.K.; ABIR, R.A.; SULTANA, M.; SIDDIKI, A.Z.; CRANDALL, K.A.; HOSSAIN, A.M. Insights Into the Resistome of Bovine Clinical Mastitis Microbiome, a Key Factor in Disease Complication. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 860, 2020.

ILJAZOVIC, A.; ROY, U.; G;ALVEZ, E.J.C.; LESKER, T.R.; ZHAO, B.; GRONOW, A.; AMEND, L.; WILL, S.E.; HOFMANN, J.D.; PILS, M.C.; SCHMIDT-HOHAGEN, K.; NEUMANN-SCHAAL, M.; STROWIG, T. Perturbation of the gut microbiome by *Prevotella* spp. enhances host susceptibility to mucosal inflammation. **Mucosal Immunology**, v. 14, p. 113- 124, 2021.

ISO 13366-2/International Dairy Federation (IDF) 148-2 – Milk – Enumeration of somatic cells –Part 2: Guidance on the operation of fluoro-opto-electronic counters. Brussels, Belgium, 2006.16p.

KHODAYAR-PARDO, P.; PASCUAL, M.L.; COLLADO, M.C.; COSTA. M. Impact of lactation stage, gestational age and mode of delivery on breast milk microbiota. **Journal of Perinatology**, v. 34, p. 599-605, 2014.

KROMKER, V.; FRIEDRICH, J. Teat canal closure in non-lactating heifers and its association with udder health in the consecutive lactation. **Veterinary Microbiology**, v. 134, p. 100-105, 2009.

LARSEN, J.J. The Immune Response to *Prevotella* Bacteria in Chronic Inflammatory Disease. **Immunology**, v. 151, p. 363-374, 2017.

LE MAERECHAL, C.; JAN, G.; EVEN, S.; McCULLOCH, J.A.; AZEVEDO, V.; THIÉRY, R.; VAUTOR, E.; LE LOIR, Y. Development of serological proteome analysis of mastitis by *Staphylococcus aureus* in ewes. **Journal of Microbiological Methods**, v. 79, p. 131 – 136, 2009 .

LEITE, A.Z.; RODRIGUES, N.C.; GONZAGA, M.I.; PAIOLO, J.C.C.; SOUZA, C.A.; STEFANUTTO, N.A.V.; OMORI, W.P.; PINHEIRO, D.G.; BRISTOTTI, J.L.; MATHEUCCI, E.J.; MARIANO, V.S.; OLIVEIRA, G.L.V. Detection of increased Plasma interleukin-6 levels and Prevalence of *Prevotella copri* and *Bacteroides*

vulgatus in the Feces of Type 2 Diabetes Patients. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 2017.

LIMA, S.F; TEIXEIRA, A.G; LIMA, F. S; GANDA, E.K; HIGGINS, C.H; OIKONOMOU, G; BICALHO, R.C. The bovine colostrum microbiome and its association with clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 4, p. 3031-3042, 2017.

LINDNER, J.D.D.; SANTARELLI, M.; YAMAGUISHI, C.T.; SOCCOL, C.R.; NEVIANI, E. Recovery and identification of bovine colostrum microflora using traditional and molecular approaches, **Food Technology and Biotechnology**, p. 349-364, 2011.

METZGER, S.A.; HERNANDEZ, L.L.; SUEN, G.; RUEGG, P. Understanding the Milk Microbiota. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, v. 34, P. 427–438, 2018.

NAQVI, S.A.; BUCK, J.D.; DUFOUR, S.; BARKEMA, H.W. Udder health in Canadian dairy heifers during early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 1-15, 2018.

NARAYANA, S.G.; MIGLIOR, F.; NAQVI, S.A.; MALCHIODI, F.; MARTIN, P.; BARKEMA, H.W. Genetic analysis of subclinical mastitis in early lactation of heifers using both linear and threshold models. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 1-12, 2018.

NITZ, J.; KROMKER, V.; KLOCKE, D.; WENTE, N.; ZHANG, Y.; SEETH, M. Intramammary Infections in Heifers—Time of Onset and Associated Risk Factors. **Animals**, v. 10, p. 1-17, 2020.

OIKONOMOU, G., BICALHO, M. L., MEIRA, E., ROSSI, R. E., FODITSCH, C., MACHADO, V. S.; BICALHO, R. C. Microbiota of cow's milk; distinguishing healthy, sub-clinically and clinically diseased quarters. **Plos One**, v. 9, n. 1, p. e85904, 2014.

