

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Programa de Pós-Graduação em Genética

Raphael Steinberg da Silva

**CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA DA GLÂNDULA MAMÁRIA BOVINA  
SAUDÁVEL E COM MASTITE SUBCLÍNICA E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS  
POTENCIALMENTE PROBIÓTICAS ISOLADAS DESTE ECOSISTEMA**

Belo Horizonte  
2016

Raphael Steinberg da Silva

**CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA DA GLÂNDULA MAMÁRIA BOVINA  
SAUDÁVEL E COM MASTITE SUBCLÍNICA E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS  
POTENCIALMENTE PROBIÓTICAS ISOLADAS DESTE ECOSSISTEMA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Cantini Nunes  
Universidade Federal de Minas Gerais.

Co-orientadores:  
Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli  
Universidade Federal de Minas Gerais.

Profa. Dra. Elisabeth Neumann  
Universidade Federal de Minas Gerais.

Belo Horizonte  
2016

043 Silva, Raphael Steinberg da.  
Caracterização da microbiota da glândula mamária bovina saudável e com mastite subclínica e seleção de bactérias potencialmente probióticas isoladas deste ecossistema [manuscrito] / Raphael Steinberg da Silva. – 2016.

235 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Cantini Nunes. Co-orientadores: Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli, Profa. Dra. Elisabeth Neumann.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Mastite Bovina. 2. Microbiota. 3. Probióticos - Teses. 4. Genética - Teses. I. Nunes, Álvaro Cantini. II. Nicoli, Jacques Robert. III. Neumann, Elisabeth. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 575



Pós-Graduação em Genética  
Departamento de Biologia Geral, ICB  
Universidade Federal de Minas Gerais

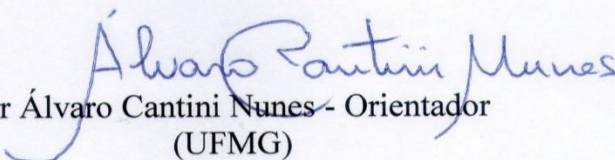
Av. Antônio Carlos, 6627 - C.P. 486 - Pampulha - 31270-901 - Belo Horizonte - MG  
e-mail: pg-gen@icb.ufmg.br FAX: (+31) - 3409-2570

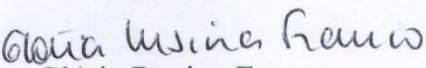


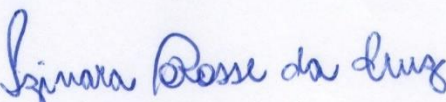
**"Caracterização da microbiota da glândula mamária bovina saudável  
e com mastite subclínica e seleção de bactérias potencialmente  
probióticas isoladas deste ecossistema"**

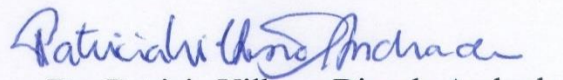
**Raphael Steinberg da Silva**

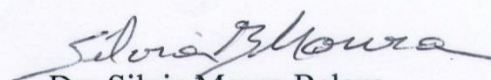
Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

  
Dr Álvaro Cantini Nunes - Orientador  
(UFMG)

  
Dra Glória Regina Franco  
(UFMG)

  
Dra Izinara Rosse da Cruz  
(UFMG)

  
Dra Patricia Vilhena Dias de Andrade  
(EMBRAPA)

  
Dra Silvia Moura Beleza  
(UFMG)

Belo Horizonte, 21 de outubro de 2016.

Aos meus pais, Antônio e Lourdes, por serem minha inspiração, fonte de virtude e de amor incondicional.

À minha avó, Maria da Conceição Resende (*in memoriam*), por sua força e exemplo.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus. Esta força pulsante que traz vida a todos os seres. Ele que proveu energia, saúde, perseverança, paciência, criatividade e força de vontade para superar cada adversidade encontrada no tortuoso caminho seguido ao longo destes quatro anos.

Aos meus pais, Antônio e Maria de Lourdes. Eles que foram a motivação inicial para o desenvolvimento desta tese, me abrindo os olhos para a gravidade que é a mastite na produção leiteira. Meus companheiros que sempre estão dispostos a me salvar dos problemas, me protegendo, amando, educando, suportando, e guiando-me pelas trilhas menos pedregosas da vida. Ao seu amor incondicional.

A André Alves Gundes, por seu companheirismo, carinho, presença, afeto e cumplicidade que tornaram estes últimos meses únicos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Álvaro Cantini Nunes e minha co-orientadora Profa. Dra. Elisabeth Neumann. Pelo apoio ao projeto proposto para este doutoramento e pela credibilidade depositada em minhas propostas. Pela amizade e pelos valorosos ensinamentos e cobranças que contribuíram, enormemente, para minha formação pessoal e acadêmica.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Jacques Nicoli. Por seu exemplo de postura ética e profissional que sempre irão influenciar a minha ideia sobre ciência. Pelas valorosas dicas sugeridas em conversas ao largo do famoso “cafezinho” do LEFM, além da contribuição com diversos recursos utilizados neste doutoramento.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Izinara Rosse da Cruz, Profa. Dra. Glória R. Franco, Profa. Dra. Sílvia B. de Moura e a Dra. Patrícia V. D. de Andrade. Pela disponibilidade de avaliar este trabalho e pelas primorosas contribuições.

Aos professores do Laboratório de Microbiologia Oral e de Anaeróbios, Prof. Dr. Luiz M. Farias, Profa. Dra. Simone Gonçalves dos Santos e Profa. Dra. Maria Auxiliadora, pela disponibilidade de utilização da infraestrutura de seu laboratório

Às Profa. Dra. Maria Raquel dos S. Carvalho e Dra. Maria Gabriela Campolina. Por terem me acolhido no mundo acadêmico e terem me influenciado na escolha de

meu objeto de estudo, os bovinos de leite, bem como pela influência acerca do pensamento científico, que sempre serão importantes em minha trajetória profissional.

À Marlene de Miranda e à Clélia. Pela amizade sempre presente e pelo conhecimento técnico que é vital para a realização do trabalho laboratorial.

Às secretárias do Programa de Pós-graduação em Genética, Mary das Graças Santos e Enaile Dias Siffert pela disponibilidade em resolver as questões burocráticas.

Aos colegas do LEFM, Felipe Bambirra, Felipe Machado, Leonardo, Khatarina Barros, Bianca Seridan, Maria Cecília, Carolina Araújo, Adriano Cloves, Anna Karolina, Caro Carito, Zulema Pérez, Rafael Bastos e Sílvia Pietra pela convivência.

Aos colegas do programa de Pós-graduação em Genética, em especial à Camila Prósperi, Paulo Eduardo, Ana Paula Martins, Vanessa Bastos, Aline Martins, Bruno Repolês, Fernanda Caroline, Guilherme Dias, Leonardo Lima, Michele Araújo, Pablo Fonseca, Moara Machado, Priscila Rodrigues, Octávio Magabeira e Gabriela Salazar pelo companheirismo durante as disciplinas e experimentos.

Aos colegas e alunos da Escola Municipal Paulo Mendes Campos, que fizeram minhas manhãs dos últimos três anos mais radiantes e imersas de aprendizado pessoal e pedagógico. Em especial, à Iliada Freitas, Conceição Souza, Maria do Carmo Olímpio, Danielle Xavier, Elisa Oliveira, Ermita Gonçalves, Janete Cordeiro, Lúcio Maia, Márcia Salles Vidal, Evanilton, Sérgio Bandeira de Melo, Vania Marcolino, Geraldo, Rute, Valdivino, Maria Isabel Warchaw, Grassy Perdigão e Teresa Cristina.

Aos meus amigos eternos. Estes que sempre estiveram presentes, me apoiando, me podando, me suportando (o que não é uma tarefa fácil) e tornando minha vida extremamente colorida. Aos “Talentosos”, Jacqueline Gomes, Fernanda Alvarenga e os “afilhados” Grazielle Teixeira e André Martinez, pela sólida amizade cultivada nos últimos 10 anos. À Tássia Costa Souza e Gabriela Silva, que mesmo longe estão sempre presentes e me alegrando. Aos amigos da EMPMC, Lorena Dionízio, Elaine Gilmará, Lettícia Carmargos, Cristina Raposo, Antônio Augusto, Dilce Laranjeiras e Maria Aparecida. À Izinara Rosse por seus conselhos, experiência, exemplo, ética e afeto sempre presentes. E também à Meriele Cruz, Vitória Cristina Benevides e ao “afilhado” Luciano Silva Barbosa.

Aos meus familiares que apoiaram esse meu projeto de vida, Ana Heliza, Wagner, Kátia, Débora, Magno, Michelle P., Vera, Isabelle, Wellington, Cláudia e em especial à Paloma Oliveira, pelo tempo que moramos juntos e pelo companheirismo e pelas “*good vibes*” sempre presentes.

Aos meus colaboradores. Ao Prof. Dr. Marcelo Resende, pelas discussões que fundamentaram este projeto. Ao Prof. Dr. Ronaldo Braga Reis e ao veterinário Adriano Bicalho, pela ajuda na etapa de amostragem. À Prof. Dra. Adriana Abalen e ao João Paulo Nunes, pela parceria nos experimentos de cultivo celular. A Jefferson Rayneres, Anderson do Carmo e Maria Luíza Suhadolnik, sem os quais as análises de microbioma não teriam sido realizadas, pela disponibilidade de embarcar nesta aventura que idealizei e nós realizamos juntos.

À Lilian Cristina Silva e Silva. Minha aluna de iniciação científica e companhia de todos os dias de trabalho, que sempre estava pronta a ajudar em todo o desenvolvimento desta tese, com um sorriso no rosto e com muita boa vontade. Ela que esteve disposta a acordar, mais de uma vez, as três da manhã para coletas e ficar no laboratório até as oito da noite, no mesmo dia. Ela que foi o braço direito e esquerdo com todos os dedos e muitas vezes a cabeça que tocou este projeto adiante quando a minha própria falhou. Pela amizade e pela paciência para com meus defeitos.

Aos proprietários e funcionários das fazendas visitadas. Em especial a Fernando García e a equipe da Faz. Cayuaba. A Jordane Silva, Toni, Ronaldo Santiago e a equipe da Faz. Calciolândia. Ao prof. Dr. Ronaldo B. Reis e Victor Malacco e a equipe da Faz. Vargem Grande, e todos aqueles que contribuíram para a coleta do material biológico.

Às agências de fomento CAPES, financiadora de minha bolsa de Doutorado e FAPEMIG e CNPq, financiadoras dos projetos de pesquisa que forneceram recursos para execução deste trabalho.

Ao povo brasileiro, grande financiador, não só deste, mas de todos os trabalhos de pesquisa público de nosso país.

Aos animais que muito contribuíram com os achados aqui relatados sem se beneficiar, ainda, com eles.

Ao Google, por responder boa parte das minhas perguntas.



*Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura para achar as que estão certas. (Carl Sagan)*

*A ciência é uma disposição de aceitar os fatos mesmo quando eles são opostos aos desejos. (Burrhus Frederic Skinner)*

## RESUMO

A mastite é a fonte dos maiores prejuízos à produção de leite em bovinos. Devido a importância estratégica da pecuária leiteira na produção de alimentos, o controle desta doença é vital. Objetivando atender às pressões, em nível internacional, para redução do uso de antimicrobianos, o desenvolvimento de métodos alternativos para o tratamento e prevenção da mastite devem ser implementados para substituir a atual terapia com antibióticos. Devido ao aumento do uso de probióticos para o controle de doenças, a bacterioterapia oferece uma possível estratégia para o controle da mastite. As bactérias do ácido láctico (BAL) são membros da microbiota do leite, e tem uma longa história de uso seguro, produzindo efeitos benéficos à saúde do hospedeiro e, por isso, são candidatas à prospecção de probióticos para a glândula mamária. Os objetivos deste trabalho foram o de caracterizar a microbiota da glândula mamária bovina em quatro raças (Gir, Guzerá, Girolando 1/2 e Holandês) além de isolar e caracterizar BAL a partir de amostras de leite cru e *swab* intramamário. A microbiota da glândula mamária de 200 vacas (131 saudáveis e 69 com mastite subclínica) apresentou composição dominada por membros dos filos Firmicutes e Proteobactéria. De maneira geral, uma baixa porcentagem de OTUs foi compartilhada entre animais de raças diferentes. Nossos dados apontam que o efeito ambiental sobre a composição desta comunidade microbiana parece ser forte. A mudança na composição da microbiota com a instalação do quadro de mastite subclínica (redução da abundância de *Acinetobacter* e *Pseudomonas* e aumento de *Staphylococcus*) indicam que esse quadro está associado a disbiose. Com exceção da raça Holandês, que parece ter quadro de mastite subclínica caracterizado pelo aumento da abundância de *Lactococcus*, a abundância relativa de BAL diminuiu em animais com CCS > 200.000 cel/mL, indicando que elas podem estar relacionadas a úberes mais saudáveis. Por isso, amostras de 115 vacas foram submetidas ao isolamento de BAL. Foram obtidos 192 isolados de BAL pertencentes a 30 espécies, dos quais 82 foram selecionados para avaliação de seu potencial probiótico. De forma geral, as BAL que habitavam a glândula mamária apresentam baixa autoagregação, hidrofobicidade da superfície celular, co-agregação com patógenos, capacidade de produção de biofilme, além de incapacidade de produção de exopolissacarídeos (EPS) e forte antagonismo contra patógenos causadores de mastite, com alta produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dois isolados de BAL, capazes de aderir e internalizar células epiteliais mamárias MDA-MB-231, apresentaram potencial efeito protetor contra mastite. O isolado WcoGIRO48L1\* (*Weissella confusa* GIR48L1\*) reduziu significativamente a adesão de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, adesão de *Escherichia coli* ATCC 25723 e produção de Tnfa. Por outro lado, o isolado LactGIRO4S8\* (*L. lactis* GIRO4S8\*) foi capaz de reduzir significativamente a adesão e invasão de *S. aureus* ATCC 29213 e a adesão de *E. coli* ATCC 25723, além de aumentar a expressão de IL8. Ambos os isolados foram capazes de reduzir a produção de IL1 $\beta$ . Nossos resultados, portanto, contribuem para a produção, no futuro, de novas ferramentas de diagnóstico e de bacterioterapia para mastite bovina.

Palavras-chave: mastite, microbiota, bactérias do ácido láctico, probióticos.

## ABSTRACT

Mastitis is the most impactful disease on milk production in cattle. Due to strategic importance of dairy livestock in food production, control of this disease is of utmost importance. To address international pressure to reduce the use of antimicrobials in animal production, development of alternative methods of treatment and prevention of mastitis should be implemented to replace the traditional antibiotic therapy. Due to increasing use of probiotic bacteria in the control of different infectious diseases, bacteriotherapy offers a possible strategy for control of mastitis. The lactic acid bacteria are members of the natural microbiota of bovine mammary gland, having a long history of safe use, and present several proven beneficial health effects on the host, and therefore are strong candidates for selection of probiotics for the mammary gland. The objectives of this study were to characterize the microbiota of mammary gland in four bovine cattle (Gir, Guzerat, Girolando 1/2 and Holstein) and isolate and characterize BAL from raw milk and intramammary swab samples sources. The microbiota of the mammary gland of 200 cows (131 healthy and 69 with subclinical mastitis) showed composition dominated by Firmicutes and Proteobacteria. In general, a low percentage of OTUs was shared between different breeds. Our data indicate that the environmental effect on the composition of the microbial community seems to be strong. The change in microbiota composition with the installation of subclinical mastitis (reduced abundance of *Acinetobacter* and *Pseudomonas* and increased of *Staphylococcus*) indicate that this disorder is associated with dysbiosis. With the exception of Holstein, that seems to have subclinical mastitis condition characterized by increased abundance of *Lactococcus*, the relative abundance of BAL decreased in CCS > 200.000 cel/mL animals. This indicates that BAL may be related to healthier udders. Therefore, samples of 115 cows were subjected to the isolation of BAL. 192 isolates were obtained from BAL belonging to 30 species, of which 82 were selected for evaluation of its potential probiotic. In general, the BAL inhabiting the mammary gland had low autoaggregation, hydrophobicity of the cell surface, co-aggregation with pathogens and biofilm production capacity. Moreover, it seems to be typical that these BAL did not exhibit the EPS production capacity and had a high percentage of antagonism against mastitis pathogens with high H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production. Two BAL strains were able to adhere and internalize in MDA-MB-231 mammary epithelial cells and had potential protective effect against mastitis. WcoGIRO48L1\* (*Weissella confusa* GIR48L1\*) significantly reduced adhesion of *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, adhesion of *Escherichia coli* ATCC 25723 and of Tnfa production. On the other hand, LactGIRO4S8\* (*L. lactis* GIRO4S8\*) was able to significantly reduce adhesion and invasion of *S. aureus* ATCC 29213 and adhesion of *E. coli* ATCC 25723, and increased IL8 expression. Both strains were able to reduce IL1 $\beta$  production. Our results contribute for production of new diagnostic and treatment tools for mastitis in the future.

Key-words: mastitis, microbiota, latic acid bacteria, probiotics.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Esquema estrutural da glândula mamária bovina.....	24
FIGURA 2 – Origem das bactérias do leite.....	29
FIGURA 3 – Processo de invasão e estabelecimento das bactérias causadoras da mastite.....	37
FIGURA 4 - Localização geográfica das fazendas amostradas.....	57
FIGURA 5 - Contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) na amostra total para avaliação da microbiota da glândula mamária.....	84
FIGURA 6 - Contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) na amostra de isolamento de bactérias do ácido láctico (BAL).....	85
FIGURA 7 - Abundância relativa em diferentes níveis taxonômicos da composição da microbiota da glândula mamária bovina.....	90
FIGURA 8 - Composição relativa de BAL da microbiota da glândula mamária bovina.....	94
FIGURA 9 - <i>Heatmaps</i> apresentando similaridades na composição da microbiota da glândula mamária bovina.....	95
FIGURA 10 - Comparativo dos índices de riqueza e diversidade da microbiota da glândula mamária bovina.....	98
FIGURA 11 - Abundância relativa em nível de gênero da composição da microbiota da glândula mamária de animais da raça Gir e Girolando 1/2.....	100
FIGURA 12 - Composição relativa de BAL da microbiota da glândula mamária bovina nas raças Gir e Girolando 1/2.....	102
FIGURA 13 - Comparativo dos índices de riqueza e diversidade da microbiota da glândula mamária bovina das raças Gir e Girolando 1/2.....	103
FIGURA 14 - Diagramas de Venn mostrando sobreposição de OTUs entre as raças e Fazendas amostradas.....	106
FIGURA 15 - Diferença na composição da microbiota da glândula mamária bovina avaliada por PCoA pelo teste de <i>Bray-Curtis</i> .....	109

FIGURA 16 - Dendogramas mostrando a similaridade na composição da microbiota da glândula mamária bovina .....	110
FIGURA 17 - Enumeração bacteriana em MRS a partir de amostras de leite cru e <i>swab</i> intramamário de acordo com raça e estado de saúde dos animais.....	112
FIGURA 18 - Perfis de <i>fingerprinting</i> rep-PCR (GTG) <sub>5</sub> de isolados de BAL obtidos a partir da resolução dos <i>amplicons</i> em eletroforese em gel de agarose 2%.....	114
FIGURA 19 - Perfil da amplificação da região ITS I entre os genes codificadores do rRNA 16S e rRNA 23S de isolados de BAL obtido a partir de eletroforese em gel de agarose 1,4%.....	115
FIGURA 20 – Perfis de restrição obtidos por PCR – ARDRA dos espaçadores ITS I para identificação dos isolados .....	117
FIGURA 21 – Diversidade dos 192 isolados de BAL obtidos de amostras de leite cru e <i>swab</i> intramamário a partir de amostras biológicas de 81 vacas das raças Guzerá, Girolando 1/2, Gir e Holandês de acordo com o tipo de amostra de origem.....	118
FIGURA 22 – Abundância relativa dos isolados de BAL obtidos de amostras de leite e <i>swab</i> intramamário de acordo com o a raça do animal e fazenda de origem.....	119
FIGURA 23 - Distribuição relativa dos isolados de acordo com o nível de autoagregação.....	123
FIGURA 24 - Distribuição relativa dos isolados de acordo com o nível de co-agregação com patógenos .....	123
FIGURA 25 - Distribuição relativa dos isolados de acordo com o nível de hidrofobicidade .....	124
FIGURA 26 – Isolados produtores e não produtores de EPS pela técnica de estriamento em ágar MRS modificado .....	124
FIGURA 27 – Correlação entre as características de superfície celular dos isolados de BAL.....	125
FIGURA 28 - Distribuição dos isolados de BAL produtores e não-produtores de EPS de acordo com a origem da amostra biológica do isolamento.....	126

FIGURA 29 - Distribuição dos isolados de BAL de acordo com o nível de produção de biofilme no ensaio com placas de poliestireno.....	128
FIGURA 30 – Correlação entre a capacidade de produção de biofilme e as características de superfície celular dos isolados de BAL .....	129
FIGURA 31 - Distribuição dos isolados de BAL de acordo com o nível de produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	135
FIGURA 32 – Adesão de BAL em células epiteliais mamárias MDA-MB-231.....	146
FIGURA 33 – Internalização de BAL em células epiteliais mamárias MDA-MB-231.....	148
FIGURA 34 - Adesão de patógenos em células MDA-MB-231 na presença de BAL expressa em log <sub>10</sub> de UFC de patógeno / mL de lisado celular.....	150
FIGURA 35 - Adesão de patógenos em células MDA-MB-231 na presença de BAL expressa em % de adesão de patógenos.....	151
FIGURA 36 – Invasão de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 em células MDA-MB-231 na presença de BAL.....	154
FIGURA 37 – Efeito dos tratamentos experimentais sobre a expressão relativa de Gapdh e de Actb em células MDA-MB-231.....	156
FIGURA 38 – Expressão relativa das citocinas IL1 $\beta$ , IL8, IL10, Tgfb1 e Tnfa em células MDA-MB-231.....	157

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Descrição das Fazendas e dos tipos de animais coletados.....	55
TABELA 2 - Descrição das características dos iniciadores utilizados para avaliação da presença de fatores de virulência relacionados à mastite em BAL.....	74
TABELA 3 – Descrição dos <i>primers</i> e condições utilizadas na RT-qPCR para avaliação da expressão gênica de mediadores da resposta imune em células MDA-MB-231 ....	81
TABELA 4 - Dados do sequenciamento das regiões V3-V4 do gene rRNA 16S em amostras de DNA de leite cru.....	86
TABELA 5 - Índices de riqueza e diversidade da microbiota da glândula mamária bovina.....	97
TABELA 6 - Dados do sequenciamento das regiões V3-V4 do gene rRNA 16S em amostras de DNA de leite cru nas raças Gir e Girolando 1/2.....	104
TABELA 7 - Índices de riqueza e diversidade da microbiota da glândula mamária bovina.....	105
TABELA 8 - Enumeração bacteriana média em ágar MRS de amostras de leite cru e <i>swab</i> intramamário .....	111
TABELA 9 – Distribuição por raça dos 314 isolados de BAL obtidos de 81 vacas a partir de amostras de leite cru e <i>swab</i> intramamário.....	113
TABELA 10 – Isolados de BAL produtores de EPS .....	126
TABELA 11 – Sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados de BAL.....	131
TABELA 12 – Antagonismo de isolados de BAL contra patógenos associados.....	137
TABELA 13 – Presença de genes codificadores de fatores de virulência em BAL....	141
TABELA 14 – Resultados da avaliação do potencial probiótico em teste <i>in vitro</i> de BAL isoladas de leite cru e <i>swab</i> intramamário.....	142
TABELA 15 – Isolados de BAL selecionados para os ensaios em modelo de co-cultivo com células epiteliais mamárias MDA-MB-231.....	145
TABELA 16 - Adesão e internalização de isolados de BAL em células epiteliais da glândula mamária MDA-MB-231.....	148
TABELA 17 - Adesão e invasão de patógenos na presença de isolados de BAL em células epiteliais da glândula mamária MDA-MB-231 .....	153

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**A** - Absorbância

**a.C.** - antes de Cristo

**Actb**- Beta-actina

**AAD** – *Antibiotic-associated diarrhoea*

**ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**APP** – Proteínas de fase aguda

**ARDRA** - Análise de Restrição do DNA Ribossômico Amplificado

**BAL** - Bactéria do ácido lático

**CBT** – Contagem bacteriana total

**CCS ou SCC** –contagem de células somáticas ou *somatic cells count*

**cDNA** - Ácido desoxirribonucleico complementar

**cel** – Células

**CNS** - *Coagulase-negative Staphylococcus*

**C<sub>q</sub>** - *Cycle quantification*

**C<sub>t</sub>** - *Cycle Threshold*

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico

**EC** – *European Communities*

**EFSA** - *European Food Safety Authority*

**ELISA** - *enzyme-linked immunosorbent assay*

**EMBRAPA** – Empresa Brasileira de Pesquisa em Agropecuária

**EPS** – Exopolissacarídeos

**EUA** – Estados Unidos da América

**FAO/WHO** - *Food and Agricultural Organization/ World Health Organization*



**FDA** - *Food and Drug Administration*

**Gapdh** - *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*

**GRAS** - Geralmente reconhecidas como seguras

**HC** - *Health Canada*

**IBGE** - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

**IL** - Interleucina

**Ig** - Imunoglobulina

**Inf** - Interferon

**ITS I** - Espaçadores do transcrito interno I

**LF** – Lactoferrina

**MAPA**- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

**MATS** – *Microbial Adhesion to Solvents*

**mim** - Minutos

**MOI** - *Multiplicity of infection*

**MPO** - Mieloperoxidase

**mRNA** - Ácido ribonucleico mensageiro

**NRE**- Nível relativo de expressão

**OMS** - Organização Mundial da Saúde

**OD ou DO** – densidade ótica

**OTU** - *Operational taxonomic units*

**qPCR** - PCR quantitativa

**QPS** - *Qualified Presumption of Safety*

**PAMP** - *Pathogen associated molecular pattern*

**pbMEC** - Células epiteliais primárias da glândula mamária bovina

**PBS** - Salina tampão fosfato

**PCR** - *Polymerase chain reaction*

**PCoA** - *Principal Coordinates Analysis*

**PIB** – Produto interno bruto

**PMN**- *Polymorphonuclear neutrophilic leukocytes*

**PRR** - *Pattern recognition receptors*

**RAPD** - *Random Amplified Polymorphic DNA*

**RNA** - Ácido ribonucleico

**ROI** - *ratio of interaction*

**rRNA** – RNA ribossômico

**RQ** - Quantificação relativa

**RT-PCR**- *Reverse transcription polymerase chain reaction*

**RT-qPCR**- *Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*

**seg** - Segundos

**Tgf** - Fator de transformação do crescimento

**TLRs** - Receptores *Toll-like*

**Tnf** - Fator de necrose tumoral

**UE**- União Europeia

**UFC** - Unidades formadoras de colônias

**USDA** - *United States Department of Agriculture*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
1.1 Pecuária leiteira e sua importância para a economia e sociedade.....	21
1.2 A glândula mamária bovina.....	23
1.3 Microbiota do leite e da glândula mamária.....	24
1.3.1 Composição e importância.....	24
1.3.2 Origem da microbiota do leite.....	27
1.4 Mastite.....	29
1.4.1 Definição.....	29
1.4.2 Diagnóstico.....	31
1.4.3 Impacto econômico e sobre a saúde animal.....	31
1.4.4 Epidemiologia .....	32
1.4.5 Etiologia.....	33
1.4.6 Processo de invasão bacteriana e estabelecimento da infecção.....	35
1.4.7 Alterações morfológicas e histológicas associadas à mastite.....	37
1.4.8 Resposta imune gerada contra mastite.....	39
1.4.9 Prevenção e tratamentos tradicionais e alternativos para mastite.....	40
1.5 As bactérias do ácido lático como probióticos.....	43
1.5.1 Definição de probióticos.....	43
1.5.2 Bactérias do ácido lático BAL.....	45
1.5.3 Efeitos benéficos da utilização de probióticos .....	46
1.5.4 Probióticos e a bacterioterapia da mastite .....	47
<b>2. PROBLEMA CIENTÍFICO E HIPÓTESES LEVANTADAS.....</b>	<b>50</b>
<b>3. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>51</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>53</b>
4.1 Objetivos gerais.....	53
4.2 Objetivos específicos .....	53
<b>5. ANIMAIS, MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>54</b>
5.1 Fazendas e seleção de animais no campo.....	54
5.2 Coletas de amostras biológicas de leite e <i>swab</i> intramamário.....	57
5.3 Contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) do leite.....	58
5.4 Análise da microbiota da glândula mamária a partir das amostras de leite cru....	59
5.4.1 Extração de DNA genômico bacteriano total.....	59
5.4.2 Amplificação das regiões hipervariáveis V3-V4 do gene codificador do rRNA 16S.....	60
5.4.3 Sequenciamento de alto rendimento das regiões hipervariáveis V3 e V4 do gene codificador do rRNA 16S.....	62
5.4.4 Análises de Bioinformática .....	62
5.5 Isolamento, identificação e caracterização de BAL da glândula mamária .....	64
5.5.1 Enumeração bacteriana em MRS e isolamento de BAL.....	64
5.5.2 Reativação .....	65
5.5.3 Identificação genética dos isolados .....	65
5.5.3.1 Extração de DNA genômico .....	65
5.5.3.2 <i>Fingerprinting</i> rep-PCR (GTG) <sub>5</sub> .....	65
5.5.3.3 PCR-ARDRA .....	66

5.5.4 Ensaio de autoagregação dos isolados de BAL.....	67
5.5.5 Ensaio de co-agregação dos isolados de BAL com agentes etiológicos da mastite .....	68
5.5.6 Ensaio de avaliação da hidrofobicidade da superfície celular dos isolados de BAL .....	69
5.5.7 Ensaio para determinação da produção de Exopolissacarídeos (EPS) pelos isolados de BAL.....	69
5.5.8 Ensaio de avaliação da produção de biofilme pelos isolados de BAL.....	70
5.5.9 Ensaio de sensibilidade a antimicrobianos dos isolados de BAL .....	70
5.5.10 Ensaio de produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> pelos isolados de BAL.....	71
5.5.11 Ensaio de avaliação da atividade antagonista dos isolados de BAL contra patógenos da mastite.....	71
5.5.12 Ensaio para identificação da presença de genes codificadores de fatores de virulência para mastite em isolados de BAL .....	73
5.6 Avaliação da capacidade de adesão, internalização, inibição da adesão e inibição da invasão de patógenos associados à etiologia da mastite e imunomodulação de isolados de BAL em modelo de co-cultivo com células MDA-MB-231 .....	73
5.6.1 Cultura de células epiteliais da glândula mamária MDA-MB-231.....	74
5.6.2 Preparação das bactérias (BAL e patógenos) para ensaios em células MDA-MB-231.....	75
5.6.3 Ensaio de avaliação da capacidade de adesão de BAL em células MDA-MB-231.....	75
5.6.4 Ensaio de avaliação da capacidade de internalização de BAL em células MDA-MB-231.....	76
5.6.5 Ensaio de avaliação da capacidade de BAL em inibir a adesão de patógenos em células MDA-MB-231.....	76
5.6.6 Ensaio de avaliação da capacidade de BAL em inibir a invasão de patógenos em células MDA-MB-231.....	77
5.6.7 Ensaio de avaliação da capacidade de imunomodulação de BAL em células MDA-MB-231.....	78
5.7 Análises estatísticas.....	81
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>83</b>
6.1 Caracterização da amostragem (animais e fazendas).....	83
6.2 Microbiota da glândula mamária bovina .....	86
6.2.1 Enumeração de bactérias que crescem em MRS.....	111
6.3 Isolamento e identificação de BAL do leite e <i>swab</i> intramamário.....	113
6.4 Caracterizações probiótica <i>in vitro</i> .....	122
6.6 Adesão e internalização de isolados de BAL em células epiteliais da glândula mamária MDA-MB-231.....	144
6.7 Inibição da adesão e invasão de patógenos associados à mastite em células MDA-MB-231 por isolados de BAL.....	149
6.8 Imunomodulação de isolados de BAL em células MDA-MB-231.....	155
<b>7. DISCUSSÃO.....</b>	<b>158</b>
<b>8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>206</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>208</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Pecuária leiteira e sua importância para a economia e sociedade

A pecuária ocupa aproximadamente 30% da superfície terrestre que é livre de gelo. O atual objetivo da produção pecuária é a entrega de alimentos seguros para o consumo humano, levando-se em conta o bem-estar animal e o respeito ao meio ambiente (GAGGIÀ et al., 2010). Além disso, a pecuária está organizada em cadeias produtivas que empregam, aproximadamente, 1,3 bilhão de pessoas. Este setor fornece meios de subsistência para 600 milhões de pequenos agricultores nos países em desenvolvimento (THORNTON, 2010).

O leite é um fluido biológico complexo espécie-específico cuja função principal é satisfazer as necessidades nutricionais da prole. Este fluido apresenta um rico conteúdo nutricional, pois contém proteínas, lipídeos, carboidratos, vitaminas, sais minerais e aminoácidos essenciais, todos eles imersos em uma solução de pH quase neutro (QUIGLEY et al., 2013). Em humanos o consumo de leite e seus derivados é a melhor forma de garantir o aporte diário de cálcio durante a vida adulta (NESTLÉ, 2012). Somada a sua função nutricional, a ingestão de leite promove a ativação do sistema imune dos filhotes em amamentação (MORROW & RANGEL, 2004). O efeito protetor do leite está associado à ação combinada de uma variedade de fatores, tais como imunoglobulinas, células imunocompetentes, ácidos graxos, peptídeos antimicrobianos, poliaminas, oligossacarídeos, lisozima, lactoferrina e outras glicoproteínas nele presentes (ISAACS; NEWBURG, 2005). Diante destes fatos, não é um exagero afirmar que a lactação é uma notável adaptação, desde o surgimento dos primeiros mamíferos, garantindo a esses animais sucesso na ocupação de diferentes nichos ecológicos (CONTRERAS & RODRÍGUEZ, 2011).

Os registros mais antigos da criação de animais com finalidade de produzir leite para a alimentação humana datam do ano 5.000 a.C., na região do Oriente Médio. Desde meados dos anos 90 o consumo mundial de leite tem apresentado um crescimento entre 10 a 15 toneladas por ano. O volume mundial de leite produzido, no ano de 2014, foi estimado em 730 milhões de toneladas

(STOCK & ZOCCAL, 2015). A União Europeia e os Estados Unidos representam os maiores mercados consumidores de leite, entretanto desde os anos 80, a demanda por produtos derivados do leite vem crescendo consideravelmente nos países emergentes, com destaque para a China, Índia e os “tigres asiáticos”. Essa demanda está relacionada à popularização dos programas governamentais de consumo de leite nas escolas de educação básica e também à expansão do mercado de produtos lácteos em todo mundo (BOGNI et al., 2011). Além do mais, mudanças na estrutura da pirâmide populacional e nos hábitos de consumo, bem como melhora no poder aquisitivo e nas condições de bem-estar têm, em conjunto, aumentado o consumo *per capita* de lácteos nos países subdesenvolvidos (STOCK & ZOCCAL, 2015). Diante deste cenário, um aumento de 25% na demanda mundial pelo consumo de leite é esperado até 2020 (FAO, 2011).

O rebanho mundial bovino foi estimado em 1,46 bilhão de cabeças em 2013 (USDA, 2014). O Brasil, em 2014, possuía o segundo maior rebanho bovino do mundo com 212,3 milhões de cabeças e era o quinto maior produtor de leite, produzindo 35,2 bilhões de litros. Nesse contexto, a região Sul contribuiu com a maior parte da produção nacional de leite (34,7%), entretanto Minas Gerais configura como o maior produtor, entre os estados, com 26,6% da produção brasileira. O preço médio nacional do litro do leite foi de R\$ 0,96 contabilizando, em 2014, com aproximadamente R\$ 33,78 bilhões para o PIB (IGBE, 2014). Outro dado relevante foi o consumo *per capita* brasileiro que, no ano de 2009, totalizou 152 litros de leite por habitante (IBGE, 2010).

Além da importância econômica, a pecuária leiteira também tem uma forte relevância social no Brasil. Entre os agricultores familiares, a pecuária de leite é uma das principais atividades desenvolvidas, estando presente em 36% dos estabelecimentos classificados como apresentando economia familiar. O país conta com 4,8 milhões de estabelecimentos rurais dos quais, 85% podem ser considerados de produção familiar e geram cerca de 14 milhões de empregos no meio rural (ZOCCAL et al., 2012).

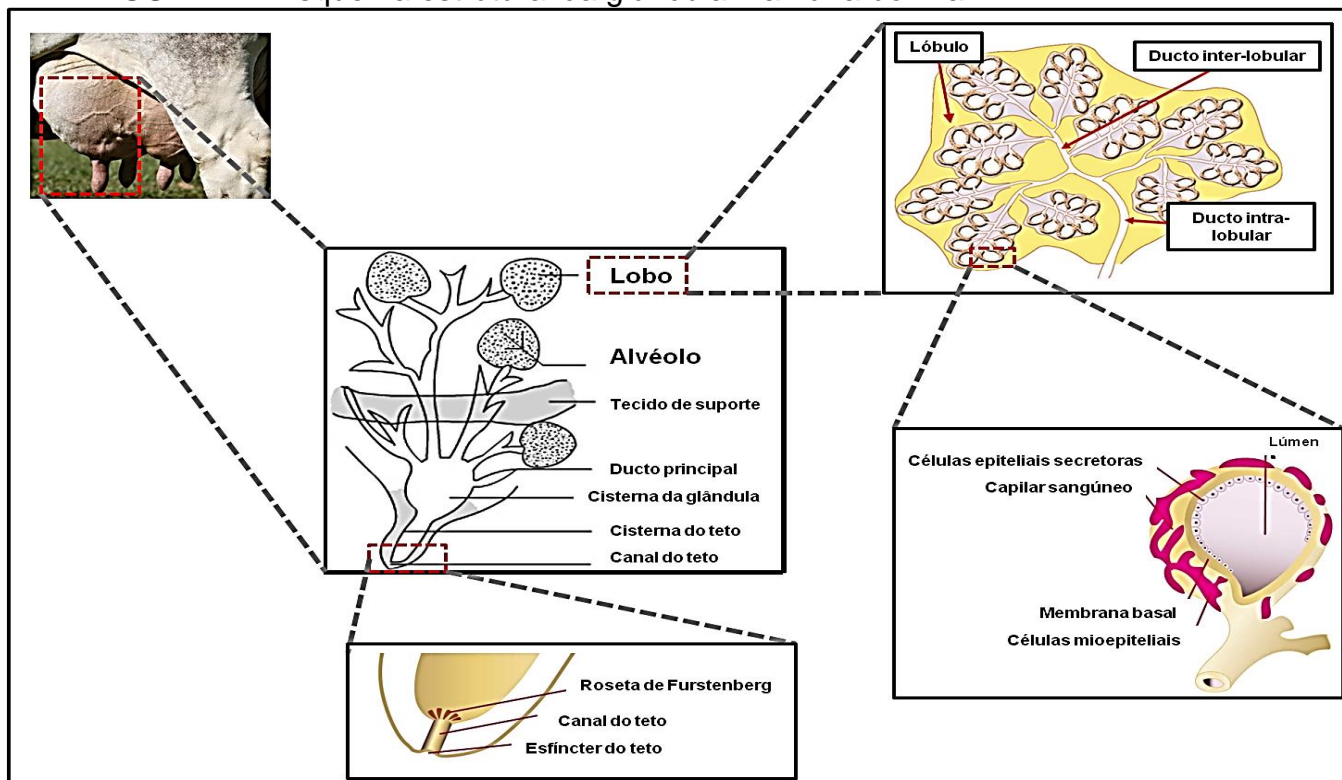
## 1.2 A glândula mamária bovina

A glândula mamária é definida como parte do sistema reprodutor e para mamíferos a lactação é considerada a etapa final do processo reprodutivo. Histologicamente, a glândula mamária é dividida em parênquima e estroma. O parênquima corresponde à porção secretora de leite, constituído por alvéolos, os quais são bolsas formadas por uma única camada de células epiteliais secretoras. Essas estruturas secretoras drenam o leite para ductos pequenos que vão gradualmente se unindo a ductos maiores até se abrirem em bolsas coletoras de leite, as cisternas. Os alvéolos, ductos e as cisternas são recobertos por células contráteis de natureza mioepitelial que promovem a ejeção de leite. Os alvéolos se organizam em unidades chamadas lóbulos, e estes por sua vez em lobos, todos eles delimitados por septos de tecido conjuntivo. O estroma é formado por tecido conjuntivo, depósitos de gordura, vasos sanguíneos e nervos (BANKS, 1992).

Em vacas um rápido crescimento e ramificação dos ductos acontece antes da puberdade, entretanto a maior parte do desenvolvimento da glândula mamária ocorre durante a gestação, período no qual existe uma diferenciação cito-histológica e bioquímica do epitélio mamário, necessária para o início da lactação (CAPUCO et al., 2002). Com o fim da lactação, ocorre um intenso *turnover* e remodelamento de todos os tecidos da glândula, aumentando a proporção de estroma em relação ao parênquima, que era a porção predominante durante a lactação (CAPUCO & AKERS, 1999).

O úbere da vaca, de posição inguinal, é formado pela associação das 4 glândulas mamárias que são unidades produtoras de leite independentes também chamadas de quartos mamários. Cada glândula possui uma única abertura no final de cada teto. Internamente, cada quarto é formado pelas unidades de secreção (alvéolos), ductos e cisternas dos lóbulos os quais drenam o leite para a cisterna de cada quarto. A cisterna de cada quarto comunica-se diretamente com o canal do teto, por meio do qual o leite é conduzido para o meio externo através do óstio papilar onde o esfíncter do teto fica localizado. As estruturas internas e externas da glândula mamária bovina estão esquematizadas na FIGURA 1.

FIGURA 1 - Esquema estrutural da glândula mamária bovina



**Fonte:** Criado pelo autor adaptado de < <http://www.agrobit.com/images/udder2.gif>> e < [http://4.bp.blogspot.com/\\_wYWvKixjVak/TDohui1E6I/AAAAAAAAA8/wwYgbvj9ZQQ/s1600/glan.jpg](http://4.bp.blogspot.com/_wYWvKixjVak/TDohui1E6I/AAAAAAAAA8/wwYgbvj9ZQQ/s1600/glan.jpg)>.

**Legenda:** A glândula mamária bovina apresenta o parênquima formado basicamente por alvéolos, que são as unidades secretoras do leite, organizados em lóbulos e, estes últimos em estruturas maiores chamadas lobos. O leite produzido nos lobos é conduzido por canais até ser armazenado na cisterna da glândula que, se comunica com o meio externo através do canal do teto, por onde o leite é ejetado. O estroma da glândula reveste o espaço entre os lobos, o qual é basicamente formado por tecido conjuntivo, sendo responsável pela sustentação e nutrição da glândula mamária. Os alvéolos são sacos achatados, formados por uma camada de células epiteliais secretoras de leite, envolvidas por capilares e células mioepiteliais.

### 1.3 Microbiota do leite e da glândula mamária

#### 1.3.1 Composição e importância

A glândula mamária é um exemplo de nicho que contém uma diversa e complexa população microbiana composta por diferentes grupos taxonômicos de micro-organismos (QUIGLEY et al., 2011). Fisiologicamente, a concentração de bactérias no leite humano fresco é menor que  $10^3$  unidades formadoras de colônia (UFC) por mL. O leite cru fresco de uma vaca saudável, normalmente, contém uma carga microbiana similar à encontrada em leite humano, porém a população microbiana do leite bovino pode aumentar em até 100 vezes, ou mais, se o ele for estocado à temperatura ambiente (RICHTER et al., 1992).



Tradicionalmente, métodos baseados em cultivo de micro-organismos têm sido empregados na identificação e enumeração de membros comensais e patogênicos presentes na microbiota do leite. Em humanos, a tradicional análise da microbiota do leite de mulheres saudáveis revelou que este fluido biológico apresenta estafilococos e estreptococos e, em menor extensão, bactérias do ácido láctico (BAL) (PEREZ et al., 2007; MARTÍN et al., 2010). Em bovinos, espécies de *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Micrococcus* estão entre as espécies bacterianas mais isoladas a partir de leite fresco (KIM et al., 2000; CHYE et al., 2004; QUIGLEY et al., 2013).

O leite representa uma das principais fontes de bactérias para o intestino da prole. Em humanos, por exemplo, um bebê que consome diariamente 800 mL de leite, deve ingerir entre  $10^5$  a  $10^7$  bactérias por dia (HEIKKILÄ & SARIS, 2003). Portanto, o leite materno é uma importante fonte de *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* e *Bifidobacterium* para a colonização do intestino da prole (FERNÁNDEZ et al., 2012). Essas bactérias desempenham importantes papéis na formação da microbiota intestinal da prole e nas funções exercidas por essa comunidade na promoção da saúde dos lactentes (DIAZ-ROPERO et al., 2006; OLIVARES et al., 2007).

Metodologias independentes de cultivo são baseadas na exploração de regiões variáveis do genoma. Enquanto as abordagens baseadas em metagenômica exploram o sequenciamento de genomas inteiros de microorganismos presentes em uma amostra ambiental de DNA genômico, a metodologia de microbioma se baseia no sequenciamento de um marcador taxonômico específico do genoma, como o gene codificador do RNA ribossômico (rRNA) 16S. Atualmente, a disponibilização de plataformas de sequenciamento de nova geração, rápidas e automatizadas, aliadas às tradicionais metodologias moleculares ganham status de “padrão ouro” na caracterização de microbiotas associadas à diferentes nichos localizados em plantas e animais, inclusive no homem (LIU et al., 2007).

Em mulheres saudáveis, análises independentes de cultivo mostram que os gêneros mais abundantes no leite são *Streptococcus*, *Staphylococcus*,

*Serratia* e *Corynebacterium*. Esses gêneros são dominantes nesta comunidade (50% de sua composição) e formam um núcleo que parece ser compartilhado por diferentes mulheres. A comparação entre diferentes indivíduos demonstra que existe um perfil personalizado na composição dos membros menos prevalentes da microbiota da glândula mamária humana que apresenta constituição estável ao longo do tempo (HUNT et al., 2011). Outros estudos identificaram espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* como membros menos prevalentes na microbiota do leite humano (2-3% da composição) (COLLADO et al., 2009; MARTÍN et al., 2009). Em bovinos, poucos estudos de avaliação da microbiota do leite por meio de metodologias independente de cultivo foram realizados, mas estudos preliminares reportaram que a composição microbiana do leite destes animais é dominada por membros pertencentes aos gêneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Leuconostoc*, *Brevibacterium* e *Acinetobacter* (QUIGLEY et al., 2013).

Um estudo de metagenômica analisou a composição microbiológica de leite de animais com mastite subclínica (BHATT et al., 2012). Nesse trabalho foi descrito que entre as bactérias (90% dos membros da microbiota do leite) as famílias mais prevalentes foram *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Bacillaceae*, *Streptococcaceae* e *Enterococcaceae*. Porém, as espécies mais prevalentes no leite com mastite subclínica de animais *Bos indicus*, como *Escherichia coli*, eram diferentes das comumente encontradas em animais cruzados (*B. taurus* X *B. indicus*) dominados por *Staphylococcus aureus*. A discriminação microbiológica desses dois grupos pode ser atribuída às diferenças genéticas entre as raças as quais refletiriam em suscetibilidade variada à colonização por diferentes bactérias. Entretanto, esse estudo não explorou as diferenças na composição entre a microbiota de vacas saudáveis e acometidas com mastite subclínica existentes entre as diferentes raças avaliadas, nem apresentou a composição genética dos animais cruzados, ambos pontos que foram explorados neste trabalho.

### 1.3.2 Origem da microbiota do leite

A origem das bactérias presentes no leite é controversa (MARTÍN et al., 2007a). Tradicionalmente acreditava-se que o leite continha micro-organismos que eram apenas resultado da contaminação com bactérias da pele da fêmea ou da cavidade oral da prole (RAMSEY et al., 2004). Entretanto, vem sendo observado que, ao contrário dessa crença, o interior da glândula mamária alberga uma microbiota complexa e própria.

Em humanos, parece ser evidente que estreptococos são transferidos da boca dos lactentes para a mama e, a partir daí, passam a fazer parte da microbiota do leite materno (MARTÍN et al., 2004). Foi demonstrada ausência de efeito do tipo de parto (a termo ou cesariana) sobre a composição microbiana do leite materno (FERNÁNDEZ et al., 2012), sinalizando pouco efeito da microbiota vaginal sobre a composição da microbiota da glândula mamária. Alguns filotipos são compartilhados entre a microbiota da pele da mãe e do leite humano, tais como *Staphylococcus*, *Corynebacterium* e *Propionibacterium* (GRICE et al., 2009). Portanto, a microbiota da pele provavelmente tem importante contribuição para a composição da microbiota do leite. Entretanto, existem diferenças entre as duas comunidades. Um exemplo é a ausência de bifidobactérias na pele da mãe as quais são presentes no leite materno (GUEIMONDE et al., 2007). Além disso, a secreção que é expressa na glândula mamária durante as últimas semanas antes do parto (isto é, que não sofreu qualquer contato com o lactente) contém uma constituição bacteriana muito similar àquela encontrada no leite após o parto (MARTÍN et al., 2004). Logo, a comunidade microbiana do leite não é apenas resultado da contaminação com bactérias da pele da mãe ou da boca do lactente (HUNT et al., 2011; FERNÁNDEZ et al., 2012). Diante disso, começou a ser postulado que as bifidobactérias do leite e outros anaeróbios, que estão presentes na microbiota intestinal da mãe, poderiam alcançar a glândula mamária por uma possível rota endógena (MARTÍN et al., 2004).

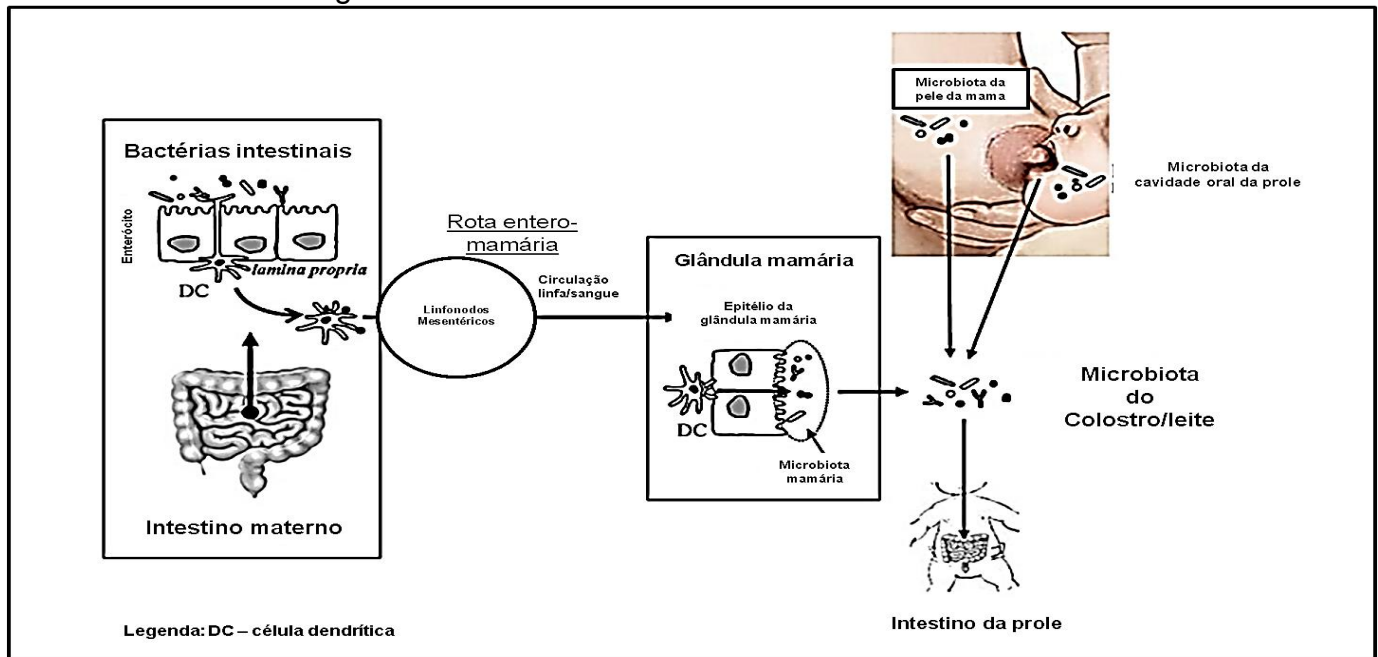
Uma possível rota endógena para a passagem de bactérias da microbiota intestinal para a glândula mamária envolveria participação de células fagocíticas do sistema imune inato (macrófagos e células dendríticas), que são capazes de absorver bactérias no intestino, transportá-las pelo sangue ou linfa, e liberá-las

no tecido mamário. Algumas dessas bactérias intestinais sobrevivem nos fagossomos desses monócitos e são liberadas na glândula mamária durante a recirculação dos fagócitos pelo corpo (MACPHERSON & UHR, 2004). Essa rota, chamada de entero-mamária, tem sido confirmada por diferentes grupos de pesquisa (FERNÁNDEZ et al., 2012). Por exemplo, um experimento com camundongas prenhas que receberam oralmente *Enterococcus faecium* marcados radioativamente mostrou baixos níveis de transferência da linhagem para o intestino fetal dos lactentes e altos níveis para a glândula mamária (XAUS et al., 2003). Durante a lactação, a colonização da glândula mamária por células do sistema imune é um processo regulado por hormônios lactogênicos (BERTOTTO et al., 1991). O aumento do suplemento de sangue e linfa para a glândula mamária junto com a liberação de ocitocina a qual, causa contração das células mioepiteliais que revestem os alvéolos da glândula mamária, parecem facilitar a transferência de bactérias do intestino para o leite (BEISCHER et al., 1997). Essas mudanças fisiológicas produzem condições para a formação de um biofilme no sistema de ductos da glândula mamária. Portanto, parece não existir um isolamento entre as microbiotas que povoam o corpo dos animais, mas sim uma rede de comunicação entre elas que resulta em diferentes membros que são compartilhados entre essas comunidades. As principais origens das bactérias do leite estão resumidas na FIGURA 2.

A microbiota do leite de vaca taurinas saudáveis apresenta alta abundância de membros dos gêneros *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Pseudomonas*. Em menor proporção, esses animais apresentam no leite *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Pseudoalteromonas* e *Staphylococcus* (QUIGLEY et al., 2013). Esses micro-organismos têm diferentes fontes tais como o ar, solo, pasto, volumoso, pele do úbere, glândula mamária, equipamento de ordenha e fezes dos animais (COOREVITS et al., 2008). Até agora, as pesquisas sobre essa microbiota têm se concentrado nos micro-organismos responsáveis pela deterioração do leite (FRICKER et al., 2011). Porém, muitos dos micro-organismos presentes no leite têm importante função no subsequente processamento de produtos lácteos, já que estas bactérias estão muitas vezes associadas à produção de textura, sabor

e propriedades organolépticas importantes para queijos, iogurtes e leites fermentados (QUIGLEY et al., 2013).

FIGURA 2 – Origem das bactérias do leite



Fonte: adaptado de FERNÁNDEZ et al., 2012.

Legenda: Estudos atuais, de metagenômica comparativa, apontam que outros membros não existentes na pele da mãe e na boca do lactente estão presentes em grandes quantidades no leite. Bactérias anaeróbias encontradas no leite teriam chegado na glândula mamária a partir do intestino, sendo transportadas dentro de células fagocíticas, como macrófagos e células dendríticas.

## 1.4 Mastite

### 1.4.1 Definição

A mastite (*mast*: mama; *ite*: inflamação) ou mamite é definida como uma inflamação da glândula mamária, incluindo os tecidos intramamários, mas também das estruturas anatômicas associadas à glândula, tais como mamilos, aoréolas, tetos e ductos de condução de leite, como resultado da invasão da glândula por um determinado agente infeccioso, usualmente bactérias (FAO, 1989; CONTRERAS & RODRÍGUEZ, 2011). A mastite, atualmente, é a principal doença infecciosa que afeta rebanhos leiteiros de alta produção, alterando a quantidade e qualidade do leite produzido (NOTEBAERT & MEYER, 2006).

A ocorrência de mastite depende da interação do hospedeiro com agentes microbiológicos e fatores ambientais. A gravidade da inflamação depende da natureza do patógeno, bem como da idade, raça, estado da saúde imunológica e lactação do animal (BOGNI et al., 2011). A principal diferenciação dos tipos de mastite está relacionada à manifestação clínica. A mastite clínica é caracterizada pela persistência do processo infeccioso, com presença de grandes quantidades de células somáticas no leite e concomitante agravamento do dano tecidual intramamário. São sintomas da mastite clínica a hiperemia, vermelhidão, inchaço, dor e aumento do tamanho e densidade do úbere. Esses sintomas podem ser acompanhados de sinais sistêmicos, tais como febre e depressão. A produção de leite com coágulos é a mudança mais evidente nas características organolépticas do leite associada à mastite clínica (KEMPER & GERJETS, 2009; CONTRERAS & RODRÍGUEZ, 2011).

A mastite subclínica não possui nenhum sinal clínico e, portanto, permanece despercebida na maior parte do tempo. Como resultado da mastite subclínica observa-se uma redução da produção em relação ao verdadeiro potencial do animal. Essa condição é caracterizada principalmente pelo aumento na contagem de células somáticas no leite (CCS). Em bovinos, a contagem de células somáticas acima de 200.000 células/ mL de leite define o diagnóstico de mastite subclínica na ausência de quaisquer sinais clínicos (NMC, 2001). Portanto, no mercado de leite, o aumento de CCS é inversamente proporcional ao preço do produto (BLOWEY & EDMONDSON, 1995), visto ser esta medida um indicador importante da saúde e bem-estar animal e, por consequência, da qualidade do leite produzido.

Estudos da avaliação comparativa de microbiota apontam que a mastite é uma doença polimicrobiana, na qual as populações bacterianas predominantes podem ser consideradas clinicamente como bactérias oportunistas. Outros estudos em humanos apontam que, amostras de leite obtidas de mulheres saudáveis, com mastite ou obesas, apresentam comunidades bacterianas diferentes. Logo, a microbiota da glândula mamária também pode ser influenciada pelo estado de saúde do hospedeiro (FERNÁNDEZ et al., 2012).

#### 1.4.2 Diagnóstico

O diagnóstico da mastite no campo é baseado na avaliação visual da saúde do úbere e por mudanças nas propriedades organolépticas do leite. Para este fim é usada como rotina, nas fazendas, a avaliação da presença de coágulos nos primeiros jatos de leite de cada animal antes da ordenha, procedimento conhecido como “teste da caneca”. Além disso, são ferramentas utilizadas no diagnóstico de mastite: contagem de células somáticas (CCS), teste Califórnia de mastite (CMT), cultura microbiológica de amostras de leite, atividade de N-acetil-beta-D-glucosaminidase, pH, conteúdo de lactose, condutividade elétrica, avaliação de fluxo de leite e quantificação de proteínas de fase aguda (PYORALA, 2003).

Avanços no conhecimento da proteômica da mastite bovina têm permitido à identificação de biomarcadores que poderão ser usados na confecção de novos testes diagnósticos para esta doença. Dessa forma biomarcadores tais como proteínas associadas a neutrófilos, proteínas reconhecidas de peptidoglicano, prostaglandina sintase D, entre outros poderiam ser facilmente detectados e quantificados por métodos de rotina, como ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) (VIGUIER et al., 2009)

#### 1.4.3 Impacto econômico e sobre a saúde animal

A inflamação dos tecidos mamários altera a composição e reduz a secreção de leite, fatos que, do ponto de vista evolutivo, pioram o crescimento e desenvolvimento da prole. Na pecuária leiteira, a mastite é a doença mais comum e com o maior impacto econômico sobre a produção de leite além de causar sérios prejuízos para o bem-estar animal (CONTRERAS & RODRÍGUEZ, 2011). Neste setor, a mastite permanece como a doença que causa as maiores perdas econômicas. Os custos relacionados à mastite, na Europa, variam de €112 a €1006 por caso de mastite clínica (HEIKKILÄ et al., 2012). Nos EUA, por exemplo, em média 200 dólares/vaca/ano são gastos em casos de mastite clínica, o que contribui para uma perda anual de aproximadamente 2 bilhões de dólares para a economia norte-americana (BOGNI et al., 2011). Os principais

componentes dos custos advindos de casos de mastite clínica são: redução da produção do animal em relação ao seu verdadeiro potencial, medicamentos e cuidados veterinários, reposição e descarte prematuro de animais com quadro crônico de mastite, descarte do leite anormal e com resíduos de antibióticos e trabalho suplementar derivado dos cuidados demandados durante o tratamento (NAHMS, 2007; HEIKKILÄ et al., 2012). Entretanto, o mais importante prejuízo causado pela mastite subclínica é a redução da produção de leite em animais com infecção subclínica, o que contribui aproximadamente com 2/3 das perdas totais causadas por essa doença. Um quarto infectado tem uma redução de 10-12% no volume total de produção de uma vaca (AKERS & NICKERSON, 2011). Assim a mastite subclínica produz um prejuízo total anual em todo o mundo estimado em aproximadamente 35 bilhões de dólares (ANNAPOORANI et al., 2007).

#### 1.4.4 Epidemiologia

Em humanos, a mastite é uma condição comum, atingindo entre 5-33% das mães, se desenvolvendo com mais frequência nos estágios iniciais da lactação (VOGEL et al., 1999; SCOTT et al., 2008).

A prevalência da mastite em gado leiteiro é alta. Em bovinos de leite, a incidência de mastite varia em todo o mundo de acordo com a raça, condições ambientais e de manejo. Em países desenvolvidos a incidência de mastite clínica varia de 7-30%, enquanto que em países subdesenvolvidos e tropicais essas taxas de prevalência ultrapassam 40%. No Brasil, dados epidemiológicos são escassos, entretanto estima-se uma prevalência de mastite clínica em torno de 47% (COSTA et al., 1998). O balanço energético negativo gera uma condição de supressão imunológica, a qual aumenta consideravelmente o risco de desenvolvimento de mastite. Portanto, a mastite clínica apresenta pico de incidência no início da lactação e também no período entre lactações (SORDILLO, 2005).



#### 1.4.5 Etiologia

Mais de 135 diferentes micro-organismos (bactérias, vírus, algas ou fungos) têm sido isolados a partir de casos de mastite bovina, mas a maioria das infecções é causada por estafilococos, estreptococos e bactérias Gram-negativas (WATTS, 1988). Globalmente, *Staphylococcus* (*S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativos - CNS do inglês *Coagulase-negative Staphylococcus*) são os agentes mais comumente associados aos casos de mastite em bovinos, bem como em outros mamíferos. Além destas bactérias, a mastite é também relacionada à invasão da glândula por *Streptococcus* spp. e *Escherichia coli* que, em algumas espécies, apresentam prevalência tão alta quanto à mastite de origem estafilocócica. Menos comumente, outras bactérias Gram-positivas (*Actinomyces* spp., *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp., *Mycobacterium* spp., *Enterococcus* spp. e *Clostridium* spp.), Gram-negativas (*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Pasteurella* spp. e *Manheimia haemolytica*) e *Mycoplasma* spp. podem estar envolvidas na etiologia da mastite, enquanto casos devido à infecção por vírus, algas, fungos filamentosos e leveduras são raros (CONTRERAS & RODRÍGUEZ, 2011).

Os agentes causadores da mastite podem ser classificados de acordo com seu reservatório e modo de transmissão em agentes contagiosos e agentes ambientais. Os agentes contagiosos apresentam como reservatório a própria glândula mamária e, por consequência, essas bactérias são transmitidas de vaca para vaca ou entre os quartos do mesmo animal, principalmente durante o processo de ordenha, pelo contato com leite infectado. Nesta classe estão incluídos *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Mycoplasma* spp. Em contraste, patógenos ambientais apresentam como reservatórios componentes do habitat do animal tais como a cama, pasto e outros objetos inanimados. Nesta classe estão incluídos outros estreptococos não agalactiae (*S. uberis* e *S. dysgalactiae*), *Enterococcus* spp., estafilococos coagulase negativos e bactérias coliformes, tais como *E. coli* e *Klebsiella* spp. (BOGNI et al., 2011).

Entre os agentes contagiosos causadores de mastite, *S. aureus* se destaca pela alta prevalência já que ele é responsável por grande parte das

infecções em ruminantes (NOTEBAERT & MEYER, 2006). A infecção por *S. aureus* geralmente começa com um quadro subclínico que evolui para mastite clínica aguda que, em muitos casos, pode se tornar crônica e persistir por toda a vida do animal (PEREYRA et al., 2014). O sucesso limitado da antibioticoterapia contra infecções intramamárias causadas por *S. aureus* está relacionado com a capacidade deste patógeno de evadir da resposta imune do hospedeiro ao invadir, multiplicar e sobreviver dentro de diferentes tipos celulares da glândula mamária, tais como as células epiteliais secretoras de leite, muitas vezes sem causar sintomas clínicos (ALMEIDA et al., 1996; HÉBERT et al., 2000). Além disso, *S. aureus* é o agente etiológico da mastite gangrenosa que apresenta elevada taxa de mortalidade em bovinos. Em vacas leiteiras é reportada uma prevalência de mastite causada por *S. aureus* entre 5-18% (HONEYMAN et al., 2002).

*S. agalactiae* é um patógeno obrigatório da glândula mamária bovina, onde causa mastite contagiosa (KEEFE, 1997). As boas práticas de higiene na ordenha e o uso adequado de infusões intramamárias de antibióticos no fim do período de lactação reduziram drasticamente os casos de mastite causados por *S. agalactiae* na América do Norte e na Europa (CONTRERAS & RODRÍGUEZ, 2011).

O segundo grupo de bactérias causadoras de infecções intramamárias são os patógenos ambientais. Essas bactérias causam principalmente casos de mastite clínica em bovinos. *E. coli* é a mais bem conhecida bactéria Gram-negativa causadora de mastite (NOTEBAERT & MEYER, 2006). Esta bactéria coliforme é reconhecida por ser um patógeno oportunista, causando infecções agudas de curta duração cujo resultado é a rápida depuração bacteriana ou a morte do hospedeiro. *E. coli* é ubíqua no ambiente rural pois é massivamente excretada nas fezes. Além disso, tem sido descrito que esta bactéria pode ser a causa mais comum de mastite fatal em gado de leite, principalmente associada às fazendas que usam sistemas intensivos de produção (MENZIES et al., 1995; BOGNI et al., 2011). *Streptococcus uberis* e *S. dysgalactiae* são importantes patógenos ambientais, particularmente, pois são ubíquos no ambiente de fazendas de leite (BOGNI et al., 2011) mesmo que, alguns autores reportem transmissão contagiosa de isolados de *S. dysgalactiae* (MCDUGALL, 2002).

*Staphylococcus*-CNS, durante a última década, têm sido considerados patógenos emergentes de mastite bovina (BOGNI et al., 2011). Entre as espécies mais comuns associadas à mastite se encontram: *Staphylococcus epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. simulans*, *S. warneri*, *S. xylosum*, *S. sciuri* e *S. chromogenes* (TORMO et al., 2005).

Agentes não bacterianos também estão envolvidos em casos de mastite, incluindo, algas (*Prototheca* spp.) e outros organismos, tais como leveduras e fungos filamentosos que são pouco relacionados ao desenvolvimento desta patologia. Alguns vírus, entretanto, estão diretamente associados ao desenvolvimento tanto de mastite clínica como subclínica e incluem herpes vírus bovino 1, herpes vírus 4 e parainfluenza 3 (CONTRERAS & RODRÍGUEZ, 2011).

#### 1.4.6 Processo de invasão bacteriana e estabelecimento da infecção

O estabelecimento de infecções intramamárias depende da entrada do agente patogênico na glândula, mas também da adesão dele às células epiteliais secretoras, bem como da subsequente colonização, evasão das defesas do hospedeiro, multiplicação e disseminação desse agente nas condições presentes no úbere (NOTEBAERT & MEYER, 2006; PEREYRA et al., 2014).

O revestimento epitelial do canal do teto consiste na primeira linha de defesa da glândula mamária contra a invasão por agentes infecciosos. A queratina presente neste canal fornece uma barreira física e química contra a penetração bacteriana (CAPUCO et al., 1992). Bactérias podem, entretanto, escapar dessa barreira natural e multiplicar-se ao longo desta mucosa (ARKES & NICKERSON, 2011). Deste modo, as infecções intramamárias são resultado da passagem de bactérias através do ducto do teto para o quarto mamário com subsequente multiplicação dentro dos canais das cisternas da glândula e concomitante avanço dos patógenos em direção aos tecidos produtores de leite.

Durante a ordenha, as superfícies inferiores da pele do teto são expostas às bactérias contagiosas oriundas de uma vaca previamente ordenhada que, podem permanecer nos copos da teteira e serem injetadas dentro do quarto pelos procedimentos mecânicos da ordenha. Depois da ordenha, o esfíncter do

teto permanece dilatado por, aproximadamente, duas horas, sendo esse um dos períodos mais críticos para invasão da glândula mamária por patógenos. Também, entre ordenhas, micro-organismos podem passar através do canal do teto e se multiplicar dentro do lúmen ductal, sendo tal processo facilitado pelo movimento físico resultante da pressão exercida sobre o final do teto quando a vaca se movimenta (ARKES & NICKERSON, 2011).

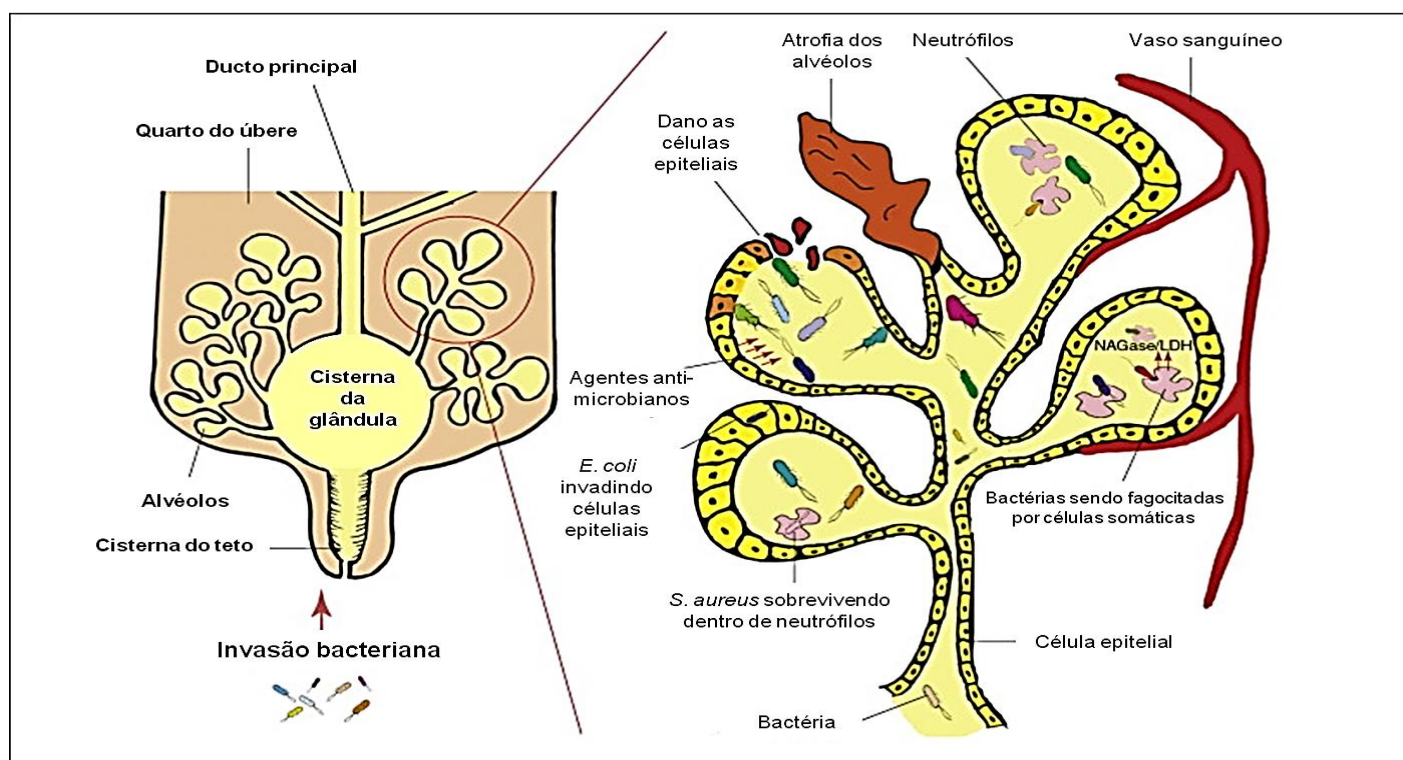
Uma vez que os micro-organismos rompem a passagem através do canal do teto e dos espaços das cisternas, a aderência das bactérias aos tecidos que revestem o interior da glândula mamária afeta diretamente sua capacidade de permanecer dentro da glândula, especialmente durante a lactação. Durante o período de lactação, o fluxo de fluido dentro do úbere é intenso e constante, portanto a aderência, internalização e sobrevivência intracelular das bactérias patogênicas são, em conjunto, importantes para o sucesso da infecção (TAMILSELVAM et al., 2006). Conseqüentemente, a habilidade de alguns micro-organismos de persistirem no tecido mamário, formando um biofilme, é uma possível causa de infecções crônicas e persistentes (VASEDUVAN et al., 2003). A invasão de células epiteliais secretoras fornece à bactéria patogênica uma vantagem de sobrevivência, permitindo com que ela evada dos mecanismos imunológicos do hospedeiro, bem como da ação de antimicrobianos. A capacidade de invasão de células epiteliais já foi descrita para alguns patógenos, como *S. aureus* (LAMMERS et al., 1999; PEREYRA et al., 2014).

Por fim, a interação das bactérias patogênicas com leucócitos presentes no úbere afeta diretamente o estabelecimento da infecção. No leite produzido em um úbere saudável, macrófagos são o tipo de leucócitos mais abundante e servem como sentinelas não específicas para a detecção de patógenos invasores. Depois da detecção do patógeno, macrófagos liberam compostos quimio-atrativos que recrutam leucócitos neutrofílicos polimorfonucleares (PMN-*polymorphonuclear neutrophilic leukocytes*). Um resumo do processo de invasão bacteriana e estabelecimento da infecção está apresentado na FIGURA 3.

### 1.4.7 Alterações morfológicas e histológicas associadas à mastite

As alterações na morfologia tecidual causadas pela mastite na glândula mamária bovina podem ser observadas através do desafio desta estrutura com baixas quantidades de patógeno (500-5000 UFC) que produzem drásticas mudanças histológicas (HEALD, 1979). Estas alterações envolvem a formação de edema, danos às células epiteliais mamárias e intensa infiltração de PMN nos tecidos mamários.

FIGURA 3 – Processo de invasão e estabelecimento das bactérias causadoras da mastite



**Fonte:** Adaptado de VIGUIER et al., 2009.

**Legenda:** O processo de invasão da glândula mamária começa com penetração de bactérias do ambiente ou da própria glândula que, ficam nos resíduos de leite de vacas previamente ordenhadas presentes na maquinaria de ordenha. As bactérias ao vencerem as barreiras físicas e químicas presentes na mucosa do canal do teto, ganham acesso ao sistema de cisternas e ductos da glândula, aonde se multiplicam. Depois disso, os patógenos têm acesso ao tecido epitelial secretor, alvo de invasão bacteriana. Com a chegada das bactérias invasoras e a destruição do epitélio secretor pela infecção, mudanças morfológicas e histológicas acontecem em detrimento do processo de resposta imunológica à invasão. Nesse sentido, ocorre intenso recrutamento de leucócitos neutrofílicos polimorfonucleares e destruição tecidual que, em conjunto, contribuem para redução da função e produção da glândula mamária.

Depois da penetração da bactéria no quarto, as células epiteliais se destacam da membrana basal e o estroma da glândula se espessa devido à

multiplicação de fibroblastos. Essa descamação de células secretoras aumenta ainda mais a migração de neutrófilos do estroma da glândula para dentro do lúmen dos alvéolos (ARKES & NICKERSON, 2011). Ao mesmo tempo, a regeneração celular leva ao aumento da produção de células indiferenciadas no epitélio secretor. Portanto, a mastite tem impacto negativo sobre a quantidade de leite por alterar a proporção entre células secretoras completamente diferenciadas em relação às células indiferenciadas não-secretoras de leite (AKERS et al., 2006). Essa observação sugere que a mastite pode ser especialmente prejudicial e com efeitos negativos irreversíveis quando ocorre no período pré-parto, no qual a proliferação celular nos alvéolos e a diferenciação de células secretoras são intensas (ARKES & NICKERSON, 2011).

Em infecções agudas, ductos médios e pequenos tornam-se obstruídos com fibrina, leucócitos, restos celulares e bactérias. Como resultado do bloqueio dos ductos, as bactérias multiplicam e se espalham rapidamente produzindo focos microscópicos de infecção que geram involução da glândula mamária e necrose. Embora a perda na produção de leite devido à mastite seja usualmente associada ao dano e destruição das células epiteliais alveolares, os efeitos da mastite criam bloqueios nos ductos mamários e comprometem a ejeção natural de leite, o que também contribui para a redução da produção. Portanto, o bloqueio da passagem natural do leite pelo sistema de ductos leva à formação de coágulos que, ao serem ejetados, permitem o diagnóstico da mastite clínica pelo tradicional “teste da caneca” (ARKES & NICKERSON, 2011).

O dano sofrido pelas células epiteliais durante o processo infeccioso é causado pela: liberação de uma série de produtos celulares pelas bactérias (toxinas); enzimas lisossômicas e produtos oxidativos liberados por células do hospedeiro para atacar bactérias durante o processo de fagocitose; proteases do sangue e citocinas pro-inflamatórias (ARKES & NICKERSON, 2011). Além disso, o dano tecidual pode ser causado pela degeneração de neutrófilos. Após a lise dessas células, enzimas hidrolíticas localizadas em seus grânulos podem causar lise das células secretoras circunvizinhas. A migração de leucócitos (PMN), através do epitélio que reveste os alvéolos, é proposta como a principal causa de dano mecânico e químico ao epitélio secretor de leite.

