**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Caracterização molecular da comunidade bacteriana em rebanhos
leiteiros com mastite subclínica**

Lilian Ribeiro Rezende

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Ciência Animal e Pastagens

**Piracicaba
2016**

Lilian Ribeiro Rezende
Zootecnista

**Caracterização molecular da comunidade bacteriana em rebanhos
leiteiros com mastite subclínica**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **LUIZ LEHMANN COUTINHO**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Ciência Animal e Pastagens

Piracicaba
2016

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Rezende, Lilian Ribeiro

Caracterização molecular da comunidade bacteriana em rebanhos leiteiros com mastite subclínica / Lilian Ribeiro Rezende. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.

90 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Sequenciamento de nova geração 2. Gene 16S rRNA 3. Bactérias 4. Infecção intramamária 5. Bovino 6. Leite I. Título

CDD 636.234
R467c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICO

A minha filha Pietra,

por ter me escolhido como mãe e por me fazer sentir o amor mais puro e lindo que existe. Você é a razão pela qual, a cada dia tento me tornar uma pessoa melhor. Sou muito grata e muito mais feliz por ter você em minha vida.

Ao meu amado Daniel por ser tão especial e trazer paz para o meu coração.

Por você acredito na força do amor, por você acredito na solidez da família e com você acredito que juntos somos mais fortes e melhores.

OFEREÇO

Aos meus pais Anízio e Iraima, às minhas irmãs Cláudia e Flávia e aos meus queridos e amados sobrinhos Eduardo e Clara.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **Luiz Lehmann Coutinho**, gostaria de fazer um agradecimento muito especial pela orientação, amizade, apoio, compreensão e pela grande oportunidade de fazer parte da equipe do Laboratório de Biotecnologia Animal pela segunda vez.

Ao Prof. Dr. **Fernando Dini Andreote**, pela atenção nas análises de bioinformática, pela amizade e pela presteza em que me atendeu nos momentos de urgência sendo o meu anjo da guarda na elaboração desta tese.

Ao Dr. **Victor Satler Pylro**, coordenador geral do *Brazilian Microbiome Project*, pela atenção nas análises de bioinformática.

Ao Dr. **Horácio Montenegro**, pela atenção nas análises de bioinformática.

Ao Prof. Dr. **Paulo Fernando Machado**, pela atenção e colaboração nas análises de CCS realizadas na Clínica do Leite.

Ao Prof. Dr. **Marcos Veiga**, pela atenção e colaboração nas análises de cultura microbiológica realizadas no laboratório de Pesquisa em Qualidade do Leite.

Às mestrandas **Natália** e **Priscila**, na época estagiárias, pela grande colaboração nas coletas e processamento das amostras no laboratório.

À **CAPES** pela concessão da bolsa de estudos.

Aos técnicos do Laboratório de Biotecnologia Animal, **Marcela**, **Pilar**, **Ricardo**, **Nirlei** e **Jorge** pela atenção nas análises, apoio e amizade durante estes anos.

Aos **amigos e colegas** da Esalq e Laboratório de Biotecnologia Animal: **Paula**, **Natalia**, **Priscilla Vilela**, **Luiza**, **Fábio**, **Ribamar**, **Thaís**, **Gabriel**, **Gabriela**, **Priscila**, **Clarissa**, **Mirele**, **Aline**, **Andrezza** e **Karina** pela convivência e troca de experiências durante estes anos.

À minha amiga especial **Elaine**, simplesmente por ser minha irmã espiritual nesta vida e por tanto contribuir para minha evolução espiritual.

À minha nova família que Deus me presenteou, meus amados sogros **Teresa** e **Ricardo** e mais uma vez ao meu amado **Daniel**, por toda compreensão e paciência em todos os momentos em que o trabalho e o estudo ocuparam todo o meu tempo e não pude estar presente.

Por último, e mais uma vez, à **minha filhinha amada Pietra** por me dar toda força desse mundo para vencer mais esse desafio em minha vida, mesmo exigindo todos os cuidados de uma criança de dois anos, mesmo por todas as manhãs e por todas as vezes em que não me deixou descansar, para o bom rendimento deste trabalho, acordando em média 5 vezes na madrugada para mamar, pois é, este “mini ser” adorável e encantador ainda mama no peito. E por me fazer acreditar que nós mulheres podemos sim ser boas mães e também boas profissionais.

***A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho,
minha sincera gratidão!***

*“Se o que você está percorrendo é o caminho dos seus verdadeiros sonhos, comprometa-se com ele. Não deixe a porta de saída aberta, através da desculpa: "Ainda não é bem isto que eu queria". Esta frase guarda dentro dela a semente da derrota. Assuma o seu caminho mesmo que precise dar passos incertos, mesmo que saiba que pode fazer melhor o que está fazendo. Se você aceitar suas possibilidades no presente, vai melhorar no futuro, mas se negar suas limitações, jamais se verá livre delas. Enfrente seu caminho com coragem, não tenha medo da crítica dos outros. E, sobretudo, não se deixe paralisar por sua própria crítica. Deus estará sempre com você nas noites insones, e enxugará com seu amor as lágrimas ocultas. **Deus é o Deus dos valentes.**”*

Paulo Coelho

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 HIPÓTESES OU QUESTÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS	19
2.1 Objetivos	19
2.1.1 Objetivo geral	19
2.1.2 Objetivos específicos.....	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1 Contagem de Células Somáticas	21
3.2 Agentes da Mastite.....	23
3.3 Método tradicional de identificação de bactérias em cultivo.....	25
3.4 Microbiologia molecular em estudos de diversidade bacteriana	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Amostragem	31
4.2 Coleta de amostras assépticas.....	31
4.3 Princípios analíticos	32
4.3.1 Contagem celular somática	32
4.3.2 Cultivo microbiológico.....	32
4.3.3 Extração de DNA bacteriano	33
4.3.4 Amplificação da sequência do gene 16S ribossomal RNA (rRNA).....	34
4.3.5 Sequenciamento dos amplicons.....	35
4.3.6 Procedimentos de bioinformática para análises das sequências 16S rRNA	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1 Contagem de Células Somáticas	39
5.2 Cultura microbiológica	39
5.3 Estrutura e composição da comunidade bacteriana com base na sequência da região V3 e V4 do gene 16S rRNA.....	43
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	77
REFERÊNCIAS	79

RESUMO

Caracterização molecular da comunidade bacteriana em rebanhos leiteiros com mastite subclínica

A mastite bovina é considerada a doença de maior impacto nos rebanhos leiteiros, exercendo efeito econômico negativo sobre a produtividade e perdas significativas à indústria de laticínios. Tendo em vista os impactos na sanidade animal e os prejuízos econômicos acarretados, o objetivo deste estudo foi caracterizar de forma mais abrangente a comunidade microbiana presente em rebanhos leiteiros com mastite subclínica utilizando o sequenciamento parcial do gene 16S ribossomal RNA (rRNA). Especificamente, foram caracterizadas as comunidades bacterianas presentes em amostras de leite vindas de três fazendas comerciais, sendo que cada fazenda contribuiu com amostras com alta contagem de células somáticas (CCS > 200.000 cel./mL) e com baixa contagem (CCS < 200.000 cel./mL) perfazendo um total de 57 animais. O DNA total foi extraído e amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores da região V3 e V4 do gene 16S rRNA. O sequenciamento foi realizado utilizando a tecnologia de sequenciamento de nova geração através do equipamento *MiSeq* (Illumina – San Diego, EUA). Para efeito de comparação, alíquotas de todas as amostras foram destinadas ao cultivo microbiológico para identificação de bactérias causadoras da mastite. Os fragmentos *amplicons* de todas as amostras foram submetidos a uma série de análises computacionais utilizando o programa QIIME. Após a avaliação adicional das sequências em nível de espécie, verificou-se que em geral as bactérias diagnosticadas por cultura geralmente não corresponderam com as sequências mais abundantes detectadas pelo sequenciamento. A análise da composição da microbiota de amostras de leite provenientes de animais saudáveis revelou a presença de uma grande diversidade de espécies bacterianas, mesmo que nenhuma bactéria tenha sido detectada por técnica de cultura. A espécie bacteriana mais abundante em todas as amostras foi *Staphylococcus chromogenes*. *Staphylococcus aureus* também foi detectada na grande maioria das amostras. As diferenças na composição microbiana foram observadas entre as amostras quando a comparação foi feita de forma individual. Estas diferenças foram notórias em composição taxonômica e foram refletidas por intermédio das estimativas de alfa e beta diversidade. Quando a comparação foi realizada por separação de grupos com alta e baixa CCS, essa diferença não foi tão evidente. Com este estudo será possível compreender a diversidade dos microrganismos presentes na glândula mamária de animais saudáveis e com mastite subclínica. Essas informações podem ser úteis podendo contribuir no planejamento de medidas terapêuticas e preventivas mais eficazes da doença.

Palavras-chave: Sequenciamento de nova geração; Gene 16S rRNA; Bactérias; Infecção intramamária; Bovino; Leite

ABSTRACT

Molecular characterization of bacterial communities in dairy herds with subclinical mastitis

Bovine mastitis is considered the most impact disease in dairy herds, exerting negative economic effect on productivity and significant losses to the dairy industry. In view of the impact on animal health and carted economic losses, the objective of this study was to characterize more comprehensively the microbial community present in dairy herds with subclinical mastitis using the partial sequencing of 16S ribosomal RNA gene (rRNA). Specifically, the bacterial communities present in samples of milk coming from three commercial farms were identified, and each farm contributed samples with high somatic cell count (SCC > 200,000 cel./mL) and low count (SCC < 200,000 cel./ml) for a total of 57 animals. Total DNA was extracted and amplified with primers of the V3 and V4 region of the 16S rRNA gene. Sequencing was performed using the new generation of sequencing technology through MiSeq equipment (Illumina - San Diego, USA). For comparison, aliquots of all samples were intended for microbiological culture for identification of bacteria which cause mastitis. The amplicon fragments of all samples were subjected to a series of computer analyzes using the QIIME program. After further evaluation of the sequences at the species level, it was found that in general the bacteria do not generally diagnosed by culture corresponded to the most abundant sequences identified by sequencing. The analysis of milk samples from microbial composition from healthy animals revealed the presence of a diversity of bacterial species, even though no bacteria have been detected by culture technique. The most abundant bacterial species in all samples was *Staphylococcus chromogenes*. *Staphylococcus aureus* was also detected in most samples differences in microbial composition were found between the samples when a comparison was made individually. These differences were noticeable in taxonomic composition and were reflected by means of the estimates of alpha and beta diversity. When comparison was performed by separation of high and low groups with CCS, this difference was not so evident. This study will be possible to understand the diversity of microorganisms present in the mammary gland of healthy animals and with subclinical mastitis. This information can be useful and can contribute in the planning of more effective therapeutic and preventive measures of the disease.

Keywords: Next generation sequencing; 16S rRNA; Bacteria; Intramammary infection; Bovine; Milk

1 INTRODUÇÃO

A mastite bovina é caracterizada como uma inflamação da glândula mamária, apresentando alterações patológicas no tecido glandular e uma série de modificações físico-químicas no leite. Na forma clínica, alterações visuais no leite podem ser observadas como alterações de coloração, aparecimento de coágulos e presença de grande número de leucócitos, enquanto na apresentação subclínica evidencia-se a diminuição da produção, da qualidade e aumento da contagem de células somáticas (CCS) do leite (RADOSTITS et al., 1994). Apesar das consideráveis pesquisas realizadas sobre o tema, a mastite tem sido considerada a doença de maior impacto nos rebanhos leiteiros, exercendo efeito econômico negativo sobre a produtividade e perdas significativas à indústria de laticínios por impactar negativamente a qualidade do leite produzido (HILLERTON, 1996).

Nos EUA as perdas econômicas são estimadas em aproximadamente US\$ 200 (duzentos dólares) por vaca com mastite por ano, as quais são devido à menor produção, descarte prematuro de vacas por perda de um ou mais quartos mamários que se tornam fibrosos e improdutivos, aumento dos custos de reposição, descarte de leite, custos de medicamentos, honorários veterinários, custos trabalhistas, além das penalidades aplicadas pelos laticínios (SMITH; HOGAN, 2001). Segundo Bramley et al. (1996) o prejuízo anual pode chegar a 2 bilhões de dólares nos EUA. No Brasil, um estudo realizado com rebanhos leiteiros dos estados de Minas Gerais e São Paulo, os autores estimaram perdas de US\$ 317,93/vaca/ano e prejuízos de US\$ 20.611,32/propriedade/ano (COSTA et al., 1998).

As perdas ocorrem em ambas as manifestações clínicas e subclínicas da doença. Os custos adicionais que raramente são mencionados são absorvidos pela indústria em termos de redução nos rendimentos dos produtos lacteos, bem como a fabricação de produtos com vida útil reduzida e aceitação pelo consumidor (SMITH; HOGAN, 2001). A ocorrência da mastite para indústria traz como consequência problemas relacionados ao processamento do leite e redução no rendimento em razão dos teores inferiores de caseína, gordura e lactose resultando em produtos de baixa qualidade e estabilidade (BRITO, 1998).

A etiologia da mastite é complexa e multifatorial e o controle da doença consiste em identificar os agentes causadores da infecção e conhecer suas características. No Brasil pode-se afirmar que todos os rebanhos leiteiros

apresentam mastite subclínica, sendo que sua prevalência pode variar de 15 a 75% de vacas infectadas (MACHADO et al., 2000).

A mastite subclínica é geralmente causada por uma variedade de patógenos. Aproximadamente 90% das mastites são causadas por bactérias e além desses patógenos, algas, leveduras, fungos e vírus podem estar envolvidos na etiologia da doença, porém estima-se que a ocorrência deste último grupo seja baixa (PHILPOT; NICKERSON, 1991). Dentre as bactérias, um número limitado, dentro dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e do grupo dos coliformes causa a maior parte das infecções. Aproximadamente 80% das infecções que resultam em mastite são causadas pelas bactérias *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli* (BRITO et al., 1998; BRADLEY, 2002). No entanto, esta lista pode não estar completa e microrganismos que não podem ser cultivados por condições de cultura convencionais podem escapar à notificação. O progresso recente na ecologia microbiana molecular revelou que os métodos de cultura tradicionais não representam o âmbito da diversidade microbiana em seu ambiente natural ou em determinada amostra, uma vez que apenas uma pequena proporção de microrganismos viáveis em uma amostra são recuperados por técnicas de cultura (HUGENHOLTZ et al., 1998).

Além disso, muitas abordagens utilizadas para explorar a diversidade e potencial de comunidades microbianas são tendenciosas por causa das limitações dos métodos de cultivo. Uma vez que o cultivo microbiológico seleciona apenas os aptos a sobreviver em determinado meio, esse se torna o maior desafio no estudo de bactérias e vírus impedindo que toda biodiversidade da amostra natural seja preservada. De acordo com Torsvik et al. (1990) técnicas de cultivo padrão abrangem 1% ou menos da diversidade bacteriana na maioria das amostras ambientais. Para superar as dificuldades e limitações associadas às técnicas de cultivo, vários métodos moleculares baseados em DNA têm sido desenvolvidos. Em geral, os métodos baseados na análise total ou parcial do gene 16S ribossomal RNA (rRNA) fornece informações abrangentes sobre os táxons e espécies presentes em um ambiente. Esse gene funciona como marcador de grandes grupos bacterianos e através de comparação com sequências de bancos de dados de DNA ribossomal permite a classificação dos grupos presentes na amostra (COLE et al., 2009).

Dessa forma, estudos de metodologias independentes de cultivo apresentam-se como uma nova perspectiva da ciência que permite estudar organismos não cultiváveis para compreender a verdadeira diversidade de microrganismos, suas funções, cooperação e evolução em ambientes naturais como solo, água, sistema digestivo de animais e humanos ou de amostras clínicas (HANDELSMAN, 2004). Além disso, as plataformas de sequenciamento fornecem a oportunidade de identificar microrganismos que até então eram desconhecidos e assim poder inferir a relevância de determinados grupos com a relação a um chamado “fenótipo” ambiental (GIANOULIS et al., 2009).

Atualmente, as novas plataformas de sequenciamento apresentam a grande vantagem de permitir um sequenciamento altamente representativo de genomas e/ou transcriptomas em um único passo, o que é extremamente relevante em razão da grande redução de custo alcançado com essas metodologias (CARVALHO; SILVA, 2010). O presente estudo visa abordar a caracterização molecular microbiana, através do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, em rebanhos leiteiros saudáveis e com mastite subclínica a fim de estabelecer uma melhor compreensão da doença. Portanto, a utilização de metodologias independentes de cultivo, baseando as análises no DNA de tais microrganismos permite uma determinação mais abrangente da comunidade bacteriana. Dessa forma, dentre as contribuições científicas, destaca-se a descrição destas comunidades presentes em rebanhos leiteiros a partir de metodologias independentes de cultivo. Tais informações podem ser úteis podendo contribuir no planejamento de medidas terapêuticas e preventivas mais eficazes, resultando em redução de novos casos da infecção.

2 HIPÓTESES OU QUESTÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS

- 1) O sequenciamento de DNA permite uma determinação mais abrangente da comunidade microbiana presente no leite do que o cultivo microbiológico.
- 2) Animais com alta contagem de células somáticas apresentam uma população bacteriana diferente de animais com baixa contagem.

2.1 Objetivos

2.1.1 Objetivo geral

- Caracterizar e comparar a diversidade de bactérias presentes em amostras de leite de vacas saudáveis e com mastite subclínica em rebanhos leiteiros da raça Holandesa, por meio de análise parcial do gene 16S rRNA utilizando o sequenciamento de nova geração.

2.1.2 Objetivos específicos

- Determinar a abundância relativa e diversidade taxonômica das amostras de leite de vacas saudáveis e com mastite subclínica;
- Analisar e comparar os perfis taxonômicos, por meio de ferramentas de bioinformática, em amostras de leite de animais saudáveis (CCS < 200.000 cel./mL) e com alta contagem de células somáticas (CCS > 200.000 cel./mL) por sequenciamento de DNA e cultivo microbiológico.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Contagem de Células Somáticas

As células somáticas estão presentes naturalmente no leite e são caracterizadas como as células de defesa do organismo, que migram da corrente sanguínea com a finalidade de combater os agentes causadores de infecção da glândula mamária (PHILPOT; NICKERSON, 1991). As células somáticas são constituídas pelas células epiteliais dos alvéolos, correspondendo entre 2 a 20% do total e pelas células de defesa constituídas pelos leucócitos, principalmente neutrófilos, linfócitos e macrófagos correspondendo entre 80 a 98% do total. Em um animal sadio, o principal tipo celular encontrado são células epiteliais, representando em torno de 80% do total. No entanto, o aumento na contagem de células somáticas, acompanhado de alteração da proporção entre tipos celulares, é utilizado como indicador da ocorrência de mastite (GIGANTE; COSTA, 2008).

A contagem eletrônica de células somáticas se tornou o meio universal de monitoramento da mastite e tem sido utilizada em países desenvolvidos há mais de 25 anos. A contagem de células somáticas (CCS) pode ser feita em equipamentos automatizados, que possibilita o exame de grande número de amostras a um custo por amostra relativamente baixo. CCS é uma medida primária da inflamação da glândula mamária sendo utilizado como indicativo para medir a presença de mastite subclínica e indiretamente, a prevalência de infecção intramamária em rebanhos leiteiros (HARMON, 1994).