OIKONOMOU, G.; ADDIS, M.F.; CHASSARD, C.; NADER-MACIAS, M.E.F.; GRANT, I.; DELBES, C.; BOGNI, C.I.; LOIR, Y.L.; EVEN, S. Milk microbiota: What are we exactly talking about? **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 60, 2020.

OLIVER, S.P.; LEWIS, M. J.; GILLESPIE, B.E.; DOWLEN, H.H.; JAENICKE, E.C.; ROBERTS, R.K. Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection and Determination of Milk Quality. 4th ed. Verona, WI: **National Mastitis Council**, 47 p., 2004.

PLAYFORD, R. J.; WEISER, M. J. Bovine Colostrum: Its Constituents and Uses. **Nutrients**, v. 13, 2021.

PORCELLATO, D.; MEISAL, R.; BOMBELLI, A.; NARVHUS, J. A core microbiota dominates a rich microbial diversity in the bovine udder and may indicate presence of dysbiosis. **Scientific Reports**, n. 10, p. 21608, 2020.

RAINARD, P. Mammary microbiota of dairy ruminants: fact or fiction. **Veterinary Research**, v. 48, n. 1, 2017.

SAM MA, Z.; GUAN, Q.; YE, C.; ZHANG, C.; FOSTER, J.A.; FORNEY, L.J. Network analysis suggests a potentially “evil” alliance of opportunistic pathogens inhibited by a cooperative network in human milk bacterial communities. **Scientific Reports**, v. 5, 2015.

TAPONEN, S.; McGUINNESS, D.; HIITIO, H.; SIMOJOKI, H.; ZADOKS, R.; PYORALA, S. Bovine milk microbiome: a more complex issue than expected. **Veterinary Research**. V. 50, n. 44. 2019.

ZHAO, Y.; CHEN, H.; LIU, H.; CAI, J.; MENG, L.; DONG, L.; ZHENG, N.; WANG, J.; WANG, C. Quantitative polymerase chain reaction coupled with sodium dodecyl sulfate and propidium monoazide for detection of viable *Streptococcus agalactiae* in Milk. **Frontiers in Microbiology**. v. 10, n. 661. 2019.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS – INTRODUÇÃO & REVISÃO

ADDIS, M.F.; TANCA, A.; UZAU, S.; OIKONOMOU, G.; BICALHO, R.C.; MORONI, P. The bovine milk microbiota: insights and perspectives from the –omics studies. **Molecular Biosystems**, 12:2359, 2016.

AITKEN, S.L.; CORL, C.M.; SORDILLO, L.M. Immunopathology of mastitis: insights into disease recognition and resolution. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v. 16, p. 291-304, 2011.

ALMEIDA, W.E.S. Caracterização parcial do gene 16S rRNA de isolados do solo e seus potenciais na solubilização de fostato e influência no crescimento de soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*). 63f. **Dissertação** de Mestrado. Microbiologia Agropecuária - FCAV, Jaboticabal. 2017.

ANDREWS, T.; NEHER, D.A.; WEICHT, T.R.; BARLOW, J.W. Mammary microbiome of lactating organic dairy cows varies by time, tissue site, and infection status. **Plos One**, v. 14, p. 11, 2019.

ASSIS, B.S.; GERMON, P.; SILVA, A.M.; EVEN, S.; NICOLI, J.R.; LE LOIR, Y. *Lactococcus lactis* V7 inhibits the cell invasion of bovine mammary epithelial cells by *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Beneficial Microbes**, 6:879-886, 2015.

BAG, S., SAHA, B., MEHTA, O., ANBUMANI, D., KUMAR, N., DAYAL, M., HANSEN, T. et al.. An improved method for high quality metagenomics DNA extraction from human and environmental samples. **Scientific Reports**, v. 6, p. 26775, 2016.

BARTRAM AK, LYNCH MDJ, STEARNS JC, MORENO-HAGELSIEB G, NEUFELD JD. Generation of multimillion sequence 16S rRNA gene libraries from complex microbial communities by assembling paired-end Illumina reads. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 11, p. 3846-3852, 2011.

BEXIGA, R.; PEREIRA, H.; PEREIRA, O.; LEITÃO, A.; CARNEIRO, C.; ELLIS, K.A.; VILELA, C.L. Observed reduction in recovery of *Corynebacterium* spp. From bovine milk samples by use of a teat cannula. **Journal of Dairy Research**, v.78, p. 9-14, 2011.