#### 1.4.8 Resposta imune gerada contra mastite

O imediato reconhecimento dos patógenos pelas células do hospedeiro tem um papel crítico na orquestração da resposta imune contra a bactéria invasora, o que representa um determinante chave no resultado do processo infeccioso (BANNERMAN, 2009). Esse reconhecimento na glândula mamária é feito por macrófagos residentes e células epiteliais (PAAPE et al., 2002). De maneira geral, receptores de reconhecimento de padrão (PRR - *pattern recognition receptors*) localizados nas células “sentinelas” do hospedeiro se ligam às moléculas de padrão associados aos patógenos (PAMP- *pathogen associated molecular pattern*) presentes na superfície das bactérias patogênicas (TAKEDA & AKIRA, 2005). Os receptores do tipo *toll* (*Toll like receptors* – TLR) fazem parte do repertório de PRR presente nas células de reconhecimento de patógenos, sendo TLR2 e TLR4 os mais importantes para a ativação de respostas imunes contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, respectivamente (PEREYRA et al., 2014). Após a detecção do patógeno invasor, macrófagos e células epiteliais liberam substâncias quimio-atrativas. Essas substâncias acionam a migração de PMN, do sangue para a glândula mamária, aumentando sua proporção do nível basal de 5-25% para aproximadamente 90% das células somáticas presentes no leite (LEITNER et al., 2000).

Os fatores quimio-atrativos de PMN liberados pela glândula mamária infectada incluem: *Regakine-1*, componente C5 do complemento e citocinas tais como: IL1 $\beta$ , IL2 e IL8 (PAAPE et al., 2002). Por exemplo, células epiteliais infectadas por patógenos secretam IL8 (CXCL8), citocina que está envolvida com o recrutamento e ativação de PMN e de linfócitos T para a glândula mamária, considerada como uma das moléculas mais importantes para a ativação da resposta imune inata contra patógenos causadores de mastite (TAKAHASHI et al., 2005).

A resposta imune inata desempenha papel fundamental na depuração de patógenos invasores da glândula mamária, principalmente contra *S. aureus* sendo a fagocitose realizada por PMN o mais efetivo mecanismo de defesa. A especificidade desse tipo de resposta é dada pelo reconhecimento de patógenos por PMN, mediado por componentes do complemento (C3b e C3bi) e imunoglobulinas (IgG<sub>2</sub> e IgM) que, em conjunto, funcionam como opsoninas. A ativação do sistema do complemento desempenha um importante papel na

defesa da glândula mamária aumentando o recrutamento de leucócitos e a atividade bactericida de neutrófilos (RAINARD & RIOLLET, 2006). Além da atuação de PMN, a defesa da glândula mamária é também executada pela produção de moléculas efetoras, tais como citocinas pró-inflamatórias e proteínas de fase aguda (APP). Aumentos das concentrações das citocinas IL1 $\beta$ , IL8, IL12, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , em células do leite, têm sido observados em resposta às infecções intramamárias. Outras citocinas que tem sua expressão aumentada em tecidos mamários infectados são IL17, IL22 e IL9 (RINALDI et al., 2010).

O reconhecimento das bactérias também gera a produção de espécies reativas de oxigênio (radicais hidroxila, peróxido de hidrogênio e superóxido) que possuem atividade bactericida potente, por uma explosão (*burst*) respiratória dos PMN. Este mecanismo é uma das principais vias de controle de infecções intramamárias causadas por bactérias Gram-negativas (PAAPE et al., 2002).

#### 1.4.9 Prevenção e tratamentos tradicionais e alternativos para mastite

A prevenção da mastite está baseada, de acordo com o *National Mastitis Council* (BRAMLEY et al., 2003) em um programa intitulado “*Five point plan*” que se fundamenta nas seguintes estratégias: melhora dos padrões de higiene na rotina de ordenha; utilização preventiva de infusão intramamária de antibióticos no período entre lactações; tratamento adequado dos casos de mastite clínica; descarte e substituição de animais com mastite crônica e plano de vacinação, este último com pouco sucesso até o momento. O principal obstáculo para a produção de uma vacina efetiva contra a mastite é o grande número de micro-organismos relacionados com a etiologia desta doença e o incompleto conhecimento da imunidade da glândula mamária, bem como dos fatores de virulência dos principais patógenos (BOGNI et al., 2011). A maior parte das vacinas desenvolvidas não previne a mastite e têm apenas um ligeiro efeito sobre a gravidade e duração dos sintomas da infecção por *S. aureus* sendo, por isso, consideradas de baixa eficácia. Essa baixa eficácia pode estar relacionada com a pequena eficiência de respostas humorais em eliminar *S. aureus*, pois a



imunidade humoral é ineficiente no combate de bactérias intracelulares (NOTEBAERT & MEYER, 2006) quando comparada à imunidade inata.

O tratamento de infecções intramamárias é historicamente iniciado com o uso de antibióticos, os quais têm sido usados com sucesso no tratamento de diversas doenças bacterianas ao longo dos últimos 70 anos. A maior ameaça para o sucesso da aplicação de antibióticos tem sido desenvolvimento de resistência, particularmente em bactérias patogênicas (QUIGLEY et al., 2013). O uso destes antimicrobianos durante a lactação é comum, já que entre 2% a 55% das vacas apresentam algum evento de mastite durante este período (KELTON et al., 1998). Penicilinas e cefalosporinas são frequentemente usadas por atuarem como inibidores da síntese da parede celular. Ocasionalmente são usados agentes bacteriostáticos, tais como, lincosamidas e macrolídeos. É descrito que esses agentes, quando aplicados pela via intramamária, levam a uma significativa redução da carga bacteriana e subsequente redução do infiltrado neutrofílico. No entanto, este não é o caso de infecções causadas por estafilococos intracelulares, que não são susceptíveis à ação destas drogas uma vez que dentro da célula do hospedeiro as bactérias estão em um estado metabolicamente dormente (BROUILLETTE et al., 2004).

Notavelmente, bactérias associadas à mastite, incluindo isolados de *S. aureus*, tem apresentado resistência aos antibióticos como penicilina, oxitetraciclinas, estreptomicina e gentamicinas (THAKER et al., 2013). Um problema inerente à antibioticoterapia para tratamento da mastite é o aparecimento de resíduos de antibióticos no leite (DANTON, 2006). Atualmente, existe uma grande preocupação sobre o efeito residual de antibióticos, em produtos de origem animal, sobre a saúde humana principalmente no tocante à seleção de bactérias multi-resistentes (MENTEM, 2001). Portanto, pressões em nível internacional levaram ao banimento do uso de antibióticos como promotores de crescimento em animais de produção na União Europeia desde 2006 (EC 2001; EC 2003). Ademais, a imposição de salvaguardas, propostas pela Organização Mundial de Saúde (WHO - *World Health Organization*) e pela *Food and Agriculture Organization* (FAO) no 34º *Codex Alimentarius Commission* 2009 e pela *European Union Council Regulation* 37/2010/EC (QUIGLEY et al., 2013) impuseram medidas destinadas a reduzir a resistência

aos antimicrobianos, implementando o monitoramento das fazendas e propondo limites de concentração residual de antibióticos que serão toleradas para o uso comercial do leite (KLOSTERMANN et al., 2008). Diante deste novo cenário, existe uma emergente necessidade pela busca de alternativas viáveis para aumentar os mecanismos de defesas naturais de animais levando à redução do uso dos antibióticos na pecuária (VERSTEGEN & WILLIAMS, 2002).

Tratamentos alternativos aos antibióticos para mastite vêm sendo pesquisados e incluem: hidroterapia, infusões intramamárias de glicose, nisina, hidrolisados de caseína, terapia de choque térmico e ultrassom, aplicação de oxitocina, administração de anti-histamínicos, esteroides, anti-inflamatórios não esteroidais e preparações homeopáticas (KLOSTERMANN et al., 2008). Todas essas com eficiência variada. Uma das novas abordagens que vem sendo estudada é o uso de lisostafina (BRAMLEY & FOSTER, 1990). Esta enzima hidrolisa especificamente o peptidoglicano encontrado na parede celular de *Staphylococcus* spp. Infusões intramamárias de lisostafina reduzem o número de bactérias recuperadas de glândulas infectadas e, por isso seu uso tem se mostrado promissor no tratamento de mastite estafilocócica. A lactoferrina (LF) é outra alternativa. Esta proteína tem capacidade de se ligar ao ferro, que é fator de crescimento para algumas bactérias patogênicas e também atua como imuno-regulador das defesas do hospedeiro (LEVAY & VILJOEN, 1995).

Várias patologias dos tratos gastrointestinal e urogenital (HUNT et al., 2011) são caracterizadas por uma perturbação da composição da microbiota normal destes nichos. Essa perturbação, chamada de disbiose, vem sendo cada vez mais prevenida e tratada pela administração de membros comensais das respectivas microbiotas. Estudos da microbiota da glândula mamária vêm relatando que a mastite é uma doença polimicrobiana relacionada com perturbações da comunidade microbiana do quarto mamário. Até hoje, os antibióticos são a forma de tratamento mais usada em casos de mastite, porém eles não protegem diretamente a glândula do dano tecidual causado pelo processo infeccioso, além de apresentarem eficácia reduzida. Esse dano tecidual pode causar perdas irreversíveis na produção de leite como uma das principais consequências negativas da mastite (ZHAO & LACASSE, 2008). Essa prevenção de dano tecidual pode ser feita pelo uso de probióticos, os quais estão

se tornando formas emergentes de prevenção ou tratamento de diferentes patologias em humanos e animais de produção.

## **1.5 As bactérias do ácido láctico como probióticos**

### 1.5.1 Definição de probióticos

O uso de bactérias “amigáveis” na alimentação humana apresenta uma longa história. Os primeiros relatos dos efeitos benéficos das bactérias na alimentação datam da versão Persa do Velho Testamento (Gênesis 18:8), que descreve que “Abraão atribuiu sua longevidade ao consumo de coalhada”. Plínio, um filósofo romano, recomendou o uso de leite fermentado para o tratamento de doenças intestinais, já em 76 a.C. (TEITELBAUM & WALKER, 2002). Em 1906, Henry Tissier, recomendou a administração de bifidobactérias para modular a microbiota de crianças com diarreia, afirmando que estas bactérias poderiam competir com bactérias indesejáveis, eliminando-as e tornando-se dominantes no intestino (SHORTT, 1999; NICOLI & VIEIRA, 2000).

A palavra probiótico deriva-se do grego e significa “a favor da vida”. O termo probiótico foi originalmente usado para descrever suplementos alimentares microbianos que estimulavam o crescimento de animais domésticos em fazendas (GALDEANO et al., 2007). Lilly e Stillwell (1965) foram os primeiros a usar o termo probiótico, para descrever substâncias produzidas por um ou mais micro-organismos que estimulavam o crescimento de outros seres vivos. Há mais de 30 anos atrás, a produção de substâncias que inibiam o crescimento de patógenos na superfície de meios sólidos e a habilidade de reduzir a aderência de patógenos em ensaios *in vitro* definiam os micro-organismos chamados de probióticos (CHAN et al., 1985). Fuller (1989) define probióticos de forma mais abrangente como “suplemento alimentar com micro-organismos vivos que, afetam benéficamente o hospedeiro através do melhoramento do balanço da microbiota intestinal”. A FAO/WHO, em nível internacional, define probióticos como “micro-organismos vivos que, quando são administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002) sendo esta, a definição atualmente mais aceita.

Não existe ainda um único padrão para avaliação da segurança de bactérias probióticas para uso em humanos e animais. EUA, Canadá e a União Europeia têm apresentado significativos progressos na legislação da avaliação de segurança de bactérias probióticas (FAO/WHO, 2002; EFSA 2005; HC, 2006). *European Food Safety Authority* (EFSA) publicou uma lista de micro-organismos que possuem histórico de segurança, utilizando o conceito de *Qualified Presumption of Safety* (QPS), similar ao proposto pela abordagem do status GRAS (EFSA, 2007). De maneira geral, a maior parte das BAL também possui o status QPS entretanto, devido ao risco de transmissão genética de resistência aos antibióticos, espécies de *Enterococcus* spp. foram excluídas desta lista de micro-organismos seguros para utilização em animais.

Para a identificação de uma nova linhagem benéfica que possa ser usada como probiótico existem diferentes critérios e ensaios laboratoriais recomendados por organizações internacionais (FAO/WHO, 2002; International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics – ISAPP, 2009). São características esperadas para a seleção de um novo probiótico seguro: não ser tóxico nem patogênico; ter identificação taxonômica acurada; ser um habitante indígena da espécie alvo e do respectivo nicho de atuação; apresentar alta taxa de sobrevivência após administração, colonizar e apresentar atividade metabólica no sítio alvo de ação (o que implica possuir adesão ao epitélio da mucosa e competir com a microbiota residente no nicho de atuação); apresentar produção de substâncias antimicrobianas; produzir antagonismos contra bactérias patogênicas, induzir algum nível de modulação das respostas imunes, apresentar estabilidade genética, ter habilidade de manter estáveis suas características desejáveis durante o processo de estocagem e entrega aos animais, apresentar viabilidade em altas populações no produto comercial e apresentar propriedades tecnológicas que permitam o seu aproveitamento industrial (GAGGIÀ et al., 2010).

A maior parte das bactérias utilizadas como probióticos são Gram-positivas pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* e *Lactococcus* além, de algumas linhagens de leveduras (*Saccharomyces boulardii* e *S. cerevisiae*) (NAIDU et al., 1999). Entretanto, bactérias Gram-negativas, tais como as linhagens *E. coli* EMO e *E. coli* Nissle 1917, são consideradas probióticas (NISSLE, 1959; SCHULTZ et al., 2004).

Portanto, os micro-organismos mais reconhecidos como sendo probióticos são as BAL.

### 1.5.2 Bactérias do ácido láctico (BAL)

As bactérias do ácido láctico (BAL) têm a capacidade de converter carboidratos em ácido láctico por fermentação. Quando amostras de leite de animais domésticos são deixadas em repouso sua acidificação aumenta devido à presença de BAL (OHRIS & JOSHI, 1961). Essa acidificação do leite, relacionada ao ácido láctico, foi primeiramente descoberta em leite azedo em 1780 pelo químico sueco Carl Wilhelm Cheele, o qual inicialmente considerou o ácido láctico como um componente natural do leite. Essa teoria foi corrigida, em 1857, por Louis Pasteur que, definiu o ácido láctico como um produto final da fermentação bacteriana (WEE et al., 2006).

As BAL são um grupo não-monofilético de bactérias Gram-positivas, não formadoras de esporos, com morfologia de cocos, diplococos, cocobacilar e de bastonetes e produtoras de ácido láctico como principal produto final da fermentação de carboidratos (SHARMA et al., 2013). Este grupo de bactérias inclui mais de 20 gêneros (SIEZEN et al., 2002). Os principais gêneros representantes das BAL são: *Lactobacillus*; *Leuconostoc*; *Pediococcus*; *Lactococcus*; *Streptococcus*; *Carnobacterium*; *Enterococcus*; *Oenococcus*; *Tetragenococcus*; *Vagococcus* e *Weissella*.

Embora essas bactérias sejam fastidiosas elas podem ser isoladas de várias fontes (SINGH & PRAKASH, 2009). Em geral, as BAL ocorrem em habitats que apresentam muitos nutrientes disponíveis. Elas são isoladas a partir de material vegetal ou frutos em decomposição, em produtos lácteos, carne ou peixe fermentados, beterraba, batata, purê, chucrute, legumes em conserva, silagem, bebidas, sucos, esgoto e em diferentes nichos de animais endotérmicos (trato urogenital, gastrointestinal, respiratório e glândula mamária). As BAL são desejáveis na fermentação de muitos alimentos sendo, por isso, responsáveis pela fabricação de pães de massa acidificada, todos os leites fermentados e a maioria dos vegetais fermentados (SHARMA et al., 2013).

As BAL estão entre os membros residentes da microbiota do leite cru de bovinos e de outros animais domésticos (AZIZ et al., 2009). Historicamente,

leites fermentados têm sido produzidos para prolongar o tempo de prateleira do leite (OUADGHIRI et al., 2008). Os representantes das BAL contribuem para redução do pH, sabor e outras características organolépticas associadas à produção de produtos lácteos (LILLY & STILLWELL, 1965) e, por isso são responsáveis pela maioria das transformações físico-químicas e aromáticas próprias desses produtos (OGIER et al., 2002). Diante do exposto, não é errado afirmar que as BAL têm desempenhado um longo e importante papel na tecnologia alimentar e tem uma extensa história de uso seguro pelo homem na produção e preservação de alimentos (ABDULLAH & OSMAN, 2010). Por isso, a maior parte dos seus representantes possui o status GRAS “*Generally Recognized As Safe*” de acordo com a *Food and Drug Administration*.

### 1.5.3 Efeitos benéficos da utilização dos probióticos

Vários são os benefícios conferidos à saúde do hospedeiro pela administração de probióticos, dentre os quais podem-se citar: prevenção de doenças infecciosas intestinais (SILVA et al., 1999); melhora dos sintomas de diarreia associada à imunodeficiência, em pacientes portadores do vírus HIV (NEUTRA et al., 1996); redução do colesterol sérico (FUKUSHIMA & NAKANO, 1996); atividade anticarcinogênica (DE MORENO DE LEBLANC et al., 2006); estabilização e reforço da barreira da mucosa intestinal (SALMINEN et al., 1996); propriedades imunes adjuvantes (DI GIACINTO et al., 2005); prevenção de doenças inflamatórias intestinais (IBDs) (SARTOR, 2004); melhora na digestão da lactose em indivíduos intolerantes (KOPP-HOOLIHAN, 2001); entre outros.

Mais de 100 micro-organismos já são listados como estabilizadores da microbiota intestinal no *Register of Feed Additives of the European Union*. Esse fato ilustra um interesse geral na prospecção de novos probióticos a serem usados na nutrição animal. Tal interesse foi impulsionado pela proibição do uso de antibióticos como promotores de crescimento na nutrição animal em toda a Europa. Probióticos usados na alimentação de porcos apresentaram efeitos positivos sobre a melhora na taxa de ganho de peso e na prevenção de diarreia pós-desmame de origem viral (rotavírus) ou bacteriana (*E. coli*), além de reduzir a mortalidade e morbidade geral, bem como melhorar parâmetros da qualidade de carcaça (DUCATELLE et al., 2015). Em frangos, o uso de probióticos foi

relacionado com aumentos no desempenho de crescimento e na quantidade e qualidade de ovos produzidos. Em bovinos, o uso de probióticos adicionados na alimentação de bezerros mostra ter impacto significativo na redução da incidência, mortalidade e contagens de coliformes fecais em vitelos, aparentemente apresentando efeitos benéficos na profilaxia e tratamento da diarreia neonatal nesses animais (GAGGÌA et al., 2010).

É amplamente conhecido o efeito antagonista de bactérias probióticas contra patógenos (bactérias, vírus e protozoários). Algumas linhagens probióticas são capazes de inibir o crescimento de bactérias patogênicas como, por exemplo, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas* e *Helicobacter* (SERVIN, 2004). O potencial de prevenção de infecção, de crescimento de tumores e de outras patologias inclui os efeitos em locais distantes da mucosa intestinal, tais como os tratos respiratório (PERDIGÓN et al., 1999) e urogenital (VINTIÑI et al., 2004) e a glândula mamária (DE MORENO DE LEBLANC et al., 2006). Esses fatos demonstram que os efeitos dos probióticos são sistêmicos e podem impactar locais distantes do sítio de atuação desses micro-organismos.

Os meios de ação propostos para explicar os efeitos benéficos dos probióticos podem ser divididos em três linhas básicas de ação: atividade antimicrobiana, reforço da função da barreira de mucosa e imunomodulação (PARVEZ et al., 2006; NG et al., 2009). Os mecanismos principais envolvidos nessas linhas de ação são: adesão às células epiteliais, colonização, formação de biofilme, produção de biosurfactantes, autoagregação ou co-agregação com patógenos, produção de metabólitos antagonistas (ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas), competição por nutrientes, produção de enzimas e/ou alteração da atividade das células imunes do hospedeiro (FROLA et al., 2012).

#### 1.5.4 Probióticos e a bacterioterapia da mastite

A bacterioterapia é a prática que faz uso de bactérias benéficas para prevenir ou tratar a colonização do hospedeiro por patógenos (STRAUSS, 2000; HUOVINEN, 2001). Essa prática vem sendo estudada como uma nova abordagem para a prevenção de infecções em animais, especialmente aquelas

que atingem o trato gastrointestinal e urogenital (OTERO& NADER-MACÍAS, 2007; WALSH et al., 2008). Além disso, já foi mostrado que BAL isoladas de leite humano têm potencial de prevenir infecções da mama causadas por *S. aureus* (HEIKKILÄ & SARIS, 2003). Ademais, a possível existência da rota enteromamária tem justificado a avaliação da administração oral de probióticos na tentativa de prevenir ou de melhorar os sintomas associados à mastite.

*Lactobacillus fermentum* CECT5716 e *L. salivarius* CECT5713 parecem ser uma alternativa à antibioticoterapia da mastite em humanos. O tratamento probiótico oral de mulheres acometidas com mastite levou a uma melhora significativa (menores contagens bacterianas no leite além de melhoria dos sinais clínicos) em relação ao grupo controle tratado somente com antibióticos. Além disso, o grupo que recebeu probióticos apresentou menor índice de recorrência de mastite (ARROYO et al., 2010). O tratamento com *L. salivarius* CECT5713 e *L. gasseri* CECT5714, em mulheres com mastite, levou à redução nas contagens de estafilococos em relação àquelas encontradas antes do tratamento. Também, foram observadas menores contagens de estafilococos no grupo tratado em comparação ao controle não-tratado. Em adição, houve melhora nos sinais clínicos devido à combinação de efeitos anti-inflamatórias e anti-infecciosos das linhagens administradas (JIMÉNEZ et al., 2008).

*Lactococcus lactis* DPC3147, um isolado de grãos de kefir, produz uma bacteriocina que inibi o crescimento de um amplo espectro de patógenos de mastite (RYAN et al., 1998). *L. lactis* DPC3147 também atua como um imunomodulador no ecossistema mamário, levando a um aumento do influxo de PMN para a glândula como fruto da indução de expressão local de IL8 e IL1 $\beta$  (BEECHER et al., 2009). O tratamento diário durante 10 dias com infusão intramamária de vacas com *L. lactis* DPC3147 foi tão eficaz quanto o tradicional tratamento de infusão de antibióticos para mastite bovina. Esse isolado é capaz de desencadear respostas imunes no tecido mamário levando à acumulação local de PMN (CRISPIE et al., 2008). Esses resultados sugerem que o mecanismo associado ao tratamento com este probiótico está relacionado com a estimulação do sistema imune inato (ARROYO et al., 2010).



Uma linhagem de *Lactobacillus perolens* CRL 1724, isolada do leite de vacas da raça Holandês na Argentina, apresentou antagonismo e co-agregação contra patógenos associados à mastite, bem como adesão às células epiteliais do canal do teto (FROLA et al., 2012). A administração desta linhagem, por infusão intramamária em vacas, levou ao aumento na CCS apenas nas primeiras 24h após a inoculação, sem produzir sinais clínicos e histológicos de inflamação aguda do úbere (FROLA et al., 2012; 2013). Linhagens de *L. casei*, isoladas do canal do teto, apresentaram capacidade significativa de reduzir a adesão e internalização de *S. aureus* em modelo de co-cultivo com células epiteliais mamárias bovinas (BOUCHARD et al., 2013). Recentemente, a linhagem *Lactococcus lactis* V7, isolada a partir de vacas no Brasil, apresentou capacidade significativa de reduzir a adesão de *S. aureus* Newbould 305 e a internalização de diferentes linhagens patogênicas de *S. aureus* e *E. coli*, bem como de estimular a produção de IL8, quando avaliada em modelo de co-cultivo com células epiteliais mamárias bovinas (ASSIS et al., 2015). Portanto, devido aos poucos estudos realizados até o momento, existe um nicho a ser explorado na prospecção de novas bactérias com potencial probiótico para prevenção e ou tratamento de mastite em bovinos de produção leiteira do Brasil.

## **2. PROBLEMA CIENTÍFICO E HIPÓTESES LEVANTADAS**

Não se conhece a microbiota da glândula mamária bovina saudável das raças Girolando 1/2, Guzerá e Gir, importantes para a formação do rebanho de produção de leite do Brasil. Além disso, não foi realizado ainda nenhum estudo de microbioma comparando a microbiota albergada na glândula mamária bovina entre animais saudáveis e acometidos com mastite subclínica residentes no Brasil. Somados a estes fatos, são poucas as bactérias caracterizadas para uso probiótico na glândula mamária bovina com perspectiva de uso na bacterioterapia da mastite.

Diante dos problemas científicos descritos, algumas hipóteses foram levantadas. A primeira delas é que a microbiota albergada na glândula mamária bovina possivelmente apresenta um perfil diversificado de composição, de acordo com a raça e fazenda, com alterações devido à mastite subclínica, a qual deve estar associada a um quadro de disbiose. A segunda hipótese é que as bactérias do ácido láctico (BAL), membros residentes da microbiota da glândula mamária bovina, devem estar associadas a um úbere saudável, pois produzem um estado salutar em outros ecossistemas, além de, provavelmente, apresentarem, como as isoladas de outros ambientes, características probióticas promissoras.

### 3. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

O leite humano apresenta uma diversificada comunidade microbiana que têm implicações sobre a saúde da mama e sobre a colonização bacteriana do trato gastrointestinal dos lactentes. Estudos prévios têm mostrado que as microbiotas presentes no trato gastrointestinal e urogenital de seres humanos apresentam composição variada entre estados saudáveis e patológicos, o que, de fato, caracteriza que muitas doenças são causa ou consequência de disbiose (HUNT et al., 2011). Logo, estudos de comparação da microbiota da glândula mamária bovina saudável e com mastite subclínica podem fornecer esclarecimentos sobre a verdadeira etiologia desta doença. Além disso, a comparação da composição microbiológica do leite de diferentes regiões ou raças pode aumentar nosso conhecimento sobre microbiota normal do leite.

A mastite é considerada a patologia que mais causa prejuízos à pecuária leiteira. No Brasil, em função da alta prevalência (acima de 40%), estima-se uma perda de produção entre 12 e 15% devido à mastite, o que significa um total de 2,8 bilhões de litros/ano (SANTOS, 2013). Diante disto, como quinto produtor mundial de leite e, devido à importância desta atividade para o agronegócio brasileiro, o combate à mastite é de extrema importância.

O tratamento tradicional com antimicrobianos é relativamente não efetivo contra alguns patógenos, especialmente *S. aureus* (BARKEMA et al., 2006). Por isso, uma taxa de 70-90% dos casos de mastite de origem estafilocócica, em bovinos, é refratária a esse tratamento e, usualmente, se tornam recorrentes ou até mesmo crônicos (WALL et al., 2005). A antibioticoterapia gera resíduos no leite que causam contaminação dos alimentos de abastecimento humano e podem contribuir para a transmissão de resistência microbiana (DUARTE et al., 2005) o que faz esse tipo de leite ser inaceitável para o processamento industrial (ESPECHE et al., 2009). Diante do exposto, a insuficiência dos atuais tratamentos para mastite (BRADLEY, 2002) tem aumentado a necessidade pela busca de outros métodos mais efetivos para prevenir e tratar esta patologia (AL-QUMBER & TAGG, 2006). Portanto, dados sobre a composição da microbiota podem permitir o desenvolvimento de alternativas para o tratamento da mastite.

Atualmente, existem consideráveis pressões para redução do uso de antimicrobianos na pecuária, visando a redução da seleção e da transmissão de

genes de resistência a múltiplas drogas (ROWSON et al., 2011). Diante deste fato, o mercado consumidor, nos últimos anos, tem requerido produtos de origem mais “orgânica”, produzidos com o uso mínimo de antimicrobianos e outras drogas. Portanto, o desenvolvimento de novas estratégias baseadas em bacterioterapia pode ser uma alternativa atrativa para complementar, ou até mesmo substituir a tradicional antibióticoterapia. Bactérias probióticas têm sido usadas no controle de diversas doenças infecciosas através do antagonismo bacteriano e da imunomodulação (CROSS, 2002). Bactérias da microbiota comensal do úbere, com destaque para as BAL, apresentam um amplo espectro de atividade antimicrobiana que sugere sua possível aplicação como agentes preventivos contra a mastite (AL-QUMBER & TAGG, 2006).

A maioria dos estudos envolvendo uso de probióticos em animais não leva em consideração a especificidade ao hospedeiro e muitas bactérias potencialmente probióticas não são autóctones. A especificidade entre linhagem bacteriana e o hospedeiro parece ser essencial para favorecer a adesão e a expressão dos efeitos benéficos. Provavelmente, linhagens autóctones têm maiores chances de sobreviver devido a sua prévia adaptação ao ambiente presente no hospedeiro. Além disso, a genômica comparativa de BAL tem identificado a existência de genes de especificação de nicho que permitem a uma bactéria sobreviver em determinados ambientes (ESPECHE et al., 2012).

O uso de tratamentos sem antibióticos pode reduzir os custos terapêuticos e atender às pressões, em nível internacional, exercidas sobre o setor agropecuário (KLOSTERMANN et al., 2008). O uso de probióticos em infusão mamária pode ser um tratamento que reduz os custos associados à mastite, visto que é estimado que 5-7% dos prejuízos advindos desta doença sejam causados pelo descarte de leite contendo resíduos de antimicrobianos (COSTELLO, 2004). Portanto, a modulação da microbiota da glândula mamária da vaca pode ter efeitos diretos sobre o estado de saúde do úbere abrindo novas perspectivas para bacterioterapia e para a geração de novos produtos contendo probióticos administrados por via intramamária ou oral em bovinos de produção de leite (FERNÁNDEZ et al., 2012).

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivos gerais

- A) Caracterizar a microbiota da glândula mamária bovina saudável e acometida com mastite subclínica nas raças Holandês, Guzerá, Gir e Girolando 1/2;
- B) Isolar, identificar e caracterizar linhagens de Bactérias do Ácido Lático (BAL), obtidas da glândula mamária bovina, em testes *in vitro* e em modelo de co-cultivo com células MDA-MB-231 para avaliar o seu potencial uso probiótico.

### 4.2 Objetivos específicos

- A) Examinar a composição microbiana da glândula mamária bovina pela análise da microbiota baseada no sequenciamento de nova geração das porções V3-V4 do gene 16S rRNA em amostras de DNA total extraído a partir de leite cru;
- B) Caracterizar diferenças de composição entre raças bovinas e estados de saúde comparando a microbiota do leite de vacas saudáveis e acometidas com mastite subclínica das raças Holandês, Guzerá, Gir e Girolando 1/2;
- C) Isolar e identificar BAL presentes na glândula mamária bovina a partir de amostras de leite e *swab* intramamário para comparar a incidência relativa das BAL recuperadas entre as diferentes raças e os estados de saúde do úbere;
- D) Caracterizar o potencial probiótico das BAL isoladas da glândula mamária bovina em testes *in vitro* de caracterização da superfície celular bacteriana, produção de exopolissacarídeos (EPS) e biofilme, sensibilidade a antimicrobianos, produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, antagonismo contra patógenos envolvidos na etiologia da mastite e presença de fatores virulência;
- E) Avaliar a capacidade de adesão, internalização, inibição de adesão e invasão de patógenos associados à mastite, bem como de alteração da expressão gênica de mediadores da resposta imune por BAL isoladas da glândula mamária em modelo de co-cultivo com células epiteliais mamárias (MDA-MB-231 ATCC®HTB-26™).

## 5. ANIMAIS, MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Fazendas e seleção de animais no campo

Para a análise da microbiota da glândula mamária, foram coletadas amostras de leite cru de 200 vacas que estavam dentro do pico da 1ª à 5ª lactação (com pelo menos 60 dias pós-parto) das raças Holandês, Guzerá, Gir e Girolando 1/2 sangue. Essas raças foram escolhidas pois representam as principais raças componentes do rebanho bovino leiteiro brasileiro, além de apresentarem características zootécnicas distintas. O Girolando 1/2 é uma raça mestiça obtida do cruzamento da raça zebuína Gir (*B. indicus*) com a europeia Holandês (*B. taurus*). Esta raça é considerada por alguns especialistas como a mais importante raça leiteira em países de clima tropical, sendo responsável por aproximadamente 80% de todo leite produzido no Brasil (FREITAS et al., 2002). Além do Girolando 1/2, e das duas raças usadas no cruzamento de sua origem (Gir e Holandês), a raça Guzerá foi incluída neste trabalho por se tratar de uma raça zebuína rústica de duplo-propósito, na qual os animais acumulam bom rendimento de carcaça aliado à habilidade materna e produção de leite que já foi documentada atingindo até 40 kg de leite por dia (PENNA et al., 2014). A quantidade de animais coletados de cada raça foi proporcional a importância da raça na composição do rebanho leiteiro brasileiro. Foram amostrados de forma aleatória, em média, 30% dos rebanhos em lactação em 5 fazendas, localizadas em diferentes regiões do estado de Minas Gerais, que apresentaram contribuição importante para a formação genética do rebanho leiteiro do estado.

Uma parte dessa amostra foi utilizada para o isolamento de bactérias do ácido láctico (BAL). Para o isolamento de BAL foram coletadas amostras de leite e *swab* intramamário de 115 vacas das mesmas raças, em 4 fazendas. Os animais coletados não foram tratados com medicamento antimicrobiano pelo menos 30 dias antes das coletas. As coletas foram feitas entre novembro de 2013 e janeiro de 2014 (estação chuvosa) apenas na ordenha matutina (4-6 h da manhã). A listagem das fazendas, tipo de animais e número de animais coletados estão resumidos na TABELA 1 e a localização geográfica das fazendas mostrada na FIGURA 4.

TABELA 1 - Descrição das Fazendas e dos tipos de animais coletados

Código da Fazenda	Localização	Região do Estado	Raça dos animais	Animais para microbiota (n)	Animais para isolamento de BAL (n)
Fazenda A	Arcos – MG	Centro-oeste	Gir	39	23
Fazenda A	Arcos – MG	Centro-oeste	Girolando 1/2	18	18
Fazenda B	Martinho Campos - MG	Lago de Três Marias	Gir	11	11
Fazenda B	Martinho Campos - MG	Lago de Três Marias	Girolando 1/2	25	25
Fazenda C	Monsenhor Paulo - MG	Sul	Girolando 1/2	49	-
Fazenda D	Betim – MG	Centro-oeste	Guzerá	18	18
Fazenda E	Entre Rios de Minas – MG	Centro-oeste	Holandês	40	20

**Legenda:** Os 200 animais coletados para a avaliação da microbiota total da glândula mamária foram proporcionalmente amostrados de acordo com sua relevância para a produção de leite no estado de Minas Gerais, em 5 fazendas. Apenas foram incluídos na amostragem animais com registro nas respectivas associações de raça e que não apresentassem sintomas de mastite clínica. Animais da raça Gir foram amostradas duas fazendas (A e B) e para animais da raça Girolando 1/2 foram coletadas em três fazendas (A, B e C). Para as raças Guzerá e Holandês só foram amostradas uma fazenda para cada raça (D e E, respectivamente). Uma parte dos animais coletados para a avaliação da microbiota total também teve suas amostras utilizadas para o isolamento de Bactérias do Ácido Lático (BAL) a partir de leite e swab intramamário. Para o isolamento, foram amostradas apenas 4 fazendas, sendo que a Fazenda C não foi incluída neste experimento devido à dificuldade de logística do material biológico.

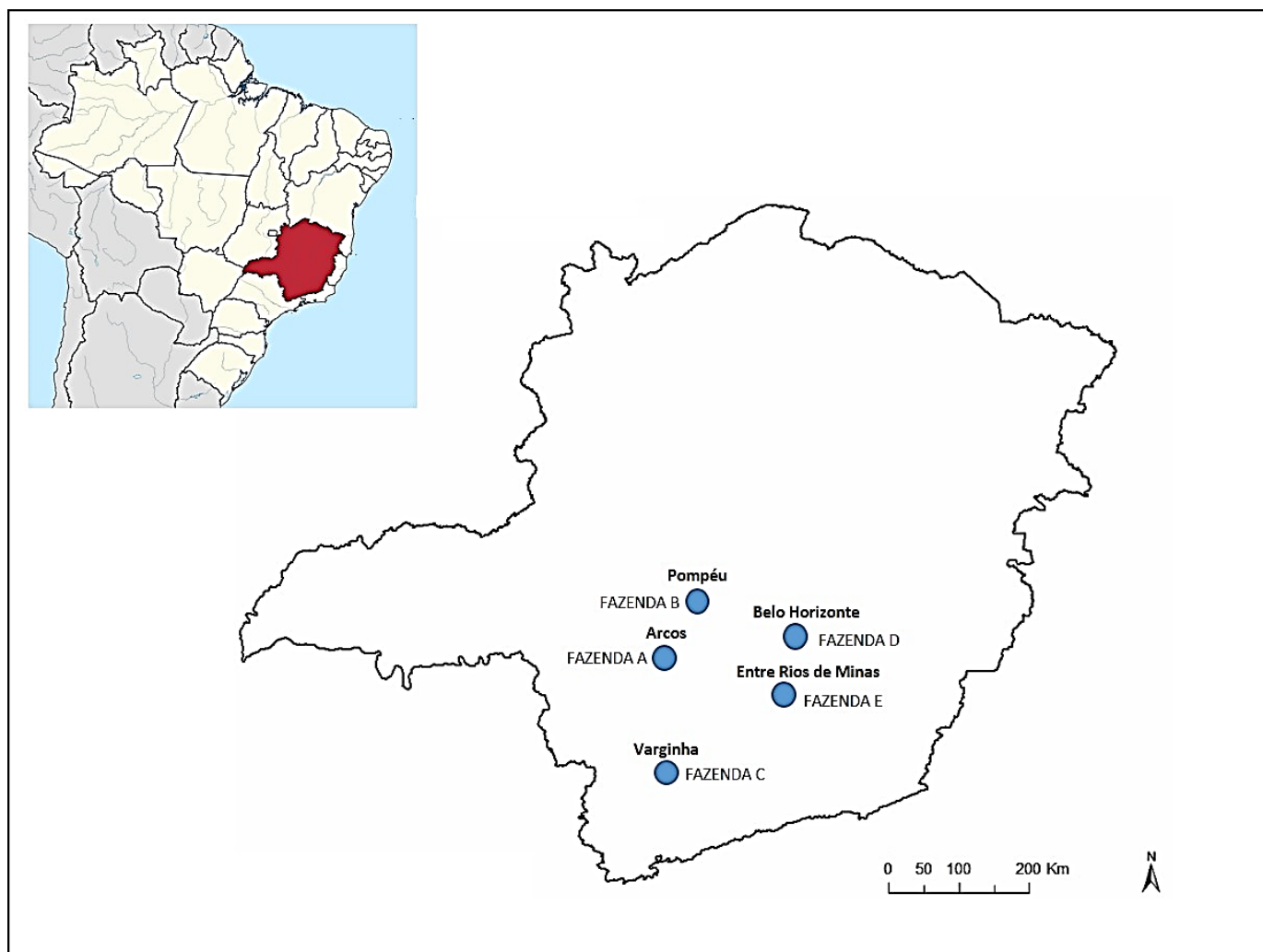
A Fazenda A (Arcos - MG) possui criação de animais da raça Gir e Girolando 1/2. A alimentação dos animais é basicamente ao pasto (Tifton 85 e Tanzânia) entre novembro e abril e com volumoso, de silagem de milho, no cocho na estação seca (maio a outubro), com suplementação de concentrado no cocho durante todo o ano. A ordenha é manual com presença de bezerro ao pé para os animais da raça Gir e mecânica sem bezerro ao pé para os animais Girolando 1/2. A Fazenda B (Martinho Campos - MG) possui criação de animais da raça Gir e da raça Girolando. A alimentação dos animais é basicamente ao pasto (Braquiária) entre novembro e abril e com volumoso, de silagem de milho e de cana-de-açúcar, no cocho na estação seca (maio a outubro), com suplementação de concentrado no cocho durante todo o ano. A ordenha é mecânica com presença de bezerro ao pé após a ordenha. A Fazenda C (Monsenhor Paulo - MG) possui criação de animais da raça Girolando 1/2. A alimentação dos animais é basicamente ao pasto (Braquiária, Braquiarão e

Tifton) entre novembro e abril e com volumoso de cana-de-açúcar fresca no cocho na estação seca (maio a outubro), com suplementação de concentrado no cocho durante todo o ano. A ordenha é mecânica sem presença de bezerro ao pé. A Fazenda D (Betim - MG) possui criação apenas de animais da raça Guzerá. A alimentação é a pasto (Braquiarão) na estação chuvosa (novembro a abril) e com silagem de milho ou cana-de-açúcar no cocho na estação seca (maio a outubro) e suplementação com concentrado o ano todo. A ordenha é manual com bezerro ao pé. A Fazenda E (Entre Rios de Minas - MG) possui criação apenas de animais da raça Holandês. Nessa fazenda, diferente de todas as outras que possuem manejo semi-intensivo, os animais são criados de forma intensiva (sistema de confinamento *free stall*) durante todo o ano. Nesse sistema, os animais recebem volumoso de silagem de milho e feno no cocho com suplementação de concentrado. A ordenha é mecânica sem presença de bezerro ao pé da vaca. Em todas as fazendas as vacas eram alimentadas com concentrados comerciais, sem suplementação com pré ou probióticos.

Durante a coleta foram descartados animais que apresentavam características sugestivas de mastite clínica, tais como aspecto inchado e inflamado do úbere e presença de flocos ou coágulos nos primeiros jatos de leite, detectados pela visualização de grumos em uma caneca de fundo escuro ou em uma peneira com tela (procedimento conhecido como “teste da caneca”), antes da ordenha. Esse critério foi estabelecido pois, no presente estudo um dos objetivos era caracterizar a composição da microbiota de animais acometidos com mastite subclínica e não clínica.



FIGURA 4 - Localização geográfica das fazendas amostradas



**Fonte:** Criado pelo autor adaptado de <<http://www.mapasparacolorir.com.br>> e <<https://upload.wikimedia.org>>.

**Legenda:** Localização das 5 fazendas amostradas no estado de Minas Gerais com a referência de cidades de médio e grande porte localizadas próximas às propriedades para facilitar sua localização geográfica.

## 5.2 Coleta de amostras biológicas de leite e *swab* intramamário

Antes do procedimento de coleta, os tetos foram cuidadosamente lavados com uma solução de permanganato de potássio (1:1000) e submetidos à limpeza com algodão embebido em solução de álcool iodado, seguida da secagem do teto com papel toalha individual, para redução da contaminação com a microbiota da pele. As amostras foram coletadas apenas no quarto dianteiro direito em todos os animais.

Por ordenha manual, os primeiros jatos de leite foram descartados e 100 mL de leite de cada animal foram coletados em tubos Falcon de 50 mL estéreis

e transportados sob refrigeração para o laboratório. Parte dessa amostra de leite foi utilizada para o isolamento de BAL e o restante congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para extração do DNA genômico bacteriano total, o qual foi empregado na avaliação da microbiota. Além disso, alíquotas de 50 mL de leite foram coletadas em frascos contendo bromopol ou azidiol e armazenadas a  $4^{\circ}\text{C}$ , para contagem de células somáticas (CCS) e para contagem bacteriana total (CBT), respectivamente.

Para coleta das amostras de *swab* intramamário, foi utilizado COPAN *Venturi Transystem* (Copan Diagnostics IN. Murrieta, CA, EUA). O *swab* foi inserido internamente 2cm a partir do ápice do teto, para dentro do canal, e levemente girado três vezes antes de ser removido (BOUCHARD et al., 2015). Depois deste procedimento, o *swab* foi introduzido dentro do meio de transporte, presente no sistema, sendo levado ao laboratório, de acordo com as recomendações fornecidas pelo fabricante. As amostras de *swab* intramamário foram usadas exclusivamente para o isolamento de BAL.

As técnicas de coleta realizadas neste trabalho fazem parte da prática clássica veterinária de rotina em fazendas de alta produção de leite. De acordo com determinações em nível internacional (2010/63/EU), este tipo de experimento não requer aprovação em comitê de ética, visto que todos os procedimentos aqui realizados fazem parte do cuidado de rotina e vigilância sanitária em fazendas e foram, inclusive, acompanhados por médico veterinário. Ademais, nenhum animal sofreu qualquer agressão ou foi sacrificado para o alcance dos objetivos desta tese. A permissão para coleta das amostras biológicas foi recebida pelos proprietários dos animais que também consentiram na condução e publicação deste trabalho.

### **5.3 Contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) do leite**

As análises de CCS e CBT das amostras de leite foram realizadas no Laboratório de Análise da Qualidade do Leite (LabUFMG) do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinária - UFMG. A CCS foi realizada no equipamento Bentley Combi System 2300®

(Bentley. Instruments Incorporated, Chaska, EUA), que se baseia no princípio de contagem eletrônico fluoro-ótico em citometria de fluxo. A análise de CBT, tal como a CCS, foi realizada no equipamento Bentley Combi System 2300®, composto por uma unidade do equipamento Bentley 2000 e uma do equipamento Somacount 300. A CCS foi utilizada como critério de classificação dos animais em saudáveis e com mastite subclínica. O ponto de corte para determinação de mastite foi de CCS > 200.000 células/mL (HARMON, 1994). Portanto, foram amostradas vacas saudáveis (não infectadas, sem sinais clínicos de mastite e CCS < 200.000 células/mL) e vacas com mastite subclínica com CCS > 200.000 células/mL, mas sem sinais clínicos. Todas estas análises foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Marcelo Rezende da Escola de Veterinária - UFMG.

#### **5. 4 Análise da microbiota da glândula mamária a partir das amostras de leite cru**

##### **5. 4. 1 Extração de DNA genômico bacteriano total**

O DNA genômico bacteriano foi recuperado das amostras de leite cru utilizando o *Milk Bacterial DNA isolation* kit #21500 (Norgen, Thorold, ON, Canada) seguindo as recomendações do fabricante, com modificações. Basicamente, após o descongelamento, 100 mL das amostras de leite cru foram homogeneizadas por aproximadamente 15 min a 37°C. Em seguida, foram centrifugadas a 8000 x g por 10 min e o sobrenadante foi descartado, tomando-se cuidado, nesta etapa, em eliminar a maior proporção da capa de gordura das amostras, usando *swab* estéril. Os *pellets* foram lavados duas vezes com salina 0,9% e ao final ressuspensos em 1 mL de salina 0,9% sendo transferidos para microtubos de 2 mL. Em seguida, as amostras foram submetidas às etapas de digestão enzimática com lisozima (fornecida no kit) e lisostafina (5 ng/amostra - L7386 Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), seguida da digestão utilizando proteinase K, de acordo com as recomendações do fabricante. No final, o DNA genômico bacteriano foi isolado usando colunas de sílica, fornecidas pelo fabricante, e eluído com tampão de eluição. Para aumentar a concentração, após a extração, as amostras de DNA foram submetidas a um ciclo de dessecação de

solução aquosa durante uma hora com aquecimento a 65°C utilizando *Speed vac - Eppendorf concentrator 5301* (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). Depois de extraído, o estado de qualidade do DNA foi avaliado por eletroforese em gel de agarose 0,8% e sua quantificação foi realizada usando o equipamento NanoDrop (Thermo Scientific, Hudson, NH, EUA).

*Pools* de quantidade equimolares de DNA de todos os indivíduos foram usados para produção das amostras de DNA que foram submetidas ao sequenciamento de alto rendimento. Cada *pool* a ser sequenciado foi formado pelo conjunto de todos os indivíduos de uma fazenda pertencentes a uma mesma raça que apresentavam um mesmo estado de saúde da glândula mamária. Portanto, 14 *pools* foram sequenciados utilizando esse critério de *pooling* sendo: duas amostras contendo DNA oriundo de animais Gir saudáveis (uma da Fazenda A, outra da Fazenda B), duas com DNA de animais Gir com mastite subclínica (uma da Fazenda A e outra da Fazenda B), três amostras contendo DNA oriundo de animais Girolando 1/2 saudáveis (uma da Fazenda A, outra da Fazenda B e uma da Fazenda C), três com DNA de animais Girolando 1/2 com mastite subclínica (uma da Fazenda A, outra da Fazenda B e uma da Fazenda C), uma com DNA de animais Guzerá saudáveis, uma contendo DNA de animais Guzerá com mastite subclínica, uma com DNA de animais Holandês saudáveis e uma contendo DNA de animais Holandês com mastite subclínica. Ainda foram feitos mais quatro *pools* adicionais, dois para a raça Gir e dois para a raça Girolando 1/2, que uniam por estado de saúde da glândula mamária (uma amostra para animais saudáveis e outra amostra para animais com mastite subclínica) todos os animais dessas raças, independente da fazenda de origem. Portanto, foram sequenciados 18 *pools* de amostras.

#### 5. 4. 2 Amplificação das regiões hipervariáveis V3-V4 do gene codificador do rRNA 16S

As reações de PCR foram realizadas utilizando um conjunto de iniciadores recomendados pela Illumina (KLINDWORTH et al., 2013). Esses iniciadores possuem em sua extremidade 5' uma sequência complementar aos adaptadores de *indexes*, que permitem o sequenciamento de até 96 amostras em uma mesma

corrida. Na sua extremidade 3', cada iniciador possui uma sequência complementar ao *locus* específico de amplificação no genoma bacteriano, que flanqueia as regiões V3 e V4 do gene codificador do rRNA 16S. As sequências dos iniciadores utilizados foram: 16S *Amplicon PCR Forward Primer* 5'TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CC TAC GG GNG GCW GCA G 3' e 16S *Amplicon PCR Reverse Primer* 5'GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA CTA CHV GGG TAT CTA ATC C 3', em sublinhado estão evidenciadas as sequências dos iniciadores que são complementares ao gene do rRNA 16S. Essa amplificação resultou em um *amplicon* de 460 pb considerado como um dos alvos moleculares mais adequados para identificação de bactérias e *Archaea*, resultando em alta cobertura global e, por isso, adequado para classificação filogenética de bactérias (HUNT et al., 2011; KLINDWORTH et al., 2013).

Cada 25 µL de produto de reação de PCR foram produzidos utilizando 12,5 µL de 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix (Kapa Biosystems, Woburn, MA, EUA), 1 µL de cada um dos iniciadores 16S *Amplicon PCR* (20 µM) e 10,5 µL do DNA genômico bacteriano na concentração de 30 ng/µL. As reações foram feitas em termociclador Veriti® (Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA) utilizando as seguintes condições de ciclagem: desnaturação inicial de 3 min a 95°C, seguida de 25 ciclos com 95°C por 30 seg, 55°C por 30 seg e 72°C por 30 seg, terminada por uma etapa de alongação final de 5 min a 72°C. A eficácia das reações e a ausência de contaminação dos controles negativos foram verificadas através da resolução dos *amplicons* em eletroforese em gel de agarose a 1%, com subsequente coloração com brometo de etídeo e visualização dos produtos de PCR em transluminador UV. Os produtos de PCR foram purificados utilizando AMPure XP beads (Illumina Inc., San Diego, Califórnia, EUA) para remoção de dímeros de iniciadores e iniciadores não ligados, seguindo as recomendações do fabricante. A adição dos *indexes* com cauda complementar e dos adaptadores de sequenciamento foi feita utilizando o Nextera XT Index Kit (Illumina Inc.) por uma PCR de 5 ciclos, seguindo as recomendações do fabricante, com subsequente purificação usando AMPure XP beads (Illumina Inc.). As bibliotecas foram quantificadas e normalizadas para a concentração de 4 nM, em seguida foi feito um *pool* com quantidades equimolares de cada biblioteca, o qual foi submetido ao sequenciamento de alto rendimento.

#### 5. 4. 3 Sequenciamento de alto rendimento das regiões hipervariáveis V3 -V4 do gene codificador do rRNA 16S

Durante a preparação das amostras para sequenciamento, as bibliotecas foram desnaturadas com uma solução de NaOH 0,2N (diluída na solução HT1). A amostra, depois de diluída para a concentração de 12 pM, foi aplicada no cartucho e o sequenciamento *paired end* de 2x300 ciclos foi realizado. Na corrida foi incluído 5% PhiX para servir como um controle interno de bibliotecas de baixa diversidade. Nesta etapa foi utilizado o kit MiSeq v3 (Illumina Inc.) seguindo as recomendações do fabricante. Depois de processadas as bibliotecas foram injetadas na plataforma MiSeq (Illumina Inc.) pertencente ao Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis do Dep. de Biologia Geral – ICB – UFMG.

#### 5. 4. 4 Análises de Bioinformática

As sequências foram alinhadas e classificadas utilizando o banco de dados referência SILVA (QUAST et al., 2013), através do emprego do software MOTHUR, versão 1.35.1 (KOZICH et al., 2013), sendo executado localmente e em um *cluster* gerenciado pelo Slurm (*Simple Linux Utility for Resource Management*). O *pipeline* usado foi baseado nos trabalhos de Kozich e col. (2013) e Kopylova (2016) e os *scripts* utilizados na análise estão disponíveis no endereço eletrônico <<https://github.com/jeffRayneres/Bacterial-sequence-analysis>>. Toda essa análise foi feita em colaboração com o discente de mestrado Jefferson Rayneres Silva Cordeiro do programa de Pós-Graduação em Ciência da Computação da UFMG. Inicialmente foram filtradas as sequências ambíguas e as maiores que 550 bp, em seguida, sequências duplicadas ou redundantes foram unificadas para melhorar o desempenho e evitar a redundância na representatividade das mesmas. Então foi calculada a frequência de cada sequência em cada amostra e elas foram alinhadas utilizando o banco de dados SILVA de referência de alinhamento. Após esses procedimentos, foi gerado um sumário para analisar a qualidade dos alinhamentos. A partir do sumário, para garantir que todas as sequências

sobreponham a mesma região, foram selecionadas apenas aquelas que alinhavam inicialmente na posição 6388 ou posterior e que terminavam seu alinhamento na posição 25316 ou anterior. Então, com as sequências alinhadas, foi feita novamente a remoção de duplicações, e em seguida uma pré-clusterização, considerando *diffs* = 5, ou seja, 1 *diff* cara cada 100 bp. Em seguida, foram geradas as unidades taxonômicas operacionais (*operational taxonomic unit* – OTU) através da classificação taxonômica das sequências utilizando a base taxonômica SILVA e considerando um percentual mínimo de similaridade de 90%. Concluída a geração das OTUs, foram removidas possíveis sequências indesejáveis, no caso, aquelas taxonomicamente classificadas como Cloroplasto, Mitocôndria, *Archaea* e *Eukaryota*. Por fim, foi feita uma clusterização considerando o nível taxonômico de Ordem e uma distância matricial de 0,15.

Os gráficos de abundância relativa de OTUs em cada amostra, em diferentes níveis taxonômicos, foram gerados através da utilização do pacote *phyloseq* disponível no programa R versão 2.8.0 (R Development Core Team, 2016). Nesse pacote também foram gerados os *hetmaps* de comparação de abundância de OTUs pelo método de análise por correspondência (CCA), calculadas as medidas de riqueza (índice de Chao1 e ACE) e de diversidade (índice de Shannon, Simpson invertido e Fisher) de cada amostra. Usando ainda este pacote, foi realizada a análise de coordenadas principais (*Principal Coordinates Analysis* - PCoA) usando medidas Unifrac ponderadas de  $\beta$ -diversidade para geração do escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) baseado na dissimilaridade de Bray-Curtis. Esta análise não-taxonômica permite avaliar a diversidade entre as amostras com base na abundância relativa de cada OTU dentro de cada amostra. Por fim, os diagramas de Venn que mostram o grau de compartilhamento de OTUs entre amostras foram gerados bem como, construídos dendogramas com base em medidas de diversidade estrutural como o coeficiente de Jaccard (*jclass*) com auxílio do programa Unifrac disponível no MOTHUR versão 1.35.1 (KOZICH et al., 2013).

## 5.5 Isolamento, identificação e caracterização de BAL da glândula mamária

Para o isolamento de BAL foram coletadas amostras de leite e *swab* intramamário de 115 vacas das mesmas raças, em 4 fazendas. A Fazenda C foi excluída desta etapa devido às dificuldades logísticas de transporte das amostras para o laboratório em tempo hábil para o isolamento de BAL. Após o isolamento e caracterização morfológica e fenotípica, a identificação dos isolados de BAL foi feita por métodos moleculares. Como triagem do potencial probiótico destas bactérias, foram avaliados *in vitro* aspectos da superfície celular; capacidade de produção de exopolissacarídeos (EPS) e biofilme; sensibilidade à antimicrobianos; capacidade de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e atividade antagonista contra patógenos causadores de mastite e presença de fatores de virulência importantes para a infecção da glândula mamária.

### 5.5.1 Enumeração bacteriana em MRS e isolamento de BAL

Amostras de campo (leite cru e *swab* intramamário) não diluídas e suas respectivas diluições decimais seriadas foram plaqueadas em ágar Man, Rogosa e Sharpe (MRS, Merck & Co. Inc, EUA) acrescido de cicloheximida 100 mg/L (Sigma-Aldrich). Em seguida, as placas foram incubadas durante 48 h, a 37°C em câmara anaeróbica (Forma Scientific, Marietta, OH, EUA), contendo uma atmosfera de 85% N<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>. Os resultados foram expressos em logaritmo decimal do número de unidades formadoras de colônias (log<sub>10</sub> UFC) por mL (para leite) e por *swab* (para *swab* intramamário).

Aleatoriamente, em média 10% das colônias (CHEN et al., 2008) de cada placa foram transferidas para caldo MRS (Acumedia, Baltimore, MD, EUA) e incubadas a 37°C por 24 h em anaerobiose. A seleção de BAL foi feita por testes fenotípicos: coloração de Gram e teste de produção de catalase (HARRIGAN & MACCANCE, 1976; SHARPE, 1976; COLLINS & LYNE, 1980). Isolados que apresentaram morfologia de bastonetes, cocos e cocobacilos Gram-positivos, catalase-negativos foram selecionados como BAL presumidos e purificados por duas subculturas em MRS ágar. A pureza dos isolados foi confirmada microscopicamente e os isolados crescidos em caldo MRS por 24h a 37°C em



anaerobiose foram congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  acrescido de glicerol 20% v/v para os estudos posteriores.

### 5.5.2 Reativação

Para a identificação molecular e para cada um dos ensaios de caracterização probiótica, os isolados estocados a  $-80^{\circ}\text{C}$  foram reativados por meio de duas passagens consecutivas em caldo MRS a partir de um inóculo de 2% (v/v). Em cada uma das passagens os isolados foram mantidos em câmara anaeróbica por 18 h a  $37^{\circ}\text{C}$ .

### 5.5.3 Identificação genética dos isolados de BAL

#### 5.5.3.1 Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído a partir de 10 mL de culturas puras crescidas por 18 h a  $37^{\circ}\text{C}$  em anaerobiose. Antes da extração do DNA genômico, as bactérias foram submetidas a um pré-tratamento, no qual os isolados bacterianos foram centrifugados, lavados com 1 mL de água deionizada e ressuspensos em 1 mL de LiCl 5M sob agitação por 1h à temperatura ambiente. Depois, foi realizada outra centrifugação, seguida de descarte do sobrenadante, e lavagem com 1 mL de água deionizada. O *pellet* foi ressuspensado em tampão TES (50 mM de Tris-HCl pH 8.0, 10 mM de EDTA e 25mM de sacarose) contendo lisozima (Sigma-Aldrich; 10 mg/mL) e mantido a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1h, seguido da extração do DNA genômico utilizando o protocolo de fenol: clorofórmio de acordo com Sambrook e col. (1989).

#### 5.5.3.2 Fingerprinting rep-PCR (GTG)<sub>5</sub>

Com o objetivo de diminuir a redundância e reduzir o número de isolados a serem identificados pela análise do gene codificador do rRNA 16S, o DNA dos isolados foi submetido a *fingerprinting* rep-PCR (GTG)<sub>5</sub> com o intuito de excluir isolados potencialmente pertencentes a mesma linhagem bacteriana. As

reações foram realizadas de acordo com os procedimentos descritos por Gever e col. (2001) usando o iniciador GTG<sub>5</sub>: 5' GTG GTG GTG GTG GTG 3' e PCR Master Mix (Promega Corporation, Madison, WI, EUA). Os produtos amplificados gerados foram resolvidos em gel de agarose 2% e visualizados em transluminador de UV, após coloração com brometo de etídeo. Isolados que apresentaram perfis de bandas sobrepostos foram excluídos das subseqüentes etapas de identificação molecular, permanecendo apenas isolados que apresentaram perfis diferentes de *fingerprinting* rep-PCR (GTG)<sub>5</sub>.

### 5.5.3.3 PCR-ARDRA

A identificação dos isolados em nível taxonômico de espécie foi realizada utilizando Análise de Restrição do DNA Ribossômico Amplificado (PCR-ARDRA), conforme descrito por Moreira e col. (2005) e revisado por Sandes e col. (2014). O espaçador interno do transcrito 1 (ITS1) foi amplificado utilizando-se um par de iniciadores que se anelam às regiões conservadas dos genes codificadores do rRNA 16S e rRNA 23S, 16-1A (5' GAA TCG CTA GTA ATC G 3') e 23-1B (5' GGG TTC CCC CAT TCG GA 3') (TILSALA-TIMISJARVI & ALATOSSAVA, 1997). Para cada reação foi utilizado PCR Master Mix (Promega), 1 µM de cada um dos iniciadores (16-1A e 23-1B) e 100 ng de DNA genômico bacteriano total. As condições de ciclagem utilizadas para amplificação foram: 1 ciclo (95°C por 2 min), 35 ciclos (95°C por 30 s, 55°C por 1 min e 72°C por 1 min) e o último ciclo (72°C por 5 min). Os produtos foram resolvidos em eletroforese em gel de agarose 1,4% e visualizados em transluminador de UV, após coloração com brometo de etídeo. Como descrito por Moreira e col. (2005), bactérias pertencentes aos gêneros *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Weissella* e *Lactobacillus* apresentam, nesta reação, três *amplicons*, o padrão de *Enterococcus* é composto por dois *amplicons* e *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* e *Streptococcus* apresentam apenas um *amplicon*. Todos os *amplicons* gerados, nessa análise, apresentaram tamanho entre 500-750 pb. Bactérias que apresentaram o padrão com 3 *amplicons* foram submetidas à digestão com 12 enzimas de restrição: *SphI*, *NcoI*, *NheI*, *SspI*, *SfuI*, *EcoRV*, *DraI*, *VspI*, *HincII*, *EcoRI*, *HindIII* e *AvrII*. Os produtos

da restrição foram, em seguida, resolvidos em eletroforese em gel de agarose 1,4% e visualizados em transluminador de UV, após coloração com brometo de etídeo. O perfil de restrição obtido, para cada isolado, foi comparado com um perfil de restrição teórico das sequências depositadas no GenBank, atualizado por Sandes e col. (2014).

Os isolados que não apresentaram perfil compatível com o proposto por Sandes e col. (2014) ou apresentaram padrão com dois ou um *amplicon* na PCR do rRNA 16S-23S, foram encaminhados para sequenciamento no Laboratório de Genética Animal, localizado no Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária - UFMG. Estes isolados tiveram parte do gene codificador do 16S rRNA sequenciado pelo método de Sanger, utilizando-se o sequenciador automático ABI 3130 (Life Technologies). Os iniciadores usados foram o 27F (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') e 1492R (5' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3') e as condições foram estabelecidas por Reysenbach e col. (2000). Após a obtenção das sequências, a pesquisa de similaridade foi realizada usando a ferramenta BLASTn 2.125 da base de dados do *National Center of Biotechnology Information GenBank* (ALTSCHUL et al., 1997). Além desse banco de dados, as sequências obtidas foram também comparadas com o *Ribosomal Data-base Project II sequences* (MAIDAK et al., 2002). Para identificação das espécies foi considerada uma similaridade de no mínimo 98% de identidade no alinhamento múltiplo, em ambos os bancos de dados.

#### 5.5.4 Ensaio de autoagregação dos isolados de BAL

Ensaio de autoagregação foram realizados de acordo com Del Re e col. (2000). Os isolados de BAL foram cultivados em anaerobiose durante 18 h a 37°C em caldo MRS. As culturas foram centrifugadas a 5.000 x g durante 15 min e foram lavadas duas vezes em PBS e ressuspensas em PBS em um volume tal que foi obtida uma concentração de 10<sup>8</sup> UFC/mL. Aproximadamente 1 mL das suspensões foram misturadas por agitação em vórtex durante 10 seg e a autoagregação foi determinada depois de 4h de incubação à temperatura ambiente. No tempo 0h e no tempo 4h, 50µL da suspensão foram coletados e transferidos para outro frasco contendo 1,95 mL de PBS e foram feitas leituras

de absorvância (A) em espectrofotômetro a 600 nm. A porcentagem de autoagregação (%) foi expressa como:  $1 - (A_t/A_0) \times 100$ , onde  $A_t$  representa a absorvância medida no tempo 4h e  $A_0$  a absorvância no tempo zero. O grau de autoagregação dos isolados foi classificado de acordo com o critério publicado por Nader-Macías e col. (2008), no qual isolados com autoagregação entre 0-33% foram considerados como tendo baixa autoagregação, aqueles com autoagregação entre 34-66% considerados com autoagregação moderada e aqueles com autoagregação entre 67-100% considerados como possuindo alta autoagregação. Esse ensaio foi feito em duplicata.

#### 5.5.5 Ensaio de co-agregação dos isolados de BAL com agentes etiológicos da mastite

A co-agregação avalia a capacidade que uma bactéria tem de se associar a outra em suspensão, através da interação de suas superfícies celulares. Portanto, avaliamos a capacidade que BAL tem de co-agregar com os principais patógenos associados à etiologia da mastite, usando como isolados patogênicos alvos *S. aureus* ATCC 29213 e *E. coli* ATCC 25723. As linhagens patogênicas alvo foram ativadas com inóculo de 2% (v/v) em caldo BHI e crescidas em aerobiose a 37°C por 24 h. O método para a preparação das suspensões de células para a análise de co-agregação foi o mesmo descrito para o ensaio de autoagregação (item 5.5.4). Volumes iguais (0,5 mL) de cada suspensão de células (BAL e bactéria patogênica) foram misturados, em pares, por agitação em vórtex durante 10 seg. Os tubos controle, contendo 1 mL de cada suspensão bacteriana sozinha, foram também submetidos, de forma paralela, ao mesmo procedimento. A absorvância (A) em 600 nm das suspensões foi medida após 4h de co-incubação das bactérias à temperatura ambiente. A porcentagem (%) de co-agregação foi calculada utilizando a seguinte equação:  $\{[(A_x+A_y)/2 - A(x+y)] / (A_x+A_y/2)\} \times 100$  na qual, x e y representam cada uma das duas linhagens analisadas (x a BAL e y o patógeno), e (x + y) os dados de absorvância da mistura de ambas. Esse ensaio foi feito em duplicata para cada isolado.

### 5.5.6 Ensaio de avaliação da hidrofobicidade da superfície celular dos isolados de BAL

A hidrofobicidade da superfície celular dos isolados foi avaliada pelo método de Adesão Microbiana a Solventes (MATS – “*Microbial Adhesion to Solvents*”) (KOS et al., 2003). Culturas em fase estacionária foram centrifugadas (2.000 x g por 10 min), lavadas duas vezes com 1 mL de PBS e ressuspensas em 1 mL de solução de KNO<sub>3</sub> (0,1 M, pH 6,2), sendo a OD<sub>600nm</sub> ajustada para valores entre 0,5 e 0,9 (A<sub>0</sub>). Posteriormente, 20 µL de xileno foram adicionados a 120 µL da suspensão bacteriana em placas de microtitulação (96 poços). Após uma pré-incubação de 10 min à temperatura ambiente, o sistema de duas fases foi homogeneizado em vórtex por 2 min e, em seguida, mantido em repouso durante 50 min. A fase aquosa foi removida e sua absorbância a 600 nm foi medida (A<sub>1</sub>). A hidrofobicidade foi calculada pela porcentagem (%) de bactérias associadas ao xileno de acordo com a fórmula: Hidrofobicidade (%) = [1-(A<sub>1</sub>/A<sub>0</sub>)] x 100. O grau de hidrofobicidade dos isolados foi classificado de acordo com o critério publicado por Nader-Macías e col. (2008), no qual isolados com hidrofobicidade entre 0-33% foram considerados como tendo baixa hidrofobicidade, aqueles com hidrofobicidade entre 34-66% considerados com hidrofobicidade moderada e aqueles com hidrofobicidade entre 67-100% considerados como possuindo alta hidrofobicidade. Esse ensaio foi feito em duplicata.

### 5.5.7 Ensaio para determinação da produção de Exopolissacarídeos (EPS) pelos isolados de BAL

Para avaliação da produção de exopolissacarídeos (EPS), os isolados, após reativação, foram plaqueados por estriamento simples em meio MRS modificado contendo 80 g/L de sacarose (Sigma-Aldrich) em substituição à glicose, e sem adição de Tween-20 (VAN DER MEULEN et al., 2007). Depois de estriados, os isolados foram mantidos em câmara anaeróbica por 18 h a 37°C. A presença de viscosidade em volta das colônias caracteriza a produção de EPS. Esse experimento foi realizado em duplicata.

### 5.5.8 Ensaio de avaliação da produção de biofilme pelos isolados de BAL

O ensaio de avaliação da produção de biofilme foi realizado de acordo com Pérez-Ibarreche e col. (2014). Após a reativação dos isolados, foi feito um inóculo de 5% (v/v) em caldo MRS, e 200 µL desse inóculo foram adicionados em microplacas de cultivo celular de 96 poços de poliestireno (TPP, Trasadingen, Suíça) que foram incubadas a 37°C por 72h em anaerobiose. Depois da incubação, o sobrenadante foi desprezado e, em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS. Em seguida, foram adicionados 200 µL de solução de cristal violeta (0,1% p/v em solução de isopropanol: metanol: PBS 1:1:18) e as placas foram incubadas a temperatura ambiente por 30 min. Após este procedimento, as placas foram lavadas 3 vezes com água destilada, e após secagem de 30 min a 37°C, foram adicionados 200 µL de solução de ácido acético 30% para dissolver o corante. Ao final, foram transferidos 135 µL do corante solubilizado em ácido acético para uma nova placa de microtitulação e a OD<sub>570 nm</sub> foi mensurada. Os resultados de produção de biofilme foram determinados de acordo com a classificação proposta por Milanov e col. (2010). De acordo com este critério, o *cut-off* de produção de biofilme é determinado como três desvios-padrão da A<sub>570 nm</sub> de um poço controle negativo (apenas com MRS). Os isolados foram classificados em não produtores de biofilme se apresentassem absorvância menor que o *cut-off*, os isolados fracos produtores de biofilme apresentaram absorvância entre o valor de *cut-off* e duas vezes o valor de *cut-off*, os produtores moderados de biofilme apresentaram absorvância entre duas e quatro vezes o valor do *cut-off* e os isolados fortes produtores de biofilme apresentaram valor de absorvância maior que quatro vezes o valor do *cut-off*. Esse experimento foi realizado em triplicata para cada isolado.

### 5.5.9 Ensaio de sensibilidade a antimicrobianos dos isolados de BAL

A sensibilidade aos antimicrobianos foi determinada pelo método de difusão da droga em ágar utilizando-se discos impregnados com antimicrobianos conforme descrito por Charteris e col. (1998) e ANVISA (2005). Após reativados, os isolados de BAL foram diluídos em salina 0,9% esterilizada, até atingir a turbidez equivalente a 0,5 da escala de Mac Farland (10<sup>8</sup> UFC/mL). Alíquotas de 0,1mL destas diluições foram semeadas em ágar MRS usando

*swab* estéril. Foi avaliada a sensibilidade das BAL aos principais antimicrobianos utilizados no tratamento de mastite: vancomicina 30 µg (VAN), ampicilina 10 µg (AMP), gentamicina 10 µg (GEN), amicacina 30 µg (AMI), eritromicina 15 µg (ERI), ceftriaxona 30 µg (CRO), estreptomicina 10 µg (EST), oxacilina 1 µg (OXA), penicilina G 10 U (PEN) e amoxicilina 10 µg (AMO). Após a disposição dos discos, as placas foram incubadas a 37°C por 48 h em aerobiose. Um paquímetro digital foi utilizado para posterior leitura dos diâmetros dos halos de inibição (Mitutoyo, Japão). A determinação da sensibilidade dos isolados de BAL foi feita pela comparação dos tamanhos dos halos de inibição medidos com o padrão de referência descrito por Charteris e col. (1998) e ANVISA (2005), no qual os isolados foram classificados em sensíveis, moderadamente sensíveis ou resistentes a cada antimicrobiano testado. Esse ensaio foi feito em duplicata para cada isolado.

#### 5.5.10 Ensaio de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelos isolados de BAL

A triagem de produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foi realizada de acordo com o método descrito por Juárez Tomás e col. (2004). Brevemente, culturas reativadas dos isolados de BAL foram estriadas em ágar MRS contendo 1 mM 3,3',5,5'- tetramethylbenzidine (TMB) (Sigma-Aldrich) e 2 U/mL de peroxidase tipo II *horseradish* (Sigma-Aldrich). As placas foram incubadas durante 48 h a 37°C em anaerobiose e em seguida foram abertas e expostas ao ar por 10 min. Os isolados foram classificados de acordo com a intensidade de cor das colônias, sendo isolados não produtores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aqueles que apresentaram colônias brancas e os produtores, colônias azuis ou até amarronzadas, de acordo com o aumento da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esse ensaio foi feito em duplicata para cada isolado.

#### 5.5.11 Ensaio de avaliação da atividade antagonista dos isolados de BAL contra patógenos da mastite

O ensaio para detecção do efeito antagonista dos isolados de BAL da glândula mamária bovina foi realizado pela técnica de difusão em camada dupla

de ágar, utilizando como patógenos reveladores bactérias relacionadas à etiologia da mastite. Entre as bactérias indicadoras foram usadas: isolados clínicos de *S. aureus* e *Streptococcus uberis* que foram gentilmente cedidos pelo prof. Dr. Nivaldo Silva da Escola de Veterinária- UFMG; isolados clínicos de *Streptococcus agalactiae* 8710, *Listeria innocua* 5830, *Staphylococcus capitis* 8246, *S. xylosus* 8671 e *S. sciuri* 8583 que foram gentilmente cedidos pelo Dr. Humberto de Mello Brandão da EMBRAPA-Gado de leite; e por fim as linhagens referência de *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *S. aureus* ATCC 29213, *S. agalactiae* ATCC 1381 e *E. coli* ATCC 25723. As linhagens patogênicas reveladoras foram ativadas com inóculo de 2% (v/v) em caldo BHI e crescidas em aerobiose a 37°C por 24 h. Os isolados de BAL foram reativados (item 5.5.2) e spots de 5 µL foram feitos na superfície de ágar MRS contido em placas contendo papel de filtro na tampa. As placas foram incubadas por um período de 24 h em anaerobiose a 37°C. Após o período de crescimento dos isolados, as placas foram retiradas da câmara de anaerobiose e os isolados expostos ao vapor de clorofórmio (1 mL em papel filtro), por 30 min, para promover a morte das células. Em seguida, as placas foram abertas, por 30 min, para evaporação do clorofórmio residual e uma sobrecamada de meio BHI contendo ágar semissólido (0,75%), previamente inoculado com as amostras reveladoras (patógenos), foi vertida sobre a placa contendo o spot de BAL. Posteriormente, as placas foram incubadas por um período de 24 h em aerobiose a 37°C e o diâmetro do halo de inibição de crescimento do patógeno revelador, formado ao redor do spot, foi medido com o auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo, Japão). Os isolados foram classificados em positivamente antagonistas, quando apresentavam halo de inibição, parcialmente antagonistas quando apresentavam halos de inibição nublados ou não antagonistas quando não produziam halo de inibição na sobrecamada reveladora. Além disso, o antagonismo de cada isolado de BAL foi expresso como porcentagem de antagonismo, definida como número de patógenos que foram inibidos dividido pelo número total de patógenos reveladores, multiplicado por 100. Esse ensaio foi feito em duplicata para cada isolado.



#### 5.5.12 Ensaio para identificação da presença de genes codificadores de fatores de virulência para mastite em isolados de BAL

A detecção da presença dos genes *agg*, *gelE*, *efa*, *cylA* e *cad* que codificam fatores de virulência comuns em bactérias causadoras de mastite foi avaliada nos isolados de BAL por PCR. Para isso, o DNA total dos isolados foi obtido conforme descrito no item 5.5.3.1. Cem (100) ng de DNA total dos isolados foram amplificados utilizando nas reações PCR Master Mix (Promega) e 1 µM dos pares de iniciadores para cada um dos genes avaliados. Os iniciadores e o tamanho de *amplicon* esperado para cada um dos genes estão sumarizados na TABELA 2. Foram utilizadas condições de ciclagem descritas por Espeche e col. (2012). Os *amplicons* foram resolvidos em eletroforese em gel de agarose 1,4% e visualizados em transluminador de UV, após coloração com brometo de etídeo. As amostras que apresentaram produtos amplificados para quaisquer um dos genes testados foram sequenciadas para confirmação da identidade dos *amplicons* usando os mesmos iniciadores empregados na amplificação por PCR e, seguindo o mesmo procedimento de sequenciamento descrito no item 5.5.3.3 seguido da pesquisa de similaridade realizada através da ferramenta BLASTn 2.125 da base de dados do *National Center of Biotechnology Information* GenBank (ALTSCHUL et al., 1997).

#### **5.6 Avaliação da capacidade de adesão, internalização, inibição da adesão e inibição da invasão de patógenos associados à etiologia da mastite e imunomodulação de isolados de BAL em modelo de co-cultivo com células MDA-MB-231**

Dez BAL que apresentaram características desejáveis nos testes de potencial probiótico *in vitro* foram selecionadas para ensaios em modelo de co-cultivo com células epiteliais da glândula mamária MDA-MB-231 ATCC®HTB-26™ (MDA-MB-231). Nestes ensaios, foram avaliadas as capacidades de adesão, internalização, inibição da adesão e inibição da invasão de patógenos associados à etiologia da mastite e imunomodulação de isolados de BAL.