Atualmente, os programas de pagamento pela qualidade do leite são baseados em CCS. Essa forma de diagnóstico vem sendo realizada por Laboratórios da Rede Brasileira de Controle da Qualidade do Leite (RBQL) e apresenta como objetivo melhorar a qualidade do leite e monitorar a situação do rebanho leiteiro. A CCS vem sendo utilizada por diferentes países como indicador da qualidade higiênica do leite sendo utilizada como critério de qualidade onde atesta o estado sanitário das vacas em lactação (GIGANTE; COSTA, 2008).

Quartos mamários que estão livres da infecção quase sempre apresentam CCS menor de 100.000 células/mL e considera-se valores acima de 200.000 células/mL indicativo de um distúrbio inflamatório (HILLERTON, 1999) ou que o quarto mamário está se recuperando da infecção (ESSLEMONT;

KOSSAIBATI, 2002; SANTOS; FONSECA, 2007). De acordo com estudos realizados em vários países, a taxa de mastite dos rebanhos pode ser estimada com base na CCS e a interpretação dos resultados permite inferir o possível número de animais infectados e os prejuízos causados pela perda da produção (BRITO et al.; 1999).

A contagem de células somáticas do tanque de leite (CCST) é uma medida da prevalência de mastite em um rebanho leiteiro, sendo utilizado pelas agências reguladoras como um indicador de salubridade, segurança e adequação de leite cru para consumo humano (HARMON, 1994; SMITH; HOGAN, 2001). Quase todos os países desenvolvidos têm aprovado limites máximos regulamentados de CCS no leite destinado ao consumo humano. No Brasil o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), por intermédio do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) publicou a Instrução Normativa Nº 51/2002 no Diário Oficial da União. Esta instrução normatiza a produção, estabelecendo os critérios e parâmetros de identidade e qualidade do leite desde a ordenha, o resfriamento na propriedade e seu transporte a granel, incluindo requisitos físico-químicos e microbiológicos, contagem de células somáticas (CCS) e limites máximos de resíduos (LMR) de antimicrobianos.

Desta forma busca-se no médio e longo prazo a melhoria da qualidade de modo a obter um produto que venha a atender os padrões internacionais, ampliando e possibilitando as exportações no setor (BRASIL, 2002). Ficou estabelecido que em 2005, considerando um período de adaptação inicial de 3 anos, a CCS máxima permitida no leite cru refrigerado fosse de 1.000.000 céls./mL para as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. Tal padrão legal foi válido até 2010 para as regiões Norte e Nordeste, quando diminuem para 750.000 céls./mL. A partir de 2011, para todas as regiões, o padrão passaria a ser de 400.000 céls./mL (BRASIL, 2002). Entretanto, em resposta às dificuldades ocorridas para sua implantação, um novo texto foi publicado no Diário Oficial da União, na forma da Instrução Normativa Nº 62/2012. Ficou estabelecido que os produtores da região Sul, Sudeste e Centro-Oeste teriam novos limites para CCS onde a tolerância seria de 600.000 céls./mL a partir de janeiro de 2012, 500.000 céls./mL a partir de julho de 2014 e 400.000 céls./mL a partir de julho de 2016. Para as regiões Norte e Nordeste a mesma exigência valeria a partir de 2013, 2015 e 2017 respectivamente.

Apesar de várias mudanças na legislação ao longo desses anos, dados da Clínica do Leite (ESALQ/USP) que constitui um dos laboratórios integrante da RBQL, a contagem de células somáticas do leite de tanques analisado desde 1999 até 2008, apontam que não houve evolução na CCS no período. Não foi observado nenhum efeito sobre a qualidade do leite, apesar da publicação da IN-51 em 2002. As médias apresentadas de CCS ficaram por volta de 497.000 cél./mL e desvio padrão médio de 463.000 cél./mL. O que foi observado foi um aumento expressivo no número de análises realizadas, entre o primeiro ano da IN-51 (Jul/05 a Jun/06) e o último ano (Jul/07 a Jul/08). O aumento foi de 220% no número de amostras analisadas sendo que os resultados indicaram que 30 a 50% das vacas estavam infectadas e os produtores estavam perdendo cerca de 6% do leite (MACHADO, 2008).

Os países da União Européia, Nova Zelândia, Austrália, Suíça e Noruega estabeleceram um valor de 400.000 céls./mL como o limite superior, sendo que a União Européia já está discutindo uma redução do limite regulamentado de CCS para 300.000 ou 250.000 céls./mL (HILLERTON, 1999). Há uma tendência no mercado internacional de avaliar a segurança e a qualidade do fornecimento de leite baseado no limite máximo aceitável para contagem de células somáticas. Muitos países são capazes de determinar uma média nacional de CCS, com base em todos os produtores do país, e essas médias foram, em geral, diminuindo ao longo dos últimos 10 anos e indicam progressos consideráveis no controle da mastite subclínica e/ou aumento da capacidade de gerenciamento do sistema de produção (SMITH; HOGAN, 2001). Vale ressaltar que a obtenção da redução da CCS no Brasil, assim como em outros países, não será alcançada por intermédio da legislação e sim pelo interesse do produtor em melhorar a sanidade do rebanho e principalmente por uma demanda por leite de melhor qualidade via pagamento por qualidade e que resulte em aumento da lucratividade.

3.2 Agentes da Mastite

A mastite bovina pode resultar de um trauma ou injúria do úbere, irritação química ou a partir de uma infecção causada por diferentes microrganismos, principalmente as espécies bacterianas (WATTS, 1988). Os patógenos responsáveis pela mastite podem ser divididos em dois grupos baseados em sua origem e método

de transmissão: patógenos contagiosos e patógenos do meio ambiente (SANDHOLM et al., 1990). O primeiro é caracterizado por apresentar baixa incidência de casos clínicos e alta incidência de casos subclínicos, geralmente de longa duração, crônicos e de alta contagem de células somáticas (CCS). É transmitida principalmente durante o processo de ordenha, com os tetos sendo a principal fonte de infecção. O ambiente é a fonte de infecção para o segundo grupo, tais como esterco, urina, barro e camas orgânicas. Os patógenos ambientais normalmente descritos como invasores oportunistas, desencadeiam uma resposta imune no hospedeiro e são rapidamente eliminados (BRADLEY, 2002). Em ambos os grupos, a infecção da glândula mamária ocorre principalmente através do canal do teto (BRAMLEY; DODD, 1984).

O principal reservatório destes agentes é o ambiente da vaca leiteira, ao passo que o principal reservatório dos patógenos contagiosos é a glândula mamária infectada. Exposição de quartos mamários infectados com agentes patogênicos contagiosos se limita ao processo de ordenha. Entre os principais agentes contagiosos que levam ao aumento da CCS destaca-se *Staphylococcus coagulase negativa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Corynebacterium bovis*. Em contraste, exposição das glândulas infectadas com patógenos ambientais pode ocorrer em qualquer momento durante a fase de produção da vaca, incluindo o tempo de ordenha, entre as ordenhas, durante o período seco, e antes do primeiro parto em novilhas (COSTA et al, 1998).

De acordo com Smith e Hogan (1993), os patógenos primários ambientais são as bactérias Gram-negativas e espécies de estreptococos, exceto *Streptococcus agalactiae*. Entre estes, os mais frequentemente associados à mastite bovina são as bactérias coliformes (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* e *Enterobacter spp.*), *Streptococcus uberis* e *Pseudomonas aeruginosa*, que devido ao agente etiológico envolvido na infecção e às diferenças das respostas imunológicas podem ou não alterar os valores de CCS. Outros microrganismos também têm sido associados à mastite clínica ambiental, ocasionando em algumas vezes surtos de mastite no rebanho (WATTS, 1988).

O impacto econômico da mastite ambiental é principalmente uma consequência da natureza clínica da doença. O custo médio de um caso clínico de mastite ambiental foi estimado em 107 dólares por ocorrência (MILLER et al, 1993).

A maioria destes custos é devido à perda de produção de leite e descartes após a terapêutica. No entanto, o custo de alguns casos de mastite clínica por coliformes pode ser muito maior, devido à morte ou descarte da vaca. Além disso, casos clínicos de coliformes também podem ter impactos negativos sobre o desempenho reprodutivo do rebanho (CULLOR, 1990). O controle da mastite em rebanhos leiteiros geralmente envolve a implementação de práticas que reduzam a taxa de novas infecções. De acordo com Bramley (1990), a taxa de novas infecções ocasionadas por patógenos ambientais é influenciada por diversos fatores entre eles pode-se citar, fase de lactação, estação do ano, número de partos e gestação (COSTA et al., 1998).

Um importante conceito na compreensão da mastite é que esses patógenos comuns são agrupados em duas categorias: bactérias contagiosas e bactérias ambientais. Essa distinção é de importância prática, uma vez que medidas diferentes de controle são requeridas por grupos distintos de microrganismos. De acordo com Brito et al. (1998) o conhecimento do microrganismo envolvido permite avaliar corretamente o problema do rebanho onde a identificação dos agentes indica as áreas dentro do sistema de produção que requerem atenção imediata. Os resultados podem ser usados para a adoção de medidas específicas de controle, identificação de patógenos emergentes, segregação e descarte de animais com infecção crônica, avaliação da eficácia do tratamento e estabelecimento de padrões de susceptibilidade a antimicrobianos.

3.3 Método tradicional de identificação de bactérias em cultivo

O diagnóstico microbiológico da mastite tem como objetivo principal oferecer resultados rápidos e seguros para que se possa identificar problemas no rebanho e tomar decisões a respeito de casos individuais. Procedimentos padronizados foram publicados por *International Dairy Federation* (IDF, 1981) e *National Mastitis Council* (OLIVER et al. 2004; HOGAN et al., 2005) como requisitos fundamentais para que o resultado do exame microbiológico seja reproduzível e confiável. As padronizações detalham os procedimentos que devem ser seguidos, indicando, entre outros, volume de leite a ser inoculado para o isolamento, meio de cultivo a ser usado, tempo de incubação, temperatura e testes para identificação de patógenos.

No entanto, mesmo com procedimentos padronizados, amostras de leite de vacas com mastite muitas vezes não apresentam crescimento bacteriano na cultura convencional (HOGAN et al., 1999). A identificação precisa da bactéria causal é de extrema importância para o desenvolvimento de estratégias de controle da mastite em rebanhos leiteiros. A utilização do tratamento antimicrobiano das infecções animais contra o agente causal é geralmente recomendado (CONSTABLE et al., 2008) e as informações geradas são importantes para a determinação de estratégias de manejo e prevenção de novos casos. Nos casos de infecções severas, que não respondem à terapia, o exame de amostras de mastite clínica torna-se necessário para a decisão sobre o descarte de um determinado animal e para o monitoramento dos casos clínicos do rebanho. O ideal é examinar o leite dos quartos mamários com mastite clínica antes do início de qualquer tratamento (BRITO et al., 1998). Isso só é possível com a identificação exata das bactérias nas amostras de leite com mastite.

De acordo com estudos realizados em vários países, amostras de leite podem apresentar resultados negativos após cultivo microbiológico em pelo menos 20 a 30% das amostras de leite provenientes de quartos de glândulas mamárias com mastite clínica. Em um estudo realizado no Reino Unido, o valor foi de 26,5% (BRADLEY et al., 2002), em um estudo anterior realizado nos Estados Unidos, 27,2% (HOGAN et al., 1989), e em estudos realizados na Finlândia foi de 23,7% a 27,1% (KOIVULA et al. 2007). Olde Riekerink et al. (2008) com o objetivo de estudar a taxa de incidência de mastite clínica através da identificação do patógeno específico, analisaram 3.033 amostras de 106 propriedades em 10 províncias Canadenses. Destas amostras, 1.330 representando 43,9% não apresentaram crescimento bacteriano. Na mastite subclínica, amostras sem crescimento bacteriano são em geral mais comum, sendo que em vários estudos realizados, o percentual de amostras de cultura negativa variou de 28,7% (KOIVULA et al., 2007) para 38,6% (BRADLEY et al., 2002). Makovec e Ruegg (2003) relataram um valor de 49,7% sem qualquer diferenciação entre mastite subclínica e clínica.

Baixa viabilidade ou morte de bactérias na amostra devido a fatores antibacteriano do leite pode ser uma razão para o não crescimento. O leite contém muitas substâncias antibacterianas tais como lactoferrina, lisozima, lactoperoxidase, componentes do complemento e imunoglobulinas (RAINARD; RIOLLET, 2006). Suas concentrações permanecem a um nível baixo em quartos saudáveis, mas

substancialmente aumentam durante a mastite. Pode-se supor que essas substâncias, que funcionam em sinergia com os leucócitos do leite, poderiam contribuir para a morte de bactérias em leite mastítico. A presença de substâncias inibidoras externas no leite como tratamento com antibióticos das vacas antes da amostragem ou resíduos de desinfetantes utilizados na limpeza do teto também podem inibir o crescimento bacteriano (TAPONEN et al., 2009). Outra questão importante seria a baixa concentração de bactérias no leite estando abaixo dos limites de detecção o que também poderia contribuir para o não crescimento bacteriano em cultura (SEARS et al., 1993). Quando se empregam técnicas que procuram aumentar as chances de isolamento da bactéria, os resultados negativos são reduzidos, mas não eliminados.

Outra questão é o tempo de análise exigindo rotina completa de até 48 horas. Identificação de muitas espécies da cultura também requer experiência do operador, causando diferença na confiabilidade entre testes de diferentes laboratórios (KOSKINEN et al., 2009). Além disso, a metodologia tradicional de cultivo de bactérias apresenta outra limitação como dificuldades de processamento de grande número de amostras, principalmente quando se faz acompanhamento de rebanhos e se necessita avaliar amostras repetidas vezes.

3.4 Microbiologia molecular em estudos de diversidade bacteriana

O uso de ensaios baseados em DNA pode contornar alguns dos problemas associados aos procedimentos de cultivo microbiológico convencional. A grande vantagem caracteriza-se em focar a composição do ácido nucléico do genoma bacteriano ao invés da expressão fenotípica de produtos que os ácidos nucléicos codificam. Por isso, esse sistema de identificação está sujeito a menor variabilidade em comparação com os métodos de diagnóstico com base na caracterização fenotípica (GILLESPIE; OLIVER, 2005). O sistema de identificação específico via PCR, permite avaliação rápida de um grande número de patógenos ao mesmo tempo e fornece uma confirmação definitiva dos agentes patogênicos (YANG et al., 2001).

A análise da sequência do gene 16S RNA ribossomal tem sido amplamente utilizado para identificar espécies bacterianas e executar estudos taxonômicos (CHOI et al., 1996; CLARRIDGE, 2004; MUNSON et al., 2004; PETTI

et al., 2005; SCHMALENBERGER et al., 2001). A sequência 16S é composta por nove regiões hipervariáveis (VAN DE PEER et al., 1996) que são flanqueadas por regiões conservadas na maior parte das bactérias, permitindo a amplificação por PCR de sequências alvo utilizando iniciadores universais (BAKER et al., 2003) (Figura 1). O sequenciamento total ou parcial deste gene, além de permitir correlações entre o genótipo e o ambiente estudado, permite a identificação da comunidade microbiana no nível de gênero e possivelmente no nível de espécie (CHENEBY et al., 2000).

Figura 1 – Locais de regiões hipervariáveis do gene 16S rRNA definidas. Vales correspondem às regiões V1-V9, com barras na coloração vermelha no eixo X, enquanto picos refletem alta conservação. Adaptado de ASHELFORD et al., 2005

Análises de sequenciamento baseadas no gene 16S rRNA de várias fontes ambientais foi acessada, permitindo revelar a grande diversidade de microrganismos que deixariam de ser revelados se fossem aplicados somente métodos baseados de cultivo (PROSSER et al., 2007). Dentre os grandes projetos de sequenciamento, pode-se citar o realizado por Venter e colaboradores (2004), onde coletando amostras do mar de Sargaços em diferentes profundidades, verificaram que nas regiões mais profundas as bactérias expressavam genes diversos enquanto as bactérias presentes na superfície do mar expressavam mais genes relacionados à via da fotossíntese. Outro exemplo foi o realizado por Edwards e colaboradores (2006) que amostraram a diversidade microbiana em uma mina. Como resultado das comparações dos microrganismos e os subsistemas

identificados nas amostras analisadas, os autores verificaram diferenças importantes no potencial metabólico em cada ambiente. As bactérias estavam realizando bioquímica distinta sobre os substratos e os subsistemas separavam as duas comunidades através de diferenças na utilização de carbono, mecanismos de aquisição de ferro, assimilação de nitrogênio e vias respiratórias.

Análises de sequenciamento da microbiota de diversas fontes clínicas, incluindo as biópsias de pele visando caracterizar os microrganismos implicados na patogênese da psoríase (FÁHLEN et al. 2011), amostras de sangue contendo componentes bacterianos de pacientes diabéticos (AMAR et al., 2011) e análise de metagenômica em dentes lesionados com periodontite apical (SIQUEIRA et al. 2011) tem sido relatadas. Ainda dentro de análises de fontes clínicas, Hunt et al., (2011) analisaram e caracterizaram a comunidade microbiana em leite de mulheres lactantes. Os autores verificaram uma maior diversidade de bactérias em relação ao relatado anteriormente e levantaram a questão de qual o papel que esta comunidade desempenha na colonização do trato gastrointestinal de crianças lactentes e na manutenção da saúde mamária. Contudo, até o momento, poucos trabalhos examinaram amostras de leite com mastite subclínica com análise em profundidade das comunidades bacterianas com técnicas de sequenciamento de alto rendimento.

O avanço nas metodologias de análise destes tipos de dados é grande, podendo gerar alterações nas formas de análise, aprimorando as inferências ecológicas realizadas a partir dos dados obtidos por sequenciamento. Entretanto, vale ressaltar que os dados devem ser analisados com cautela, pois os resultados de uma análise do gene 16S rRNA podem ser influenciados por diversos fatores incluindo a região hipervariável escolhida, métodos de alinhamento, distância evolucionária e bancos de dados (SCHLORS, 2010; WHITE et al.; 2010). Apesar dos esforços dos pesquisadores para remover sequências de baixa qualidade a partir de dados da pesquisa, é provável que muitas dessas sequências de referência reflitam artefatos de sequenciamento ao invés da diversidade biológica real.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostragem

Foram coletadas amostras de leite cru de vacas individuais destinadas para confirmação da CCS, cultivo microbiológico e sequenciamento de DNA de nova geração. As amostras de leite são provenientes de rebanhos comerciais da raça Holandesa e que realizam monitoramento mensal de CCS individual de vacas leiteiras. Inicialmente o objeto de estudo foi a coleta de amostras provenientes de três fazendas localizadas na região de Piracicaba - SP, sendo cada fazenda contribuindo com 16 amostras com alta contagem de células somáticas (CCS > 200.000 cel./mL) e 16 amostras com baixa contagem (CCS < 200.000 cel./mL) perfazendo um total de 96 animais. No entanto, devido problemas relacionados ao protocolo de extração, reações de PCR e posteriormente filtragem nas análises de bioinformática o número de amostras foi reduzido para 57, sendo 31 amostras com baixa CCS e 26 amostras com alta CCS distribuídas entre três fazendas.