BLUDAU, M.J.; MAESCHLI, A.; LEIBER, F.; STEINER, A.; KLOCKE, P. Mastitis in dairy heifers: Prevalence and risk factors. **The Veterinary Journal**, v. 202, p. 566-572, 2014.

BOUCHARD, D.S.; RAULT, L.; BERKOVA, N.; LE LOIR, Y.; EVEN, S. Inhibition of *Staphylococcus aureus* invasion into bovine mammary epithelial cells by contact with live *Lactobacillus casei*. **Applied and Environmental Microbiology**, 79:877-885, 2013.

BOUCHARD, D.S.; SERIDAN, B.; SARAOU, T.; RAULT, L.; GERMON, P.; GONZALEZ MORENO, C.; NADER-MACIAS, F.M.E.; BAUD, D.; FRANÇOIS, P.; CHUAT, V.; CHAIN, F.; LANGELLA, P.; NICOLI, J.; LE LOIR, Y.; EVEN, S. Lactic

acid bacteria isolated from bovine mammary microbiota: potential allies against bovine mastitis. **PloS One**, 10:e0144831, 2015.

BRAEM, G.; STIJLEMANS, B.; VAN HAKEN, W.; DE VliegHER, S.; LEROY, F. Antibacterial activities of coagulase-negative staphylococci from bovine teat apex skin and their inhibitory effect on mastitis-related pathogens. **Journal of Applied Microbiology**, 116:1084-1093, 2014.

CAPORASO JG, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, BITTINGER K, BUSHMAN FD, COSTELLO EK et al. (2010b). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, v. 7, n. 5, p. 335, 2010.

CAPORASO, J. G., LAUBER, C. L., WALTERS, W. A., BERG-LYONS, D., HUNTLEY, J., FIERER, N., GORMLEY, N. et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME Journal**, v. 6, n. 8, p. 1621, 2012.

CARSON, D.A.; BARKEMA, H.W.; NAUSHAD, S.; DE BUCK, J. Bacteriocins of non aureus staphylococci isolated from milk. **Applied Environmental Microbiology**, v. 17, e01015-17, 2017.

COSTA, G. M., BARROS, R. A., da COSTA CUSTODIO, D. A., de PÁDUA PEREIRA, U., FIGUEIREDO, D. J., da SILVA, N. Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, n. 3, p. 297-302, 2013.

COSTA, M.C., STÄMPFLI, H.R., ARROYO, L.G., ALLEN-VERCOE, E., GOMES, R. G., e WEESE, J. S. Changes in the equine fecal microbiota associated with the use of systemic antimicrobial drugs. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, p. 19, 2015.

COSTA, M.C.; WEESE, J.S. Methods and basic concepts for microbiota assessment. **The Veterinary Journal**, v. 249, p. 10-15, 2019.

CHO, I.; BLASER, M.J. The human microbiome: at the interface of health and disease. **Nature Reviews Genetics**, v.v.13, n.4, p.260-270, 2012.

DAHLBERG, J.D.; SUN, L.; WALLER, K.P.; OSTENSSON, K.; McGUIRE, M.; AGENAS, S.; DICKSYED, J. Microbiota data from low biomass milk samples is markedly affected by laboratory and reagent contamination. **Plos One**, v. 14, 2019.

DAHLBERG, J.; WILLIAMS, J.E.; MCGUIRE, M.A.; PETERSON, H.K.; OSTENSSON, K.; AGENAS, S.; DICKSVED, J.; WALLER, P.K. Microbiota of bovine milk, teat skin, and teat canal: Similarity and variation due to sampling technique and milk fraction. **Journal of Dairy Science**, v. 103, p. 7322-7330, 2020.

DE VliegHER, S.; OPSOMER, G.; VANROLLEGHEM, L.A.; DEVRIESE, L.A.; SAMPIMON, O.C.; SOL. J.; BARKEMA, H.W.; HAESEBROUCK, F.; DE KRUIF, A. In vitro growth inhibition of major mastitis pathogens by *Staphylococcus chromogenes* originating from teat apices of dairy heifers. **Veterinary Microbiology**, 101:215-221, 2004.

EISENHOFER, R.; MINICH, J.J.; MAROTZ, C.; COOPER, A.; KNIGHT, R.; WEYRICH, L.S. Contamination in Low Microbial Biomass Microbiome Studies: Issues and Recommendations. **Cell Press Reviews**. n.1637, p. 13, 2018.