TABELA 2 - Descrição das características dos iniciadores utilizados para avaliação da presença de fatores de virulência relacionados à mastite em BAL

Genes	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Tm	Tamanho do amplicon
<i>agg</i>	F: AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC R: AAACGGCAAGACAAGTAAATA	47	1553 pb
<i>gelE</i>	F: ACCCCGTATCATTGGTTT R: ACGCATTGCTTTTCCATC	59	419 pb
<i>efa</i>	F: GCCAATTGGGACAGACCCTC R: CGCCTTCTGTTCTTCTTTGGC	59	688 pb
<i>cylA</i>	F: TGGATGATAGTGATAGGAAGT R: TCTACAGTAAATCTTTCGTCA	47	517 pb
<i>cad</i>	F: CGTAGCATCTTCAGAAACG R: TGAGAATGTTGTGTGGTAGC	51	502 pb

Legenda: Tm – Temperatura de *melting* ou temperatura de anelamento. pb- pares de base  
F: *forward* e R: *reverse*.

### 5.6.1 Cultura de células epiteliais da glândula mamária MDA-MB-231

Os ensaios de co-cultivo em células MDA-MB-231 foram feitos em colaboração com o Laboratório de Genética Experimental – UFMG, coordenado pela profa. Dra. Adriana Abalen Martins Dias e desenvolvidos em parceria com o discente de doutorado MSc. João Paulo Nunes. Brevemente, criotubos contendo alíquotas de 1 mL das células congeladas, em nitrogênio líquido, foram descongelados em banho-maria a 37°C. As células descongeladas foram semeadas, utilizando tubos Falcon de 15 mL, em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Life Technologies), pré-aquecido a 37°C e, em seguida, centrifugadas a 500 x *g* por 3 min para remoção do DMSO usado no processo de criopreservação. Em seguida, o sobrenadante foi removido e o *pellet* de células foi gentilmente ressuspensionado no mesmo volume de meio RPMI 1640 suplementado. Por fim, a suspensão de células foi transferida para frasco de cultura celular T25 (TPP) e incubada em estufa com tensão de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. As células foram subcultivadas até atingirem confluência de 80%, necessária para sua utilização nos diferentes ensaios realizados neste trabalho.

### 5.6.2 Preparação das bactérias (BAL e patógenos) para ensaios em células MDA-MB-231

As suspensões bacterianas foram crescidas de acordo com o descrito no item 5.5.2 para BAL e 5.5.5 para bactérias patogênicas (*S. aureus* ATCC 29213 e *E. coli* ATCC 25723). Em seguida, as culturas foram lavadas 3 vezes em PBS por centrifugação a 5000 x g por 15 min. Logo após o descarte do sobrenadante, as bactérias foram ressuspensas no seu volume original em meio RPMI 1640 completo (sem adição de antibióticos) e, em seguida, diluídas 1:10 em RPMI 1640 completo para obtenção de uma concentração aproximada de  $1 \times 10^7$  UFC/mL.

### 5.6.3 Ensaio de avaliação da capacidade de adesão de BAL em células MDA-MB-231

Monocamadas confluentes de MDA-MB-231 ( $\sim 1,5 \times 10^5$  células/poço) foram crescidas em placas de cultivo celular de 24 poços (TPP) e foram inoculadas com BAL em uma taxa de interação (*ROI – ratio of interaction*) de 100 BAL: 1 célula MDA-MB-231. Depois de 1 h de co-cultivo, em estufa a 37°C com tensão de 5% CO<sub>2</sub>, as células foram lavadas 3 vezes com PBS pré-aquecido a 37°C. Após a lavagem, as monocamadas foram tratadas com tripsina (0,25% em água Miliq: Sigma-Aldrich) e foram lisadas com 1 mL de solução contendo 0,1% de Triton X-100 em PBS por 10 min. As bactérias foram recuperadas pela técnica padrão de contagem por plaqueamento. Os lisados foram diluídos serialmente em salina 0,9% e plaqueados em ágar MRS e as colônias foram enumeradas depois da incubação das placas por 48h em estufa microbiológica a 37°C. A adesão de BAL foi expressa como log<sub>10</sub> de UFC/mL de BAL recuperada de cada poço. Esse ensaio foi feito em quadruplicata para cada BAL testada.

#### 5.6.4 Ensaio de avaliação da capacidade de internalização de BAL em células MDA-MB-231

Essa técnica é baseada no fato que bactérias não internalizadas em células eucarióticas podem ser eliminadas através do uso, no meio de cultura do co-cultivo, de um antibiótico para o qual a bactéria seja sensível. Portanto, este ensaio usa da sensibilidade de cada linhagem bacteriana a um determinado antibiótico, que foi utilizado no meio para matar bactérias que estejam na superfície das células MDA-MB-231. Depois da etapa de lise celular, as bactérias que estavam protegidas dentro das células foram recuperadas fazendo-se o plaqueamento do lisado, e por isso foram correspondentes àquelas que entraram nas células epiteliais. Brevemente, monocamadas confluentes de MDA-MB-231 ( $\sim 1,5 \times 10^5$  células/poço) foram crescidas em placas de cultivo celular de 24 poços (TPP) e foram infectadas com BAL em *ROI* de 100:1, conforme descrito no item 5.6.3. A diferença é que depois de 1 h de co-cultivo as células foram lavadas 3 vezes com PBS pré-aquecido a 37°C e, então incubadas por mais 1 h com o meio RPMI-1640 completo suplementado com 100 µg/mL de Estreptomicina e 100 U/mL de Penicilina (Sigma-Aldrich). Esse passo tem como objetivo matar qualquer bactéria que esteja na superfície extracelular das células MDA-MB-231. Em seguida, foram realizadas lavagens e lise das células seguido do plaqueamento do lisado, conforme descrito no item 5.6.3. A invasão de BAL foi expressa como  $\log_{10}$  de UFC/mL de BAL recuperada de cada poço. Esse ensaio foi feito em quadruplicata para cada BAL testada.

#### 5.6.5 Ensaio de avaliação da capacidade de BAL em inibir a adesão de patógenos em células MDA-MB-231

Monocamadas confluentes de MDA-MB-231 ( $\sim 1,5 \times 10^5$  células/poço) foram crescidas em placas de cultivo celular de 24 poços (TPP) e foram infectadas com BAL em um *ROI* de 100:1 e com bactérias patogênicas em uma taxa de infecção (*MOI – multiplicity of infection*) de 10:1. A inoculação com BAL e infecção com bactérias patogênicas foi feita de forma simultânea. O controle do experimento foi realizado em poços infectados apenas com um dos patógenos, sem BAL. Foram usados como bactérias patogênicas *S. aureus*

ATCC 29213 e *E. coli* ATCC 25723. Depois de 1 h de co-cultivo, em estufa a 37°C com tensão de 5% CO<sub>2</sub>, as células foram lavadas 3 vezes com PBS pré-aquecido a 37°C. Em seguida, as monocamadas foram lavadas e lisadas pelos procedimentos descritos no item 5.6.3. Os lisados foram diluídos serialmente em salina 0,9% e plaqueados em ágar Manitol (Acumedia) para ensaios usando *S. aureus* e em ágar MacConkey (Acumedia) para os ensaios usando *E. coli* e, as colônias foram enumeradas depois da incubação das placas por 48h em estufa microbiológica a 37°C. Previamente, foi verificado que BAL não conseguem crescer nos referidos meios, que são seletivos para as bactérias patogênicas (dados não mostrados). A adesão de *S. aureus* e *E. coli* foi expressa de duas formas. A primeira como log<sub>10</sub> de UFC/mL de patógeno recuperado de cada poço (controles e experimentais, os últimos contendo também BAL). A segunda como porcentagem de adesão (BOUCHARD et al., 2013). Nessa segunda abordagem, os dados foram expressos como a porcentagem de bactéria aderida, definida como o número total de bactérias recuperadas nos poços experimentais, após uma hora de incubação em células MDA-MB-231, dividido pela média aritmética do número de bactérias recuperadas nos poços controle, multiplicado por 100. Nessa abordagem, a porcentagem de adesão dos poços controle fica definida como 100%. Esse ensaio foi feito em quadruplicata para cada BAL testada.

#### 5.6.6 Ensaio de avaliação da capacidade de BAL em inibir a invasão de patógenos em células MDA-MB-231

Monocamadas confluentes de MDA-MB-231 (~1,5 x 10<sup>5</sup> células/poço) foram crescidas em placas de cultivo celular de 24 poços (TPP) e foram inoculadas com BAL em um ROI de 100:1 e infectadas com bactérias patogênicas (*S. aureus* ATCC 29213 e *E. coli* ATCC 25723) em um MOI de 10:1, sendo que a infecção com BAL e patógenos foi feita simultaneamente, conforme descrito no item 5.6.5. Depois de 1 h de co-cultivo, em estufa a 37°C com tensão de 5% CO<sub>2</sub>, as células foram lavadas 3 vezes com PBS pré-aquecido a 37°C. Em seguida, o ensaio para avaliação de invasão em células MDA-MB-231 seguiu o mesmo procedimento apresentado no item 5.6.4, usando como poços controle aqueles nos quais apenas um dos patógenos foi adicionado. Os lisados obtidos

ao final do ensaio foram diluídos serialmente em salina 0,9% e plaqueados em ágar Manitol para ensaios usando *S. aureus* e em ágar MacConkey para ensaios usando *E. coli*. A invasão de *S. aureus* e de *E. coli* foi expressa de duas formas. A primeira como  $\log_{10}$  de UFC/mL de patógeno recuperado de cada poço (controles e experimentais, os últimos contendo também BAL). A segunda como porcentagem de invasão (BOUCHARD et al., 2013). Nessa segunda abordagem, os dados foram expressos como a porcentagem de bactéria invasoras, definida como o número total de bactérias recuperadas nos poços experimentais, após duas horas de incubação em células MDA-MB-231, dividido pela média aritmética do número de bactérias recuperadas nos poços controle, multiplicado por 100. Nessa abordagem, a porcentagem de invasão dos poços controle fica definida como 100%. Esse ensaio foi feito em quadruplicata para cada BAL testada.

#### 5.6.7 Ensaio de avaliação da capacidade de imunomodulação de BAL em células MDA-MB-231

Foi avaliada a expressão de mediadores da resposta imunológica após 1h de co-cultivo de BAL em células MDA-MB-231 na presença ou ausência de desafio com *S. aureus* ATCC 29213. Monocamadas confluentes de MDA-MB-231 ( $\sim 1,5 \times 10^5$  células/ poço) foram crescidas em placas de 24 poços (TPP) e foram infectadas com BAL em um *ROI* de 100:1 e *S. aureus* ATCC 29213 em um *MOI* de 10:1, sendo que a inoculação com BAL e do patógeno foi feita simultaneamente, conforme descrito no item 5.6.5. Portanto, para cada BAL avaliada existiram poços experimentais (com BAL e patógeno e outros apenas com BAL) e poços controle (apenas com patógeno e outros sem inóculo bacteriano, recebendo apenas meio RPMI 1640 completo). Depois de 1 h de co-cultivo, em estufa a 37°C com tensão de 5% CO<sub>2</sub>, as células foram lavadas 3 vezes com PBS pré-aquecido a 37°C. Em seguida, as monocamadas foram solubilizadas pela adição de TRIZOL<sup>®</sup> (Life Technologies) e a extração de RNA total das células foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA total obtido foi quantificado em NanoDrop (Thermo Scientific) e a análise de sua qualidade levou em conta a relação de DO<sub>260</sub>/DO<sub>280</sub> e a razão das bandas

dos rRNAs 18S:28S visualizadas em eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Em seguida, o RNA total foi submetido à remoção de DNA genômico usando o kit Turbo DNase I (Life Technologies), seguindo as recomendações do fabricante. Os RNAs tratados foram utilizados em reações de RT-qPCR para análise da expressão gênica de diferentes mediadores da resposta imune nas células MDA-MB-231 sendo eles: IL1 $\beta$ , IL8, IL10, Tgfb1 e Tnfa. Para normalização dos dados de expressão foram utilizados os genes referência Gapdh e Actb. Foi empregado o kit High Capacity (Life Technologies), seguindo as recomendações do fabricante, para produção de cDNA usado nas reações de qPCR. As reações de qPCR foram feitas na plataforma ABI 7900 HT REAL TIME PCR (Life Technologies) pertencente ao Departamento de Biologia Geral-ICB/UFMG. Essas reações foram realizadas usando o Kit SYBR Green PCR Master Mix 2x (Life Technologies) e os iniciadores descritos na TABELA 3.

Para padronização das reações foram feitas curvas de diluição seriada de cDNA utilizando pontos contendo 50 ng; 5 ng; 0,5 ng, 0,05 ng e 0,005 ng de cDNA. Nas reações de padronização foi empregada uma amostra de cDNA produzida a partir de um *pool* de amostras de RNA total de células de todos os grupos experimentais e controles adicionadas em igual proporção. Essas curvas de diluição foram feitas para cada um dos genes. Os padrões para avaliação da qualidade das reações foram a eficiência de amplificação e o perfil da curva de dissociação. As reações tiveram sua eficiência (E) calculada através da inclinação (*slope*) da curva de diluição (quantidade) do cDNA *versus* C<sub>q</sub> (ciclo de quantificação ou C<sub>t</sub>), através da equação (1):

$$E_{(\%)} = [(10)^{-1/slope} - 1] \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

A especificidade das reações foi avaliada através da curva de dissociação. Foram padronizadas condições, para cada um dos genes amplificados, com eficiência entre 90-110% e com um único pico nas curvas de dissociação. Em todas as reações de amplificação foi usado programa de ciclagem universal contendo um passo inicial de 50°C por 2 min; 95°C por 10 min seguido por 40 ciclos, cada um contendo um passo de 95°C por 15 seg e outro

de 60°C por 1 min. Após a reação de amplificação a curva de dissociação foi obtida através das etapas de aquecimento, resfriamento e aquecimento sucessivas (95°C por 15 seg, 60°C por 15 seg e 95°C por 15 seg). As reações foram realizadas em placas MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate fechadas com selante MicroAmp® Optical Adhesive Film (Life Technologies). As quantidades de iniciador (em µM) padronizadas e a eficiência de amplificação para cada um dos genes amplificados estão sumarizadas na TABELA 3. Para assegurar uma normalização adequada dos dados de expressão relativa dos genes codificadores de mediadores da resposta imune, foi avaliado o possível efeito do contato da célula MDA-MB-231 com as BAL e com *S. aureus* ATCC 29213 sobre a expressão relativa dos genes de referência Gapdh e Actb. Para este fim, os dados de amplificação ( $C_q$ ) destes genes em amostras de todos os tratamentos e controles foram submetidos ao método do  $2^{-\Delta C_q}$ , no qual  $\Delta C_q = (C_q \text{ do gene de referência na amostra teste}) - (C_q \text{ do gene de referência no calibrador})$  (LIVAK & SHIMITTGEN, 2001). Uma adaptação desta abordagem foi feita para inserção do valor real de eficiência ( $1+E_{(\%)}$ ) no lugar da base 2, que predispõe eficiência de amplificação do gene normalizador de 100%. Nessa abordagem é calculado um valor relativo da expressão do gene referência em relação ao grupo usado como calibrador da expressão relativa. O grupo calibrador da análise de expressão gênica foi composto pelos poços sem inóculo bacteriano (poços que receberam apenas meio RPMI 1640). Depois de calculado o valor relativo de expressão para todos os tratamentos, foi feito um teste estatístico para averiguar se existem diferenças significativas da expressão do gene referência entre os diferentes tratamentos. Caso elas existam, o gene referência em questão sofre efeito em sua expressão do tratamento experimental, inviabilizando sua aplicação como gene normalizador.

Para obtenção dos dados de nível relativo de expressão (NRE), foi empregado o método derivado do RQ (*relative quantification*) =  $2^{\Delta \Delta C_q}$  (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001), descrito por Hellemans e col. (2007) usando a equação (2):

$$NRE_x = \frac{[E_x]^{\Delta C_{q_x} (C_{q_x} \text{ calibrador} - C_{q_x} \text{ amostra teste})}}{n \sqrt{\prod^n [E_{ref}]^{\Delta C_{q_{ref}} (C_{q_{ref}} \text{ calibrador} - C_{q_{ref}} \text{ amostra teste})}}} \quad (\text{Equação 2})$$



Foi usado como calibrador os dados de expressão dos poços sem inóculo bacteriano (poços que receberam apenas meio RPMI 1640). Os resultados foram expressos graficamente usando média e erro-padrão dos valores do nível relativo de mRNA de cada citocina/normalizado pelo fator de normalização, este último dado pela média geométrica das quantidades relativas de mRNA de Gapdh e Actb, para cada tratamento.

TABELA 3 – Descrição dos iniciadores e condições utilizadas na RT-qPCR para avaliação da expressão gênica de mediadores da resposta imune em células MDA-MB-231

Gene	Sequência do iniciador (5'-3')	Tm	[ <i>primer</i> ] ( $\mu$ M)	E (%)	Referência
<b>Genes alvo de quantificação</b>					
IL1 $\beta$	F CTG ATG GCC CTA AAC AGA TGA AG R GGT CGG AGA TTC CGT AGC AGC TGG AT	60	0,75	90	Consoli et al., 2015
IL8	F GCA GAG GGT TGT GGA GAA GTT T R TTG GAT ACC ACA GAG AAT GAA TTT TTY	60	0,75	108	*
IL10	F GGG AGA ACC TGA AGA CCC TCA R TGC TCT TGT TTT CAC AGG GAA G	60	0,75	98	Consoli et al., 2015
Tgfb1	F GAG CCT GGA CAC GCA GTA CA R CCC GGG TTA TGC TGG TTG T	60	0,75	99	Consoli et al., 2015
Tnfa	F CAA GCC TGT AGC CCA TGT TGT R TTG GCC AGG AGG GCA TT	60	1	104	*
<b>Genes de referência</b>					
Gapdh	F TGG GTG TGA ACC ATG AGA AG R GCT AAG CAG TTG GTG GTG C	60	0,5	100	Consoli et al., 2015
Actb	F GGA TGC AGA AGG AGA TCA CTG R CGA TCC ACA CGG AGT ACT TG	60	0,5	96	Consoli et al., 2015

**Legenda:** Tm – Temperatura de *melting* ou temperatura de anelamento.

F: *forward* e R: *reverse*.

[Iniciador] – concentração do par de iniciadores no volume da reação final, em  $\mu$ M.

E (%) – eficiência de amplificação do gene, em %, padronizada por curvas de diluição de cDNA.

\* Iniciadores cedidos pelo Laboratório de Genética Experimental, desenvolvidos pelos próprios pesquisadores e ainda não publicados (comunicação pessoal).

## 5.7 Análises estatísticas

Para os dados de microbioma, todos os gráficos foram gerados com auxílio do pacote *phyloseq* disponível no programa R (R Development Core Team, 2016). Como cada amostra sequenciada representava um *pool* de

diferentes animais de uma mesma raça e ou de uma mesma fazenda com ou sem mastite subclínica, não foi possível comparar estatisticamente as diferenças observadas no tocante à abundância relativa dos diferentes grupos taxonômicos analisados.

Para os dados de isolamento de BAL, avaliação do potencial probiótico dos isolados de BAL nos testes *in vitro* e nos ensaios de co-cultivo foram gerados gráficos usando o software GraphPad Prism® 6 (GraphPad Software Inc.). Para os dados referentes ao isolamento de BAL e avaliação do potencial probiótico *in vitro* dos isolados de BAL, não foram feitas análises estatísticas, pois estes dados foram apenas descritivos para os objetivos traçados nesta tese. Porém, algumas análises de correlação foram realizadas entre algumas das características de superfície celular dos isolados de BAL e capacidade de produção de biofilme. Nestes casos, as análises de correlação entre as variáveis citadas foram verificadas utilizando o teste de correlação de Pearson, sendo considerados significativamente correlacionadas variáveis cujo o teste apresentasse como resultado  $p < 0,05$ . Variáveis diretamente correlacionadas apresentaram sinal do coeficiente de correlação de Pearson positivo e aquelas inversamente correlacionadas apresentaram sinal do coeficiente de correlação de Pearson negativo.

Para os dados da avaliação do potencial probiótico dos isolados de BAL em testes de co-cultivo foram feitas análises estatísticas específicas. Neste caso, os dados obtidos de contagens bacterianas expressos em log UFC/mL ou porcentagem de bactérias aderidas ou internalizadas foram avaliados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade das distribuições. Foram obtidos as médias, desvios-padrão e coeficientes de variação para cada conjunto de dados. Os dados que apresentaram distribuição normal, foram analisados pelo teste one-way ANOVA para cada conjunto de dados em cada tipo de ensaio, com o intuito de verificar se houveram diferenças estatisticamente significativas entre as variâncias, e o pós-teste de Tukey, de múltiplas comparações, para verificar quais médias foram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Para os dados que não apresentaram distribuição normal foi empregado o teste de Kruskal-Wallis com o pós-teste de Dunn, de múltiplas comparações, com os mesmos objetivos.

## 6. RESULTADOS

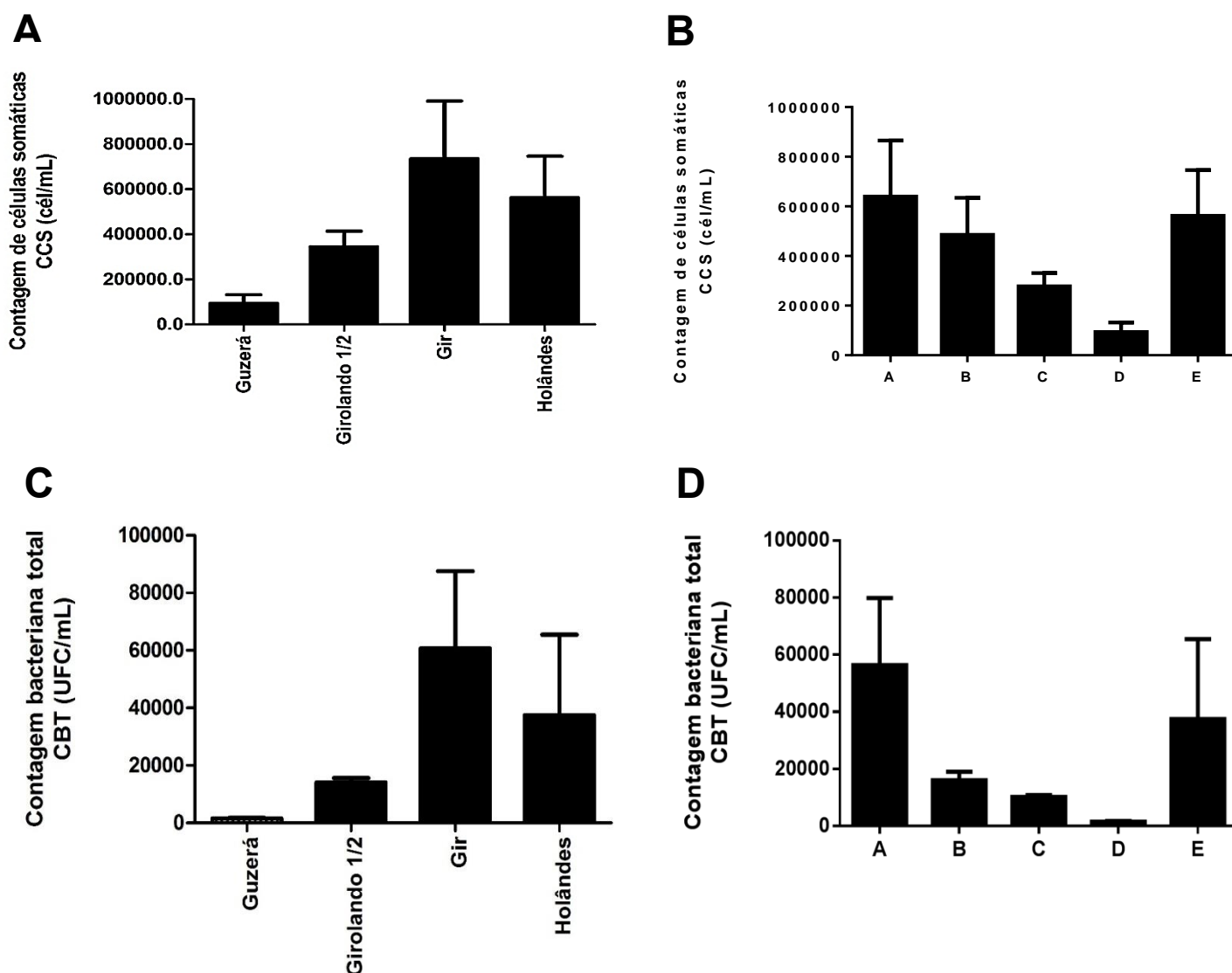
### 6.1 Caracterização da amostragem (animais e fazendas)

Na amostragem total, usada para avaliação da microbiota da glândula mamária, foram obtidas amostras de leite de 200 animais das raças Guzerá, Holandês, Gir e Girolando 1/2 de 5 fazendas. A análise de CCS mostrou que 69 animais (3 da raça Guzerá, 13 da raça Holandês, 18 da raça Gir e 35 da raça Girolando 1/2), ou seja 34,5%, apresentavam CCS > 200.000 cel/mL e, portanto, foram classificados como apresentando mastite subclínica. Foi observada uma ligeira diferença na porcentagem de animais com CCS > 200.000 cel/mL entre as raças amostradas. As porcentagens de animais com mastite subclínica nas diferentes raças bovinas foram de 16,7% em Guzerá, 32,5% em Holandês, 36% em Gir e 38,1% em Girolando 1/2. A porcentagem de animais doentes da raça Gir entre as duas fazendas amostradas foi ligeiramente diferente com 38,4% na Fazenda A e 27,7% na Fazenda B. Na raça Girolando 1/2 diferenças mais expressivas na porcentagem de animais com CCS > 200.000 cel/mL foram observadas entre as fazendas, com 22,3% na Fazenda A, 36,0% na Fazenda B e 44,9% na Fazenda C. Na amostra total de 200 animais, a média de CCS encontrada foi de  $456.790,5 \pm 567.672,2$  cel/mL e uma CBT média de  $29.437,3 \pm 39.186,6$  UFC/mL. Entre os animais saudáveis foi encontrada uma média de CCS de  $70.489,2 \pm 78.510,1$  e uma CBT de  $7.572,2 \pm 5.387,2$  UFC/mL enquanto que entre os animais com mastite subclínica foi encontrada uma CCS de  $1.158.662,2 \pm 959.983,7$  e uma CBT de  $69.364,7 \pm 96.031,4$  UFC/mL. A variação das CCS e CBT de acordo com as raças e fazendas amostradas é apresentada na FIGURA 5. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre as CCS e CBT enumeradas nas diferentes raças e fazendas amostradas.

Entre os 200 animais amostrados para a análise da microbiota, 115 animais, aleatoriamente escolhidos, foram também utilizados para o isolamento de BAL a partir de amostras de leite e do *swab* intramamário. Nesta sub-amostra, 40 animais (3 da raça Guzerá, 13 da raça Holandês, 11 da raça Gir e 13 da raça Girolando 1/2), ou seja, 34,78% do total, apresentaram CCS > 200.000 cel/mL de leite. Essa sub-amostra apresentou características muito similares com

relação aos dados de CCS e CBT apresentados para a amostra total e também não apresentou diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) nessas variáveis entre as diferentes raças e fazendas amostradas, como pode ser observado na FIGURA 6.

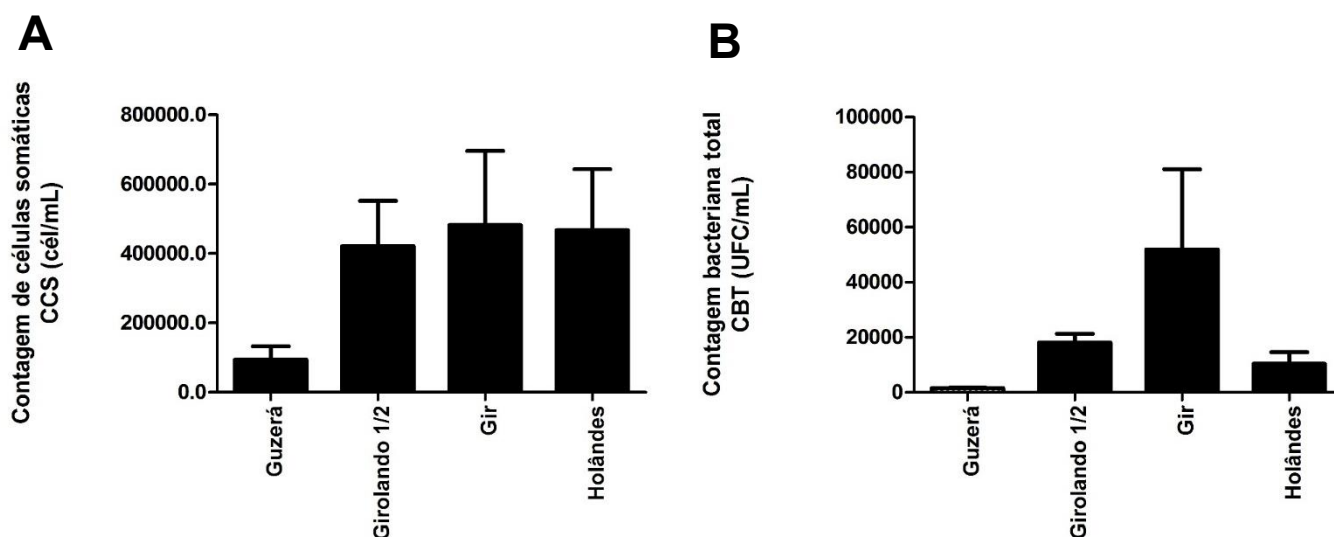
FIGURA 5 - Contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) na amostra total para avaliação da microbiota da glândula mamária



**Legenda:** A contagem de células somáticas (CCS) e a contagem bacteriana total (CBT) foram determinadas pelo equipamento Bentley Combi System 2300®, que se baseia no princípio de contagem eletrônico fluoro-ótico em citometria de fluxo. As barras verticais representam os erros-padrão das médias. Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre as fazendas ou raças analisadas foram identificadas nos gráficos com letras diferentes localizadas acima da barra de desvio-padrão. Ausências de letras sobre as barras ou presença de letras iguais sinalizam inexistência de diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ). **A** e **C**: apresentam respectivamente, CCS e CBT, avaliada nas 200 vacas que compõem a amostra da avaliação de microbiota, de acordo com a raça dos animais, sendo  $n = 18$  para Guzerá,  $n = 92$  para Girolando 1/2,  $n = 50$  para Gir e  $n = 40$  para Holândes; **B** e **D**: apresentam respectivamente, CCS e CBT, avaliada nas 200 vacas que compõem a amostra da avaliação de microbiota, de acordo com a fazenda dos animais, sendo:  $n = 57$  para Faz. A,  $n = 36$  para Faz. B,  $n = 49$  para Faz. C,  $n = 18$  para Faz. D e  $n = 40$  para Faz. E.

A única fazenda que apresentava sistema intensivo e de confinamento em seu manejo foi a Fazenda E, na qual foram coletadas todas as amostras dos animais da raça Holandês. Nesta fazenda, os animais recebiam volumoso no cocho o ano todo, que era basicamente composto de silagem de milho e feno. As demais fazendas possuíam o sistema semiextensivo de manejo, com animais se alimentando a pasto na estação chuvosa e recebendo volumoso no cocho no inverno. Basicamente, o volumoso de inverno nessas fazendas foi a silagem de milho, com exceção da Fazenda B onde também foi misturado ao volumoso de inverno cana-de-açúcar e, da Fazenda C, na qual o volumoso de inverno foi constituído apenas de cana-de-açúcar. Com relação ao tipo de ordenha, apenas a Fazenda D, na qual foram coletadas todas as amostras dos animais da raça Guzerá, tinha ordenha manual, e na Fazenda A apenas os animais da raça Gir eram ordenhados manualmente. Nesses dois casos a ordenha acontecia com o bezerro “ao pé” da vaca. Na Fazenda B a ordenha era mecânica, mas os bezerros tinham contato com as mães após a ordenha, mamando o leite residual presente na glândula. Nas fazendas C e E, e nos animais Girolando 1/2 da Fazenda A, a ordenha era mecanizada e as vacas não tinham mais contato com os bezerros após o nascimento.

FIGURA 6 - Contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) na amostra de isolamento de bactérias do ácido láctico (BAL)



**Legenda:** A contagem de células somáticas (CCS) e a contagem bacteriana total (CBT) foram determinadas pelo equipamento Bentley Combi System 2300®, que se baseia no princípio de contagem eletrônico fluoro-ótico em citometria de fluxo. As barras verticais representam os erros-padrão das médias. Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre as fazendas ou raças analisadas foram identificadas nos gráficos com letras diferentes localizadas acima da barra de desvio-padrão. Ausências de letras sobre as barras ou presença de letras iguais sinalizam inexistência de diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ). **A:** apresenta CCS e **B:** apresenta CBT, avaliada nas 151 vacas que compõem a amostra do isolamento de bactérias do ácido láctico (BAL) a partir de amostras de leite e swab intramamário, de acordo com a raça dos animais, sendo  $n = 18$  para Guzerá,  $n = 43$  para Girolando 1/2,  $n = 34$  para Gir e  $n = 20$  para Holândês.

## 6.2 Microbiota da glândula mamária bovina

O sequenciamento de alto rendimento de *amplicons* gerados a partir das regiões V3-V4 do gene codificador do rRNA 16S, amplificados com base em amostras de DNA genômico bacteriano de leite cru de 200 vacas, realizado na plataforma Illumina Miseq, produziu um total de 1.170.289 sequências após o processamento e controle de qualidade das *paired-end* sequências geradas. Em média, foram produzidas 146.286,13±39.899,64 sequências por amostra, e o número de sequências geradas respectivamente, nos *pools* de amostras dos animais Gir saudáveis ( $n=32$ ) e doentes ( $n=18$ ); Girolando 1/2 saudáveis ( $n=52$ ) e doentes ( $n=35$ ), Guzerá saudáveis ( $n=15$ ) e doentes ( $n=3$ ); Holandês saudáveis ( $n=27$ ) e doentes ( $n=13$ ) estão mostrados na TABELA 4. Foram denominados animais doentes aqueles acometidos com mastite subclínica, os quais apresentavam CCS > 200.000 cel/mL de leite.

TABELA 4 - Dados do sequenciamento das regiões V3-V4 do gene rRNA 16S em amostras de DNA de leite cru

Amostras ( <i>pool</i> )	Gir-d	Gir-s	Giro-d	Giro-s	Guz-d	Guz-s	Hol-d	Hol-s
Total de sequências	155.710	187.912	189.659	143.751	95.032	167.191	80.323	150.711
OTUs identificadas	101.844	160.752	139.879	107.537	76.705	136.200	66.206	123.604
BAL (%) / total de OTUs em gênero*	1,65	2,91	1,43	4,18	0,55	1,23	23,13	7,29
% <i>Lactobacillus</i> / BAL**	2,35	2,00	0,52	1,72	57,06	23,45	0,67	1,22
% <i>Lactococcus</i> / BAL**	13,30	33,23	17,12	17,85	4,91	1,11	92,09	88,43
% <i>Leuconostoc</i> / BAL**	0,57	2,61	0,12	0,34	0,00	0,16	0,00	0,01
% <i>Pediococcus</i> / BAL**	3,69	3,73	0,35	8,67	1,53	1,19	0,04	0,01
% <i>Streptococcus</i> / BAL**	37,72	26,52	61,69	47,44	22,09	37,96	5,05	1,13
% <i>Enterococcus</i> / BAL**	34,99	19,25	19,50	20,26	13,50	35,90	2,00	7,98
% <i>Weissella</i> / BAL**	7,38	12,65	0,70	3,72	0,92	0,24	0,16	1,22

**Legenda:** Dados do sequenciamento da microbiota da glândula mamária bovina a partir de amostras de DNA obtido de leite cru de 200 animais das raças Gir saudáveis (Gir-s),  $n=32$  e doentes (Gir-d),  $n=18$ ; Girolando 1/2 saudáveis (Giro-s),  $n=52$  e doentes (Giro-d);  $n=35$ , Guzerá saudáveis (Guz-s),  $n=15$  e doentes (Guz-d),  $n=3$ ; Holandês saudáveis (Hol-s),  $n=27$  e doentes (Hol-d),  $n=13$ . São denominados como doentes animais que estavam acometidos com mastite subclínica, os quais apresentavam CCS > 200.000 cel/mL de leite.

\* abundância relativa em porcentagem (%) dos gêneros classificados não-filogeneticamente como BAL em relação ao total de OTUs identificadas em nível de gênero;

\*\* abundância relativa em porcentagem (%) de cada gênero em relação ao total de OTUs classificadas como BAL.

Um total de 14.979 OTUs foi identificado pelo pareamento aleatório das 1.170.289 sequências contra sequências depositadas no banco de dados SILVA (QUAST et al., 2013). As 14.979 OTUs identificadas pertencem a 21 filos, 49 classes, 92 ordens, 177 famílias e 512 gêneros bacterianos. O número de OTUs que foram identificadas em nível de espécie foi muito baixo (aproximadamente 8%) e por isso análises em nível de espécie foram descartadas. As análises ecológicas e de comparação de composição entre as amostras foram feitas com a composição de OTUs classificadas em nível de gênero, por ser este o nível taxonômico mais específico com mais de 80% das OTUs classificadas em todas as amostras. A composição taxonômica das amostras de cada raça (Gir, Girolando 1/2, Guzerá e Holandês) e estado de saúde do úbere (saudável ou doente – com mastite subclínica) estão mostrados na FIGURA 7. Entre os 21 filos identificados, 7 foram os mais abundantes em todas as raças, com destaque para Firmicutes e Proteobacteria que, juntos, representavam mais de 75% das OTUs identificadas. Com exceção da raça Guzerá, as demais raças apresentaram aumento na abundância relativa dos membros do filo Firmicutes e redução dos membros do filo Proteobacteria em animais doentes em comparação com animais saudáveis (FIGURA 7A).

Entre as 49 classes reconhecidas, as mais abundantes foram Bacilli e Gammaproteobacteria, sendo a primeira mais abundante nas raças Gir, Girolando 1/2 e Holandês e a segunda mais abundante na raça Guzerá. Em animais doentes observou-se uma redução da abundância relativa de Gammaproteobacteria e aumento da abundância de Bacilli, exceto na raça Guzerá (FIGURA 7B).

A raça Gir apresentou abundância relativa dominada (mais de 60%) por membros das ordens Pseudomonadales e Bacillales os quais reduziram e aumentaram, respectivamente, sua abundância na comparação de amostras de animais doentes com os saudáveis. Essa mesma tendência foi observada também na raça Girolando 1/2, acompanhada pela redução da abundância dos membros da ordem Lactobacillales e aumento da abundância dos membros da ordem Enterobacteriales na comparação de animais doentes e saudáveis. Não foi percebida nenhuma alteração significativa em nível de ordem na abundância relativa entre animais saudáveis e doentes da raça Guzerá, que apresentaram

como ordens mais prevalentes a Pseudomonadales, Xanthomonadales e Rhizobiales. Na raça Holandês foi verificado que a abundância relativa, em nível de ordem, foi dominada por Lactobacillales, Pseudomonadales, Bacillales e Micrococcales. Em animais doentes da raça Holandês, foi observado um aumento na abundância relativa dos membros da ordem Bacillales e Lactobacillales e, uma redução da abundância dos membros Pseudomonadales e Micrococcales em comparação com a composição relativa de animais saudáveis desta raça (FIGURA 7C).

Entre as 177 famílias identificadas, alterações na composição relativa de 5 delas entre animais saudáveis e doentes chamaram atenção. Com exceção da raça Guzerá, todas as demais raças apresentaram aumento na composição relativa de membros da família Staphylococcaceae em animais doentes. Além disso, na raça Gir e Holandês foi verificada uma redução na abundância dos membros da família Moraxellaceae e na raça Girolando 1/2 dos membros da família Pseudomonadaceae em animais doentes. Na raça Girolando 1/2 foi observado ainda um aumento na abundância relativa dos membros da família Enterobacteriaceae e, da família Streptococcaceae na raça Holândes, em animais doentes em comparação com os animais saudáveis das respectivas raças (FIGURA 7D).

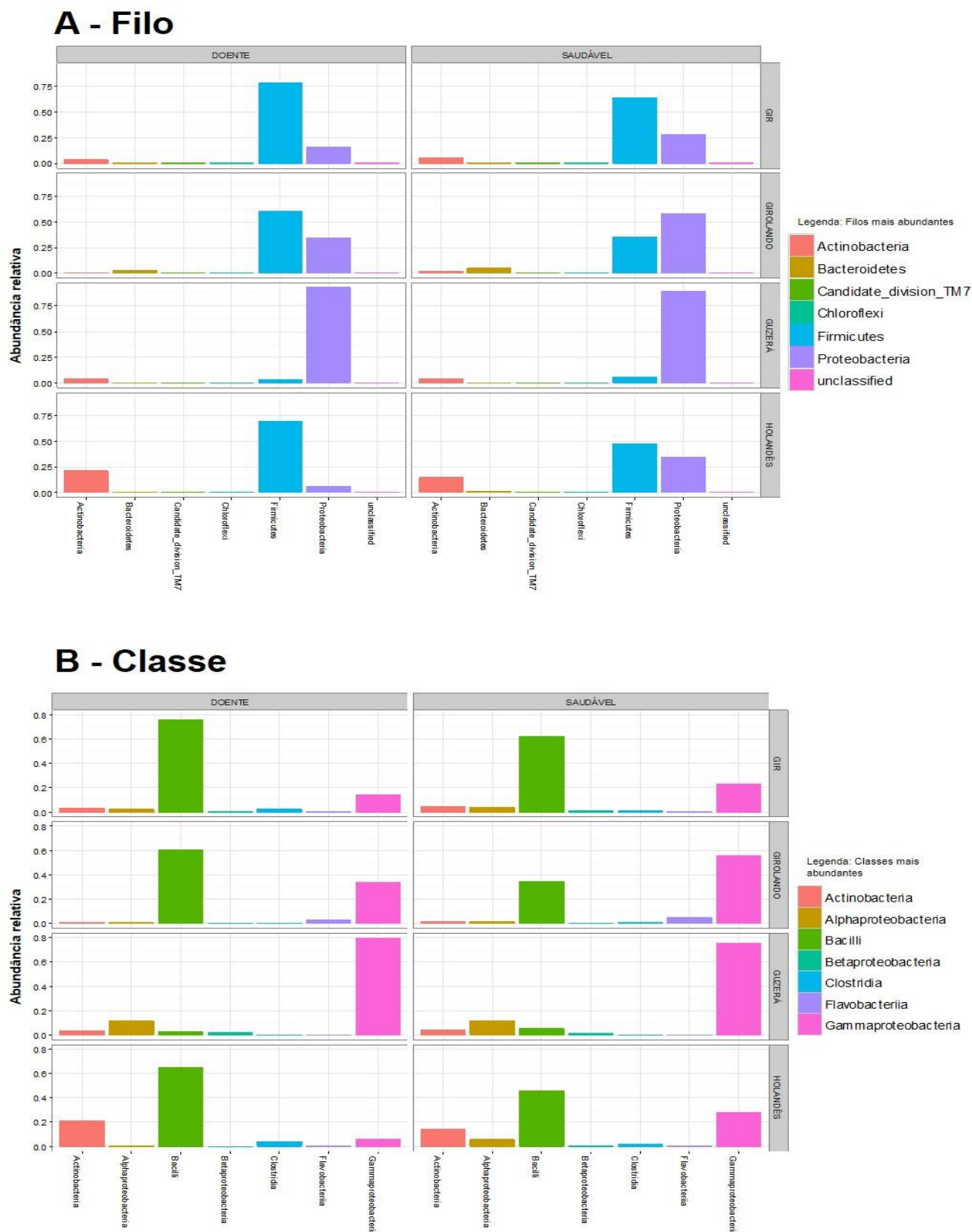
A composição em nível de gênero, observando os 10 gêneros mais prevalentes nas OTUs identificadas em cada raça, mostrou que apenas os gêneros *Acinetobacter* e *Staphylococcus* estavam presentes entre os 10 mais prevalentes em todas as raças analisadas e os gêneros *Streptococcus* e *Stenotrophomonas* entre os 10 mais abundantes nas raças Gir, Girolando 1/2 e Guzerá. Na raça Gir a composição em nível de gênero foi dominada por *Staphylococcus* e *Acinetobacter* que aumentaram e diminuíram, respectivamente, sua abundância relativa em animais doentes em comparação com saudáveis. Na raça Girolando 1/2 foi observado que em animais doentes a abundância relativa de membros do gênero *Staphylococcus* foi o dobro e a abundância relativa dos membros de *Pseudomonas* caiu pela metade em comparação com a abundância relativa destes gêneros em animais saudáveis. Interessantemente, a raça Guzerá apresentou a maior abundância relativa de OTUs não classificadas em nível de gênero (aproximadamente 25%) em



comparação com as outras raças. Além disso, não houveram alterações na abundância relativa observada em animais doentes e saudáveis, que foi dominada por *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas* e *Staphylococcus*. O gênero *Stenotrophomonas* apenas apresentou abundância relativa acima de 20% na raça Guzerá. Por fim, a raça Holandês apresentou uma composição mais homogênea na abundância relativa dos 10 gêneros mais prevalentes em comparação com a composição das demais raças. Em animais doentes desta raça foi observado uma redução drástica da abundância de *Acinetobacter* e um aumento de *Escherichia-Shigella*, *Lactococcus*, *Staphylococcus* e *Ornithinimicrobium* em comparação com a abundância destes gêneros em animais saudáveis (FIGURA 7E).

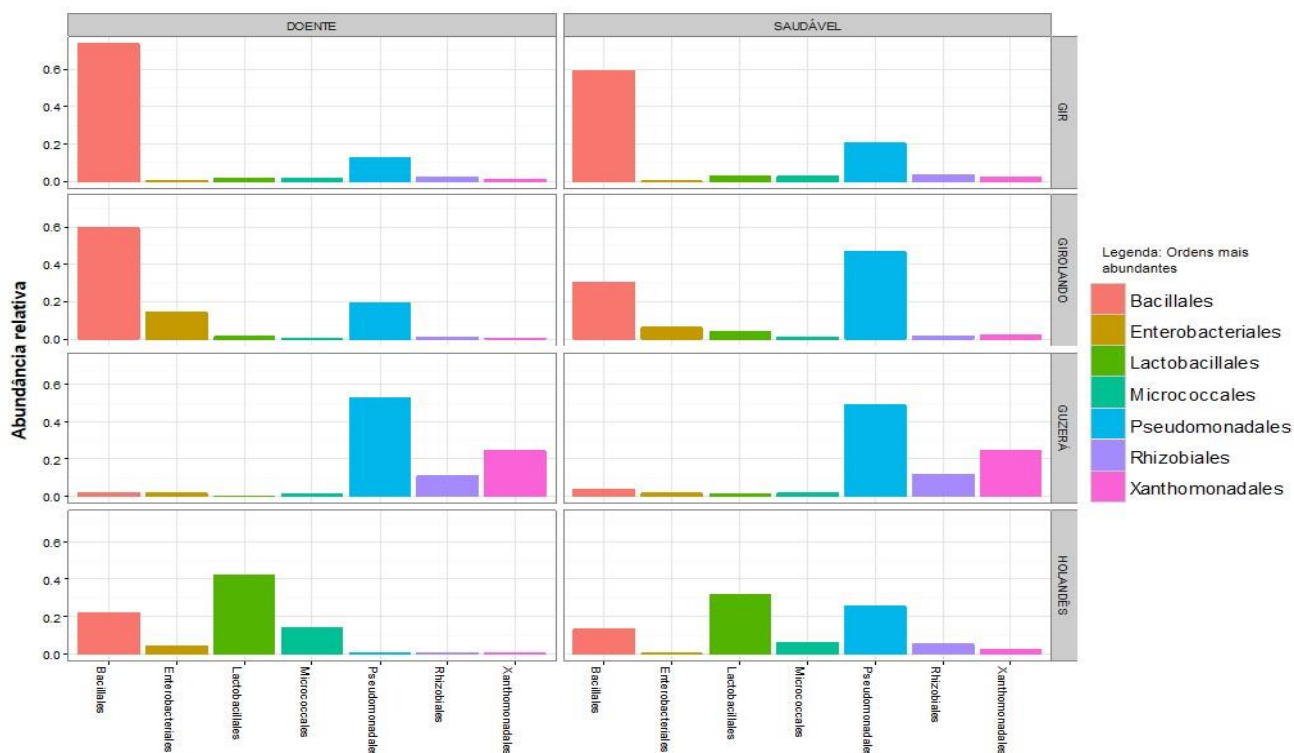
A abundância relativa média dos gêneros classificados não-filogeneticamente como BAL foi de  $5,29 \pm 7,52\%$ . A maior abundância relativa de BAL foi na raça Holandês (7,29% em animais saudáveis e 23,13% em animais doentes) e a menor na raça Guzerá (1,23% em animais saudáveis e 0,55% em animais doentes). A FIGURA 8 apresenta o perfil de composição de BAL das raças e estados de saúde do úbere e os dados individuais de composição de BAL estão mostrados na TABELA 4.

FIGURA 7 - Abundância relativa em diferentes níveis taxonômicos da composição da microbiota da glândula mamária bovina

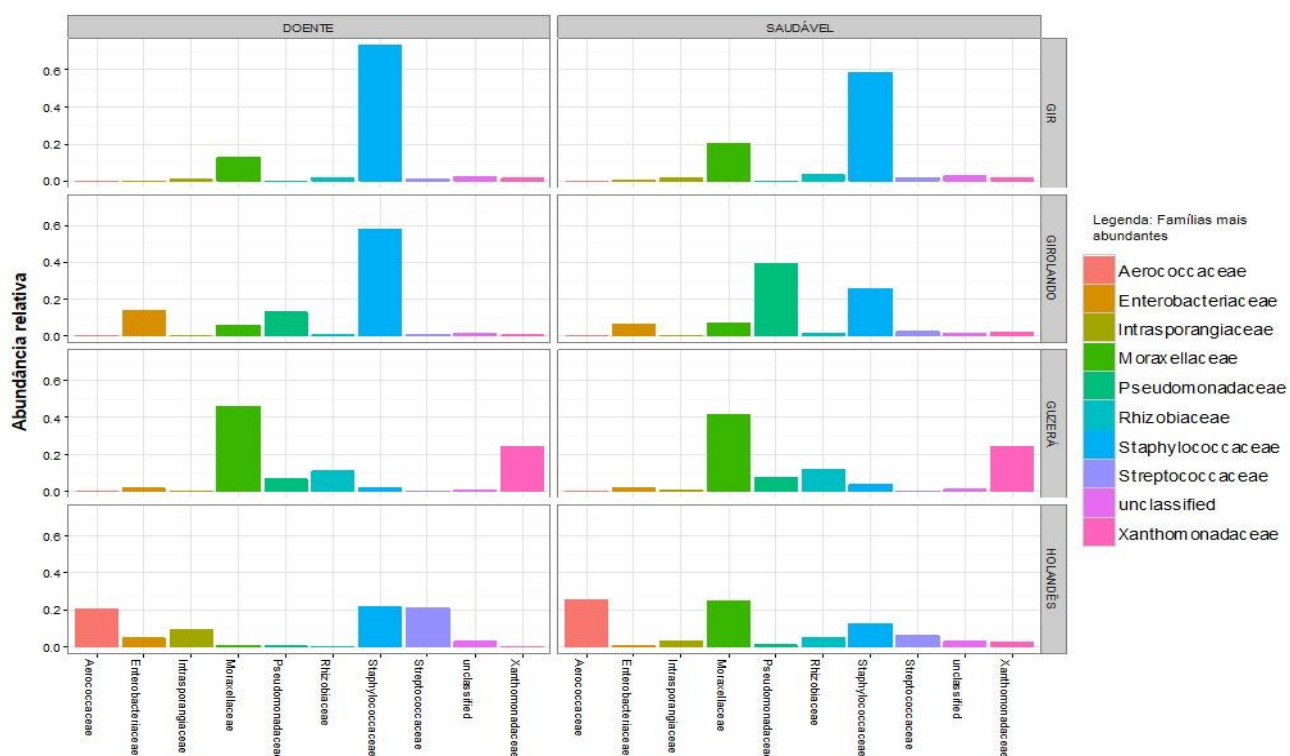


**Legenda:** Diferenças taxonômicas na composição da microbiota da glândula mamária bovina em 200 animais das raças Gir (saúdáveis,  $n=32$  e doentes,  $n=18$ ); Girolando 1/2 (saúdáveis,  $n=52$  e doentes,  $n=35$ ), Guzerá (saúdáveis,  $n=15$  e doentes,  $n=3$ ); Holandês (saúdáveis,  $n=27$  e doentes,  $n=13$ ). Os gráficos apresentam a comparação de abundância relativa entre: os 7 filos mais abundantes (A); as 7 classes mais abundantes (B); as 7 ordens mais abundantes (C); as 10 famílias mais abundantes (D) e os 10 gêneros mais abundantes (E). São denominados como doentes animais que estavam acometidos com mastite subclínica, os quais apresentavam CCS > 200.000 cel/mL de leite. Os gráficos foram gerados com auxílio do pacote *phyloseq* disponível no programa R (R Development Core Team, 2016).

### C - Ordem

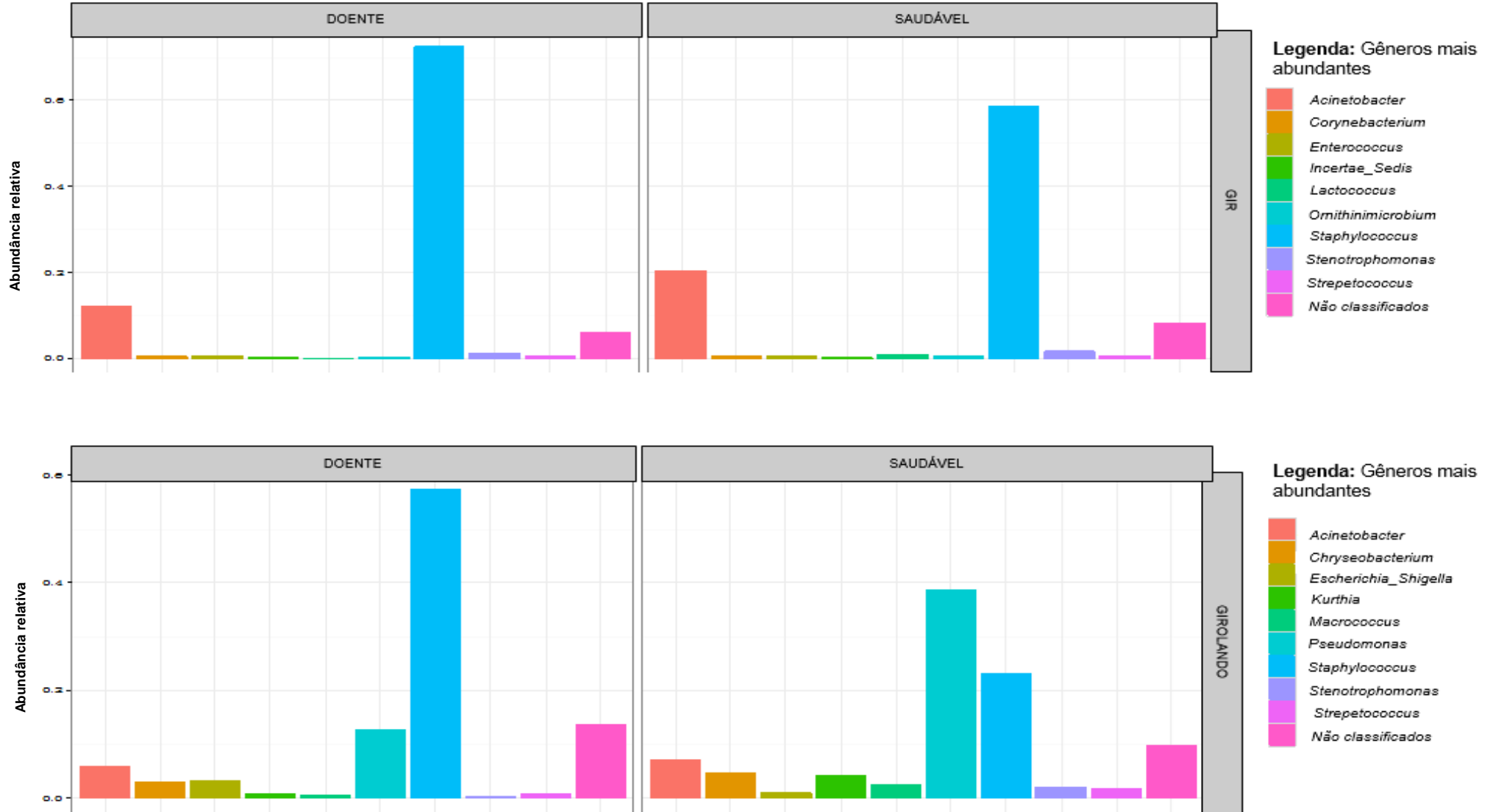


### D - Família

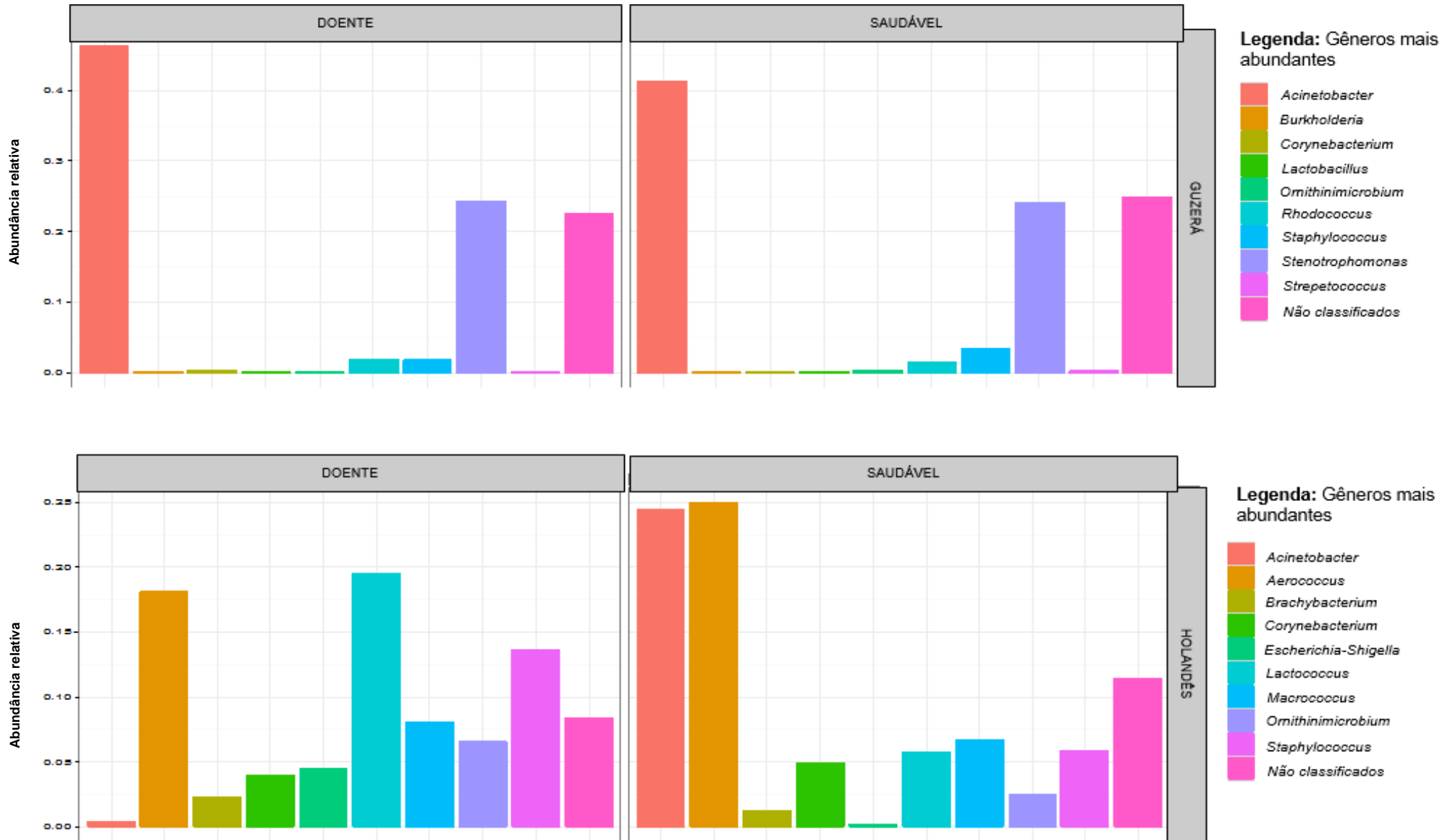


**Legenda:** Diferenças taxonômicas na composição da microbiota da glândula mamária bovina em 200 animais das raças Gir (saudáveis,  $n=32$  e doentes,  $n=18$ ); Girolando 1/2 (saudáveis,  $n=52$  e doentes,  $n=35$ ), Guzerá (saudáveis,  $n=15$  e doentes,  $n=3$ ); Holandês (saudáveis,  $n=27$  e doentes,  $n=13$ ). Os gráficos apresentam a comparação de abundância relativa entre: os 7 filos mais abundantes (A); as 7 classes mais abundantes (B); as 7 ordens mais abundantes (C); as 10 famílias mais abundantes (D) e os 10 gêneros mais abundantes (E). São denominados como doentes animais que estavam acometidos com mastite subclínica, os quais apresentavam CCS > 200.000 cel/mL de leite. Os gráficos foram gerados com auxílio do pacote *phyloseq* disponível no programa R (R Development Core Team, 2016).

## E - Gênero

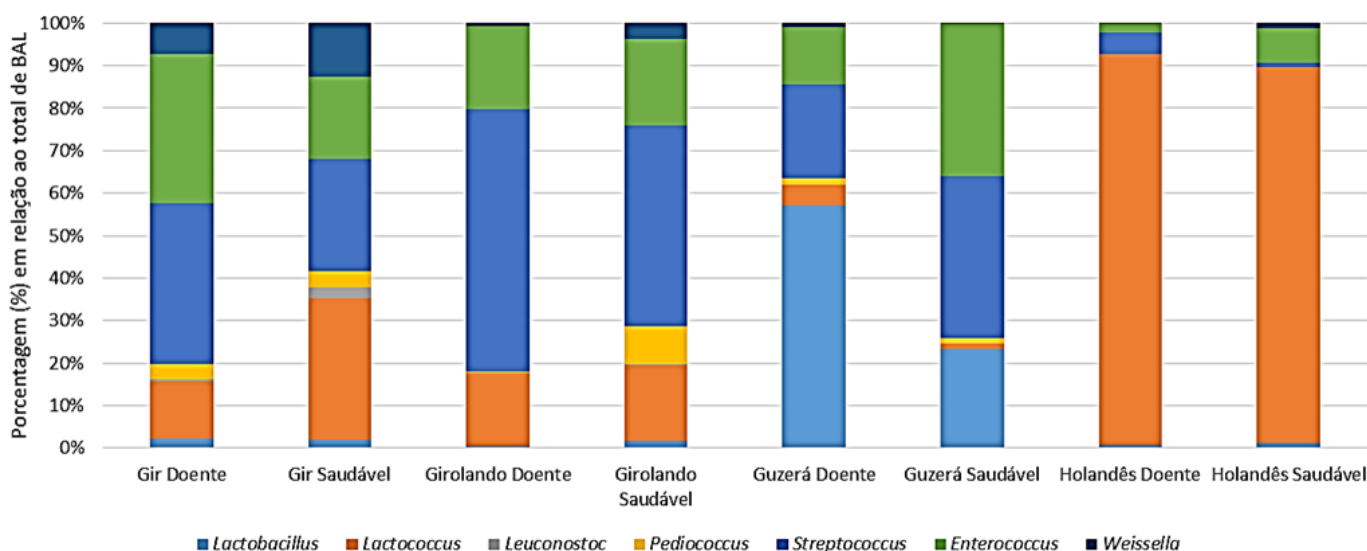


**Legenda:** Diferenças taxonômicas na composição da microbiota da glândula mamária bovina em 200 animais das raças Gir (saudáveis,  $n=32$  e doentes,  $n=18$ ); Girolando 1/2 (saudáveis,  $n=52$  e doentes,  $n=35$ ), Guzerá (saudáveis,  $n=15$  e doentes,  $n=3$ ); Holandês (saudáveis,  $n=27$  e doentes,  $n=13$ ). Os gráficos apresentam a comparação de abundância relativa entre: os 7 filós mais abundantes (A); as 7 classes mais abundantes (B); as 7 ordens mais abundantes (C); as 10 famílias mais abundantes (D) e os 10 gêneros mais abundantes (E). São denominados como doentes animais que estavam acometidos com mastite subclínica, os quais apresentavam CCS > 200.000 cel/mL de leite. Os gráficos foram gerados com auxílio do pacote *phyloseq* disponível no programa R (R Development Core Team, 2016).



**Legenda:** Diferenças taxonômicas na composição da microbiota da glândula mamária bovina em 200 animais das raças Gir (saudáveis,  $n=32$  e doentes,  $n=18$ ); Girolando 1/2 (saudáveis,  $n=52$  e doentes,  $n=35$ ), Guzerá (saudáveis,  $n=15$  e doentes,  $n=3$ ); Holandês (saudáveis,  $n=27$  e doentes,  $n=13$ ). Os gráficos apresentam a comparação de abundância relativa entre: os 7 filós mais abundantes (A); as 7 classes mais abundantes (B); as 7 ordens mais abundantes (C); as 10 famílias mais abundantes (D) e os 10 gêneros mais abundantes (E). São denominados como doentes animais que estavam acometidos com mastite subclínica, os quais apresentavam  $CCS > 200.000$  cel/mL de leite. Os gráficos foram gerados com auxílio do pacote *phyloseq* disponível no programa R (R Development Core Team, 2016).

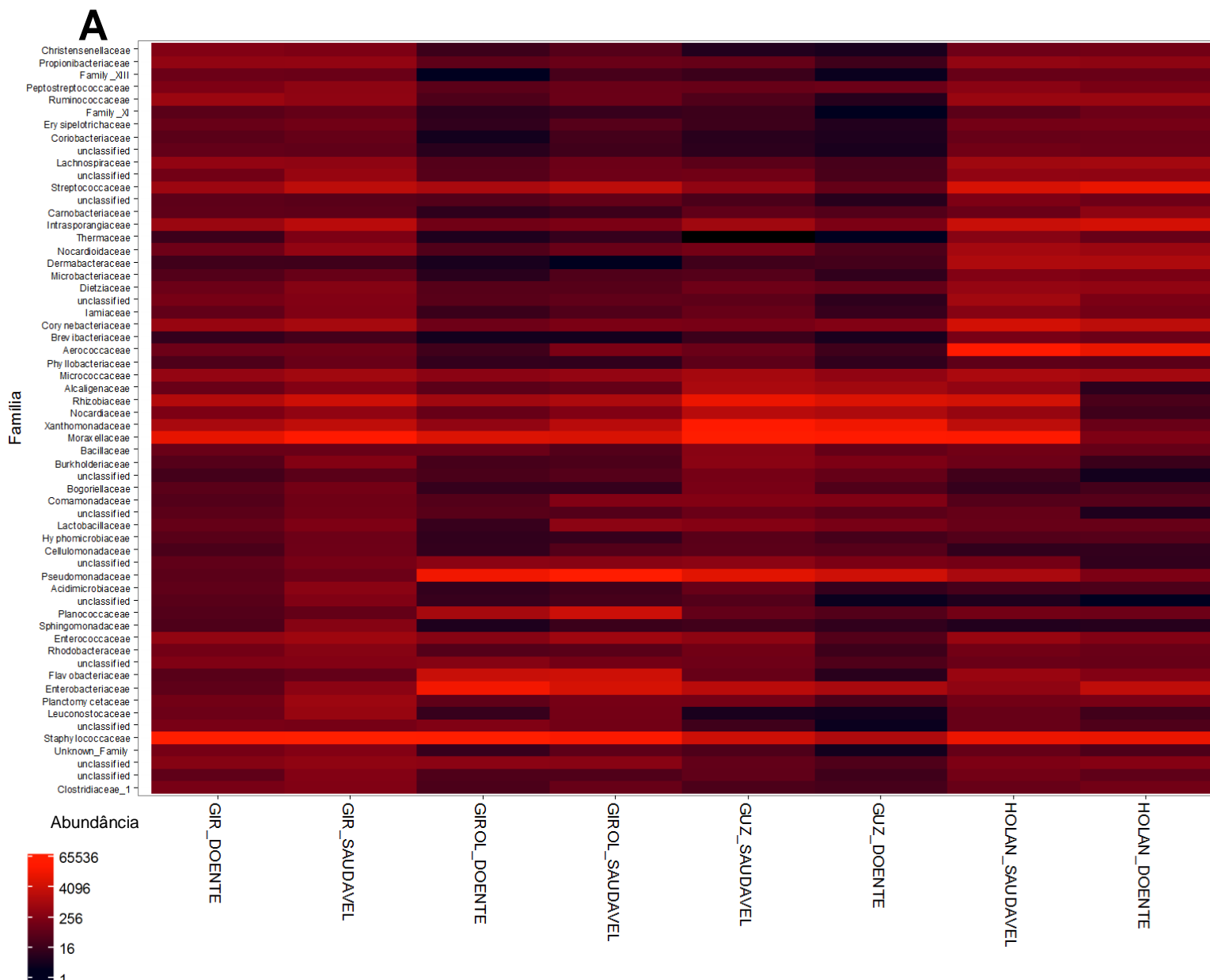
FIGURA 8 - Composição relativa de BAL da microbiota da glândula mamária bovina



**Legenda:** Composição de BAL da microbiota da glândula mamária bovina em 200 animais das raças Gir (saudáveis,  $n=32$  e doentes,  $n=18$ ); Girolando 1/2 (saudáveis,  $n=52$  e doentes,  $n=35$ ), Guzerá (saudáveis,  $n=15$  e doentes,  $n=3$ ); Holandês (saudáveis,  $n=27$  e doentes,  $n=13$ ). A composição foi relativizada pelo total de OTUs classificadas como BAL. São denominados como doentes animais que estavam acometidos com mastite subclínica, os quais apresentavam CCS > 200.000 cel/mL de leite. Os gráficos foram gerados com auxílio do pacote *phyloseq* disponível no programa R (R Development Core Team, 2016).

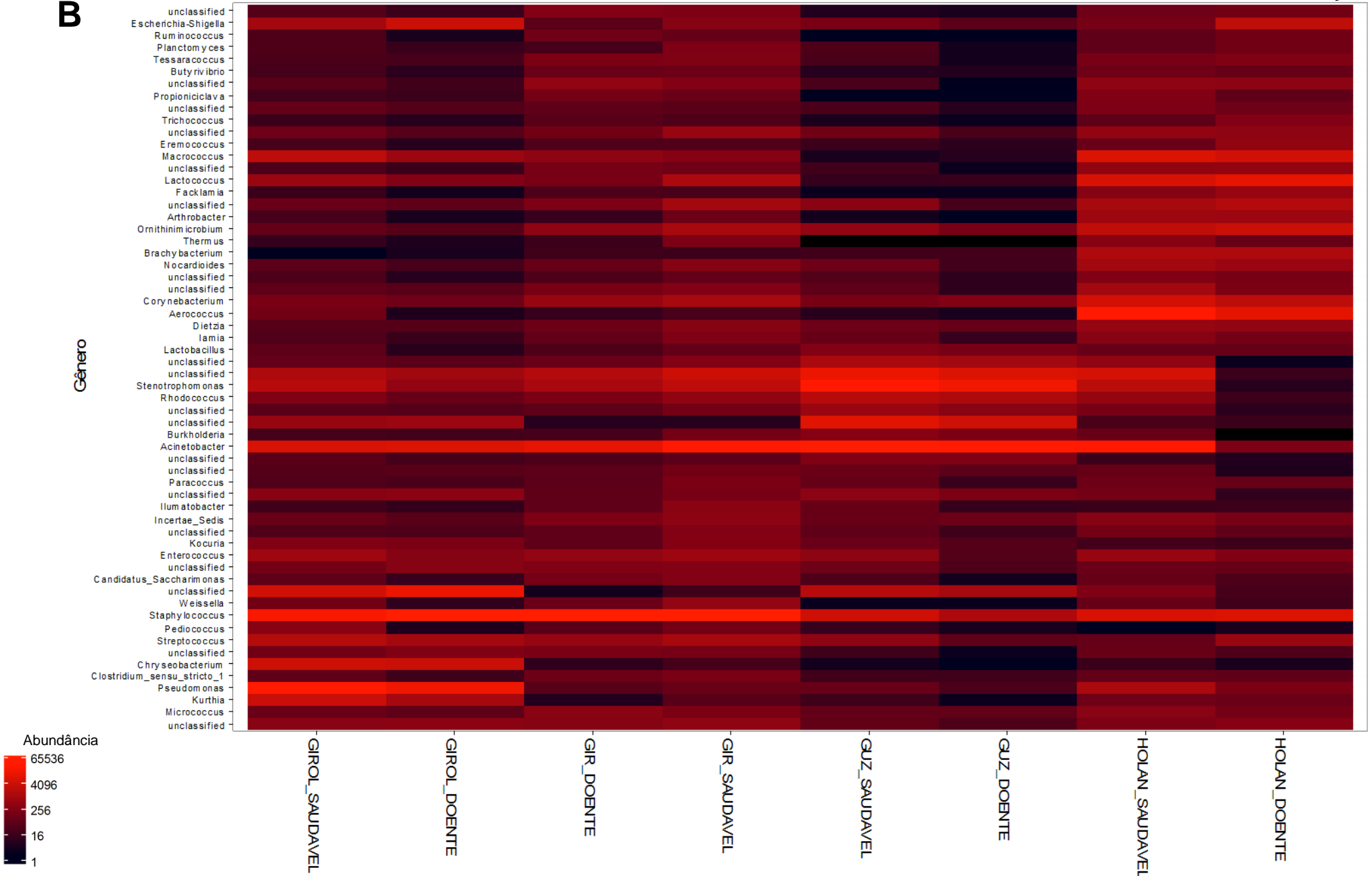
Além dos gráficos de comparação de abundância relativa entre as amostras sequenciadas, foram também gerados *heatmaps* que comparam a composição, em nível de família e gênero, das 60 OTUs mais prevalentes identificadas em cada uma dessas categorias taxonômicas, apresentados na FIGURA 9.

FIGURA 9 - *Heatmaps* apresentando similaridades na composição da microbiota da glândula mamária bovina



**Legenda:** *Heatmaps* foram gerados pela análise hierárquica de cluster das 60 mais prevalentes famílias (A) e gêneros (B) presentes na composição da microbiota da glândula mamária bovina em 200 animais das raças Gir (saudáveis,  $n=32$  e doentes,  $n=18$ ); Girolando 1/2 (saudáveis,  $n=52$  e doentes,  $n=35$ ); Guzerá (saudáveis,  $n=15$  e doentes,  $n=3$ ); Holandês (saudáveis,  $n=27$  e doentes,  $n=13$ ). São denominados como doentes animais que estavam acometidos com mastite subclínica, os quais apresentavam CCS > 200.000 cel/mL de leite. Os gráficos foram gerados com auxílio do pacote *phyloseq* usando o método de análise por correspondência (CCA) disponível no programa R (R Development Core Team, 2016).

**B**



**Legenda:** Heatmaps foram gerados pela análise hierárquica de cluster das 60 mais prevalentes famílias (A) e gêneros (B) presentes composição da microbiota da glândula mamária bovina em 200 animais das raças Gir (saudáveis,  $n=32$  e doentes,  $n=18$ ); Girolando 1/2 (saudáveis,  $n=52$  e doentes,  $n=35$ ); Guzerá (saudáveis,  $n=15$  e doentes,  $n=3$ ); Holandês (saudáveis,  $n=27$  e doentes,  $n=13$ ). São denominados como doentes animais que estavam acometidos com mastite subclínica, os quais apresentavam CCS > 200.000 cel/mL de leite. Os gráficos foram gerados com auxílio do pacote *phyloseq* usando o método de análise por correspondência (CCA) disponível no programa R (R Development Core Team, 2016).