4.2 Coleta de amostras assépticas

As amostras foram coletadas em tubos esterilizados, de forma asséptica para minimizar o risco de contaminação. O teto foi limpo com água corrente e em seguida realizada a imersão do teto em solução desinfetante à base de cloro, iodo ou clorexidina. Após aguardar 30 segundos para a ação do desinfetante, foi realizada a secagem completa do teto com papel-toalha descartável. Foram desprezados 2-3 jatos de leite e em seguida foi feito a desinfecção da extremidade do teto com algodão embebido em álcool 70%. Estes procedimentos foram realizados antes da ordenha e alíquotas de aproximadamente 40 mL de amostra de leite composta dos quatro quartos foram colhidas. Em seguida as amostras foram identificadas e enviadas ao laboratório, resfriado em gelo, para exame em até 48 horas ou congelada a -20°C até a realização das análises.

4.3 Princípios analíticos

4.3.1 Contagem celular somática

Alíquotas das amostras de leite foram submetidas a contagem eletrônica de células somáticas utilizando o equipamento *Fossomatic 500 Basic*[®] (*Foss Electric A/S. Hillerod, Denmark*), no Laboratório da Clínica do Leite da ESALQ/USP. As amostras foram inicialmente aquecidas em banho-maria à temperatura de 40°C/15min. Após ser automaticamente pipetada para dentro do equipamento, uma alíquota da amostra foi misturada aos reagentes. As membranas das células somáticas se rompem, permitindo a coloração do DNA por brometo de etídio. O equipamento possui uma lâmpada halógena que emite raios de luz azul que, ao incidirem sobre o DNA corado, provocam a emissão de pulsos de luz vermelha. Esses pulsos são ampliados e contados por um foto-multiplicador, aplica-se um fator de correção e, então, o equipamento expressa o resultado em células/mL. Contagens < 200.000 cel./mL indicam vacas sadias e contagens > 200.000 cel./mL indicam vacas infectadas por mastite subclínica.

4.3.2 Cultivo microbiológico

A identificação das espécies de microrganismos foi realizada por meio de cultura microbiológica no Laboratório de Qualidade do Leite, da Faculdade de Zootecnia e Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP).

Cada amostra foi imediatamente acondicionada em caixa térmica sob temperatura de 5-7°C até laboratório de microbiologia onde foram armazenadas à -18°C para em um prazo não maior do que 20 dias serem analisadas. As amostras coletadas de forma asséptica de cada quarto mamário foram transportadas ao Laboratório de Qualidade do Leite para realização dos procedimentos de cultura microbiológica. Para o isolamento de agentes causadores de mastite foi utilizada a metodologia proposta pelo NMC - National Mastitis Council (2004). Foram inoculados 10 mL da amostra em ágar sangue enriquecido de 5% de sangue ovino desfibrinado (Becton Dickinson Co., Franklin Lakes, NJ). Em seguida, a placa foi incubada à 37°C, invertida. O padrão de crescimento bacteriano foi observado a cada 24 horas por 2 dias.

Para a identificação das espécies bacterianas, foram realizadas as seguintes provas bioquímicas: coloração de Gram (para diferenciar grupos de bactérias Gram-positivas das Gram-negativas), hidróxido de potássio (KOH) como teste confirmatório da coloração de Gram, prova da catalase com peróxido de hidrogênio a 3% (diferenciação de bactérias catalase positivas das catalase negativas), prova da coagulase com plasma de coelho estéril (diferenciação dos *Staphylococcus aureus* coagulase-positiva daqueles *Staphylococcus sp.* coagulase-negativa), teste de produção do fator CAMP e esculina (identificação e diferenciação do gênero *Streptococcus sp.*). Os testes aplicados para identificação de grupos Gram-negativos foram: fermentação da lactose, motilidade, indol, citrato, vermelho de metila (VM/VP). Amostras com crescimento de mais de dois tipos de patógenos foram consideradas contaminadas e excluídas da análise estatística.

4.3.3 Extração de DNA bacteriano

As amostras de leite foram processadas para a extração do DNA bacterial de acordo com orientações do fabricante utilizando-se o Kit comercial *NucleoSpin®Tissue* (Macharey-Nagel). Após homogeneizadas, foram transferidos 1000 µL da amostra para tubos *ependorfs*. Em seguida foi realizada a centrifugação por 3 minutos à 14.000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e as células peletizadas foram ressuspensas com um tampão de pré-lise contendo 20 mM de Tris/HCL, 2 mM de EDTA, 1% de Triton X-100, 0,2 mg/mL de lisostafina, acrescentado de 22 mg/mL de proteinase K. Posteriormente, as amostras foram incubadas em termobloco a 56 °C durante a noite ou por aproximadamente 16 horas. Na manhã seguinte, foram adicionados 200 µL de *buffer B3* (tampão de lise) homogeneizando por dez segundos em agitador orbital (vórtex) e incubado em termobloco a 70 °C durante 10 minutos.

Passados 10 minutos, foram adicionados 210 µL de etanol (96-100%) a cada amostra, seguindo-se a homogeneização. Em seguida, transferiu-se aproximadamente 750-800 µL das amostras para o microtubo com a coluna de sílica procedendo-se à centrifugação a 14.000rpm/3min, descartando-se o microtubo e mantendo-se a coluna de sílica em outro microtubo. Este passo consiste na ligação do DNA à membrana de sílica, sendo que a desnaturação das proteínas melhora a

ligação seletiva de ácidos nucleicos com carga negativa na membrana de sílica, enquanto a maioria das outras moléculas passa através da coluna.

Na sequência foram adicionados 500 µl de *buffer BW* (tampão de lavagem) em cada coluna, seguindo-se de centrifugação a 14.000rpm/3min. Após remoção e descarte da solução, foram adicionados 600µL de *buffer B5* (segundo tampão de lavagem) a cada tubo, seguindo-se novamente de centrifugação, remoção e descarte da solução. Posteriormente, os microtubos com a coluna de sílica foram transferidos a um tubo *ependorf* de 1,5mL previamente esterilizado e finalmente, foram adicionados 50 µl de *buffer BE* (tampão de eluição) pré-aquecido a 70 °C, seguindo-se de centrifugação a 14.000rpm/3min.

Em seguida, a concentração e o grau de pureza do DNA foi verificado utilizando-se o equipamento NanoDrop® e após a quantificação as amostras foram armazenadas à -20 °C, estando pronto para ser utilizado como *template* para as reações de PCR.

4.3.4 Amplificação da sequência do gene 16S ribossomal RNA (rRNA)

O DNA extraído das amostras foi amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores da região V3 e V4 do gene 16S ribossomal, de acordo com o protocolo da Illumina (Illumina Inc., San Diego, CA) e descritos por Klindworth et al., (2013). A construção do iniciador foi composto pelo pré-adaptador Illumina 5' e o iniciador direto: 5'- TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG CCTACGGGNGGCWGCAG-3'. Já o iniciador reverso foi composto pelo pré-adaptador Illumina 5' e o iniciador reverso: 5'- GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'. A região V3 e V4 de 57 amostras foram amplificadas utilizando adaptadores diferentes e combinados em uma única biblioteca para o sequenciamento. Cada amostra recebeu um par de adaptadores (*index*) diferentes que foram adicionados às terminações 5' e 3' de todas as moléculas para identificação da origem de cada uma das sequências.

A reação padrão de amplificação foi ajustada para um volume final de 25 µL contendo: 0,5 µL (10 µM) de iniciador direto, 0,5 µL (10 µM) de iniciador reverso, 12,5 µL do mix 2x *KAPA HiFi Hot Start Ready Mix* e 11,5 µL de DNA. As reações foram realizadas em termociclador e o programa básico de amplificação da

primeira PCR seguiu uma desnaturação inicial à 95°C por 3 minutos, seguido por 25 ciclos com desnaturação por 30 segundos à 95 °C. Para as condições de anelamento foram 55°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos e uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Após a primeira PCR, a especificidade dos produtos amplificados foi verificada em gel de agarose a 2%.

Posteriormente, os produtos da reação foram purificados com *AMPure XP Beads* (AGENCOURT®AMPure®XP) e quantificados utilizando-se o equipamento NanoDrop®. Para a ligação dos adaptadores (*index*) aos pré-adaptadores (segunda PCR) foi utilizado o Kit *Nextera XT Index* (Illumina Inc., San Diego, CA) e as condições de amplificação foram: 95°C por 3 minutos para desnaturação do DNA no primeiro ciclo da PCR, 12 ciclos à 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos e uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Os reagentes da segunda PCR foram similares aos da reação anterior com exceção da adição dos iniciadores em que foi modificado pela adição de 5 µL de cada adaptador (dois adaptadores para cada amostra), além da inclusão de 10 µL do produto da primeira PCR, completando um volume final de 50 µL. Após a segunda PCR, novamente a especificidade dos produtos amplificados foi verificada em gel de agarose a 2%, procedendo-se a purificação com *AMPure XP beads* e quantificação em equipamento NanoDrop®.

4.3.5 Sequenciamento dos amplicons

Os produtos de amplificação foram normalizados para uma mesma concentração, seguido do agrupamento de todas as amostras. Este agrupamento de amostras foi quantificado via PCR em Tempo Real (qPCR), com o uso do Kit *KAPA Library Quantification* (KAPA Biosystems) por meio de uma regressão linear determinada pelas 6 amostras padrões de concentrações conhecidas presentes no kit. Uma vez que as concentrações das amostras foram calculadas, elas foram diluídas para uma concentração de 2 nM, agrupadas para desnaturação com NaOH, diluídas em tampão de hibridização, sofreram desnaturação térmica e então foram inseridas na lâmina de sequenciamento para clusterização e sequenciamento com o uso do Kit *MiSeq Reagent Kit v2* (2x250 ciclos) (Illumina – San Diego, EUA). O sequenciamento foi realizado com tecnologia de sequenciamento de nova geração através do equipamento *MiSeq* (Illumina Inc., San Diego, CA).

4.3.6 Procedimentos de bioinformática para análises das sequências 16S rRNA

Os fragmentos *amplicons* de todas as amostras foram submetidos a uma série de análises computacionais utilizando o programa *Quantitative Insights Into Microbial Ecology – QIIME*. Este pipeline consiste em um pacote para análise comparativa de comunidades microbianas. Entre suas funções, destaca-se a classificação das sequências dentro de unidades taxonômicas (por vezes até o nível de espécies), análise filogenética, análise de biodiversidade e estatística (CAPORASO et al., 2010). Os parâmetros utilizados e as análises realizadas estão de acordo com os protocolos estabelecidos pelo *Brazilian Microbiome Project* (BMP) (PYLRO et al., 2014).

Primeiramente, foi realizada a montagem das sequências com base em um consenso de similaridade (*contig*) utilizando o comando *join_paired_ends.py*. Este comando permite que as leituras *forward* e *reverse* geradas pelo sequenciamento *paired-end* sejam alinhadas e unidas formando uma leitura única. Em seguida foi realizada a seleção dos dados com base no valor de qualidade (*quality value*), no qual foi adotado como qualidade média o valor de Q20. Cada base pertencente às sequências FASTA possui um valor de qualidade e as bases não-identificadas (NS) ou sequências com valores inferiores a 20 foram descartadas das análises. Sequências que não apresentaram um alinhamento mínimo foram descartadas. Por intermédio do comando *split_libraries.py* as sequências aprovadas foram separadas de acordo com os seus indexes (barcodes), gerando informações do número de sequências oriundas de cada uma das amostras iniciais.

Posteriormente, as sequências foram alocadas em uma matriz de UTOs (Unidade Taxonômica Operacional), construídas com um nível de similaridade de 97% com o algoritmo *uclust* empregando-se o comando *pick_otus.py*. A classificação taxonômica foi realizada com base no comando *assing_taxonomy.py* pelo RDP *classifier* (COLE et al., 2007) utilizando como comparativo o banco de dados do *Greengenes* chamado *Caporoso Reference OTUs* (GREENGENE, 2012). A árvore filogenética foi construída utilizando o algoritmo *FastTree*. O número de sequências foi padronizado a partir da tabela de UTOs sendo consideradas 10.000 sequências por amostra para as análises posteriores. Essa padronização tem a finalidade de minimizar os efeitos *bias* de amostragem na análise.

Subsequentemente, um gráfico de abundância taxonômica foi construído e a alfa diversidade foi calculada utilizando o algoritmo *Phylogenetic Distance* (PD). O índice de Chao1 foi calculado com a finalidade de estimar a riqueza das amostras. Estes índices foram calculados utilizando o comando *alpha_diversity.py*, que também gerou os dados de rarefação considerando um nível de similaridade de 97% entre as sequências.

Com a finalidade de demonstrar a similaridade ou distância relativa entre grupos de amostras, com base na heterogeneidade na composição das comunidades (beta diversidade), procedeu-se a utilização da Análise de Coordenadas Principais (*Principal Coordinates Analysis – PCoA*) (LEGENDRE; LEGENDRE, 2012). Esta análise permite visualizar as variações na estrutura da comunidade bacteriana, permitindo uma visão mais robusta da distribuição das amostras, por meio do software QIIME a partir da matriz de UTOs.

Para uma análise mais aprofundada e somente para alguns gêneros de interesse, a afiliação taxonômica em nível de espécie foi realizada. Inicialmente foi feito a separação das sequências das OTUs afiliadas aos gêneros que apresentaram abundância maior que 1%, e estas foram locadas em árvores filogenéticas. Para tanto, as sequências com maior similaridade foram recuperadas do banco de dados do *Ribossomal Database Project* (RDP), e estas foram alinhadas no programa Mega 5.0. O alinhamento deu então origem a uma matriz de similaridade entre as sequências, que foi usada como arquivo de entrada para a obtenção das árvores filogenéticas, obtidas pela metodologia de *Neighbor-joining* e agrupamento por UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*). A consistência dos agrupamentos obtidos foi avaliada pela metodologia de *Bootstrap*, realizado com 1.000 sub-amostragens em cada um dos alinhamentos avaliados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Contagem de Células Somáticas

A escolha das amostras foi baseada na análise de CCS do mês anterior e no momento da coleta, alíquotas foram destinadas para confirmação da CCS. Nas tabelas 1 e 2 encontram-se as médias de CCS das fazendas e as médias de alta e baixa CCS separadas por fazenda com os seus respectivos desvios padrões. A existência de um menor número de amostras com alta CCS e um maior número de amostras com baixa CCS faz com que o desvio padrão seja maior que a média, indicando a existência de grandes variações entre as três fazendas estudadas.

Tabela 1 – Informações gerais dos dados de CCS das amostras de leite e seus respectivos valores de média e desvio padrão

	Nº animais	Média CCS (x1000)	Desvio Padrão das CCS (x1000)
Fazenda 1	25	642	893
Fazenda 2	27	640	1.307
Fazenda 3	5	309	349

Tabela 2 – Informações gerais dos dados de CCS separadas por baixa e alta CCS e seus respectivos valores de média e desvio padrão

CCS abaixo de 200.000 cél/mL				CCS acima de 200.000 cél/mL		
	Nº animais	Média CCS (x1000)	DP* (x1000)		Média CCS (x1000)	DP* (x1000)
Fazenda 1	14	92	36	11	1.341	977
Fazenda 2	14	98	49	13	1.141	1.688
Fazenda 3	3	101	44	2	621	400

Nota: *Desvio Padrão

5.2 Cultura microbiológica

Alíquotas de leite das 57 amostras foram destinadas para cultura microbiológica. Com base na cultura de bactérias de 26 amostras com mastite subclínica (CCS > 200.000 células/mL) oriundas de 3 fazendas distintas, 13 casos

foram diagnosticados como infectados com *Staphylococcus* coagulase negativa, 1 como *Staphylococcus* coagulase negativa/*Streptococcus uberis*, 2 como *Streptococcus bovis*, 1 como *Streptococcus uberis*, 1 como *Corynebacterium spp.*, 1 como *Levedura spp.* e 7 amostras foram caracterizadas como cultura negativa. Das 7 amostras negativas, 5 estavam com CCS entre 1.127.000 a 2.745.000 células por mL. Das 31 amostras de leite oriundas de vacas saudáveis (CCS < 200.000 células/mL), 21 amostras foram caracterizadas como cultura negativa, 5 como *Staphylococcus* coagulase negativa, 1 como *Staphylococcus* coagulase negativa/*Corynebacterium spp.*, 1 como *Bacillus spp./ Arcanobacterium spp.*, 2 como *Corynebacterium spp.* e *Staphylococcus aureus* foi recuperado como principal agente patogênico contagioso presente em apenas uma amostra, na qual apresentou CCS de 177.000 células somáticas por mL (Tabela 3). Trabalhos realizados por outros pesquisadores relataram o agente *Staphylococcus* coagulase negativa como o mais frequentemente isolado. Sargeant et al. (2001) isolou *Staphylococcus* coagulase negativa em 49,7% das amostras e Pierpers et al. (2007) também relataram o agente *Staphylococcus* coagulase negativa como mais frequente em 57,2% das amostras, seguido de 18,4% de *Staphylococcus aureus*, 15,9% de *Streptococcus uberis* e 0,8% de *Corynebacterium spp.*

Tabela 3 – Identificação das amostras e seus respectivos valores de Cultura Microbiológica

(continua)

Número	CCS (x1000)	Identificação	Cultura Microbiológica
1	77	1 (77_F1)	Negativo
2	105	2 (105_F1)	Negativo
3	93	3 (93_F1)	Negativo
4	78	4 (78_F1)	Negativo
5	115	5 (115_F1)	Negativo
6	35	6 (35_F1)	Negativo
7	121	7 (121_F1)	Negativo
8	88	8 (88_F1)	<i>Bacillus spp./Arcanobacterium spp.</i>
9	115	9 (115_F1)	Negativo
10	67	10 (67_F1)	Negativo
11	30	11 (30_F1)	Negativo
12	85	12 (85_F1)	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa
13	123	13 (123_F1)	Negativo
14	169	14 (169_F1)	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa
15	819	15 (819_F1)	<i>Streptococcus uberis</i>

Tabela 3 – Identificação das amostras e seus respectivos valores de Cultura Microbiológica

(continuação)			
Número	CCS (x1000)	Identificação	Cultura Microbiológica
16	456	16 (456_F1)	<i>Streptococcus bovis</i>
17	443	17 (443_F1)	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa
18	447	18 (447_F1)	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa
19	883	19 (883_F1)	<i>Streptococcus bovis</i>
20	1.711	20 (1.711_F1)	Negativo
21	3.276	21 (3.276_F1)	<i>Corynebacterium spp.</i>
22	1.265	22 (1.265_F1)	Negativo
23	2.745	23 (2.745_F1)	Negativo
24	2.000	24 (2.000_F1)	Negativo
25	714	25 (714_F1)	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa
26	60	26 (60_F2)	Negativo
27	18	27 (18_F2)	Negativo
28	110	28 (110_F2)	Negativo
29	84	29 (84_F2)	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa
30	63	30 (63_F2)	Negativo
31	80	31 (80_F2)	Negativo
32	88	32 (88_F2)	Negativo
33	136	33 (136_F2)	Negativo
34	22	34 (22_F2)	Negativo
35	152	35 (152_F2)	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa
36	177	36 (177_F2)	<i>Staphylococcus aureus</i>
37	29	37 (29_F2)	<i>Corynebacterium spp.</i>
38	140	38 (140_F2)	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa/ <i>Corynebacterium spp.</i>
39	97	39 (97_F2)	Negativo
40	488	40 (488_F2)	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa/ <i>S. uberis</i>
41	438	41 (438_F2)	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa
42	442	42 (442_F2)	Negativo
43	6.456	43 (6.456_F2)	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa
44	1.127	44 (1.127_F2)	Negativo
45	208	45 (208_F2)	Negativo
46	409	46 (409_F2)	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa
47	418	47 (418_F2)	<i>Levedura spp.</i>
48	445	48 (445_F2)	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa
49	206	49 (206_F2)	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa
50	1.278	50 (1.278_F2)	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa
51	2.176	51 (2.176_F2)	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa

Tabela 3 – Identificação das amostras e seus respectivos valores de Cultura Microbiológica

Número	CCS (x1000)	Identificação	(conclusão)
			Cultura Microbiológica
52	742	52 (742_F2)	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa
53	149	53 (149_F3)	Negativo
54	62	54 (62_F3)	<i>Corynebacterium</i> spp.
55	92	55 (92_F3)	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa
56	338	56 (338_F3)	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa
57	905	57 (905_F3)	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa

Nota: Identificação das amostras (os números entre parênteses correspondem aos valores de CCS x 1000 de cada amostra; F1 corresponde a Fazenda 1; F2 = Fazenda 2; F3 = Fazenda 3).