FRIMAN, M.; HIITIÖ, H; NIEMI, M.; HOLOPAINEN, J.; PYÖRÄLÄ, S.; SIMOJOKI, H. The effect of a canula milking sampling technique on the microbiological diagnosis of bovine mastitis. **The Veterinary Journal**, v. 2, n. 26, p. 57 -61. 2017.

FU, X.; ZENG, B.; WANG, P.; WANG, L.; WEN, B.; LI, J.; LIU, H.; BAI, S.; JIA, G. Microbiome of total versus live bacteria in the gut of rex rabbits. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1-10, 2018.

HEISE, J.; NEGA, M.; ALAWI, M.; WAGNER, D. Propidium monoazide treatment to distinguish between live and dead methanogens in pure cultures and environmental samples. **Journal of Microbiological Methods**. V. 121, p – 11-23. 2016.

HIITIO, H.; SIMOJOKI, H.; KALMUS, P.; HOLOPAINEN, J.; PYORALA, S.; TAPONEN, S. The effect of sampling technique on PCR-based bacteriological results of bovine milk samples. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 6532-6541, 2016.

HOQUE, N.M.; ISTIAQ, A.; CLEMENT, R.A.; GIBSON, K.M.; SAHA, O.; ISLAM, O.K.; ABIR, R.A.; SULTANA, M.; SIDDIKI, A.Z.; CRANDALL, K.A.; HOSSAIN, A.M. Insights Into the Resistome of Bovine Clinical Mastitis Microbiome, a Key Factor in Disease Complication. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 860, 2020.

JAMALI, H., RADMEHR, B., e ISMAIL, S. Short communication: prevalence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 4, p. 2226-2230, 2014.

KALINSKA, A.; GOTEBIEWSKI, M.; WOJCIK, A. Mastitis pathogens in dairy cattle – a review, **World Scientific News**, v. 89, p. 22-31, 2017.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition by the innate immune system. **Int Rev Immunol**, v. 30, 2011.

LIMA, S.F; TEIXEIRA, A.G; LIMA, F. S; GANDA, E.K; HIGGINS, C.H; OIKONOMOU, G; BICALHO, R.C. The bovine colostrum microbiome and its association with clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 4, p. 3031-3042, 2017.

LIMA,S.F.; BICALHO, M.L.; BICALHO, R.C. Evaluation of milk sample fractions for characterization of milk microbiota from healthy and clinical mastitis cows. **Plos One**, v. 13, 2018.

MAHMMOD, Y. S., KLAAS, I. C., KATHOLM, J., LUTTON, M., E ZADOKS, R. N. Molecular epidemiology and strain-specific characteristics of *Streptococcus agalactiae* at the herd and cow level. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 10, p. 6913-6924, 2015.

- MAN, W.J.; DE STEENHUIJSEN PITERS, W.A.A.; BOGAERT, D. The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, p. 259-270, 2017.
- MELO, P. D. C., FERREIRA, L. M., NADER-FILHO, A., ZAFALON, L. F., e GODOY VICENTE, H. I. Análise fenotípica e molecular da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite subclínica bovina. **Bioscience Journal**, p. 94-99, 2012.
- METZGER, S.A.; HERNANDEZ, L.L.; SUEN, G.; RUEGG, P. Understanding the Milk Microbiota. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, v. 34, P. 427–438, 2018.
- MOYES, K.M.; SORENSEN, P.; BIONAZ, M. The Impact of Intramammary *Escherichia coli* Challenge on Liver and Mammary Transcriptome and Cross-Talk in Dairy Cows during Early Lactation Using RNAseq. **PloS One**, v. 11, n. 6, 2016.
- NAKAZATO T, OHTA T, BONO H. Experimental design-based functional mining and characterization of high-throughput sequencing data in the sequence read archive. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e77910, 2013.
- NAQVI, S.A.; BUCK, J.D.; DUFOUR, S.; BARKEMA, H.W. Udder health in Canadian dairy heifers during early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 1-15, 2018.
- NARAYANA, S.G.; MIGLIOR, F.; NAQVI, S.A.; MALCHIODI, F.; MARTIN, P.; BARKEMA, H.W. Genetic analysis of subclinical mastitis in early lactation of heifers using both linear and threshold models. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 1-12, 2018.
- NASCIMENTO, J.S.; FAGUNDES, P.C.; BRITO, M.A.V.P.; DOS SANTOS, K.R.N.; BASTOS, M.C.F. Production of bacteriocins by coagulase-negative staphylococci involved in bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, 106:61-71, 2005.
- NITZ, J.; KROMKER, V.; KLOCKE, D.; WENTE, N.; ZHANG, Y.; SEETH, M. Intramammary Infections in Heifers—Time of Onset and Associated Risk Factors. **Animals**, v. 10, p. 1-17, 2020.
- OIKONOMOU, G., BICALHO, M. L., MEIRA, E., ROSSI, R. E., FODITSCH, C., MACHADO, V. S.; BICALHO, R. C. Microbiota of cow's milk; distinguishing healthy, sub-clinically and clinically diseased quarters. **Plos One**, v. 9, n. 1, p. e85904, 2014.
- OIKONOMOU, G.; ADDIS, M.F.; CHASSARD, C.; NADER-MACIAS, M.E.F.; GRANT, I.; DELBES, C.; BOGNI, C.I.; LOIR, Y.L.; EVEN, S. Milk microbiota: What are we exactly talking about? **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 60, 2020.
- OLIVEIRA, A.C.D.; SOUZA, F.N.; SANTÁNNA, F.M.; FAÚLA, L.L.; CHANDE, C.G.; CORTEZ, A.; DELLA LIBERA, A.M.M.P.; COSTA, M.; SOUZA, M.R.; HEINEMANN, M.B.; CERQUEIRA, M.O.P. Temporal and geographical comparison of bulk tank milk and water microbiota composition in Brazilian dairy farms. **Food Microbiology**. 2021.