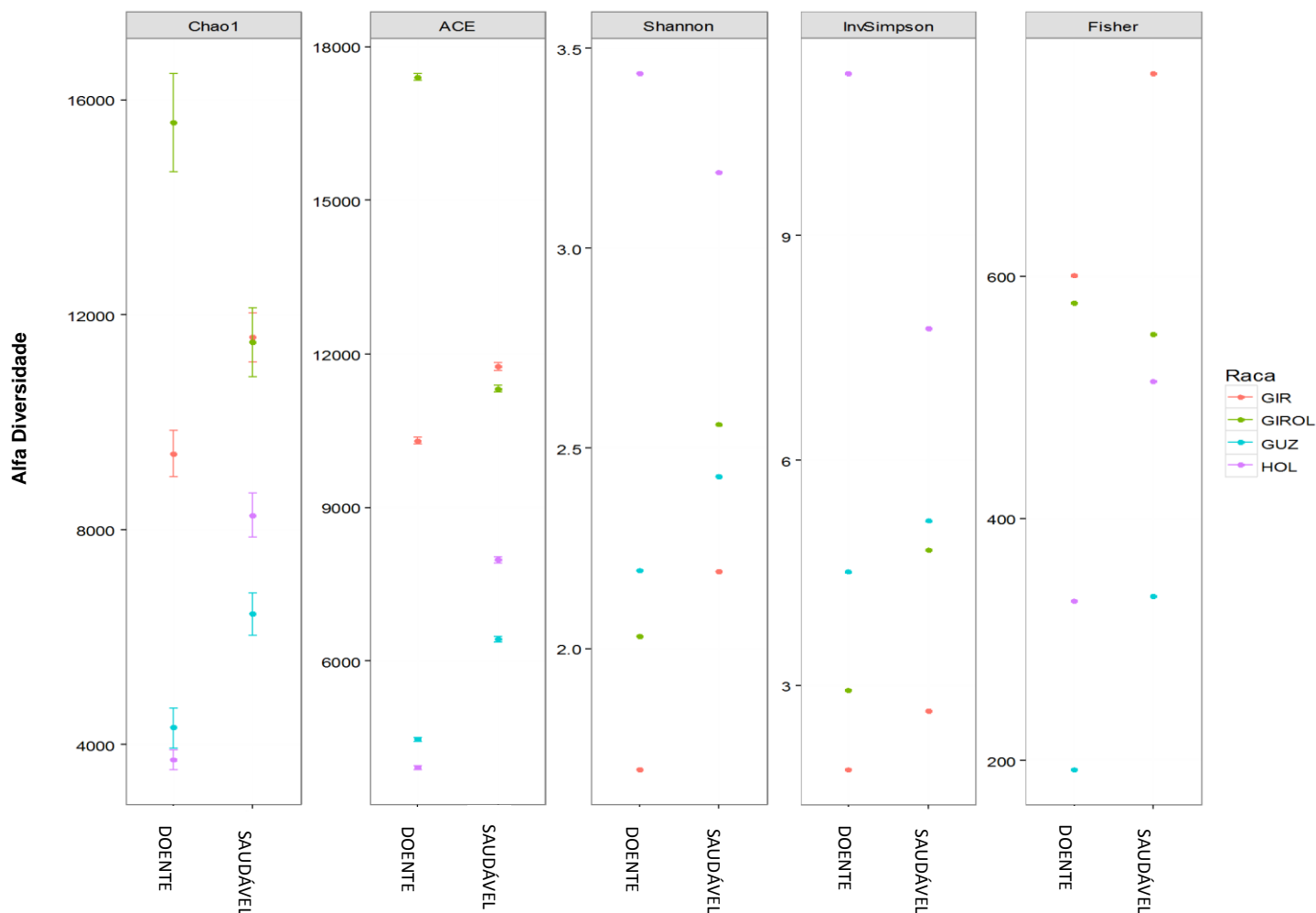
A riqueza média das microbiotas foi estimada pelos índices Chao1 e ACE enquanto a diversidade microbiana foi determinada pelos índices de diversidade de Shannon, Simpson invertido e Fisher. Os valores dos índices para cada amostra sequenciada estão mostrados na TABELA 5. De maneira geral, foi observado que animais saudáveis apresentam maior riqueza em comparação com animais doentes, exceto na raça Girolando 1/2. Da mesma forma, a diversidade microbiana foi maior em animais saudáveis quando comparados com animais doentes, exceto para raça Holandês (índices de Shannon e Simpson invertido em animais doentes apresentaram valores maiores) e na raça Girolando 1/2 (índice de Fisher apresentou valor maior em animais doentes). As raças Gir e Girolando 1/2 apresentaram maiores valores de riqueza enquanto as raças Holandês e Guzerá apresentaram maiores valores para índices de diversidade, quando foram comparadas a composição da microbiota apenas de animais saudáveis. A FIGURA 10 apresenta um comparativo dos índices de riqueza e diversidade entre as diferentes raças e estados de saúde do úbere.

TABELA 5 - Índices de riqueza e diversidade da microbiota da glândula mamária bovina

<b>Amostras (pool)</b>	<b>Gir-d</b>	<b>Gir-s</b>	<b>Giro-d</b>	<b>Giro-s</b>	<b>Guz-d</b>	<b>Guz-s</b>	<b>Hol-d</b>	<b>Hol-s</b>
Chao1	9417,61	11582,57	15580,27	11495,00	4306,66	6425,04	3707,01	8262,00
ACE	10299,43	11754,74	17404,30	11315,67	4472,28	6425,482	3920,30	7988,25
Shannon	1,696938	2,191740	2,030400	2,560652	2,195827	2,429863	3,437032	3,188726
InvSimpson	1,867787	2,650758	2,935705	4,798139	4,513662	5,189945	11,16178	7,753080
Fisher	600,4619	767,6048	577,5549	552,2350	192,0794	335,9141	331,3659	513,2882

**Legenda:** Índices de riqueza (Chao1 e ACE) e de diversidade (Shannon, Simpson invertido – InvSimpson – e Fisher) calculados a partir dos dados do sequenciamento da microbiota da glândula mamária bovina a partir de amostras de DNA obtido de leite cru de 200 animais das raças Gir saudáveis (Gir-s),  $n=32$  e doentes (Gir-d),  $n=18$ ; Girolando 1/2 saudáveis (Giro-s),  $n=52$  e doentes (Giro-d);  $n=35$ , Guzerá saudáveis (Guz-s),  $n=15$  e doentes (Guz-d),  $n=3$ ; Holandês saudáveis (Hol-s),  $n=27$  e doentes (Hol-d),  $n=13$ . São denominados como doentes animais que estavam acometidos com mastite subclínica, os quais apresentavam CCS > 200.000 cel/mL de leite. Os índices foram calculados com auxílio do pacote *phyloseq* disponível no programa R (R Development Core Team, 2016).

FIGURA 10 - Comparativo dos índices de riqueza e diversidade da microbiota da glândula mamária bovina

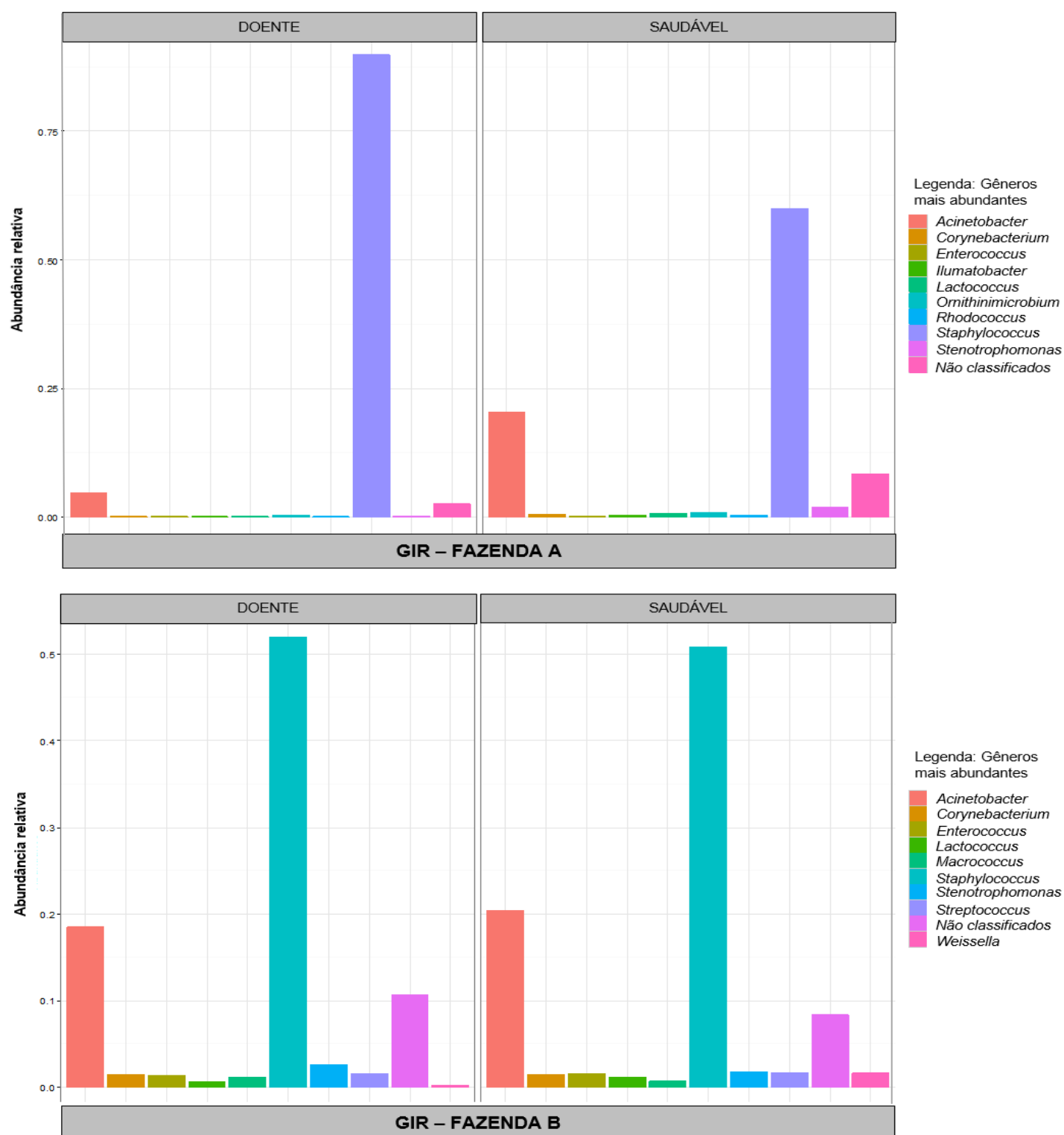


**Legenda:** Índices de riqueza (Chao1 e ACE) e de diversidade (Shannon, Simpson invertido – InvSimpson – e Fisher) calculados a partir dos dados do sequenciamento da microbiota da glândula mamária bovina a partir de amostras de DNA obtido de leite cru de 200 animais das raças Gir saudáveis (Gir-s),  $n=32$  e doentes (Gir-d),  $n=18$ ; Girolando 1/2 saudáveis (Girol-s),  $n=52$  e doentes (Girol-d),  $n=35$ ; Guzerá saudáveis (Guz-s),  $n=15$  e doentes (Guz-d),  $n=3$ ; Holandês saudáveis (Hol-s),  $n=27$  e doentes (Hol-d),  $n=13$ . São denominados como doentes animais que estavam acometidos com mastite subclínica, os quais apresentavam CCS > 200.000 cel/mL de leite. Os índices foram calculados com auxílio do pacote *phyloseq* disponível no programa R (R Development Core Team, 2016).

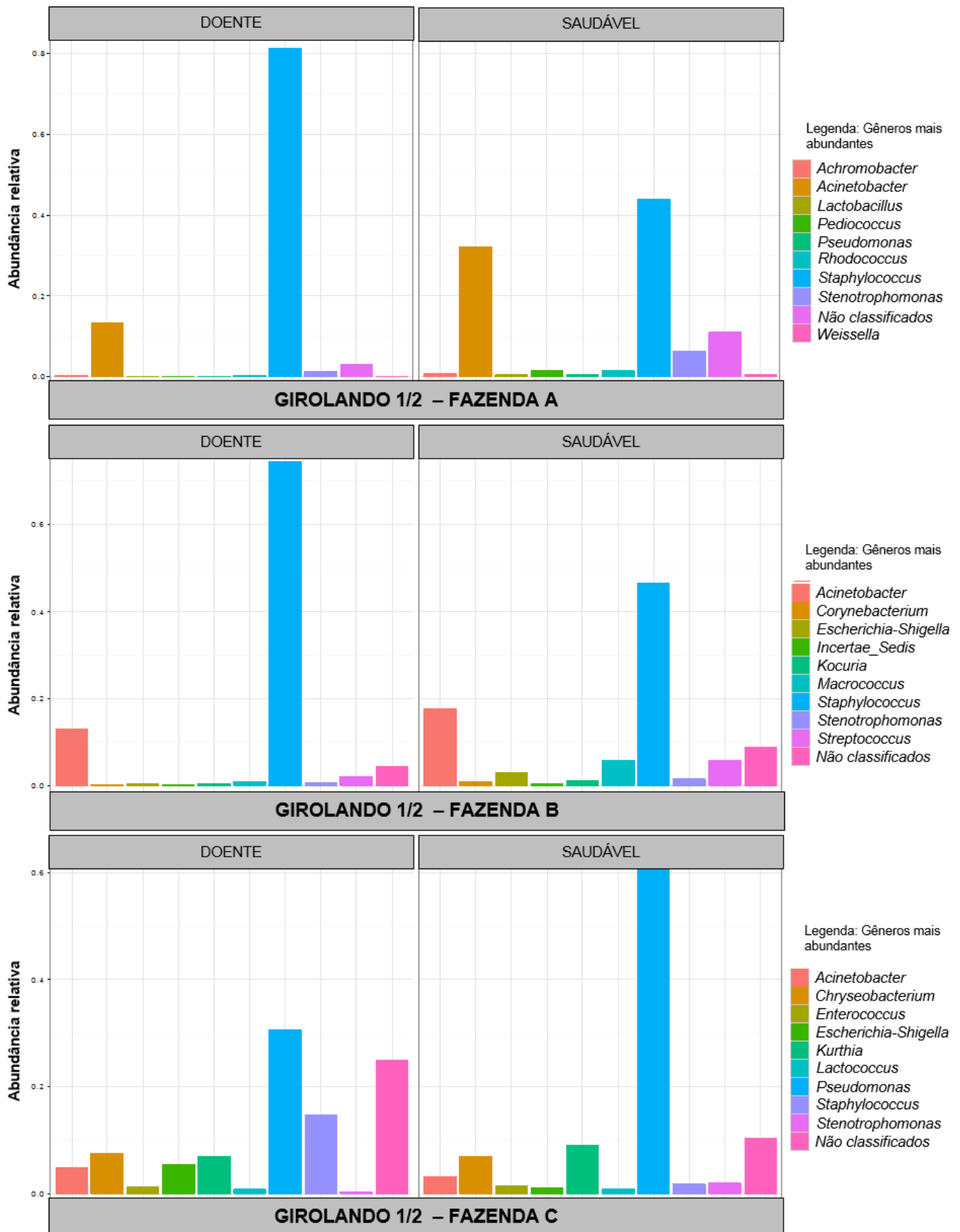
As raças Gir e Girolando 1/2 foram amostradas em mais de uma fazenda (A e B para Gir e A, B e C para Girolando 1/2) e por isso, as amostras representativas do *pool* de animais dessas raças nas respectivas fazendas foram sequenciadas e analisadas em separado. A composição em nível de gênero, observando os 10 gêneros mais prevalentes nas OTUs identificadas em cada *pool*, mostrou que na Fazenda A os animais da raça Gir apresentaram uma microbiota dominada por *Staphylococcus* e *Acinetobacter*, que aumentaram e

reduziram sua abundância relativa, respectivamente, em animais com mastite subclínica quando comparados com animais saudáveis. Na Fazenda B, esses mesmos gêneros também foram os dominantes, porém pouca alteração foi observada na composição relativa quando animais Gir saudáveis foram comparados com os animais com mastite subclínica desta raça. Interessantemente, na Fazenda B outros gêneros (*Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Macrococcus*, *Stenotrophomonas*, *Streptococcus* e *Weissella*) foram observados entre os 10 mais abundantes com abundância relativa discretamente maior que aqueles observados na Fazenda A (*Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Ilumatobacter*, *Lactococcus*, *Ornithinimicrobium*, *Rhodococcus* e *Stenotrophomonas*). A raça Girolando 1/2 foi amostrada em três fazendas. Na Fazenda A, a microbiota dos animais Girolando 1/2, assim como dos animais Gir amostrados nesta propriedade foi dominada por *Staphylococcus* e *Acinetobacter*, que sofreram aumento e redução, respectivamente, nas suas abundâncias relativas com a instalação do quadro de mastite subclínica. Os demais gêneros presentes entre os 10 mais abundantes (*Achromobacter*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas* e *Weissella*) sofreram redução em sua abundância relativa com a instalação da mastite. Na Fazenda B, os gêneros mais abundantes na composição da microbiota foram também *Staphylococcus* e *Acinetobacter*, apresentando aumento na abundância relativa dos membros do gênero *Staphylococcus* em animais acometidos com mastite subclínica. Por fim, a composição da microbiota dos animais Girolando 1/2 da Fazenda C foi bem peculiar. Em animais saudáveis foi observada uma dominância de membros do gênero *Pseudomonas*, seguido de *Khurtia* e *Chryseobacterium*. Outros gêneros (*Acinetobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia-Shigella*, *Lactococcus*, *Staphylococcus* e *Stenotrophomonas*) apresentaram abundância relativa relativamente homogênea entre os 10 mais prevalentes. Em animais com mastite subclínica, foi observada uma redução da abundância relativa de *Pseudomonas* acompanhada com aumento da abundância de *Staphylococcus*, *Escherichia-Shigella* e de OTUs não classificadas em nível de gênero (FIGURA 11).

FIGURA 11 - Abundância relativa em nível de gênero da composição da microbiota da glândula mamária de animais da raça Gir e Girolando 1/2



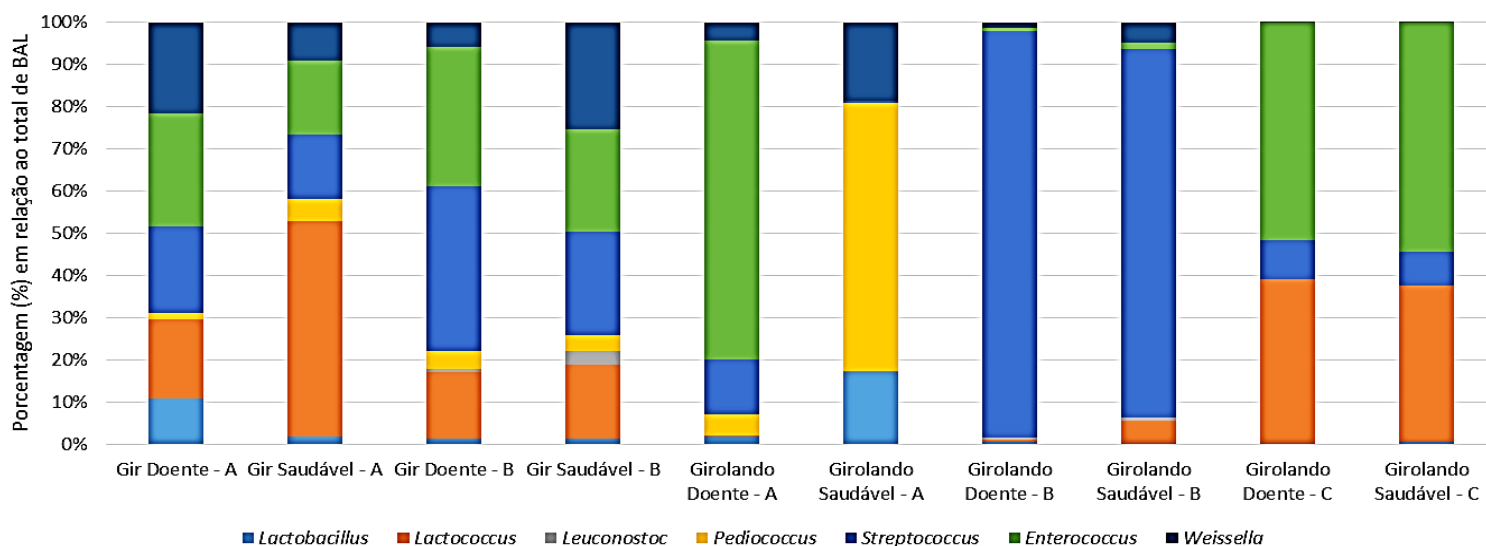
**Legenda:** Diferenças em nível de gênero na composição da microbiota da glândula mamária bovina em animais das raças Gir (Fazenda A: saudáveis,  $n=24$  e doentes,  $n=15$ ; Fazenda B: saudáveis,  $n=8$  e doentes,  $n=3$ ) e Girolando 1/2 (Fazenda A: saudáveis,  $n=14$  e doentes,  $n=4$ ; Fazenda B: saudáveis,  $n=16$  e doentes,  $n=9$ ; Fazenda C: saudáveis,  $n=27$  e doentes,  $n=22$ ). Os gráficos apresentam a comparação de abundância relativa entre os 10 gêneros mais abundantes. São denominados como doentes animais que estavam acometidos com mastite subclínica, os quais apresentavam CCS > 200.000 cel/mL de leite. Os gráficos foram gerados com auxílio do pacote *phyloseq* disponível no programa R (R Development Core Team, 2016).



**Legenda:** Diferenças em nível de gênero na composição da microbiota da glândula mamária bovina em animais das raças Gir (Fazenda A: saudáveis,  $n=24$  e doentes,  $n=15$ ; Fazenda B: saudáveis,  $n=8$  e doentes,  $n=3$ ) e Girolando 1/2 (Fazenda A: saudáveis,  $n=14$  e doentes,  $n=4$ ; Fazenda B: saudáveis,  $n=16$  e doentes,  $n=9$ ; Fazenda C: saudáveis,  $n=27$  e doentes,  $n=22$ ). Os gráficos apresentam a comparação de abundância relativa entre os 10 gêneros mais abundantes. São denominados como doentes animais que estavam acometidos com mastite subclínica, os quais apresentavam  $CCS > 200.000$  cel/mL de leite. Os gráficos foram gerados com auxílio do pacote *phyloseq* disponível no programa R (R Development Core Team, 2016).

Os dados de abundância relativa dos gêneros classificados não-filogeneticamente como BAL nas amostras de *pool* por raça e estados de saúde do úbere nas Fazendas A, B e C estão apresentados na FIGURA 12 e na TABELA 6.

FIGURA 12 - Composição relativa de BAL da microbiota da glândula mamária bovina nas raças Gir e Girolando 1/2

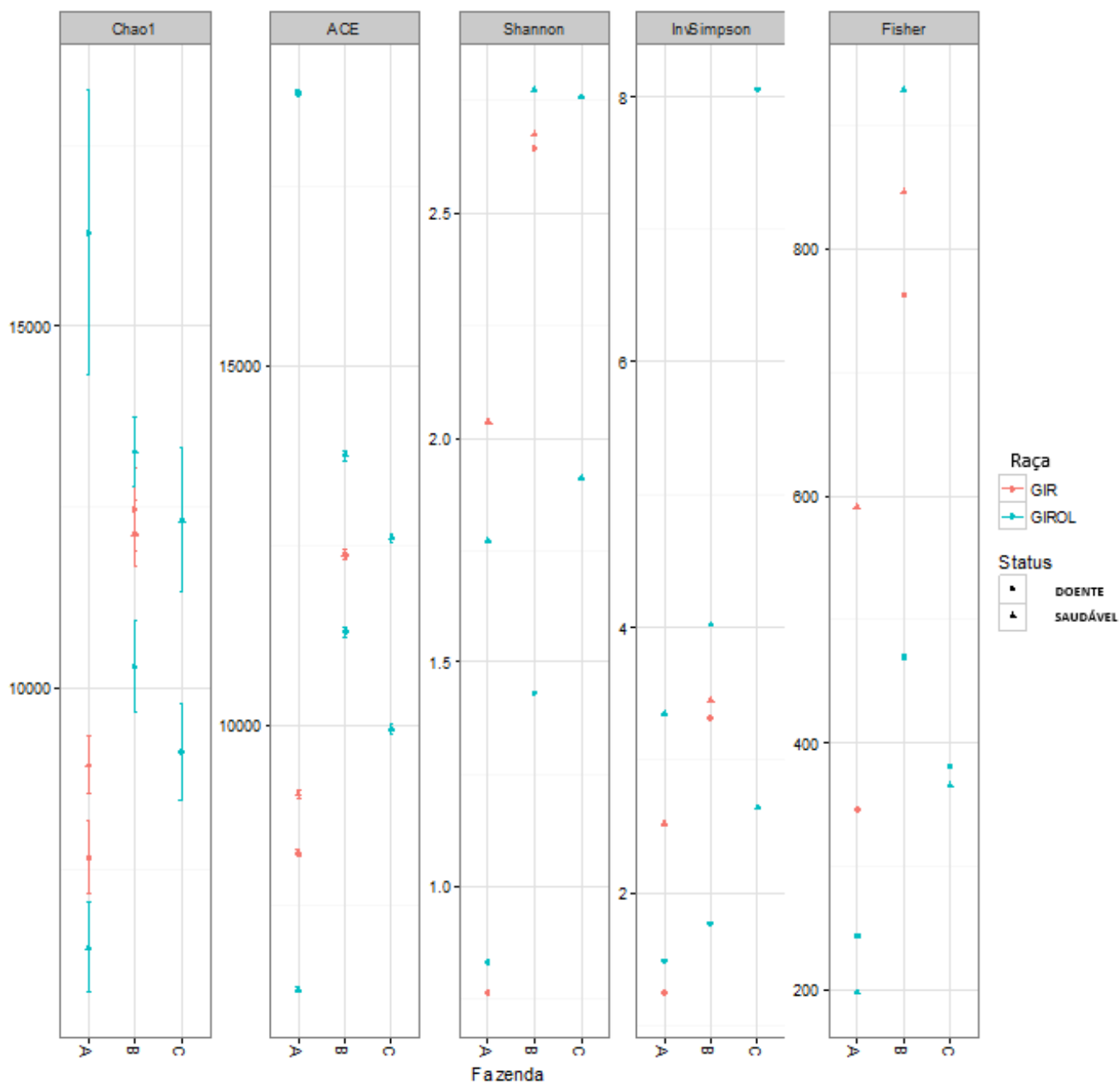


**Legenda:** Composição de BAL da microbiota da glândula mamária bovina em animais das raças Gir (Fazenda A: saudáveis,  $n=24$  e doentes,  $n=15$ ; Fazenda B: saudáveis,  $n=8$  e doentes,  $n=3$ ) e Girolando 1/2 (Fazenda A: saudáveis,  $n=14$  e doentes,  $n=4$ ; Fazenda B: saudáveis,  $n=16$  e doentes,  $n=9$ ; Fazenda C: saudáveis,  $n=27$  e doentes,  $n=22$ ). A composição foi relativizada pelo total de OTUs classificadas como BAL. São denominados como doentes animais que estavam acometidos com mastite subclínica, os quais apresentavam  $CCS > 200.000$  cel/mL de leite. Os gráficos foram gerados com auxílio do pacote *phyloseq* disponível no programa R (R Development Core Team, 2016).

Os valores dos índices de riqueza e de diversidade para cada *pool* de amostras das raças Gir e Girolando 1/2 estão mostrados na TABELA 7. Na raça Gir, animais saudáveis da Fazenda A apresentaram maiores índices de riqueza e de diversidade em comparação aos animais doentes da mesma raça e fazenda. Por outro lado, na Fazenda B, não foi observada essa tendência entre os animais da raça Gir, visto que os valores dos índices de riqueza e diversidade apresentaram valores semelhantes. Para a raça Girolando 1/2, índices de riqueza (Chao1 e ACE) apresentaram valores maiores para animais saudáveis das Fazendas B e C e menor na Fazenda A em comparação com animais com mastite subclínica. Entretanto, para esta mesma raça os índices de diversidade (Shannon, InvSimpson e Fisher) apresentaram maiores valores para animais

saudáveis das Fazendas A e B e valor menor para animais da Fazenda C em comparação com animais acometidos com mastite. A FIGURA 13 apresenta um comparativo dos índices de riqueza e diversidade entre as diferentes raças e fazendas.

FIGURA 13 - Comparativo dos índices de riqueza e diversidade da microbiota da glândula mamária bovina das raças Gir e Girolando 1/2



**Legenda:** Índices de riqueza (Chao1 e ACE) e de diversidade (Shannon, Simpson invertido – InvSimpson – e Fisher) calculados a partir dos dados do sequenciamento da microbiota da glândula mamária bovina a partir de amostras de DNA obtido de leite cru de animais das raças Gir (Fazenda A: saudáveis (**Gir-sA**),  $n=24$  e doentes (**Gir-dA**),  $n=15$ ; Fazenda B: saudáveis (**Gir-sB**),  $n=8$  e doentes (**Gir-dB**),  $n=3$ ) e Girolando 1/2 (Fazenda A: saudáveis (**Giro-sA**),  $n=14$  e doentes (**Giro-dA**),  $n=4$ ; Fazenda B: saudáveis (**Giro-sB**),  $n=16$  e doentes (**Giro-dB**),  $n=9$ ; Fazenda C: saudáveis (**Giro-sC**),  $n=27$  e doentes (**Giro-dC**),  $n=22$ ). São denominados como doentes animais que estavam acometidos com mastite subclínica, os quais apresentavam CCS > 200.000 cel/mL de leite. Os índices foram calculados com auxílio do pacote *phyloseq* disponível no programa R (R Development Core Team, 2016).

TABELA 6 - Dados do sequenciamento das regiões V3-V4 do gene rRNA 16S em amostras de DNA de leite cru nas raças Gir e Girolando 1/2

<b>Amostras (pool)</b>	<b>Gir-dA</b>	<b>Gir-sA</b>	<b>Gir-dB</b>	<b>Gir-sB</b>	<b>Giro-dA</b>	<b>Giro-sA</b>	<b>Giro-dB</b>	<b>Giro-sB</b>	<b>Giro-dC</b>	<b>Giro-sC</b>
Total de sequencias	157.055	135.443	134.317	178.309	170.629	134.435	122.196	178.065	110.383	161.675
OTUs identificadas	99.748	115.776	105.782	150.311	145.675	115.303	95.422	140.159	71.441	120.844
BAL (%) / total de OTUs em gênero*	0,251	1,561	3,940	6,513	0,312	2,531	2,047	6,739	2,314	2,669
% <i>Lactobacillus</i> / BAL**	10,800	1,937	1,392	1,277	1,762	16,998	0,512	0,307	0,302	0,558
% <i>Lactococcus</i> / BAL**	18,800	50,858	15,763	17,528	0,441	0,343	0,614	5,336	38,778	37,054
% <i>Leuconostoc</i> / BAL**	0,000	0,055	0,696	3,320	0,000	0,000	0,410	0,783	0,000	0,000
% <i>Pediococcus</i> / BAL**	1,600	5,368	4,367	3,698	4,846	63,674	0,102	0,032	0,121	0,093
% <i>Streptococcus</i> / BAL**	20,400	15,274	38,988	24,566	12,996	0,308	96,160	87,264	9,135	7,814
% <i>Enterococcus</i> / BAL**	26,800	17,322	32,917	24,168	75,551	0,069	0,819	1,567	51,482	54,295
% <i>Weissella</i> / BAL**	21,600	9,186	5,878	25,444	4,405	18,609	1,382	4,711	0,181	0,186

**Legenda:** Dados do sequenciamento da microbiota da glândula mamária bovina a partir de amostras de DNA obtido de leite cru de animais das raças Gir (Fazenda A: saudáveis (**Gir-sA**),  $n=24$  e doentes (**Gir-dA**),  $n=15$ ; Fazenda B: saudáveis (**Gir-sB**),  $n=8$  e doentes (**Gir-dB**),  $n=3$ ) e Girolando 1/2 (Fazenda A: saudáveis (**Giro-sA**),  $n=14$  e doentes (**Giro-dA**),  $n=4$ ; Fazenda B: saudáveis (**Giro-sB**),  $n=16$  e doentes (**Giro-dB**),  $n=9$ ; Fazenda C: saudáveis (**Giro-sC**),  $n=27$  e doentes (**Giro-dC**),  $n=22$ ). São denominados como doentes animais que estavam acometidos com mastite subclínica, os quais apresentavam CCS > 200.000 cel/mL de leite.

\* abundância relativa em porcentagem (%) dos gêneros classificados não-filogeneticamente como BAL em relação ao total de OTUs identificadas em nível de gênero;

\*\* abundância relativa em porcentagem (%) de cada gênero em relação ao total de OTUs classificadas como BAL.



TABELA 7 - Índices de riqueza e diversidade da microbiota da glândula mamária bovina

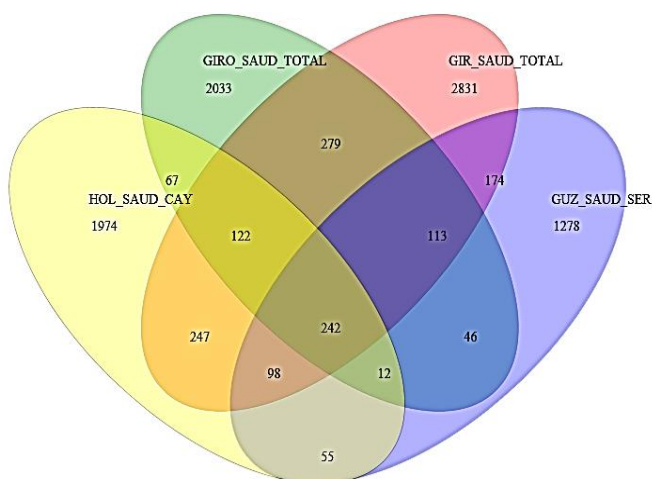
<b>Amostras (pool)</b>	<b>Gir-dA</b>	<b>Gir-sA</b>	<b>Gir-dB</b>	<b>Gir-sB</b>	<b>Giro-dA</b>	<b>Giro-sA</b>	<b>Giro-dB</b>	<b>Giro-sB</b>	<b>Giro-dC</b>	<b>Giro-sC</b>
Chao1	7665,85	8939,72	12471,9	12140,9	16288,0	6422,63	10295,4	13262,0	9116,35	12325,6
ACE	8231,03	9048,60	12372,8	12380,5	18785,7	6329,79	11298,1	13751,8	9946,78	12594,9
Shannon	0,76355	2,03728	2,64339	2,67521	0,83016	1,77168	1,43211	2,77545	2,75868	1,910747
InvSimpson	1,24451	2,51920	3,31315	3,44639	1,48423	3,34665	1,76617	4,01647	8,05165	2,64576
Fisher	345,587	590,750	761,858	846,004	243,250	197,624	469,635	928,405	380,972	365,008

**Legenda:** Índices de riqueza (Chao1 e ACE) e de diversidade (Shannon, Simpson invertido – InvSimpson – e Fisher) calculados a partir dos dados do sequenciamento da microbiota da glândula mamária bovina a partir de amostras de DNA obtido de leite cru de animais das raças Gir (Fazenda A: saudáveis (**Gir-sA**),  $n=24$  e doentes (**Gir-dA**),  $n=15$ ; Fazenda B: saudáveis (**Gir-sB**),  $n=8$  e doentes (**Gir-dB**),  $n=3$ ) e Girolando 1/2 (Fazenda A: saudáveis (**Giro-sA**),  $n=14$  e doentes (**Giro-dA**),  $n=4$ ; Fazenda B: saudáveis (**Giro-sB**),  $n=16$  e doentes (**Giro-dB**),  $n=9$ ; Fazenda C: saudáveis (**Giro-sC**),  $n=27$  e doentes (**Giro-dC**),  $n=22$ ). São denominados como doentes animais que estavam acometidos com mastite subclínica, os quais apresentavam CCS > 200.000 cel/mL de leite. Os índices foram calculados com auxílio do pacote *phyloseq* disponível no programa R (R Development Core Team, 2016).

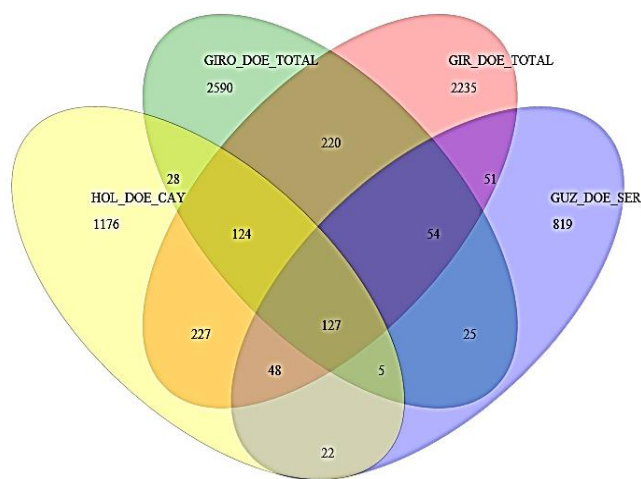
Diagramas de Venn foram gerados para avaliar a quantidade de OTUs que eram compartilhadas entre as diferentes amostras sequenciadas e estão mostrados na FIGURA 14. Entre animais saudáveis, foram identificadas 9571 OTUs referência, das quais 242 (2,53 %) eram compartilhadas entre as 4 raças avaliadas. A raça Gir e Girolando 1/2 apresentaram o maior número de OTUs referência compartilhadas, 756 (7,9 %) enquanto que as raças Guzerá e Holandês apresentaram o menor número de OTUs referência compartilhadas (407 – 4,25%). Em todas as raças o maior número de OTUs referência não era compartilhado com nenhuma outra raça, ultrapassando mais de 60% das OTUs referência em todas as amostras de *pool* sequenciadas. Por outro lado, em animais com mastite subclínica foram identificadas menos OTUs referência 7751 e as mesmas tendências de compartilhamento de OTUs entre os animais saudáveis foram observadas, com exceção de um maior compartilhamento de OTUs entre as raças Holandês e Gir, que em animais doentes foi de 526 OTUs (6,8%).

FIGURA 14 - Diagramas de Venn mostrando sobreposição de OTUs entre as raças e Fazendas amostradas

#### A - Saudável



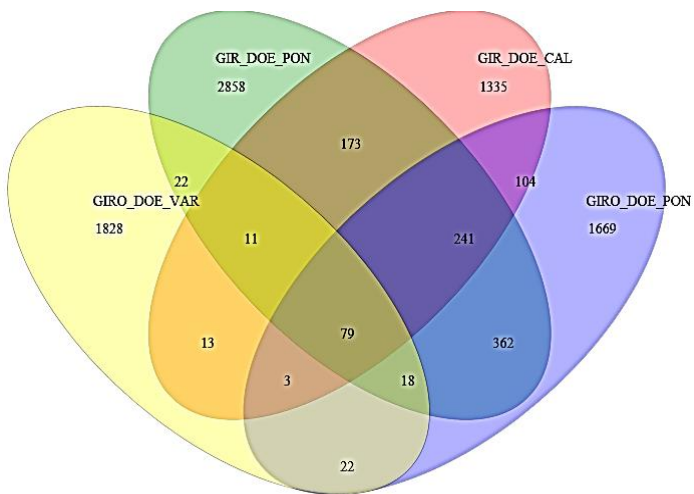
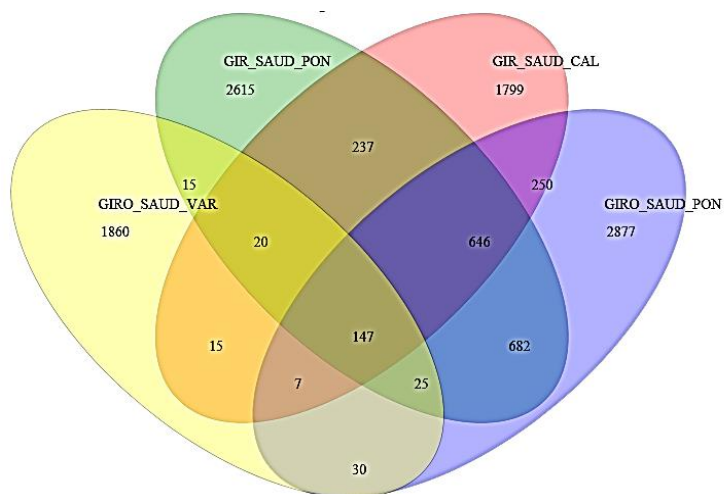
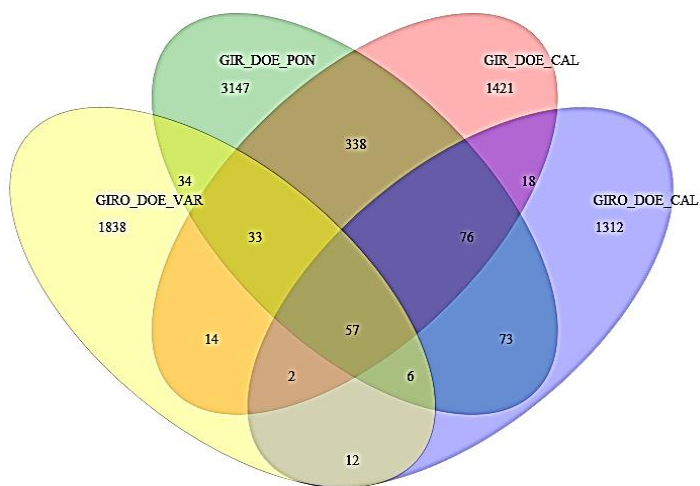
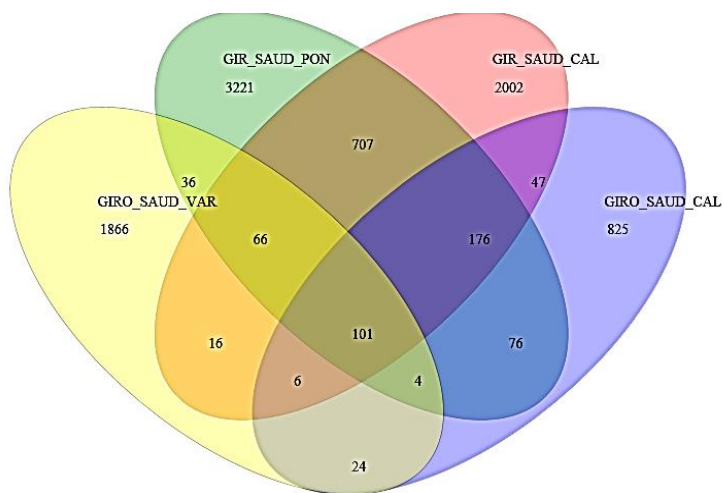
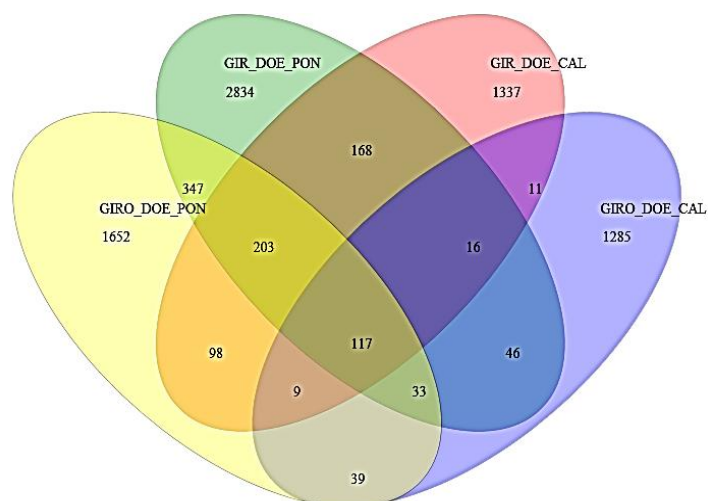
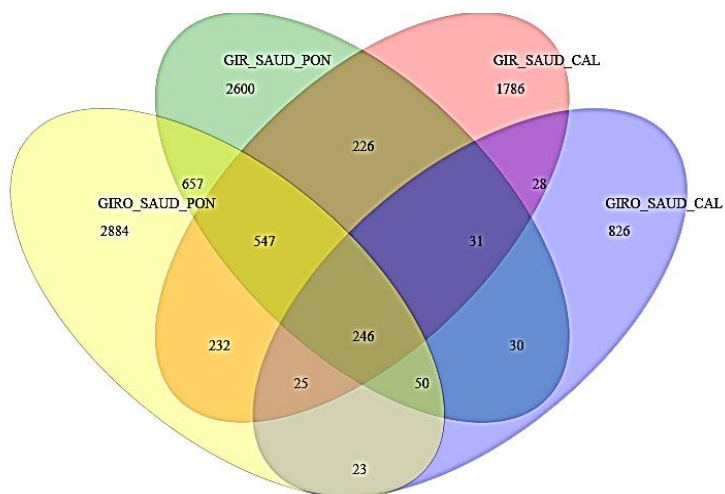
#### B – Mastite Subclínica



**Legenda:** Diagramas de Venn mostrando a sobreposição de OTUs referência presentes composição da microbiota da glândula mamária bovina em 200 animais das raças Gir (saudáveis - SAUD,  $n=32$  e doentes - DOE,  $n=18$ ); Girolando 1/2 (saudáveis- SAUD,  $n=52$  e doentes- DOE,  $n=35$ ); Guzerá (saudáveis- SAUD,  $n=15$  e doentes- DOE,  $n=3$ ); Holandês (saudáveis- SAUD,  $n=27$  e doentes- DOE,  $n=13$ ). São denominados como animais acometidos com mastite subclínica (doentes), aqueles que apresentavam CCS > 200.000 cel/mL de leite. Os diagramas foram gerados com auxílio do programa MOTHUR (KOZICH et al., 2013).

A - Saudável

B – Mastite Subclínica

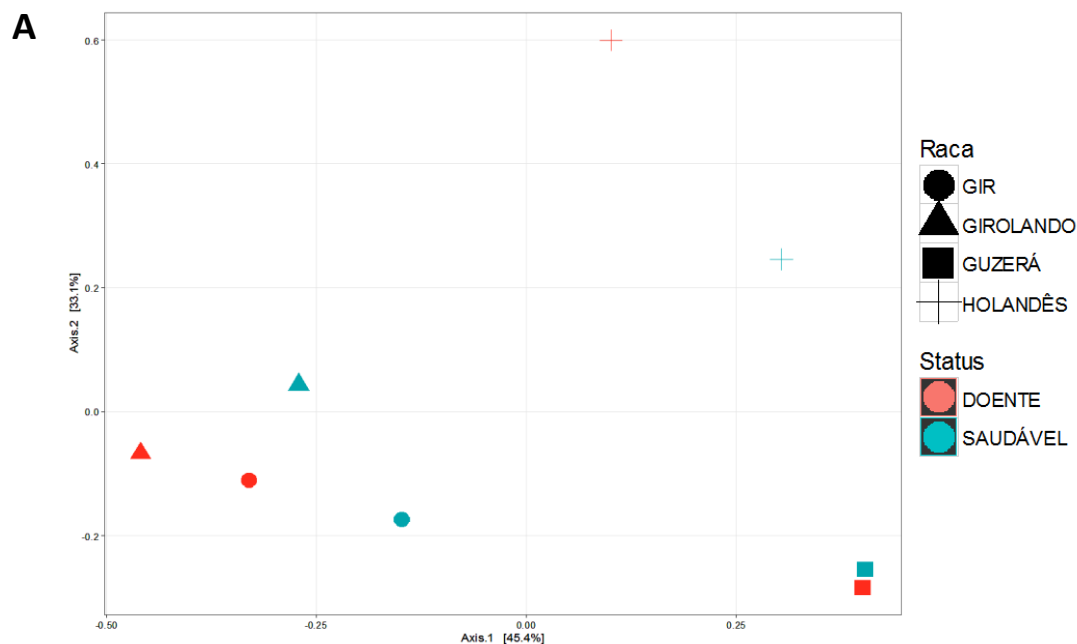


**Legenda:** Diagramas de Venn mostrando a sobreposição de OTUs referência presentes composição da microbiota da glândula mamária bovina de animais das raças Gir (Fazenda A: saudáveis (**GIR\_SAUD\_CAL**),  $n=24$  e doentes (**GIR\_DOE\_CAL**),  $n=15$ ; Fazenda B: saudáveis (**GIR\_SAUD\_PON**),  $n=8$  e doentes (**GIR\_DOE\_PON**),  $n=3$ ) e Girolando 1/2 (Fazenda A: saudáveis (**GIRO\_SAUD\_CAL**),  $n=14$  e doentes (**GIRO\_DOE\_CAL**),  $n=4$ ; Fazenda B: saudáveis (**GIRO\_SAUD\_PON**),  $n=16$  e doentes (**GIRO\_DOE\_PON**),  $n=9$ ; Fazenda C: saudáveis (**GIRO\_SAUD\_VAR**),  $n=27$  e doentes (**GIRO\_DOE\_VAR**),  $n=22$ ). São denominados como doentes animais que estavam acometidos com mastite subclínica, os quais apresentavam  $CCS > 200.000$  cel/mL de leite. São denominados como animais acometidos com mastite subclínica (doentes), aqueles que apresentavam  $CCS > 200.000$  cel/mL de leite. Os diagramas foram gerados com auxílio do programa MOTHUR (KOZICH et al., 2013).

Entre as amostras das raças Gir e Girolando 1/2 coletadas nas Fazendas A, B e C foi observado que, em animais saudáveis, entre 20-30% das OTUs referência foram compartilhadas entre animais da Fazenda B (Gir e Girolando 1/2) e também destes últimos com animais da raça Gir da Fazenda A. Por outro lado, animais da raça Girolando 1/2 da Fazenda A compartilharam entre 11-12% com animais Gir da Fazenda A e com os animais Gir e Girolando 1/2 da Fazenda B. Animais Girolando 1/2 da Fazenda C apresentaram entre 6-10% de compartilhamento de OTUs referência com os animais das raças Gir e Girolando 1/2 das Fazendas A e B. Entre animais doentes das raças Gir e Girolando 1/2 as mesmas tendências de compartilhamento foram observadas.

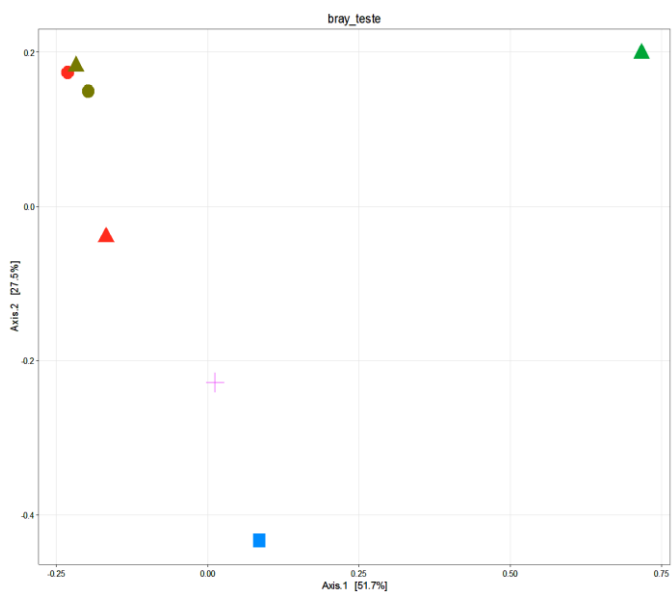
A análise de coordenadas principais foi realizada para explorar e visualizar as semelhanças e diferenças entre amostras sequenciadas. Entre os *pools* de animais de mesma raça e estado de saúde do úbere, foi observado que as amostras se dividem em três grupos diferentes, um grupo formado pelo *pool* de animais Holandês, outro da raça Guzerá e o último por animais da raça Gir e Girolando 1/2. Em todos eles, animais saudáveis e acometidos com mastite subclínica estavam ligeiramente distantes, exceto na raça Guzerá. Ao analisar as amostras separadas por raça e fazenda de origem, foi observado que, em animais saudáveis, apenas vacas da raça Gir da Fazenda A agrupam com animais da raça Girolando 1/2 e Gir da Fazenda B. Por outro lado, entre os animais com mastite subclínica, três grupos foram identificados, um formado pelos animais da raça Gir e Girolando 1/2 das Fazendas A e B, outro formado pelos animais da raça Girolando 1/2 da Fazenda C e da raça Holandês e um último formado pelos animais da raça Guzerá. Os diagramas de PCoA estão mostrados na FIGURA 15. Dendogramas foram também gerados para mostrar a relação de similaridade entre as amostras sequenciadas e confirmam as mesmas tendências observadas para a análise de PCoA e estão apresentados na FIGURA 16.

FIGURA 15 - Diferença na composição da microbiota da glândula mamária bovina avaliada por PCoA pelo teste de *Bray-Curtis*

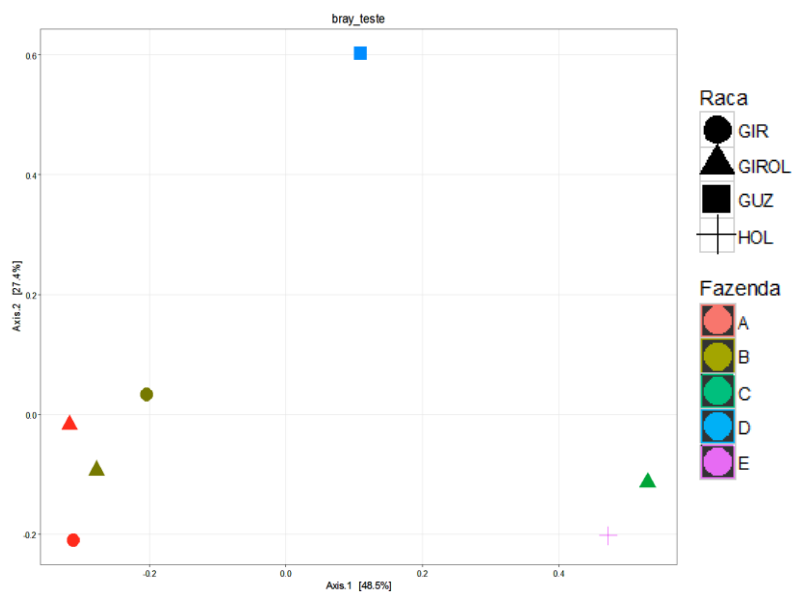


**B**

Saudável



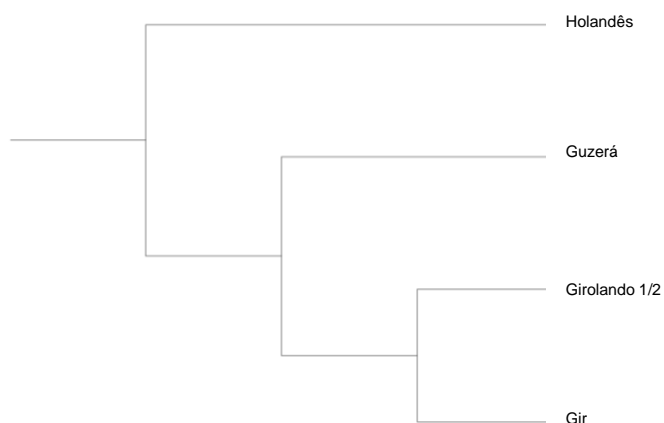
Mastite Subclínica



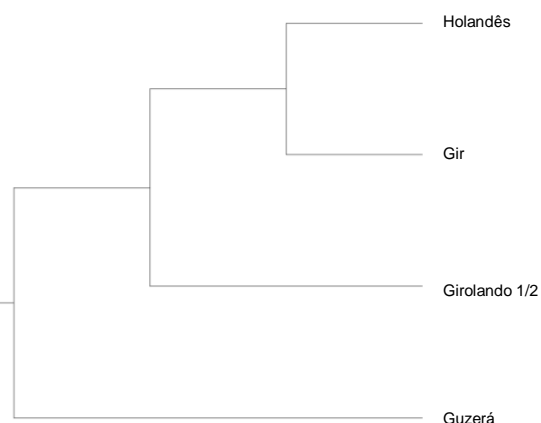
**Legenda:** Análise de coordenadas principais (*Principal Coordinates Analysis - PCoA*) usando medidas Unifrac ponderadas de  $\beta$ -diversidade para geração do escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) baseado na dissimilaridade de Bray-Curtis mostrando a diferença composição da microbiota da glândula mamária bovina (**A**) em 200 animais das raças Gir (saudáveis,  $n=32$  e doentes,  $n=18$ ); Girolando 1/2 (saudáveis,  $n=52$  e doentes,  $n=35$ ); Guzerá (saudáveis,  $n=15$  e doentes,  $n=3$ ); Holandês (saudáveis,  $n=27$  e doentes,  $n=13$ ) e (**B**) em animais das raças Gir (Fazenda A: saudáveis,  $n=24$  e doentes,  $n=15$ ; Fazenda B: saudáveis,  $n=8$  e doentes,  $n=3$ ); Girolando 1/2 (Fazenda A: saudáveis,  $n=14$  e doentes,  $n=4$ ; Fazenda B: saudáveis,  $n=16$  e doentes,  $n=9$ ; Fazenda C: saudáveis,  $n=27$  e doentes,  $n=22$ ) bem como com as mesmas amostras das raças Guzerá e Holandês. São denominados como doentes animais que estavam acometidos com mastite subclínica, os quais apresentavam CCS > 200.000 cel/mL de leite. Os diagramas foram gerados com auxílio do pacote *phyloseq* usando o teste *bray* disponível no programa R (R Development Core Team, 2016).

FIGURA 16 - Dendogramas mostrando a similaridade na composição da microbiota da glândula mamária bovina

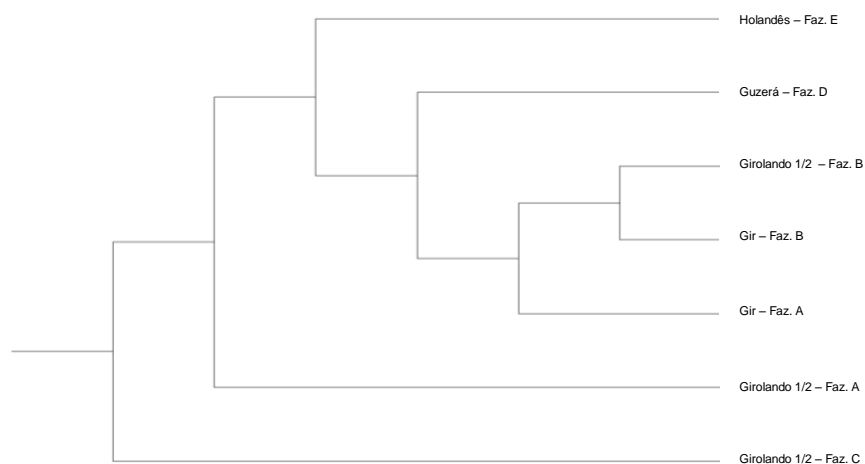
**A** Saudável



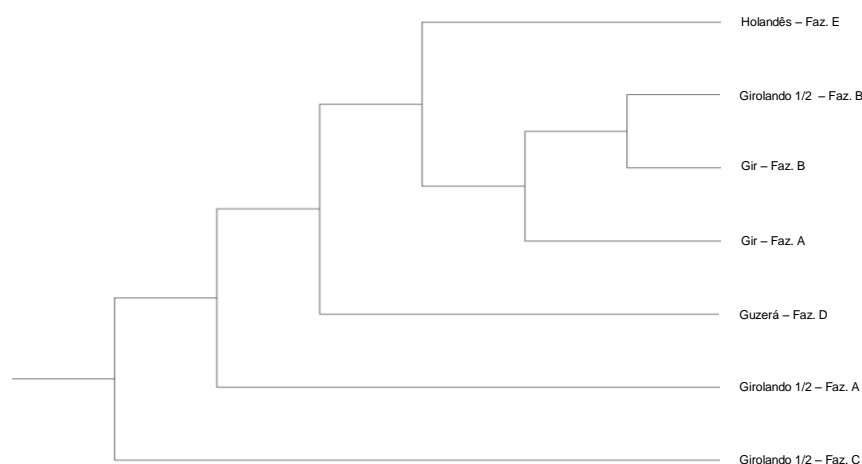
Mastite Subclínica



**B** Saudável



Mastite Subclínica



**Legenda:** Dendogramas Unifrac mostrando a similaridade na composição da microbiota da glândula mamária bovina (**A**) em 200 animais das raças Gir (saudáveis,  $n=32$  e doentes,  $n=18$ ); Girolando 1/2 (saudáveis,  $n=52$  e doentes,  $n=35$ ); Guzerá (saudáveis,  $n=15$  e doentes,  $n=3$ ); Holandês (saudáveis,  $n=27$  e doentes,  $n=13$ ) e (**B**) em animais das raças Gir (Fazenda A: saudáveis,  $n=24$  e doentes,  $n=15$ ; Fazenda B: saudáveis,  $n=8$  e doentes,  $n=3$ ); Girolando 1/2 (Fazenda A: saudáveis,  $n=14$  e doentes,  $n=4$ ; Fazenda B: saudáveis,  $n=16$  e doentes,  $n=9$ ; Fazenda C: saudáveis,  $n=27$  e doentes,  $n=22$ ) bem como com as mesmas amostras das raças Guzerá e Holandês. São denominados como doentes animais que estavam acometidos com mastite subclínica, os quais apresentavam CCS > 200.000 cel/mL de leite. Os dendogramas foram gerados usando como medida de diversidade estrutural o coeficiente de Jaccard (jclass) com auxílio do programa Unifrac (KOZICH et al., 2013).

### 6.3 Enumeração de bactérias que crescem em MRS

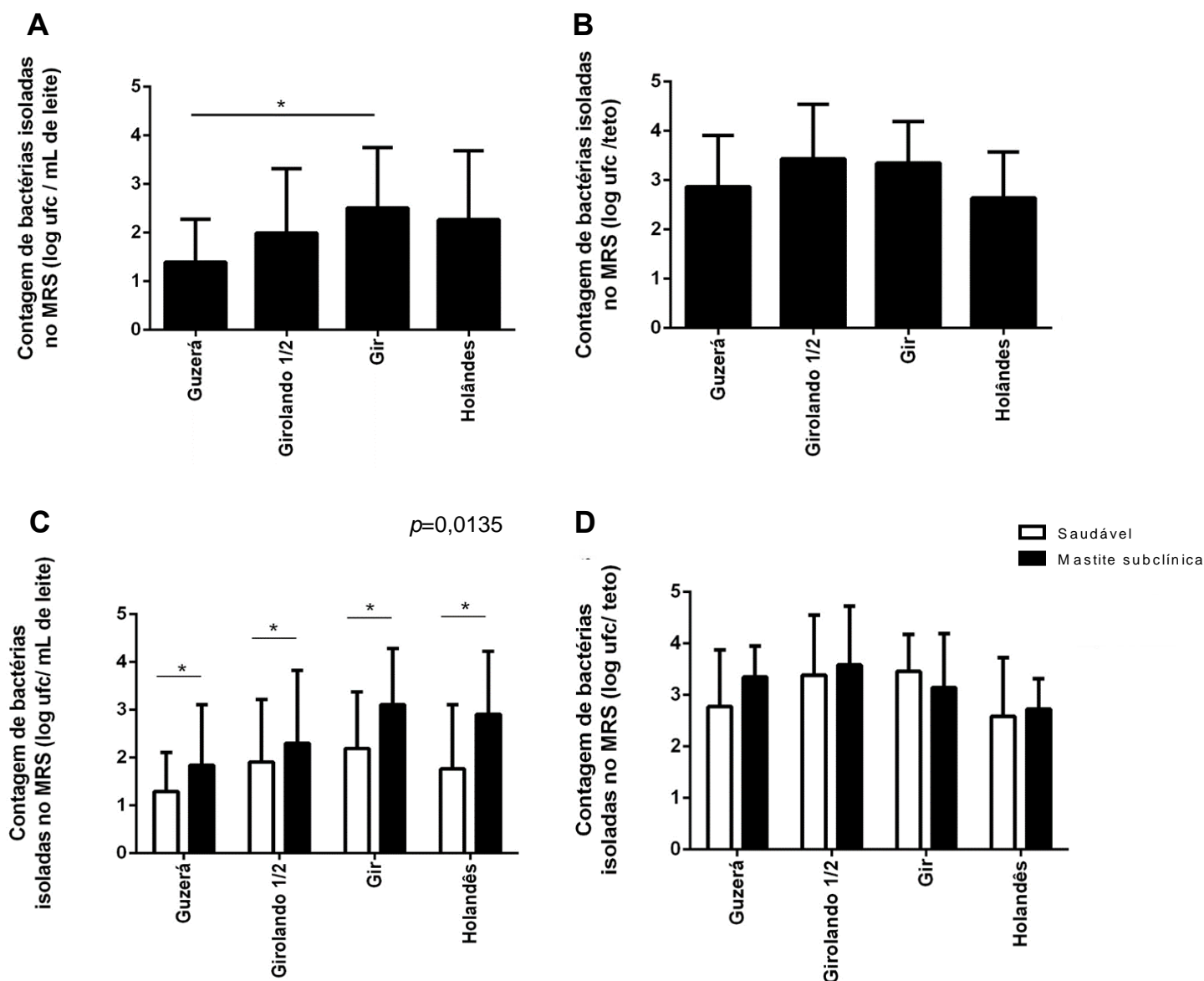
A enumeração de bactérias para isolamento de BAL foi realizada após diluições decimais das amostras de leite cru e *swab* intramamário de 115 animais plaqueadas em ágar MRS. As contagens bacterianas em MRS ágar variaram de 0 a 4,75 log<sub>10</sub> UFC/mL e de 0 a 4,68 log<sub>10</sub> UFC/*swab*, sendo as contagens médias 2,09 ± 1,3 log<sub>10</sub> UFC/mL e 3,22 ± 1,04 log<sub>10</sub> UFC/*swab*, respectivamente nas amostras de leite cru e no *swab* intramamário (TABELA 8).

TABELA 8 - Enumeração bacteriana média em ágar MRS de amostras de leite cru e *swab* intramamário de 115 animais das raças Guzerá, Girolando 1/2, Gir e Holandês

Raça	log <sub>10</sub> UFC/mL leite	log <sub>10</sub> UFC/ <i>swab</i>
Guzerá (n=18)	1,39± 0,86	2,87± 1,01
Girolando 1/2 (n=43)	2,17± 0,93	3,40± 1,11
Gir (n=34)	2,23± 0,89	3,32± 0,87
Holandês (n=20)	2,27± 1,41	2,64± 0,94

Entre as 115 vacas que tiveram suas amostras biológicas plaqueadas, 40 (34,78% dos animais plaqueados) apresentaram CCS acima de 200.000 cel/mL, e foram classificadas como acometidas com mastite subclínica. Uma única diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre as contagens bacterianas em ágar MRS foi encontrada entre a raça Guzerá e Gir, em contagens obtidas nas amostras de leite. Entre as demais raças nas amostras de leite e entre todas em amostras de *swab* não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ). Entre as contagens obtidas a partir das amostras de leite houve um efeito estatisticamente significativo do estado de saúde do úbere sobre as contagens bacterianas em MRS, sendo que a presença do quadro inflamatório estava associada ao aumento dessas contagens ( $p = 0,0135$ ). Os resultados das contagens de bactérias enumeradas em ágar MRS, por raça e por estado de saúde dos animais, em amostras de leite cru e *swab* intramamário estão mostrados na FIGURA 17.

FIGURA 17 - Enumeração bacteriana em MRS a partir de amostras de leite cru e swab intramamário de acordo com raça e estado de saúde dos animais



**Legenda:** Foram utilizadas para enumeração bacteriana em MRS amostras biológicas de 115 animais, sendo  $n=18$  para Guzerá,  $n=43$  para Girolando 1/2,  $n=34$  para Gir e  $n=20$  para Holandês. A enumeração bacteriana em MRS foi feita pela diluição decimal em salina 0,9%, de amostras de leite cru e swab intramamário, seguida do plaqueamento em ágar MRS e incubação a 37° C em anaerobiose por 48h. As colônias foram contadas e os resultados expressos em  $\log_{10}$  UFC/mL para amostras de leite e  $\log_{10}$  UFC/swab para amostras de swab intramamário. As barras verticais representam os erros-padrão das médias. Diferenças estatisticamente significativas ( $p<0,05$ ) entre as raças analisadas foram identificadas nos gráficos com asteriscos localizados acima da barra de desvio-padrão. Ausências de asteriscos sobre as barras sinalizam inexistência de diferenças estatisticamente significativas ( $p>0,05$ ). **A:** Contagem de bactérias isoladas em MRS em amostras de leite cru; **B:** Contagem de bactérias isoladas em MRS em amostras de swab intramamário; **C:** Contagem de bactérias isoladas em MRS em amostras de leite cru com separação de contagens obtidas de animais saudáveis ( $\square$ ) ( $CCS<200.000$  cel/mL) dos animais com mastite subclínica ( $\blacksquare$ ) ( $CCS>200.000$  cel/mL); **D:** Contagem de bactérias isoladas em MRS em amostras de swab intramamário com separação de contagens obtidas de animais saudáveis ( $\square$ ) ( $CCS<200.000$  cel/mL) dos animais com mastite subclínica ( $\blacksquare$ ) ( $CCS>200.000$  cel/mL).



#### 6.4 Isolamento e identificação de BAL do leite e *swab* intramamário

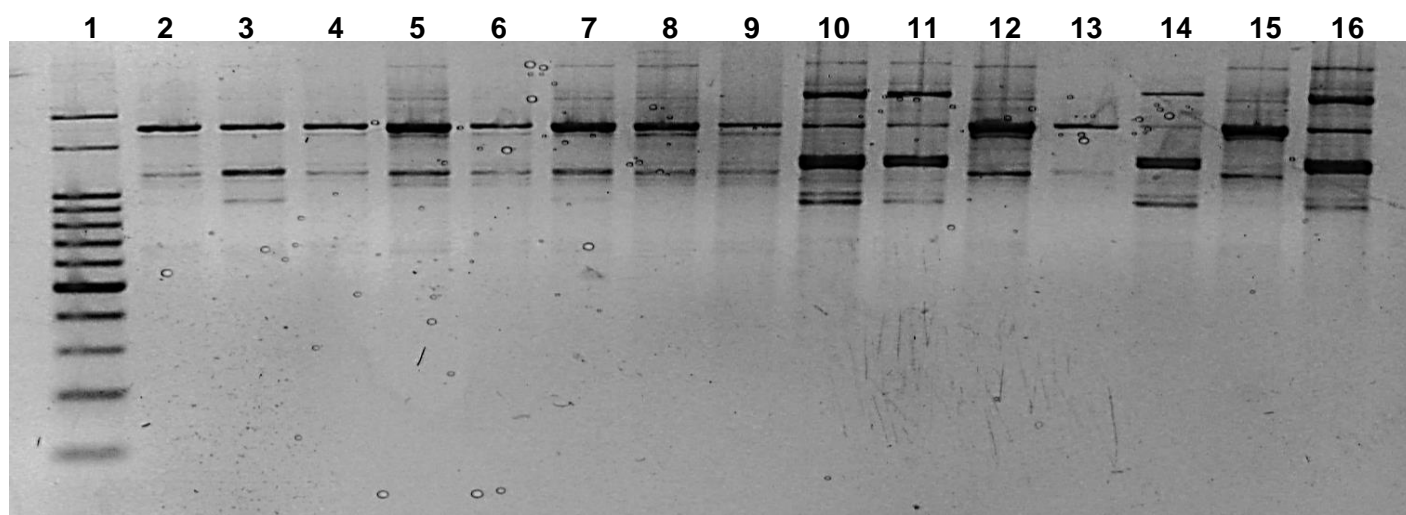
Durante o isolamento foram selecionadas bactérias que apresentassem características típicas de BAL (Gram-positiva, catalase-negativa e com morfologia do tipo coco, cocobacilo ou bastonete). Ao total, 314 isolados que apresentaram crescimento de colônias típicas em MRS (211 isolados obtidos de *swab* e 103 obtidos de leite) foram coletados a partir de amostras biológicas de 81 vacas (70,4% da amostra de isolamento). Entre as 81 vacas saudáveis das quais foram isoladas BAL, 9 delas foram da raça Guzerá, 33 da raça Girolando 1/2, 25 da raça Gir e 14 da raça Holandês. Dos 314 isolados obtidos, 45 (14,3% do total de isolados) apresentaram morfologia de cocobacilo, 47 (15,4% do total de isolados) de bastonete e os 222 restantes (70,3% do total de isolados) de cocos. Os dados referentes à abundância relativa de isolados encontram-se na TABELA 9. A maior parte dos isolados obtidos, 38%, foi coletada de animais da raça Gir, em seguida, 35% dos isolados vieram de animais da raça Girolando 1/2, 18% da raça Holandês e 9% da raça Guzerá.

TABELA 9 – Distribuição por raça dos 314 isolados de BAL obtidos de 81 vacas a partir de amostras de leite cru e *swab* intramamário

Raça	Número de isolados	Número médio de isolados por animal
Guzerá ( $n=9$ )	29	3,2
Girolando 1/2 ( $n=33$ )	110	3,3
Gir ( $n=25$ )	120	4,8
Holandês ( $n=14$ )	55	3,9

Na tentativa de agrupar isolados de BAL, em amostras de um mesmo animal, que representavam uma mesma linhagem bacteriana, foi realizada análise do perfil de *fingerprinting* rep-PCR (GTG)<sub>5</sub>. Utilizando esta metodologia, foram descartados 122 (39%) isolados que representavam uma replicata de um outro isolado obtido no mesmo animal, o qual foi mantido no estudo. Portanto, depois desta filtragem, 192 isolados foram então submetidos a identificação molecular. A FIGURA 18 apresenta um resultado de *fingerprinting* rep-PCR (GTG)<sub>5</sub> no qual são mostrados isolados de uma mesma linhagem e isolados de linhagens diferentes, diferenciados pelo padrão de bandas obtidos após resolução dos *amplicons* em eletroforese em gel de agarose 2%.

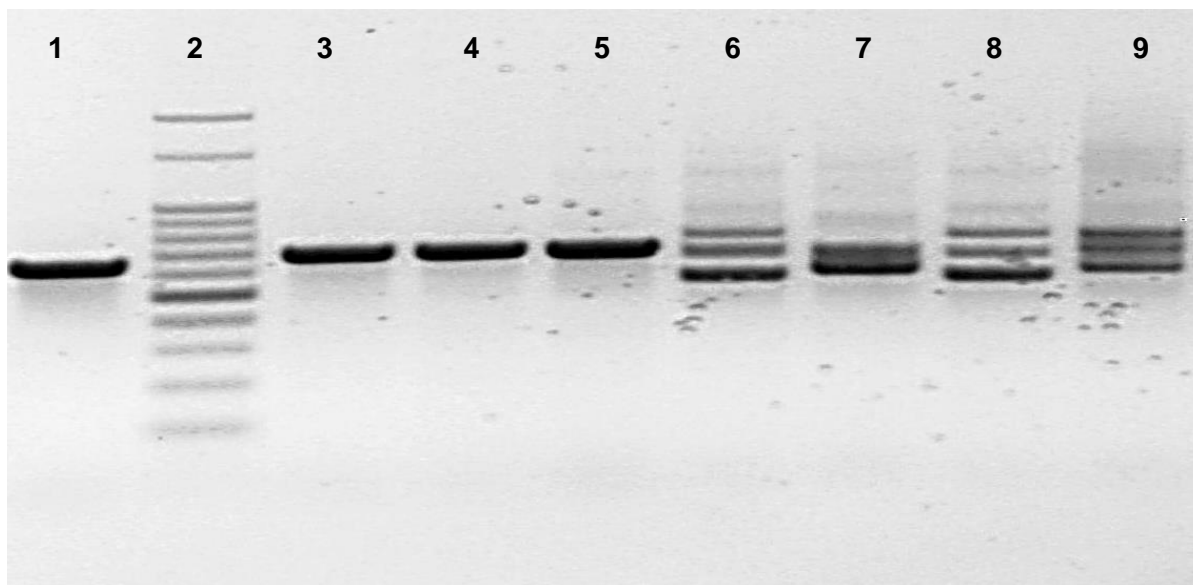
FIGURA 18 - Perfis de *fingerprinting* rep-PCR (GTG)<sub>5</sub> de isolados de BAL obtidos a partir da resolução dos *amplicons* em eletroforese em gel de agarose 2%



**Legenda:** Perfis de *fingerprinting* rep-PCR (GTG)<sub>5</sub> de isolados de BAL obtidos a partir da resolução de *amplicons* em eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo e documentado em transluminador com luz UV Gel Doc XR (Bio-rad, Hercules, CA, EUA). Na canaleta 1 foi aplicado marcador de pelo molecular de 100 bp DNA ladder (Promega), nas canaletas 2, 4, 6 e 13 se encontram isolados que foram considerados como sendo do mesmo biótipo ou linhagem, nas canaletas 5, 7, 8 e 9 se encontram isolados que foram considerados como sendo do mesmo biótipo ou linhagem, nas canaletas 10 e 11 se encontram isolados que foram considerados como sendo do mesmo biótipo ou linhagem, nas 3, 12, 13, 14, 15, e 16 se encontram isolados de diferentes biótipos e que não apresentam semelhanças entre si nem com os demais perfis observados no gel.

Os 192 isolados com perfis distintos de *fingerprinting* rep-PCR (GTG)<sub>5</sub> foram submetidos à análise dos polimorfismos de tamanho dos espaçadores do transcrito interno I (ITS I), localizado entre os genes codificadores do rRNA 16S e rRNA 23S. A FIGURA 19 apresenta um gel de agarose 1,4% com a resolução em eletroforese dos três tipos esperados de perfil para esta análise. Os tamanhos dos *amplicons* que representam os diferentes tipos de ITS I variam de aproximadamente 600-750 pb, sendo que *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Weissella* e *Lactobacillus* apresentam três *amplicons*, *Enterococcus* apresenta dois *amplicons* e *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* e *Streptococcus* apresentam apenas um *amplicon*. Entre os 192 isolados, 37 apresentaram dois *amplicons* e 55 apresentaram um *amplicon* e foram encaminhados para o sequenciamento de parte do gene codificador do rRNA 16S, para a sua identificação molecular em nível de espécie. Os demais 100 isolados apresentaram o perfil de 3 *amplicons* e foram submetidos a análise de restrição por PCR-ARDRA para sua identificação.

FIGURA 19 - Perfil da amplificação da região ITS I entre os genes codificadores do rRNA 16S e rRNA 23S de isolados de BAL obtido a partir de eletroforese em gel de agarose 1,4%



**Legenda:** Perfis da amplificação da região ITS I entre os genes codificadores do rRNA 16S e rRNA 23S de isolados de BAL obtido a partir da resolução dos *amplicons* em eletroforese em gel de agarose 1,4% corado com brometo de etídeo e documentado em transluminador com luz UV Gel Doc XR (Bio-rad). Na canaleta 2 foi aplicado marcador de pelo molecular de 100 bp DNA *ladder* (Promega). Nas canaletas 1, 3, 4 e 5 estão amostras que apresentam apenas um espaçador ITS I e pertencem aos gêneros *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* ou *Streptococcus*. Nas canaletas 6,8 e 9 estão amostras que apresentam três espaçadores ITS I e pertencem aos gêneros *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Weissella* ou *Lactobacillus*. Na canaleta 7 encontramos uma amostra com dois espaçadores ITS I pertencente ao gênero *Enterococcus*.