Com base no diagnóstico da cultura microbiológica, a Figura 2 mostra o percentual dos microrganismos isolados por fazenda.

Figura 2 – Porcentagem de microrganismos diagnosticados em cultura microbiológica por fazendas. A=Fazenda 1 (n=25), B=Fazenda 2 (n=27) e C=Fazenda 3 (n=5)

5.3 Estrutura e composição da comunidade bacteriana com base na sequência da região V3 e V4 do gene 16S rRNA

A afiliação taxonômica das sequências 16S rRNA de bactérias foi realizada por sequenciamento de nova geração, utilizando a plataforma Illumina através do equipamento *MiSeq* (Illumina Inc., San Diego, CA). Essa análise foi baseada em 10.000 sequências por amostra, após o processo de rarificação. Este processo é de extrema importância para comparar os grupos de bactérias encontrados em cada uma das amostras utilizando um mesmo universo amostral. Após o alinhamento das sequências foram geradas 4.802.567 sequências consenso (contigs) das quais 570.000 sequências passaram pelo método de filtragem e rarificação. Uma vez que as sequências *forward* e *reverse* são unidas em apenas um contig é naturalmente esperado que haja uma redução no número de *reads* no processo de geração dos contigs. A taxa de erro do sequenciamento aliada à existência de bases com qualidade inferior, principalmente nas extremidades, reduz a taxa de acerto no sequenciamento entre as sequências *forward* e *reverse* e consequentemente a formação de contigs.

Utilizando o software *QIIME*, foi possível realizar o agrupamento de sequências selecionadas em 67.420 UTOs (determinadas a um nível de 97% de similaridade) e cada uma destas UTOs, encontradas em diferentes quantidades em cada uma das amostras (Tabela 4).

Tabela 4 – Número de sequências e de unidades taxonômicas operacionais provenientes de amostras de leite com mastite subclínica e amostras de leite de vacas saudáveis

(continua)				
Número	Amostra	Identificação	Nº sequências	Nº UTOs
1	9110	1 (77_F1)	38.891	856
2	1721	2 (105_F1)	77.590	780
3	9109	3 (93_F1)	149.083	526
4	9111	4 (78_F1)	118.408	532
5	2012	5 (115_F1)	39.962	1.224
6	1901	6 (35_F1)	252.092	1.016
7	1879	7 (121_F1)	82.873	671
8	1783	8 (88_F1)	78.327	677
9	4358	9 (115_F1)	127.843	951
10	1679	10 (67_F1)	96.897	923

Tabela 4 – Número de sequências e de unidades taxonômicas operacionais provenientes de amostras de leite com mastite subclínica e amostras de leite de vacas saudáveis

Número	Amostra	Identificação	Nº sequências	(continuação)
				Nº UTOs
11	2111	11 (30_F1)	12.646	755
12	2021	12 (85_F1)	58.829	974
13	9106	13 (123_F1)	89.773	773
14	1949	14 (169_F1)	52.207	256
15	2011	15 (819_F1)	456.352	551
16	1410	16 (456_F1)	125.255	1.018
17	1895	17 (443_F1)	121.435	1.018
18	1490	18 (447_F1)	143.893	992
19	4330	19 (883_F1)	166.963	1.125
20	9121	20 (1.711_F1)	58.829	881
21	1889	21 (3.276_F1)	111.805	363
22	1961	22 (1.265_F1)	270.025	385
23	1654	23 (2.745_F1)	166.544	512
24	1987	24 (2.000_F1)	13.793	940
25	1708	25 (714_F1)	47.054	321
26	3740	26 (60_F2)	15.857	1.484
27	2034	27 (18_F2)	24.938	2.048
28	1843	28 (110_F2)	312.752	1.776
29	1977	29 (84_F2)	11.685	1.033
30	1820	30 (63_F2)	28.341	2.294
31	1762	31 (80_F2)	42.052	1.449
32	1802	32 (88_F2)	47.390	1.061
33	1801	33 (136_F2)	61.841	3.082
34	1461	34 (22_F2)	33.413	1.002
35	1792	35 (152_F2)	62.759	3.086
36	2078	36 (177_F2)	39.946	1.098
37	1936	37 (29_F2)	80.222	845
38	2136	38 (140_F2)	22.505	68
39	2043	39 (97_F2)	188.694	88
40	2052	40 (488_F2)	71.604	1315
41	1942	41 (438_F2)	15.972	1.279
42	2065	42 (442_F2)	37.075	1.797
43	1677	43 (6.456_F2)	68.405	1.399
44	1894	44 (1.127_F2)	78.717	2.474
45	1631	45 (208_F2)	12.890	1.514
46	1724	46 (409_F2)	13.793	2.273

Tabela 4 – Número de sequências e de unidades taxonômicas operacionais provenientes de amostras de leite com mastite subclínica e amostras de leite de vacas saudáveis

Número	Amostra	Identificação	Nº sequências	(conclusão) Nº UTOs
47	3440	47 (418_F2)	31.075	2.366
48	1815	48 (445_F2)	48.988	2.635
49	1848	49 (206_F2)	39.118	2.208
50	1969	50 (1.278_F2)	66.699	1.863
51	1784	51 (2.176_F2)	72.175	1.004
52	4912	52 (742_F2)	90.808	1.239
53	6	53 (149_F3)	35.083	1.023
54	7	54 (62_F3)	109.408	1.051
55	14	55 (92_F3)	68.057	989
56	21	56 (338_F3)	34.967	1.094
57	37	57 (905_F3)	20.620	463
Total	-	-	4.802.567	67.420

Nota: Identificação das amostras (os números entre parênteses correspondem aos valores de CCS x 1000 de cada amostra; F1 corresponde a Fazenda 1; F2 = Fazenda 2; F3 = Fazenda 3).

As curvas de rarefação foram calculadas para cada grupo de amostras baseadas em diagnóstico de cultura (Figura 3). A partir das curvas de rarefação foi possível determinar o valor máximo de UTOs observadas em cada amostra. Este atua por intermédio de métodos estatísticos capazes de extrapolar a relação de UTOs, em função do número de sequências. Essas curvas têm a finalidade de verificar a riqueza dos filotipos e o esforço amostral. Para minimizar o efeito do esforço da amostragem na análise, foi adotado como padrão de corte 10.000 sequências por amostra. Desse modo, verifica-se que as curvas foram ascendentes e muito próximas para a maioria das amostras, atingindo o ponto de saturação (platô) na grande maioria delas. A comunidade cuja curva está acima é considerada mais abundante em grupos taxonômicos (YOUSSEF; ELSHAHED 2009). Assim, observa-se que tais curvas apresentam diferenças de riqueza de filotipos entre os diferentes grupos de amostras, de modo que a curva representada por *Levedura spp.* revelou maior riqueza de UTOs quando comparada com as outras curvas. A curva representada por *Staphylococcus coagulase negativa/Corynebacterium spp.* apresentou a menor riqueza observada e foi a única curva que não se mostrou ascendente. Isto pode ser explicado por que esta amostra contém somente 68 UTOs (Tabela 4), então a mediada que há um aumento de sequências analisadas nesta

amostra, não se observa grande aumento de UTOs como observado nas outras curvas. Essas duas curvas são representadas, cada uma somente por uma amostra. Os grupos de amostras caracterizados como *Staphylococcus* coagulase negativa, *Staphylococcus* coagulase negativa/*Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus bovis* e cultura negativa apresentaram riquezas distintas. Já os grupos de amostras caracterizados como *Bacillus spp*/*Arcanobacterium spp.*, *Streptococcus uberis* e *Corynebacterium spp.* apresentaram curvas de desenhos bastante semelhantes e praticamente paralelas com pouca diferença entre suas riquezas.

Portanto, estes resultados indicam que o efeito do esforço amostral foi suficiente e a representação geral da diversidade das amostras pôde ser inteiramente descrita. Estes resultados são contrários aos encontrados em trabalho anterior, que ao analisar as curvas de rarefação de amostras de leite agrupadas com base no diagnóstico de cultura, verificaram que algumas curvas não atingiram o ponto de saturação, indicando que o efeito do esforço amostral não foi satisfatório e que não conseguiram revelar a presença total das comunidades bacterianas (OIKONOMOU et al., 2012). Por isso a importância do processo de rarificação para estabelecer o padrão de corte em número de sequências por amostra, evitando dessa forma introdução de viés nas análises subsequentes de alfa e beta diversidade. Vale ressaltar, que os componentes riqueza e equabilidade das curvas de rarefação, considerados em uma mesma análise, podem ser usadas para comparar as comunidades com quantidades diferentes de organismos amostrados (HUGHES et al.; 2001; OLSZEWSKI, 2004).

Figura 3 – Curvas de rarefação para diferentes grupos de amostras baseado no diagnóstico de cultura, indicando o efeito do esforço amostral no sequenciamento, construídas com o auxílio do programa QIIME

Além das curvas de rarefação, os dados de sequenciamento permitiram avaliar a alfa diversidade, através dos índices PD (*Phylogenetic diversity*) e Chao-1. O índice PD (*Phylogenetic diversity*) é um índice de diversidade obtido pela somatória do comprimento total dos ramos da estrutura filogenética que acomoda os componentes de uma comunidade, incluindo a distância evolutiva das espécies na comparação (FAITH, 1992). Chao1 é um estimador não paramétrico de riqueza (número de UTOs) e baseia-se no número de UTOs raras (UTOs únicos e duplicados) dentro de uma amostra. De maneira geral, as amostras agrupadas com base no diagnóstico de cultura, apresentaram grandes variações de riqueza e diversidade entre os grupos de amostras. Os grupos que apresentaram maior riqueza foram das amostras caracterizadas como *Levedura spp.* (47 (418_F2), grupo de amostras caracterizadas como *Staphylococcus coagulase negativa* (12 (85_F1), 14 (169_F1), 17 (443_F1), 18 (447_F1), 25 (714_F1), 29 (84_F2), 35 (152_F2), 41 (438_F2), 43 (6.456_F2), 46 (409_F2), 48 (445_F2), 49 (206_F2), 50 (1.278_F2), 51 (2.176_F2), 52 (742_F2), 55 (92_F3), 56 (338_F3) e 57 (905_F3)), amostra caracterizada como *Staphylococcus coagulase negativa/Streptococcus uberis* (40

(488_F2)), seguido do conjunto de amostras com alta CCS que foram negativas na cultura (20 (1.711_F1), 22 (1.265_F1), 23 (2.745_F1), 24 (2.000_F1), 42 (442_F2), 44 (1.127_F2), 45 (208_F2)) (Tabela 5). Não necessariamente essas amostras apresentaram os maiores valores para diversidade. Embora alguns trabalhos tenham encontrado correlação entre essas variáveis (CARVALHO et al., 2010, REZENDE; DINIZ-FILHO, 2012), os dados aqui apresentados indicam que os maiores valores de PD não estão necessariamente associados com os maiores valores de riqueza. Isto indica que comunidades muito ricas podem na realidade apresentar agrupamento filogenético (grande quantidade de linhagens próximas), ou seja, menor diversidade filogenética.

A menor riqueza e diversidade filogenética foram observadas na amostra caracterizada como *Staphylococcus* coagulase negativa/*Corynebacterium* spp. (38 (140_F2)) e esses valores foram corroborados com o desenho da curva de rarefação (Figura 3). Este fato pode ser explicado porque, além desta amostra ser composta por somente 68 UTOs (espécies observadas), uma única UTO representou aproximadamente 70% das sequências, indicando que existe uma espécie dominante contribuindo para uma menor diversidade observada. Esta amostra apresenta valor de riqueza próximo à amostra caracterizada como *Bacillus* spp/*Arcanobacterium* spp. (8 (88_F1)) que por sua vez apresentou índice de diversidade oito vezes maior (Tabela 5). Os maiores índices de diversidade foram observados no grupo de amostras caracterizadas como *Streptococcus bovis* (16(456_F1) e 19(883_F1)), *Staphylococcus* coagulase negativa/*Streptococcus uberis* (40 (488_F2)) e *Staphylococcus aureus* (36 (177_F2), com valores de índices de 50.6, 46.9 e 44.6 respectivamente.

Tabela 5 – Índices de riqueza e diversidade de grupos de amostras baseados no diagnóstico de cultura, obtidos a partir de análise de sequências parciais do gene 16S rRNA

Grupos de amostras baseados no diagnóstico de cultura	Número de amostras/sequências analisadas	Índice de riqueza (Chao 1)	Índice de diversidade (Distância Filogenética)
<i>Bacillus spp./Arcanobacterium spp.</i>	1/10.000	798,01	32,5
<i>Corynebacterium spp.</i>	3/30.000	908,05	38,9
<i>Levedura spp.</i>	1/10.000	3703,51	36,7
*Cultura Negativa	7/700.000	1719,70	35,9
<i>Staphylococcus aureus</i>	1/10.000	1459,59	44,6
<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>	18/180.000	2026,75	32,4
<i>Staphylococcus coagulase negativa/Corynebacterium spp.</i>	1/10.000	638,85	3,8
<i>Staphylococcus coagulase negativa/Streptococcus uberis</i>	1/10.000	1803,14	46,9
<i>Streptococcus bovis</i>	2/20.000	1560,81	50,6
<i>Streptococcus uberis</i>	1/10.000	967,58	32,6
**Amostras de leite normal	21/210.000	1599,84	36,9

*Grupo de amostras oriundas de vacas com mastite subclínica (CCS > 200.000 cél./mL) que apresentaram resultado negativo na cultura microbiológica.

**Grupo de amostras oriundas de vacas saudáveis (CCS < 200.000 cél./mL) que apresentaram resultado negativo na cultura microbiológica.

Além dos índices Chao-1 e PD dos grupos de bactérias agrupadas com base no diagnóstico de cultura, os mesmos índices foram calculados e agrupados por fazenda e contagem de células somáticas. Para o estimador Chao-1 verifica-se maior riqueza observada na fazenda 2, enquanto que a fazenda 3, apesar de ser composta por somente cinco amostras (três amostras com baixa CCS e duas amostras com alta), apresentou maior riqueza comparada à fazenda 1. Porém, as fazendas 1 e 3 apresentaram relativamente pouca diferença entre suas riquezas com formato da curva bastante similares (Figura 4A). O estimador Chao-1 para amostras com contagem de células somáticas mostrou maior riqueza nas amostras com alta CCS (Figura 4B). Por outro lado, o índice PD mostrou maior diversidade no conjunto de amostras com baixa CCS (Figura 5B). Portanto, estes resultados revelam que as amostras com alta CCS apresentam maior riqueza e menor diversidade microbiana, ao passo que as amostras provenientes de animais saudáveis apresentam menor riqueza e maior diversidade microbiana.

Figura 4 – Estimativas de riqueza agrupadas por fazendas (A) e por alta e baixa CCS (B), construídas com o auxílio do programa QIIME. O eixo X descreve o número de sequências analisadas por amostra. O eixo Y descreve os valores do índice de Chao-1 em média para cada grupo de amostras e o desvio padrão respectivo

Figura 5 – Índices PD (*Phylogenetic diversity*) agrupados por fazendas (A) e alta e baixa CCS (B), construídas com o auxílio do programa QIIME. O eixo X descreve o número de sequências analisadas por amostra. O eixo Y descreve os valores do índice PD em média para cada grupo de amostras e o desvio padrão respectivo

Com base na heterogeneidade entre as amostras estudadas e buscando avaliar diferenças na composição das comunidades bacterianas (beta diversidade) das amostras de leite separadas por fazendas ou por alta e baixa CCS, procedeu-se a utilização da Análise de Coordenadas Principais (PCoA). A análise revelou uma ampla variação da estrutura da comunidade, sendo que somente

algumas amostras tenderam a se agrupar, enquanto que as demais apresentaram ampla variabilidade, estando dispersas ao longo do gráfico. Isso pôde ser observado tanto para o parâmetro *weighted* que leva em consideração a abundância relativa de cada grupo de sequências (Figura 6A e 6C), quanto para o parâmetro *unweighted* que leva em consideração apenas presença-ausência de diferentes UTOs nas amostras (Figura 6B e 6D). Embora fosse esperado que animais pertencentes à mesma fazenda fossem mais susceptíveis de serem infectados com a mesma composição de microrganismos, visto que infecções ocasionadas principalmente por bactérias contagiosas podem se espalhar entre animais, equipamentos de ordenha, mãos do ordenhador e utensílios (FOX; GAY, 1993), este fato não foi observado. Oikonomou et al. (2012) utilizando a metodologia de análise discriminante (SUN et al., 2012), relataram que a microbiota de amostras derivadas de vacas saudáveis foi claramente diferente de amostras derivadas de vacas com mastite. Logo, os resultados aqui apresentados não indicaram agrupamento filogenético das comunidades e demonstram que a composição bacteriana entre as amostras é bem distinta e, portanto, pode-se sugerir que estas diferenças entre os estudos podem ser atribuídas à variação genética individual que pode resultar em diferenças na susceptibilidade para diferentes microrganismos.