OULAS, A., PAVLOUDI, C., POLYMENAKOU, P., PAVLOPOULOS, G. A., PAPANIKOLAOU, N., KOTOULAS, G., ILIOPOULOS, L. ET AL. Metagenomics: tools and insights for analyzing next-generation sequencing data derived from biodiversity studies. **Bioinformatics And Biology Insights**, v. 9, p. BBI. S12462, 2015.

PARENTE, E.; RICCIARDI, A.; ZOTTA, T. The microbiota of dairy milk: A review. **International Dairy Journal**, v. 107, 2020.

PIEPERS, S.; PEETERS, K.; OPSOMER, G.; BARKEMA, H.W.; FRANKENA, K.; DE VliegHER, S. Pathogen group specific risk factors at herd, heifer and quarter levels for intramammary infections in early lactating dairy heifers. **Preventive Veterinary Medicine**, 99:91-101, 2011.

PICCART, K.; VERBEKE, J.; VISSCHER, A.D.; PIEPERS, S.; HAESENBROUCH, A.F.; DE VliegHER, S. Local host response following an intramammary challenge with *Staphylococcus fleurettii* and different strains of *Staphylococcus chromogenes* in dairy heifers. **Veterinary Research**, p. 47-56, 2016.

PINZÓN, C.P.; CABRERA, V. E.; RUEGG, P. L. Decision tree analysis of treatment strategies for mild and moderate cases of clinical mastitis occurring in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 4, p. 1873-1892, 2011.

PORCELLATO, D.; MEISAL, R.; BOMBELLI, A.; NARVHUS, J. A core microbiota dominates a rich microbial diversity in the bovine udder and may indicate presence of dysbiosis. **Scientific Reports**, n. 10, p. 21608, 2020.

PORCHERIE, A.C.P.; TROTIEREAU, A.; et al. Repertoire of *Escherichia coli* agonists sensed by innate immunity receptors of the bovine udder and mammary epithelial cells. **Veterinary Research**, v. 43, 2012.

QUAST, C., PRUESSE, E., YILMAZ, P., GERKEN, J., SCHWEER, T., YARZA, P., ... & GLÖCKNER, F. O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. QUAST, **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D590-D596, 2013.

RAINARD, P. Mammary microbiota of dairy ruminants: fact or fiction. **Veterinary Research**, v. 48, n. 1, 2017.

RAINARD, P.; FOUCRAS, G.; FITZGERALD, J.R.; WATTS, J.L. et al. Knowledge gaps and research priorities in *Staphylococcus aureus* mastitis control. **Transboundary and Emerging Diseases**, 2018.

ROSS MG, RUSS C, COSTELLO M, et al. Characterizing and measuring bias in sequence data. **Genome Biology**, v. 14, n. 5, p. R51, 2013.

RUEGG, P. L. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 10381-10397, 2017.

RYMAN, V.E.; PACKIRISWAMY, N.; SORDILLO, L.M. Role of endothelial cells in bovine mammary gland health and disease. **Animal Health Research**, v. 16, p. 135-149, 2015.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite. São Paulo: **Manole**, p. 313, 2007.