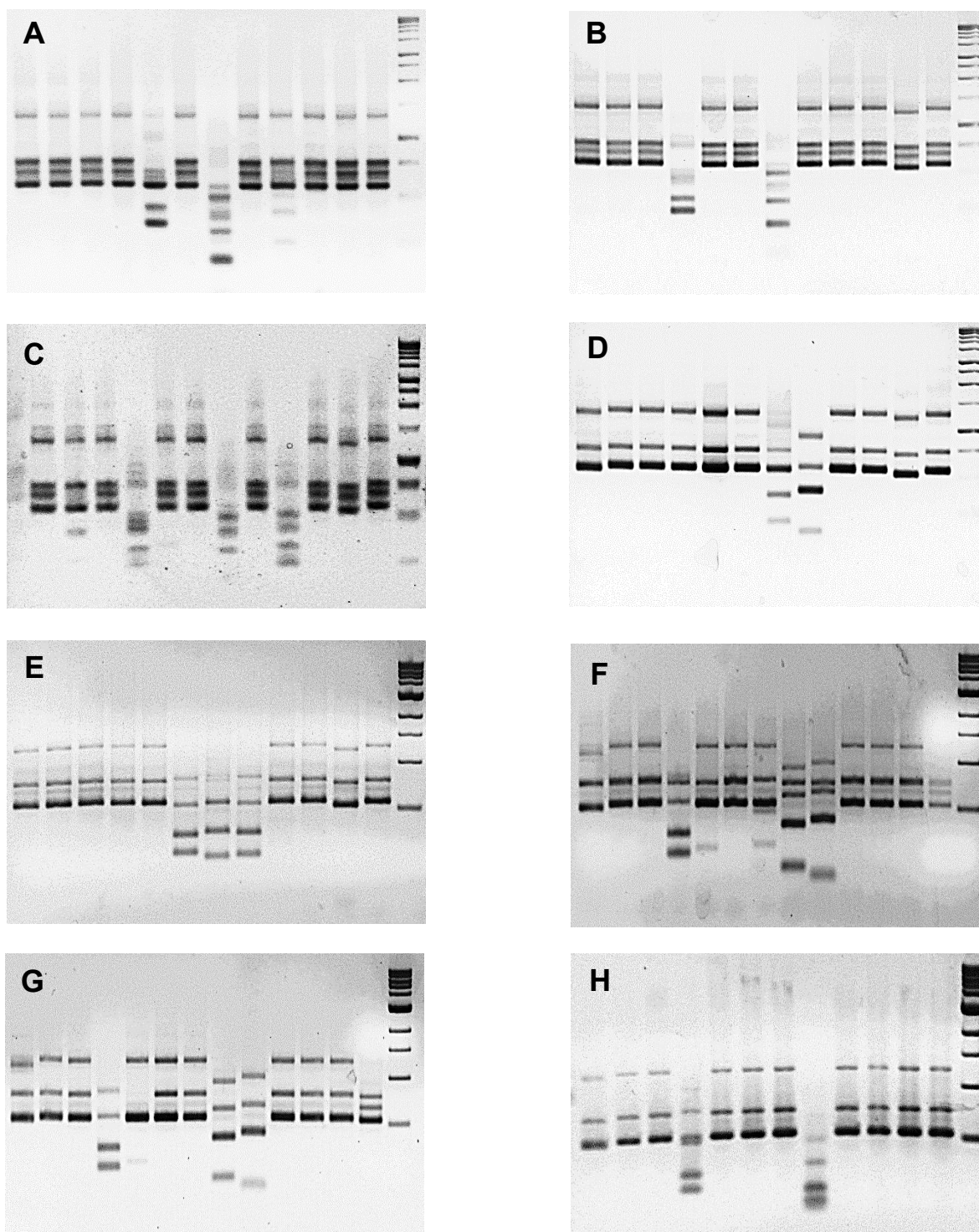
Os 100 isolados que apresentaram o perfil de 3 *amplicons* na análise do ITS I foram submetidos à PCR-ARDRA utilizando doze enzimas de restrição e foram obtidos 8 diferentes perfis. Os perfis obtidos foram comparados com o padrão previamente estabelecido por Sandes e col. (2014) permitindo a identificação dos isolados em nível de espécie. Os diferentes perfis obtidos estão apresentados na FIGURA 20. Quatro isolados apresentaram o perfil identificado como “Grupo *plantarum*” (FIGURA 20F). Para identificação em nível de espécies, esses quatro isolados foram submetidos a uma análise, por PCR, de polimorfismo presente no gene *recA* (TORRIANI et al., 2001), que permitiu a identificação de 3 desses isolados como *Lactobacillus plantarum* e um como *Lactobacillus pentosus*. O isolado que apresentou o perfil denominado “Grupo *casei*” (FIGURA 20E) também foi submetido a uma segunda etapa de identificação utilizando polimorfismos presentes no gene codificador do rRNA 16S seguindo procedimentos descritos por Ward e Timmins

(1999), e foi identificado como *Lactobacillus paracasei*. Os perfis de *Weissella* (FIGURA 20A, 20B e 20C), *Pediococcus* (FIGURA 20D) e *Lactobacillus mucosae* (FIGURA 20H) não haviam sido contemplados por Sandes e col. (2014) e, portanto, foram identificados por sequenciamento de parte do gene do rRNA 16S. Pelo menos um representante de cada perfil de PCR-ARDRA obtido foi submetido ao sequenciamento de uma porção do gene codificador do rRNA 16S para confirmação das identificações.

Os 37 isolados que apresentaram dois *amplicons* e os 55 isolados que apresentaram um *amplicon* para a análise do ITS I foram encaminhados para o sequenciamento de parte do gene codificador do rRNA 16S, para a sua identificação molecular em nível de espécie. Somados a esses isolados, foram sequenciados também pelo menos um representante de cada perfil de PCR-ARDRA obtido para confirmação das identificações. Desta maneira, os 192 isolados foram identificados como pertencentes a 30 diferentes espécies de BAL com a seguinte abundância: *Weissella paramesenteroides* (15), *W. confusa* (3), *W. cibaria* (2), *Streptococcus lutetiensis* (15), *S. bovis* (2), *S. salivarius* (2), *S. infantarius* (2), *S. henryi* (1), *S. gallolyticus* (1), *S. equinus* (1), *S. pseudoporcinus* (1), *S. parasanguinis* (1), *Pediococcus pentosaceus* (69), *P. stilesii* (1), *Lactococcus lactis* (16), *L. garvieae* (13), *Lactobacillus plantarum* (6), *L. pentosus* (1), *L. mucosae* (1), *L. brevis* (1), *L. paracasei* (1), *Enterococcus hirae* (23), *E. camelliae* (3), *E. casseliflavus/gallinarum* (3), *E. faecalis* (2), *E. italicus* (2), *E. saccharolyticus* (1), *E. faecium* (1), *E. pseudoavium* (1) e *E. durans* (1) (FIGURA 21). A relação completa da identificação de todos os 192 isolados está no ANEXO 1.

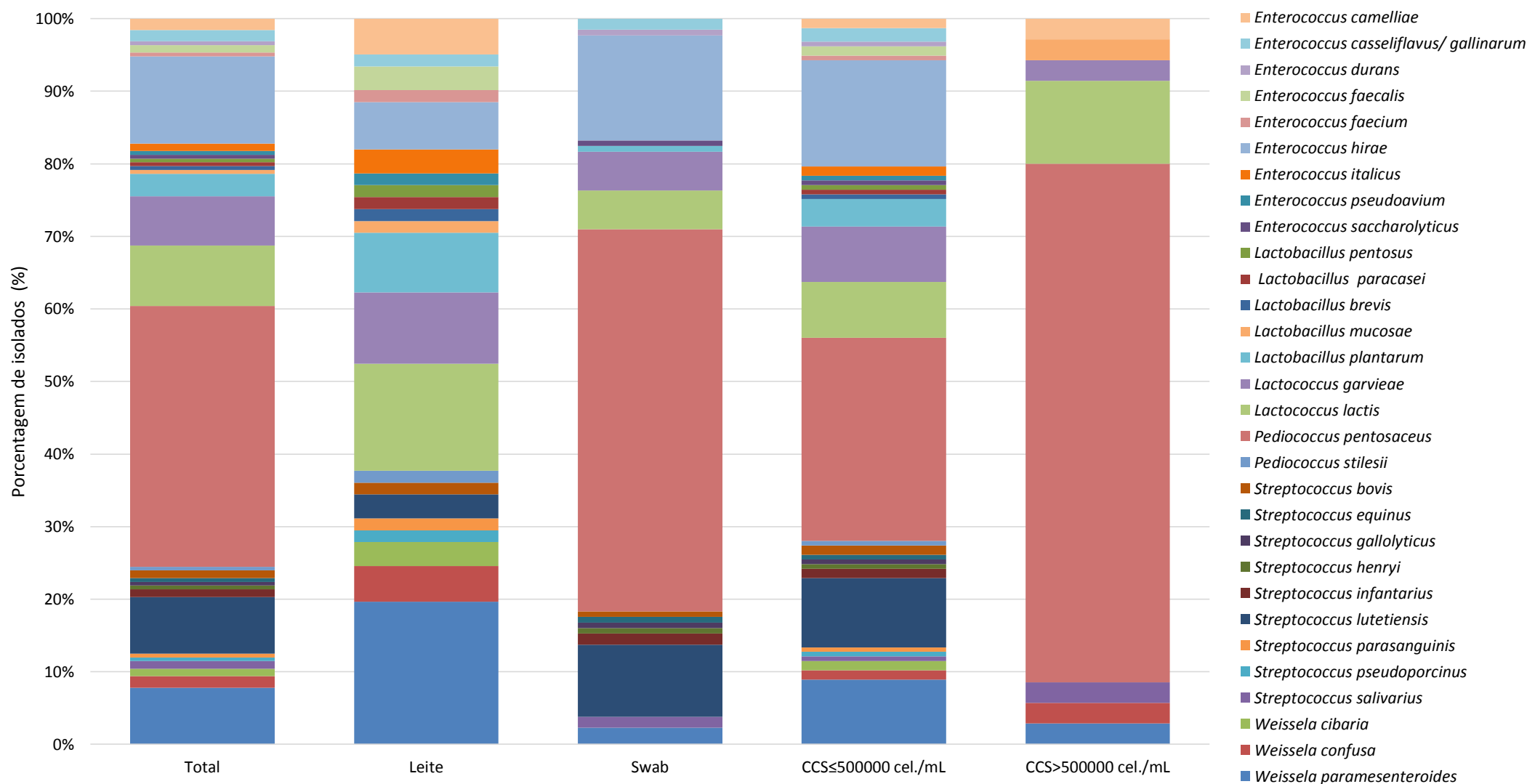
Ao analisar os isolados obtidos de animais com CCS de até 500.000 cel/mL foram identificadas 29 espécies em 157 isolados, sendo apenas *L. mucosae* não encontrado. Em animais com CCS > 500.000 cel/ mL foram obtidos apenas 35 isolados pertencentes a apenas 8 espécies sendo elas: *W. paramesenteroides*, *W. confusa*, *S. salivarius*, *P. pentosaceus*, *L. lactis*, *L. garvieae*, *L. mucosae* e *E. camelliae* (FIGURA 21).

FIGURA 20 – Perfis de restrição obtidos por PCR – ARDRA dos espaçadores ITS I para identificação dos isolados



**Legenda:** Perfis de restrição dos espaçadores ITS I, entre os genes codificadores do rRNA 16S e rRNA 23S, de isolados de BAL obtidos a partir da resolução dos *amplicons* digeridos com endonucleases de restrição resolvidos em eletroforese em gel de agarose 1,4% corado com brometo de etídeo e documentado em transluminador com luz UV Gel Doc XR (Bio-rad). Em todos os géis foi aplicado na última canalleta o marcador de pelo molecular de 1 kb plus DNA ladder (Promega). Em todos os géis, da esquerda para a direita, foi aplicado o produto da digestão dos espaçadores ITS I digeridos, respectivamente, pelas enzimas de restrição: *SphI*, *NcoI*, *NheI*, *SspI*, *Csp45I*, *EcoRV*, *DraI*, *VspI*, *HincII*, *EcoRI*, *HindIII* e *AvrII*. **A:** Perfil de *Weissella paramesenteroides*; **B:** Perfil de *Weissella confusa*; **C:** Perfil de *Weissella cibaria*; **D:** Perfil de *Pediococcus pentosaceus*; **E:** Perfil do “Grupo *casei*”; **F:** Perfil do “Grupo *plantarum*”; **G:** Perfil de *Lactobacillus plantarum* e **H:** Perfil de *Lactobacillus mucosae*.

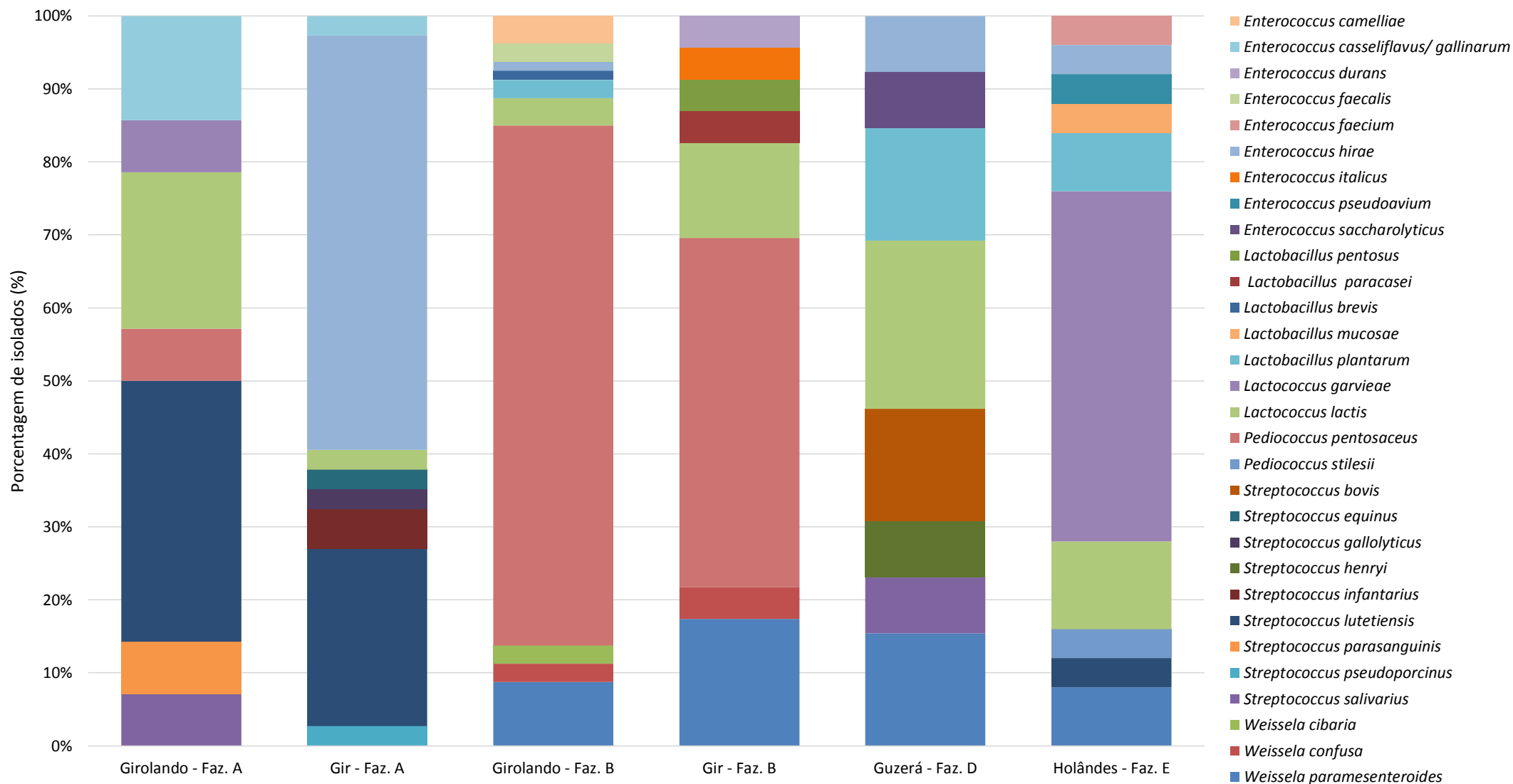
FIGURA 21 – Diversidade dos 192 isolados de BAL obtidos de amostras de leite cru e swab intramamário a partir de amostras biológicas de 81 vacas das raças Guzerá, Girolando 1/2, Gir e Holandês de acordo com o tipo de amostra de origem



**Legenda:** Abundância relativa (em percentual de isolados -%) na amostra total e em diferentes sub-amostras de acordo com o tipo de amostra (Leite ou Swab) ou de acordo com o valor de contagem de células somáticas (CCS) encontradas nos animais usados para isolamento de BAL.



FIGURA 22 – Abundância relativa dos isolados de BAL obtidos de amostras de leite e *swab* intramamário de acordo com o a raça do animal e fazenda de origem



**Legenda:** Abundância relativa (em percentual de isolados -%) de acordo com a raça/fazenda de origem dos animais coletados para isolamento de BAL a partir de leite cru e *swab* intramamário.

Ao analisar a diversidade obtida no isolamento de BAL de amostras de leite cru e *swab* intramamário, foi observado maior número de espécies no leite (22 espécies) com relação ao recuperado em *swab* (16 espécies). Além disso, o número de espécies exclusivamente isoladas a partir de leite foi maior que aquelas unicamente isoladas a partir de *swab*, respectivamente, 14 e 8 espécies. Com exceção de *L. mucosae*, todos os demais isolados desse gênero foram obtidos em amostras de leite. Uma mesma tendência foi observada no gênero *Weissella*, já que apenas três isolados de *W. paramesenteroides* foram recuperados de *swab*, sendo que todos os outros 17 isolados desse gênero vieram de amostras de leite. Por outro lado, a maior parte dos isolados e espécies de *Streptococcus* foi obtida em amostras de *swab*, sendo apenas 2 espécies exclusivamente encontradas em leite (*S. pseudoporcinus* e *S. parasanguinis*) e 5 recuperadas exclusivamente a partir de amostras de *swab* intramamário (*S. salivarius*, *S. infantarius*, *S. henryi*, *S. gallolyticus* e *S. equinus*). Interessantemente, todos os 69 isolados da espécie *P. pentosaceus* foram encontrados em amostras de *swab*, sendo 68 deles oriundos de animais da Fazenda B (FIGURA 22).

Em média, foram recuperados de 7-10 diferentes espécies em cada uma das fazendas ou raças analisadas. A raça Guzerá foi a que apresentou maior homogeneidade na diversidade de espécies, sendo que nela as espécies mais raras foram *E. saccharolyticus*, *E. hirae*, *S. henryi* e *S. bovis*, cada uma apresentando uma abundância relativa de 8% sendo a espécie dominante *L. lactis* com 23%. A raça Holandês teve uma dominância da espécie de *L. garvieae* que representou 48% dos isolados obtidos, sendo que as outras 9 espécies apresentaram abundância relativa entre 4-12%. Entretanto, ao analisar o perfil de espécies recuperadas nas raças Gir e Girolando 1/2 foi observado que a diversidade de BAL entre animais da raça Gir da Fazenda A e da Fazenda B era diferente. Na Fazenda B, animais da raça Gir apresentaram como espécie mais comum *Pediococcus pentosaceus*, que foi encontrada com abundância relativa de 48%, seguida por *W. paramesenteroides* com 17% e *L. lactis* com 13%. Os demais 22% de abundância relativa foram compostos, de forma homogênea, por espécies do gênero *Enterococcus*, *Weissella* e *Lactobacillus*. Por outro lado, animais da raça Gir da Fazenda A apresentaram uma composição de espécies bem diferente, com dominância de *E. hirae* (57%), seguido por *S. lutetiensis* (24%) e por *S. infantarius* (5%), sendo que as demais espécies (*S. pseudoporcinus*, *S. gallolyticus*, *S. equinus*, *L. lactis* e *E. casseliflavus/gallinarum*)



apresentaram abundância relativa de 3% cada. Na raça Girolando 1/2 essa mesma diferença composicional foi observada. Em animais da Fazenda B, 71% dos isolados obtidos pertenciam a espécie *P. pentosaceus* e 9% a espécie *W. paramesenteroides*. Os demais 20% de abundância relativa apresentaram composição relativa ligeiramente semelhante entre espécies dos gêneros *Enterococcus*, *Weissella*, *Lactococcus* e *Lactobacillus*. Por outro lado, na Fazenda A animais da raça Girolando 1/2 apresentaram como espécie de BAL dominante *S. lutetiensis* (36%), seguido por *L. lactis* (21%) e *E. casseliflavus/ gallinarum* (14%), sendo ainda encontrados nessa raça, com menor e homogênea abundância relativa, outros isolados do gênero *Streptococcus* e também de *Lactococcus* e *Pediococcus*. Esses resultados sugerem que existe uma maior semelhança na composição relativa de BAL entre animais de raças diferentes que estão vivendo em uma mesma fazenda em relação a animais de uma mesma raça que vivem em fazendas distintas. A FIGURA 22 apresenta a distribuição relativa de isolados de acordo com o a raça e fazenda de origem do animal.

Após a identificação molecular dos 192 isolados, seus perfis de *fingerprinting* rep-PCR (GTG)<sub>5</sub> foram novamente avaliados para a identificação de isolados de uma mesma espécie pertencentes a mesma linhagem. Desta maneira, 99 isolados foram reconhecidos como linhagens repetidas e, portanto, 93 linhagens diferentes foram identificadas. Entre as 93 diferentes linhagens, 81 foram isoladas a partir de animais com CCS < 500.000 cel/mL e foram selecionadas para a caracterização do seu potencial probiótico em testes *in vitro*. Além destes, o isolado *L. mucosae* HOL5L1 obtido de um animal com CCS > 500.000 cel/mL, também foi selecionado para os testes *in vitro*, pois foi o único isolado recuperado desta espécie. No total, portanto, foram selecionados 82 diferentes isolados para os subsequentes testes de caracterização probiótica *in vitro*.

### 6.5 Caracterizações probiótica *in vitro* de isolados de BAL

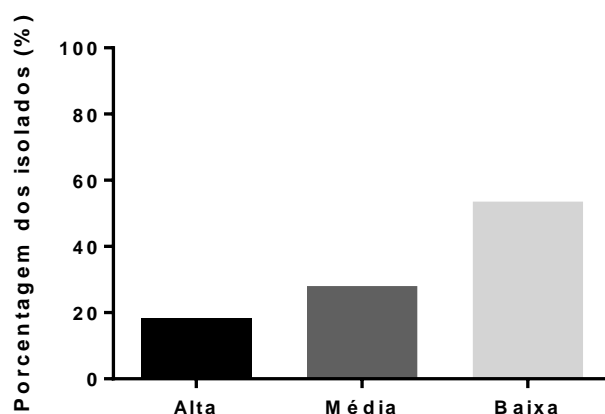
Dos 82 isolados selecionados para avaliação do potencial probiótico *in vitro*, 6 pertenciam ao gênero *Pediococcus*, 14 *Lactococcus*, 12 *Weissella*, 10 *Lactobacillus*, 23 *Enterococcus* e 17 *Streptococcus*. Esses isolados foram avaliados quanto às características da superfície celular; capacidade de produção de EPS, biofilme e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; sensibilidade aos antimicrobianos; antagonismo contra patógenos bacterianos e presença de fatores de virulência associados à mastite.

Com o intuito de avaliar as características da superfície celular de BAL foram mensuradas a capacidade de autoagregação, co-agregação com *S. aureus* ATCC 29213 e *E. coli* ATCC 25723 e a hidrofobicidade de sua superfície celular. O percentual médio de autoagregação dos 82 isolados de BAL foi de 42,45±18,30%, variando de 0-89,5%. Metade (53,66%) dos isolados apresentou baixa autoagregação e apenas 18,29% dos isolados foram considerados de autoagregação alta. Já o percentual médio de co-agregação dos 82 isolados de BAL com *S. aureus* ATCC 29213 foi de 23,90±20,75%, variando de 0-87,6% e para *E. coli* ATCC 25723 foi de 20,64±18,64%, variando de 0-74,9%. Usando os mesmos critérios de classificação propostos por Nader-Macías e col. (2008) para classificação do grau de autoagregação, a maior parte dos isolados (74,39%) apresentou baixa co-agregação com *S. aureus* e também com *E. coli* (80,49%) e, menos de 5% dos isolados foram capazes de co-agregar em grau elevado com qualquer um dos patógenos avaliados. A mesma tendência foi observada para a hidrofobicidade da superfície celular. A hidrofobicidade média dos isolados foi de 16,65±18,04%. A hidrofobicidade variou de 0-96,36%, sendo que a maior parte dos isolados (85,37%) apresentou baixa hidrofobicidade da superfície celular e apenas 9,76% dos isolados apresentou alta hidrofobicidade. Os resultados individuais de autoagregação, co-agregação e hidrofobicidade estão mostrados na TABELA 14. As FIGURAS 23, 24 e 25 mostram a distribuição relativa dos isolados (em porcentagem de isolados) de acordo com o grau de autoagregação, co-agregação com *S. aureus* ATCC 29213 e *E. coli* ATCC 25723 e hidrofobicidade, respectivamente.

Os resultados dos testes de correlação de Pearson entre os valores individuais das características de superfície celular estão mostrados na FIGURA 27. Foi encontrada correlação significativa e positiva entre a autoagregação individual de BAL

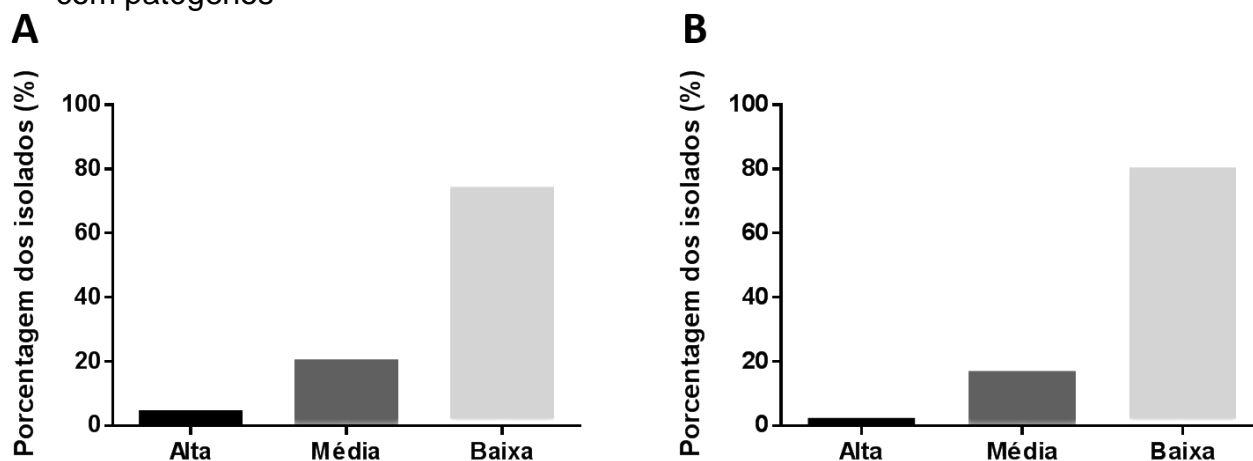
e co-agregação dos isolados com *E. coli* (coeficiente de Pearson=0,3141;  $p=0,0041$ ), entre co-agregação dos isolados com *S. aureus* e co-agregação individual com *E. coli* (coeficiente de Pearson=0,6281;  $p<0,0001$ ) e entre a hidrofobicidade dos isolados e a co-agregação individual com *S. aureus* (coeficiente de Pearson=0,2225;  $p=0,0445$ ). Não foi encontrada correlação significativa entre a autoagregação com co-agregação individual com *S. aureus*, a hidrofobicidade e a autoagregação individual ou com a co-agregação de isolados de BAL com *E. coli*.

FIGURA 23 - Distribuição relativa dos isolados de acordo com o nível de autoagregação



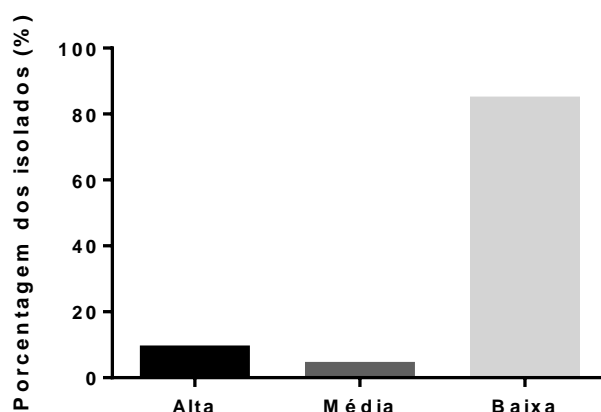
**Legenda:** Distribuição relativa (em percentual de isolados -%) dos 82 isolados, de acordo com o nível de autoagregação, foi feita de acordo com critério descrito por Nader-Macías e col. (2008), no qual isolados com autoagregação entre 0-33% foram considerados com tendo baixa autoagregação, aqueles com autoagregação entre 34-66% considerados com autoagregação moderada e aqueles com autoagregação entre 67-100% considerados como possuindo alta autoagregação de sua superfície celular.

FIGURA 24 - Distribuição relativa dos isolados de acordo com o nível de co-agregação com patógenos



**Legenda:** Distribuição relativa (em percentual de isolados -%) dos 82 isolados, de acordo com o nível de autoagregação, foi feita de acordo com critério descrito por Nader-Macías e col. (2008), no qual isolados com co-agregação com patógenos entre 0-33% foram considerados com tendo baixa co-agregação, aqueles com co-agregação entre 34-66% considerados com co-agregação moderada e aqueles com co-agregação entre 67-100% considerados como possuindo alta co-agregação. **A:** Co-agregação de BAL com *S. aureus* ATCC 29213 e **B:** Co-agregação de BAL com *E. coli* ATCC 25723.

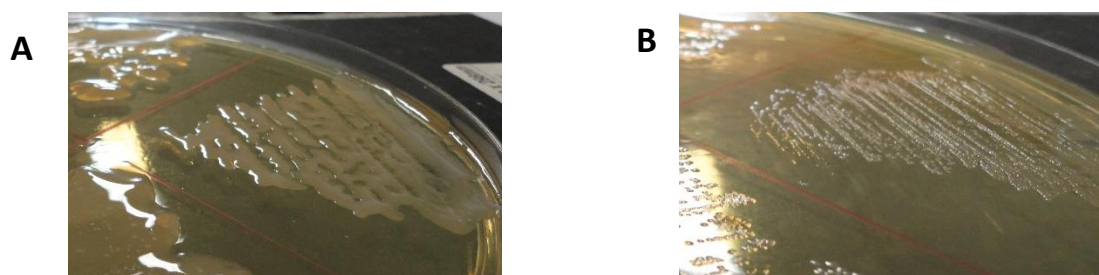
FIGURA 25 - Distribuição relativa dos isolados de acordo com o nível de hidrofobicidade



**Legenda:** A distribuição relativa dos 82 isolados (em percentual de isolados -%), de acordo com o nível de hidrofobicidade, foi feita de acordo com critério descrito por Nader-Macías e col. (2008), no qual isolados com hidrofobicidade entre 0-33% foram considerados com tendo baixa hidrofobicidade, aqueles com hidrofobicidade entre 34-66% considerados com hidrofobicidade média e aqueles com hidrofobicidade entre 67-100% considerados como possuindo alta hidrofobicidade de sua superfície celular.

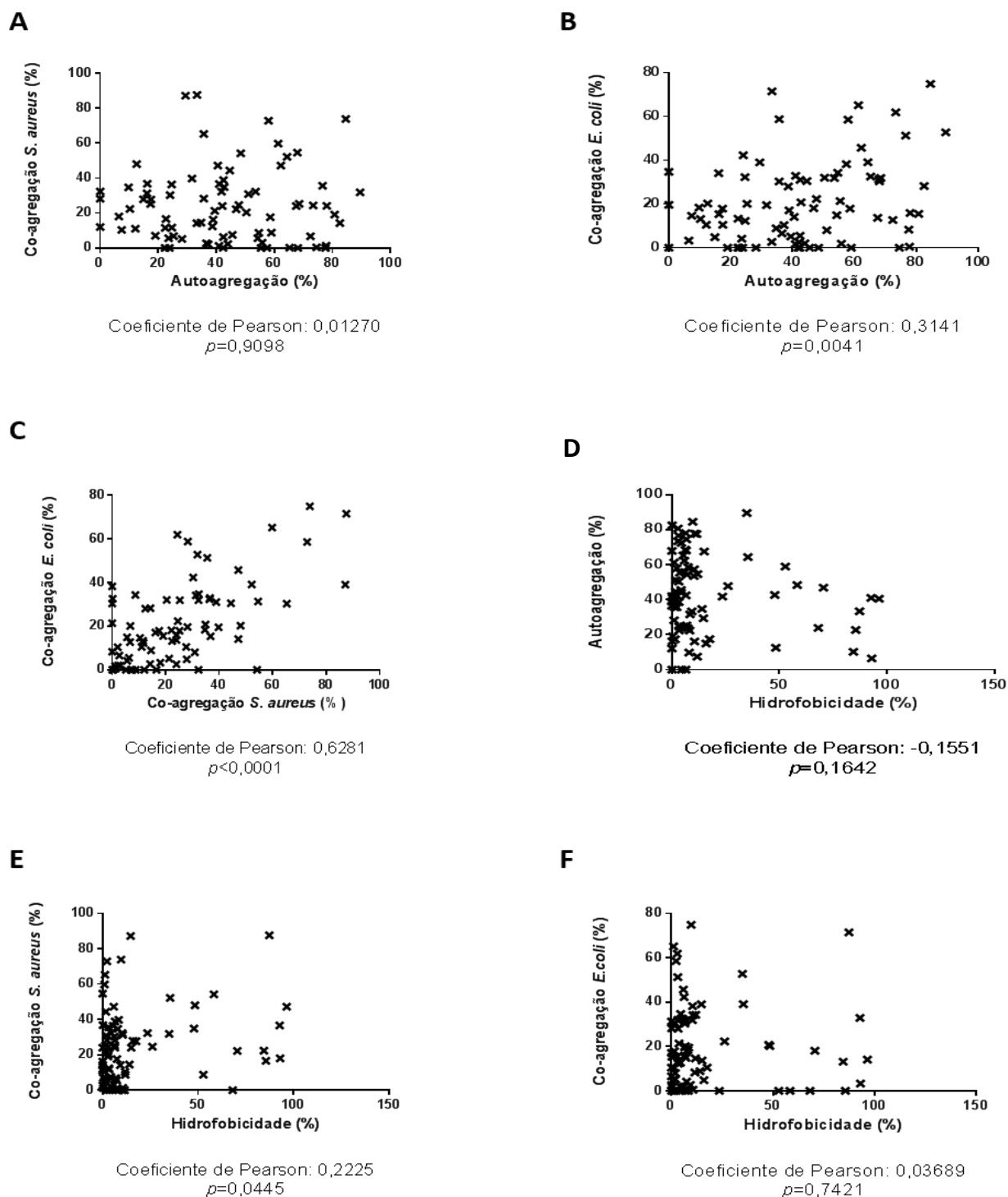
A capacidade de produção de biofilme sobre mucosas dos isolados de BAL foi avaliada utilizando os ensaios de produção de EPS em meio MRS modificado e de produção de biofilme em placas de poliestireno. Dos 82 isolados, apenas 17 deles foram capazes de produzir EPS no meio com adição de 8% de sacarose em substituição à glicose, evidenciado pelo aspecto viscoso das colônias (FIGURA 26; TABELA 10; TABELA 14). Dos 17 isolados produtores de EPS, 12 eram do gênero *Streptococcus*, 4 do gênero *Weissella* e apenas um do gênero *Enterococcus*. Interessantemente, a maior parte dos isolados produtores de EPS (70,6%) foi obtida de amostras de *swab*, diferentemente das características de superfície celular que não apresentaram nenhuma tendência de distribuição de acordo com a origem dos isolados (leite cru ou *swab* intramamário). A distribuição relativa dos isolados produtores e não-produtores de EPS está mostrada na FIGURA 28.

FIGURA 26 – Isolados produtores e não-produtores de EPS pela técnica de estriamento em ágar MRS modificado



**Legenda:** Foto de placas de MRS modificado com excesso de sacarose em substituição à glicose usadas para triagem da produção de EPS pelas BAL. **A:** Estria de isolado produtor de EPS e **B:** Estria de isolado não-produtor de EPS.

FIGURA 27 – Correlação entre as características de superfície celular dos isolados de BAL



**Legenda:** A relação entre as características individuais da superfície celular bacteriana foi avaliada utilizando o cálculo do coeficiente de correlação de Pearson com base nos dados individuais e pareados de duas características. Correlações estatisticamente significativas apresentaram  $p<0,05$ . Variáveis diretamente correlacionadas apresentaram sinal do coeficiente de correlação de Pearson positivo e aquelas inversamente correlacionadas apresentaram sinal do coeficiente de correlação de Pearson negativo. **A:** correlação entre a autoagregação individual e a co-agregação dos isolados de BAL com *S. aureus* ATCC 29213; **B:** correlação entre a autoagregação individual e a co-agregação dos isolados de BAL com *E. coli* ATCC 25723; **C:** correlação entre a co-agregação dos isolados de BAL com *S. aureus* ATCC 29213 e a co-agregação individual com *E. coli* ATCC 25723; **D:** correlação entre a hidrofobicidade individual e a autoagregação de isolados de BAL; **E:** correlação entre a hidrofobicidade individual e a co-agregação dos isolados de BAL com *S. aureus* ATCC 29213 e **F:** correlação entre a hidrofobicidade individual e a co-agregação dos isolados de BAL com *E. coli* ATCC 25723.

FIGURA 28 - Distribuição dos isolados de BAL produtores e não-produtores de EPS de acordo com a origem da amostra biológica do isolamento

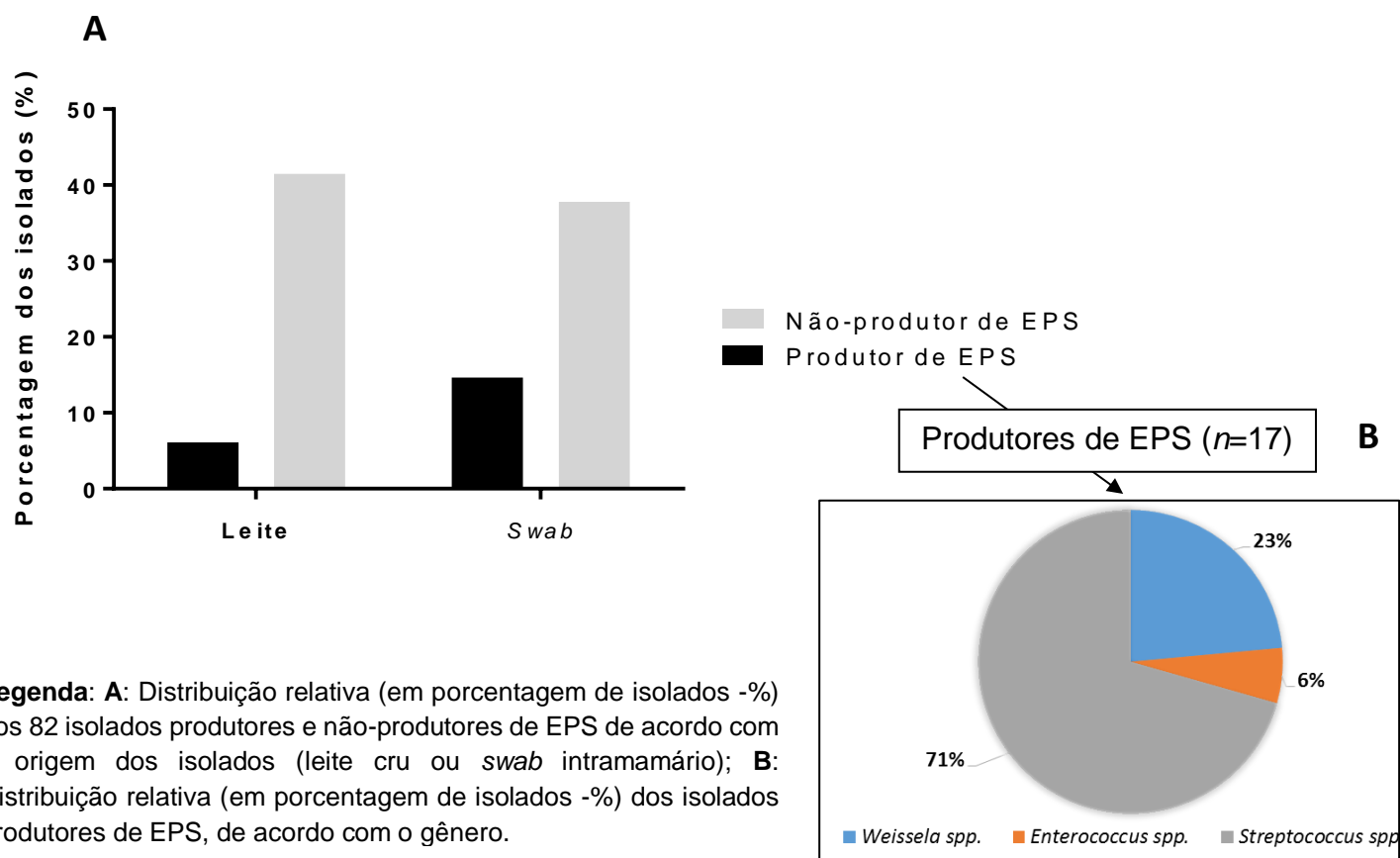


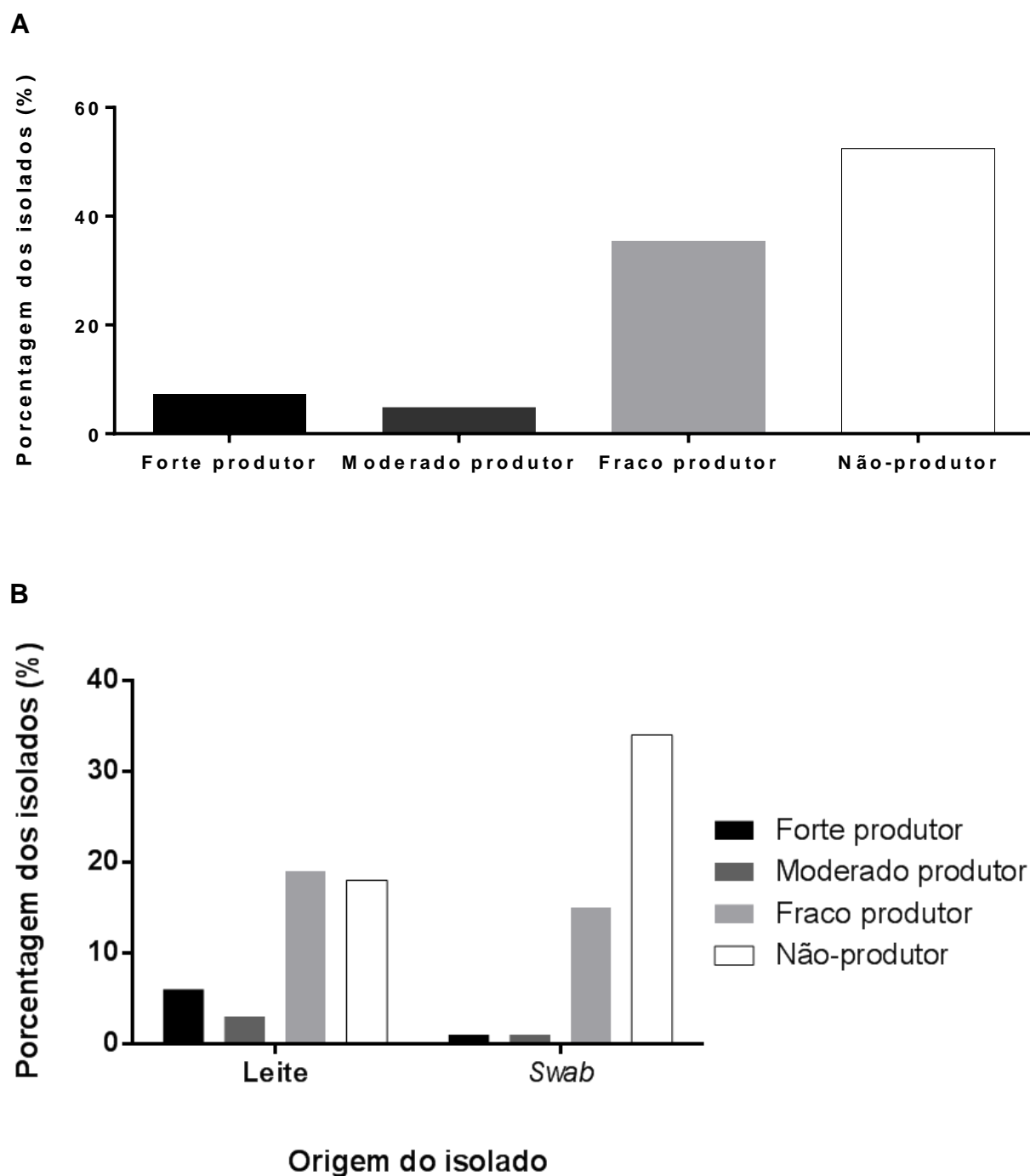
TABELA 10 – Isolados de BAL produtores de EPS

Identificação do isolado	Raça de origem	Fazenda de origem	Fonte
<i>Weissella confusa</i> GIR48L1*	Gir	B	Leite
<i>Weissella confusa</i> GIRO21L1*	Girolando	B	Leite
<i>Weissella cibaria</i> GIRO31L2*	Girolando	B	Leite
<i>Weissella cibaria</i> GIRO27L2*	Girolando	B	Leite
<i>Enterococcus hirae</i> GIR17S1	Gir	A	Swab
<i>Streptococcus lutetiensis</i> GIRO4S3	Girolando	A	Swab
<i>Streptococcus lutetiensis</i> GIR25S7	Gir	A	Swab
<i>Streptococcus lutetiensis</i> GIR25S8	Gir	A	Swab
<i>Streptococcus lutetiensis</i> GIR25S5	Gir	A	Swab
<i>Streptococcus lutetiensis</i> GIR25S2*	Gir	A	Swab
<i>Streptococcus lutetiensis</i> GIR20S1	Gir	A	Swab
<i>Streptococcus lutetiensis</i> GIRO15S2	Girolando	A	Swab
<i>Streptococcus infantarius</i> GIR14S1	Gir	A	Swab
<i>Streptococcus gallolyticus</i> GIR28S1	Gir	A	Swab
<i>Streptococcus equinus</i> GIR20S2	Gir	A	Swab
<i>Streptococcus bovis</i> GUZ1S7*	Guzerá	D	Swab
<i>Streptococcus bovis</i> GUZ1L1*	Guzerá	D	Leite

Metade dos 82 isolados avaliados (52,44%) não demonstrou capacidade de produzir biofilme no ensaio utilizando placas de poliestireno. De acordo com a classificação proposta por Milanov e col. (2010), 35,37% das BAL avaliadas foram fracas produtoras de biofilme, 4,88% moderadas produtoras de biofilme e 7,32% foram fortes produtoras de biofilme. Entre os isolados que foram fortes produtores de biofilme, apenas dois eram produtores de EPS (*W. confusa* GIR48L1\* e *W. confusa* GIRO21L1\*). Interessantemente, a maior proporção de isolados não produtores de biofilme foi originada de amostras de *swab* enquanto que entre todos os produtores, principalmente entre os fortes e moderados, foi observada uma tendência de predominância dos isolados originados de leite cru. Entre os 82 isolados, sete foram classificados como fortes produtores de biofilme, sendo eles: *L. lactis* GIR39S2; *W. paramesenteroides* GIR46L4\*; *W. confusa* GIR48L1\*; *W. confusa* GIRO21L1\*; *E. pseudoaerium* HOL25L1\* e *S. lutetiensis* HOL36L2\*. Os resultados do nível de produção individual de biofilme, para cada um dos isolados avaliados, estão mostrados na TABELA 14. A FIGURA 29 mostra a distribuição relativa dos isolados de acordo com o nível de produção de biofilme.

Os resultados dos testes de correlação de Pearson entre os valores individuais das características de superfície celular e a capacidade de cada isolado produzir biofilme estão mostrados na FIGURA 30. Foi encontrada correlação significativa entre a capacidade de cada isolado produzir biofilme e: sua hidrofobicidade individual (coeficiente de Pearson=0,4360;  $p < 0,0001$ ) e também com sua co-agregação individual com *E. coli* (coeficiente de Pearson= -0,3636;  $p = 0,0008$ ). Isto quer dizer que quanto maior a hidrofobicidade e menor a co-agregação com *E. coli* de um isolado de BAL maior será sua capacidade em produzir biofilme. Não foi encontrada correlação significativa entre a capacidade de cada isolado produzir biofilme e sua autoagregação ou co-agregação com *S. aureus* individual. Não foi observada nenhuma tendência de distribuição diferencial na capacidade de produzir biofilme entre isolados produtores e não-produtores de EPS.

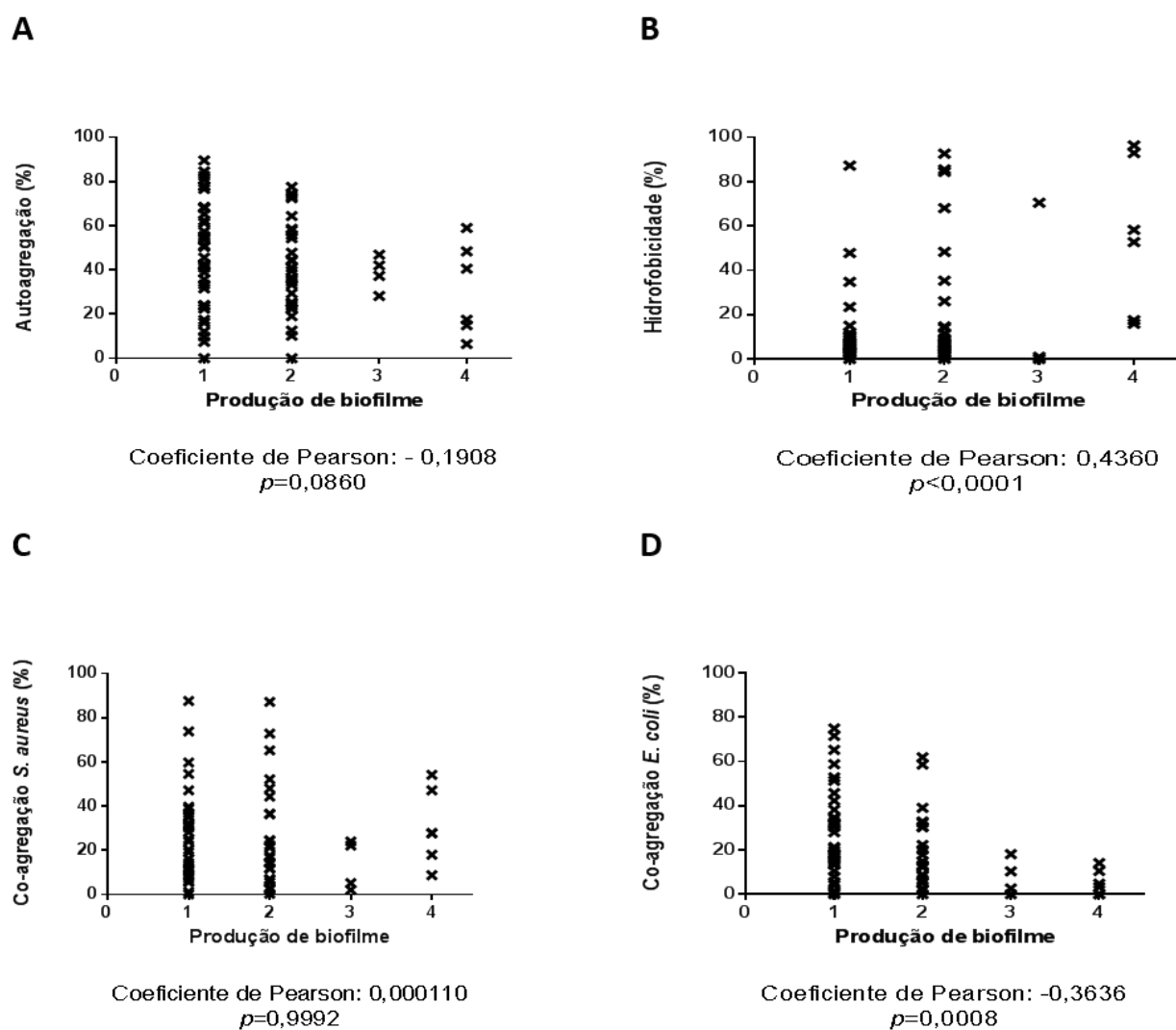
FIGURA 29 - Distribuição dos isolados de BAL de acordo com o nível de produção de biofilme no ensaio com placas de poliestireno



**Legenda:** A distribuição relativa (em percentual de isolados -%) dos 82 isolados, de acordo com o nível de produção de biofilme em placas de poliestireno, foi feita de acordo com critério descrito por Dubravka e col. (2010), levando em consideração a quantidade de cristal violeta retido pelas bactérias aderidas na placa. **A:** Distribuição relativa dos isolados, de acordo com o nível de produção de biofilme, sem discriminação da origem dos isolados; **B:** Distribuição relativa dos isolados, de acordo com o nível de produção de biofilme, de acordo com a origem dos isolados (leite cru ou *swab* intramamário).



FIGURA 30 – Correlação entre a capacidade de produção de biofilme e as características de superfície celular dos isolados de BAL



**Legenda:** A relação entre a capacidade de produção de biofilme e as características individuais da superfície celular bacteriana foi avaliada utilizando o cálculo do coeficiente de correlação de Pearson com base nos dados individuais e pareados de duas características. Correlações estatisticamente significativas apresentaram  $p<0,05$ . Variáveis diretamente correlacionadas apresentaram sinal do coeficiente de correlação de Pearson positivo e aquelas inversamente correlacionadas apresentaram sinal do coeficiente de correlação de Pearson negativo. **A:** correlação entre a autoagregação individual e capacidade de produção de biofilme; **B:** correlação entre a hidrofobicidade individual e a capacidade de produção de biofilme; **C:** correlação entre a co-agregação dos isolados de BAL com *S. aureus* ATCC 29213 e capacidade de produção de biofilme; **D:** correlação entre a co-agregação individual dos isolados de BAL com *E. coli* ATCC 25723 e a capacidade de produção de biofilme.

Produção de biofilme: 1 : não produtor; 2 : fraco produtor; 3 : moderado produtor; 4 : forte produtor.

Foi avaliada a sensibilidade dos 82 isolados de BAL aos antimicrobianos importantes na prática veterinária clínica, principalmente com relação ao tratamento da mastite através do método de difusão da droga em ágar (Charteris et al., 1998; ANVISA, 2005). Apenas 4 isolados (*P. pentosaceus* GIR50S1\*; *L. lactis* GUZ3S2\*; *E. hirae* GIR17S1 e *E. faecalis* GIRO33L2\*) foram sensíveis à vancomicina, os demais foram resistentes. Apenas *P. pentosaceus* GIR50S1\* foi resistente a ampicilina, sendo os demais sensíveis a esta droga. Três isolados (*W. paramesenteroides* GIR46L4\*; *W. cibaria* GIRO27L2\* e *E. faecalis* GIRO46L3\*) foram sensíveis a gentamicina sendo os demais resistentes. Somente *P. pentosaceus* GIR50S1 foi sensível e *W. paramesenteroides* GIR46L4\* foi moderadamente sensível a amicacina, sendo os demais isolados resistentes. *E. faecalis* GIRO33L2\* foi o único isolado resistente a eritromicina, outros 14 isolados (*L. garvieae* HOL12S2\*; *E. hirae* GIR14S6\*; HOL9L1\*; GIR17S5\*; GIR11S8\*; GIR20S3\*; GIR46S1\*; *S. salivarius* GUZ4S6\*; *S. parasanguinis* GIRO4L4; *S. lutetiensis* GIRO4S3; GIR25S2\*; HOL36L2\* e *S. equinus* GIR20S2) foram moderadamente sensíveis e os demais sensíveis. *P. pentosaceus* GIR50S1 foi o único isolado resistente a ceftriaxona, outros 8 isolados (*P. pentosaceus* GIRO18S1; GIRO23S1\*; GIRO29S1; *L. lactis* GIRO5L2; *L. garvieae* HOL12S2\*; *W. paramesenteroides* GIR51L1\*; *W. confusa* GIRO21L1\* e *S. salivarius* GUZ4S6\*) foram moderadamente sensíveis e os demais sensíveis a este antibiótico. Todos os isolados foram resistentes a estreptomicina. *E. faecalis* GIRO33L2\* foi o único isolado moderadamente sensível à oxacilina, *P. pentosaceus* GIR44S3\* e *L. lactis* GUZ3S2\* foram sensíveis e os demais isolados resistentes a este antimicrobiano. Nenhum isolado foi resistente a penicilina G, 18 (incluindo isolados dos gêneros *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Weissella* e *Lactobacillus*) foram moderadamente sensíveis e a grande maioria foi sensível a esta droga. Por fim, 8 isolados (*P. pentosaceus* GIRO23S1\*; GIRO29S1; *L. lactis* GIRO5L2; GIRO46L2\*; *L. garvieae* HOL12S2\*; *E. italicus* GIRO21L2\*; *S. salivarius* GUZ4S6\* e *S. henryi* GUZ10S2\*) foram resistentes a amoxicilina, 24 moderadamente sensíveis (incluindo isolados dos gêneros *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Weissella*, *Enterococcus* e *Streptococcus*) e os demais isolados foram sensíveis a este antibiótico (TABELA 11).

TABELA 11 – Sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados de BAL

Identificação do isolado	Antimicrobiano									
	VAN	AMP	GEN	AMI	ERI	CRO	EST	OXA	PEN	AMO
<i>Pediococcus stilesii</i> HOL36L1*	R	S	R	R	S	S	R	R	S	MS
<i>Pediococcus pentosaceus</i> GIR44S3*	R	S	R	R	S	S	R	S	MS	MS
<i>Pediococcus pentosaceus</i> GIR50S1*	S	R	R	S	S	R	R	R	S	MS
<i>Pediococcus pentosaceus</i> GIRO18S1	R	S	R	R	S	MS	R	R	S	S
<i>Pediococcus pentosaceus</i> GIRO23S1*	R	S	R	R	S	MS	R	R	MS	R
<i>Pediococcus pentosaceus</i> GIRO29S1	R	S	R	R	S	MS	R	R	MS	R
<i>Lactococcus lactis</i> GUZ3S2*	S	S	R	R	S	S	R	S	S	S
<i>Lactococcus lactis</i> GUZ3S3*	R	S	R	R	S	S	R	R	MS	MS
<i>Lactococcus lactis</i> HOL3L1	R	S	R	R	S	S	R	R	S	MS
<i>Lactococcus lactis</i> GIR46L3*	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S
<i>Lactococcus lactis</i> GIRO5L2	R	S	R	R	S	MS	R	R	S	R
<i>Lactococcus lactis</i> GIR39S2	R	S	R	R	S	S	R	R	MS	S
<i>Lactococcus lactis</i> GIRO11S1*	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S
<i>Lactococcus lactis</i> GIRO46L2*	R	S	R	R	S	S	R	R	MS	R
<i>Lactococcus lactis</i> GIRO4S8*	R	S	R	R	S	S	R	R	MS	MS
<i>Lactococcus lactis</i> HOL32S2	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S
<i>Lactococcus garvieae</i> HOL12S2*	R	S	R	R	MS	MS	R	R	MS	R
<i>Lactococcus garvieae</i> GIRO5S1*	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S
<i>Lactococcus garvieae</i> HOL15L3	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S
<i>Lactococcus garvieae</i> HOL26S3*	R	S	R	R	S	S	R	R	S	MS
<i>Weissella paramesenteroides</i> GIR46L4*	R	S	S	MS	S	S	R	R	S	S
<i>Weissella paramesenteroides</i> GIR48L2*	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S
<i>Weissella paramesenteroides</i> GIRO31L1*	R	S	R	R	S	S	R	R	MS	MS
<i>Weissella paramesenteroides</i> GIRO32L1*	R	S	R	R	S	S	R	R	S	MS
<i>Weissella paramesenteroides</i> GUZ3S4*	R	S	R	R	S	S	R	R	S	MS

... continuação

Identificação do isolado	Antimicrobiano									
	VAN	AMP	GEN	AMI	ERI	CRO	EST	OXA	PEN	AMO
<i>Weissella paramesenteroides</i> HOL25S3	R	S	R	R	S	S	R	R	MS	S
<i>Weissella paramesenteroides</i> GIR51L1*	R	S	R	R	S	MS	R	R	MS	MS
<i>Weissella paramesenteroides</i> GIR52L2*	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S
<i>Weissella confusa</i> GIR48L1*	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S
<i>Weissella confusa</i> GIRO21L1*	R	S	R	R	S	MS	R	R	MS	MS
<i>Weissella cibaria</i> GIRO31L2*	R	S	R	R	S	S	R	R	S	MS
<i>Weissella cibaria</i> GIRO27L2*	R	S	S	R	S	S	R	R	MS	S
<i>Lactobacillus plantarum</i> GUZ3S1*	R	S	R	R	S	S	R	R	MS	S
<i>Lactobacillus plantarum</i> HOL25L1	R	S	R	R	S	S	R	R	MS	S
<i>Lactobacillus plantarum</i> HOL25S1	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S
<i>Lactobacillus plantarum</i> GIRO23L1*	R	S	R	R	S	S	R	R	MS	S
<i>Lactobacillus plantarum</i> GIRO49L1*	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S
<i>Lactobacillus plantarum</i> GUZ3L2*	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S
<i>Lactobacillus pentosus</i> GIR50L1*	R	S	R	R	S	S	R	R	MS	S
<i>Lactobacillus mucosae</i> HOL5L1	R	S	R	R	S	S	R	R	MS	S
<i>Lactobacillus brevis</i> GIRO32L2*	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S
<i>Lactobacillus paracasei</i> GIR53L1*	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S
<i>Enterococcus saccharolyticus</i> GUZ9S1*	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S
<i>Enterococcus pseudoavium</i> HOL25L1*	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S
<i>Enterococcus italicus</i> GIRO21L2*	R	S	R	R	S	S	R	R	S	R
<i>Enterococcus italicus</i> GIR44L3*	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S
<i>Enterococcus hirae</i> GIR14S6*	R	S	R	R	MS	S	R	R	S	S
<i>Enterococcus hirae</i> HOL9L1*	R	S	R	R	MS	S	R	R	S	MS
<i>Enterococcus hirae</i> GIR17S1	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S
<i>Enterococcus hirae</i> GIR17S5*	R	S	R	R	MS	S	R	R	S	S
<i>Enterococcus hirae</i> GIR11S8*	R	S	R	R	MS	S	R	R	S	S

... continuação

Identificação do isolado	Antimicrobiano									
	VAN	AMP	GEN	AMI	ERI	CRO	EST	OXA	PEN	AMO
<i>Enterococcus hirae</i> GUZ4S4*	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S
<i>Enterococcus hirae</i> GIR30S1	R	S	R	R	S	S	R	R	S	MS
<i>Enterococcus hirae</i> GIR17S2	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S
<i>Enterococcus hirae</i> GIR20S3*	R	S	R	R	MS	S	R	R	S	MS
<i>Enterococcus hirae</i> GIR6S1	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S
<i>Enterococcus faecium</i> HOL8L2*	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S
<i>Enterococcus faecalis</i> GIRO33L2*	S	S	R	R	R	S	R	MS	S	S
<i>Enterococcus faecalis</i> GIRO46L3*	R	S	S	R	S	S	R	R	S	S
<i>Enterococcus durans</i> GIR46S1*	R	S	R	R	MS	S	R	R	S	S
<i>Enterococcus casseliflavus/ gallinarum</i> GIRO5L1*	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S
<i>Enterococcus casseliflavus/ gallinarum</i> GIR35S3	R	S	R	R	S	S	R	R	S	MS
<i>Enterococcus casseliflavus/ gallinarum</i> GIRO15S3*	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S
<i>Enterococcus camelliae</i> GIRO35L1*	R	S	R	R	S	S	R	R	S	MS
<i>Enterococcus camelliae</i> GIRO28L2*	R	S	R	R	MS	S	R	R	S	S
<i>Streptococcus salivarius</i> GUZ4S6*	R	S	R	R	MS	MS	R	R	S	R
<i>Streptococcus pseudoporcinus</i> GIR15L3	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S
<i>Streptococcus parasanguinis</i> GIRO4L4	R	S	R	R	MS	S	R	R	S	S
<i>Streptococcus lutetiensis</i> GIRO4S3	R	S	R	R	MS	S	R	R	S	MS
<i>Streptococcus lutetiensis</i> GIR25S7	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S
<i>Streptococcus lutetiensis</i> GIR25S8	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S
<i>Streptococcus lutetiensis</i> GIR25S5	R	S	R	R	S	S	R	R	S	MS
<i>Streptococcus lutetiensis</i> GIR25S2*	R	MS	R	R	MS	S	R	R	S	MS
<i>Streptococcus lutetiensis</i> GIR20S1	R	S	R	R	S	S	R	R	S	MS
<i>Streptococcus lutetiensis</i> HOL36L2*	R	S	R	R	MS	S	R	R	S	S
<i>Streptococcus lutetiensis</i> GIRO15S2	R	S	R	R	S	S	R	R	S	MS
<i>Streptococcus infantarius</i> GIR14S1	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S

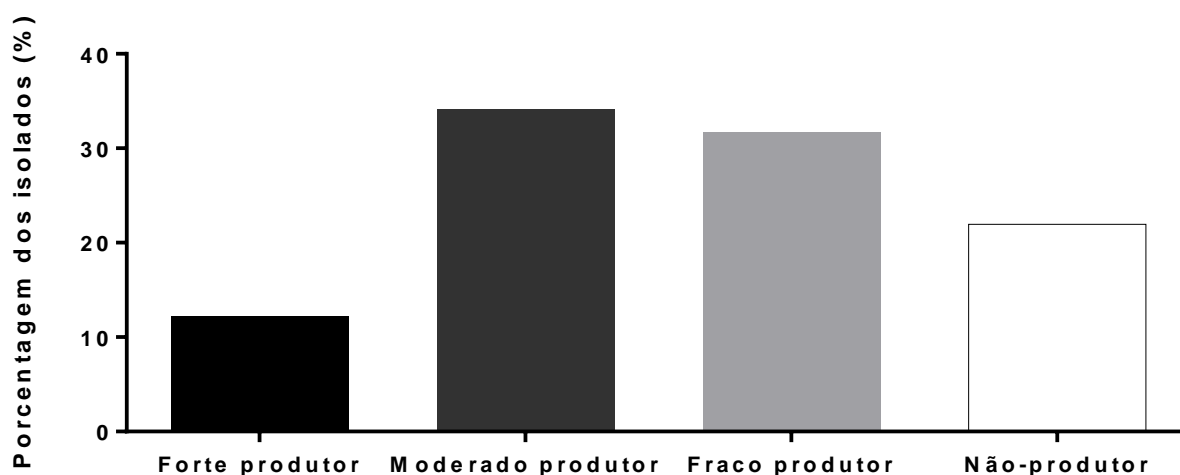
... continuação

Identificação do isolado	Antimicrobiano									
	VAN	AMP	GEN	AMI	ERI	CRO	EST	OXA	PEN	AMO
<i>Streptococcus henryi</i> GUZ10S2*	R	S	R	R	S	S	R	R	S	R
<i>Streptococcus gallolyticus</i> GIR28S1	R	S	R	R	S	S	R	R	S	MS
<i>Streptococcus equinus</i> GIR20S2	R	S	R	R	MS	S	R	R	S	S
<i>Streptococcus bovis</i> GUZ1S7*	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S
<i>Streptococcus bovis</i> GUZ1L1*	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S

**Legenda:** Sensibilidade aos antimicrobianos dos 82 isolados de BAL foi determinada pelo método de difusão da droga em ágar utilizando-se discos impregnados com antimicrobianos conforme descrito por Charteris e col. (1998) e ANVISA (2005). VAN: vancomicina 30 µg, AMP: ampicilina 10 µg, GEN: gentamicina 10 µg, AMI: amicacina 30 µg, ERI: eritromicina 15 µg, CRO: ceftriaxona 30 µg, EST: estreptomicina 10 µg, OXA: oxacilina 1 µg, PEN: penicilina G 10 U e AMO: amoxicilina 10 µg; R: resistente, MS: moderadamente sensível e S: sensível. Os halos de inibição de crescimento dos isolados frente à difusão das drogas foram medidos com paquímetro digital e o valor comparado com o padrão de sensibilidade descrito por Charteris e col. (1998) e ANVISA (2005).

A produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) foi avaliada em meio TMB-plus contendo 3,3',5,5'-TMB e peroxidase. Basicamente, o  $H_2O_2$  produzido por algum isolado é convertido, pela peroxidase presente no meio, em  $H_2$  e  $O_2$ . O 3,3',5,5'-TMB, presente no meio, funciona como indicador, que na presença de  $O_2$  adquire coloração azul. Por isso, a presença da coloração azul indica que o isolado é produtor de  $H_2O_2$  e, sua tonalidade, de azul claro até tons amarronzados, indica a intensidade da produção de  $H_2O_2$ . Apenas 21,95% dos isolados não produziu  $H_2O_2$  apresentando colônias brancas em meio TMB-plus. Entre os isolados de BAL produtores, 31,71% foram fracos produtores de  $H_2O_2$ , 34,15% foram moderados produtores de  $H_2O_2$  e 12,20% foram fortes produtores de  $H_2O_2$ . Entre os fortes produtores de  $H_2O_2$  foram encontradas apenas representantes do gênero *Weissella* (10 das 12 *Weissella* testadas), sendo que *W. confusa* GIR48L1\* e *W. confusa* GIRO21L1\* além de fortes produtoras de  $H_2O_2$ , foram também produtoras de EPS e fortes produtoras de biofilme em ensaio com placas de poliestireno. Não foi observada nenhuma tendência de distribuição diferencial no nível de produção de  $H_2O_2$  entre isolados de BAL originados de leite cru daqueles originados de swab intramamário. Os resultados do nível de produção individual de  $H_2O_2$  estão mostrados na TABELA 14. A FIGURA 31 mostra a distribuição relativa dos isolados de acordo com a produção de  $H_2O_2$ .

FIGURA 31 - Distribuição dos isolados de BAL de acordo com o nível de produção de  $H_2O_2$



**Legenda:** Distribuição relativa dos 82 isolados, de acordo com o nível de produção de  $H_2O_2$ , sem discriminação da origem dos isolados. A produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) foi avaliada em meio TMB-plus contendo 3,3',5,5'-TMB e peroxidase. Basicamente, o  $H_2O_2$  produzido por algum isolado é convertido, pela peroxidase presente no meio, em  $H_2$  e  $O_2$ . O 3,3',5,5'-TMB, presente no meio, funciona como indicador, que na presença de  $O_2$  adquire coloração azul. Por isso, a presença da coloração azul indica que o isolado é produtor de  $H_2O_2$  e, sua tonalidade, de azul claro até tons amarronzados, indica a intensidade da produção de  $H_2O_2$ .

O antagonismo dos 82 isolados de BAL aos patógenos associados à etiologia da mastite foi determinado pelo método de difusão em camada dupla de ágar usando como patógenos reveladores 11 bactérias patogênicas pertencentes às principais espécies associadas com casos de infecção intramamária. Os resultados individuais dos isolados de BAL para o ensaio de antagonismo estão mostrados na TABELA 12. A maior parte dos isolados avaliados (75%) apresentou antagonismo contra, pelo menos 8 patógenos reveladores e 35% das BAL testadas foram capazes de inibir o crescimento de todas as bactérias patogênicas avaliadas. Todos os isolados apresentaram antagonismo contra, pelo menos, 5 patógenos, exceto o isolado *E. faecalis* GIRO33L2\* que apresentou antagonismo apenas contra *S. sciuri* 8353. Entre os gêneros de BAL avaliados, os isolados de *Pediococcus* foram capazes de inibir todos os patógenos e aqueles pertencentes aos gêneros *Weissella* e *Lactobacillus* foram capazes de inibir, pelo menos, 9 patógenos. Entre os isolados de *Lactococcus*, a grande maioria foi capaz de inibir os 11 patógenos, com exceção do isolado *L. lactis* GUZ3S2\* que inibiu apenas 6 patógenos. Entre os isolados pertencentes aos gêneros *Enterococcus* e *Streptococcus* apenas três isolados (*E. saccharolyticus* GUZ9S1\*; *E. pseudoavium* HOL25L1\* e *S. bovis* GUZ1L1\*) foram capazes de produzir antagonismo contra todos os patógenos usados como reveladores.

Entre os patógenos usados como reveladores, *E. coli* ATCC 25723 foi a bactéria patogênica que menos foi inibida pelas BAL (16 isolados não foram capazes de inibir seu crescimento e 24 inibiram seu crescimento parcialmente); seguida de *L. monocytogenes* ATCC 15313 (7 isolados não foram capazes de inibir seu crescimento e 25 inibiram seu crescimento parcialmente); acompanhada de *S. aureus* ATCC 29213 (5 isolados não foram capazes de inibir seu crescimento e 7 inibiram seu crescimento parcialmente) e de *S. uberis* (10 isolados não foram capazes de inibir seu crescimento e 1 inibiu seu crescimento parcialmente). Apenas *S. sciuri* 8353 teve seu crescimento inibido por todas as BAL testadas neste trabalho. Usando a variável porcentagem de antagonismo, definida como número de patógenos que foram inibidos pelo isolado de BAL dividido pelo número total de patógenos reveladores e multiplicado por 100, a média de porcentagem de antagonismo entre as 82 BAL testadas foi de 87%.





Identificação do isolado	Patógeno revelador											% ant.
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
<i>Weissella paramesenteroides</i> HOL25S3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
<i>Weissella paramesenteroides</i> GIR51L1*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
<i>Weissella paramesenteroides</i> GIR52L2*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
<i>Weissella confusa</i> GIR48L1*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
<i>Weissella confusa</i> GIRO21L1*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
<i>Weissella cibaria</i> GIRO31L2*	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+	91
<i>Weissella cibaria</i> GIRO27L2*	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+	91
<i>Lactobacillus plantarum</i> GUZ3S1*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
<i>Lactobacillus plantarum</i> HOL25L1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
<i>Lactobacillus plantarum</i> HOL25S1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
<i>Lactobacillus plantarum</i> GIRO23L1*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
<i>Lactobacillus plantarum</i> GIRO49L1*	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+	91
<i>Lactobacillus plantarum</i> GUZ3L2*	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+	91
<i>Lactobacillus pentosus</i> GIR50L1*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
<i>Lactobacillus mucosae</i> HOL5L1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
<i>Lactobacillus brevis</i> GIRO32L2*	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	±	82
<i>Lactobacillus paracasei</i> GIR53L1*	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	±	82
<i>Enterococcus saccharolyticus</i> GUZ9S1*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
<i>Enterococcus pseudoavium</i> HOL25L1*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
<i>Enterococcus italicus</i> GIRO21L2*	+	+	+	±	+	+	+	±	+	+	±	73
<i>Enterococcus italicus</i> GIR44L3*	+	+	+	±	+	+	+	±	+	+	±	73
<i>Enterococcus hirae</i> GIR14S6*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	91
<i>Enterococcus hirae</i> HOL9L1*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	91
<i>Enterococcus hirae</i> GIR17S1	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	45
<i>Enterococcus hirae</i> GIR17S5*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	91
<i>Enterococcus hirae</i> GIR11S8*	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	±	82

Identificação do isolado	Patógeno revelador											% ant.
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
<i>Enterococcus hirae</i> GUZ4S4*	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+	91
<i>Enterococcus hirae</i> GIR30S1	±	+	+	+	+	+	+	±	±	+	±	64
<i>Enterococcus hirae</i> GIR17S2	±	+	+	+	+	+	+	±	±	+	±	64
<i>Enterococcus hirae</i> GIR20S3*	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	±	82
<i>Enterococcus hirae</i> GIR6S1	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	±	82
<i>Enterococcus faecium</i> HOL8L2*	±	+	+	±	+	+	+	-	±	+	-	55
<i>Enterococcus faecalis</i> GIRO33L2*	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	9
<i>Enterococcus faecalis</i> GIRO46L3*	+	+	+	+	+	+	+	±	±	+	±	73
<i>Enterococcus durans</i> GIR46S1*	+	+	+	+	+	+	+	±	±	+	±	73
<i>Enterococcus casseliflavus/ gallinarum</i> GIRO5L1*	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	±	82
<i>Enterococcus casseliflavus/ gallinarum</i> GIR35S3	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	±	82
<i>Enterococcus casseliflavus/ gallinarum</i> GIRO15S3*	+	-	+	+	+	+	+	±	+	+	-	73
<i>Enterococcus camelliae</i> GIRO35L1*	+	-	+	+	+	+	+	±	+	+	-	73
<i>Enterococcus camelliae</i> GIRO28L2*	+	-	+	+	+	+	+	+	±	+	-	73
<i>Streptococcus salivarius</i> GUZ4S6*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	91
<i>Streptococcus pseudoporcinus</i> GIR15L3	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	73
<i>Streptococcus parasanguinis</i> GIRO4L4	+	-	+	+	+	+	+	±	+	+	-	73
<i>Streptococcus lutetiensis</i> GIRO4S3	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	82
<i>Streptococcus lutetiensis</i> GIR25S7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	91
<i>Streptococcus lutetiensis</i> GIR25S8	+	+	±	+	+	±	+	+	+	+	-	73
<i>Streptococcus lutetiensis</i> GIR25S5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	91
<i>Streptococcus lutetiensis</i> GIR25S2*	+	-	+	+	+	+	+	±	+	+	-	73
<i>Streptococcus lutetiensis</i> GIR20S1	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	±	82
<i>Streptococcus lutetiensis</i> HOL36L2*	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	±	82
<i>Streptococcus lutetiensis</i> GIRO15S2	+	-	+	+	+	+	+	±	±	+	±	64
<i>Streptococcus infantarius</i> GIR14S1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	±	82

Identificação do isolado	Patógeno revelador											% ant.
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
<i>Streptococcus henryi</i> GUZ10S2*	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	±	82
<i>Streptococcus gallolyticus</i> GIR28S1	+	+	+	+	+	+	+	±	-	+	±	73
<i>Streptococcus equinus</i> GIR20S2	+	+	+	+	+	+	+	±	-	+	±	73
<i>Streptococcus bovis</i> GUZ1S7*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	91
<i>Streptococcus bovis</i> GUZ1L1*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100

**Legenda:** O antagonismo dos 82 isolados de BAL aos patógenos associados à etiologia da mastite foi determinado pelo método de difusão em camada dupla de ágar. Foram usados como patógenos reveladores:

- 1: *Staphylococcus aureus* (isolado clínico cedido pela Escola de Veterinária – UFMG);
- 2: *Streptococcus uberis* (isolado clínico cedido pela Escola de Veterinária – UFMG);
- 3: *Streptococcus agalactiae* 8710 (isolado clínico cedido pela EMBRAPA-Gado de leite);
- 4: *Listeria innocua* 5830 (isolado clínico cedido pela EMBRAPA-Gado de leite);
- 5: *Staphylococcus capitis* 8246 (isolado clínico cedido pela EMBRAPA-Gado de leite);
- 6: *Staphylococcus xylosus* 8671 (isolado clínico cedido pela EMBRAPA-Gado de leite);
- 7: *Staphylococcus sciuri* 8353 (isolado clínico cedido pela EMBRAPA-Gado de leite);
- 8: *Listeria monocytogenes* ATCC 15313;
- 9: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213;
- 10: *Streptococcus agalactiae* ATCC 1381;
- 11: *Escherichia coli* ATCC 25723;

+ : presença de antagonismo; ± : antagonismo parcial (halo de inibição nublado); - : ausência de antagonismo;

% ant.: Porcentagem de antagonismo, definida como número de patógenos que foram inibidos pelo isolado de BAL dividido pelo número total de patógenos reveladores e multiplicado por 100.