Figura 6 – Análise de coordenadas principais (PCoA) de comunidades bacterianas por CCS (A e B) e fazendas (C e D), mostrando a similaridade entre as amostras. Em A e B a contagem de células somáticas está representada pela cor dos *plots*, em que vermelho= alta CCS e azul= baixa CCS. Em C e D as fazendas estão representadas pela cor dos *plots*, em que vermelho= fazenda 1; azul= fazenda 2 e verde= fazenda 3

Além desse tipo de enfoque, foi possível realizar a análise de sequências por meio de afiliação taxonômica. De acordo com a matriz de UTOs formada pelo software QIIME e analisando conjuntamente todas as amostras, foi observado um valor médio de 39,4% de sequências não classificadas em filos (bactérias não classificadas). Dentre as sequências classificadas, os filos mais abundantes encontrados foram: *Firmicutes* (23,2%), *Actinobacteria* (13,1%), *Proteobacteria* (12,8%), *Bacteroidetes* (4,1%), *Chloroflexi* (1,5%) e *Fusobacteria* (1,2%), além de outros 11 filos representando um total de 4,5%. (Figura 7). O percentual de 0,2% do total de sequências obtidas foi afiliado ao domínio *Archaea*. A predominância do filo mais abundante variou em algumas amostras, embora os grupos dominantes sejam os mesmos em todas as amostras. *Firmicutes* foi o filo mais abundante na maioria das amostras oriundas de vacas saudáveis (contagem

de células somáticas abaixo de 200.000 cel./mL), das 31 amostras com baixa CCS, 24 apresentaram este filo como o mais abundante. Porém, em alguns casos este filo foi sobreposto por *Actinobacteria* ou *Proteobacteria*, principalmente nas amostras com alta contagem de células somáticas (Tabela 6). A afiliação das sequências a nível taxonômico de classe, em uma análise mais detalhada, revelou como mais abundantes as classes *Bacilli* (12,2%) e *Clostridia* (10,7%) para o filo *Firmicutes*; *Actinobacteria* (10,1%), *Acidimicrobiia* (1,5%) e *Rubrobacteria* (1,2%) para o filo *Actinobacteria*; e *Alphaproteobacteria* (5,3%), *Gammaproteobacteria* (4,9%) e *Betaproteobacteria* (2%) para o filo *Proteobacteria*.

Estes resultados estão de acordo com estudo anterior feito em amostras de leite. Por exemplo, Bhatt et al. (2012) revelaram que *Proteobacteria* e *Firmicutes* foram os principais filos encontrados no leite amostrado, a partir de três raças leiteiras bovinas. O maior e mais diversificado grupo entre os procariontes é representado pelo filo *Proteobacteria*, que desempenha grande importância biológica e inclui uma ampla variedade de patógenos (MADIGAN; MARTINKO 2005). Bactérias afiliadas ao filo *Proteobacteria* são Gram-negativas e são considerados como patógenos ambientais causadores da mastite (HOGAN et al., 1999), enquanto *Firmicutes* gram-positivas são geralmente considerados como patógenos contagiosos causadores da mastite (SMITH; HOGAN, 1995).

Figura 7 – Frequências relativas dos principais filos bacterianos encontrados em cada uma das 57 amostras de leite avaliadas neste estudo. Os dados são oriundos da classificação de sequências representativas de cada uma das OTUs obtidas (similaridade de 97%) com a distribuição de 10.000 sequências por amostra

Tabela 6 – Porcentagem de abundância dos principais filos encontrados em cada uma das amostras estudadas

(continua)

	1 (77_F1)	2 (105_F1)	3 (93_F1)	4 (78_F1)	5 (115_F1)	6 (35_F1)
<i>Actinobacteria</i>	23,0	19,8	15,9	20,7	27,1	27,8
<i>Bacteroidetes</i>	4,6	7,1	22,4	4,6	8,6	8,1
<i>Chloroflexi</i>	1,3	0,5	0,5	0,3	3,0	2,7
<i>Firmicutes</i>	23,3	27,3	15,3	26,7	25,8	15,8
<i>Fusobacteria</i>	1,5	0,6	0,4	1,3	0,8	1,2
<i>Proteobacteria</i>	15,9	23,3	15,8	37,7	19,7	21,8
Não classif.	25,4	17,3	27,5	6,9	6,8	16,0
Outros	5,0	4,1	2,2	1,8	8,2	6,6
	7 (121_F1)	8 (88_F1)	9 (115_F1)	10 (67_F1)	11 (30_F1)	12 (85_F1)
<i>Actinobacteria</i>	8,4	13,6	16,8	16,2	10,0	23,5
<i>Bacteroidetes</i>	4,2	3,3	7,0	8,6	10,5	2,7
<i>Chloroflexi</i>	0,1	0,3	0,9	0,7	0,6	0,8
<i>Firmicutes</i>	16,1	30,6	31,7	49,4	31,2	28,6
<i>Fusobacteria</i>	1,2	0,8	1,9	0,7	3,0	0,7
<i>Proteobacteria</i>	27,8	9,4	10,6	12,6	12,7	10,1
Não classif.	40,3	40,0	23,3	8,0	28,4	26,4
Outros	1,9	2,0	7,8	3,8	3,6	7,2
	13 (123_F1)	14 (169_F1)	15 (819_F1)	16 (465_F1)	17 (443_F1)	
<i>Actinobacteria</i>	6,1	21,7	5,1	22,3	24,0	
<i>Bacteroidetes</i>	2,0	0,4	4,2	6,1	8,9	
<i>Chloroflexi</i>	0,4	0,6	0,7	3,4	2,5	
<i>Firmicutes</i>	25,2	36,3	6,0	7,6	24,7	
<i>Fusobacteria</i>	0,6	6,3	0,4	-	-	
<i>Proteobacteria</i>	4,3	22,4	9,7	30,5	27,4	
Não classif.	59,7	0,3	72,3	19,7	6,6	
Outros	1,7	12,0	1,6	10,4	5,9	
	18 (447_F1)	19 (883_F1)	20 (1.711_F1)	21 (3.276_F1)	22 (1.265_F1)	
<i>Actinobacteria</i>	26,9	18,8	9,0	3,8	5,8	
<i>Bacteroidetes</i>	8,7	6,1	6,5	2,0	1,6	
<i>Chloroflexi</i>	1,9	1,8	2,7	0,5	0,5	
<i>Firmicutes</i>	29,5	16,2	12,6	5,7	19,4	
<i>Fusobacteria</i>	-	0,1	0,1	-	0,1	
<i>Proteobacteria</i>	19,4	17,7	14,2	7,2	4,0	
Não classif.	10,4	33,3	49,5	79,4	67,0	
Outros	3,2	6,0	5,4	1,4	1,6	

Tabela 6 – Porcentagem de abundância dos principais filos encontrados em cada uma das amostras estudadas

	(continuação)				
	23 (2.745_F1)	24 (2.000_F1)	25 (714_F1)	26 (60_F2)	27 (18_F2)
<i>Actinobacteria</i>	8,7	32,7	13,5	13,7	5,9
<i>Bacteroidetes</i>	1,9	5,4	0,3	5,2	1,4
<i>Chloroflexi</i>	0,4	0,4	11,4	2,3	0,6
<i>Firmicutes</i>	10,3	21,1	15,7	34,3	13,1
<i>Fusobacteria</i>	0,2	0,9	0,7	0,5	0,4
<i>Proteobacteria</i>	7,7	16,8	36,7	14,5	6,6
Não classif.	69,9	17,3	4,0	23,2	67,2
Outros	0,9	5,4	17,7	6,3	4,8
	28 (110_F2)	29 (84_F2)	30 (63_F2)	31 (80_F2)	32 (88_F2)
<i>Actinobacteria</i>	18,9	18,6	8,3	9,3	8,7
<i>Bacteroidetes</i>	4,3	4,0	4,2	4,3	1,1
<i>Chloroflexi</i>	3,5	1,6	1,3	0,9	1,3
<i>Firmicutes</i>	28,9	35,7	19,5	41,9	57,6
<i>Fusobacteria</i>	0,7	1,5	0,9	0,6	0,4
<i>Proteobacteria</i>	16,2	25,8	9,3	7,7	3,5
Não classif.	20,3	7,2	52,2	33,3	16,5
Outros	7,2	5,6	4,3	2,0	10,9
	33 (136_F2)	34 (22_F2)	35 (152_F2)	36 (177_F2)	37 (29_F2)
<i>Actinobacteria</i>	0,3	9,8	2,3	20,5	19,3
<i>Bacteroidetes</i>	0,4	1,8	0,7	5,6	4,0
<i>Chloroflexi</i>	-	2,4	0,4	3,4	5,9
<i>Firmicutes</i>	1,6	59,0	5,2	35,9	33,8
<i>Fusobacteria</i>	-	0,8	0,1	1,1	0,9
<i>Proteobacteria</i>	0,4	5,9	1,6	21,6	21,6
Não classif.	97,1	6,6	88,9	6,1	2,1
Outros	0,2	13,7	0,8	5,8	12,4
	38 (140_F2)	39 (97_F2)	40 (488_F2)	41 (438_F2)	42 (442_F2)
<i>Actinobacteria</i>	-	0,1	8,2	15,6	2,8
<i>Bacteroidetes</i>	-	-	5,8	4,0	2,0
<i>Chloroflexi</i>	-	0,0	1,0	4,5	0,9
<i>Firmicutes</i>	0,1	0,2	56,2	40,5	15,3
<i>Fusobacteria</i>	-	-	2,0	1,3	0,1
<i>Proteobacteria</i>	0,1	0,1	12,2	17,4	5,2
Não classif.	99,7	99,4	8,7	9,2	70,6
Outros	0,1	0,2	5,9	7,5	3,1

Tabela 6 – Porcentagem de abundância dos principais filos encontrados em cada uma das amostras estudadas

(conclusão)

	43 (6.456_F2)	44 (1.127_F2)	45 (208_F2)	46 (409_F2)	47 (418_F2)
<i>Actinobacteria</i>	6,8	6,7	11,3	7,5	5,6
<i>Bacteroidetes</i>	1,4	1,5	4,5	3,9	2,1
<i>Chloroflexi</i>	0,3	0,9	1,6	1,7	0,4
<i>Firmicutes</i>	31,5	11,4	35,4	16,0	8,1
<i>Fusobacteria</i>	25,4	0,3	1,2	0,5	0,3
<i>Proteobacteria</i>	4,5	4,6	10,6	8,4	11,3
Não classif.	27,9	72,5	29,6	57,1	66,2
Outros	2,2	2,1	5,8	4,9	6,0

	48 (445_F2)	49 (206_F2)	50 (1.278_F2)	51 (2.176_F2)	52 (742_F2)
<i>Actinobacteria</i>	3,0	4,9	0,1	1,1	1,8
<i>Bacteroidetes</i>	1,4	1,4	0,1	0,4	0,1
<i>Chloroflexi</i>	0,2	0,9	-	0,1	68,6
<i>Firmicutes</i>	5,0	17,4	0,6	4,0	0,3
<i>Fusobacteria</i>	0,2	0,1	-	0,1	4,6
<i>Proteobacteria</i>	2,6	3,1	0,2	1,1	21,8
Não classif.	87,1	69,5	98,9	92,6	1,9
Outros	0,5	2,7	0,6	0,6	0,9

	53 (149_F3)	54 (62_F3)	55 (92_F3)	56 (338_F3)	57 (905_F3)
<i>Actinobacteria</i>	39,6	15,4	17,8	14,2	27,2
<i>Bacteroidetes</i>	3,4	7,4	3,3	3,4	2,4
<i>Chloroflexi</i>	1,2	7,6	0,8	0,6	0,9
<i>Firmicutes</i>	12,8	26,2	17,4	16,8	18,1
<i>Fusobacteria</i>	0,4	0,7	0,5	0,3	0,5
<i>Proteobacteria</i>	19,9	23,9	10,6	7,3	9,5
Não classif.	18,9	4,9	44,4	54,3	37,5
Outros	3,8	13,9	5,2	3,1	3,9

Para facilitar a comparação, os resultados de sequenciamento para gêneros foram agrupados de acordo com o diagnóstico baseado em cultura. Sequências derivadas de amostras de leite vindas de vacas saudáveis também foram agrupadas separadamente. Nas Figuras 8-16, estão apresentados os gêneros que contribuem para as sequências identificadas em amostras individuais. Dentro da classe *Actinobacteria* os gêneros mais abundantes foram *Corynebacterium*, *Phycococcus*, *Arthrobacter* e *Propionibacterium*. Representando o filo *Firmicutes*, os

gêneros mais abundantes foram *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Clostridium* e *Staphylococcus*. Este último gênero apresentou abundância elevada (5,1% do total) e predominantemente foi observado tanto nas amostras de alta quanto nas de baixa CCS. Vale a pena um destaque para a amostra 52 (742_F2), caracterizada com alta CCS que apresentou percentual elevadíssimo de *Staphylococcus* (59,2%), seguido das amostras 17 (443_F1) com 10,2%, 22 (1.265_F1) com 11,9%, 40 (488_F2) com 7,2% e amostra 41 (438_F2) com 12,40%. As amostras com baixa CCS também apresentaram abundância elevada de *Staphylococcus*, entre elas destacam-se as amostras 31 (80_F2) com 24,20%, 14 (169_F1) com 16,5%, 12 (85_F1) com 12,1%, 55 (92_F3) com 9,6%, 26 (60_F2) com 9,2% e 4 (78_F1) com 6,8 %.

Curiosamente a única amostra que foi diagnosticada como *Staphylococcus aureus* na cultura microbiológica, apresentou um percentual relativamente baixo comparado a outras amostras, apresentando percentual de 4,4% do gênero *Staphylococcus* (Figura 8). Por outro lado, a amostra negativa para cultura microbiológica 31 (80_F2) com apenas 80.000 células somáticas/mL apresentou percentual alto de 24,2%. A mesma discrepância foi observada para a amostra 22 (1.265_F1) com mais de 1.000.000 de células somáticas que, com 11,9% de sequências afiliadas para o gênero *Staphylococcus* apresentou como diagnóstico de cultura, resultado negativo. Esta variação pode estar associada a alterações na quantidade total de células bacterianas em diferentes animais. Isso provavelmente reflete a relativa baixa abundância de muitas espécies de bactérias no leite, estando abaixo dos limites de detecção bem como os requisitos de crescimento que impedem a sua detecção por métodos padrão de cultura, limitando nossa inferência neste aspecto. Apesar disso, a amostra 52 (742_F2) que apresentou o percentual mais elevado de *Staphylococcus* teve como resultado de cultura a presença de *Staphylococcus* coagulase negativa.

Após avaliação adicional das sequências em nível de espécie, foi possível confirmar a presença de *Straphylococcus aureus* em quase todas as amostras, inclusive em amostras de leite provenientes de animais saudáveis. Somente quatro amostras (14 (169_F1), 25 (714_F1), 38 (140_F2) e 39 (97_F2)) não apresentaram nenhuma sequência de DNA de *Staphylococcus aureus*. Esta espécie bacteriana é um dos mais importantes agentes etiológicos da mastite de vacas, cabras e ovelhas (MARK et al., 2005). Além disso, *Staphylococcus aureus* é conhecida por causar infecções de longa duração com tendência a se tornarem

crônicas e com alta resistência aos antimicrobianos (MILES et al., 1992). Hunt et al., (2011) relataram que o *Staphylococcus spp.* e *Streptococcus spp.* faziam parte do núcleo da comunidade bacteriana de amostras de leite humano não mastítico. Observação semelhante foi feita por Oikonomou et al. (2012) que também encontraram prevalência de *Staphylococcus* em todos os grupos de amostras analisadas, inclusive nas amostras derivadas de vacas saudáveis.

Proporção dos gêneros no total de sequências

Figura 8 – Distribuição dos gêneros em porcentagem do número total de sequências 16S, identificados em amostra individual com baixa contagem de células somáticas (vacas saudáveis), que foi diagnosticada como *Staphylococcus aureus* em cultura microbiológica clássica (n=1)

A maior abundância de *Staphylococcus aureus* foi observada nas amostras 23 (2.745_F1) caracterizada como cultura negativa, 28 (110_F2) também caracterizada como cultura negativa e a amostra 36 (177_F2) única caracterizada como *Staphylococcus aureus*, que apresentaram respectivamente 2.631, 1.003 e 679 sequências de DNA. Na amostra 36 (177_F2) foram encontrados alta prevalência de DNA de sequências de *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) como *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus capitis*. Já a amostra 52 (742_F2) com percentual elevado do gênero *Staphylococcus* (59,2%) apresentou, além de sequências de DNA de *Staphylococcus aureus* (58 sequências), sequências de *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus capitis* e

Staphylococcus chromogenes, sendo este último, com destaque para sua alta prevalência de sequências com 53.017 sequências de DNA.

No grupo de amostras com alta CCS diagnosticadas como SCN (Figura 9), foi encontrada alta prevalência de sequências de DNA de *Staphylococcus chromogenes*, seguida das sequências de *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus capitis*. Sequências de *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus warneri* e *Staphylococcus carnosus* foram encontradas com baixa abundância na maior parte das amostras, independente do diagnóstico a base de cultura. Por outro lado, sequências de *Staphylococcus simulans*, considerado o segundo patógeno mais abundante das SCN, foram detectadas somente nas amostras diagnosticadas como SCN, porém em baixa prevalência em comparação com a prevalência de *Staphylococcus chromogenes*. Os mesmos resultados foram observados para o grupo de amostras com baixa CCS que apresentaram SCN como diagnóstico de cultura microbiológica. Nossos resultados com alta e baixa prevalência para sequências de *Staphylococcus chromogenes* e *Staphylococcus simulans*, respectivamente, corroboram com os encontrados por Piessens et al. (2011) que, devido a heterogeneidade de SCN, sugerem a existência de reservatórios ambientais e intramamário na determinação da prevalência dessas espécies, observadas em amostras provenientes de fontes ambientais e amostras de leite. Estes autores, utilizando metodologia de polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP – *Amplified Fragment Length Polymorphism*) investigaram a possível fonte de SCN na mastite. Como resultado identificaram em nível de espécie *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus simulans*. Estas espécies foram responsáveis por 81,3% de todo SCN isolado do leite com maior prevalência da espécie *Staphylococcus chromogenes*. Foram observados diferenças na distribuição de espécies de SCN no leite e no ambiente, ao passo que, *Staphylococcus chromogenes* raramente foi encontrado no ambiente apresentando características de patógenos verdadeiros do úbere.

Para *Staphylococcus simulans*, o ambiente foi encontrado como principal reservatório apresentando alta prevalência em amostras ambientais e baixa prevalência em amostras de leite, sugerindo que a infecção intramamária com esta espécie foi possivelmente de origem ambiental. No entanto, Taponen et al., (2008) analisando isolados de várias espécies de SCN a partir de amostras de esfregaços

da pele do úbere, teto e mãos dos ordenhadores juntamente com amostras de leite com mastite, encontraram como espécies predominantes em amostras de leite, *Staphylococcus chromogenes* e *Staphylococcus simulans*. Da mesma forma, *Staphylococcus chromogenes*, também foi isolado de várias amostras ambientais e *Staphylococcus simulans*, a segunda espécie de SCN mais comum na mastite, foi isolado apenas a partir de três amostras extramamária, sugerindo que *Staphylococcus simulans* pode também ser mais especificamente associados à mastite com características de patógenos verdadeiros do úbere.