SANTOS, T.M.; GILBERT, R.O.; BICALHO, R.C. Metagenomic analysis of the uterine bacterial microbiota in healthy and metritis postpartum dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.94, p.291-302, 2011.

SCHLOSS, P. D., WESTCOTT, S. L., RYABIN, T., HALL, J. R., HARTMANN, M., HOLLISTER, E. B., SAHL, J. W. et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7537-7541, 2009.

SHKRETA, L.; TALBOT, B.J.; DIARRA, M.S.; LACASSE, P. Immune responses to a DNA/protein vaccination strategy against *Staphylococcus aureus* induced mastitis in dairy cows. **Vaccine**, v. 23, n. 1, p. 114-126, 2004.

SORDILLO, L.M. Mammary Gland Immunobiology and Resistance to Mastitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 34, p. 507-523, 2018.

SORDILLO, L.M.; STREICHER, K.L. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility, **Journal Mammary Gland Biology Neoplasia**, v. 7, p. 135-146, 2002.

TAPONEN, S.; McGUINNESS, D.; HIITIO, H.; SIMOJOKI, H.; ZADOKS, R.; PYORALA, S. Bovine milk microbiome: a more complex issue than expected. **Veterinary Research**. V. 50, n. 44. 2019.

VASQUEZ, A.K.; GANDA, E.K.; CAPEL, M.B.; EICKER, S.; VIRKLER, P.D.; BICALHO, R.C.; NYDAM, D.V. The microbiome *Escherichia coli* and culture-negative non severe clinical mastitis: Characterization and associations with linear score and milk production. **Journal of Dairy Science**, v. 102, p. 578-594, 2019.

WHITESIDE, S.A.; RAVZI, H.; DAVE, S.; REID, G.; BURTON, J.P. The microbiome of the urinary tract – a role beyond infection. **Nature Reviews Urology**, v.12, p.81-90, 2015.

ZHAO, Y.; CHEN, H.; LIU, H.; CAI, J.; MENG, L.; DONG, L.; ZHENG, N.; WANG, J.; WANG, C. Quantitative polymerase chain reaction coupled with sodium dodecyl sulfate and propidium monoazide for detection of viable *Streptococcus agalactiae* in Milk. **Frontiers in Microbiology**. V. 10, n. 661. 2019.

ZHOU, H. W., LI, D. F., TAM, N. F. Y., JIANG, X. T., ZHANG, H., SHENG, H. F., ZOU, F. et al. BIPES, a cost-effective high-throughput method for assessing microbial diversity. **The ISME Journal**, v. 5, n. 4, p. 741, 2011.

APÊNDICE 1. Capítulo 1. Dados referentes aos valores de CCS, resultado microbiológico e resultado da amplificação de qPCR.

Animal	Quarto	CCS (cels./mL)	Contagem - UFC 10 uL	Microbiológico 10 uL	Contagem - UFC 100 uL	Microbiológico 100 uL	qPCR com PMA	qPCR sem PMA
15 dias pós-parto								
2	AD	66.000	31	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	763	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	Muito baixo	Muito baixo
2	AE	2.000	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito baixo	1.787x10 ⁴
2	PD	2.000	5	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	86	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	Muito baixo	Muito baixo
2	PE	3.000	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito baixo	Muito baixo
3	AD	51.000	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito baixo	Muito baixo
3*	AE*	5.000	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito baixo	1.002x10 ⁸
3	PD	3.000	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito baixo	9.458x10 ⁴
3	PE	33.000	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito baixo	Muito baixo
4	AD	251.000	6	<i>Lactococcus garviae</i>	176./161.	<i>Lactococcus garviae/ Staphylococcus chromogenes</i>	Muito baixo	5.062x10 ⁶
4*	AE*	357.000	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito baixo	1.224x10 ⁷
4	PD	458.000	14	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	277	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	Muito baixo	1.179x10 ⁸
4	PE	313.000	9	<i>Staphylococcus</i>	213	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	Muito	1.710x10 ⁵