A presença, nos 82 isolados de BAL, dos genes *agg*, *gelE*, *efa*, *cylA* e *cad*, que codificam fatores de virulência comuns em bactérias causadoras de mastite, foi determinada por PCR, de acordo com a metodologia descrita por Espeche e col. (2012). Entre os 82 isolados de BAL avaliados, 71 deles (87%) não apresentaram nenhum destes genes. Cinco isolados (*L. lactis* GIRO5L2; *L. lactis* HOL32S2; *L. garvieae* HOL12S2\*; *L. garvieae* HOL26S3\*; *E. faecalis* GIRO33L2\*) apresentaram amplificação do gene *agg*. Em cinco BAL (*L. lactis* GIR46L3\*; *W. paramesenteroides* HOL25S3; *L. plantarum* HOL25S1; *E. faecalis* GIRO33L2\*; *E. faecalis* GIRO46L3\*) foi detectada à presença do gene *gelE*. Três isolados (*L. brevis* GIRO32L2\*; *E. pseudoavium* HOL25L1\* e *E. faecalis* GIRO33L2\*) apresentaram amplificação do gene *efa*. Nenhum dos isolados testados apresentou amplificação do gene *cylA*. Por fim, em três BAL (*L. brevis* GIRO32L2\*; *E. faecalis* GIRO33L2\*; *E. faecalis* GIRO46L3\*) foi detectada à presença do gene *cad*. Entre os 11 isolados que mostraram a presença de pelo menos um gene codificador de fator de virulência, o isolado *E. faecalis* GIRO33L2\* foi o único a apresentar quatro genes codificadores de fatores de virulência (*agg*, *gelE*, *efa* e *cad*) e a maioria destes isolados apresentou apenas a presença de um gene codificador de fator de virulência. Todos os isolados que apresentaram amplificação de genes codificadores de fatores de virulência tiveram seus *amplicons* submetidos à confirmação de identidade por sequenciamento. A descrição dos isolados que apresentaram fatores de virulência está mostrada na TABELA 13.

TABELA 13 – Presença de genes codificadores de fatores de virulência em BAL

Identificação do isolado	<i>agg</i>	<i>gelE</i>	<i>efa</i>	<i>cylA</i>	<i>cad</i>
<i>Lactococcus lactis</i> GIR46L3*	-	+	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> GIRO5L2	+	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> HOL32S2	+	-	-	-	-
<i>Lactococcus garvieae</i> HOL12S2*	+	-	-	-	-
<i>Lactococcus garvieae</i> HOL26S3*	+	-	-	-	-
<i>Weissella paramesenteroides</i> HOL25S3	-	+	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> HOL25S1	-	+	-	-	-
<i>Lactobacillus brevis</i> GIRO32L2*	-	-	+	-	+
<i>Enterococcus pseudoavium</i> HOL25L1*	-	-	+	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> GIRO33L2*	+	+	+	-	+
<i>Enterococcus faecalis</i> GIRO46L3*	-	+	-	-	+

**Legenda:** A detecção da presença, nos 82 isolados de BAL, dos genes *agg*, *gelE*, *efa*, *cylA* e *cad*, que codificam fatores de virulência comuns em bactérias causadoras de mastite, foi determinada por PCR, seguida da resolução e visualização dos *amplicons* produzidos em gel de eletroforese corado com brometo de etídio de acordo com metodologia descrita por Espeche e col. (2012):

+ : presença de amplificação do gene e - : ausência de amplificação do gene.

TABELA 14 – Resultados da avaliação do potencial probiótico em teste *in vitro* de BAL isoladas de leite cru e swab intramamário

Identificação do isolado	Resultados dos testes <i>in vitro</i>						
	EPS <sup>a</sup>	Biofi. <sup>a</sup>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>a</sup>	MATS <sup>b</sup>	C-ag <sup>1</sup>	C-ag <sup>2</sup>	Autoag. <sup>c</sup>
<i>Pediococcus stilesii</i> HOL36L1*	-	++	++	70,54	22,18	18,12	46,85
<i>Pediococcus pentosaceus</i> GIR44S3*	-	-	-	0,00	54,63	31,33	67,9
<i>Pediococcus pentosaceus</i> GIR50S1*	-	-	-	3,11	35,63	51,34	76,59
<i>Pediococcus pentosaceus</i> GIRO18S1	-	+	-	2,30	72,89	58,64	57,99
<i>Pediococcus pentosaceus</i> GIRO23S1*	-	-	+	9,73	73,94	74,85	84,57
<i>Pediococcus pentosaceus</i> GIRO29S1	-	-	+	10,62	1,30	0,52	77,82
<i>Lactococcus lactis</i> GUZ3S2*	-	-	++	0,00	11,02	10,46	12,14
<i>Lactococcus lactis</i> GUZ3S3*	-	-	+	1,43	25,22	17,91	17,38
<i>Lactococcus lactis</i> HOL3L1	-	-	++	1,47	6,35	5,45	42,41
<i>Lactococcus lactis</i> GIR46L3*	-	-	+	7,49	5,57	4,23	23,6
<i>Lactococcus lactis</i> GIRO5L2	-	-	+	10,27	32,31	31,90	53,51
<i>Lactococcus lactis</i> GIR39S2	-	+++	+	92,96	18,04	3,34	6,48
<i>Lactococcus lactis</i> GIRO11S1*	-	+	++	26,09	24,61	22,34	47,75
<i>Lactococcus lactis</i> GIRO46L2*	-	-	+	11,75	10,41	14,57	7,44
<i>Lactococcus lactis</i> GIRO4S8*	-	-	++	87,25	87,55	71,53	33,37
<i>Lactococcus lactis</i> HOL32S2	-	+	++	1,75	44,43	30,47	44,66
<i>Lactococcus garvieae</i> HOL12S2*	-	+	++	4,29	2,28	1,98	43,97
<i>Lactococcus garvieae</i> GIRO5S1*	-	-	++	47,89	34,90	20,82	42,74
<i>Lactococcus garvieae</i> HOL15L3	-	+	++	0,14	11,99	0,00	0
<i>Lactococcus garvieae</i> HOL26S3*	-	+	+	3,36	11,67	12,34	24,67
<i>Weissella paramesenteroides</i> GIR46L4*	-	+++	-	17,52	27,75	10,54	17,49
<i>Weissella paramesenteroides</i> GIR48L2*	-	+	+++	7,54	17,63	17,89	58,59
<i>Weissella paramesenteroides</i> GIRO31L1*	-	-	+++	15,04	23,99	13,74	67,53
<i>Weissella paramesenteroides</i> GIRO32L1*	-	+	+++	14,71	87,20	38,97	29,41
<i>Weissella paramesenteroides</i> GUZ3S4*	-	-	+++	2,32	28,25	58,80	35,67
<i>Weissella paramesenteroides</i> HOL25S3	-	+	+++	5,55	36,37	32,29	24,64
<i>Weissella paramesenteroides</i> GIR51L1*	-	+	+++	1,29	65,33	30,34	35,67
<i>Weissella paramesenteroides</i> GIR52L2*	-	+	++	6,03	3,03	1,88	55,82
<i>Weissella confusa</i> GIR48L1*	+	+++	+++	52,75	8,77	0,00	58,96
<i>Weissella confusa</i> GIRO21L1*	+	+++	+++	15,93	27,86	4,79	14,94
<i>Weissella cibaria</i> GIRO31L2*	+	-	+++	3,34	11,53	13,31	22,43
<i>Weissella cibaria</i> GIRO27L2*	+	+	+++	7,04	5,59	14,87	54,29
<i>Lactobacillus plantarum</i> GUZ3S1*	-	+	++	9,28	14,17	2,71	33,33
<i>Lactobacillus plantarum</i> HOL25L1	-	++	+	1,02	5,20	0,00	28,21
<i>Lactobacillus plantarum</i> HOL25S1	-	+	-	1,98	21,31	5,21	39,48
<i>Lactobacillus plantarum</i> GIRO23L1*	-	+	-	0,00	2,66	6,62	36,56
<i>Lactobacillus plantarum</i> GIRO49L1*	-	+	-	6,90	6,81	20,07	25,33
<i>Lactobacillus plantarum</i> GUZ3L2*	-	+	+	48,40	48,04	20,18	12,58
<i>Lactobacillus pentosus</i> GIR50L1*	-	+	++	6,83	0,41	0,00	74,52
<i>Lactobacillus mucosae</i> HOL5L1	-	+	-	0,39	6,95	0,00	19,05
<i>Lactobacillus brevis</i> GIRO32L2*	-	+	-	14,07	14,54	8,94	34,73

... continuação

<i>Lactobacillus paracasei</i> GIR53L1*	-	++	+	0,00	23,97	2,64	42,07
<i>Enterococcus saccharolyticus</i> GUZ9S1*	-	++	++	1,38	2,09	10,41	37,26
<i>Enterococcus pseudoavium</i> HOL25L1*	-	+++	++	58,31	54,18	0,00	48,39
<i>Enterococcus italicus</i> GIRO21L2*	-	-	+	6,49	24,09	15,89	78,01
<i>Enterococcus italicus</i> GIR44L3*	-	-	-	1,01	59,83	65,21	61,29
<i>Enterococcus hirae</i> GIR14S6*	-	-	-	5,88	47,18	45,65	62,26
<i>Enterococcus hirae</i> HOL9L1*	-	+	+	35,39	52,21	39,12	64,34
<i>Enterococcus hirae</i> GIR17S1	+	-	+	10,51	31,30	34,08	16,12
<i>Enterococcus hirae</i> GIR17S5*	-	-	+	2,17	0,10	0,00	42,35
<i>Enterococcus hirae</i> GIR11S8*	-	+	++	11,52	0,00	8,27	77,58
<i>Enterococcus hirae</i> GUZ4S4*	-	-	++	10,39	0,00	38,20	57,39
<i>Enterococcus hirae</i> GIR30S1	-	-	++	6,32	25,30	31,92	68,53
<i>Enterococcus hirae</i> GIR17S2	-	-	++	2,84	19,15	15,54	80,74
<i>Enterococcus hirae</i> GIR20S3*	-	-	++	4,58	32,39	34,71	0
<i>Enterococcus hirae</i> GIR6S1	-	-	-	4,28	7,52	0,00	45,5
<i>Enterococcus faecium</i> HOL8L2*	-	-	++	1,91	30,91	8,02	51,11
<i>Enterococcus faecalis</i> GIRO33L2*	-	+	-	68,09	0,00	0,00	23,86
<i>Enterococcus faecalis</i> GIRO46L3*	-	-	+	6,58	38,87	31,01	42,46
<i>Enterococcus durans</i> GIR46S1*	-	-	-	34,86	31,92	52,77	89,53
<i>Enterococcus casseliflavus/ gallinarum</i> GIRO5L1*	-	-	-	0,36	1,23	1,71	40,92
<i>Enterococcus casseliflavus/ gallinarum</i> GIR35S3	-	-	+	0,00	16,18	17,08	38,89
<i>Enterococcus casseliflavus/ gallinarum</i> GIRO15S3*	-	+	++	4,46	6,75	12,71	72,42
<i>Enterococcus camelliae</i> GIRO35L1*	-	-	+	3,68	0,00	21,44	55,39
<i>Enterococcus camelliae</i> GIRO28L2*	-	-	+	6,21	30,34	42,27	24,09
<i>Streptococcus salivarius</i> GUZ4S6*	-	-	+	3,27	12,36	28,04	38,62
<i>Streptococcus pseudoporcinus</i> GIR15L3	-	-	-	0,15	14,26	28,23	82,55
<i>Streptococcus parasanguinis</i> GIRO4L4	-	-	++	8,47	39,78	19,48	31,64
<i>Streptococcus lutetiensis</i> GIRO4S3	+	-	+	6,44	28,19	19,63	0
<i>Streptococcus lutetiensis</i> GIR25S7	+	+	++	85,57	16,56	0,00	22,7
<i>Streptococcus lutetiensis</i> GIR25S8	+	+	++	84,46	22,44	13,23	10,24
<i>Streptococcus lutetiensis</i> GIR25S5	+	+	++	92,73	36,55	32,89	41
<i>Streptococcus lutetiensis</i> GIR25S2*	+	-	++	3,19	20,42	32,01	50,38
<i>Streptococcus lutetiensis</i> GIR20S1	+	-	-	11,96	8,68	34,30	54,62
<i>Streptococcus lutetiensis</i> HOL36L2*	-	+++	++	96,36	47,16	14,05	40,52
<i>Streptococcus lutetiensis</i> GIRO15S2	+	-	+	0,17	36,75	15,37	16,26
<i>Streptococcus infantarius</i> GIR14S1	+	-	+	23,51	32,32	0,00	41,79
<i>Streptococcus henryi</i> GUZ10S2*	-	-	+	5,30	0,17	32,63	65,26
<i>Streptococcus gallolyticus</i> GIR28S1	+	-	+	6,66	0,00	30,43	68,09
<i>Streptococcus equinus</i> GIR20S2	+	-	-	8,07	34,72	18,45	9,82
<i>Streptococcus bovis</i> GUZ1S7*	+	+	++	8,31	0,00	0,00	22,35
<i>Streptococcus bovis</i> GUZ1L1*	+	+	+	2,88	24,39	61,86	73,38

**Legenda:** Os isolados foram caracterizados de acordo com testes que avaliam as características da superfície celular, produção de EPS, biofilme em ensaio com placas de poliestireno e produção de peróxido de hidrogênio:

EPS<sup>a</sup> = produção de EPS: + : presença ou produtor; - : não produtor;

Biofi.<sup>a</sup> = produção de biofilme: - : não produtor; + : fraco produtor; ++ : moderado produtor; +++ : forte produtor;

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>a</sup> = produção de peróxido de hidrogênio: - : não produtor; + : fraco produtor; ++ : moderado produtor; +++ : forte produtor;

MATS<sup>b</sup> = Hidrofobicidade da superfície celular em %;

C-ag<sup>1</sup> e C-ag<sup>2</sup> = Co-agregação em % com *S. aureus* ATCC 29213 e *E. coli* ATCC 25723, respectivamente;

Autoag.<sup>c</sup> = Autoagregação em %.

## 6.6 Adesão e invasão de isolados de BAL em células epiteliais da glândula mamária MDA-MB-231

De acordo com os critérios propostos por Saarela e col. (2000); FAO/WHO (2002); EFSA (2005; 2007); HC (2006); Espeche e col. (2009) e Gaggia e col. (2010) as linhagens a serem selecionadas para estudos como possíveis candidatas a probióticos para o ecossistema mamário não devem ter apresentado citação como patógenos associados a casos de mastite, serem isoladas de quartos saudáveis, inibirem o maior número possível de patógenos na triagem de antagonismo, terem alta ou média hidrofobicidade e autoagregação e ausência de fatores de virulência associados à mastite. Somados a isso, a produção de EPS ou de biofilme são características desejáveis, porém não obrigatórias. A avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos também deve mostrar um perfil intrínseco de suscetibilidade para descartar o risco de transferência gênica lateral de resistência para membros comensais e patogênicos que residam na glândula mamária (CALVINHO et al., 2002).

Diante dos critérios apresentados, entre os 82 isolados de BAL avaliados na fase de caracterização probiótica *in vitro*, foram descartados isolados de *Lactococcus garvieae*, pois já foram associados a casos de mastite (COLLINS et al., 1983; ZUILY et al., 2011), bem como de *S. bovis* que é considerado agente etiológico desta doença. Os isolados de *Enterococcus* também foram descartados, devido a discussão acirrada sobre seu uso seguro como probióticos. Portanto, entre as 82 linhagens de BAL avaliadas, 10 foram selecionadas para os ensaios em modelo de co-cultivo com células epiteliais mamárias MDA-MB-231. Além de atenderem às características desejáveis em um bom probiótico, estas linhagens pertencem a diferentes gêneros de BAL e possuem qualidades diferenciadas entre as diversas características que são desejáveis em um bom probiótico. Portanto, essas 10 linhagens de BAL foram submetidas a ensaios de adesão e invasão, inibição de adesão e de invasão de patógenos e imunomodulação em modelo de co-cultivo com células epiteliais. A TABELA 15 apresenta as 10 linhagens de BAL selecionadas para os diferentes ensaios realizados em modelo de co-cultivo com um resumo de suas características probióticas avaliadas nos testes *in vitro*, bem como sua codificação nos gráficos de resultados apresentados nas seções 6.6; 6.7 e 6.8 desta tese.



TABELA 15 – Isolados de BAL selecionados para os ensaios em modelo de co-cultivo com células epiteliais mamárias MDA-MB-231

Identificação do isolado	Resultados dos testes <i>in vitro</i>										
	EPS <sup>a</sup>	Biofi. <sup>a</sup>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>a</sup>	MATS <sup>b</sup>	C-ag <sup>1</sup>	C-ag <sup>2</sup>	Autoag. <sup>c</sup>	% ant.	f. virul.	Antibio.	Código
<i>Pediococcus stilesii</i> HOL36L1*	-	++	++	70,54	22,18	18,12	46,85	100	-		<b>PstiHOL36L1*</b>
<i>Lactococcus lactis</i> GIRO4S8*	-	-	++	87,25	87,55	71,53	33,37	100	-		<b>LactGIRO4S8*</b>
<i>Weissella paramesenteroides</i> GIR46L4*	-	+++	-	17,52	27,75	10,54	17,49	82	-		<b>WparGIR46L4*</b>
<i>Weissella confusa</i> GIR48L1*	+	+++	+++	52,75	8,77	0,00	58,96	100	-		<b>WcoGIRO48L1*</b>
<i>Weissella confusa</i> GIRO21L1*	+	+++	+++	15,93	27,86	4,79	14,94	100	-		<b>WcoGIRO21L1*</b>
<i>Weissella cibaria</i> GIRO27L2*	+	+	+++	7,04	5,59	14,87	54,29	91	-		<b>WciGIRO27L2*</b>
<i>Lactobacillus plantarum</i> GUZ3L2*	-	+	+	48,40	48,04	20,18	12,58	91	-		<b>LplanGUZ3L2*</b>
<i>Lactobacillus paracasei</i> GIR53L1*	-	++	+	0,00	23,97	2,64	42,07	82	-		<b>LparaGIR53L1*</b>
<i>Streptococcus lutetiensis</i> GIR25S5	+	+	++	92,73	36,55	32,89	41	91	-		<b>StrelutGIR25S5</b>
<i>Streptococcus lutetiensis</i> HOL36L2*	-	+++	++	96,36	47,16	14,05	40,52	82	-		<b>StrelutHOL36L2*</b>

**Legenda:** Os isolados selecionados para os testes em cultivo celular foram aqueles que apresentavam características em acordo com as preconizadas por FAO/WHO (2002); EFSA (2005; 2007); HC (2006); Espeche e col. (2009) e Gaggia e col. (2010):

EPS<sup>a</sup> = produção de EPS: + : presença ou produtor; - : não produtor;

Biofi.<sup>a</sup> = produção de biofilme: - : não produtor; + : fraco produtor; ++ : moderado produtor; +++ : forte produtor;

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>a</sup> = produção de peróxido de hidrogênio: - : não produtor; + : fraco produtor; ++ : moderado produtor; +++ : forte produtor;

MATS<sup>b</sup> = Hidrofobicidade da superfície celular em %;

C-ag<sup>1</sup> e C-ag<sup>2</sup> = Co-agregação em % com *S. aureus* ATCC 29213 e *E. coli* ATCC 25723, respectivamente;

Autoag.<sup>c</sup> = Autoagregação em %;

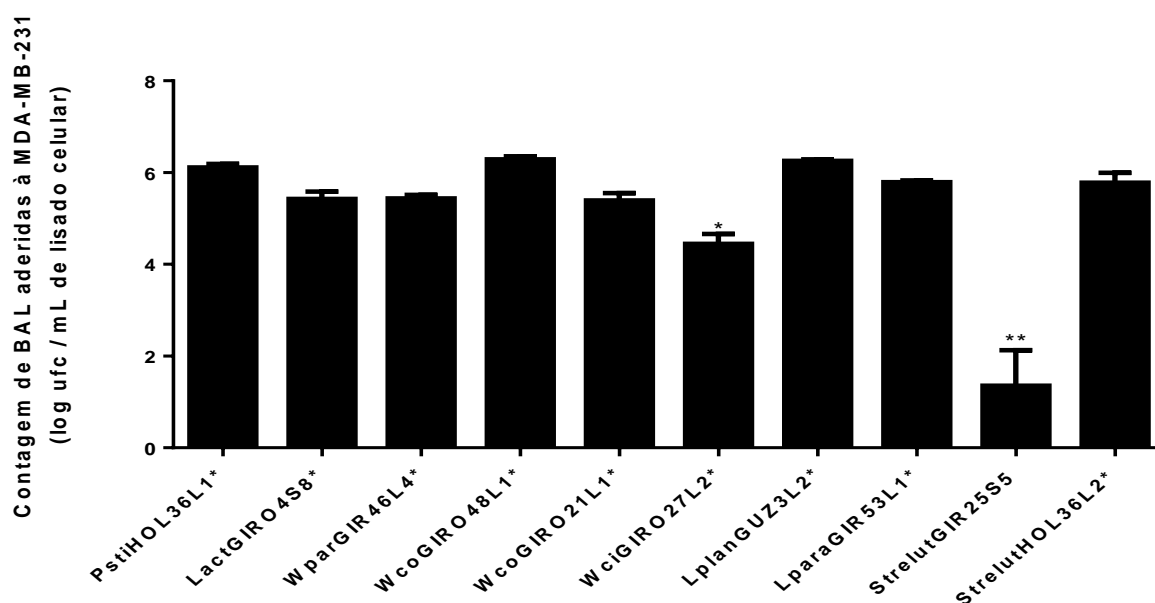
%ant. = porcentagem de antagonismo, definida como número de patógenos que foram inibidos pelo isolado de BAL dividido pelo número total de patógenos reveladores e multiplicado por 100;

f. virul. = presença de genes codificadores de fatores de virulência associados à mastite (*agg*, *gelE*, *efa*, *cylA* e *cad*): - : ausência de amplificação desses genes por PCR;

Antibio. = perfil de sensibilidade aos antimicrobianos testados pelo teste de difusão da droga em ágar: | – perfil intrínseco de sensibilidade (VAN: resistente, AMP: sensível, GEN: sensível/resistente, AMI: resistente, ERI: sensível, CRO: sensível, EST: resistente 10 µg, OXA: resistente 1 µg, PEN: sensível e AMO: sensível).

A adesão dos 10 isolados de BAL selecionados foi avaliada, em ensaio de co-cultivo, usando um *ROI* de 100:1 com 1 h de contato e foi expressa como  $\log_{10}$  de UFC de BAL /mL de lisado celular. Nos ensaios individuais, entre as 10 BAL, a população de bactérias aderidas variou de 0 - 6,44  $\log_{10}$  de UFC/mL de lisado celular e a média de bactérias aderidas foi de  $5,23 \pm 1,47 \log_{10}$  de UFC/mL de lisado celular. Em comparação ao total de BAL adicionadas à monocamada de células ( $\sim 7 \log_{10}$  de UFC), aproximadamente 1,77  $\log_{10}$  de UFC de BAL não foram capazes de aderir-se às células MDA-MB-231. Dois isolados (WciGIRO27L2\* - *W. cibaria* GIRO27L2\*; StrelutGIR25S5 - *S. lutetiensis* GIR25S5) apresentaram níveis de adesão significativamente menores ( $p < 0,05$ ) em comparação aos demais. O isolado StrelutGIR25S5 além de apresentar a menor capacidade de adesão mostrou dificuldade de crescimento em condições aeróbicas e, portanto, seu uso em escala industrial provavelmente é comprometido. Graças a essas razões, o isolado StrelutGIR25S5 foi excluído dos demais ensaios desta tese. Os resultados de adesão, para as 10 BAL avaliadas, estão mostrados na FIGURA 32 e os valores médios das populações bacterianas aderidas às células MDA-MB-231 (em  $\log_{10}$  de UFC/mL de lisado celular), com seus respectivos desvio-padrão, mostrados na TABELA 16.

FIGURA 32 – Adesão de BAL em células epiteliais mamárias MDA-MB-231



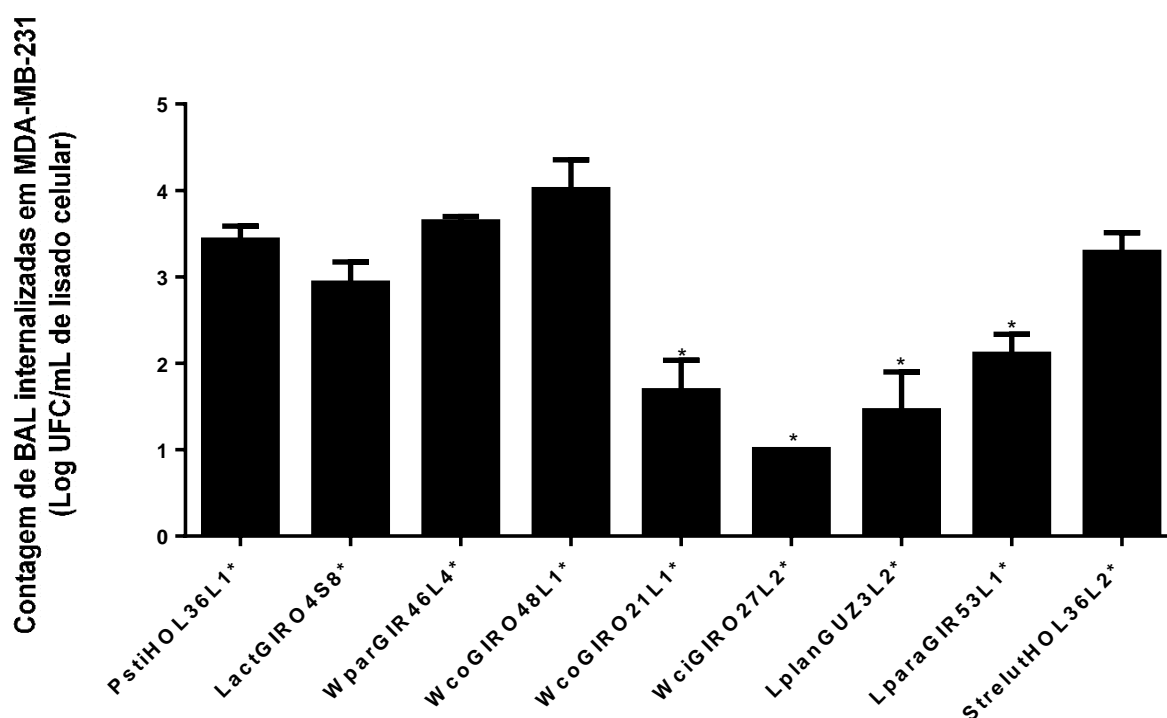
**Legenda:** Adesão dos 10 isolados de BAL selecionados foi avaliada, em ensaio de co-cultivo com monocamadas confluentes de  $\sim 1,5 \times 10^5$  células MDA-MB-231/poço, em um *ROI* de 100:1 com 1 h de contato. Dados foram expressos como média e desvio-padrão das populações bacterianas aderidas, expressas em  $\log_{10}$  de UFC de BAL /mL de lisado celular. Cada ensaio foi feito em quadruplicata. Diferenças entre os isolados foram avaliadas usando *one-way* ANOVA seguida do pós-teste de Turkey. Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) estão mostradas na figura com (\*). Código dos isolados: (PstiHOL36L1\*) *Pediococcus stilesii* HOL36L1\*; (LactGIRO4S8\*) *Lactococcus lactis* GIRO4S8\*; (WparGIR46L4\*) *Weissella paramesenteroides* GIR46L4\*; (WcoGIR048L1\*) *Weissella confusa* GIR48L1\*; (WcoGIRO21L1\*) *Weissella confusa* GIRO21L1\*; (WciGIRO27L2\*) *Weissella cibaria* GIRO27L2\*; (LplanGUZ3L2\*) *Lactobacillus plantarum* GUZ3L2\*; (LparaGIR53L1\*) *Lactobacillus paracasei* GIR53L1\*; (StrelutGIR25S5) *Streptococcus lutetiensis* GIR25S5 e (StrelutHOL36L2\*) *Streptococcus lutetiensis* HOL36L2\*.

A capacidade de internalização dos 9 isolados de BAL selecionados foi determinada, em ensaio de co-cultivo, usando um *ROI* de 100:1 em 1 h de contato, seguido de 1 h de incubação das monocamadas com meio RPMI 1640 contendo 100 µg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina e foi expressa como  $\log_{10}$  de UFC de BAL / mL de lisado celular. Entre as 9 BAL, a população de bactérias internalizadas variou de 1,00 – 4,69  $\log_{10}$  de UFC/mL de lisado celular e a média de bactérias internalizadas foi de  $2,61 \pm 1,08 \log_{10}$  de UFC/mL de lisado celular. Em comparação ao total de BAL adicionadas à monocamada de células (~ 7  $\log_{10}$  de UFC), aproximadamente 4,4  $\log_{10}$  de UFC de BAL não foram capazes de entrar nas células MDA-MB-231. Comparando os níveis de adesão e internalização, houve uma redução média de  $3,05 \pm 0,93 \log_{10}$  de UFC do total de bactérias aderidas que não foram capazes de entrar nas células epiteliais mamárias.

Interessantemente, os 9 isolados apresentaram dois comportamentos significativamente ( $p < 0,05$ ) diferentes com relação à capacidade de internalização, a qual parece ser linhagem-dependente. Cinco isolados (PstiHOL36L1\* - *P. stilesii* HOL36L1\*; LactGIRO4S8\* - *L. lactis* GIRO4S8\*; WparGIR46L4\* - *W. paramesenteroides* GIR46L4\*; WcoGIRO48L1\* - *W. confusa* GIR48L1\* e StrelutHOL36L2\* - *S. lutetiensis* HOL36L2\*) apresentaram internalização significativamente maior que os demais (WcoGIRO21L1\* - *W. confusa* GIRO21L1\*; WciGIRO27L2\* - *W. cibaria* GIRO27L2\*; LplanGUZ3L2\* - *L. plantarum* GUZ3L2\* e LparaGIR53L1\* - *L. paracasei* GIR53L1\*), sendo o primeiro grupo denominado aqui como “invasores eficientes” e o segundo como “invasores ineficientes”. Entre os isolados “invasores eficientes” a média e desvio-padrão de bactérias invasoras foi de  $3,46 \pm 0,40 \log_{10}$  de UFC/mL de lisado celular, enquanto que entre os “invasores ineficientes” esses valores foram de  $1,56 \pm 0,46 \log_{10}$  de UFC/mL de lisado celular.

Os resultados de internalização, para as 9 BAL avaliadas, estão mostrados na FIGURA 33 e os valores médios das populações bacterianas internalizadas em células MDA-MB-231 (em  $\log_{10}$  de UFC/mL de lisado celular), com seus respectivos desvio-padrão, mostrados na TABELA 16.

FIGURA 33 – Internalização de BAL em células epiteliais mamárias MDA-MB-231



**Legenda:** Internalização dos 9 isolados de BAL selecionados foi avaliada, em ensaio de co-cultivo com monocamadas confluentes de  $\sim 1,5 \times 10^5$  células MDA-MB-231/poço, em um ROI de 100:1 com 1 h de contato, seguida de 1 h de incubação das monocamadas com meio RPMI 1640 contendo 100  $\mu$ g/mL de Estreptomicina e 100 U/mL de Penicilina. Dados foram expressos como média e desvio-padrão das populações bacterianas internalizadas, expressas em  $\log_{10}$  de UFC de BAL /mL de lisado celular. Cada ensaio foi feito em quadruplicata. Diferenças entre os isolados foram avaliadas usando *one-way* ANOVA seguida do pós-teste de Turkey. Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) estão mostradas na figura com (\*). Código dos isolados: (PstiHOL36L1\*) *Pediococcus stilesii* HOL36L1\*; (LactGIRO4S8\*) *Lactococcus lactis* GIRO4S8\*; (WparGIR46L4\*) *Weissella paramesenteroides* GIR46L4\*; (WcoGIRO48L1\*) *Weissella confusa* GIR48L1\*; (WcoGIRO21L1\*) *Weissella confusa* GIRO21L1\*; (WciGIRO27L2\*) *Weissella cibaria* GIRO27L2\*; (LplanGUZ3L2\*) *Lactobacillus plantarum* GUZ3L2\*; (LparaGIR53L1\*) *Lactobacillus paracasei* GIR53L1\* e (StrelutHOL36L2\*) *Streptococcus lutetiensis* HOL36L2\*.

TABELA 16 - Adesão e internalização de isolados de BAL em células epiteliais da glândula mamária MDA-MB-231

Identificação do isolado	Código	Adesão*	Invasão*	Tip. inv.	Ad-In*
<i>Pediococcus stilesii</i> HOL36L1*	PstiHOL36L1*	6,11 $\pm$ 0,15	3,42 $\pm$ 0,28	Eficiente	2,69
<i>Lactococcus lactis</i> GIRO4S8*	LactGIRO4S8*	5,43 $\pm$ 0,32	2,93 $\pm$ 0,43	Eficiente	2,50
<i>Weissella paramesenteroides</i> GIR46L4*	WparGIR46L4*	5,44 $\pm$ 0,15	3,64 $\pm$ 0,11	Eficiente	1,80
<i>Weissella confusa</i> GIR48L1*	WcoGIRO48L1*	6,29 $\pm$ 0,13	4,01 $\pm$ 0,69	Eficiente	2,28
<i>Weissella confusa</i> GIRO21L1*	WcoGIRO21L1*	5,39 $\pm$ 0,32	1,68 $\pm$ 0,61	Ineficiente	3,71
<i>Weissella cibaria</i> GIRO27L2*	WciGIRO27L2*	4,45 $\pm$ 0,44	1,00 $\pm$ 0,00	Ineficiente	3,45
<i>Lactobacillus plantarum</i> GUZ3L2*	LplanGUZ3L2*	6,26 $\pm$ 0,07	1,45 $\pm$ 0,78	Ineficiente	4,80
<i>Lactobacillus paracasei</i> GIR53L1*	LparaGIR53L1*	5,79 $\pm$ 0,08	2,10 $\pm$ 0,41	Ineficiente	3,69
<i>Streptococcus lutetiensis</i> GIR25S5	StrelutGIR25S5	1,35 $\pm$ 1,56	-	-	-
<i>Streptococcus lutetiensis</i> HOL36L2*	StrelutHOL36L2*	5,78 $\pm$ 0,44	3,28 $\pm$ 0,39	Eficiente	2,49

**Legenda:** Adesão e internalização dos 10 isolados de BAL selecionados foram avaliadas, em ensaio de co-cultivo com monocamadas confluentes de  $\sim 1,5 \times 10^5$  células MDA-MB-231/poço, em um ROI de 100:1 com 1 h de contato.

\* Dados foram expressos como média e desvio-padrão ( $\pm$ ) das populações bacterianas aderidas ou internalizadas, expressas em  $\log_{10}$  de UFC de BAL /mL de lisado celular. Cada ensaio foi feito em quadruplicata.

**Tip. inv.** = Tipo de invasor: Eficiente ou Ineficiente;

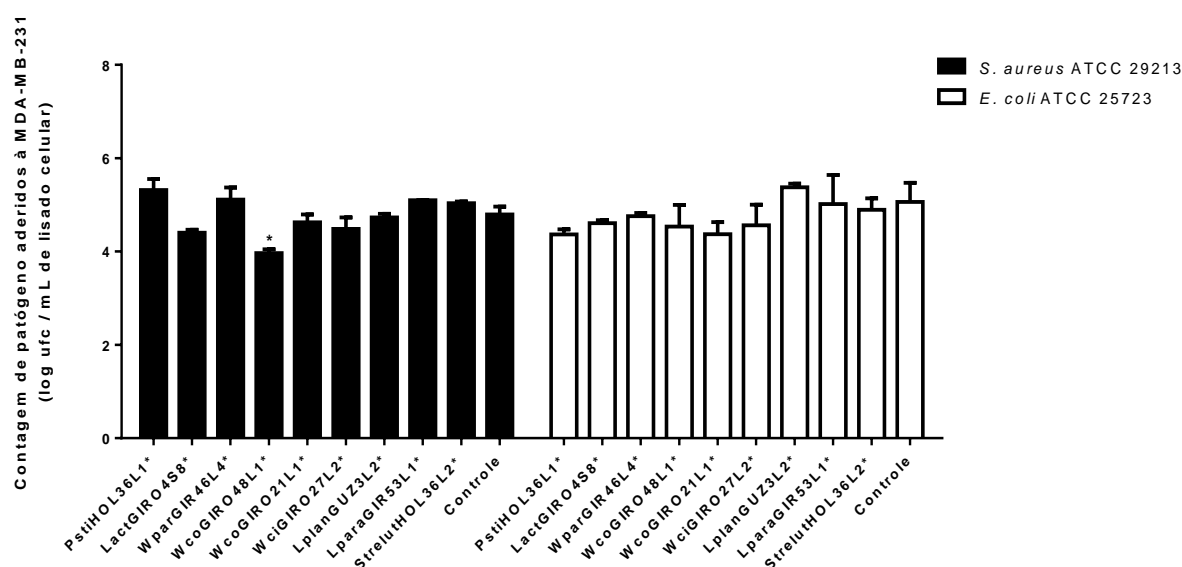
**Ad-In**= População de bactérias que aderiram subtraída das bactérias que entraram, expresso em  $\log_{10}$  de UFC de BAL /mL de lisado celular.

## 6.7 Inibição da adesão e invasão de patógenos associados à mastite em células MDA-MB-231 por isolados de BAL

A avaliação da inibição de adesão de *S. aureus* ATCC 29213 e *E. coli* ATCC 25723 por BAL foi feita em ensaios de co-cultivo, usando um *ROI* de 100:1 para BAL e um *MOI* de 10:1 de bactérias patogênicas, com 1 h de contato simultâneo e foi expressa, primeiramente como  $\log_{10}$  de UFC de patógeno / mL de lisado celular. *S. aureus* ATCC 29213, em poços controle, apresentou, em média, níveis de adesão de  $4,79 \pm 0,34 \log_{10}$  de UFC/mL de lisado celular, enquanto *E. coli* ATCC 25723 apresentou uma população bacteriana aderida média de  $5,06 \pm 0,83 \log_{10}$  de UFC/mL de lisado celular. A média de adesão observada para os patógenos foi similar à encontrada nos ensaios de avaliação de adesão de BAL (em média, as 10 BAL testadas apresentaram adesão de  $5,23 \pm 1,47 \log_{10}$  de UFC/mL de lisado celular) entretanto, os patógenos foram mais eficientes em se ligar às células MDA-MB-231, pois apresentaram, para *S. aureus* ATCC 29213  $\sim 1,21 \log_{10}$  de UFC e, para *E. coli* ATCC 25723  $\sim 0,94 \log_{10}$  de UFC de bactérias que não foram capazes de se associar às células epiteliais mamárias em comparação ao total de patógenos adicionados à monocamada ( $\sim 6 \log_{10}$  de UFC).

Ao avaliar o efeito das 9 BAL testadas em inibir a adesão de patógenos através da comparação das médias e desvio-padrão do  $\log_{10}$  de UFC de patógeno aderido / mL de lisado celular, não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) para a adesão de *E. coli* ATCC 25723. Por outro lado, apenas o isolado WcoGIRO48L1\* (*W. confusa* GIR48L1\*) foi capaz de reduzir significativamente ( $p < 0,05$ ) a adesão de *S. aureus* ATCC 29213, produzindo uma redução média de  $0,82 \pm 0,14 \log_{10}$  de UFC com relação ao número médio de bactérias patogênicas aderidas observado em poços controle. Os resultados de adesão de *S. aureus* ATCC 29213 e *E. coli* ATCC 25723, na presença das 9 BAL testadas e nos seus respectivos controles experimentais, expressos como  $\log_{10}$  de UFC de patógeno / mL de lisado celular, estão mostrados na FIGURA 34.

FIGURA 34 - Adesão de patógenos em células MDA-MB-231 na presença de BAL expressa em  $\log_{10}$  de UFC de patógeno / mL de lisado celular



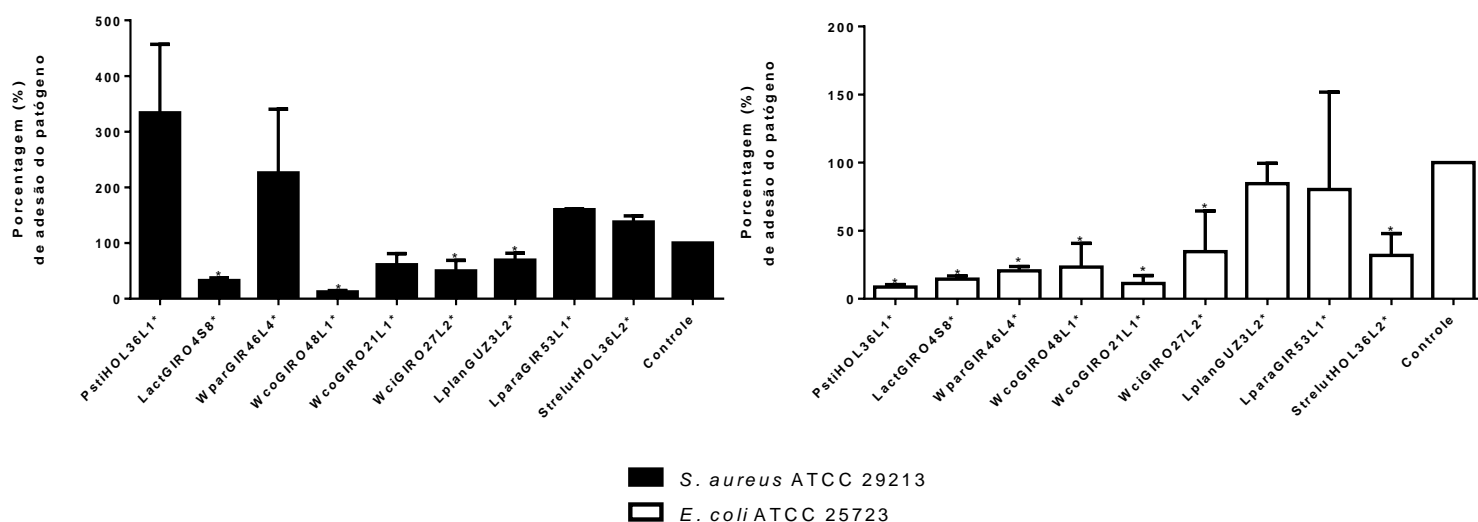
**Legenda:** Adesão de *S. aureus* ATCC 2913 e de *E. coli* ATCC 25723 na presença de 9 BAL selecionadas foi avaliada, em ensaio de co-cultivo com monocamadas confluentes de  $\sim 1,5 \times 10^5$  células MDA-MB-231/poço, em um ROI de 100:1 para BAL e em um MOI de 10:1 para bactérias patogênicas, com 1 h de contato simultâneo. Dados foram expressos como média e desvio-padrão das populações de patógenos aderidas em  $\log_{10}$  de UFC de patógeno /mL de lisado celular. Cada ensaio foi feito em quadruplicata. Diferenças entre os isolados foram avaliadas usando *one-way* ANOVA seguida do pós-teste de Turkey. Diferenças estatisticamente significativas em comparação aos controles ( $p < 0,05$ ) estão mostradas na figura com (\*).

(■) *S. aureus* ATCC 2913 e (□) *E. coli* ATCC 25723. Código dos isolados: (PstiHOL36L1\*) *Pediococcus stilesii* HOL36L1\*; (LactGIRO4S8\*) *Lactococcus lactis* GIRO4S8\*; (WparGIR46L4\*) *Weissella paramesenteroides* GIR46L4\*; (WcoGIRO48L1\*) *Weissella confusa* GIR48L1\*; (WcoGIRO21L1\*) *Weissella confusa* GIRO21L1\*; (WciGIRO27L2\*) *Weissella cibaria* GIRO27L2\*; (LplanGUZ3L2\*) *Lactobacillus plantarum* GUZ3L2\*; (LparaGIR53L1\*) *Lactobacillus paracasei* GIR53L1\*; (StrelutGIR25S5) *Streptococcus lutetiensis* GIR25S5 e (StrelutHOL36L2\*) *Streptococcus lutetiensis* HOL36L2\*. Controle (só patógeno – sem BAL).

De acordo com Bouchard e col. (2013) a capacidade de uma bactéria candidata a probiótica em inibir a adesão de um patógeno pode ser avaliada pela comparação da porcentagem (%) de adesão do patógeno na ausência e na presença das bactérias com possível efeito benéfico. Portanto, os dados de adesão de patógenos em MDA-MB-231 foram também assim expressos. Nessa segunda abordagem, a % de adesão dos poços controle fica definida como 100%. Com exceção dos isolados LplanGUZ3L2\* (*L. plantarum* GUZ3L2\*) e LparaGIR53L1\* (*L. paracasei* GIR53L1\*), todos os demais foram capazes de reduzir significativamente ( $p < 0,05$ ) a % de adesão de *E. coli* ATCC 25723. O isolado mais efetivo em reduzir a % de adesão de *E. coli* ATCC 25723 foi o PstiHOL36L1\* (*P. stilesii* HOL36L1\*) que apresentou redução média de  $91,39 \pm 3,22\%$  na adesão deste patógeno. Entretanto, apenas os isolados LactGIRO4S8\* (*L. lactis* GIRO4S8\*); WcoGIRO48L1\* (*W. confusa* GIR48L1\*); WciGIRO27L2\* (*W. cibaria* GIRO27L2\*) e LplanGUZ3L2\* (*L. plantarum* GUZ3L2\*)

foram capazes significativamente ( $p < 0,05$ ) de reduzir a % de adesão de *S. aureus* ATCC 29213. O isolado mais efetivo em reduzir a % de adesão de *S. aureus* ATCC 29213 foi o WcoGIRO48L1\* que apresentou uma redução média de  $87,79 \pm 4,26$  % na adesão deste patógeno, sendo também o único a reduzir de forma significativa a população de *S. aureus* aderida à célula MDA-MB-231 expressa como  $\log_{10}$  de UFC de patógeno / mL de lisado celular. Os resultados de adesão de *S. aureus* ATCC 29213 e *E. coli* ATCC 25723, na presença das 9 BAL testadas e nos seus respectivos controles experimentais, expressos como % de adesão de patógeno, estão mostrados na FIGURA 35. Os valores médios da adesão de ambos os patógenos em células MDA-MB-231 na presença das 9 BAL testadas, bem como nos controles experimentais, em ambas as abordagens de tratamento dos dados, com seus respectivos desvio-padrão, estão mostrados na TABELA 17.

FIGURA 35 - Adesão de patógenos em células MDA-MB-231 na presença de BAL expressa em % de adesão de patógenos



**Legenda:** Adesão de *S. aureus* ATCC 2913 e de *E. coli* ATCC 25723 na presença de 9 BAL selecionadas foi avaliada, em ensaio de co-cultivo com monocamadas confluentes de  $\sim 1,5 \times 10^5$  células MDA-MB-231/poço, em um ROI de 100:1 para BAL e em um MOI de 10:1 para bactérias patogênicas, com 1 h de contato simultâneo. Dados foram expressos como média e desvio-padrão da % de adesão dos patógenos, definida como o número total de bactérias recuperadas nos poços experimentais, após duas horas de incubação em células MDA-MB-231, dividido pela média aritmética do número de bactérias recuperadas nos poços controle, multiplicado por 100. Cada ensaio foi feito em quadruplicata. Diferenças entre os isolados foram avaliadas usando one-way ANOVA seguida do pós-teste de Turkey. Diferenças estatisticamente significativas em comparação aos controles ( $p < 0,05$ ) estão mostradas na figura com (\*).

(■) *S. aureus* ATCC 2913 e (□) *E. coli* ATCC 25723. Código dos isolados: (PstHOL36L1\*) *Pediococcus stilesii* HOL36L1\*; (LactGIRO4S8\*) *Lactococcus lactis* GIRO4S8\*; (WparGIR46L4\*) *Weissella paramesenteroides* GIR46L4\*; (WcoGIRO48L1\*) *Weissella confusa* GIR48L1\*; (WcoGIRO21L1\*) *Weissella confusa* GIRO21L1\*; (WciGIRO27L2\*) *Weissella cibaria* GIRO27L2\*; (LplanGUZ3L2\*) *Lactobacillus plantarum* GUZ3L2\*; (LparaGIR53L1\*) *Lactobacillus paracasei* GIR53L1\*; (StrelutGIR25S5) *Streptococcus lutetiensis* GIR25S5 e (StrelutHOL36L2\*) *Streptococcus lutetiensis* HOL36L2\*. Controle (só patógeno – sem BAL).

O efeito das 9 BAL avaliadas em inibir a invasão de *S. aureus* ATCC 29213 e *E. coli* ATCC 25723 por BAL foi avaliado em ensaio de co-cultivo, usando um *ROI* de 100:1 para BAL e em um *MOI* de 10:1 para bactérias patogênicas, com 1 h de contato simultâneo, seguido de 1 h de incubação das monocamadas com meio RPMI 1640 contendo antibióticos e foi expresso, primeiramente como  $\log_{10}$  de UFC de patógeno/mL de lisado celular. *S. aureus* ATCC 29213, em poços controle, apresentou, em média, níveis de invasão de  $4,15 \pm 0,15 \log_{10}$  de UFC/mL de lisado celular. Aparentemente, todo *S. aureus* aderido estava, na verdade dentro das células epiteliais pois as populações aderidas e invasoras deste patógenos são similares. Por outro lado, *E. coli* ATCC 25723 não foi capaz de invadir células MDA-MB-231 nos poços controle e experimentais. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as contagens de *S. aureus* ATCC 29213, expressas em  $\log_{10}$  de UFC de patógeno/mL de lisado celular, entre os poços controle e experimentais contendo BAL. Entretanto, ao avaliar a redução da % de invasão de *S. aureus* ATCC 29213, os isolados LactGIRO4S8\* (*L. lactis* GIRO4S8\*), WparGIR46L4\* (*W. paramesenteroides* GIR46L4\*), LplanGUZ3L2\* (*L. plantarum* GUZ3L2\*) e LparaGIR53L1\* (*L. paracasei* GIR53L1\*) foram capazes de reduzir significativamente ( $p < 0,05$ ) a invasão deste patógeno. O isolado mais efetivo em reduzir a % de invasão de *S. aureus* ATCC 29213 foi o LparaGIR53L1\* que apresentou uma redução média de  $88,10 \pm 4,03\%$  na invasão deste patógeno. Os resultados de invasão de *S. aureus* ATCC 29213, na presença das 9 BAL testadas e nos seus respectivos controles experimentais, expressos em  $\log_{10}$  de UFC de patógeno/mL de lisado celular e em % de invasão de patógeno, estão mostrados na FIGURA 36. Os valores médios da invasão de *S. aureus* em células MDA-MB-231 na presença das 9 BAL testadas, bem como nos controles experimentais, em ambas as abordagens de tratamento dos dados, com seus respectivos desvio-padrão, estão mostrados na TABELA 17.

O isolado WcoGIRO48L1\* (*W. confusa* GIR48L1\*) foi o único a reduzir significativamente a adesão de *S. aureus* ATCC 29213 (em  $\log_{10}$  de UFC de patógeno/mL de lisado celular e em % de adesão de patógeno). Por outro lado, o isolado LactGIRO4S8\* (*L. lactis* GIRO4S8\*) foi capaz de reduzir significativamente a % de adesão e invasão de *S. aureus* ATCC 29213. Estes dois isolados também foram capazes de reduzir significativamente a % de adesão de *E. coli* ATCC 25723, e apresentaram alta taxa de adesão e foram invasores “eficientes” de células MDA-MB-



231. Por esses motivos, os isolados WcoGIRO48L1\* e LactGIRO4S8\* foram selecionados para avaliação de seu efeito imunomodulador em co-cultivo com células MDA-MB-231.

TABELA 17 - Adesão e invasão de patógenos na presença de isolados de BAL em células epiteliais da glândula mamária MDA-MB-231

**A: *S. aureus* ATCC 29213**

Identificação do isolado	Código	Ade. log*	Ade. %**	Inv. log*	Inv. %**
<i>Pediococcus stilesii</i> HOL36L1*	PstiHOL36L1*	5,32±0,41	333,8±213,1	4,63±0,34	184,3±23,7
<i>Lactococcus lactis</i> GIRO4S8*	LactGIRO4S8*	4,40±0,11	32,7±7,9	3,27±,50	17,5±13,2
<i>Weissella paramesenteroides</i> GIR46L4*	WparGIR46L4*	5,11±0,45	226,1±197,8	3,91±0,09	55,3±11,8
<i>Weissella confusa</i> GIR48L1*	WcoGIRO48L1*	3,97±0,14	12,2±4,2	4,15±0,02	93,8±4,7
<i>Weissella confusa</i> GIRO21L1*	WcoGIRO21L1*	4,62±0,29	61,0±34,9	4,06±0,35	94,9±76,0
<i>Weissella cibaria</i> GIRO27L2*	WciGIRO27L2*	4,49±0,42	49,8±33,2	4,33±0,27	165,3±107,7
<i>Lactobacillus plantarum</i> GUZ3L2*	LplanGUZ3L2*	4,73±0,11	69,4±17,4	4,18±0,85	33,5±4,7
<i>Lactobacillus paracasei</i> GIR53L1*	LparaGIR53L1*	5,10±0,01	160,0±2,2	3,24±0,15	11,9±7,0
<i>Streptococcus lutetiensis</i> HOL36L2*	StrelutHOL36L2*	5,04±0,05	137,8±15,6	3,93±0,12	58,6±15,5
Controle (somente patógeno)	Controle	4,79±0,34	100	4,15±0,15	100

**B: *E. coli* ATCC 25723**

Identificação do isolado	Código	Ade. log*	Ade. %**	Inv. log*	Inv. %**
<i>Pediococcus stilesii</i> HOL36L1*	PstiHOL36L1*	4,37±0,19	8,6±3,2	0	0
<i>Lactococcus lactis</i> GIRO4S8*	LactGIRO4S8*	4,61±0,12	14,4±4,1	0	0
<i>Weissella paramesenteroides</i> GIR46L4*	WparGIR46L4*	4,76±0,12	20,5±5,5	0	0
<i>Weissella confusa</i> GIR48L1*	WcoGIRO48L1*	4,54±0,80	23,3±34,7	0	0
<i>Weissella confusa</i> GIRO21L1*	WcoGIRO21L1*	4,37±0,45	11,2±10,0	0	0
<i>Weissella cibaria</i> GIRO27L2*	WciGIRO27L2*	4,56±0,76	34,6±51,6	0	0
<i>Lactobacillus plantarum</i> GUZ3L2*	LplanGUZ3L2*	5,38±0,11	84,6±20,9	0	0
<i>Lactobacillus paracasei</i> GIR53L1*	LparaGIR53L1*	5,02±0,88	80,2±101,1	0	0
<i>Streptococcus lutetiensis</i> HOL36L2*	StrelutHOL36L2*	4,90±0,34	31,8±22,8	0	0
Controle (somente patógeno)	Controle	5,06±0,83	100	0	0

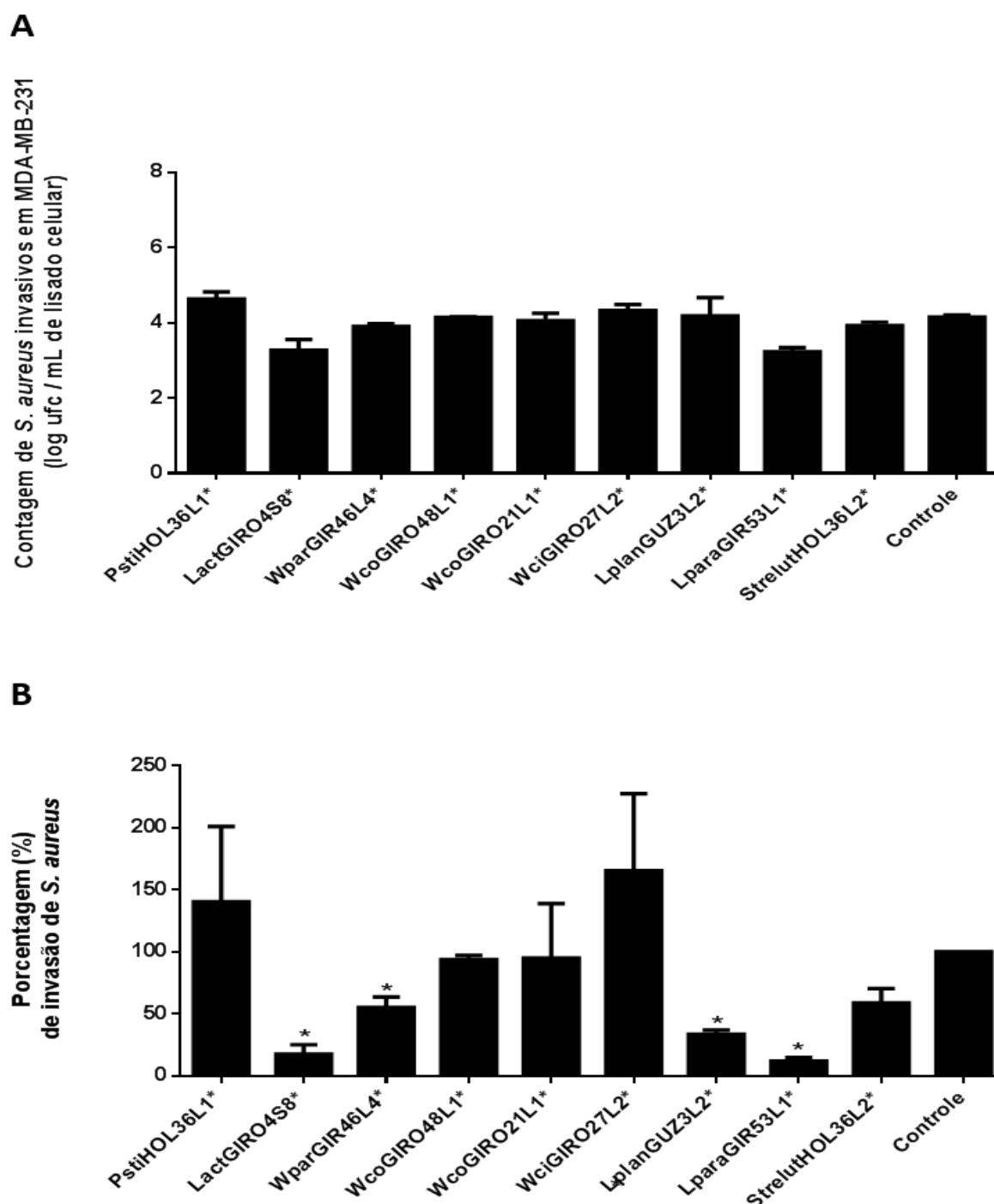
**Legenda:** Adesão e invasão de *S. aureus* ATCC 2913 e de *E. coli* ATCC 25723 na presença de 9 BAL selecionadas foram avaliadas, em ensaio de co-cultivo com monocamadas confluentes de ~ 1,5 x 10<sup>5</sup> células MDA-MB-231/poço, em um ROI de 100:1 para BAL e em um MOI de 10:1 para bactérias patogênicas, com 1 h de contato simultâneo.

Dados foram expressos como média e desvio-padrão (±) das populações bacterianas aderidas ou invasoras, expressas em log<sub>10</sub> de UFC de patógeno / mL de lisado celular (\*) ou como % de adesão ou invasão de patógeno (\*\*). Cada ensaio foi feito em quadruplicata.

\* **Ade.log** e **Inv.log** = Adesão ou invasão de patógeno expressas em log<sub>10</sub> de UFC de patógeno / mL de lisado celular;

\*\* **Ade.%** e **Inv.%** = Adesão ou invasão de patógeno expressas em % de adesão ou invasão de patógeno.

FIGURA 36 – Invasão de *S. aureus* ATCC 29213 em células MDA-MB-231 na presença de BAL



**Legenda:** Invasão de *S. aureus* ATCC 2913 na presença de 9 BAL selecionadas foi avaliada, em ensaio de co-cultivo com monocamadas confluentes de  $\sim 1,5 \times 10^5$  células MDA-MB-231/poço, em um *ROI* de 100:1 para BAL e em um *MOI* de 10:1 para bactérias patogênicas, com 1 h de contato simultâneo, seguido de 1 h de incubação das monocamadas com meio RPMI 1640 contendo antibióticos. Dados foram expressos como média e desvio-padrão do **(A)**  $\log_{10}$  de UFC de patógeno /mL de lisado celular e da **(B)** % de adesão dos patógenos, definida como o número total de bactérias recuperadas nos poços experimentais, após duas horas de incubação em células MDA-MB-231, dividido pela média aritmética do número de bactérias recuperadas nos poços controle, multiplicado por 100. Cada ensaio foi feito em quadruplicata. Diferenças entre os isolados foram avaliadas usando *one-way* ANOVA seguida do pós-teste de Turkey. Diferenças estatisticamente significativas em comparação aos controles ( $p < 0,05$ ) estão mostradas na figura com (\*).

Código dos isolados: (PstiiHOL36L1\*) *Pediococcus stilesii* HOL36L1\*; (LactGIRO4S8\*) *Lactococcus lactis* GIRO4S8\*; (WparGIR46L4\*) *Weissella paramesenteroides* GIR46L4\*; (WcoGIRO48L1\*) *Weissella confusa* GIR48L1\*; (WcoGIRO21L1\*) *Weissella confusa* GIRO21L1\*; (WciGIRO27L2\*) *Weissella cibaria* GIRO27L2\*; (LplanGUZ3L2\*) *Lactobacillus plantarum* GUZ3L2\*; (LparaGIR53L1\*) *Lactobacillus paracasei* GIR53L1\*; (StrelutGIR25S5) *Streptococcus lutetiensis* GIR25S5 e (StreluthOL36L2\*) *Streptococcus lutetiensis* HOL36L2\*. Controle (só patógeno – sem BAL).

## 6.8 Imunomodulação de isolados de BAL em células MDA-MB-231

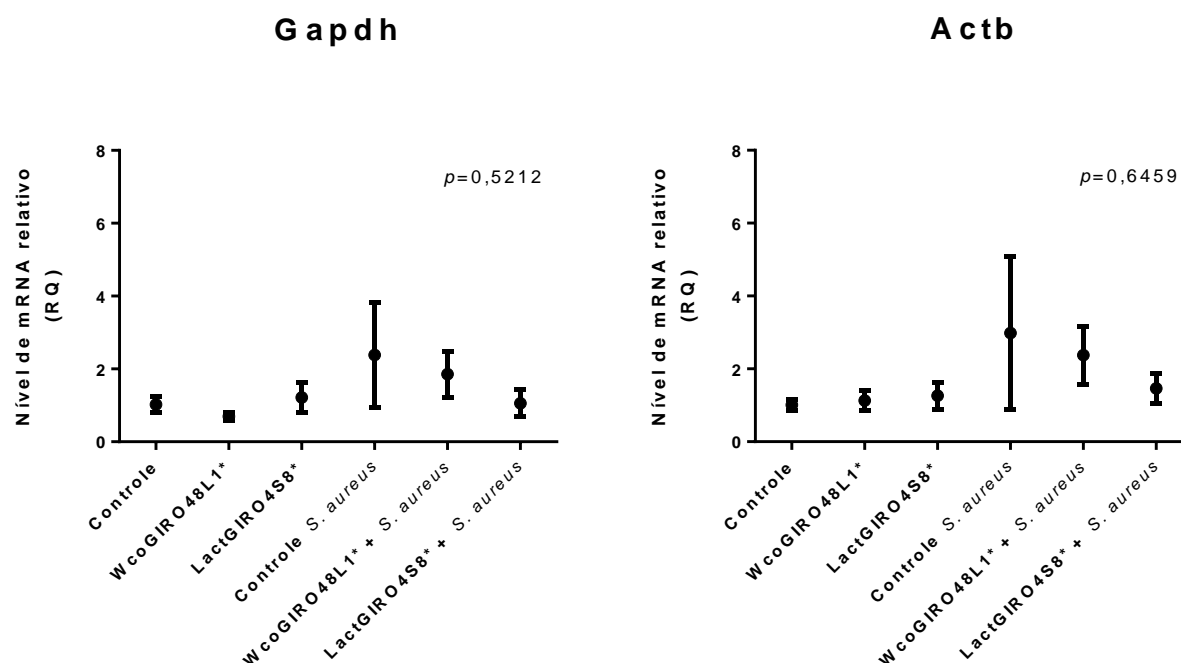
O efeito imunomodulador dos isolados WcoGIRO48L1\* e LactGIRO4S8\* foi avaliado pela quantificação da expressão gênica de alguns mediadores da resposta imune (IL1 $\beta$ , IL8, IL10, Tgfb1 e Tnfa). A expressão gênica foi quantificada em células MDA-MB-231 após 1h de co-cultivo com BAL na presença ou ausência de desafio com *S. aureus* ATCC 29213 em um *ROI* de 100:1 para BAL e em um *MOI* de 10:1 para a bactéria patogênica. Portanto, para cada BAL avaliada existiram poços experimentais (com BAL e patógeno e outros apenas com BAL) e poços controle (apenas com meio RPMI 1640 completo sem inóculo bacteriano e outros apenas com *S. aureus* ATCC 29213). Os resultados da quantificação gênica foram expressos através das médias e erro-padrão da quantidade relativa de mRNA de cada gene alvo de acordo com método descrito por Hellemans e col. (2007) usando como calibrador a média dos dados de expressão de células sem inóculo bacteriano. O resultado de cada tratamento é mostrado como uma quantidade relativa da expressão do calibrador, que tem nível de expressão definido como 1x.

Não houve efeito dos tratamentos com BAL e/ou *S. aureus* ATCC 29213 sobre a expressão relativa dos genes normalizadores (Gapdh e Actb), pois não foram encontradas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) de expressão relativa entre as células tratadas e as células que apenas receberam meio RPMI 1640, como está mostrado na FIGURA 37. Portanto, os genes Gapdh e Actb foram usados com segurança para normalização dos dados de expressão gênica dos genes IL1 $\beta$ , IL8, IL10, Tgfb1 e Tnfa nas células MDA-MB-231.

Os resultados da avaliação da expressão gênica das citocinas IL1 $\beta$ , IL8, IL10, Tgfb1 e Tnfa estão mostrados na FIGURA 38. Não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) na expressão das citocinas IL10 e Tgfb1 entre todos os tratamentos avaliados. Em comparação às células que só receberam meio RPMI 1640, o desafio com *S. aureus* ATCC 29213 produziu aumento da expressão de IL1 $\beta$  e redução de Tnfa, estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ). O tratamento das células MDA-MB-231 com o isolado WcoGIRO48L1\* também produziu redução significativa ( $p < 0,05$ ) na expressão de Tnfa em comparação as células sem inóculo bacteriano. Células em contato com o isolado WcoGIRO48L1\* ou com o isolado LactGIRO4S8 desafiadas com patógeno apresentaram níveis de expressão da

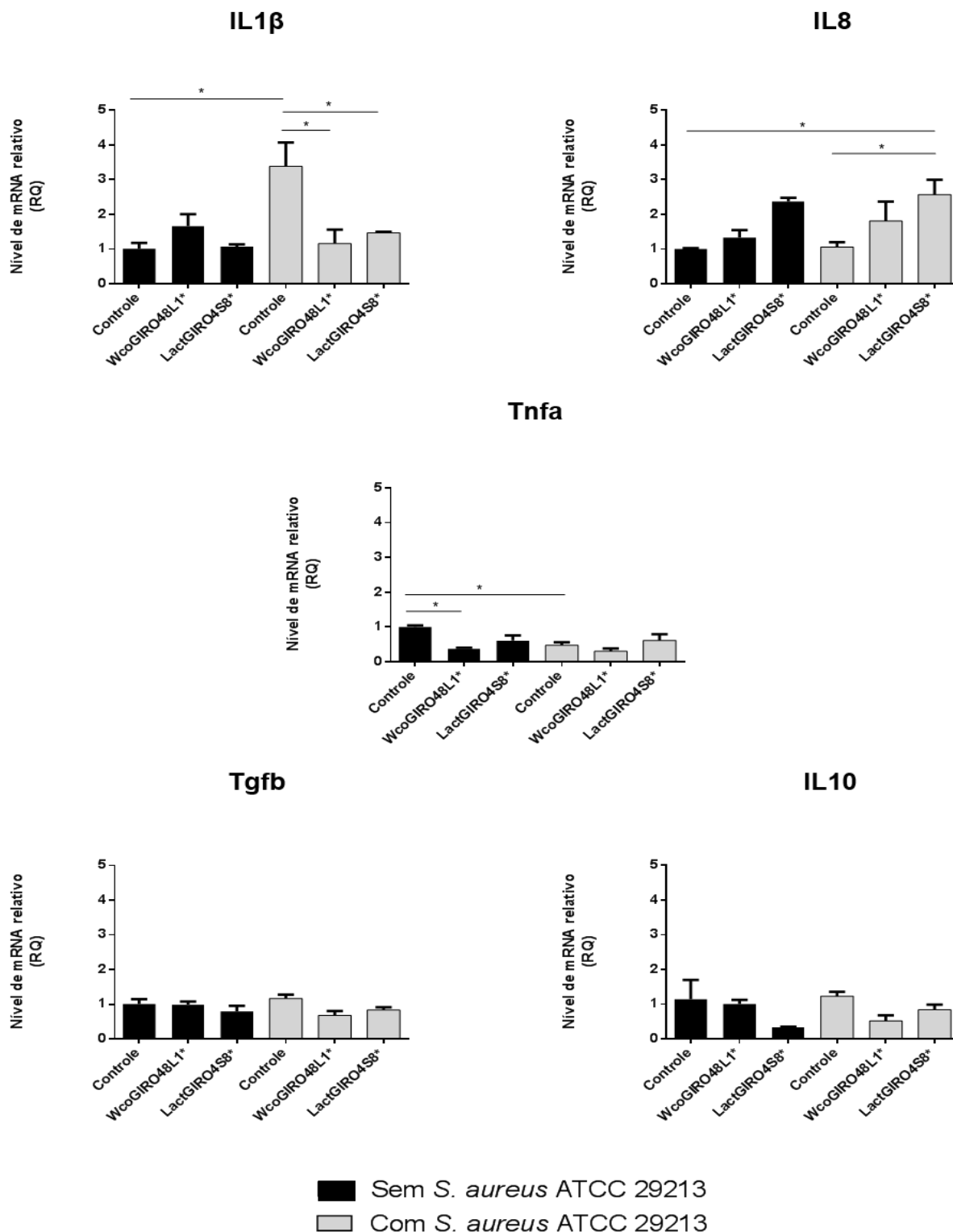
citocina IL1 $\beta$  significativamente ( $p < 0,05$ ) menores quando comparados com os níveis de expressão em células apenas desafiadas com *S. aureus* ATCC 29213. O tratamento das células com o isolado LactGIRO4S8 na presença de desafio com *S. aureus* ATCC 29213 produziu aumentos significativos na expressão de IL8 em comparação com células apenas desafiadas com patógeno e também em comparação com células que receberam apenas meio RPMI 1640.

FIGURA 37 – Efeito dos tratamentos experimentais sobre a expressão relativa de Gapdh e de Actb em células MDA-MB-231



**Legenda:** Avaliação do efeito dos tratamentos experimentais sobre a expressão relativa de Gapdh e de Actb utilizando o método do  $2^{-\Delta Cq}$  (LIVAK & SHIMITTGEN, 2001). Cada tratamento experimental foi representado, nesta figura, como média e desvio-padrão dos dados relativos de expressão dos genes referência de todos os poços submetidos a cada tratamento. Os valores de expressão de cada gene normalizador foram relativizados pelos dados dos poços que receberam apenas meio RPMI 1640. Os resultados indicam ausência de diferenças estatísticas ( $p > 0,05$ ) na expressão desses genes nas células MDA-MB-231, entre os diferentes tratamentos experimentais avaliados (tratamento com os isolados WcoGIRO48L1\* e LactGIRO4S8\* e desafio com *S. aureus* ATCC 29213). Os resultados foram expressos como média e desvio-padrão do nível de mRNA relativo de cada gene de referência. As barras verticais representam os desvios-padrão das médias. O valor de  $p$  foi obtido a partir de teste estatístico de comparação de médias e variâncias (*one-way ANOVA*).

FIGURA 38 – Expressão relativa das citocinas IL1 $\beta$ , IL8, IL10, Tgfb1 e Tnfa em células MDA-MB-231



**Legenda:** A expressão gênica das citocinas IL1 $\beta$ , IL8, IL10, Tgfb1 e Tnfa em células MDA-MB-231 foi representada pelo nível relativo de expressão gênica (nível de mRNA). Os dados foram expressos em quantidades médias relativas, e seus respectivos desvios-padrão, de mRNA, de acordo com o método descrito por Hellemans e col., (2007) usando como calibrador a média dos dados de expressão de poços que receberam apenas meio RPMI 1640 (Controle). O resultado de cada tratamento é mostrado como uma média da quantidade relativa da expressão do calibrador, que tem nível de expressão definido como 1x. As barras verticais representam os desvios-padrão das médias. Cada ensaio foi feito em triplicata. Diferenças entre os isolados foram avaliadas usando *one-way* ANOVA seguida do pós-teste de Turkey. Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos experimentais foram identificadas nos gráficos com (\*) sobre traços.

## 7. DISCUSSÃO

O leite é um fluido biológico secretado pelos mamíferos com funções nutricionais importantes para o desenvolvimento da prole. Além disso, o papel chave do leite para o desenvolvimento do sistema imune dos filhotes é extremamente reconhecido. Os seres humanos, graças ao hábito de continuarem a ingerir leite após o desmame, passaram a utilizar, na alimentação, leite obtido de outros animais, os quais passaram a ser criados para este fim. Além de produzir um alimento importante para dieta humana, a pecuária leiteira representa um importante setor econômico, principalmente para o Brasil, que é o quinto maior produtor mundial de leite. Fatores associados principalmente à saúde e ao bem-estar animal afetam diretamente a produção de leite. A mastite representa a principal doença que afeta rebanhos de produção de leite em todo o mundo sendo reconhecida como a doença que gera os maiores prejuízos para os produtores e indústria de leite.

A mastite subclínica é o quadro caracterizado pela ausência de sinais clínicos de infecção em animais que apresentam CCS > 200.000 cel/mL (NMC, 2001). O percentual de animais acometidos com mastite subclínica, em todo mundo, é pouco conhecido, já que muitos animais não são diagnosticados, pois apenas rebanhos extremamente sistematizados utilizam a CCS como uma prática preventiva de rotina. Entretanto, estudos apontam alta incidência desta doença no Brasil, com índices variando de 11,9-58,8% de vacas infectadas, por rebanho (PEREIRA et al., 2001). Na amostragem feita neste trabalho, em 200 animais entre a 1<sup>a</sup>-5<sup>a</sup> lactação das raças Guzerá, Holandês, Gir e Girolando 1/2, foi encontrado um índice geral de mastite subclínica de 34,5%. De maneira geral, as diferentes raças apresentaram índices de mastite subclínica variando entre 16,7-44,9%, sendo a menor incidência encontrada na raça Guzerá. A raça Guzerá apresenta rusticidade e resistência a infecções por endo e ectoparasitas, além de ser tolerante ao estresse térmico (PENNA et al., 2014). Por ter apresentado média de CCS baixa (em torno de 100.000 cel/mL) era esperado que o índice de animais acometidos com mastite subclínica, nesta raça, fosse pequeno em nossa amostra. A CCS para a raça Guzerá foi também aferida por Peixoto e col. (2008) sendo encontrada uma média de 164.000 cel/mL, valor próximo ao encontrado em nossa amostra. A taxa de mastite subclínica em uma amostragem feita no norte da Argentina, sem menção no trabalho sobre a raça dos animais

coletados, mostrou que 21,8% deles apresentavam  $CCS > 200.000$  cel/mL (ESPECHE et al., 2009). Outro estudo na Argentina, com vacas da raça Holandês, encontrou uma taxa de 39,3% dos quartos amostrados apresentando mastite subclínica (ESPECHE et al., 2012), taxa similar aos 32,5% encontrados em nossa amostragem para esta raça.

A CCS é uma importante medida para acompanhar a eficiência dos programas de controle da mastite, sendo por isso de extrema importância para a indústria leiteira e para os produtores (SCHUKKEN et al., 2003). Além de funcionar como critério classificatório de animais doentes e saudáveis, a CCS tem sido considerada uma ferramenta importante para avaliação da qualidade da matéria-prima, pois está relacionada à composição do leite, rendimento industrial e à determinação da segurança alimentar dos produtos derivados do leite (BUENO et al., 2005). Entretanto, a maior perda associada ao aumento de CCS é a redução da produção de leite em relação ao verdadeiro potencial do animal, pois contagens acima de 1.000.000 cel/mL estão associadas com uma redução de 18% na produção de leite. Como principal consequência dessa redução na produção de leite, o aumento de CCS gera perdas econômicas para os produtores de leite. Estima-se, no Brasil, uma perda entre R\$ 52 a R\$ 57 por vaca, para cada aumento no escore de células somáticas (MAGALHÃES et al., 2006).