Ademais, vale ressaltar que a prevalência de SCN na mastite é mais elevada em primíparas do que nas vacas mais velhas. *Staphylococcus chromogenes*, espécie de SCN predominante na mastite bovina, é a principal espécie de SCN que afetam novilhas (nulíparas) e primíparas, enquanto *Staphylococcus simulans* foi isolada com maior frequência em vacas mais velhas. Vacas multíparas geralmente tornam-se infectadas com SCN durante a lactação enquanto vacas primíparas desenvolvem infecção antes ou logo após o parto (GILLESPIE et al., 2009). Contudo, informações a respeito de registros de partos não foram coletadas neste estudo, o que restringe nossa inferência neste aspecto.

Figura 9 – Distribuição dos gêneros em porcentagem do número total de sequências 16S identificados em amostras individuais com alta contagem de células somáticas, que foram diagnosticadas como *Staphylococcus coagulase negativa* em cultura microbiológica clássica (n=14). Nota: * amostra diagnosticada como *Staphylococcus coagulase negativa/Streptococcus uberis*

As amostras com baixa CCS que foram diagnosticadas como SCN na cultura microbiológica apresentaram alta prevalência dos gêneros *Staphylococcus* e *Propionibacterium* (Figura 10). Vale a pena um destaque para a amostra 38 (140_F2) diagnosticada como SCN/*Corynebacterium spp.* que apresentou o menor índice de riqueza e diversidade, com 10.000 sequências alocadas em 68 UTOs, apresentou 99,7 % de sequências não classificadas. Isto indica que as sequências que foram encontradas pertencem a outro tipo de organismo e não ao domínio *Bacteria*. Entre as poucas sequências detectadas nesta amostra, destacam-se as sequências de DNA correspondente à *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus chromogenes* e *Lactobacillus acidophilus*. No entanto, vale a pena evidenciar que estudos de prevalência não apresentam a capacidade de mostrar uma ordem de causa e efeito. Estudos de desafios experimentais com conhecidas quantidades de bactérias seriam capazes de fornecer tais argumentos causais. Apesar destas limitações, um possível papel de certas bactérias como patógenos oportunistas podem ser especulados com base nos resultados aqui apresentados.

Figura 10 – Distribuição dos gêneros em porcentagem do número total de sequências 16S, identificados em amostras individuais obtidas de vacas saudáveis, que foram diagnosticadas como *Staphylococcus coagulase negativa* em cultura microbiológica (n=6). Nota: * amostra diagnosticada como *Staphylococcus coagulase negativa/Corynebacterium spp*

O gênero *Streptococcus* mostrou maior prevalência nos grupos caracterizados como *Streptococcus bovis* (16 (465_F1) e (19 (883_F1)) e *Streptococcus uberis* (15 (819_F1)) na cultura microbiológica (Figura 11A e 11B). Na amostra 16 (465_F1) foram encontradas 721 sequências, na amostra 19 (883_F1) 3.565 sequências e na amostra 15 (819_F1) 8.565 sequências, representando a amostra com maior abundância de sequências para a espécie *Streptococcus uberis*. No entanto, *Streptococcus uberis* também foi prevalente em todos os outros grupos de amostras, mesmo nas amostras de leite derivadas de vacas saudáveis. A bactéria gram-positiva *Streptococcus uberis* está entre as quatro espécies mais prevalentes de patógenos causadores da mastite (ERICSSON et al., 2009; ZADOKS et al., 2011). A infecção com esta bactéria pode ocorrer com pouco ou nenhum sinal clínico, mas também pode resultar em grave inflamação da glândula mamária culminando em mastite clínica (ZADOKS et al., 2003). Resultados de desafios experimentais ou infecção natural com *Streptococcus uberis* mostraram variação da doença de clínica grave a infecção assintomática ou mesmo incapacidade do estabelecimento da infecção (HILL, 1998; TOMIDA et al., 2008). Com isso alguns autores tentaram correlacionar estirpes com características clínicas e epidemiológicas, como a persistência da infecção, sinais clínicos ou elevação da contagem de células somáticas. Dessa forma, alguns estudos defendem a existência de cepas persistentes (ZADOKS et al., 2003) enquanto outros, acreditam que fatores relacionados a variabilidade individual dos animais, que irão determinar a duração da infecção ao invés da presença de múltiplas estirpes (PULLINGER et al., 2007).

Figura 11 – Distribuição dos gêneros em porcentagem do número total de sequências 16S, identificados em amostra individual com alta contagem de células somáticas, que foi diagnosticada como (A) *Streptococcus uberis* (n=1) e (B) *Streptococcus bovis* em cultura microbiológica clássica (n=2)

Sequências de DNA de *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus thermophilus* e *Streptococcus gallolyticus* também foram encontradas nas amostras caracterizadas como *Streptococcus uberis* e *Streptococcus bovis* com bastante variação de abundância entre as espécies. Sequências de *Streptococcus sanguinis* esteve presente em quase todas as amostras analisadas, com exceção de quatro amostras (14 (169_F1), 20 (1.711_F1), 25 (714_F1) e 38 (140_F2)) que não apresentaram nenhuma sequência de DNA para esta espécie, sendo que sua prevalência variou entre 1 a 2.206 sequências. Nenhuma OTU correspondente à *Streptococcus bovis* foi encontrada neste estudo, por outro lado, sequências de *Streptococcus dysgalactiae* foram detectadas com alta prevalência principalmente na amostra 15 (819_F1) caracterizada como *Streptococcus uberis* na cultura microbiológica. A epidemiologia do *Streptococcus dysgalactiae* ainda é mal compreendida. Essa espécie tem sido descrita como agente patogênico contagioso (FOX; GAY, 1993), e contrariamente como agente patogênico ambiental (OLIVER et

al., 2003), porém, fontes ambientais ainda não foram investigadas. A evidência para a natureza dual deste patógeno vem de estudos realizados na década de 1960 (NEAVE et al., 1969) e de estudos moleculares realizados na década de 1990 (OLIVER et al., 1998). Os resultados deste último estudo, que abrangeu 12 quartos a partir de 6 vacas, ilustram uma série de características de *Streptococcus dysgalactiae*. Em primeiro lugar, as infecções podem ser transitórias ou persistentes. Em segundo lugar, uma estirpe parece dominar dentro do rebanho. Desse modo, quando vários quartos são positivos, simultaneamente, para *Streptococcus dysgalactiae*, a infecção geralmente é causada por uma única estirpe dentro de um animal, indicando que a transmissão ocorre de animal para animal. Embora com todas as advertências apropriadas para um único estudo com número limitado de animais, esses padrões parecem descrever uma mistura do que se poderia esperar para patógenos típicos contagiosos com infecções persistentes e estirpe dominante, e patógenos ambientais com infecções transitórias e multiplicidade de estirpes.

O grupo de amostras diagnosticadas como *Corynebacterium* spp. na cultura microbiológica apresentou, além da presença do gênero *Corynebacterium*, sequências com alta prevalência dos gêneros *Propionibacterium*, *Staphylococcus* e *Streptococcus*. Em menores abundâncias foram detectados os gêneros *Pseudomonas*, *Methylobacterium*, *Ruminococcus*, *Lactobacillus* e *Rubrobacter* (Figura 12A e 12B). O gênero *Corynebacterium* esteve presente em quase todas as amostras analisadas neste estudo, o que pode ser observado ao longo dos gráficos 8 a 16. Curiosamente, uma quantidade bastante significativa de espécies do gênero *Corynebacterium* foi detectada pelo sequenciamento. No total foram identificadas 25 espécies alocadas em 29 UTOs. Apesar da elevada quantidade de espécies encontradas, a grande maioria esteve presente em quase todas as amostras, porém com baixa prevalência. As espécies mais abundantes foram *Corynebacterium bovis* e *Corynebacterium xerosis*. As principais fontes de *Corynebacterium bovis* em um rebanho são o interior da glândula mamária e o canal do teto. É considerado um agente contagioso, pois a sua transmissão pode ocorrer principalmente durante o momento da ordenha, de vaca para vaca. O papel do *C. bovis* como agente da mastite é controverso. Alguns autores o consideram como patógeno de significância limitada ou um microrganismo comensal da glândula mamária (LEVAN et al., 1985; POCHIECHA, 1989), contrariamente, outros autores afirmam sua elevada prevalência em infecções intramamárias, sugerindo que talvez seja mais apropriado não

considerá-lo um patógeno secundário (BUENO et al., 2003; PITKALA et al., 2004; MARTINS et al., 2010). Neste contexto é importante destacar, que a deficiência na desinfecção dos tetos pós-ordenha pode promover uma alta incidência de *C. bovis* em um rebanho (SANTOS, 2007).

Figura 12 – Distribuição dos gêneros em porcentagem do número total de sequências 16S, identificados em amostras individuais com alta (A) e baixa (B) contagem de células somáticas, que foram diagnosticadas como *Corynebacterium* spp em cultura microbiológica clássica (n=3)

A amostra 47 (418_F2) diagnosticada na cultura microbiológica como *Levedura* spp. apresentou no sequenciamento alta prevalência dos gêneros *Propionibacterium*, seguido dos gêneros *Streptococcus* e *Staphylococcus*. Os gêneros *Corynebacterium*, *Rubrobacter*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas* e *Ruminococcus* também foram detectados, porém com baixa prevalência (Figura 13). Leveduras e fungos constituem a flora normal de solos e podem ser encontrados em uma ampla variedade de substratos, tais como plantas e água. A maioria destes microrganismos são oportunistas e as fontes de infecção também incluem a pele do úbere, a secreção de glândulas mamárias, mãos dos ordenhadores, utensílios e equipamentos de ordenha (RICHARD et al., 1980). Dessa forma, podem promover a doença quando os mecanismos de defesa naturais são reduzidos, no entanto, a incidência da mastite por fungos é geralmente muito baixa em rebanhos leiteiros dos

Estados Unidos (KIRK; BARTLETT, 1986), mas em países tropicais a percentagem de incidência pode ser mais elevada (COSTA et al., 1993). Em um trabalho prévio realizado no estado de Minas Gerais, os autores identificaram uma frequência média de isolamento de leveduras na ordem de 3,4% (COSTA et al., 2008). Entretanto, outros autores encontraram outras frequências médias de isolamento que vão desde 0,1% até 17,3%, demonstrando grandes variações nos índices de infecções ocasionadas por leveduras (WILSON et al., 1997; SANTOS; MAREIN, 2005). Ainda dentro deste contexto, é importante destacar que a ocorrência da mastite fúngica tem sido relatada principalmente após o tratamento com antibióticos, muitas vezes com a utilização de cânulas e seringas contaminadas, juntamente com a falha nos cuidados com assepsia dos tetos antes do tratamento intramamário (CRAWSHAW et al., 2005).

Proporção dos gêneros no total de sequências

Figura 13 – Distribuição dos gêneros em porcentagem do número total de sequências 16S, identificados na amostra individual com alta contagem de células somáticas, que foi diagnosticada como *Levedura spp.* em cultura microbiológica clássica (n=1)

Como mostrado na Figura 14, os gêneros *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Rubrobacter*, *Propionibacterium* e *Corynebacterium* foram predominantes em quase todas as amostras de baixa CCS que foram negativas para cultura. Uma amostra apresentou proporção bem elevada de *Staphylococcus* e a análise aprofundada em nível de espécie mostrou alta predominância das espécies *Staphylococcus chromogenes* (7.709 sequências) e *Staphylococcus auriculares*

(1.677 sequências). Nesta mesma amostra *Staphylococcus aureus* também foi prevalente juntamente com as espécies *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus simulans*, com variação de média a baixa prevalência. Curiosamente dois destes gêneros, mais especificamente *Staphylococcus* e *Corynebacterium*, foram encontrados em amostras negativas para cultura (KUEHN et al., 2013). Da mesma forma, esses dois gêneros também foram identificados em um estudo prévio de bactérias associadas com a pele do teto por métodos dependentes de cultura e por sequenciamento de bibliotecas de clones do gene 16S rRNA (VERDIER-METZ et al., 2012). Levando em conta a proximidade da pele do teto com a superfície da mucosa do canal do teto e os métodos de coleta juntamente com coleta de fluxos de leite iniciais, estes autores sugerem que grande parte da prevalência destes gêneros presente nas amostras negativas em cultura pode ter vindo do ambiente, apoiando a ideia de sobreposição da microbiota do animal para o leite. Embora em nosso estudo, tenham sido descartados os primeiros jatos de leite e as amostras tenham sido coletadas de forma asséptica, a pele do teto pode ser uma fonte particular de biodiversidade para o leite. Este ponto pode ser levado em consideração para direcionamento em estudos futuros de mastite permitindo assim, avaliar como as mudanças microbianas da superfície do teto podem contribuir para o estabelecimento da infecção intramamária.

Figura 14 – Distribuição dos gêneros em porcentagem do número total de sequências 16S, identificados em amostras individuais obtidas de vacas saudáveis, que foram classificadas como negativa em cultura microbiológica clássica (n=21)

Da mesma forma, estes mesmos gêneros *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Rubrobacter*, *Propionibacterium* e *Corynebacterium* foram também prevalentes nas amostras com alta CCS e que foram negativas na cultura. Uma amostra em específico apresentou alta prevalência do gênero *Propionibacterium* com 3.311 sequências para *Propionibacterium acnes* e 67 sequências para *Propionibacterium granulosum* (Figura 15). Espécies de *Propionibacterium* são Gram-positivas anaeróbias e são considerados bactérias comensais da pele humana. Geralmente não são consideradas patogênicas e são contaminantes comuns das culturas do sangue e fluidos corporais. Estas espécies são de crescimento lento e exigem pelo menos 6 dias para crescimento em cultura (BRUGGEMANN et al., 2004). Espécies de *Propionibacterium* têm sido estudadas por causa de sua associação com a acne vulgar (MAKRANTONAKI et al., 2011), no entanto, também podem causar numerosas infecções, incluindo endocardite, infecções pós-operatórias e infecções neurocirúrgicas (DALI et al., 2001). *Propionibacterium acnes* cresce em microambientes ricos em lipídeos do folículo piloso. *Propionibacterium granulosum* é encontrado nas mesmas condições, mas em menor abundância do que as espécies de *P. acnes* (PERRY et al., 2011). Embora

todos os cuidados relacionados à assepsia das coletas neste experimento tenham sido tomados, a presença destas duas espécies, sendo *P. acnes* com alta prevalência em algumas amostras, demonstra contaminação durante o processo de amostragem.

Ainda dentro do grupo de amostras com alta CCS e que foram negativas na cultura, uma amostra chamou atenção para alta prevalência do gênero *Staphylococcus* (Figura 15). Foram identificadas 30.452 sequências de DNA para a espécie *Staphylococcus chromogenes*. A superabundância de DNA desta espécie ou o deslocamento do nicho de organismos comensais promoveu a diminuição da diversidade taxonômica nesta amostra que levou à comparativamente baixas sequências de outras UTOs.

Figura 15 – Distribuição dos gêneros em porcentagem do número total de sequências 16S, identificados em amostras individuais com alta contagem de células somáticas, que foram diagnosticadas como negativa em cultura microbiológica clássica (n=7).

O diagnóstico da amostra com baixa CCS caracterizada como *Bacillus/Arcanobacterium spp.* na cultura microbiológica, foi confirmado apesar da baixa prevalência dos gêneros *Bacillus* (0,2%) e *Arcanobacterium* (0,1%) detectados pelo sequenciamento. No entanto, o sequenciamento também detectou sequências de DNA de outras espécies presentes nesta amostra e com maior prevalência do que a observada para os gêneros *Bacillus* e *Arcanobacterium*. Entre essas espécies

podemos destacar alta prevalência de várias espécies de SCN, espécies do gênero *Streptococcus*, espécies do gênero *Propionibacterium* e espécies do gênero *Corynebacterium* (Figura 16). Na grande maioria das amostras, o sequenciamento também detectou a presença de outros patógenos conhecidos da mastite, além dos que foram detectados na cultura microbiológica. Estudos prévios utilizando PCR-DGGE e pirosequenciamento fizeram a mesma constatação e estes autores sugerem a possibilidade de infecções bacterianas mistas em alguns casos de mastite (KUANG et al., 2009; OIKONOMOU et al., 2012). Bhatt et al. (2012) também apoiam esta hipótese e sugerem que a mastite subclínica não é apenas causada por uma única espécie de bactéria patogênica, e sim por uma mistura de vários microrganismos. Por outro lado, a presença de muitas espécies de bactérias diferentes em uma amostra de leite, pode ser considerada sinal de contaminação em decorrência de falhas no momento da coleta de amostras destinadas às análises microbiológicas (KOSKINEN et al., 2010). A presença de muitas espécies bacterianas em quantidades que não são identificadas por cultura, mas são identificados pelo sequenciamento, também pode refletir uma contaminação subjacente de pequenas quantidades de DNA bacteriano durante o processo de amostragem e manipulação de amostras.

Proporção dos gêneros no total de sequências

Bacillus spp/Arcanobacterium spp.

Figura 16 – Distribuição dos gêneros em porcentagem do número total de sequências 16S, identificados em amostra individual com baixa contagem de células somáticas (vacas saudáveis), que foi diagnosticada como *Bacillus spp.* em cultura microbiológica clássica (n=1)

O gênero *Pseudomonas* apresentou prevalência acima de 1% em algumas amostras provenientes de vacas saudáveis e que apresentaram resultado negativo no diagnóstico de cultura. Entre estas se destacam as amostras 4 (78_F1) com 1%, 7 (121_F1) com 1,4%, 9 (115_F1) com 1,9%, 10 (67_F1) com 1,4%, 26 (60_F2) com 1,9%, 27 (18_F2) com 1,3% e amostra 28 (110_F2) com 1,4%. Amostras caracterizadas como *Staphylococcus* coagulase negativa também apresentaram prevalência de *Pseudomonas* acima de 1%. Entre estas se destacam as amostras 29 (84_F2) com 1,6% e amostra 41 (438_F2) com 1,4%. A infecção intramamária, causada por *Pseudomonas aeruginosa*, por exemplo, é inicialmente caracterizada pelo desenvolvimento de mastite aguda que muitas vezes se desenvolve em um estado de infecção crônica (POWER, 2003). Esta espécie é facilmente cultivada e identificada por métodos de cultura convencional e considerando que esta bactéria está associada a casos moderados a graves da doença, possivelmente a prevalência acima de 1% encontrada nas amostras provenientes de animais saudáveis não são *Pseudomonas aeruginosa* e sim outras espécies de *Pseudomonas* que não são facilmente cultivadas por métodos de cultura convencional. Embora não tenha sido realizada análise aprofundada em nível de espécie para esta confirmação, visto que sua prevalência total ficou abaixo de 1%, essa hipótese é corroborada por Kuehn et al. (2013), que ao analisar a diversidade de microrganismos causadores da mastite clínica, encontraram alta prevalência de *Pseudomonas* em amostras de leite provenientes de animais saudáveis e que apresentaram isolamento negativo nas culturas microbiológicas. Estes autores utilizaram como metodologia a plataforma de sequenciamento 454 GS-FLX Titanium da Roche. Utilizando a metodologia de pirosequenciamento parcial do gene 16S rRNA, Hunt et al. (2011) e colaboradores, também encontraram o gênero *Pseudomonas* em amostras de leite humano provenientes de mulheres saudáveis. Este gênero apresentou alta prevalência em 15 amostras obtidas a partir de 16 mulheres saudáveis, ao longo de um gradiente de tempo. Além disso, o gênero *Pseudomonas* também tem sido associado com a contaminação de sistemas de água e desinfetantes do teto na sala de ordenha (MENA; GERBA, 2009). Esta associação representa potencial fonte de colonização dos tecidos mamários em bovinos, uma vez que a água é imprescindível para o saneamento das unidades de ordenha.