				<i>chromogenes</i>			baixo	
6	AD	21.000	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito baixo	Muito baixo
6	AE	8.000	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito baixo	6.086x10 ⁴
6	PD	134.000	Ausente	NHC	1	<i>Staphylococcus xylosus</i>	Muito baixo	6.476x10 ⁴
6	PE	5.000	Ausente	NHC	3	<i>Staphylococcus capitis</i>	Muito baixo	5.055x10 ⁵
7	AD	18.000	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito baixo	1.651x10 ⁸
7	AE	39.000	Ausente	NHC	1	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	Muito baixo	7.902x10 ⁵
7*	PD*	87.000	Ausente	NHC	1	<i>Moraxella osloensis</i>	Muito baixo	1.607x10 ⁵
7*	PE*	63.000	Ausente	NHC	2	<i>Staphylococcus auricularis</i>	Muito baixo	5.411x10 ⁴
8	AD	23.000	1	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	15	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	Muito baixo	Muito baixo
8*	AE*	6.000	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito baixo	Muito baixo
8*	PD*	37.000	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito baixo	1.961x10 ⁴
8	PE	143.000	66	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	1.064	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	Muito baixo	Muito baixo
9	AD	24.000	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito baixo	1.698x10 ⁴

9	AE	10.000	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito baixo	3.545x10 ⁶
9*	PD*	320.000	Ausente	NHC	2	<i>Bacillus pumilus</i>	Muito baixo	Muito baixo
9*	PE*	4.000	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito baixo	2.042x10 ⁴
12*	AD*	19.000	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito baixo	6.331x10 ⁵
12	AE	12.000	Ausente	NHC	4	<i>Bacillus megaterium</i>	Muito baixo	5.251x10 ⁴
12	PD	523.000	1	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	27	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	Muito baixo	2.512x10 ⁴
12	PE	87.000	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito baixo	6.120x10 ⁴

AD: anterior direito; AE: anterior esquerdo; PD: posterior direito; PE: posterior esquerdo; NHC: não houve crescimento; CCS: contagem de células somáticas; UFC: unidade formadora de colônias; qPCR: reação da cadeia da polimerase quantitativa em tempo real.

Animais e quartos que contêm (*), indicam que não foi possível obter sucesso no sequenciamento de alto rendimento da amostra.

APÊNDICE 2. – Capítulo 2 - Dados referentes aos valores de CCS, resultado microbiológico e resultado da amplificação de qPCR.

Animal	Quarto	CCS (cels./mL)	Contagem - UFC 10 uL	Microbiológico 10 uL	Contagem - UFC 100 uL	Microbiológico 100 uL	Tradicional	Cânula	Cisterna	Alvéolo
15 dias pós-parto							qPCR			
2*	AD*	66.000	31	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	763	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo
2*	AE*	2.000	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo
2*	PD*	2.000	5	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	86	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo
2*	PE*	3.000	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito baixo	1.904x10 ⁴	Muito baixo	Muito baixo
3*	AD*	51.000	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo
3*	AE*	5.000	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo
3*	PD*	3.000	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo
3*	PE*	33.000	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo
4	AD	251.000	6	<i>Lactococcus garviae</i>	176./161.	<i>Lactococcus garviae/ Staphylococcus chromogenes</i>	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo
4*	AE*	357.000	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito baixo	Muito baixo	1.854x10 ⁴	Muito baixo
4	PD	458.000	14	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	277	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo

4*	PE*	313.000	9	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	213	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo
6*	AD*	21.000	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo
6*	AE*	8.000	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo
6	PD	134.000	Ausente	NHC	1	<i>Staphylococcus xylosus</i>	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo
6*	PE*	5.000	Ausente	NHC	3	<i>Staphylococcus captis</i>	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo
7*	AD*	18.000	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo
7*	AE*	39.000	Ausente	NHC	1	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	Muito baixo	1.799x10 ⁴	Muito baixo	Muito baixo
7*	PD*	87.000	Ausente	NHC	1	<i>Moraxella osloensis</i>	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo
7*	PE*	63.000	Ausente	NHC	2	<i>Staphylococcus auricularis</i>	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo
8	AD	23.000	1	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	15	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo
8	AE	6.000	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo
8	PD	37.000	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito baixo	2.400x10 ⁴	Muito baixo	Muito baixo
8	PE	143.000	66	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	1.064	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo
9*	AD*	24.000	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito	Muito	Muito baixo	Muito

							baixo	baixo		baixo
9	AE	10.000	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo
9*	PD*	320.000	Ausente	NHC	2	<i>Bacillus pumilus</i>	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo
9*	PE*	4.000	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo
12*	AD*	19.000	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo
12	AE	12.000	Ausente	NHC	4	<i>Bacillus megaterium</i>	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo
12*	PD*	523.000	1	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	27	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo	Muito baixo
12*	PE*	87.000	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito baixo	1.802x10 ⁴	Muito baixo	Muito baixo

AD: anterior direito; AE: anterior esquerdo; PD: posterior direito; PE: posterior esquerdo; NHC: não houve crescimento; CCS: contagem de células somáticas; UFC: unidade formadora de colônias; qPCR: reação da cadeia da polimerase quantitativa em tempo real.