Os seres vivos pluricelulares vivem em íntima associação com micro-organismos residentes em seus corpos, e os bovinos não são exceção. Vários nichos do corpo de uma vaca, tais como trato gastrointestinal, reprodutor e a própria glândula mamária, são colonizados por uma gama de micro-organismos, que em conjunto são chamados de “microbiota”. Essas microbiotas colonizam o corpo dos seres vivos pluricelulares desde o nascimento até a morte e interferem, muitas vezes, na anatomia, fisiologia, sistema nervoso e imunologia do seu hospedeiro (IEBBA et al., 2016). Devido às limitações das abordagens dependentes de cultivo, a avaliação da microbiota associada principalmente às plantas e animais cada vez mais tem sido feita por metodologias moleculares independentes de cultivo, e um largo conhecimento sobre essas comunidades vem sendo construído pela comunidade científica.

Em animais de produção, principalmente os bovinos, o foco dos estudos de avaliação de microbiota foi direcionado para a relação da dieta, da eficiência

fermentativa, da produção de gases relacionados ao efeito estufa (metano e gás carbônico) e do desempenho animal com a composição da microbiota ruminal (MOHAMMED et al., 2014; SANDRI et al., 2014; JEWELL et al., 2015; WEIMER, 2015). Nos últimos anos, porém, seguindo a tendência primeiramente verificada em humanos da correlação de alterações da microbiota com diferentes patologias, o foco dos estudos de microbiota em animais de produção foi ampliado. Portanto, para avaliar a composição da microbiota da glândula mamária bovina saudável e acometida por mastite subclínica em quatro raças importantes para a produção leiteira no Brasil (Girolando 1/2, Holandês, Gir e Guzerá) foi empregado o sequenciamento de nova geração das porções hipervariáveis V3-V4 do gene 16S rRNA em amostras DNA total extraído a partir de leite cru.

Nos dados produzidos neste trabalho, em média, foram geradas 146.286,13±39.899,64 sequências por amostra. Esse rendimento foi satisfatório para análise de constituição de microbiota, visto que na literatura é relatado que um rendimento médio de 30.000 sequências fornece uma cobertura adequada para esse tipo de análise (DE OLIVEIRA et al., 2013). Um estudo de microbioma, conduzido na França, usando basicamente o mesmo protocolo de extração de DNA e de análise dos dados aqui empregado, obteve, em média 122.977 sequências por amostra (FALENTIN et al., 2016), rendimento da mesma ordem de grandeza do encontrado aqui.

Procariontes representam mais de 90% da composição microbiológica residente na glândula mamária enquanto outros micro-organismos, tais como fungos, algas unicelulares, *Archeas* e vírus, são menos prevalentes (BHATT et al., 2012). Os filos bacterianos mais abundantes em todas as amostras sequenciadas neste trabalho (animais saudáveis e com mastite subclínica) foram Firmicutes e Proteobacteria. Proteobacteria é um filo diverso que inclui várias bactérias patogênicas Gram-negativas, algumas das quais, inclusive, são consideradas patógenos ambientais de mastite. Por outro lado, o filo Firmicutes alberga bactérias Gram-positivas e possui representantes relacionados com quadros de mastite contagiosa. Em animais da raça Holandês criados na França a microbiota da glândula mamária é dominada por gêneros pertencentes ao filo Firmicutes, seguido dos pertencentes aos filos Bacteroides, Actinobacteria, e, em menor extensão, ao Proteobacteria (FALENTIN et



al., 2016). A dominância de Firmicutes foi também verificada, em nossos dados, nas raças Holandês, Gir e Girolando 1/2.

Em animais indianos com mastite subclínica, a metagenômica comparativa apontou que os principais filos bacterianos encontrados foram Firmicutes e Proteobacteria, entretanto nos animais zebuínos (Gir e Guzerá) ocorreu uma prevalência maior de Proteobacteria enquanto nos mestiços (*B. taurus* x *B. indicus*) o filo mais prevalente foi Firmicutes (BHATT et al., 2012). Nos animais Guzerá amostrados neste trabalho, também foi observada a dominância de Proteobacteria em relação a Firmicutes, mas este perfil não foi verificado nas amostras da raça Gir avaliadas. Provavelmente, por ter um histórico de melhoramento voltado para produção de leite mais recente e baixa capacidade de produção leiteira, os animais da raça Guzerá residentes no Brasil apresentam mais semelhança genética e de manejo com o perfil existente nos animais presentes na Índia. A raça Gir, por outro lado, foi submetida no Brasil, ao longo dos últimos 30 anos, a um intenso processo de seleção para produção de leite e também a muitas práticas de manejo realizadas primariamente em animais taurinos (VERNEQUE et al., 2010) o que pode explicar, em parte, seu perfil de composição diferente do apresentado por animais indianos desta raça e do observado em nossos dados para a raça Guzerá.

Ao avaliar o perfil taxonômico entre as diferentes raças estudadas pode-se afirmar que sua composição microbiana é diversa. Nos animais saudáveis, em nível de gênero, por exemplo, *Acinetobacter* e *Staphylococcus* estavam presentes entre os 10 mais prevalentes em todas as raças analisadas e os gêneros *Streptococcus* e *Stenotrophomonas* entre os 10 mais abundantes nas raças Gir, Girolando 1/2 e Guzerá. Na raça Girolando 1/2, *Pseudomonas* também estava entre os mais prevalentes na microbiota da glândula mamária saudável. O gênero *Stenotrophomonas* também foi observado entre os mais abundantes nas amostras de animais da raça Guzerá. Na raça Holandês, *Aerococcus* foi também identificado como um gênero prevalente nos dados gerados neste trabalho. Diferente do gênero *Pseudomonas*, que apresentou abundância relativa de 40% na raça Girolando 1/2 e também do gênero *Stenotrophomonas* que foi encontrado com abundância relativa de 24% na raça Guzerá, alguns outros gêneros de bactérias Gram-negativas foram encontrados, em algumas raças entre os 10 gêneros mais prevalentes, mas com

abundâncias abaixo de 5% (*Escherichia-Shigella* na raça Holandês, *Chryseobacterium* na raça Girolando 1/2 e *Stenotrophomonas* nas raças Gir e Girolando 1/2).

A ocorrência de bactérias Gram-negativas no leite, com destaque para *Escherichia*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Chryseobacterium* e *Stenotrophomonas*, tem sido relatada em situações em que os padrões de higiene e de manejo não são adequados e refletem uma má preparação do úbere antes da ordenha, devido à ausência de boas práticas de sanitização do animal e dos equipamentos. Estas bactérias também estão relacionadas com a deterioração de alimentos, bem como com várias doenças, além de portarem genes de resistência a diferentes antibióticos (QUIGLEY et al., 2013). Diante destes fatos, a presença deste tipo de bactéria no leite continua sendo indesejada, mesmo que alguns trabalhos apontem um papel importante de algumas delas na produção de produtos lácteos (VACHEYROU et al., 2011).

Dados do microbioma do leite humano, apontam que os gêneros mais prevalentes são *Streptococcus* e *Staphylococcus*, que junto com os gêneros *Serratia*, *Pseudomonas* e *Corynebacterium* formam um núcleo conservado e dominante (50% da abundância relativa) entre diferentes mulheres. *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são membros menos prevalentes (2-3% de abundância relativa) (HUNT et al., 2011). Em nossos dados, *Lactobacillus* estão entre os 10 gêneros mais abundantes apenas da raça Guzerá e mesmo assim com abundância relativa abaixo de 1% enquanto *Bifidobacterium* são praticamente inexistentes na microbiota da glândula mamária bovina.

Uma revisão de vários trabalhos sobre a composição microbiológica do leite reportou que a microbiota do leite de vaca taurinas saudáveis, avaliada por metodologias moleculares, é dominada pelos gêneros *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Pseudomonas*. Em menor proporção, esses animais apresentam no leite *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Pseudoalteromonas* e *Staphylococcus* (QUIGLEY et al., 2013). *Streptococcus* apresenta alta prevalência em animais taurinos saudáveis e também em animais acometidos com mastite relacionada ao isolamento de *S. uberis* e *S. dysgalactiae* (OIKONOMOU et al., 2012). Entretanto, em nossos dados, *Streptococcus* foram

encontrados em todas as raças, mas com abundância relativa inferior a 5%. Em animais taurinos, foi também relatado que além de *Pseudomonas*, o gênero *Ralstonia* é um dos mais abundantes em glândulas mamárias bovinas saudáveis (KUEHN et al., 2013). Um grande número de outros gêneros, cada um com abundância relativa <1% foram também relatados na composição desta microbiota (QUIGLEY et al., 2013). De fato, neste trabalho foram identificados mais de 200 gêneros bacterianos, dos quais grande parte estava presente em abundância relativa muito baixa. Provavelmente, esse perfil é típico da microbiota existente na glândula mamária bovina.

Em vacas da raça Holandês, residentes na França, gêneros dominantes presentes na glândula mamária incluem *Staphylococcus* (com uma abundância relativa média de 23,8%), *Corynebacterium* (10,1%), *Ruminococcus* (4,9%), *Aerococcus* (3,2%), *Bifidobacterium* (2,6%), *Flacklamia* (2,4%), *Jeotgalicoccus* (1,3%), *Trichococcus* (1,2%), e *Oscillospira* (0,8%) (FALENTIN et al., 2016). Em nossos dados, os gêneros *Aerococcus*, *Staphylococcus* e *Corynebacterium* também estavam entre os 10 mais abundantes em animais saudáveis da raça Holandês, mas com abundâncias relativas diferentes de 25%, 7% e 6%, respectivamente. Variações geográficas e climáticas, de manejo e de constituição genética provavelmente explicam essas diferenças, bem como diferenças metodológicas entre os dois estudos. Não existem dados na literatura sobre a composição da microbiota da glândula mamária de animais da raça Guzerá, Gir e Girolando 1/2 saudáveis, sendo este o primeiro estudo a descrever a composição da microbiota presente em animais destas raças.

Assim como observado em humanos (HUNT et al., 2011), alguns filotipos presentes em outros nichos foram encontrados na composição da microbiota da glândula mamária. Por exemplo, a microbiota da pele do teto é dominada por Firmicutes (76%), Actinobacteria (4,9%), Proteobacteria (17,8%) e Bacteroidetes (1,3%) e em baixos níveis por Chroflexi, Verrucomicrobia, Cyanobacteria (VERDIER-METZ et al., 2012). Nossos dados apontam que a composição de filós da microbiota da glândula mamária é similar à encontrada na pele do teto, exceto para a raça Guzerá. Além disso, o gênero *Corynebacterium* presente entre os 10 gêneros mais prevalentes de 3 raças (Gir, Guzerá e Holandês) é abundante na pele de bovinos, assim como *Staphylococcus* que também foi identificado como prevalentes na

microbiota existente na pele do teto através de metodologias dependentes e independentes de cultivo (VERDIER-METZ et al., 2012; ZINICOLA et al., 2015). Considerando o rigor asséptico empregado durante a coleta das amostras e o descarte dos primeiros jatos de leite para reduzir ao máximo a contaminação com micro-organismos residentes na pele dos animais, nossos dados reforçam a ideia de que existe uma sobreposição entre a microbiota residente na glândula mamária e aquela indígena na pele do teto (KUEHN et al., 2013). Por outro lado, alguns micro-organismos prevalentes na superfície do teto, tais como *Solobacterium*, *Clavibacter* e *Arcanobacterium* não são identificados como membros abundantes na glândula mamária provavelmente refletindo sua falta de capacidade adaptativa ao ambiente mamário mesmo que uma contínua transferência a partir da pele ocorra principalmente durante o processo de ordenha (MICHAEL et al., 2006; VACHEYROU et al., 2011).

Um estudo conduzido em Israel avaliou a evolução da microbiota do rumem de bezerros após o nascimento até dois anos de idade. Obviamente, devido à alimentação exclusiva com leite, a composição da microbiota do rúmen, nos 3 primeiros dias após o nascimento, apresentou semelhanças com a microbiota da glândula mamária (dominância de Proteobacteria e Firmicutes) e no prazo de dois anos sofreu mudança drástica em sua composição, passando a ser dominada por Bacteroidetes e Firmicutes com baixa representatividade de Proteobacteria (JAMI et al., 2013). Em bovinos adultos, o trato gastrointestinal possui diferenças na composição da comunidade microbiana entre os seus segmentos. Bacteroidetes são encontrada predominantemente no retículo e abomaso, enquanto Firmicutes são abundantes no intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e no interior do intestino grosso (ceco, cólon e fezes) (DE OLIVEIRA et al., 2013). O ambiente do rumen tem uma composição muito peculiar com presença de *Fibrobacter*, *Treponema*, *Methanobrevibacter*, *Pseudobutyrvibrio*, *Ruminococcus* e *Coprococcus*, os quais são relacionados com a degradação de celulose e hemicelulose (RUSSELL & RYCHLIK, 2001). A microbiota vaginal de vacas é basicamente composta por Firmicutes (40-50%), Bacteroidetes (15-25%) e Proteobacteria (5-25%) apresentando como gêneros mais prevalentes *Aeribacillus*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Rikenella*, *Alistipes*, *Bacillus*, *Eubacterium* e *Prevotella* (LAGUARDIA-NASCIMENTO et al., 2015). Diante destes estudos e dos dados aqui apresentados, tem-se afirmado que o

filo Firmicutes é ubíquo em diferentes microbiotas de bovinos (CALLAWAY et al., 2010; DE MENEZES et al., 2011; SHANKS et al., 2011). Entretanto, mesmo que existam alguns membros compartilhados, as microbiotas residentes em bovinos apresentam perfis diferentes de composição, provavelmente relacionados às condições físico-químicas impostas pela fisiologia de cada nicho do corpo destes animais.

Um trabalho conduzido por Vacheyrou e col. (2011) mostrou que existe uma relação entre a presença de bactérias no leite e a constituição bacteriana do ambiente em que os animais vivem na fazenda. Os gêneros *Aerococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Corynebacterium* foram, por exemplo, detectados em diferentes locais de uma fazenda, incluindo, superfície do teto, sala de ordenha, ar, feno e poeira. É descrito na literatura que existe uma variação na prevalência de *Staphylococcus* no leite de vacas de acordo com o perfil e local de alimentação dos animais (QUIGLEY et al., 2013). De fato, *Staphylococcus* apresentou, em animais saudáveis, abundância relativa alta, acima de 20%, exceto na raça Holandês que foi a única submetida à alimentação com feno e sistema de confinamento *free stall*. Portanto, nossos dados sugerem que possivelmente o ambiente possa influenciar a composição da microbiota. Porém a avaliação da composição da microbiota do ambiente das fazendas amostradas é fundamental para elucidar essa questão. Por outro lado, alguns membros prevalentes presentes na microbiota da glândula mamária, como por exemplo *Lactococcus*, não são relatados como abundantes no ambiente de fazendas nem na pele do teto. De fato, a origem de *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Enterococcus* e de outras bactérias ausentes no ambiente externo mas presentes no trato gastrointestinal (MAO et al., 2012) e na glândula mamária pode ser explicada pela rota enterro-mamária (MACPHERSON & UHR, 2004), caso ela exista em ruminantes, pois só foi descrita em roedores e primatas.

A comparação do perfil taxonômico de animais saudáveis com os animais acometidos com mastite subclínica revelou alterações na composição da microbiota da glândula mamária. Essas mudanças estão relacionadas com uma redução da abundância relativa de Proteobacteria e aumento da abundância de Firmicutes. Nas raças Gir, Girolando 1/2 e Holandês foi observado um aumento da abundância relativa

de *Staphylococcus* e redução de *Acinetobacter* em animais com mastite subclínica. Em algumas raças, foi identificado um pequeno aumento da abundância relativa de *Escherichia-Shigella* e na raça Holandês aumento da abundância de *Lactococcus*. Na raça Girolando 1/2 foi observada uma redução na abundância de *Pseudomonas* em animais com mastite. Em animais da raça Guzerá, por outro lado, não foram observadas alterações no perfil taxonômico da microbiota entre animais com mastite subclínica e saudáveis. Além disso, a análise de dissimilaridade de Bray-Curtis, baseada no cálculo de  $\beta$ -diversidade, separou as amostras com mastite subclínica das amostras saudáveis para todas as raças, exceto para a Guzerá. Os índices de riqueza (Chao1 e ACE) e de diversidade (Shannon, Simpson invertido e Fisher) apresentaram, em geral, menores valores em animais com mastite subclínica em comparação com os saudáveis, exceto na raça Girolando 1/2, principalmente devido ao efeito das amostras coletadas na Fazenda C.

A estrutura de uma comunidade microbiana é um fator importante que parece determinar, em grande parte, a susceptibilidade de um indivíduo a determinadas patologias (IEBBA et al., 2016). O conhecimento da microbiota residente no corpo humano aponta que o conjunto de micro-organismos albergados nos tratos gastrointestinal e urogenital possuem características próprias e apresentam variação em sua composição quando hospedeiros saudáveis e doentes são comparados (HUNT et al., 2011). A mastite subclínica, apesar de não estar associada ao aparecimento de sintomas clínicos evidentes, é um estado relacionado a uma resposta inflamatória do hospedeiro, resultando em um aumento na quantidade de células somáticas no leite (NMC, 2001). Os dados aqui apresentados, bem como outros publicados na literatura, apontam que a mastite subclínica está relacionada a alterações na composição da microbiota residente na glândula mamária. Em animais taurinos, foi verificado que a maior parte dos marcadores taxonômicos pertencentes ao filo Firmicutes exibiu maior abundância relativa em animais com mastite (FALENTIN et al., 2016). Seguindo essa mesma tendência, a psoríase em humanos está relacionada com aumento de Firmicutes na pele em comparação com indivíduos saudáveis (CHO & BLASER, 2012). Por outro lado, em humanos também, dados de microbioma apontam que Diabetes tipo 2 e Doenças Inflamatórias Intestinais estão relacionadas com um aumento da abundância relativa de Proteobacteria e redução de Firmicutes (WALKER & IYENGAR, 2015). Esses achados demonstram que

doenças causam alterações na composição das microbiotas mesmo em níveis taxonômicos mais amplos e possuem perfil próprio de acordo com o hospedeiro e o tipo de processo inflamatório envolvido na patologia.

Em nível taxonômico mais estrito, gêneros como *Brevundimonas*, *Burkholderia*, *Sphingomonas* e *Stenotrophomonas* apresentaram abundância relativa maior em animais com mastite enquanto *Pseudomonas*, *Psychrobacter* e *Ralstonia* foram mais abundantes na microbiota da glândula mamária de animais taurinos saudáveis (KUEHN et al., 2013). Na França, animais com mastite subclínica da raça Holandês apresentaram maior abundância relativa de *Staphylococcus* (34%) em comparação com animais saudáveis (6,7%). Por outro lado, animais saudáveis apresentaram maior abundância relativa de *Ruminococcus* e *Bifidobacterium* em comparação aos acometidos por mastite (FALENTIN et al., 2016). Por métodos dependente e independentes de cultivo, na Índia, animais com mastite subclínica pertencentes às raças Guzera e Gir apresentaram alta prevalência de *E. coli* enquanto animais cruzados (*B. taurus* x *B. indicus*) apresentaram *S. aureus* como o micro-organismo mais prevalente (BHATT et al., 2012). Em nossos dados, os gêneros *Staphylococcus*, *Lactococcus*, *Pseudomonas* e *Acinetobacter* apresentaram variações em sua abundância relativa quando a microbiota de animais saudáveis e acometidos com mastite subclínica foi comparada.

*Staphylococcus*, com destaque para *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativos (CNS) são sabidamente membros residentes da microbiota da glândula mamária (BOGNI et al., 2011). Nossos dados mostram que em todas as raças esse gênero estava entre os 10 mais abundantes. Portanto, parece que membros do gênero *Staphylococcus* são tolerados em uma glândula mamária saudável, inclusive em altas populações. É descrito na literatura que *Staphylococcus* estão intimamente adaptados à sobrevivência na glândula mamária, expressando diferentes moléculas relacionadas à adesão, colonização e produção de biofilme sobre as células epiteliais mamárias (VASUDEVAN et al., 2003; DHANAWADE et al., 2010). Ademais, parece ser um padrão comum que animais com mastite subclínica apresentem aumentos consideráveis na abundância relativa deste gênero. De fato, a infecção por *S. aureus* geralmente começa como um quadro subclínico que evolui para mastite clínica aguda e, em muitos casos, crônica (PEREYRA et al., 2016).

Diante deste panorama, será que *Staphylococcus* por si só promovem a evolução do quadro subclínico para o clínico ou o processo inflamatório associado ao aumento da abundância relativa deste gênero promove uma facilitação da invasão da glândula por outros patógenos ambientais ou contagiosos? O foco deste trabalho não era o da caracterização do agente etiológico associado ao quadro de mastite subclínica, portanto o potencial patógeno causador do quadro inflamatório não foi conhecido. Porém, na literatura é descrito que existe, no trato genital bovino, uma colaboração entre bactérias potencialmente patogênicas através de interações com o sistema imune do hospedeiro (FALENTIN et al., 2016). Em quadros de metrite, uma inflamação do endométrio, parece que a contaminação do útero por *E. coli* é seguida de uma pós-infecção por *Arcanobacterium pyogenes* ou *Fusobacterium necrophorum* (WILLIAMS et al., 2007). Portanto, no contexto da glândula mamária, parece provável que um aumento da população de *Staphylococcus* permita uma “aliança maligna” destes com outros patógenos potenciais, favorecendo a evolução do quadro subclínico para o clínico, como foi proposto em humanos pela perturbação da microbiota mamária benigna por *Staphylococcus* e *Corynebacterium* (SAM MA et al., 2015). Além disso, a raça Guzerá foi aquela em que foram encontradas as menores médias de CCS entre todos os animais amostrados neste trabalho e também foi aquela com menor abundância relativa de *Staphylococcus* (3,6%). Portanto, parece provável que a manutenção de baixas densidades de *Staphylococcus* está relacionada com um estado mais salutar do úbere.

*Pseudomonas* é um gênero de bactérias Gram-negativas, bacilares, ubíquas, cuja origem é o solo, mas que são capazes de viver em ambientes hostis e, por isso sua ocorrência é comum em vários nichos (CDC, 2014). Não é a primeira vez que *Pseudomonas* foi encontrado entre os gêneros mais abundantes na microbiota da glândula mamária bovina através da análise de microbioma, visto que sua ocorrência foi relatada em animais zebuínos e taurinos, na Índia e Europa, sendo neste último local associada, inclusive, com úberes saudáveis (BHATT et al., 2012; KUEHN et al., 2013). A presença de moléculas de adesão e colonização em *Pseudomonas* permite que bactérias deste gênero, originadas do ambiente, possam colonizar com sucesso a glândula mamária (LYCZAK et al., 2000). *P. aeruginosa* é o principal patógeno do gênero relacionado com quadros infecciosos em humanos e animais, bem como com mastite crônica (POWER, 2003). Portanto parece provável que as sequências



identificadas como *Pseudomonas* neste trabalho não sejam atribuídas a *P. aeruginosa*. Além disso, *Pseudomonas* produzem substâncias antimicrobianas tais como ácido *pseudomonic* que tem capacidade de inibir o crescimento de *S. aureus* (BHATT et al., 2012). De fato, essa capacidade pode ajudar a explicar o motivo pelo qual em animais Girolando 1/2 saudáveis a abundância relativa de *Pseudomonas* foi maior que a de *Staphylococcus*, principalmente na Fazenda C, fato também observado em animais zebuínos residentes na Índia (BHATT et al., 2012).

Interessantemente, animais Girolando 1/2 amostrados na Fazenda C foram os únicos a apresentar alta prevalência de *Pseudomonas* e redução de sua abundância em animais com mastite subclínica. *Pseudomonas* já foram associadas com contaminação de água, incluindo sistemas de água purificada (RYAN et al., 2011; MENA & GERBA, 2009). A presença destas bactérias na água poderia representar uma fonte potencial de colonização dos tecidos mamários em bovinos uma vez que os sistemas de ordenha mecânicos usam intensamente água para limpeza dos materiais usados durante a ordenha (KUEHN et al., 2013). Portanto, pode ser que a água usada no sistema de ordenha da Fazenda C, que é mecânico, esteja contaminada com espécies menos patogênicas de *Pseudomonas* (KIRK & BARTLETT, 1984) que puderam colonizar a glândula mamária dos animais Girolando 1/2 desta fazenda. Essa hipótese pode ser facilmente comprovada com a análise da presença de *Pseudomonas* na água usada na propriedade em questão.

*Acinetobacter* é um gênero de bactérias Gram-negativas que pertencem ao filo Proteobacteria. Seus representantes são amplamente distribuídos na natureza, sendo capazes de sobreviver em diversas superfícies (úmidas e secas) e são encontrados principalmente no solo. Devido a sua capacidade autoagregativa, já demonstrada em meio aquoso (GERISCHER, 2008), podem ascender pelo canal do teto a partir do solo e provavelmente colonizar a glândula mamária. De fato, *Acinetobacter* já havia sido encontrado na microbiota da glândula mamária e sua origem foi relacionada ao ambiente da fazenda (VACHEYROU et al., 2011). Curiosamente, em nossos dados a abundância relativa de *Acinetobacter* foi menor em animais com mastite subclínica em comparação com animais saudáveis. Isso sugere que, mesmo estando relacionados com casos de infecção hospitalar em humanos, os membros deste gênero parecem ter efeitos benéficos no ecossistema mamário. *Acinetobacter lwoffii* F78, isolado a

partir de camas de vacas em fazendas leiteiras, apresentou efeito protetor em modelo de alergia em camundongos (DEBARRY et al., 2007) através da ativação da polarização de células T<sub>H</sub>1 e da ativação de células dendríticas (DEBARRY et al., 2010). Portanto, uma investigação mais profunda do papel que essas bactérias desempenham na fisiologia do ecossistema mamário deve ser desenvolvida.

A avaliação de dissimilaridade realizada pela análise de coordenadas principais (PCoA) empregando o cálculo de distância de Bray-Curtis, que é relacionado a  $\beta$ -diversidade, separou nas raças Gir, Girolando 1/2 e Holandês os animais saudáveis daqueles acometidos com mastite subclínica. Esse tipo de abordagem permite analisar a diversidade entre amostras de acordo com a abundância relativa de cada OTU dentro de cada amostra. Esse resultado reafirma a hipótese que a composição da microbiota da glândula mamária altera-se com a mastite subclínica. Entretanto, essa tendência não foi verificada na raça Guzerá. Provavelmente o pequeno número de animais ( $n=3$ ) que apresentaram CCS  $>200.000$  cel/mL não foi suficiente para representar a realidade do quadro de mastite subclínica nesta raça. Além disso, a média de CCS desses animais classificados com mastite subclínica da raça Guzerá foi de  $382.333,33 \pm 242.829,84$  cel/mL muito próxima do ponto de corte para classificação de animais acometidos com mastite subclínica ( $200.000$  cel/mL). Portanto, essa amostra de animais da raça Guzerá não pode ser considerada representativa do quadro inflamatório da raça e uma amostragem mais ampla deve ser realizada para avaliar, com mais propriedade, a verdadeira alteração da microbiota associada à mastite subclínica em animais Guzerá. Outro fato curioso, é que em animais da raça Guzerá foi encontrada a maior abundância relativa de OTUs não classificadas em nível de gênero, demonstrando um potencial enorme a ser ainda explorado na microbiota mamária residente nestes animais.

Uma redução da riqueza e da diversidade das microbiotas albergadas em mamíferos parece ser um padrão relacionado a diferentes patologias que atacam humanos e animais de produção, o que inclui a mastite. Análise discriminante mostrou que a microbiota da glândula mamária de vacas taurinas saudáveis é diferente das amostras de animais acometidos com mastite clínica. Além disso, algumas amostras acometidas com mastite apresentaram baixos índices de riqueza e diversidade (Chao1 e Shannon) em comparação com animais saudáveis (OIKONOMOU et al.,

2012). Em vacas da raça Holandês os valores do índice de diversidade de Shannon foram significativamente maiores em quartos saudáveis quando comparados com quartos acometidos com mastite subclínica (BRAEM et al., 2012; FALENTIN et al., 2016). Várias publicações descrevem, por metodologias independentes de cultivo, que alterações patológicas na pele, glândula mamária e no trato genital bovino estão relacionadas com uma redução da diversidade da microbiota albergada nesses nichos (SANTOS et al., 2011; BRAEM et al., 2012; OIKONOMOU et al., 2012; 2014; SANTOS & BICALHO, 2012; KUEHN et al., 2013; ZINICOLA et al., 2015).

Uma análise mais cuidadosa de nossos dados, mostra que a raça Girolando 1/2 foge dessa tendência, entretanto isso só aconteceu nas amostras coletadas na Fazenda C. É provável que efeitos ambientais, tais como clima, manejo, alimentação, tipo de ordenha, presença de bezerro, protocolos de tratamento de casos de mastite, entre outros fatores podem ter forte impacto sobre a composição da microbiota da glândula mamária e sua alteração em casos patológicos. Estudos posteriores com uma amostragem mais ampla da raça Girolando 1/2 provavelmente trarão melhores esclarecimentos para essa questão. Na raça Holandês apenas o estimador de diversidade de Fisher seguiu a tendência de apresentar menores valores para animais com mastite subclínica enquanto os estimadores de Shannon e InvSimpson apresentaram tendência contrária. Existem diferentes metodologias para cálculos de diversidade e riqueza de um mesmo conjunto de dados (MAGURRAN, 1988), entretanto não se pode afirmar que um método é superior a outro, mas que algumas abordagens se adequam melhor a determinados tipos de amostra do que a outras e variações como a encontrada na microbiota da glândula mamária da raça Holandês são comuns na natureza (CARVALHO, 1997).

O termo eubiose foi primeiro cunhado para caracterizar uma microbiota intestinal equilibrada associada à preponderância de espécies potencialmente benéficas e baixa abundância de membros potencialmente patogênicos (IEBBA et al., 2016). Nesse contexto, a disbiose configura o desequilíbrio desta comunidade microbiana que favorece a colonização de bactérias patogênicas e o desenvolvimento de doenças (ZHANG et al., 2015). Provavelmente, tanto patógenos oportunistas quanto patógenos exógenos se beneficiam do estado de disbiose. Além disso, a resposta imune do hospedeiro aos patógenos pode promover ou amplificar a disbiose

(IEBBA et al., 2016). Portanto, não se pode ainda afirmar se a disbiose é a causa ou um efeito de uma determinada patologia (WALKER & IYENGAR, 2015). Diante disso, recentemente vem ganhando força o conceito de patobioma (VAYSSIER-TAUSSAT et al., 2014) que defende uma interação ampla entre fatores de virulência de patógenos, alterações na microbiota residente e na resposta imune do hospedeiro na evolução de um determinado processo patológico. Nesse novo cenário, a compreensão das mudanças sofridas na microbiota da glândula mamária ao longo do desenvolvimento da mastite se torna de fundamental importância. Os dados aqui apresentados, reforçam alguns achados já documentados na literatura, que caracterizam a mastite, não simplesmente como uma doença polimicrobiana, mas associada a uma perturbação da microbiota residente no quarto mamário (HUNT et al., 2011; BHATT et al., 2012; OIKONOMOU et al., 2012; KUEHN et al., 2013; FALENTIN et al., 2016). Portanto, está longe de ser errado referir-se a mastite como intimamente relacionada a um quadro de disbiose na microbiota da glândula mamária. Com base nessa linha de raciocínio, a análise discriminante de comunidades microbiológicas permite a derivação da quantidade e qualidade de assinaturas microbianas associadas ou não com a mastite (SUN et al., 2010). Logo, a glândula mamária alberga uma microbiota complexa e diversa. Além disso, os dados deste trabalho ainda apontam que um perfil salutar “favorável” desta microbiota é caracterizado por maior prevalência de *Acinetobacter* e *Pseudomonas* e menor abundância de *Staphylococcus*.

Esse foi o primeiro trabalho na literatura científica a comparar a microbiota residente na glândula mamária em animais das quatro raças bovinas mais importantes na composição do rebanho bovino leiteiro do Brasil. Animais saudáveis, das raças Gir e Girolando 1/2 apresentaram maior similaridade entre si, enquanto que animais acometidos com mastite subclínica das raças Holandês e Gir foram mais semelhantes. Nossos dados apontam que uma baixa porcentagem de OTUs (2,53%) foi compartilhada por todas as raças, sendo a grande maioria delas únicas de cada raça. Essa tendência também foi observada por Bhatt e col. (2012) que mostraram que o compartilhamento de espécies, a partir de dados de metagenômica, foi de 12% dos organismos identificados entre os animais da raça Guzerá, Gir e cruzados. Os autores identificaram uma semelhança maior entre os animais zebuínos (Gir e Guzerá) do que entre os zebuínos e os cruzados. Esse dado é diferente do encontrado neste presente

trabalho. Uma explicação plausível está relacionada ao efeito ambiental, pois animais da raça Guzerá e Gir viviam em uma mesma fazenda e diferente da fazenda de animais cruzados no estudo indiano, enquanto que a amostragem realizada neste trabalho envolveu cinco fazendas.

Animais das raças Gir e Girolando 1/2 residentes em fazendas diferentes (A e B para a raça Gir e A, B e C para Girolando 1/2) tiveram seu *pool* de amostras sequenciado em separado para uma possível especulação sobre os efeitos genéticos e ambientais na variação da composição da microbiota da glândula mamária. As análises de dissimilaridade e de sobreposição de OTUs apontam que a raça Girolando 1/2 sofreu intenso efeito do ambiente das fazendas. Além disso, animais Gir e Girolando 1/2 residentes na Fazenda B apresentaram microbiota mais semelhante entre si, similar a dos animais da raça Gir da Fazenda A. Esse fato faz todo sentido, visto que na Fazenda B animais da raça Gir e Girolando vivem juntos convivendo nos mesmos espaços da fazenda e são submetidos aos mesmos procedimentos de ordenha. Portanto nesta propriedade as duas raças são submetidas a exposição dos mesmos agentes ambientais. Por outro lado, na Fazenda A animais da raça Gir são submetidos a ordenha manual e com bezerro ao pé e vivem em regiões fisicamente separadas das lotações ocupadas por animais Girolando 1/2, que nesta fazenda são submetidos a ordenha manual sem a presença do bezerro.

Um dado surpreendente foi a observação que, no dendrograma de animais saudáveis, um *cluster* é formado entre amostras de animais da raça Guzerá, Gir (Fazenda A e B) e Girolando 1/2 da Fazenda B, todos estes submetidos a presença do bezerro ao pé da vaca durante a ordenha. A permanência do bezerro ao pé da vaca após a ordenha favorece o esvaziamento da glândula mamária (OLIVEIRA et al., 2011) o que pode ter um efeito importante e homogeneizador sobre a composição da microbiota deste nicho. Além disso, animais que vivem na mesma fazenda podem apresentar um elevado grau de compartilhamento de micro-organismos na glândula mamária, pois estão sujeitos as mesmas vias de contaminação relacionadas com o maquinário de ordenha, mão dos ordenhadores os e instrumentos usados em múltiplos animais (BHATT et al., 2012), como de fato foi observado na Fazenda B.

A microbiota residente em animais da Fazenda C é a mais divergente de toda a amostra deste estudo. De fato, a Fazenda C se localiza em um microclima diferente

das demais (sul de Minas) o que pode explicar, em parte, a variação na composição da microbiota da glândula mamária observada nesta fazenda. Um resultado similar a este foi reportado por Delbès e col. (2007), onde uma das fazendas apresentou discrepância da composição da microbiota em relação às outras avaliadas. A combinação de fatores climáticos, de manejo e de composição genética dos rebanhos influencia a carga microbiana e a composição microbiológica do leite produzido (CHYE et al., 2004; LAFARGE et al., 2004), refletindo alterações na microbiota residente na glândula mamária. Porém, para avaliar a verdadeira magnitude dos efeitos genéticos e ambientais, o sequenciamento individual de uma amostra pareada maior entre animais geneticamente similares e diferentes em várias propriedades regionalmente distintas é necessário. No presente estudo, apenas uma especulação de que o efeito ambiental é mais forte que o genético sobre a composição da microbiota da glândula mamária pode ser apontado.

Além da CCS, a carga microbiana é uma importante característica de qualidade e da capacidade tecnológica do leite. Atualmente, a legislação brasileira preconiza que o leite, de boa qualidade para processamento industrial, deve apresentar CBT inferiores à 600 mil UFC/mL em amostras obtidas em tanques de expansão nas propriedades rurais (MAPA, 2011). As contagens bacterianas em ágar MRS variaram de 0 a 4,75  $\log_{10}$  UFC/mL de leite, sendo que dos 115 animais amostrados, 14 (12,17%) não apresentaram crescimento de nenhuma colônia em nenhuma das diluições feitas. De maneira semelhante, as contagens bacterianas totais em MRS a partir de amostras de leite cru variaram de 3,4 até 6,2  $\log_{10}$  UFC/mL em amostras coletadas na Itália (FRANCIOSI et al., 2009). Em outro estudo, utilizando vacas da raça Holandês, 33 das 51 vacas amostradas apresentaram crescimento no isolamento em placas de ágar MRS com contagens variando de 3,61 até 3,74  $\log_{10}$  UFC/mL (ESPECHE et al., 2012). A contagem bacteriana total das amostras de 4 diferentes fazendas localizadas na Alemanha e Áustria variou de 3,6 a 4,8  $\log_{10}$  UFC/mL, mas não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as fazendas localizadas nos diferentes países (FRICKER et al., 2011).

A enumeração bacteriana em MRS apresentou contagens estatisticamente ( $p < 0,05$ ) maiores na raça Gir em relação às contagens observadas na raça Guzerá, para as amostras de leite cru. Essa diferença está diretamente relacionada às

diferenças de CCS e CBT entre as duas raças que, mesmo não sendo estatisticamente significativas ( $p>0,05$ ), apontam maior carga microbiana e maior CCS nos animais da raça Gir em comparação com os animais Guzerá. De fato, a média de CCS para animais da raça Gir é reportada na literatura com valor de 281.870 cel/mL (ALMEIDA et al., 2013) maior que a reportada para a raça Guzerá (164.000 cel/mL) (PEIXOTO et al., 2008). Provavelmente, a enumeração bacteriana por plaqueamento é um método mais preciso para a caracterização da carga microbiana, uma vez que por ele avaliamos a quantidade de bactérias viáveis presentes na amostra, enquanto que a CBT foi realizada em equipamento de contagem eletrônico fluoro-ótico em citometria de fluxo, que não distingue células viáveis de não viáveis.

Entre as contagens obtidas a partir das amostras de leite houve um efeito estatisticamente significativo do estado de saúde do úbere sobre as contagens bacterianas em MRS, sendo que a presença do quadro infeccioso foi associada ao aumento dessas contagens ( $p=0,0135$ ). Esse achado corrobora a correlação estatisticamente positiva entre CCS e CBT, descrita na literatura (COLLA, 2009; ALBERTON et al., 2012). Entretanto, Lima e col. (2006) não encontraram variação significativa na enumeração bacteriana em diferentes intervalos de CCS e, destacaram não haver, necessariamente, uma relação entre CCS e CBT no leite. Provavelmente, essa diferença pode estar associada a variações metodológicas, estado fisiológico ou fase da lactação do animal, ou diferenças amostrais entre os estudos. Embora, o meio MRS seja utilizado para isolamento de BAL, as contagens bacterianas obtidas neste meio não foram nomeadas neste trabalho como contagens de BAL, como descrito por outros autores (OUADGHIRI et al., 2008; ESPECHE et al., 2012). Uma vez que outras bactérias tem a capacidade de fermentar os carboidratos presentes na formulação do meio MRS, nem todas as bactérias que conseguem crescer nesse meio são obrigatoriamente BAL (DE MAN et al., 1960).

Nos últimos anos, o leite cru vem sendo considerado como uma fonte contínua de bactérias comensais, mutualísticas e probióticas para o intestino dos lactentes de diferentes espécies, incluindo estafilococos, estreptococos, bifidobactérias e BAL (REVIREGO et al., 2005). A relevância tecnológica de bactérias presentes no leite, por exemplo as BAL, é amplamente reconhecida pois elas são fundamentais para a produção de queijos e outros produtos derivados do leite (COPPOLA et al., 2008).

Diante das pressões, em nível internacional, para redução do uso, terapêutico e preventivo, de antimicrobianos na produção de alimentos, abordagens alternativas ao uso dos antibióticos vêm sendo pesquisadas na tentativa de aumentar a resistência da glândula mamária bovina e reduzir o uso destes antimicrobianos na produção de leite. Diante desta conjuntura, as BAL são possíveis candidatas a probióticos para a glândula mamária uma vez que muitos dos seus representantes possuem status GRAS (*Generally Recognized As Safe*), o que significa que o uso desses microorganismos em animais é seguro e sem risco aparente (ESPECHE et al., 2009). Além disso, linhagens probióticas para uso em bovinos devem ser preferencialmente de origem bovina. Acredita-se que alguns membros da microbiota indígena apresentam especificidade para colonizar hospedeiros específicos (ZOETENDAL et al., 2006). Portanto, o isolamento de probióticos deve ser realizado no mesmo nicho ecológico ao qual o produto deverá ser potencialmente aplicado (OTERO et al., 2006). Logo, graças ao fato de as BAL serem membros da microbiota indígena do canal do teto de bovinos essas bactérias são ótimas candidatas para a prospecção de linhagens probióticas para prevenção de mastite bovina (ESPECHE et al., 2009; GIANNINO et al., 2009), sendo este um dos principais objetivos deste trabalho.

Durante o isolamento foram selecionadas bactérias que apresentavam características típicas de BAL (Gram-positiva, catalase-negativa e com morfologia do tipo coco, cocobacilo ou bastonete). Ao total, 314 isolados foram obtidos, dos quais 14,3% apresentaram morfologia de cocobacilo, 15,4% de bastonete e os 70,3% restantes de cocos. Portanto, os isolados de BAL da glândula mamária foram dominados por cocos. Do ponto de vista da morfologia bacteriana, a dominância no leite de cocos sobre bastonetes é bem documentada na literatura (WOUTER et al., 2002; FRANCIOSI et al., 2009). A proporção de morfotipos aqui encontrada foi semelhante ao isolamento de BAL a partir de amostras de leite de vaca, ovelha, cabra, camela e búfala realizado na Índia que obteve um total de 88 isolados em meio MRS e M17 do qual 64% eram cocos e 36% eram bastonetes (SHARMA et al., 2013). Outro estudo realizado em regiões montanhosas no norte do Irã obteve 164 colônias aleatoriamente selecionadas a partir do isolamento em meio M17 e MRS. Destas, 62 eram Gram-positivas e catalase-negativas e foram consideradas BAL, das quais 76% eram cocos e 24% eram bastonetes (FORGHANI et al., 2012). Outro estudo isolou BAL de animais do norte da Argentina e encontrou 56% dos isolados com morfologia



de cocobacilo, 36% com morfologia de cocos e os 8% restantes com morfologia de bastonetes (ESPECHE et al., 2009).

Na tentativa de reduzir o número de linhagens bacterianas a serem submetidas aos procedimentos moleculares de identificação taxonômica, o DNA extraído dos isolados foi submetido a *fingerprinting* rep-PCR (GTG)<sub>5</sub> para selecionar diferentes linhagens a serem identificadas. Descartamos 122 (39%) isolados que representavam uma replicata de um outro isolado obtido no mesmo animal, o qual foi mantido no estudo. Em alguns casos, diferenças no comportamento de crescimento e atividade proteolítica são encontradas entre linhagens que apresentaram o mesmo perfil de *fingerprinting* rep-PCR, sugerindo que isolados molecularmente semelhantes podem não ser exatamente da mesma linhagem. Dados de isolados de BAL obtidos de cães mostram que espécies de *Lactobacillus reuteri* com o mesmo padrão de rep-PCR *fingerprinting* apresentaram comportamento fisiológico diferente em testes *in vitro* para avaliação do potencial probiótico (SILVA et al., 2013). Essa mesma abordagem foi usada em um estudo que isolou BAL a partir de amostras de leite na França (BOUCHARD et al., 2015). Diante destes fatos, alguns autores sugerem a necessidade de utilização de múltiplos iniciadores de RAPD-PCR para uma genotipagem mais acurada, a fim de identificar diferenças em nível de linhagem entre isolados bacterianos (ERCOLINI et al., 2009) e assegurar que isolados com diferentes perfis moleculares também apresentam distintas características fenotípicas, justificando sua caracterização como linhagens bacterianas diferentes.

Entre os 192 isolados selecionados para a etapa de identificação molecular, foram identificadas 30 espécies de BAL com a seguinte abundância relativa: *W. paramesenteroides* (7,8%), *W. confusa* (1,6%), *W. cibaria* (1%), *S. lutetiensis* (7,8%), *S. bovis* (1%), *S. salivarius* (1%), *S. infantarius* (1%), *S. henryi* (0,5%), *S. gallolyticus* (0,5%), *S. equinus* (0,5%), *S. pseudoporcinus* (0,5%), *S. parasanguinis* (0,5%), *P. pentosaceus* (36,1%), *P. stilesii* (0,5%), *L. lactis* (8,5%), *L. garvieae* (6,8%), *L. plantarum* (3%), *L. pentosus* (0,5%), *L. mucosae* (0,5%), *L. brevis* (0,5%), *L. paracasei* (0,5%), *E. hirae* (12,2%), *E. camelliae* (1,6%), *E. casseliflavus/gallinarum* (1,6%), *E. faecalis* (1%), *E. italicus* (1%), *E. saccharolyticus* (0,5%), *E. faecium* (0,5%), *E. pseudoavium* (0,5%), *E. durans* (0,5%). De maneira geral, o perfil de BAL isoladas neste trabalho está de acordo com aquele reportado na literatura para amostras de

leite bovino. A maioria das linhagens isoladas a partir de leite cru, de vacas do norte da Argentina, pertencia às espécies de *S. bovis* (38,1%), *W. paramesenteroides* (14,3%) e *Lactococcus lactis* (9,5%). Neste mesmo estudo, foram obtidos, em menores quantidades, isolados de *E. hirae*, *E. mundtii*, *E. saccharominimus*, *Lactobacillus brevis*, *E. faecium*, *E. saccharolyticus*, *L. mucosae*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *S. agalactiae* and *Lactococcus garvieae* (ESPECHE et al., 2009). Num outro trabalho, foram isoladas BAL a partir de leite de vacas da raça Holandês da Argentina e mostrou a ocorrência de apenas 4 espécies: *E. hirae* (45,0%), *P. pentosaceus* (35,0%), *W. cibaria* (17,5%) e *E. faecium* (2,5%) (ESPECHE et al., 2012).

A avaliação da composição microbiana do leite de vacas do Marrocos obteve 146 isolados que, após seleção de diferentes linhagens por rep-PCR (GTG)<sub>5</sub>, foram identificados como pertencentes a 19 espécies: *L. lactis* (24,5%), *L. pseudomesenteroides* (22,4%), *L. plantarum* (12,6%), *L. mesenteroides* (11,9%), *E. faecium* (7,7%), *L. garvieae* (4,2%), *W. cibaria* (4,2%), *L. paracasei* (2,1%), *E. hirae* (2,1%), *E. gilvus* (2,1%), *E. durans* (1,4%), *W. viridescens* (1,4%), *L. kimchii* (1,4%), *L. brevis* (0,7%), *Leuconostoc citreum* (0,7%), *P. pentosaceus* (0,7%), *W. confusa* (0,7%), *W. paramesenteroides* (0,7%), e *Lactobacillus rhamnosus* (0,7%) (OUADGHIRI et al., 2008). Ao analisar a composição da microbiota do leite de vacas italianas, Franciosi e col. (2009) obtiveram 370 isolados, dos quais 124 apresentaram diferentes perfis de RAPD-PCR e, portanto, foram considerados de diferentes linhagens. Espécies como *E. durans*; *E. faecalis*, *L. lactis*, *L. garvieae*, *L. plantarum*, *L. paracasei*, *P. pentosaceus* e *S. bovis* isolados neste trabalho, também foram encontrados nas amostras de animais da Itália (FRANCIOSI et al., 2009). Outro estudo conduzido com amostras de leite originadas do norte do Irã identificou *Pediococcus acidilactici*; *W. paramesenteroides*; *E. faecalis*; *L. lactis*; *S. infantarius*; *Leuconostoc argentinum*; *L. brevis*; *P. pentosaceus*; *L. rhamnosus* e *L. plantarum* (FORGHANI et al., 2012). Portanto, muitas das espécies de BAL isoladas da glândula mamária bovina nos estudos em diferentes regiões do mundo foram também obtidas neste presente estudo, reforçando que tais espécies são membros indígenas da microbiota da glândula e não apenas frutos de contaminação ambiental.

Diferente de outros trabalhos, não foram isolados representantes do gênero *Leuconostoc* no nosso estudo. Este gênero de BAL é constituído de 23 espécies e 4

subespécies (QUIGLEY et al., 2013). Duas espécies, *L. mesenteroides* e *L. pseudomesenteroides* são comumente encontradas em leite coletado em tanques de expansão. Tem sido sugerido que a sua presença no leite esteja associada à introdução dessas bactérias durante a ordenha ou durante o processo de armazenamento do leite. Esse fato está relacionado à habilidade de *Leuconostoc* spp. sobreviver em superfícies, ferramentas e pasteurizadores por longos períodos de tempo e de resistir a tratamentos de aumento e redução de temperatura (HEMME & FOUCANUD-SCHEUNEMANN, 2004). Portanto, como *Leuconostoc* spp. está frequentemente associado com material vegetal, pode ser que este gênero não seja um habitante natural da microbiota da glândula mamária, mas presente no leite como fruto de contaminação ambiental. Portanto, a ausência de representantes de *Leuconostoc* entre os isolados aqui obtidos pode estar associada ao tipo de amostra biológica utilizada, pois não foram coletadas amostras de tanque neste estudo (foram coletadas apenas amostras de leite individual). A ausência desse gênero em nosso isolamento também pode estar relacionada a sua inabilidade de competir com outras BAL misturadas no ambiente mamário (TOGO et al., 2002). De fato, os dados de microbioma gerados neste trabalho confirmam os achados do isolamento, visto que *Leuconostoc* foi o gênero de BAL menos abundante em todas as mostras sequenciadas (< 0,5% de abundância relativa), exceto em animais Gir da Fazenda B, reforçando a hipótese de que estes micro-organismos, quando presentes na glândula mamária, são oriundos do ambiente.

O gênero *Streptococcus* consiste de 97 espécies e 17 subespécies (QUIGLEY et al., 2013). Apesar de muitas espécies de estreptococos serem patogênicas, *S. thermophilus* carrega o status GRAS (FACKLAM, 2002), sendo frequentemente isolado de leite cru ou de queijos artesanais, bem como detectado no teto de vacas, estábulos e máquinas de ordenha (BRAEM et al., 2012). Seu uso seguro é amplamente conhecido, já que *S. thermophilus* é usado como cultura iniciadora de muitos iogurtes e leites fermentados em todo o mundo. Entretanto, muitas espécies do gênero *Streptococcus* estão associadas ao desenvolvimento de mastite. *S. uberis*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* e *S. bovis* estão entre os principais representantes deste gênero associados a casos de inflamação da glândula mamária. Os dados de microbioma da glândula mamária gerados neste trabalho apontam que exceto na raça Guzerá a abundância relativa (em comparação ao total de BAL presentes em cada

amostra) de *Streptococcus* aumentou em animais com mastite subclínica em comparação com animais saudáveis. Provavelmente, espécies patogênicas de estreptococos contribuem para a disbiose associada ao processo inflamatório envolvido nesta patologia e podem contribuir para a evolução deste quadro. Além disso, a presença desses micro-organismos prejudica a qualidade do leite e dos subsequentes produtos lácteos (BARBANO et al., 2006).

Porém, outras espécies de estreptococos não estão associadas a casos de patologias em humanos e animais. *S. macedonius* tem sido isolado de queijos artesanais e tem apresentado algumas características interessantes para a indústria de laticínios (PACINI et al., 2006). *S. infantarius*, comumente isolado de leite cru de bovinos apresenta 91% de homologia com o genoma de *S. thermophilus* e ausência de fatores de virulência clássicos de estreptococos (JANS et al., 2013) apresentando, por isso, potencial de uso seguro em humanos e animais. Estreptococos do grupo viridans tais como *S. salivarius*, *S. sanguinis* e *S. parasanguis* são comumente isolados da boca de lactentes (MARTÍN et al., 2007b) e também do leite materno de humanos (MARTÍN et al., 2004; 2007). Estafilococos e estreptococos comensais podem ser úteis na redução da aquisição de patógenos indesejáveis por lactentes (UEHARA et al., 2001). A presença de estreptococos é uma típica característica de intestinos de crianças humanas lactentes saudáveis (JIMÉNEZ et al., 2008) enquanto eles são raros ou ausentes em intestinos de lactentes atópicos (KIRJAVAINEN et al., 2001).

*Enterococcus* spp. ocupam uma ampla gama de nichos ecológicos que incluem o trato gastrointestinal de humanos e animais (GIRAFFA, 2002) e, dependendo da linhagem em questão, podem ser considerados cultura iniciadora, probiótico, deteriorador de alimentos e patógeno (BHARDWAJ et al., 2009). Entre as espécies de *Enterococcus* geralmente isoladas de leite e derivados se encontram *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. italicus*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. mundtii* e *E. durans*, quase todas elas isoladas neste trabalho, com representatividade variada entre as raças e fazendas amostradas. Os dados do microbioma da glândula mamária, gerados neste trabalho, apontam que a abundância relativa (em comparação ao total de BAL) de enterococos aumentou em animais com mastite subclínica da raça Gir (residentes nas Fazendas A e B) e também em animais Girolando 1/2 residentes na Fazenda A, em comparação

aos animais saudáveis. De fato, alguns trabalhos mostram que espécies de *Enterococcus* estão relacionadas a quadros de mastite subclínica em ruminantes (DEVRIESE et al., 1999; TENHAGEN et al., 2006) entretanto, sua associação ao desenvolvimento do processo inflamatório no úbere ainda não é claramente conhecida (ROSSITTO et al., 2002; PITKÄLÄ et al., 2004).

Tem sido descrito que os enterococos desempenham importante função na fermentação de produtos derivados do leite contribuindo para sua maturação, sabor e aroma (FOULQUIÉ MORENO et al., 2006). A presença de enterococos no leite cru deve ser analisada com cautela, pois os enterococos podem carregar fatores de virulência e genes relacionados à resistência a antibióticos (FRANZ et al., 1999). Entretanto, linhagens de *E. faecium*, isoladas de leite materno de mulheres saudáveis, são desprovidas de fatores de virulência, em nível genético e fenotípico (REVIRIEGO et al., 2005). Estudos de genoma comparativo mostram que isolados de *E. faecalis* não apresentam um grande número de genes que estão presentes em isolados clínicos. Esses genes estão relacionados às proteínas de adesão e profágos, os quais contribuem para a invasão e estabelecimento de infecções (LEPAGE et al., 2006). Diante dessas descobertas, o uso de enterococos como probióticos ainda permanece um assunto controverso (GAGGIÀ et al., 2010).

O gênero *Lactococcus* consiste de sete espécies, duas subespécies e um biovar (QUIGLEY et al., 2013), sendo que *L. lactis* ssp. *lactis* e *L. lactis* spp. *cremoris* são dominantes na microbiota do leite cru, de queijos e de outros produtos de leite não cozidos. Na produção de queijos, lactococos tem importante papel na acidificação através da produção de L-lactato e também atua na proteólise e conversão de aminoácidos em compostos aromáticos como álcoois, aldeídos e cetonas (SMIT et al., 2005). A ausência de genes relacionados a fatores de virulência nos genomas sequenciados de *L. lactis* contribui para reafirmar o status GRAS conquistado pelos longos anos de uso seguro, dessas bactérias, na produção de alimentos (WEGMANN et al., 2007). *Lactococcus* produtores de nisina foram encontrados em 30% das amostras de leite maternos obtidas em mulheres na Finlândia (BEASLEY & SARIS, 2004) e, graças a esta característica, mostraram potencial uso como agentes bioterapêuticos para prevenção de doenças infecciosas causadas por *S. aureus*

(HEIKKILÄ & SARIS, 2003). Em nosso trabalho, tanto *L. lactis* quanto *L. garvieae* foram isolados nas diferentes raças e fazendas.

Nos dados de microbioma gerados neste trabalho chama muita atenção a alta abundância relativa de *Lactococcus* em animais da raça Holandês, nos quais essas bactérias representam o terceiro gênero mais abundantes em animais saudáveis e o primeiro em animais com mastite subclínica. Esse achado é confirmado pelo isolamento de BAL, pois isolados deste gênero foram os mais comuns entre os recuperados na raça holandesa, representando mais de 60% do total de BAL isoladas nestes animais. Além disso, *L. garvieae* foi a bactéria mais isolada em animais da raça Holandês. *L. garvieae* (previamente nomeado *Streptococcus garvieae* em 1983) foi originalmente descrito como um micro-organismo isolado a partir de um animal com mastite bovina (TEIXEIRA et al., 1996). Diferentes trabalhos reportam a associação desta bactéria com o desenvolvimento de mastite (COLLINS et al., 1983; DEVRIESE et al., 1999; TENHAGEN et al., 2006). Ademais, este micro-organismo é reconhecido como um patógeno de peixe (VENDRELL et al., 2006) e tem sido detectado em leite cru e também algumas vezes misturado a culturas iniciadoras de queijos artesanais (FOSCHINO et al., 2008). Portanto, dados do isolamento e de microbioma apontam para um papel importante de *Lactococcus*, e principalmente de *L. garvieae*, na etiologia do quadro de mastite subclínica, e possivelmente clínica, em animais da raça Holandês residentes na Fazenda E.

O gênero *Lactobacillus* é muito diverso sendo formado por 174 espécies e 27 subespécies (QUIGLEY et al., 2013). A presença de atividade proteolítica e sua habilidade de secretar compostos geradores de aroma, bem como a produção de exopolissacarídeos podem contribuir para a qualidade e valor nutricional de produtos fermentados por essas BAL (LEROY & DE VUYST, 2004). Entre as espécies de *Lactobacillus* comumente isoladas de leite de vaca cru se destacam: *L. casei*; *L. curvatus*; *L. mindensis*; *L. animalis*; *L. coryneformis*; *L. curvatus*; *L. delbrueckii*; *L. johnsonii*; *L. paracasei*; *L. paraplantarum*; *L. plantarum*; *L. rhamnosus*; *L. amylovorus*; *L. pentosus*; *L. acidophilus*; *L. fermentum*; *L. sakei*; *L. brevis* e *L. mucosae* (QUIGLEY et al., 2013). A composição de lactobacilos de leite cru parece ser específica de cada hospedeiro e usualmente inclui um baixo número de espécies e linhagens (MARTÍN et al., 2004). De fato, em nosso trabalho, não foram detectadas muitas espécies de

*Lactobacillus* (*L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. mucosae*, *L. pentosus* e *L. brevis*), sendo que nenhum isolado deste gênero foi encontrado em amostras recolhidas na Fazenda A. Por outro lado, os dados de microbioma apontam uma maior abundância relativa (entre as BAL) de *Lactobacillus* entre os animais da raça Guzerá.

Membros do gênero *Weissella* têm sido isolados de vegetais, cana-de-açúcar e amostras de carne, bem como de amostras clínicas de humanos e animais (BJÖRKROTH et al., 2002). Mathara e col. (2004) reportaram que espécies de *Weissella* foram ocasionalmente encontradas no leite cru, mas seu potencial papel tecnológico na fermentação do leite não foi descrito. Espécies de *Weissella* foram isoladas de leite cru de vacas do Marrocos, mas os autores as classificaram como contaminantes ambientais (OUADGHIRI et al., 2008). Diante de outros achados (MARTÍN et al., 2007b; ESPECHE et al., 2012) e dos resultados aqui expostos, nos quais foram identificadas diferentes espécies de *Weissella* em coleta de leite individual e em *swab* intramamário de diferentes fazendas e raças amostradas, pode-se inferir que as espécies de *Weissella* não sejam, de fato, contaminantes ambientais, mas sim membros da microbiota indígena da glândula mamária. Essa teoria é suportada por recentes achados nos quais *W. hellenica* foi identificada em amostras de leite por técnicas de sequenciamento de nova geração (QUIGLEY et al., 2013).

De fato, os dados gerados neste trabalho pelo microbioma da glândula mamária bovina apontam que *Weissella* está presente em todas as raças amostradas, sendo este gênero representado entre os 10 mais abundantes em animais da raça Girolando 1/2 residentes na Fazenda A e Gir residentes na Fazenda B e são as BAL mais abundantes em animais Girolando 1/2 da Fazenda B. Além disso, exceto na raça Guzerá, a abundância relativa (em comparação ao total de BAL) de *Weissella* é menor em animais com mastite subclínica com relação a sua abundância encontrada em animais saudáveis. Essa tendência aponta para um possível efeito benéfico destes micro-organismos para a manutenção de um úbere saudável, como de fato este trabalho sugere em suas conclusões.

Pediococos são BAL comumente associadas à superfície de vegetais, principalmente forrageiras como o milho e cana-de-açúcar. Durante o processo de ensilagem, elas são geralmente incorporadas ao material vegetal ensilado e podem influenciar no processo de fermentação da silagem (CAI et al., 1999). Portanto,

espécies do gênero *Pediococcus* são consideradas membros dominantes da microbiota da silagem de forrageiras, atuando na melhora da qualidade nutricional desde alimento através da fermentação de carboidratos. As espécies comumente associadas à fermentação de silagens são *P. pentosaceus* e *P. acidilactici*. Alguns estudos vêm reportando o isolamento de espécies de *Pediococcus* a partir de amostras de leite e derivados (FRANCIOSI et al., 2009; POGACIC et al., 2013).

Em nosso trabalho, 69 isolados obtidos foram identificados como *P. pentosaceus*, sendo esta a espécie mais abundante entre todos os isolados recuperados. Entretanto, 98,5% dos isolados de *P. pentosaceus* foram originados na Fazenda B, sendo todos eles obtidos de amostras de *swab*. Considerando a tendência do *swab* em permitir o isolamento de membros da microbiota do canal do teto e, considerando que na Fazenda B era utilizada silagem de milho e de cana-de-açúcar, pode-se especular que os isolados de *P. pentosaceus*, obtidos nesta fazenda, representem uma contaminação do úbere da vaca com micro-organismos presentes na silagem. Essa teoria ainda é melhor suportada pelo fato de que os 69 isolados de *P. pentosaceus* obtidos nesta fazenda são, na verdade, isolados repetidos de apenas 4 linhagens bacterianas. Um isolado identificado como *P. stilesii* foi recuperado a partir de leite de vacas da raça Holandês, sendo essa espécie também associada a grãos de milho (FRANZ et al., 2006), podendo também representar um contaminante da microbiota da silagem de milho (também usada como alimento na Fazenda E, na qual o isolado foi obtido) presente na glândula mamária. Os dados de microbioma da glândula mamária gerados neste trabalho reforçam essa teoria, uma vez que foi encontrada abundância relativa baixa de *Pediococcus*, com relação ao total de BAL, em animais originados da Fazenda B de ambas as raças (Gir: 4% e Girolando 1/2: 0,1%).

Este é o primeiro trabalho científico que compara o perfil de BAL presentes na microbiota da glândula mamária de animais saudáveis com aquele obtido a partir de animais acometidos com mastite subclínica, pelas abordagens dependentes e independentes de cultivo. Através da abordagem de análise de microbioma, em todas as raças avaliadas, a abundância relativa de BAL em animais com mastite subclínica foi menor do que a existente em animais saudáveis, com exceção da raça Holandês. Vale destacar que, provavelmente, *L. garvieae*, uma BAL patogênica e causadora de



mastite, está envolvida na etiologia da mastite subclínica na Fazenda E, na qual os animais da raça Holandês foram coletados. Foi também observada uma redução de diversidade nas BAL recuperadas, por isolamento, em animais com mastite subclínica. Essa redução foi ainda mais acentuada em animais com CCS > 500.000 cel/mL. É provável que a baixa diversidade de micro-organismos isolados em animais com CCS > 500.000 cel/mL, bem como redução da abundância relativa de BAL em animais com mastite subclínica, estejam associadas aos efeitos da resposta imunológica no combate de possíveis patógenos invasores, o que acaba por desequilibrar a composição da microbiota indígena da glândula mamária. Essas mudanças na composição da microbiota indígena da glândula podem estar diretamente relacionadas com a qualidade do leite, uma vez que CCS > 400.000 cel/mL caracterizam o leite como impróprio para o consumo humano de acordo com a legislação brasileira (SARGEANT et al., 1998; Instrução Normativa 62/2011 MAPA).

Algumas patologias são relacionadas com mudanças na composição da microbiota associada a um determinado nicho do hospedeiro. Em humanos, por exemplo, a obesidade vem sendo relacionada com redução da abundância de bifidobactérias no trato gastrointestinal, enquanto a alergia está diretamente relacionada a redução das populações de lactobacilos (GALLEGO & SALMINEN, 2016). Como BAL são sabidamente reconhecidas como micro-organismos GRAS e QPS (EFSA, 2007), a sua maior abundância relativa na glândula mamária de animais saudáveis reforça a hipótese que elas também podem conferir efeitos benéficos neste nicho, reafirmando seu potencial uso como probióticos neste ecossistema, o qual foi explorado neste trabalho.

O perfil de diversidade de BAL apresentou variações de acordo com a raça e a fazenda de origem dos animais. Alguns gêneros, por exemplo, não foram isolados em algumas fazendas e ou raças. É documentada na literatura que existe uma predileção de BAL por distintos e específicos nichos presentes no leite de cada uma das raças, provavelmente relacionados à variação na composição química do leite (AZIZ et al., 2009). A composição da microbiota do leite cru é variável de acordo com a estação (PSONI et al., 2003) e origem geográfica (FOSCHINO et al., 2002; POZNANSKI et al. 2004) sendo também influenciada por fatores relacionados ao manejo dos animais (ERCOLINI et al., 2009). Portanto, BAL predominam de forma universal no leite cru

da maioria dos mamíferos e variações na diversidade de BAL são primariamente relacionadas a variações geográficas, ambientais, genéticas e de composição do leite entre as diferentes raças amostradas (AZIZ et al., 2009).

Variações na composição de BAL também foram detectadas entre animais de fazendas diferentes. Interessantemente, animais de raças diferentes (Gir e Girolando 1/2) apresentaram maior similaridade de BAL entre si quando viviam em uma mesma fazenda, do que com animais da mesma raça que viviam em fazendas distintas (Fazenda A e B). De fato, os dados do microbioma da glândula mamária mostraram uma maior similaridade entre as microbiotas de animais Gir e Girolando 1/2 da Fazenda B entre si do que com os animais destas raças residentes em outras propriedades. Dois estudos compararam o isolamento de BAL na Argentina e mostram que amostras obtidas na região noroeste apresentaram diversidade maior (15 espécies) que amostras obtidas no sudeste do país (4 espécies). Além disso, alguns gêneros, como *Streptococcus*, *Lactococcus* e *Lactobacillus*, que são predominantes no leite bovino em todo o mundo (LAFARGE et al., 2004; KUANG et al., 2009) não foram isoladas de amostras oriundas do sudeste da Argentina (ESPECHE et al., 2009; 2012). Esses resultados, juntamente com nossos achados, sugerem que a biodiversidade de BAL, associadas à glândula mamária, apresenta diferenças entre distintas regiões geográficas (ESPECHE et al., 2012). Entretanto, um estudo avaliando a diversidade de BAL no leite de fazendas localizadas em diferentes países europeus reportou que não houve influência significativa da origem geográfica das amostras na composição microbiológica do leite (FRICKER et al., 2011).

Um achado interessante deste trabalho foi que o perfil de BAL observado no isolamento em cada raça ou fazenda foi diferente daquele observado no microbioma com exceção da raça Holandês, na qual a predominância de *Lactococcus* foi percebida em ambas as abordagens. Essa diferença de resultados entre abordagens dependentes e independentes de cultivo é recorrente na literatura. Amostras clínicas de leite de vacas com mastite, que eram negativas para testes de cultivo de micro-organismos, apresentaram uma ampla diversidade de bactérias quando foram analisadas por metodologias moleculares (OIKONOMOU et al., 2012; KUEHN et al., 2013). Metodologias dependentes de cultivo são limitadas pelas condições experimentais de crescimento bacteriano, visto que muitos micro-organismos

apresentam comportamento fastidioso. Na prática, mais de 60% dos organismos detectados utilizando técnicas moleculares não são capazes de crescer em meios de cultura e nas condições disponíveis nos laboratórios (HAN et al., 2009; D'ONOFRIO et al., 2010). Mesmo que o advento das metodologias independentes de cultivo tenha ampliado nosso conhecimento sobre as comunidades microbianas, muitas sequências geradas nos experimentos ainda não são classificadas, o que configura o principal gargalo desta abordagem (LATUGA et al., 2014). Além disso, a análise de microbioma usou, neste trabalho, aproximadamente 100X mais volume de amostra (100 mL) que aquele usado para o isolamento de BAL (1 mL). Essa diferença pode acabar por alterar a probabilidade de identificar determinadas bactérias, principalmente quando elas são raras. Como algumas BAL são membros menos prevalentes da microbiota da glândula mamária, o argumento da diferença de amostragem entre as duas metodologias (OIKONOMOU et al., 2012) pode ajudar a explicar os resultados divergentes entre as duas abordagens aqui empregadas.

À medida que os estudos avançam, fica cada vez mais evidente que os efeitos benéficos dos probióticos são específicos de cada linhagem, apontando para a necessidade do uso de vários sistemas de seleção com o intuito de identificar probióticos específicos para tratar determinadas desordens e sintomas (DELCENSERIE et al., 2008). O uso de probióticos na pecuária deve ser iniciado por estudos de seleção *in vitro* usando como critérios de seleção a determinação da atividade antimicrobiana, de estudos de caracterização da superfície celular e capacidade de adesão e de susceptibilidade a antibióticos (GAGGIÀ et al., 2010). Portanto, entre as 93 diferentes linhagens isoladas nesta tese, 82 foram selecionadas para a caracterização do seu potencial probiótico em testes *in vitro*, seguindo os seguintes critérios fisiológicos desejáveis: superfície celular hidrofóbica e autoagregativa, produção de peróxido de hidrogênio, produção de antagonismo contra patógenos associados à mastite, padrão intrínseco de resistência a antibióticos e tendência desejável à produção de EPS e de biofilme e ausência de fatores de virulência (SILVA et al., 2013).

Autoagregação é a capacidade de uma bactéria em formar agregados com bactérias da mesma linhagem em suspensão (ESPECHE et al., 2012). Aproximadamente metade dos isolados apresentou baixa autoagregação e apenas

18,29% dos isolados foram considerados de autoagregação alta. A mesma tendência foi observada para a hidrofobicidade da superfície celular. Não foi encontrada uma correlação significativa (coeficiente de Pearson=-0,1551;  $p=0,1642$ ) entre a hidrofobicidade e a autoagregação individual dos isolados, mesmo que ambas características tenham apresentado valores baixos. A maior parte dos isolados de leite (89,2%) apresenta baixo valor de autoagregação, enquanto somente 10,8% exibiram valores de autoagregação médios e nenhum isolado apresentou altos valores de autoagregação entre as BAL isoladas no norte da Argentina (ESPECHE et al., 2009). Semelhantes aos isolados avaliados nesta tese, Espeche e col. (2009) reportaram que a grande maioria das BAL isoladas de leite apresentava baixa hidrofobicidade, sendo a minoria aquelas que apresentam valores moderados (6,9%) e altos (7,8%) de adesão a solventes hidrofóbicos. Isolados de BAL de vacas holandesas apresentaram baixo grau de hidrofobicidade (ESPECHE et al., 2012). Contrastando com nossos achados, Espeche e col. (2012) mostraram que apenas isolados de *W. cibaria* e *E. hirae* apresentaram hidrofobicidade média ou alta ao avaliar as propriedades de superfícies de isolados de BAL de vacas holandesas na Argentina.

A co-agregação é a capacidade de bactérias em formar agregados com outras bactérias geneticamente diferentes em suspensão (EKMEKCI et al., 2009). Praticamente 80% dos isolados de BAL obtidos da glândula mamária bovina apresentam baixa capacidade de co-agregação com patógenos envolvidos na etiologia da mastite. *L. perolens* CRL 1724 e *L. plantarum* CRL 1716, isolados de vacas na Argentina, apresentaram alta co-agregação com vários patógenos causadores de mastite (FROLA et al., 2012). A capacidade de co-agregação dos isolados de BAL com *S. aureus* ATCC 2921 e *E. coli* ATCC 25723 segue a mesma tendência observada para a hidrofobicidade da superfície celular e para a capacidade de autoagregação. Correlações positivas e significativas ( $p<0,05$ ) foram encontradas entre a capacidade de co-agregação com *E. coli* e a capacidade de autoagregação e, também com a capacidade de co-agregação com *S. aureus*, enquanto que apenas foi significativa a correlação encontrada entre a co-agregação com *S. aureus* e a hidrofobicidade da superfície celular de BAL.

Muitos trabalhos relatam que a habilidade de co-agregação das BAL pode capacitá-las a formar uma barreira que impede a colonização do hospedeiro por

bactérias patogênicas (RENIERO et al., 1991; CHARTERIS et al., 1997). Além disso, a co-agregação com patógenos, quando associada à produção de substâncias antimicrobianas (tais como ácido lático, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas) resultaria na inibição do crescimento de patógenos (OCANA et al., 1999; YOUNES et al., 2012). Ademais, vem sendo relatado que *Lactobacillus* isolados de ambiente vaginal apresentam elevada capacidade de se co-agregar com uropatógenos e, que este fenômeno é fator importante para o estabelecimento e manutenção de uma microbiota urogenital saudável (REID et al., 1988). A correlação significativa entre capacidades de co-agregação, autoagregação e hidrofobicidade da superfície celular, encontradas neste trabalho, apontam para uma sobreposição de moléculas de superfície envolvidas nestas características.

A capacidade de adesão de BAL a superfície de mucosas pode envolver forças de ligação fraca, interações eletrostáticas, hidrofóbicas, ácidos lipoteicos e lectinas (SERVIN, 2004). A natureza hidrofóbica da superfície externa de micro-organismos facilita a adesão de bactérias ao epitélio do hospedeiro, além de conferir vantagem competitiva durante a colonização desse tipo de superfície (VINDEROLA & REINHERIMER, 2003). A hidrofobicidade está diretamente relacionada à habilidade das linhagens de aderir às superfícies apolares. Esta habilidade é determinada pela presença de componentes hidrofóbicos na membrana externa de micro-organismos. Espeche e col. (2012) reportaram, assim como nós encontramos, um baixo valor de coeficiente de Pearson (0,215) obtido da análise da relação das propriedades de superfície de BAL (hidrofobicidade e autoagregação), mostrando que essas características não apresentam correlação estatística. Entretanto, linhagens de BAL que possuem baixo grau de hidrofobicidade podem ainda ser autoagregativas hidrofílicas, pois podem possuir glicoproteínas ou peptídeos glicosilados em sua superfície (OTERO et al., 2006).

As propriedades da superfície celular de BAL parecem desempenhar um importante papel na sua capacidade de co-agregação com patógenos. A correlação significativa entre co-agregação de BAL - *S. aureus* com a hidrofobicidade da superfície celular de BAL parece indicar que moléculas hidrofóbicas são importantes na ligação de BAL com este patógeno (ESPECHE et al., 2012). Por outro lado, a correlação entre a co-agregação BAL - *E. coli* com autoagregação de BAL parece

sugerir que nessa co-agregação a presença de polissacarídeos, ácido lipoteicóico e outras substâncias hidrofílicas da superfície celular possuem importância (RENIERO et al., 1991). Curiosamente, a correlação entre a capacidade de co-agregação de BAL com os dois patógenos indica que mesmo envolvendo moléculas de natureza bioquímica diferente, algum nível significativo de sobreposição molecular deve existir. Portanto, características físico-químicas da superfície celular de BAL provavelmente determinam sua capacidade de autoagregação e co-agregação com patógenos (PEREZ et al., 1998). Consequentemente, parece que baixa autoagregação, co-agregação com patógenos e hidrofobicidade são características da superfície de micro-organismos típicos do leite. Além disso, essa mesma tendência foi reportada previamente para vários nichos bovinos, como o trato gastrointestinal, a mucosa vaginal e o próprio canal do teto (NADER-MACÍAS et al., 2008; RODRIGUEZ et al., 2011; BOUCHARD et al., 2015) e pode ser característica típica da microbiota relacionada aos ecossistemas biológicos de bovinos.

Colônias de BAL produtoras de exopolissacarídeos (EPS) apresentam aparência viscosa ao crescerem no meio modificado com excesso de sacarose. Dos 82 isolados testados neste trabalho, 17 foram positivos para a produção de EPS. Alguns estudos, demonstram que BAL isoladas do leite não apresentam produção de EPS em teste de triagem *in vitro* (FRANCIOSI et al., 2009; ESPECHE et al., 2012). Em um estudo de avaliação da produção de *slime*, um tipo de EPS produzido por *S. aureus*, foi observado que 11,42% dos isolados obtidos de leite eram produtores de EPS. Resultados semelhantes foram também reportados para *S. aureus* isolados de casos clínicos de mastite subclínica bovina (CITAK et al., 2003). As diferenças na porcentagem de isolados produtores de EPS entre os diferentes estudos documentados na literatura podem estar relacionadas a diferenças na metodologia de triagem. A metodologia mais comum para a avaliação da produção de EPS é o estriamento das bactérias a serem avaliadas em ágar modificado, com excesso de um determinado carboidrato. O carboidrato adicionado em excesso no meio será metabolizado pela bactéria avaliada e o produto deste metabolismo pode ou não gerar à produção de EPS pela bactéria em questão. Entretanto, diferentes porcentagens de suplementação (5 ou 8%) bem como diferentes carboidratos (sacarose, rafinose, lactose) são usados em diferentes estudos e, portanto, o comportamento das

bactérias nessas diferentes condições pode não ser o mesmo, resultando em achados distintos reportados na literatura.