Dentro do gênero *Rubrobacter* foram encontradas duas OTUs para a espécie *Rubrobacter xylanophilus*. Sequências de DNA desta espécie foram detectadas com alta abundância nas amostras caracterizadas como *Streptococcus bovis* e *Streptococcus uberis*. Porém, a sua maior prevalência foi verificada em praticamente metade das amostras de baixa CCS que apresentaram resultado negativo na cultura, com média de 4.824 sequências com desvio padrão de 3.003 sequências. *Rubrobacter xylanophilus* foi isolada pela primeira vez a partir de um efluente poluído termicamente de uma fábrica de tapetes no Reino Unido (CARRETO et al., 1996). Este organismo é um dos mais resistentes à radiação gama e a única termofílica verdadeiramente resistente à radiação, com uma temperatura ótima de crescimento de 60°C. O isolamento do DNA filogeneticamente classificado no gênero *Rubrobacter* encontrado em desertos suporta a hipótese de que a resistência à radiação gama é provavelmente uma consequência da adaptação a ambientes extremos áridos ou desidratação (EMPADINHAS; COSTA, 2010). Apesar disso, não foi encontrado nenhum relatório associando a presença desta espécie em amostras de leite ou com a mastite bovina.

Outro gênero que apresentou abundância acima de 1% foi o gênero *Lactobacillus*. As espécies mais abundantes foram *L. salivarius*, *L. algidus*, *L. aviarius*, *L. iners*, *L. johnsonii*, *L. reuteri*, *L. acidophilus*, *L. amylophilus*, e *L. paracasei*. Sequências de DNA dessas espécies estiveram presentes somente nas amostras provenientes de vacas saudáveis e com baixa prevalência. Espécies do gênero *Lactobacillus* são membros da microflora comensal da cavidade oral, gastrointestinal e sistema genital urinário de humanos e animais. *Lactobacillus* também são encontrados no leite e algumas cepas de certas espécies de *Lactobacillus* são capazes de influenciar benéficamente a saúde do hospedeiro (PERDIGON; FULLER; RAYA, 2001). Existem muitos relatos que demonstram que a capacidade imunomoduladora de certas estirpes probióticas possa, pelo menos em parte, mediar tais efeitos benéficos (MARRANZINO et al., 2012; VILLENA et al., 20012; TOMOSADA et al., 2013). Dessa forma, os resultados aqui apresentados demonstram que são necessárias mais investigações para um melhor entendimento de como os patógenos bacterianos podem influenciar a comunidade normal do sistema mamário.

Nosso trabalho apresenta alta semelhança com o trabalho anterior realizado por Oikonomou et al. (2012), entretanto, diferenças nos rebanhos, na

identificação das amostras em cultivo microbiológico, extração de DNA, profundidade de plataformas de sequenciamento, metodologia de classificação de sequências e por fim, utilização de base dados, provavelmente explicam as diferenças entre esses dois estudos e reflete a demanda de geração de conhecimento nesta área. A variação normal existente nas comunidades microbianas em animais saudáveis e a sua potencial regulação na doença, podem ajudar a determinar uma melhor estratégia para o aprimoramento de métodos laboratoriais e computacionais (GEVERS et al., 2012). Estes métodos podem ser adaptados para melhor caracterizar o impacto de bactérias, *archaea*, vírus e fungos presentes ao longo dos reservatórios intramamários e ambientais.

Dessa forma, existe a necessidade de iniciativas pioneiras para estabelecer métodos universais e estabelecimento de infraestrutura necessária em termos de genomas de referência, protocolos laboratoriais e ferramentas de bioinformática padronizadas para auxiliar futuros estudos (KUEHN et al., 2013). Como exemplo, podemos citar o reconhecido *National Institutes of Health (NIH)* que por intermédio do projeto Microbioma Humano, tem como finalidade caracterizar e mapear a flora microbiana presente em diferentes partes do corpo humano. Dados de indivíduos sem sinais de doença aparente servem como uma referência para estudos de comunidades microbianas associadas às doenças, ao mesmo tempo em que proporciona uma linha de base abrangente para comparação das populações ocidentais com distâncias geográficas, étnicas e grupos genéticos (YATSUNENKO et al., 2012). Isto pode servir como exemplo, para que também seja implementado na bovinocultura leiteira, para futuras análises comparativas globais permitindo comparações entre os estudos, através de processos uniformes que devem ser utilizados para reduzir a variabilidade inerente aos experimentos, assim como o já reconhecido e realizado pelo Projeto Microbioma Humano.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os métodos utilizados neste estudo permitiram realizar um exame mais aprofundado e detalhado da biodiversidade bacteriana presente nas amostras, empregando iniciadores capazes de detectar a maioria das bactérias presentes em amostras clínicas em nível de gênero e por intermédio de uma análise mais aprofundada, em nível de espécies. A variação encontrada entre as amostras, baseadas em contagem de células somáticas, cultura microbiológica e sequenciamento parcial do gene 16S rRNA foi consistente para avaliar o quanto o sequenciamento pode contribuir para a caracterização dessas comunidades de forma mais abrangente.

Portanto, este estudo confirma a hipótese de que o sequenciamento permite uma determinação mais abrangente da comunidade microbiana presente em amostras de leite derivadas de vacas saudáveis e com mastite subclínica. Após a avaliação adicional das sequências em nível de espécie, verificou-se que em geral as bactérias diagnosticadas por cultura geralmente não corresponderam com as sequências mais abundantes detectadas pelo sequenciamento. A análise da composição da microbiota de amostras de leite provenientes de animais saudáveis revelou a presença de uma grande diversidade de espécies bacterianas, mesmo que nenhuma bactéria foi detectada por técnica de cultura. Além disso, as diferenças na composição microbiana foram observadas entre as amostras quando a comparação foi feita de forma individual. Estas diferenças foram notórias em composição taxonômica e foram refletidas por intermédio das estimativas de alfa e beta diversidade como ilustrado nas análises de Chao-1, PD e PCoA. Porém, quando a comparação foi realizada por separação de grupos com alta e baixa CCS, essa diferença não foi tão evidente, rejeitando a hipótese de que os animais com alta contagem de células somáticas apresentariam uma população bacteriana diferente de animais com baixa contagem.

Assim sendo, a comparação realizada entre a cultura clássica e a análise de sequenciamento indicou que nas amostras com mastite subclínica, houve grande presença de patógenos oportunistas que compunham os maiores componentes destas comunidades. Assim, a mastite subclínica pode ser considerada uma doença polimicrobiana e populações predominantes devem ser consideradas como potenciais oportunistas em tais infecções. No entanto, animais

com sistema imunológico comprometido muitas vezes correm o risco do desenvolvimento da infecção por tais microrganismos. Por isso, reconhece que muitas das bactérias detectadas no leite provenientes de animais com mastite subclínica pode não ter participação ativa nas comunidades, mas podem ser transitórias ou populações contaminantes ambientais.

Estudos epidemiológicos moleculares, no entanto, apresentam potencial para contribuir consideravelmente para a nossa compreensão das fontes, rotas de transmissão e prognósticos para muitos patógenos causadores da mastite, podendo auxiliar os produtores leiteiros a concentrar os seus esforços nas áreas mais relevantes para prevenção e controle da doença. Estudos moleculares também podem contribuir para a compreensão dos mecanismos de adaptação e as causas da doença, fornecendo informações sobre a evolução do patógeno e alvos potenciais para o desenvolvimento de terapias ou vacinas. Contudo, é necessário ressaltar que estudos mais específicos nesta área são necessários, visto que o método de sequenciamento detecta organismos mortos e pedaços de DNA que podem ser irrelevantes para a mastite bovina e a presença do DNA por si só, não prova a patogenicidade dos microrganismos. Assim, acreditamos que um conhecimento mais profundo dessas estruturas em mastite pode ajudar a determinar a melhor estratégia de controle para ser utilizado na produção leiteira, a fim de reduzir as perdas da indústria de laticínios e para garantir bem estar animal, segurança e qualidade do leite.

REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, Z, et al. Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

AMAR, J.; SERINO, M.; LANGE, C.; CHABO, C.; IACOVONI, J.; MONDOT, S.; LEPAGE, P.; KLOPP, C. et al. Involvement of tissue bacteria in the onset of diabetes in humans: evidence for a concept. **Diabetologia**, New York, v.54, p. 3055-3061, 2011.

ASHELFORD, K.E.; CHUZHANOVA, N.A.; FRY, J.C.; JONES, A.J.; WEIGHTMAN, A.J.; At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 71, p.7724–7736, 2005.

BAKER, G.C.; SMITH, J.J.; COWAN, D.A. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.55, p.541-555, 2003.

BHATT, V.D.; AHIR, V.B.; KORINGA, P.G.; JAKHESARA, S.J.; RANK, D.N.; NAURIYAL, D.S.; KUNJADIA, A.P.; C.G. JOSHI, C.G. Milk microbiome signatures of subclinical mastitis-affected cattle analysed by shotgun sequencing. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 112, p. 639-650, 2012.

BRADLEY, A.J. Bovine mastitis: an evolving disease. **The Veterinary Journal**, London, v.164, n.2, p.116-128. 2002.

BRAMLEY, A. Environmental mastitis. In: Proc. AABP/NMC International Symposium on Bovine Mastitis. Association Bovine Practitioners, **ADAS**, Indiana, p. 156-170, 1990.

BRAMLEY, A.; DODD, F: Reviews of the progress of dairy science: mastitis control; progress and prospects. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v.51,p. 481-512,1984.

BRAMLEY, A. J.; CULLOR, L.S.; ERSKINE, R.J.; FOX,L.K.; HARMON, R.S.; HOGAN, J.S.; NICKERSON, S.C.; OLIVER, S.P.; SORDILLO, L.M. **Current concepts of bovine mastitis**. 4th.ed. Madison: National Mastitis Council, 1996. 64p,

BRITO, M.A.V.P, BRITO, J.R.F., SOUZA, H.M.; VARGAS, O.L. Avaliação da sensibilidade da cultura de leite do tanque para isolamento de agentes contagiosos da mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.18, p.45-46, 1998.

BRUGGEMANN, H.; HENNE, A.; HOSTER, F.; LIESEGANG, H.; WIEZER, A.; STRITTMATTER, A.; HUJER, S.; DURRE, P.; GOTTSCHALK, G. The complete genome sequence of *Propionibacterium acnes*, a commensal of human skin. **Science**, New York, v. 305, n. 5684, p. 671-673, 2004.

BUENO, V.F.F. Etiologia e suscetibilidade a antimicrobianos dos agentes da mastite bovina isolados na região de Pirassununga, SP, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 32, n. 1, p. 33-44, 2003.

CAPORASO, J.G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F.D.; COSTELLO, E.K.; FIERER, N.; PENA, A.G.; GOODRICH, J.K.; GORDON, J.I.; HUTTLEY, G.A.; KELLEY, S.T.; KNIGHTS, D.; KOENIG, J.E.; LEY, R.E.; LOZUPONE, C.A.; MCDONALD, D.; MUEGGE, B.D.; PIRRUNG, M.; REEDER, J.; SEVINSKY, J.R.; TURNBAUGH, P.J.; WALTERS, W.A.; WIDMANN, J.; YATSUNENKO, T.; ZANEVELD, J.; KNIGHT, R. Correspondence QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data Intensity normalization improves color calling in SOLiD sequencing. **Nature**, London, v. 7, n. 5, p.335-336, 2010.

CARRETO, L.; MOORE, E.; NOBRE, M.F.; WAIT, R.; RILEY, P.W.; SHARP, R.J.; DA COSTA, M.S. *Rubrobacter xylanophilus* sp. nov., a new thermophilic species isolated from a thermally polluted effluent. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 46, p. 460-465, 1996.

CARVALHO, M.C.C.; SILVA, D.C.G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, p. 735-744, 2010.

CARVALHO, R.A.; CIANCIARUSO, M.V.; TRINDADE-FILHO, J.; SAGNORI, M.D.; LOYOLA, R.D. Drafting a blueprint for functional and phylogenetic diversity conservation in the Brazilian Cerrado. **Natureza & Conservação**, Curitiba, v. 8, n. 2, p. 171-176, 2010.

CHENEBY, D.; PHILIPPOT, L.; HARTMANN, A.; HENAULT, C.; GERMON, J.C. 16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 34, p. 121-128, 2000.

CHOI, B.K.; WYSS, C.; GOBEL, U.B. Phylogenetic analysis of pathogen-related oral spirochetes. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, p.1922-1925, 1996.

CLARRIDGE JE 3rd. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 17, p. 840-862, 2004.

COLE J.R.; CHAI, B.; FARRIS, R.J.; WANG, Q.; KULAM-SYED-MOHIDDEN, A.S.; MACGARREL, D.M.; BANDELA, A.M.; CARDENAS, E.; GARRITY, DJE, J. M. The ribosomal database Project (RDP-II): introducing my RDP space and quality controlled public data. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.35, p. 169-172, 2007.

COLE, J.R.; WANG, Q.; CARDENAS, E.; FISH, J.; CHAI, B.; FARRIS, R.J.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A.S.; MCGARRELL, D.M.; MARSH, T.; GARRITY, G.M., TIEDJE, J.M. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 37, p. 141-145, 2009.

COSTA, E.O.; GANDRA, C.R.; PIRES, M.F.; COUTINHO, S.D.; TEIXEIRA, C.M. Survey of bovine mycotic mastitis in dairy herds in the state of São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, Den Haag, v.124, n. 1, p. 13-17, 1993.

COSTA, E.O.; RIBEIRO, A.R.; WATANABRA, T.; MELVILLE, P.A. Infectious Bovine Mastitis Caused by Environmental. **Jounal of Veterinary Medicine**, New York, v. 45, p. 65-71, 1998.

COSTA, G.M.; SILVA, N.; ROSA, C.A.; FIGUEIREDO, H.C.P.; PEREIRA, U.P. Mastite por leveduras em bovinos leiteiros do Sul do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 7, p. 1938-1942, 2008.

CRAWSHAW, W.M.; DONALD, N.R.; DUNCAN, G. Outbreak of *Candida rugosa* mastitis in a dairy herd after intramammary antibiotic treatment. **Veterinary Record**, London, v.156, n.25, p.812-813, 2005.

CULLOR, J. Mastitis and influence upon reproductive performance in dairy cattle. In: Proc. AABP/NMC International Symposium on Bovine Mastitis. Association Bovine Practitioners, **ADAS**, Indianapolis, IN, p. 176-180, 1990.

DALI, P.; GIUGLIANO, E.R.; VELLOZZI, E.M.; SMITH, M.A. Susceptibilities of *Propionibacterium acnes* ophthalmic isolates to moxifloxacin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 45, n. 10, p. 2969-2970, 2001.

DESANTIS, T.Z.; HUGENHOLTZ, P.; KELLER, K.; BRODIE, E.L.; LARSEN, N, et al. NAST: a multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16S rRNA genes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 34, p. 394-399, 2006.

DOWD, S.D.; SARAGOZA, J.; RODRIGUEZ, J.D.; OLIVER, M.; PAYTON, R.P. Windows NET Ntwork Distributed Basic Local Alignment Search Toolkit (W.ND-BLAST). **BMC Bioinformatics**, London, v. 6, p. 1-14, 2005.

EDWARDS, R.A.; RODRIGUEZ-BRITO, B.; WEGLEY, L.; HAYNES, M.; BREITBART, M.; PETERSON, D.M.; SAAR, M.O.; SCOTT ALEXANDER, ALEXANDER, E.C.; ROHWER, F. Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology. **BMC Genomics**, London, v.20, p.7-57, 2006.

EMPADINHAS, N.; Da COSTA, M.S. Diversity, biological roles and biosynthetic pathways for sugar-glycerate containing compatible solutes in bacteria and archaea. **Environmental Microbiology**, Oxford, v.13, n. 8, p. 2056-2077, 2010.

ERICSSON, U.H., LINDBERG, A.; PERSSON, W.K.; EKMAN, T.; ARTURSSON, K.; NILSSON-OST, M.; BENGTSSON, B. Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent-specific risk factors. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 137, p. 90–97, 2009.

ESSLEMONT, D.; KOSSAIBATI, M. Mastitis: how to get out of the dark ages. **Veterinary Journal**, London, v. 164, p. 85-86, 2002.

FAHLEN, A.; ENGSTRAND, L.; BARBARA, S.; ANNE, P.; LIONEL, F. Comparison of bacterial microbiota in skin biopsies from normal and psoriatic skin. **Archives Dermatological Research**, New York, v. 304, p. 15-22, 2011.

FAITH, D.P. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. **Biological Conservation**, Essex, v. 61, p. 1-10, 1992.

FOX, L.K.; GAY, J.M. Contagious mastitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 9, p. 475-487, 1993.

GIANOULIS, T.A.; RAES, J.; PATEL, P.V., BJORNSEN, R.; KORBEL, J.O.; LETUNIC, I.; YAMADA, T.; PACCANARO, A.; JENSEN, L.J.; SNYDER, M.; BORK, P.; GERSTEIN, M.B. Quantifying environmental adaptation of metabolic pathways in metagenomics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington. v.5, p.1374-1379, 2009.

GIGANTE, M.L.; COSTA, M.R. Influência das Células Somáticas nas Propriedades Tecnológicas do Leite e Derivados. CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 3., 2008.Recife. **Anais...** Recife:CCS Gráfica e Editora, 2008. 373p.

GILLESPIE, B.E.; HEADRICK, S. I.; BOONYAYATRA, S.; OLIVER, S.P Prevalence and persistence of coagulase-negative *Staphylococcus* species in three dairy research herds. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 134, p. 65-72, 2009.

GILLESPIE, B.E.; OLIVER, S.P. Simultaneous detection of mastitis pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus agalactiae* by multiplex real-time polymerase chain reaction. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88: p.3510-3518, 2005.

GEVERS, D.; KNIGHT, R.; PETROSINO, J.F.; HUANG, K.; McGUIRE, A.L.; BIRREN, B.W.; NELSON, K.E.; WHITE, O.; METHE, B.A.; HUTTENHOWER, C. The Human Microbiome Project: A Community Resource for the Healthy Human Microbiome. **PLoS Biology**, San Francisco, v. 10, n. 8, p. e1001377, 2012.

GREENGENES. **16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB**. 2012. Disponível em: http://greengenes.lbl.gov/Download/Sequence_Data/Fasta_data_files/. Acesso em: 20 jan. 2016.

HANDELSMAN J. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 68, p.669-685, 2004

HARMON, R. J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 77, n. 7, p. 2103-2112, 1994.

HILL, A.W. Pathogenicity of two strains of *Streptococcus uberis* infused into lactating and non-lactating bovine mammary glands. **Research in Veterinary Science**, London, v. 45, p. 400-404, 1998.