Animais e quartos que contêm (*), indicam que não foi possível obter sucesso no sequenciamento de alto rendimento da amostra.

APÊNDICE 3. Capítulo 3 - Dados referentes aos valores de CCS, resultado microbiológico e resultado da amplificação de qPCR.

Animal	Quarto	Avaliação visual	Avaliação US	Escore de teto	Contagem - UFC 10 uL	Microbiológico 10 uL	Contagem - UFC 100 uL	Microbiológico 100 uL	qPCR
± 4 dias									
1*	AD*	F	F	2	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito baixo
1*	AE*	F	F	2	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito baixo
1*	PD*	F	F	1	16	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	20./312	<i>Staphylococcus chromogenes</i> / <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Muito baixo
1*	PE*	F	F	2	3	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	30	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Muito baixo
2*	AD*	F	F	2	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito baixo
2	AE	F	F	2	300	<i>Bacillus oleronius</i>	2.700	<i>Bacillus oleronius</i>	Muito baixo
2*	PD*	F	F	2	Ausente	NHC	75	<i>Bacillus altitudinis</i>	Muito baixo
2	PE	F	F	2	33	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	300	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	Muito baixo
3	AD	A	A	1	Ausente	NHC	57	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	Muito baixo
3	AE	A	A	1	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito baixo
3	PD	A	A	1	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito baixo
3*	PE*	A	A	1	2	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	6	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Muito baixo

4	AD	A	A	3	70	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	44/47	<i>Lactococcus garviae</i> / <i>Staphylococcus chromogenes</i>	Muito baixo
4	AE	A	A	3	170	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	9.600	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	Muito baixo
4	PD	A	A	3	2	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	97	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	Muito baixo
4	PE	A	A	3	21	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	633	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	Muito baixo
6	AD	F	F	1	Ausente	NHC	Ausente	NHC	1.998x10 ⁴
6	AE	F	F	2	2	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	8	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	Muito baixo
6	PD	F	F	2	4	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	92	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	Muito baixo
6*	PE*	F	F	2	2	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	52	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	Muito baixo
7*	AD*	F	F	1	Ausente	NHC	12	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	Muito baixo
7*	AE*	F	F	1	1	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	7	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	Muito baixo
7*	PD*	F	F	1	10	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	53	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	Muito baixo
7*	PE*	F	F	1	1	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	30	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	Muito baixo
8*	AD*	F	F	1	Ausente	NHC	4	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Muito baixo
8*	AE*	F	F	1	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito baixo

8*	PD*	F	F	1	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito baixo
8*	PE*	F	F	1	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito baixo
9*	AD*	F	F	1	Ausente	NHC	2	<i>Brevibacillus centrosporus</i>	Muito baixo
9*	AE*	F	F	1	Ausente	NHC	1	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	Muito baixo
9*	PD*	F	F	1	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito baixo
9*	PE*	F	F	1	Ausente	NHC	4	<i>Bacillus circulans</i>	Muito baixo
11*	AD*	F	F	2	Ausente	NHC	3./2	<i>Staphylococcus aureus/ Bacillus megaterium</i>	Muito baixo
11	AE	F	F	2	2	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	288	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	Muito baixo
11	PD	F	F	2	5	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	135	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	1.601x10 ⁴
11*	PE*	F	F	2	1	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	3	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	Muito baixo
12	AD	F	F	2	Ausente	NHC	Ausente	NHC	Muito baixo
12*	AE*	F	F	2	2	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	44	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	Muito baixo
12*	PD*	F	F	2	2	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	16	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	Muito baixo
12*	PE*	F	F	2	Ausente	NHC	1	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	Muito

									baixo
--	--	--	--	--	--	--	--	--	-------

AD: anterior direito; AE: anterior esquerdo; PD: posterior direito; PE: posterior esquerdo; NHC: não houve crescimento; CCS: contagem de células somáticas;

UFC: unidade formadora de colônias; qPCR: reação da cadeia da polimerase quantitativa em tempo real.

Animais e quartos que contêm (*), indicam que não foi possível obter sucesso no sequenciamento de alto rendimento da amostra.