HILLERTON, J.E. Control of mastitis. In: Progress in Dairy Science, Edited by C.J.C. Phillips, CAB International, Wallingford, Oxon, UK. 1996. p 171-190.

HILLERTON, J.E. Redefining mastitis based on somatic cell count. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Brussels, Belgium. N 345, p. 4-6, 1999.

HOGAN, J.S.; GONZALEZ, R.N.; HARMON, R.J.; NICKERSON, S.C.; OLIVER, S.P.; PANKEY, J.W.; SMITH, K.L. **Laboratory Handbook on Bovine Mastitis**. Madison, WI: National Mastitis Council, 1999. p. 205-217.

HOGAN, J.S.; GONZALEZ, R.N.; HARMON, R.J.; NICKERSON, S.C.; OLIVER, S.P.; PANKEY, J.W.; SMITH, K.L. **Laboratory Handbook on Bovine Mastitis**. Verona, WI: National Mastitis Council, 2005, 222p.

HOGAN, J.S.; SMITH, K.L.; HOBLET, K.H.; SCHOENBERGER, P.S.; TODHUNTER, D.A.; HUESTON, W.D.; PRITCHARD, D.E.; BOWMAN, G.L.; HEIDER, L.E.; BROCKETT, B.L.; CONRAD, H.R. Field survey of clinical mastitis in low somatic cell count herds. **Journal of Dairy Science**, Champaign, n. 72, p. 1547-1556, 1989.

HUANG, Y.; LI, W.; FINN, P. W.; PERKINS, D. L. Ribosomal RNA Identification in Metagenomic and Metatranscriptomic Datasets. In: de BRUIJN, FL. **Handbook of Molecular Microbial Ecology I: Metagenomics and Complementary Approaches**, 2009. 784p.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B.M.; PACE, N.R. Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 180, p. 4765-4774, 1998.

HUGHES, J.B.; HELLMANN, J.J.; RICKETTS, T.H.; BOHANNAN, B.J.M. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 4399-4406, 2001.

HUNT, K.M.; FOSTER, J.A.; FORNEY, L. J.; SCHUTTE, U.M. E.; BECK, D.L.; ABDO, Z.; FOX, L.K.; WILLIAMS, J.E.; MCGUIRE, M.K.; MCGUIRE, M.A. Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. **PloS one**, San Francisco, v. 6, e21313, 2011.

HUSON, D.H.; AUCH, A.F.; QI, J.; SCHUSTER, S.C. MEGAN analysis of metagenomic data. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 17, p. 377-386, 2007.

KIRK, J.H.; BARTLETT, P.C. Bovine mycotic mastitis. **Compendium of Food Animal**, New York, v. 8, n. 11, p. 106-110, 1986.

KLINDWORTH, A.; PRUESSE, E.; SCHWEER, T.; PEPLIES, J.; QUAST, C.; HORN, M.; GLOCKNER, F.O. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 41, n. 1, p. 1-11, 2013.

KOIVULA, M.; PITKALA, A.; PYORALA, S.; MANTYSAARI, E. Distribution of bacteria and seasonal and regional effects in a new database for mastitis pathogens in Finland. **Acta Agriculturae Scandinavica**, Copenhagen, v. 57, p. 89-96, 2007.

KOSKINEN, M.T et al. Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.92, p. 952-959, 2010.

KUANG, Y.; TANI, K.; SYNNOTT, A.J. OHSHIMA, K.; HIGUCHI, H.; NAGAHATA, H.; TANJI, Y. Characterization of bacterial population of raw milk from bovine mastitis by culture-independent PCR–DGGE method. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 45, n.1, p. 76-81, 2009.

KUEHN, J. S.; GORDEN, P. J.; MUNRO, D.; RONG, R.; DONG, Q.; PLUMMER, P. J.; WANG, C.; PHILLIPS, G. J. Bacterial community profiling of milk samples as a means to understand culture-negative bovine clinical mastitis. **PloS one**, San Francisco, v. 8, n. 4, e61959, 2013.

LEGENDRE, P.; LEGENDRE, L. **Numerical ecology**. 2nd Ed. Amsterdam: Elsevier, 2012. 852p.

LEVAN, P.L.; BERHART, R.J.; ESLER, E. Effects of natural intramammary *Corynebacterium bovis* infection on milk yield and composition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 68, n. 12, p. 3329-3336, 1985.

LUND-OLESEN, T.; DUFVA, M.; DAHL, J.A.; COLLAS, P.; HANSEN, M.F. Sensitive on-chip quantitative real-time PCR performed on an adaptable and robust platform . **Biomedical Microdevices**, Dordrecht, v. 10, p 769-776, 2008.

MACHADO, P.F.; PEREIRA, A.R.; SILVA, L.F.P. Células somáticas no leite em rebanhos brasileiros. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.57, n.2, p.359-361, 2000.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M. Brock Biology of Microorganisms, 11th ed.. NJ, USA: Prentice Hall, 2005. 1088p.

MAKOVEC, J.A.; RUEGG, P.L. Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, p. 3466-3472, 2003.

MAKRANTONAKI, E.; GANCEVICIENE, R.; ZOUBOULIS, C. An update on the role of the sebaceous gland in the pathogenesis of acne. **Dermatoendocrinology**, Berlin, v. 22, n. 5, p. 360-366, 2011.

MARK, T.; TOLLERSRUD, T.; KVITLE, B.; JORGENSEN, H.J.; WAAGE, S. Comparison of *Staphylococcus aureus* genotypes recovered from cases of bovine, ovine, and caprine mastitis. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, p. 3979-3984, 2005.

MARRANZINO, G.; VILLENA, J.; SALVA, S.; ALVAREZ, S. Stimulation of macrophages by immunobiotic *lactobacillus* strains: influence beyond the intestinal tract. **Microbiology Immunology**, Amsterdam, v. 56, n. 11, p. 771-781, 2012.

MARTINS, R.P.; SILVA, J.A.G.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; FILHO, E.S.A. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá, MT. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n.1, p. 181-187, 2010.

MARTIN, S.W. Estimating disease prevalence and the interpretation of screening test results. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 2, p. 463-472, 1984.

MEIRI-BENDEK, I.; LIPKIN, E.; FRIEDMAN, A.; LEITNEN, G.; SARON, A.; FRIEDMAN, S.; KASHI, Y. A PCR-based method for the detection of *Streptococcus agalactiae* in milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, p.1717-1723, 2002.

MENA, K.D.; GERBA, C.P. Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, Amsterdam, v. 201, p. 71-115, 2009.

MILES, H.; LESSER, W.; SEARS, P. The economic implications of bioengineered mastitis control. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 75, p. 596-605, 1992.

MILLER, G.Y., BARTLETT, P.C.; LANCEJ, S.E.; ANDERSON, J.; HEIDER, L.E. Costs of clinical mastitis and mastitis prevention in dairy herds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, n. 202, p.1230-1236, 1993.

MUNSON, M. A.; BANERJEE, A.; WATSON, T. F. Wade WG. Molecular analysis of the microflora associated with dental caries. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, p. 3023-3029, 2004.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL (NMC). **Microbiological Procedures for the Diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality**. Madison – WI: NMC Inc., 4^a ed., 2004. 47p.

NEAVE, F.K.; DODD, F.H.; KINGWILL, R.G.; WESTGARTH, D.R. Control of mastitis in the dairy herd by hygiene and management. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 52, p. 696-707, 1969.

OIKONOMOU, G.; MACHADO, V.S.; SANTISTEBAN, C.; SCHUKKEN, Y.H.; BICALHO, R.C. Microbial Diversity of Bovine Mastitic Milk as Described by Pyrosequencing of Metagenomic 16s rDNA. **PloS one**, San Francisco, v. 7, n. 10, p. e47671, 2012.

OLDE RIEKERINK, R.G.; BARKEMA, H.W.; KELTON, D.F.; SCHOLL, D.T. Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.91, p.1366-1377, 2008.

OLIVER, S.P.; GILLESPIE, B.E.; JAYARAO, B.M. Detection of new and persistent *Streptococcus uberis* and *Streptococcus dysgalactiae* intramammary infections by polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 60, p. 69-73, 1998.

OLIVER, S.P.; GONZALEZ, R.N.; HOGAN, J.S.; JAYARAO, B.M.; OWENS, W.N. **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality**. Verona, WI: National Mastitis Council. 2003. 47p.

OLSZEWSKI, T.D. A unified mathematical framework for the measurement of richness and evenness within and among multiple communities. **OIKOS**, Hoboken, v. 104, p. 377-387, 2004.

PERDIGON, G.; FULLER, R.; RAYA, R. Lactic acid bacteria and their effect on the immune system. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, Wymondham, v. 2, n. 1, p. 27-42, 2001.

PERRY, A.; LAMBERT, P. *Propionibacterium acnes*: Infection beyond the skin. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, London, v. 9, n. 12, p. 1149-1156, 2011.

PETTI, C.A.; POLAGE, C.R.; SCHRECKENBERGER, P. The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, p. 6123–6125, 2005.

PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C. **Mastitis: Counter Attack**. Naperville: Babson Bros, 1991. 150p.

PHUEKTES, P.; MANSELL, P.D.; BROWNING, C.F. Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcal* causes of bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.84, n. 5, p.1140-1148. 2001.

PIEPERS, S.; MEULEMEESTER, L.D.; KRUIF, A.; OPSOMER, G.; BARKEMA, H. W.; VLIEGHER, S.D. Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 74, n.4, p. 478-483, 2007.

PIESSENS, V.; Van COILLIE, E.; VERBIST, B.; SUPRE, K.; BRAEM, G.; Van NUFFEL, A.; De VUYST, L.; HEYNDRIX, M.; De VLIEGHER, S. Distribution of coagulase-negative *Staphylococcus* species from milk and environment of dairy cows differs between herds. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, p. 2933-2944, 2011.

PITKALA, A.; HAVERI, M.; PYORALA, S.; MYLLYS, V.; HONKANEN-BUZALSKI, T. Bovine mastitis in Finland 2001: prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, n. 8, p. 2433-2441, 2004.

PITKALA, A.; GINDONIS, V.; WALLIN, H.; HONKANEN-BUZALSKI. Interlaboratory proficiency testing as a tool for improving performance in laboratories diagnosing bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, n. 2, p. 553-559, 2005.

POCIECHA, J.Z. Influence of *Corynebacterium bovis* on constituents of milk and dynamics of mastitis. **Veterinary Record**, London, v. 125, n. 25, p. 628, 1989.

POWER, E. Gangrenous mastitis in dairy herds. **Veterinary Record**, London, v. 153, p. 791-792, 2003.

PROSSER, J.I.; BOHANNAN, B.J.M.; CURTIS, T.P. et al. Essay – The role of ecological theory in microbial ecology. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 5, p. 384-392, 2007.

PULLINGER, G.D.; COFFEY, T.J.; MAIDEN, M.C.; LEIGH, J.A. Multilocus-sequence typing analysis reveals similar populations of *Streptococcus uberis* are responsible for bovine intramammary infections of short and long duration. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 119, p. 194-204, 2007.

PYLRO, V.S.; ROESCH, L.F.W.; MORAIS, D.K.; CLARK, I.M.; HIRSCH, P.R.; TOTOLA, M.R. Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 107, p. 30-37, 2014.

RADOSTITIS, O.M., LESLIE, K.E., FETROW, J. Mastitis control in dairy herds. In: RADOSTITIS, O.M., LESLIE, K.E., FETROW, J. **Herd health food animal production medicine**. Philadelphia: W.B. Saunders, p.229-276, 1994.

RAINARD, P.; RIOLLET, C. Innate immunity of the bovine mammary gland. **Veterinary Research**, Les Ulis, v. 37, p. 369-400, 2006.

REZENDE, E.L.; DINIZ-FILHO, J.A.F. Phylogenetic Analyses: Comparing Species to Infer Adaptations and Physiological Mechanisms. **Comprehensive Physiology**, Washington , v. 2, p. 639-674, 2012.

RICHARD, J.L.; McDONALD, D.V.M.; FICHTNER, R.E.; ANDERSON, A.J. Identification of yeasts from infected bovine mammary glands and their experimental infectivity in cattle. American **Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.41, n. 12, p. 1991-1994, 1980.

ROBERSON, J.R.; FOX, L.K., HANCOCK, D.D.; GAY, J.M. Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 77, n. 11, p. 3354-3364. 1994.

ROSSETTI, B.C.; FREY, J.; PILO, P. Direct detection of *Mycoplasma bovis* in milk and tissue samples by real-time PCR. **Molecular and Cellular Probes**, London, v.24, p.321-323, 2010.

SANDHOLM, M.; KAARTINEN, L.; PYORALA, S. Bovine mastitis-why does antibiotic therapy not always work? An overview. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 13, n. 3, p. 248-260, 1990.

SANGER, F.; NICKLEN, S; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 74, n.12, p.5463-5467, 1977.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. **Principais agentes causadores da mastite. Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. Barueri: Manole, 2007.cap. 3, p. 24-37.

SANTOS, R.C.; MAREIN, J.M. Isolation of *Candida* spp from mastitic bovine milk in Brazil. **Mycopathologia**, Den Haag, v.59, n. 2, p. 251-253, 2005.

SARGEANT, J.M.; LESLIE, K.E.; SHIRLEY, J.E.; PULKRABEK, B.J.; LIM, G.H. Sensitivity and specificity of somatic cell count and California Mastitis Test for identifying intramammary infection in early lactation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 9, p. 2018-2024, 2001.

SCHLOSS, P.D.; WESTCOTT, S.L.; RYABIN, J. et al. Introducing mother: Open-Source, Platform-Independent Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, p. 7537-7541, 2009.

SCHMALENBERGER, A.; SCHWIEGER, F.; TEBBE, C.C. Effect of primers hybridizing to different evolutionarily conserved regions of the small-subunit rRNA gene in PCR-based microbial community analyses and genetic profiling. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 8, p. 3557-3563, 2001.

SEARS, P.M., GONZALEZ, R.N., WILSON, D.J. et al. Procedures for mastitis diagnosis and control. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 9, p. 445-468, 1993.

SIQUEIRA, J.F.; ALVES, F.R.F.; ROÇAS, I.N. Pyrosequencing analysis of the apical root canal microbiota. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 37, p. 1499-1503, 2011.

SMITH, K.L.; HOGAN, J.S. Epidemiology of mastitis. In: INTERNATIONAL. MASTITIS SEMINAR, 3., 1995. Tel Aviv, Israel S6 **Proceedings...**, Tel Aviv, Israel S6, 1995. p. 3-12.

SMITH, K.L.; HOGAN, J.S. The world of mastitis. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MASTITIS AND MILK QUALITY, 2., Vancouver, Canada, 2001. **Proceedings...** Vancouver, Canada, 2001. p.13.

SOMMERHAUSER, J.; KLOPPERT, B.; WOLTER, W.; ZSCHOCK, M.; SOBIRAJ, A.; FAILING, K. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 96, p. 91-102, 2003.

SUN, Y.; CAI, Y.; MAI, V.; FARMERIE, W.; YU, F.; LI, J.; GOODISON, S. Advanced computational algorithms for microbial community analysis using massive 16S rRNA sequence data. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 38, n. 22, e205, 2012.

TAPONEN, S.; BJORKROTH, J.; PYORALA, S. Coagulase-negative staphylococci isolated from bovine extramammary sites and intramammary infections in a single dairy herd. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 75, p. 422-429, 2008.

TAPONEN, S.; SALMIKIVI, L.; SIMOJOKI, T.H.; KOSKINEN, M.T.; PYORALA, S. Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, p. 2610-2617, 2009.

TOMOSADA, Y.; CHIBA, E.; ZELAYA, H.; TAKAHASHI, T.; MARRANZINO, G.; TSUKIDA, K.; KITAZAWA, H.; AVAREZ, S.; VILLENA, J. Nasally administered *Lactobacillus rhamnosus* strains differentially modulate respiratory antiviral immune responses and induce protection against respiratory syncytial virus infection. **BMC Immunology**, London, v. 14, p. 40, 2013.

TOMITA, T.; MEEHAN, B.; WONGKATTIYA, N.; MALMO, J.; PULLINGER, G.; LEIGH, J.; DEIGHTON, M. Identification of *Streptococcus uberis* multilocus sequence types highly associated with mastitis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, p. 114-124, 2008.

TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAAE, F.L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, p.782-787 (1990a).

VAN DE PEER, Y.; CHAPELLE, S.; DE WACHTER, R. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.24, p. 3381-3391, 1996.

VENTER, J.C.; REMINGTON, K.; HEIDELBERG, J.F.; HALPERN, A.L.; RUSCH, D.; EISEN J.A.; WU, D.; PAULSEN, I.; NELSON, K.E.; NELSON, W.; FOUTS, D.E.; LEVY, S.; KNAP, A.H.; LOMAS, M.W.; NEALSON, K.; WHITE, O.; PETERSON, J.; HOFFMAN, J.; PARSONS, R.; BADEN-TILLSON, H.; PFANNKUCH, C.; ROGERS, Y.; SMITH, H.O. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. **Science**, Washington, v. 304, n. 5667, p. 66-74, 2004.

VERDIER-METZ, I.; GAGNE, G.; BORNES, S.; MONSALLIER, F.; VEISSEIRE, P.; DELBES-PAUS, C.; MONTEL, M.C. Cow teat skin, a potential source of diverse microbial populations for cheese production. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, p. 326-333, 2012.

VILLENA, J.; CHIBA, E.; TOMOSADA, Y.; SALVA, S.; MARRANZINO, G.; KITAZAWA, H.; ALVAREZ, S. Orally administered *Lactobacillus rhamnosus* modulates the respiratory immune response triggered by the viral pathogen-associated molecular pattern poly(I:C). **BMC Immunology**, London, v. 13, p. 53, 2012.

WANG, Q.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M.; COLE, J.R. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 5261-5267, 2007.

WATTS, J.L. Etiological agents of bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 16, p. 41-66, 1998.

WILSON, D.J.; GONZALEZ, R.N.; DAS, H.H. Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: Prevalence and effects on somatic cell count and milk production. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, n. 10, p. 2592-2598, 1997.

YANG, C.H.; CROWLEY, D.E.; BORNEMAN, J.; KEEN, N.T. Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, p. 3889-3894, 2001.

YATSUNENKO, T.; REY, F.E.; MANARY, M.J.; TREHAN, I.; DOMINGUEZ-BELLO, M.G., et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. **Nature**, London, v. 486, n. 7402, p. 222-227, 2012.

YOUSSEF, H.N.; ELSHAHED, M.S. Diversity rankings among bacterial lineages in soil. **The ISME Journal**, Oklahoma, v. 3, p. 305-313, 2009.

ZADOKS, R.; MIDDLETON, J.; MCDUGALL, S.; KATHOLM, J.; SCHUKKEN, Y. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. **Journal of Mammary Gland Biology Neoplasia**, Berlin, v. 16, p. 357-372, 2011.

ZADOKS, R.N.; GILLESPIE, B.E.; BARKEMA, H.W.; SAMPIMON, O.C.; OLIVER, S.P.; SCHUKKEN, Y.H. Clinical, epidemiological and molecular characteristics of *Streptococcus uberis* infections in dairy herds. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 130, p. 335-349, 2003.