A geração de EPS é considerada uma importante característica das BAL usadas em produtos lácteos, já que está relacionada à aparência e características organolépticas desejadas em produtos destinados ao consumo humano (PARENTE & COGAN, 2004). Além disso, a produção de EPS é um importante determinante na aderência de bactérias às células do hospedeiro ou superfícies inertes (MILANOV et al., 2010). Bactérias produtoras de EPS parecem possuir maior habilidade de colonizar tecidos do hospedeiro e de melhor se protegerem da opsonização e da fagocitose (ARLINA & ÖZKARDES, 2007). Portanto, não é de se espantar que a maior parte dos isolados produtores de EPS foi originada de amostras de *swab*, que a princípio recolheu bactérias que estavam aderidas sobre a mucosa do canal do teto.

Biofilme é definido como uma comunidade microbiana séssil caracterizada por células que estão irreversivelmente ligadas a um substrato, interface ou umas às outras, por uma matriz de substâncias extracelulares poliméricas que elas mesmas produziram (DONLAND & COSTERTON, 2002). As bactérias que formam biofilme apresentam uma resistência aumentada aos componentes do sistema imune do hospedeiro e aos agentes antimicrobianos (DUNNE, 2002). A formação de biofilme começa com a aderência das bactérias nas células do hospedeiro (MILANOV et al., 2010), portanto a avaliação da produção de biofilme é uma medida indireta da capacidade de adesão de BAL à superfície de mucosas. Entre os 82 isolados, sete foram classificados como fortes produtores de biofilme e metade de todos os isolados avaliados não demonstraram capacidade de produzir biofilme no ensaio utilizando placas de poliestireno. Esse é o primeiro trabalho reportado na literatura que avalia o potencial de produção de biofilme de BAL isoladas da glândula mamária. Milanov e col. (2010) reportaram que 13% de isolados de *S. aureus* de casos de mastite subclínica são fortes produtores de biofilme. Achados semelhantes foram documentados por Oliveria e col. (2006) que encontraram 18,75% de isolados clínicos de *S. aureus* sendo fortes produtores de biofilme. A formação de um biofilme protetor na mucosa da glândula mamária é uma das características desejáveis para um bom probiótico a ser usado no úbere para impedir a adesão e invasão do epitélio mamário por patógenos oportunistas (ESPECHE et al., 2009).

Um achado interessante deste trabalho foi que a maior parte das bactérias que apresentaram forte ou moderada capacidade de produção de biofilme eram originadas de leite, enquanto que a maioria das BAL não produtoras de biofilme era originada de *swab*. De maneira semelhante, isolados de *S. aureus* obtidos de leite de vaca produzem biofilme com maior frequência (41,4%) que aqueles obtidos dos tetos (24,7%), e estes últimos com maior frequência que aqueles isolados dos equipamentos de ordenha (14,7%) (FOX et al., 2005). Além disso, 53% dos isolados produtores de EPS não produziram biofilme e, ao mesmo tempo, entre as BAL que são fortes ou moderadas produtoras de biofilme, apenas 24% produziram EPS. Durante a formação do biofilme, o espaço intercelular dos agregados microbianos é preenchido por substâncias poliméricas extracelulares, como EPS, que formam a estrutura e arquitetura da matriz do biofilme (VU et al., 2009). Portanto, a produção de EPS deveria estar associada diretamente à produção de biofilme. Entretanto, essa tendência não foi verificada em nossos resultados. Na verdade, resultados positivos para a produção de EPS não necessariamente implicam que o isolado seja um grande produtor de biofilme, em teste utilizando placas de cultivo celular de poliestireno, conforme comprovado também pelas publicações de Vaseduvan e col. (2003); Oliveira e col. (2006) e Milanov e col. (2010).

A avaliação da produção de biofilme por métodos fenotípicos, como o teste utilizando placa de cultivo celular de poliestireno corada com cristal violeta, é altamente sensível às condições experimentais (STEPANOVIC et al., 2000). A suplementação do meio com diferentes tipos de açúcar e a presença de Tween-20, por exemplo, alteram a produção de biofilme significativamente (KNOBLOCH et al., 2002). Além disso, outros estudos apontam que a expressão de certos tipos de proteína na superfície de bactérias parece ter efeito extremamente significativo, e provavelmente mais importante que a produção de EPS, na formação de biofilme sobre superfícies inertes, como o poliestireno. Uma correlação extremamente forte foi encontrada entre a expressão da proteína ESP de *E. faecalis* e a produção de biofilme de isolados clínicos em ensaio utilizando placas de poliestireno (TOLEDO-ARANA et al., 2001). Da mesma maneira, a proteína de superfície BAP de *S. aureus* está diretamente relacionada à forte produção de biofilme (CUCARELLA et al., 2001).



A existência, em nossos dados, de correlação positiva significativa ( $p < 0,05$ ) entre a capacidade de produção de biofilme em placas de poliestireno e a hidrofobicidade da superfície celular de BAL e correlação negativa significativa com a co-agregação BAL - *E. coli* apontam que a natureza hidrofóbica da superfície celular de BAL contribui para a produção de biofilme. Essa hipótese é corroborada pelo fato que isolados clínicos de *Pseudomonas* com características hidrofóbicas de superfície celular apresentaram maior velocidade e biomassa acumulada na produção de biofilme (DRENKARD & AUSUBEL, 2002). Independentemente da existência de associação entre a produção de biofilme em poliestireno e EPS, a habilidade de uma bactéria em apresentar pelo menos uma dessas características pode ser importante para sua sobrevivência em ambientes hostis e para a colonização de superfícies de mucosas (MILANOV et al., 2010).

A suscetibilidade aos antimicrobianos é um importante critério para a seleção de linhagens probióticas, devido ao risco de transferência lateral de genes de resistência para membros comensais e potencialmente patogênicos da microbiota indígena do hospedeiro. Embora algumas BAL sejam resistentes a alguns antibióticos (MATHUR & SINGH, 2005) as linhagens que são encontradas em alimentos são tipicamente muito sensíveis a importantes antibióticos de uso clínico como ampicilina, penicilina, gentamicina e vancomicina (HERREROS et al., 2005). Isolados de *Lactococcus* spp. apresentam resistência a eritromicina e estreptomicina (WALTHER et al., 2008). Alguns padrões de resistência parecem ser linhagem-específicos ou espécie-específicos, mas nenhum padrão apropriado para classificação de BAL foi, até o momento, proposto (SILVA et al., 2013). Plasmídeos carregando resistência a antibióticos não são comuns entre a BAL mas se isto ocorrer, a segurança dessa linhagem deve ser questionada. Assim, linhagens carregando plasmídeos de resistência a antimicrobianos não devem ser usadas como probióticos para animais ou seres humanos. *Lactobacillus* spp. e provavelmente BAL, tem resistência natural a bacitracina, cefalotina, ciprofloxacina, oxacilina, amicacina, kanamicina, gentamicina, metronidazol, nitrofurantoína, norfloxacina, estreptomicina e vancomicina (DANIELSEN & WIND, 2003). De maneira geral, esse perfil intrínseco de resistência foi apresentado pelas BAL obtidas neste trabalho, salvo algumas exceções.

A produção de compostos antimicrobianos tais como bacteriocinas, ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) explica o antagonismo que BAL exercem contra alguns patógenos (FERNÁNDEZ et al., 2008).  $H_2O_2$  é normalmente produzido por isolados de lactobacilos do ambiente vaginal, mas também está associado com isolados de outras mucosas, como a intestinal ou oral (MARTÍN & SUAREZ, 2010). A grande maioria dos isolados de BAL avaliados neste trabalho foram produtores de  $H_2O_2$ , dos quais 34,15% foram moderados e 12,20% fortes produtores de  $H_2O_2$ . Diferentemente dos nossos resultados, Espeche e col. (2012) identificaram que 63% dos isolados que eram grandes produtores de  $H_2O_2$  pertenciam à espécie *P. pentosaceus*. De acordo com Espeche e col. (2009), a maioria das linhagens de BAL de leite (71,6%) apresentou resultado negativo para a produção de  $H_2O_2$  e apenas 8,8% foram classificadas como altas produtoras. Neste mesmo trabalho, foi reportado que a maioria das BAL isoladas de vacas saudáveis foi produtora de  $H_2O_2$  o mesmo não ocorrendo com isolados de vacas com mastite subclínica. Outro trabalho mostrou que nenhuma das BAL isoladas da glândula mamária bovina era produtora de  $H_2O_2$  (BOUCHARD et al., 2015). No trato vaginal de mulheres adultas, a produção de  $H_2O_2$  está associada aos isolados de mulheres saudáveis. Portanto, essas evidências apontam que as BAL presentes em mucosas mamárias e vaginais saudáveis produtoras de  $H_2O_2$  podem produzir um efeito protetor contra o estabelecimento de infecções (PATTERSON et al., 2008).

Uma das mais importantes características de uma bactéria probiótica é sua habilidade de competir com patógenos pela colonização de um determinado nicho (CORR et al., 2007). A maior parte dos isolados de BAL avaliados neste trabalho (75%) apresentaram antagonismo contra, pelo menos, 8 patógenos reveladores. Alguns trabalhos indicam que a microbiota da glândula mamária da vaca contém um conjunto normal de micro-organismos Gram-positivos com potencial inibitório para o crescimento de patógenos causadores de mastite (WOODWARD et al., 1987; AL-QUMBER & TAGG, 2006). É bem documentado na literatura que BAL podem inibir patógenos, como *S. aureus* que é envolvido na etiologia da mastite (ESPECHE et al., 2012). Entretanto, o potencial inibitório observado em BAL isoladas da glândula mamária é variado. Apenas 21% de 93 isolados de BAL obtidos do úbere de vacas foram capazes de inibir mais de 3 patógenos associados à etiologia da mastite (ESPECHE et al., 2009). Essa variação em relação aos resultados aqui apresentados

pode estar relacionada a diferenças metodológicas entre os ensaios de avaliação do efeito antagonista empregados em ambos os estudos. A inibição observada em nossos dados provavelmente pode estar ligada a acidificação do meio pela produção de ácidos orgânicos pelas BAL, uma vez que não foi utilizado meio MRS tamponado nos ensaios aqui realizados. Na verdade, a maior parte das BAL isoladas de leite que apresentavam antagonismo contra patógenos associados a etiologia da mastite deixavam de inibir o crescimento das bactérias patogênicas quando o sobrenadante de suas culturas teve seu pH neutralizado (BOUCHARD et al., 2015). Todavia, não pode ser excluída a possibilidade de produção de compostos inibitórios tais como bacteriocinas, que podem ser ativadas em pH ácido. Além disso, linhagens produtoras de bacteriocinas foram também isoladas da glândula mamária de bovinos em outros trabalhos documentados na literatura (TWOMEY et al., 2000; CRISPIE et al., 2005), sendo este um mecanismo que não pode ser excluído para explicar o efeito antagonista observado pelos isolados aqui avaliados.

Fatores de virulência são definidos como moléculas que aumentam a habilidade de um micro-organismo em causar uma doença, entretanto a presença de fatores de virulência não significa necessariamente que uma linhagem seja patogênica (FUQUAY et al., 2011). Contudo, a avaliação da segurança de uma linhagem bacteriana com potencial probiótico, em humanos ou animais, preconiza que bactérias utilizadas para este fim não apresentem genes codificadores para fatores de virulência em seu genoma (GAGGIÀ et al., 2010). Na verdade, a presença de genes codificadores de fatores de virulência aumenta a capacidade de colonização de enterococos em pacientes hospitalizados (COSENTINO et al., 2010). O gene *agg* codifica uma proteína agregativa importante para a conjugação bacteriana, mas que também tem papel na determinação da adesão de bactérias às células eucarióticas (CAMARGO et al., 2008). O gene *gelE* codifica uma toxina do tipo gelatinase que é uma metaloprotease extracelular que tem atividade hidrolítica sobre gelatina, colágeno e hemoglobina relacionada com o fornecimento de nutrientes para o metabolismo bacteriano a partir da degradação do tecido do hospedeiro (SU et al., 1991). *efa* é um gene identificado originalmente em *E. faecalis* o qual expressa uma proteína de parede celular que possui alta homologia com adesinas de estreptococos patogênicos (XU et al., 1997). *cyIA* é um dos genes componentes do operon da citolisina, a qual é uma toxina hemolítica (CAMARGO et al., 2008). O gene *cad* codifica

um feromônio sexual bacteriano que facilita a conjugação e funciona como quimioatrativo para leucócitos contribuindo, desta maneira, para o processo infeccioso de bactérias patogênicas (GIBSON & ABD-EL-MALEK, 1945; DE MAN et al., 1960).

Entre as 82 BAL isoladas da glândula mamária bovina avaliadas para a presença de genes codificadores de fatores de virulência, apenas 11 apresentaram pelo menos um dos 5 genes triados. Parece que no ecossistema mamário bovino uma baixa prevalência desses genes seja característica das BAL (ESPECHE et al., 2012). Nenhum isolado apresentou o gene *cyIA*. Isso não é surpreendente, uma vez que este gene também não foi identificado em linhagens *E. faecalis* isoladas a partir de leite humano, canino e felino (JIMÉNEZ et al., 2013). O isolado *E. faecalis* GIRO33L2\* chamou a atenção por apresentar quatro (*agg*, *gelE*, *efa* e *cad*) genes codificadores de fatores de virulência. Além disso, esse mesmo isolado apresentou um perfil diferente de susceptibilidade aos antimicrobianos. Alguns destes genes codificadores de fatores de virulência, incluindo o operon citolisina e *agg*, foram encontrados em uma grande ilha de patogenicidade de 153 kb (CAMARGO et al., 2008). Seguindo as determinações de segurança para seleção de linhagens bacterianas probióticas, os 11 isolados que apresentaram pelo menos um dos genes codificadores para os fatores de virulência avaliados foram excluídos dos demais ensaios aqui realizados.

De acordo com os critérios propostos por Saarela e col. (2000); FAO/WHO (2002); EFSA (2005; 2007); HC (2006); Espeche e col. (2009) e Gaggia e col. (2010) as linhagens a serem selecionadas para estudos como possíveis candidatas a probióticos para o ecossistema mamário não devem ter tido citação como patógenos associados a casos de mastite, serem isoladas de quartos saudáveis, inibirem pelo menos um patógeno na triagem de antagonismo, terem alta ou média hidrofobicidade e autoagregação e não apresentarem fatores de virulência associados à mastite. Somados a isso, a produção de EPS ou de biofilme são características desejáveis, porém não obrigatórias. A avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos também deve mostrar um perfil intrínseco de suscetibilidade para descartar o risco de transferência gênica lateral de resistência para membros comensais e patógenos potenciais que residam na glândula mamária (CALVINHO et al., 2002). Portanto, foram descartados isolados de *L. garvieae* pois já foram associados a casos de mastite e endocardite (COLLINS et al., 1983; ZUILY et al., 2011), bem como de *S.*

*bovis* que é considerado agente etiológico de infecções mamárias. Os isolados de *Enterococcus* também foram descartados, devido a discussão acirrada sobre seu uso seguro como probióticos. Diante destes fatos, 10 isolados que atendiam aos requisitos necessários à possíveis probióticos a serem usados na bacterioterapia de mastite foram selecionados para serem avaliados em ensaios de co-cultivo com células epiteliais mamárias MDA-MB-231.

A capacidade de uma bactéria potencialmente probiótica em colonizar tecidos têm como consequências principais a possibilidade de promoção de efeitos benéficos e competição com patógenos oportunistas, em um determinado nicho, por tempo prolongado (BOUCHARD et al., 2015). Os resultados aqui gerados apontam que entre 10 BAL avaliadas em modelo de co-cultivo, 8 delas apresentaram taxas satisfatórias de adesão em células epiteliais mamárias MDA-MB-231, com taxa de adesão média de  $5,23 \pm 1,47 \log_{10}$  de UFC/mL de lisado celular. Os isolados WciGIRO27L2\* (*W. cibaria* GIRO27L2\*) e StrelutGIR25S5 (*S. lutetiensis* GIR25S5) apresentaram taxas de adesão significativamente menores ( $p < 0,05$ ) em relação aos demais. A capacidade de adesão de BAL em células epiteliais mamárias parece ser fortemente associada ao tipo de linhagem avaliada. Uma variação de  $\sim 1,6 \log_{10}$  de UFC foi observada em um estudo similar ao nosso, desenvolvido na França. Entre diferentes bactérias avaliadas, *L. brevis* 1613 apresentou uma taxa de adesão de  $4,08 \log_{10}$  de UFC enquanto outras duas linhagens de *L. brevis* 1595 e 1597 atingiram taxas de adesão de  $5,49$  e  $5,32 \log_{10}$  de UFC, respectivamente (BOUCHARD et al., 2015). *Lactococcus lactis* V7, isolado de vacas no Brasil, apresentou taxas de adesão de  $5,93 \log_{10}$  de UFC em co-cultivo com células epiteliais mamárias MAC-T (ASSIS et al., 2015). Diante disso, os níveis de adesão encontrados neste trabalho foram considerados altos e similares a outros reportados para BAL usando várias linhagens celulares da glândula mamária (VIZOSO-PINTO et al., 2007; GARRIGA et al., 2014).

Uma alta capacidade de adesão em células eucarióticas demonstra a habilidade que uma BAL pode possuir em competir com patógenos pela colonização dos tecidos do hospedeiro (BOUCHARD et al., 2015). Essa capacidade é de extrema importância no ecossistema mamário, visto que nele ocorre intenso fluxo de leite durante o período de lactação (TAMILSELVAM et al., 2006). Alguns autores apontam que existe uma correlação entre a capacidade de adesão de BAL em células eucarióticas e sua hidrofobicidade da superfície celular (ESPECHE et al., 2012).

Outros apontam que bactérias autoagregativas tem maior potencial para produção de biofilme e que essa habilidade favorece a colonização do hospedeiro, o que, em conjunto, facilitaria a depuração de patógenos (YOUNES et al., 2012). Entretanto, nossos isolados foram hábeis em aderir as células MDA-MB-231, sendo que os dois menos eficientes, *W. cibaria* GIRO27L2\* e *S. lutetiensis* GIR25S5, apresentaram capacidade de autoagregação moderada e no caso do segundo, hidrofobicidade da superfície celular alta. Esses achados demonstram que mais importante que a capacidade de autoagregação ou a hidrofobicidade da superfície celular, a presença, em BAL, de moléculas de superfície, linhagem dependentes, são a chave para o sucesso de colonização de tecidos do hospedeiro. Na verdade, diferentes proteínas envolvidas na adesão ao muco, fibronectina e ao colágeno; presentes na camada S ou envolvidas na biossíntese de polissacarídeos parecem ser determinantes na adesão de BAL às células epiteliais (LEBEER et al., 2012; TURPIN et al., 2012; SENGUPTA et al., 2013).

Diferente da capacidade de adesão de BAL em células eucarióticas, a qual é bem descrita na literatura científica (BOUCHARD et al., 2013), a capacidade de internalização ou invasão de BAL ainda não é bem documentada (GUIMARAES et al., 2006). Os dados gerados aqui mostram que as 9 BAL testadas foram capazes de entrar nas células epiteliais mamárias MDA-MB-231 e, que ainda foram encontrados dois perfis significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) de internalização, aparentemente linhagem-dependentes. Entre os isolados aqui categorizados como “invasores eficientes” e os “invasores ineficientes” foi encontrada uma diferença média de  $\sim 2,0 \log_{10}$  de UFC na taxa de internalização. Esse perfil não é uma surpresa e já foi relatado em outros dois trabalhos. Bouchard e col. (2015) mostraram que a capacidade de internalização foi mais fortemente afetada pelo tipo de linhagem bacteriana do que a capacidade de adesão, chegando a relatar valores de até  $3 \log_{10}$  de UFC de diferença entre as linhagens avaliadas. As BAL que melhor invadiram as células epiteliais mamárias atingiram taxas de internalização de  $4,77 \log_{10}$  de UFC como *L. brevis* 1595 enquanto outras BAL apresentaram baixo nível de internalização, como *L. lactis* 1596, na ordem de  $2,17 \log_{10}$  de UFC. Essa mesma tendência foi verificada por Bouchard e col. (2013). *L. lactis* V7 apresentou taxa de invasão próxima ao dos isolados com perfil categorizado nesse trabalho como o de “invasor eficiente”, possuindo taxa de invasão

de 4,90  $\log_{10}$  de UFC, quando avaliada em modelo de co-cultivo em células MAC-T (ASSIS et al., 2015).

O maior foco dos estudos de internalização de BAL em células eucarióticas tem como objetivo avaliar o seu papel como veículos de entrega intracelular de moléculas de interesse (INNOCENTIN et al., 2009). Na verdade, a internalização, sobrevivência e proliferação de BAL dentro de células podem estar relacionadas ao desenvolvimento dos esperados efeitos benéficos, sabidamente relacionados a administração destes micro-organismos. A presença de sequências com domínios conservados e homólogos à internalina-J de *L. monocytogenes* no genoma de 5 BAL invasoras de células epiteliais mamárias sequenciadas aponta para uma possível atuação deste tipo de molécula na internalização de BAL em células eucarióticas (BOUCHARD et al., 2015). Além disso, proteínas de ligação à fibronectina foram identificadas no genoma de espécies de *Lactobacillus*, o que sugere que possam também estar envolvidas na capacidade de adesão e internalização de BAL em células da glândula mamária (LORCA et al., 2002; CASTALDO et al., 2009). Entretanto, a capacidade de internalização de BAL deve ser analisada com cautela pois os riscos e os efeitos de invasão em outros tecidos do hospedeiro não são ainda bem conhecidos.

Bactérias patogênicas causadoras de mastite apresentam alta capacidade de adesão às células epiteliais mamárias, com taxas de adesão entre 4,76-5,94  $\log_{10}$  de UFC para linhagens de *E. coli* e variando entre 5,21 -6,17  $\log_{10}$  de UFC para linhagens de *S. aureus*, ambas avaliadas em modelo de co-cultivo com células MAC-T (ASSIS et al., 2015). Além disso, em comparação às BAL, linhagens de *S. aureus* apresentam maior capacidade de adesão às células epiteliais em até 2 ordens de magnitude de  $\log_{10}$  de UFC (BOUCHARD et al., 2013). Todas essas tendências foram observadas nos dados gerados neste trabalho. Como a adesão e invasão de células do hospedeiro por patógenos são etapas críticas para o desenvolvimento de patologias, como a mastite, a avaliação da inibição destes processos pela administração de bactérias potencialmente probióticas é fundamental (BOUCHARD et al., 2013) e por isso foi realizada em modelo de co-cultivo em células MDA-MB-231.

Ao avaliar a capacidade de inibição da adesão dos patógenos *S. aureus* ATCC 29213 e *E. coli* ATCC 25723 pelo co-cultivo com as 9 BAL selecionadas aqui, foi observado que o efeito inibitório detectado parece ser dependente da linhagem da

BAL e também do patógeno. Na verdade, 4 isolados de BAL foram capazes de reduzir significativamente ( $p < 0,05$ ) a porcentagem de adesão de *S. aureus* e 7 BAL foram capazes de diminuir a porcentagem de adesão de *E. coli*, porém apenas três isolados (*L. lactis* GIRO4S8\* - LactGIRO4S8\*; *W. confusa* GIR48L1\* - WcoGIRO48L1\* e *W. cibaria* GIRO27L2\* - WciGIRO27L2\*) foram capazes de reduzir significativamente a adesão dos dois patógenos. Por outro lado, ao avaliar a capacidade de inibição de adesão de patógenos aferindo apenas os dados de adesão expressos como  $\log_{10}$  de UFC/ mL de lisado celular, somente o isolado WcoGIRO48L1\* foi capaz de reduzir significativamente ( $p < 0,05$ ) em 0,82  $\log$  UFC/ mL de lisado celular a adesão de *S. aureus* em comparação com o controle.

Outros trabalhos reportam que BAL são capazes de reduzir a porcentagem de adesão de patógenos em modelos de co-cultivo. *L. casei* 667 foi capaz de reduzir em 40% a adesão de *S. aureus* RF122 (BOUCHARD et al., 2013). *L. lactis* V7 reduziu significativamente em 75% a adesão de *S. aureus* N305 em células MAC- T (ASSIS et al., 2015). Vale destacar neste ponto que Bouchard e col. (2013) e Assis e col. (2015) não publicaram as contagens (expressas em  $\log_{10}$  de UFC/ mL de lisado celular) obtidas nos experimentos de inibição de adesão de patógenos, expressando seus dados apenas como porcentagem de adesão de patógeno. Como mostrado nesta tese, a adesão expressa por  $\log_{10}$  de UFC/ mL de lisado celular, ao invés de porcentagem de adesão do patógeno, parece ser uma forma mais robusta de analisar o fenômeno de inibição de adesão. Por isso, acreditamos que a inibição da adesão de *S. aureus* por WcoGIRO48L1\* seja um fenômeno forte, com robustez estatística, e digno de uma melhor avaliação em modelos *in vivo*.

Uma das principais formas pelas quais patógenos podem evadir da resposta imune é através da invasão dentro das células do hospedeiro, mecanismo bem caracterizado para *S. aureus* que tem alta capacidade de aderir e invadir células epiteliais da glândula mamária (ALMEIDA et al., 1996). Em nossos dados, *S. aureus* ATCC 29213 de fato apresentou taxas de invasão de  $4,15 \pm 0,15 \log_{10}$  de UFC, bem menores que as documentadas por Assis e col. (2015) (*S. aureus* RF122:  $6,45 \log_{10}$  de UFC e *S. aureus* N305:  $7,18 \log_{10}$  de UFC). Uma possível explicação para essa variação, são diferenças metodológicas entre os dois ensaios. Neste trabalho usamos um *MOI* de 10 bactérias patogênicas: 1 célula epitelial além de usarmos 1h de contato das células com as bactérias antes da incubação por mais uma hora das culturas com



meio RPMI 1640 suplementado com antibióticos enquanto, Assis e col. (2015) usaram um *MOI* de 100:1 e tempos de incubação de 2 h, que podem ter produzido uma maior taxa de invasão de *S. aureus* naquele trabalho.

Entre os 9 isolados de BAL avaliados aqui, 4 foram capazes de reduzir significativamente ( $p < 0,05$ ) a porcentagem de invasão de *S. aureus* ATCC 29213 em células MDA-MB-231. *L. lactis* V7 reduziu significativamente a porcentagem de invasão de diferentes linhagens patogênicas de *S. aureus* e *E. coli* entre 45 a 88% em células MAC-T (ASSIS et al., 2015). Essa mesma faixa de inibição de invasão foi também encontrada em linhagens de *L. casei* avaliadas em modelo de co-cultivo usando células epiteliais mamárias (BOUCHARD et al., 2013). Entretanto, ao avaliar os dados de invasão de *S. aureus*, expressos por  $\log_{10}$  de UFC/ mL de lisado celular, ao invés de porcentagem de invasão do patógeno, nenhuma das BAL avaliadas neste trabalho produziu uma redução significativa ( $p > 0,05$ ) na invasão de *S. aureus* quando comparada com o controle.

Um fato surpreendente neste trabalho foi a ausência de invasão de *E. coli* ATCC 25723, inclusive nos poços controle sem BAL. De forma diferente, linhagens de *E. coli* foram capazes de invadir células epiteliais mamárias MAC-T com taxas de invasão de 4,12  $\log_{10}$  de UFC para *E. coli* P4 e de 3,82  $\log_{10}$  de UFC para *E. coli* K08 (ASSIS et al., 2015). Uma possível explicação para a ausência de invasão de *E. coli* em nossos dados pode estar relacionado à célula MDA-MB-231, usada em nosso modelo de co-cultivo. Na verdade, essa linhagem celular não expressa alguns receptores do tipo *toll* (*Toll-like receptor* - TLR), tais como TLR4 e TLR10 (XIE et al., 2009). É bem documentado na literatura que a invasão de bactérias Gram-negativas, como *E. coli*, é dependente da ligação destes patógenos com receptores TLR4, expressos pelas células dos hospedeiros (PEREYRA et al., 2016). Portanto, a ausência da expressão de TLR4 pelas células MDA-MB-231 pode explicar a ausência de invasão destas células por *E. coli* ATCC 25723. Provavelmente a adesão de *E. coli* ATCC 25723, observada nos ensaios de adesão aqui realizados, envolve outros receptores de superfície expressos pelas células MDA-MB-231, que não o TLR4.

Poucos estudos foram relatados na literatura científica investigando a capacidade de BAL em interferir na invasão de bactérias patogênicas em células do hospedeiro (CAMPANA et al., 2012; BOUCHARD et al., 2013; ASSIS et al., 2015). A

inibição da adesão e invasão de patógenos verificada neste e em outros trabalhos pode ser atribuída ao mecanismo de exclusão competitiva, descrito como um importante efeito benéfico conferido pelos probióticos ao hospedeiro (BOUCHARD et al., 2013). Na verdade, a capacidade de inibição da adesão e invasão de patógenos é um critério frequentemente usado na seleção de BAL candidatas a bacterioterapia contra patógenos intestinais, como *L. monocytogenes* (LAVILLA-LERMA et al., 2013; GARRIGA et al., 2014). Ademais, assim como previamente apontado por Assis e col. (2015), a capacidade de inibição da adesão de patógenos não foi correlacionada com uma concomitante inibição de invasão para *S. aureus*, visto que, em nossos dados, o isolado WcoGIRO48L1\* inibiu adesão e o WparGIR46L4\* a invasão deste patógeno, porém LactGIRO4S8\*, WciGIRO27L2\* e LplanGUZ3L2\* foram capazes de reduzir significativamente a adesão e invasão de *S. aureus* ATCC 29213. Além disso, em nossos dados, muitas das bactérias que inibiram adesão de *E. coli* não foram capazes de inibir a adesão de *S. aureus*. Esses achados apontam que mecanismos de inibição de adesão e de invasão precisam ser mais bem avaliados e, estudos mais profundos sobre essa questão devem ser realizados.

Por apresentarem resultados promissores com relação às capacidades de adesão e de inibição da adesão e invasão de patógenos relacionados com a etiologia da mastite, avaliadas em modelo de co-cultivo, os isolados WcoGIRO48L1\* (*W. confusa* GIR48L1\*) e LactGIRO4S8\* (*L. lactis* GIRO4S8\*) foram selecionados para avaliação de seu efeito imunomodulador em células MDA-MB-231. Foram dosados, por RT-qPCR, o mRNA de alguns mediadores da resposta imune, tais como a IL1 $\beta$ , IL8, IL10, Tgfb1 e Tnfa.

Não foram detectadas alterações na expressão das citocinas regulatórias IL10 e Tgfb1. A expressão aumentada de citocinas regulatórias, como o Tgfb1, em quadros de infecção crônica causados por *S. aureus*, está relacionada com intensa remodelação do tecido mamário, a qual contribui para a persistência do quadro infeccioso (NAIKI et al., 2005; ANDREOTTI et al., 2014). Uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) na expressão de Tnfa foi detectada na presença de WcoGIRO48L1\* e também no controle com *S. aureus* ATCC 29213. Na verdade, Tnfa tem sua produção aumentada em casos de mastite causada por bactérias coliformes, como *E. coli*, e não tem expressão aumentada nas primeiras 48h após a infecção intramamária de vacas com *S. aureus* (BANNERMAN et al., 2004). Por outro lado, a habilidade de

WcoGIRO48L1\* em reduzir a expressão de Tnfa pode ser interessante no tratamento de casos de mastite clínica aguda, na qual níveis altos de Tnfa são descritos associados ao desenvolvimento de choque endotóxico causado por *E. coli* (HAVELL, 1989; PERSSON-WALLER et al., 2003).

A produção de IL1 $\beta$  foi significativamente ( $p < 0,05$ ) maior no controle contendo *S. aureus* ATCC 29213 em relação ao controle sem inóculo bacteriano. A citocina IL1 $\beta$  é produzida por monócitos, macrófagos e células epiteliais da glândula mamária, sendo responsável pela expressão de adesinas pelas células endoteliais e atua na quimiotaxia de neutrófilos (OVIEDO-BOYSO et al., 2007). Na verdade, aumentos de IL1 $\beta$  são importantes em fases iniciais das infecções causadas por *S. aureus* (ZHANG & ISSEKUTZ, 2002; YAMANAKA et al., 2000), portanto faz todo sentido que em nosso modelo de co-cultivo de apenas 1h níveis elevados desta citocina sejam detectados. Na verdade, IL1 $\beta$  parece ser mais importante na resposta imune contra *E. coli* do que contra *S. aureus* (OVIEDO-BOYSO et al., 2007). Os dois isolados WcoGIRO48L1\* e LactGIRO4S8\* reduziram significativamente a expressão de IL1 $\beta$  em poços infectados com *S. aureus* ATCC 29213. Provavelmente esse achado tem pouca relevância biológica para a mastite estafilocócica, visto ser esta citocina pouco importante na resposta imune de casos de mastite causada por *S. aureus*.

Porém, o achado mais interessante encontrado no ensaio de imunomodulação foi o aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da expressão de IL8 no cultivo concomitante de LactGIRO4S8\* e *S. aureus*. IL8 (CXCL8) é uma quimiocina produzida por monócitos, linfócitos T, macrófagos e células epiteliais mamárias que atua no recrutamento de neutrófilos para a glândula mamária (RIOLLET et al., 2000). Apesar de não significativo estatisticamente ( $p > 0,05$ ), a presença apenas de LactGIRO4S8\* em contato com as células produziu aumento da expressão de IL8. *L. lactis* V7 produziu um ligeiro aumento na produção de IL8 em células epiteliais mamárias da linhagem PS que foi potencializado quando a referida BAL foi co-incubada com *E. coli*. O aumento do estímulo para produção de IL8 pelo co-cultivo de *L. lactis* V7 e *E. coli* sugere um efeito sinérgico destas duas bactérias na indução da produção desta citocina (ASSIS et al., 2015). Por outro lado, BAL sozinhas não foram capazes de alterar a secreção de IL8 em células epiteliais mamárias da linhagem PS, entretanto quando foram co-incubadas com *E. coli*, três linhagens (*L. brevis* 1595 e 1597 e *L. casei* 1542) levaram a uma redução de quase 3x na quantidade de IL8 secretadas

pelas células. Em células epiteliais intestinais (HT-29) algumas linhagens como *L. garvieae* 1605 e *L. casei* 1542 levaram a discretos aumentos na secreção de IL8 (BOUCHARD et al., 2015).

Diferenças entre os achados descritos aqui e apontados na literatura podem estar relacionados ao tipo de célula utilizado em cada trabalho, pois é discutido que a escolha do modelo celular deva estar diretamente associada ao ecossistema estudado (BOUCHARD et al., 2015). Seguindo essa lógica, foi usada neste trabalho uma célula epitelial da glândula mamária (MDA-MB-231), que mesmo sendo de origem humana e cancerosa, foi o modelo mais próximo da realidade do ecossistema mamário bovino disponível. Uma linhagem celular chamada MAC-T, desenvolvida no Canadá, representa um modelo interessante para a avaliação das propriedades probióticas de BAL destinadas a bovinos, pois foi originalmente isolada de vacas em lactação e imortalizada por transfecção viral do antígeno T do SV-40 (HUYNH et al., 1991). Entretanto, a referida célula não é comercializada por nenhuma empresa de biotecnologia, dificultando a possibilidade de acesso a sua utilização.

O contato de bactérias com células epiteliais da glândula mamária é o ponto inicial de ativação das repostas imunes inatas envolvidas na depuração dos patógenos associados à mastite (PEREYRA et al., 2016). A produção de importantes mediadores da resposta imune inata, tais como IL6, IL12, IL8 e INF- $\gamma$  por células epiteliais tem sido descrita na literatura (RIOLLET et al., 2000; 2001). Nesse sentido, o sistema imune associado à glândula mamária apresenta a capacidade de eliminar naturalmente patógenos oportunistas, quando uma rápida e eficiente resposta é elicitada (BURVENICH et al., 1994). Seguindo essa perspectiva, o uso de procedimentos capazes de eliciar rápidas respostas imunes podem fornecer ao hospedeiro uma proteção contra infecções bacterianas causadoras de mastite, já que as células fagocíticas recrutadas por tais procedimentos (neutrófilos e macrófagos) são a primeira linha de defesa contra bactérias invasoras neste nicho (CRISPIE et al., 2008). Assim, BAL candidatas a probióticas com pequena capacidade pró-inflamatória podem ser interessantes para estimular a imunidade inata e produzir efeitos positivos na prevenção da mastite e na depuração de patógenos oportunistas (BOUCHARD et al., 2015). Esse parece ser o caso do isolado LactGIRO4S8\* que estimula a produção de IL8 e reduz a produção de IL1 $\beta$ . Por outro lado, BAL que apresentem capacidade regulatória (anteriormente chamada de anti-inflamatória) podem ajudar no tratamento

da inflamação gerada pela infecção crônica causada pela mastite (BOUCHARD et al., 2015). Nesse ponto de vista, WcoGIRO48L1\* pode ser promissor por reduzir a produção de Tnfa e de IL1 $\beta$ .

A integridade das monocamadas e a viabilidade das células MDA-MB-231 não foram afetadas pela incubação de todas as BAL avaliadas nesta tese nas condições usadas nos ensaios aqui avaliados, uma vez que as células não apresentaram alterações em sua morfologia durante o experimento e não foram detectadas alterações significativas da sua viabilidade em ensaios utilizando MTT (dados não mostrados). Esse achado está de acordo com relatos recentes da ausência de efeitos prejudiciais de linhagens de *L. casei* sobre a viabilidade celular (BOUCHARD et al., 2013) e de *L. perolens* sobre a morfologia da membrana de células epiteliais mamárias (FROLA et al., 2012). Por fim, a habilidade de adesão, inibição da adesão e internalização de patógenos e imunomodulação descritas para os isolados WcoGIRO48L1\* (*W. confusa* GIR48L1\*) e LactGIRO4S8\* (*L. lactis* GIRO4S8\*) são características interessantes que merecem ser futuramente investigada em modelos *in vivo* objetivando o desenvolvimento de probióticos a serem utilizados na bacterioterapia da mastite.

## 8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os dados produzidos nesta tese apontam, com clareza, que a microbiota existente dentro da glândula mamária bovina é complexa, diversa e parece sofrer variação de acordo com o estado de saúde, raça e ambiente do animal. Não foi possível, pelas limitações experimentais, mensurar a magnitude de cada uma dessas variáveis sobre a variação da composição de bactérias residentes no úbere. Parece que aspectos de manejo, como a presença do “bezerro ao pé da vaca” bem como o tipo de alimentação interferem na composição microbiana do leite. Nossos dados também sugerem que os efeitos ambientais apresentam uma magnitude maior sobre a composição da microbiota da glândula mamária do que a constituição genética dos animais. Portanto, futuros estudos devem explorar os achados iniciais aqui relatados, tentando associar as variações moleculares descritas entre os genomas das diferentes raças bovinas atualmente sequenciados (MEIRELLES et al., 1999; LIAO et al., 2013) com variações na composição da microbiota da glândula mamária residente em vacas.

Entretanto, é claro que a mastite subclínica produz alterações na composição da microbiota da glândula mamária, que caracterizam esse quadro como associado à disbiose desta comunidade. Redução da riqueza e diversidade, bem como da abundância relativa das BAL e de membros dos gêneros *Pseudomonas* e *Acinetobacter*, além de aumento na abundância de *Staphylococcus* parecem ser um padrão comum observado entre as raças avaliadas em nossa amostragem. Diante destes achados, a análise de microbioma do leite por sequenciamento de nova geração de porções hipervariáveis do gene codificador do rRNA 16S pode ser considerada uma nova ferramenta de diagnóstico além, de ser promissora para a detecção de biomarcadores sensíveis ao nível da mastite subclínica, que permitam uma intervenção precoce no manejo, evitando a evolução para o quadro clínico de mastite, beneficiando assim animais e produtores.

A redução da abundância relativa de BAL em animais com mastite subclínica reforçou nossa escolha acertada de realizar, nesse grupo de micro-organismos, a prospecção de novos probióticos a serem usados na bacterioterapia da mastite. De fato, os isolados WcoGIRO48L1\* (*W. confusa* GIR48L1\*) e LactGIRO4S8\* (*L. lactis* GIRO4S8\*) apresentaram características desejáveis em teste de caracterização *in vitro*, além de apresentarem resultados encorajadores nos experimentos de co-cultivo em células MDA-MB-231 e, por isso, merecem ser melhor avaliados *in vivo*.

Modelos murinos de indução de mastite podem ser uma ferramenta viável para avaliar os resultados obtidos aqui (BREYNE et al., 2015). Mais que isso, já foi demonstrado que a alimentação de camundongos com aditivos alimentares tem efeito na proteção na glândula mamária (ROWSON et al., 2011). Diante da possível existência da rota entero-mamária de entrega de bactérias intestinais na glândula em lactação, a alimentação de bovinos com BAL potencialmente probióticas pode ter efeitos benéficos na fisiologia do úbere. O isolado LactGIRO4S8\* foi moderadamente inibido (55,2% de inibição) pela sua exposição a sais biliares bovinos em testes *in vitro* (dados não mostrados). Esse dado mostra que, possivelmente, LactGIRO4S8\* fornecido oralmente poderão chegar ao intestino dos ruminantes e daí seguirem para a glândula mamária por vias endógenas. Além disso, o uso de infusões intramamárias de BAL potencialmente probióticas em vacas em lactação parece ser uma prática segura, levando à persistência dessas bactérias no ambiente mamário, no qual elas promovem efeitos benéficos (KLOSTERMANN et al., 2008; BEECHER et al., 2009; FROLA et al., 2012; 2013). Em adição, é vital o desenvolvimento de formas viáveis de inoculação destes possíveis probióticos de forma intramamária a serem usados na prática diária de ordenha em fazendas. Portanto, experimentos que explorem o potencial tecnológico de veiculação destes isolados em produtos é fundamental. Logo, os achados aqui relatados podem ser também avaliados diretamente em bovinos de leite na tentativa de determinar, com maior fidedignidade, o real efeito do isolado LactGIRO4S8\* sobre a fisiologia da glândula mamária bovina e seu potencial uso como probiótico contra a mastite.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLAH, S. A.; OSMAN, M. M. Isolation and identification of lactic acid bacteria from raw cow milk, white cheese and rob in Sudan. *Pakist J Nutr*, v. 9, p. 1203-1206, 2010.
- AKERS, R. M., CAPUCO, A. V.; KEYS, J. E. Cellular differentiation in mammary tissue of beef and dairy heifers. *Livest Sci*. v. 105, p.44 – 49, 2006.
- AKERS, R. M. & NICKERSON, S. C. Mastitis and its impact on structure and function in the ruminant mammary gland. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*. v. 16, p. 275 – 289, 2011.
- AL-QUMBER, M.; TAGG, J.R. Commensal bacilli inhibitory to mastitis pathogens isolated from the udder microbiota of healthy cows. *J Appl Microbiol* v. 101, p. 1152–1160, 2006.
- ALBERTON, J.; ALBERTON, L. R.; PACHALY, J. R.; OTUTUMI, L. K.; ZAMPIERI, T. M.; AGOSTINIS, R. O. Estudo da qualidade do leite de amostras obtidas de tanques de resfriamento em três regiões do estado do Paraná. *Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR*, v. 15 (1), p. 5-12, 2012.
- ALMEIDA, G. L. P.; PANDORFI, H.; BARBOSA, S. B. P.; PEREIRA, D. F.; GUISELINI, C.; ALMEIDA, G. A. P. Comportamento, produção e qualidade do leite de vacas Holandês-Gir com climatização no curral. *Rev. Bras. Eng. Agríc. Ambiente*, v.17 (8), 2013.
- ALMEIDA, R. A.; MATTHEWS, K. R.; CIFRIAN, E.; GUIDRY, A. J.; OLIVER, S. P. STAPHYLOCOCCUS aureus invasion of bovine mammary epithelial cells. *J. Dairy Sci.*, v. 79, p. 1021–1026, 1996.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Grapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, v. 25, p. 3389–3402, 1997.
- ANDREOTTI, C. S.; PEREYRA, E. A.; BARAVALLE, C.; RENNA, M. S.; ORTEGA, H. H.; CALVINHO, L. F.; DALLARD, B. E. Staphylococcus aureus chronic intramammary infection modifies protein expression of transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) subfamily components during active involution. *Res. Vet. Sci.*, v. 96, p. 5-14, 2014.
- ANNAPOORANI, C.; DANTE, S.; DOUGLAS, D. Antimicrobial activity of bovine bactericidal permeability-increasing protein-derived peptides against gram-negative bacteria isolated from the milk of cows with clinical mastitis. *Am. J. Vet. Res.* v. 68, p. 1151–1159, 2007.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Normas de desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana: 15º suplemento informativo, v. 25, n. 1, p. 55-58, 2005.
- ARSLAN, S.; ÖZKARDES, F. Slime production and antibiotics susceptibility in staphylococci isolated from clinical samples. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 102 (1), p.29-33, 2007.
- ARROYO, R.; MARTÍN, V.; MALDONADO, A.; JIMÉNEZ, E., FERNÁNDEZ, L.; RODRÍGUEZ, J. M. Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of lactobacilli isolated from breast milk. *Clin Infect Dis*. v. 50, n. 12, p. 1551–1558, 2010.
- ASSIS, B. S.; GERMON, P.; SILVA, A. M.; EVEN, S.; NICOLI, J. R.; LE LOIR, Y. Lactococcus lactis V7 inhibits the cell invasion of bovine mammary epithelial cells by Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *Benef. Microbes*, v. 6 (6), p. 879-886, 2015.
- BANKS, W. J. Histologia veterinaria aplicada. 2.ed. São Paulo:Manole, 629p., 1992.



BANNERMAN, D. D.; PAAPE, M. J.; LEE, J. W.; ZHAO, X.; HOPE, J. C.; RAINARD, P. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v. 11, p. 463-472, 2004.

BANNERMAN, D. D. Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. *J. Anim. Sci.* v. 87, p. 10–25, 2009.

BARBANO, D.; MA, Y.; SANTOS, M. Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life. *J. Dairy Sci.*, v. 89, E15, 2006.

BARKEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y. H.; ZADOKS, R. N. Invited Review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Dairy Sci.* v. 89, p. 1877–1895, 2006.

BEASLEY, S. S.; SARIS, P. E. J. Nisin-producing *Lactococcus lactis* strains isolated from human milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 70, p. 5051-5053, 2004.

BEECHER, C.; DALY, M.; BERRY, D. P.; KLOSTERMANN, K.; FLYNN, J.; MEANEY, W.; HILL, C.; MCCARTHY, T. V.; ROSS, R. P.; GIBLIN, L. Administration of a live culture of *Lactococcus lactis* DPC 3147 into the bovine mammary gland stimulates the local host immune response, particularly IL-1 b and IL-8 gene expression. *J Dairy Res.* v. 76, p. 340–348, 2009.

BEISCHER, N. A.; MACKAY, E. V.; COLDITZ, P. B. *Obstetrics and the Newborn*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1997.

BERTOTTO, A.; GERLI, R.; CASTELLUCCI, G.; SCALISE, F.; VACCARO, R. Human milk lymphocytes bearing the gamma/delta T-cel receptor are mostly delta TCS1-positive cells. *Immunology*, v. 74, p. 360–361, 1991.

BHARDWAJ, A.; KAPILA, S.; MANI, J.; MALIK, R. K. Comparison of susceptibility to opsonic killing by in vitro human immune response of *Enterococcus* strains isolated from dairy products, clinical samples and probiotic preparation. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 128, p. 513– 515, 2009.

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

BJÖRKROTH, K. J.; SCHILLINGER, U.; GEISEN, R.; WEISS, N.; HOSTE, B.; HOLZAPFEL, W. H.; KORKEALA, H. J.; VANDAMME, P. Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp.nov., detected in food and clinical samples. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 52, p. 141–148, 2002.

BLOWEY, R.; EDMONDSON, P. *Mastitis Control in Dairy Herds: an Illustrated and Practical Guide*. Ipswich, UK: Farming Press Books, 1995

BOGNI, C.; ODIERNO, L.; RASPANTI, C.; GIRAUDDO, J.; LARRIESTRA, A.; REINOSO, E.; LASAGNO, M. et al., War against mastitis. Current concepts on controlling bovine mastitis pathogens. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. Badajoz, Spain: Formatex Research Center, 2011.

- BOSNAKOVSKI, D.; MIZUNO, M.; KIM, G.; TAKAGI, S.; OKUMURA, M.; FUJINAGA, T. Gene expression profile of bovine bone marrow mesenchymal stem cell during spontaneous chondrogenic differentiation in pellet culture system. *Jap J Vet Res*, v. 53, p. 127-139, 2006.
- BOUCHARD, D. S.; RAULT, L.; BERKOVA, N.; LE LOIR, Y.; EVEN, S. Inhibition of *Staphylococcus aureus* invasion into bovine mammary epithelial cells by contact with live *Lactobacillus casei*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 79 (3), p. 877-885, 2013.
- BOUCHARD, D. S.; SERIDAN, B.; SARAoui, T.; RAULT, L.; GERMON, P.; GONZALEZ-MORENO, C.; NADER-MACIAS, F. M.; BAUD, D.; FRANÇOIS, P.; CHUAT, V.; CHAIN, F.; LANGELLA, P.; NICOLI, J.; LE LOIR, Y.; EVEN, S. Lactic Acid Bacteria Isolated from Bovine Mammary Microbiota: Potential Allies against Bovine Mastitis. *PLoS One*, v. 10 (12), 2015.
- BRADLEY, A. Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet. J.*, v. 164 , p. 116–128, 2002.
- BRAEM, G.; DE VliegHER, S.; VERBIST, B.; HEYNDRIKX, M.; LEROY, F.; DE VUYST, L. Culture-independent exploration of the teat apex microbiota of dairy cows reveals a wide bacterial species diversity. *Vet. Microbiol.*, v. 157, p. 383– 390, 2012.
- BRAMLEY, A. J.; FOSTER, R. Effects of lysostaphin on *Staphylococcus aureus* infections of the mouse mammary gland. *Res Vet Sci*. v. 49, p. 120-121, 1990.
- BRAMLEY, A. J.; CULLOR, J. S.; ERSKINE, R. J.; FOX, L. K.; HARMON, R. J.; HOGAN, J. S., et al. The mastitis problem. Current concepts of bovine mastitis. 4th ed. Madison: National Mastitis Council. 1996.
- BRAMLEY, A.; CULLOR, J.; ERSKINE, R.; FOX, L.; HARMON, R.; HOGAN, J.; NICKERSON, S.; OLIVER, S.; LARRY SMITH, K.; SORDILLO, L. Current Concepts of Bovine Mastitis. 4th ed. 421 S. Nine Mound Rd. Verona, WI: National Mastitis Council Publications; 2003.
- BREYNE, K.; DE VliegHER, S.; DE VISSCHER, A.; PIEPERS, S.; MEYER, E. Technical note: a pilot study using a mouse mastitis model to study differences between bovine associated coagulase-negative staphylococci. *J. Dairy Sci.*, v. 98 (2), p.1090-1100, 2015.
- BROUILLETTE, E.; GRONDIN, G.; LEFEBVRE, C.; TALBOT, G.; MALOUIN, F. Mouse mastitis model of infection for antimicrobial compound efficacy studies against intracellular and extracellular forms of *Staphylococcus aureus*. *Vet Microbiol.* v. 101, p. 253–262, 2004.
- BROUILLETTE, E.; MARTINEZ, A.; BOYLL, B. J.; ALLEN, N. E.; MALOUIN, F. Persistence of a *Staphylococcus aureus* small-colony variant under antibiotic pressure in vivo. *FEMS Immunol Med Microbiol.* v. 41, p. 35-41, 2004.
- BUENO, V. F.F. Somatic cell count: Relationship with milk composition and time of year in the State of Goiás. *Ciência Rural*, v. 35 (4), p. 848-854, 2005.
- BURVENICH, C.; PAAPE, M. J.; HILL, A. W.; GUIDRY, A. J.; MILLER, R. H.; HEYNEMAN, R.; KREMER, W. D. J.; BRAND, A. Role of the neutrophil leukocyte in the local and systemic reactions during experimentally induced *Escherichia coli* mastitis in cows immediately after calving. *Veterinary Quarterly*, v. 16, p.45–49, 1994.
- CAI, Y.; KUMAI, S.; OGAWA, M.; BENNO, Y.; NAKASE, T. Characterization and identification of pediococcus species isolated from forage crops and their application for silage preparation. *Appl Environ Microbiol*, v. 65 (7), p. 2901–2906, 1999.

CALLAWAY, T. R.; DOWD, S. E.; EDRINGTON, T. S.; ANDERSON, R. C.; KRUEGER, N.; BAUER, N.; KONONOFF, P. J.; NISBET, D. J. Evaluation of bacterial diversity in the rumen and feces of cattle fed different levels of dried distillers grains plus solubles using bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing. *J. Anim. Sci.*, v. 88(12), p.3977-83, 2010.

CALVINHO, L. F.; TOSELLI, F. G.; WEIMANN, W. R.; CANAVESIO, V. R.; NEDER, V. E.; IGUZQUIZA, I. A. Antimicrobial sensitivity of coagulase-positive staphylococcal strains isolated from bovine mastitis in the central dairy catchment area of Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.*, v. 34, p. 171–175, 2002.

CAMARGO, L. B. C.; ZANELLA, R. C.; GILMORE, M. S.; DARINI, A. L. C. Virulence factors in vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus faecalis* from Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 39, p. 273-278, 2008.

CAMPANA, R.; FEDERICI, S.; CIANDRINI, E.; BAFFONE, W. Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 on the growth and adhesion/invasion characteristics of human *Campylobacter jejuni*. *Curr. Microbiol.*, v. 64, p. 371–378, 2012.

CAPUCO, A. V.; BRIGHT, S. A.; PANKEY, J. W.; WOOD, D. L.; MILLER, R. H.; BITMAN, J. Increased susceptibility to intramammary infection following removal of teat canal keratin. *J. Dairy Sci.* v. 75, p. 2126–2130, 1992.

CAPUCO, A.V.; AKERS, R. M. Mammary involution in dairy animals. *J. Mamm. Gland Biol. Neoplasia*. v. 4, p. 137–144, 1999.

CAPUCO, A. V.; ELLIS, S.; WOOD, D. L.; AKERS, R. M.; GARRETT, W. Postnatal mammary ductal growth: three-dimensional imaging of cell proliferation, effects of estrogen treatment, and expression of steroid receptors in prepubertal calves. *Tissue Cell*. v. 34, p. 143–154, 2002.

CARVALHO, C. M. Anfíbios e Répteis: Perspectivas de estudos. *Publicações Avulsas do Centro Acadêmico de Biologia*, v.1, p. 53-60, 1997.

CASTALDO, C.; VASTANO, V.; SICILIANO, R. A.; CANDELA, M.; VICI, M.; MUSCARIELLO, L.; MARASCO, R.; SACCO, M. Surface displaced alfa-enolase of *Lactobacillus plantarum* is a fibronectin binding protein. *Microb. Cell Fact.*, v. 8:14, 2009.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. (CDC) *Pseudomonas aeruginosa* in Healthcare Settings. 2014. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/hai/organisms/pseudomonas.html>>. Acesso em 31. jul. 2016.

CITAK, S.; VARLIK, Ö.; GÜNDOĞAN, N. Slime production and DNase activity of staphylococci isolated from raw milk. *J. Food Saf.*, v. 23, p.281-288, 2003.

CHAN, R. C.; REID, G.; IRVIN, R. T.; BRUCE, A. W.; COSTERTON, J. W. Competitive exclusion of uropathogens from human uroepithelial cells by *Lactobacillus* whole cells and cell wall fragments. *Infect. Immun.*, v. 47, p.84–89, 1985.

CHANDLER, R. L. Experimental bacterial mastitis in the mouse. *J Med Microbiol*. v. 3, p. 273–282, 1970.

CHARTERIS, W. P.; KELLY, P. M.; MORELLI, L.; COLLINS, J. K. The role and therapeutic potential of *Lactobacillus* species in female urogenital tract infection. *Microecol. Ther.*, v. 26, p. 59–96, 1997.

CHARTERIS, A. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J Food Protect.* v. 61, n. 12, p. 1636-1643, 1998.

CHEN, H.; WANGA, S.; CHENA, M. Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiol.* v. 25, p. 492–501, 2008.

CHIN, C.; MONACK, D. M.; NATHAN, S. Genome wide transcriptome profiling of a murine acute melioidosis model reveals new insights into how *Burkholderia pseudomallei* overcomes host innate immunity. *BMC Genomics*, v. 11, 672, 2010.

CHO, I.; BLASER, M. J. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat. Rev. Genet.*, v. 13 (4), p. 260-270, 2012.

CHYE, F.Y.; ABDULLAH, A.; AYOB, M. K. Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. *Food Microbiol.*, v. 21, p. 535–541, 2004.

COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. Legislação e Ética. 2006. Disponível em: <<http://www.cobea.org.br>>. Acesso em: 01 mar. 2009. COBEA. 2009.

COLLA, M. F. Valor da haptoglobina no plasma comparado com a contagem de células somáticas do leite no diagnóstico da mastite subclínica em vacas leiteiras. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - UFRGS, Porto Alegre, 2009.

COLLADO, M. C.; DELGADO, S.; MALDONADO, A.; RODRÍGUEZ, J. M. Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* v. 48, p. 523–528, 2009.

COLLINS, C. H.; LYNE, P. M. *Microbiological Methods*. Vol. 4. London: Butterworths Publishers, 1980.

COLLINS, M. D.; FARROW, J. A.; PHILLIPS, B. A.; KANDLER, O. *Streptococcus garvieae* sp. nov. and *Streptococcus plantarum* sp. nov. *J. Gen. Microbiol.*, v. 129, p. 3427–3431, 1983.

CONSOLI, M. L.; DA SILVA, R. S.; NICOLI, J. R.; BRUÑA-ROMERO, O.; DA SILVA, R. G.; DE VASCONCELOS GENEROSO, S.; CORREIA, M. I. Randomized Clinical Trial: Impact of Oral Administration of *Saccharomyces boulardii* on Gene Expression of Intestinal Cytokines in Patients Undergoing Colon Resection. *JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.*, 2015.

CONTRERAS, G. A.; RODRÍGUEZ, J. M. Mastitis: Comparative etiology and epidemiology. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* v. 16, p. 339 – 356, 2011.

COOREVITS, A.; DE JONGHE, V.; VANDROEMME, J.; REEKMANS, R.; HEYRMAN, J.; MESSENS, W.; DE VOS, P.; HEYNDRICKX, M. Comparative analysis of the diversity of aerobic spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional dairy farms. *Systematic and Applied Microbiology.*, v. 31, p. 126– 140, 2008.

COPPOLA, S.; BLAIOTTA, G.; ERCOLINI, D. Dairy products. In: COCOLIN, L.; ERCOLINI, D. (Eds.) *Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods*. New York: Springer, p. 31–90, 2008.

CORR, S. C.; LI, Y.; RIEDEL, C. U.; O'TOOLE, P. W.; HILL, C.; GAHAN, C. G. Bacteriocin production as a mechanism for the anti-infective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 104(18), p. 7617–7621, 2007.

COSENTINO, S.; PODDA, G.S.; CORDA, A.; FADDA, M.E.; DEPLANO, M.; PISANO, M. B. Molecular detection of virulence factors and antibiotic resistance pattern in clinical *Enterococcus faecalis* strains in Sardinia. *J. prev. med. Hyg.*, v. 51, p. 31-36, 2010.

COSTA, E. O.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE E. T.; MELVILLE, P. A. Infectious bovine mastitis caused by environmental organisms. *J. Vet. Med.* v. 45, p. 65 – 71, 1998.

COSTELLO, S. Consultants guide to economics of mastitis, 2004. Disponível em: <<http://www.das.psu.edu/dairynutrition/documents/mastecon.pdf>>. Acesso em: 04. jul. 2006.

CREMONESI, P.; CASTIGLIONI, B.; Malferrari, G.; BIUNNO, I.; VIMERCATI, C.; MORONI P.; MORANDI, S.; LUZZANA, M. Technical note: improved method for rapid dna extraction of mastitis pathogens directly from milk. *J. Dairy Sci.* v. 89, p.163–169, 2006.

CRISPIE, F.; TWOMEY, D.; FLYNN, J.; HILL, C.; ROSS, P.; MEANEY, W. The lantibiotic lacticin 3147 produced in a milk-based medium improves the efficacy of a bismuth-based teat seal in cattle deliberately infected with *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Res.*, v. 72, p. 159–167, 2005.

CRISPIE, F; ALONSO-GÓMEZ, M; ÓLOUGHLIN, C; et al. Intramammary infusion of a live culture for treatment of bovine mastitis: effect of live lactococci on the mammary immune response. *J Dairy Res.* v. 75, p. 374–384, 2008.

CROSS, M. L. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol*, v. 34, p. 245-253, 2002.

CUCARELLA, C.; SOLANO, C.; VALLE, J.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADES J. R. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol*, v. 183 (9), p. 2888–2896, 2001.

DALTON, J. C. Antibiotic residue prevention in milk and dairy beef. *Western Dairy News*, v. 6, p. 79, 2006.

DANCER, S. J. How antibiotics can make us sick: the less obvious adverse effects of antimicrobial chemotherapy. *Lancet Infect Dis.* v. 4, p. 611–619, 2004.

DANOWSKI, K.; GROSS, J. J.; MEYER, H. H. D.; KLIEM, H. Effects of induced energy deficiency on lactoferrin concentration in milk and the lactoferrin reaction of primary bovine mammary epithelial cells in vitro. *J Anim Physiol Anim Nutr*, v. 97(4), p. 647-655, 2012.

DANIELSEN, M.; WIND, A.. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Intern J Food Microbiol*, v. 82 (1), p. 1-11, 2003.

DE MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli *J. Appl. Bact.*, v. 23 (1), p. 130-135, 1960.

DE MENEZES, A. B.; LEWIS, E.; O'DONOVAN, M.; O'NEILL, B. F.; CLIPSON, N.; DOYLE, E. M. Microbiome analysis of dairy cows fed pasture or total mixed ration diets. *FEMS Microbiol. Ecol.*, v. 78(2), p. 256-65, 2011.

DE MORENO DE LEBLANC, A.; MATAR, C.; FARNWORTH, E.; PERDIGÓN, G. Study of cytokines involved in the prevention of a murine experimental breast cancer by kefir. *Cytokine*, v. 34, p. 1–8, 2006.

DE OLIVEIRA, M. N.; JEWELL, K. A.; FREITAS, F. S.; BENJAMIN, L. A.; TÓTOLA, M. R.; BORGES, A. C.; MORAES, C. A.; SUEN, G. Characterizing the microbiota across the gastrointestinal tract of a Brazilian Nelore steer. *Vet. Microbiol.*, v. 164(3-4), p. 307-314, 2013.

DEBARRY, J.; GARN, H.; HANUSZKIEWICZ, A.; DICKGREBER, N.; BLÜMER, N.; VON MUTIUS, E.; BUFE, A.; GATERMANN, S.; RENZ, H.; HOLST, O.; HEINE, H. *Acinetobacter lwoffii* and *Lactococcus lactis* strains isolated from farm cowsheds possess strong allergy-protective properties. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 119(6), p. 1514-1521, 2007.

DEBARRY, J.; HANUSZKIEWICZ, A.; STEIN, K.; HOLST, O.; HEINE, H. The allergy-protective properties of *Acinetobacter lwoffii* F78 are imparted by its lipopolysaccharide. *Allergy*, v. 65(6), p. 690-697, 2010.

DEL RE, B.; SGORBATI, B.; MIGLIOLI, M.; PALENZONA, D. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Lett Appl Microbiol.* v. 31, p. 438–442, 2000.

DELBÈS, C.; ALI-MANDJEE, L.; MONTEL M. Monitoring bacterial communities in raw milk and cheese by culture-dependent and -independent 16S rRNA gene-based analyses. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 73 (6), 1882-1891, 2007.

DELCENSERIE, V.; MARTEL, D.; LAMOUREUX, M.; AMIOT, J.; BOUTIN, Y.; ROY, D. Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. *Curr. Issues Mol. Biol.*, v. 10, p. 37-54, 2008.

DEVRIESE, L. A.; HOMMEZ, J.; LAEVENS, H.; POT, B.; VANDAMME, P.; HAESBROUCK, F. Identification of aesculin-hydrolyzing streptococci, lactococci, aerococci and enterococci from subclinical intramammary infections in dairy cows. *Vet. Microbiol.*, v.70(1-2), p. 87-94, 1999.

DI GIACINTO, C.; MARINARO, M.; SANCHEZ, M.; STROBER, W.; BOIRIVANT, M. Probiotics ameliorate recurrent Th1-mediated murine colitis by inducing IL10 and IL10-dependent TGF-beta-bearing regulatory cells. *J. Immunol.*, v. 174, p. 3237-3246, 2005.

DIAZ-ROPERO, M. P.; MARTIN, R.; SIERRA, S.; LARA-VILLOSLADA, F.; RODRÍGUEZ, J. M.; XAUS, J. et al. Two *Lactobacillus* strains, isolated from breast milk, differently modulate the immune response. *J Appl Microbiol.* v. 102, p. 337–343, 2006.

DHANAWADE, N. B.; KALOREY, D. R.; SRINIVASAN, R.; BARBUDDHE, S. B.; KURKURE, N. V. Detection of intercellular adhesion genes and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Vet. Res. Commun.*, v. 34(1), p. 81-89, 2010.

D'ONOFRIO, A.; CRAWFORD, J. M.; STEWART, E. J.; WITT, K.; GAVRISH, E.; EPSTEIN, S.; CLARDY, J.; LEWIS, K. Siderophores from neighboring organisms promote the growth of uncultured bacteria. *Chem. Biol.*, v. 17(3), p.254–264, 2010.

DONLAND, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 15 (2), p. 167-193, 2002.

DRENKARD, E.; AUSUBEL, F. M. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature*, v. 416(6882), p. 740-743, 2002.

DUARTE, R. S.; BELLEI, B. C.; MIRANDA, O. P.; BRITO, M. A.; TEIXEIRA, L. M. Distribution of antimicrobial resistance and virulence-related genes among Brazilian group B streptococci recovered from bovine and human sources. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 49, p. 97–103, 2005.

DUCATELLE, R.; EECKHAUT, V.; HAESEBROUCK, F.; VAN IMMERSEEL, F. A review on prebiotics and probiotics for the control of dysbiosis: present status and future perspectives. *Animal*, v. 9 (1), p. 43-48, 2015.

DUNNE, C.; O'MAHONY, L.; MURPHY, L.; et al. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 73, p. 386S – 392S, 2001.

DUNNE, W. M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 15 (2), p. 155-166, 2002.

EKMEKCI, H.; ASLIM, B.; OZTURK, S. Characterization of vaginal lactobacilli coaggregation ability with *Escherichia coli*. *Microbiol. Immunol.*, v. 53(2), p. 59-65, 2009.

ERCOLINI, D.; RUSSO, F.; FERROCINO, I.; VILLANI, F. Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. *Food Microbiol*, v. 26, p. 228–231, 2009.

ESPECHE, M. C.; OTERO, M. C.; SESMA, F.; NADER-MACIAS, M. E. F. Screening of surface properties and antagonistic substances production by lactic acid bacteria isolated from the mammary gland of healthy and mastitic cows. *Vet Microbiol*, v. 135, p. 346–357, 2009.

ESPECHE, M. C.; PELLEGRINO, M.; FROLA, I.; LARRIESTRA, A.; BOGNI, C.; NADER-MACÍAS, M. E. F. Lactic acid bacteria from raw milk as potentially beneficial strains to prevent bovine mastitis. *Anaerobe*. v. 18, p. 103 -109, 2012.

EUROPEAN COMMUNITIES (EC 2001) Commission of the European Communities, Commission Recommendation, 2001/459/EC. *Official Journal of European Union L 161*, p. 42–44, 2001.

EUROPEAN COMMUNITIES (EC 2003) Commission of the European Communities, Commission Regulation (EC) No. 1831/2003. *Official Journal of European Union L 268*, p. 29–43, 2003.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA, 2005) Opinion of the scientific committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives. *EFSA Journal* 226, p. 1 –12, 2005.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA, 2007). Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EF SA Opinion of the Scientific Committee (Question No EFSA - Q- 2005- 293) Adopted on 19 November 2007. *EFSA Journal* 587, p. 1– 16, 2007.

FACKLAM, R. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 15, p. 613, 2002.

FALENTIN, H.; RAULT, L.; NICOLAS, A.; BOUCHARD, D. S.; LASSALAS, J.; LAMBERTON, P.; AUBRY, J. M.; MARNET, P. G.; LE LOIR, Y.; EVEN, S. Bovine Teat Microbiome Analysis Revealed Reduced Alpha Diversity and Significant Changes in Taxonomic Profiles in Quarters with a History of Mastitis. *Front. Microbiol.*, v. 7:480., 2016.

FERNÁNDEZ, L.; DELGADO, S.; HERRERO, H.; MALDONADO, A.; RODRÍGUEZ, J. M. The bacteriocin nisin, an effective agent for the treatment of staphylococcal mastitis during lactation. *J. Human Lact.*, v. 24, p. 311–316, 2008.

FERNÁNDEZ, L.; LANGA, S.; MARTÍN, V.; MALDONADO, A.; JIMÉNEZ, E.; MARTÍN, R.; RODRÍGUEZ, J. M. The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol. Res.* v. 69(1), p. 1-10, 2013.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION / WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report of a Joint FAO/WHO expert consultation on guidelines for the evaluation of probiotics in food. FAO/WHO of the United Nations, London Ontario, Canada. 2002.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION / WORLD HEALTH ORGANIZATION. FAO - FAOSTAT-Agriculture (Food and Agriculture Organization Statistics). Annual Agricultural data.2007. Disponível em: <<http://www.apps.fao.org/>> Acesso mai. 20, 2011.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION. FAO. Milking, milk production hygiene and udder health. FAO Animal Production and Health. Paper 78 (1989). Disponível em <<http://www.fao.org/DOC-REP/004/T0218E/T0218E00.htm>> Acesso 10 out. 2014.

FORGHANI, F.; NAZEMI, A.; OH, D.; SAFFAR, S.; TAGHINEZHAD, M.; HAMIDKHOLGH, K. Novel lactic Acid Bacteria in raw cow's milk from highland farms. *Ann Biol Res*, v. 3 (6), p. 3055-3061, 2012.

FOSCHINO, R.; INVERNIZZI, A.; BARUCCO, R.; STRADIOTTO, K. Microbial composition, including the incidence of pathogens, of goat milk from the Bergamo region of Italy during a lactation year. *J. Dairy Res.*, v. 69, p. 213–225, 2002.

FOSCHINO, R.; NUCERA, D.; VOLPONI, G.; PICOZZI, C.; ORTOFFI, M.; BOTTERO, M. T. Comparison of *Lactococcus garvieae* strains isolated in northern Italy from dairy products and fishes through molecular typing. *J. Appl. Microbiol.*, v. 105, p. 652–662, 2008.

FOULQUIÉ MORENO, M. R.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E.; DE VUYST, L. The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 106, p. 1–24, 2006.

FOX, L. K.; ZADOKS, R. N.; GASKINS, C. T. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. *Vet. Microbiol.*, v. 107, p. 295-299, 2005.

FRANCIOSI, E.; SETTANNI, L.; CAVAZZA, A.; POZNANSKI, E. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cow's milk. *Intern Dairy J*, v. 19, p. 3–11, 2009.

FRANZ, C.; HOLZAPFEL, W. H.; STILES, M. E. Enterococci at the crossroads of food safety? *Int. J. Food Microbiol.*, v. 47, p.1– 24, 1999.

FRANZ, C. M. A. P.; VANCANNEYT, M.; VANDEMEULEBROECKE, K.; WACHTER, M.; CLEENWERCK, I.; HOSTE, B.; SCHILLINGER, U.; HOLZAPFEL, W. H.; SWINGS, J. *Pediococcus stilesii* sp. nov., isolated from maize grains. *Intern J Syst Evol Microbiol*, v. 56, p. 329–333, 2006.

FREITAS, A. F.; DURÃES, M. C.; MENEZES, C. R. A. Girolando: raça tropical desenvolvida no Brasil. Circular Técnica 67. EMBRAPA, Juiz de Fora, 2002. Disponível em:< <https://www.embrapa.br/gado-de-leite/busca-de-publicacoes/-/publicacao/594820/girolando-raca-tropical-desenvolvida-no-brasil>> . Acesso em: 08 set. 2015.



- FRICKER, M.; SKÅNSENG, B.; RUDI, K.; STESSL, B.; EHLING-SCHULZ, M. Shift from farm to dairy tank milk microbiota revealed by a polyphasic approach is independent from geographical origin. *Intern J Food Microbiol*, v. 145, p.S24 –S33, 2011.
- FROLA, I. D.; PELLEGRINO, M. S.; ESPECHE, M. C.; GIRAUDO, J. A.; NADER-MACIAS M. E.; BOGNI, C. I. Effects of intramammary inoculation of *Lactobacillus perolens* CRL1724 in lactating cows' udders. *J. Dairy Res.*, v. 79 (1), p. 84-92, 2012.
- FROLA, I. D.; PELLEGRINO, M. S.; MAGNANO, G.; GIRAUDO, J. A.; ESPECHE, M. C.; NADER-MACIAS, M. E.; BOGNI, C. I. Histological examination of non-lactating bovine udders inoculated with *Lactobacillus perolens* CRL 1724. *J. Dairy Res.*, v. 80 (1), p. 28-35, 2013.
- FULLER, R. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.*, v. 66, p. 365–369, 1989.
- FUKUSHIMA, M.; NAKANO, M. Effects of a mixture of organisms *Lactobacillus acidophilus* or *Streptococcus faecalis* on cholesterol metabolism in rats fed on fat-and-cholesterol-enriched diet. *Br. J. Nutr.*, v. 76, p. 857–867, 1996.
- FUQUAY, J. W.; FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. (Eds.) *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 2ed. Academic Press : Oxford, UK, 2011.
- GAGGIÀ, F.; MATTARELLI P.; BIAVATI, B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *Int. J. Food Microbiol*, v. 141, p. S15– S28, 2010.
- GALDEANO, C. M.; DE MORENO DE LEBLANC, A. VINDEROLA, G.; BONET, M. E. B.; PERDIGÓN, G. Proposed model: mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. *Clin Vac Immunol*, v. 14, n. 5, p. 485–492, 2007
- GALLEGO C. G.; SALMINEN, S. Novel Probiotics and Prebiotics: How Can They Help in Human Gut Microbiota Dysbiosis? *Applied Food Biotechnology*, V. 3 (2), p. 72-81, 2016.
- GARRIGA, M.; RUBIO, R.; AYMERICH, T.; RUAS-MADIEDO, P. Potentially probiotic and bioprotective lactic acid bacteria starter cultures antagonise the *Listeria monocytogenes* adhesion to HT29 colonocyte-like cells. *Benef. Microbes.*, v. 8, p. 1-7, 2014.
- GERISCHER, U. (Ed). *Acinetobacter Molecular Biology*. 1<sup>a</sup> ed. University of Ulm, Germany, Caister Academic Press, 2008.
- GEVERS, D.; HUYS, G.; SWINGS, J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol Lett*, v. 205 (1), p. 31-36, 2001.
- GIANNINO, M. L.; ALIPRANDI, M.; FELIGINI, M.; VANONI, L.; BRASCA, M.; FRACCHETTI, F. A DNA array based assay for the characterization of microbial community in raw milk. *J. Microbiol. Methods*, v.78, p.181-188, 2009.
- GIBSON, T.; ABD-EL-MALEK, Y. The formation of carbon dioxide by lactic acid bacteria and *Bacillus licheniformis* and a cultural method of detecting the process. *J. Dairy Res.*, v. 14, p. 35–38, 1945.
- GIRAFFA, G. Enterococci from foods. *FEMS Microbiol Rev.*, v. 26, p. 163 –171, 2002.
- GIULIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DECALLONNE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C.. An Overview of real-time quantitative pcr: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, v. 25, p. 386–401, 2001.

GODKIN, J. D.; BAZER, F. W.; ROBERTS, R. M. Ovine trophoblast protein 1, an early secreted blastocyst protein, binds specifically to uterine endometrium and affects protein synthesis. *Endocrinology*. v. 114, p. 120-130, 1984.

GRICE, E. A.; KONG, H. H.; CONLAN, S.; DEMING, C. B.; DAVIS, J. YOUNG, A. C. NISC Comparative Sequencing Program, BOUFFARD, G. G; BLAKESLEY, R. W; MURRAY, P. R.; GREEN, E. D.; TURNER, M. L.; SEGRE, J. A. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science*. v.324, p. 1190–1192, 2009.

GUEIMONDE, M.; LAITINEN, K.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation. *Neonatology*. v. 92, p. 64–66, 2007.

GUERRA, P. V. P.; LIMA, L. N.; SOUZA, T. C.; MAZOCHI, V.; PENNA, F. J.; SILVA, A. M.; NICOLI, J. R.; GUIMARÃES, E. V. Pediatric functional constipation treatment with Bifidobacterium-containing yogurt: A crossover, double-blind, controlled trial. *World J. Gastroenterol.*, v. 17, p. 3916-3921, 2011.

GUIMARAES, V. D.; INNOCENTIN, S.; LEFEVRE, F.; AZEVEDO, V.; WAL, J. M.; LANGELLA, P.; CHATEL, J. M. Use of native lactococci as vehicles for delivery of DNA into mammalian epithelial cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 72, p. 7091– 7097, 2006.

HAN, Y. W.; SHEN, T.; CHUNG, P.; BUHIMSCHI, I. A.; BUHIMSCHI, C. S. Uncultivated bacteria as etiologic agents of intra-amniotic inflammation leading to preterm birth. *J. Clin. Microbiol.*, v. 47(1), p. 38–47, 2009.

HARMON, R. J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J Dairy Sci*. v. 77:2103-2112, 1994.

HARRIGAN, W. F.; MACCANCE, M.E.C. *Laboratory Methods in Microbiology*. London and New York: Academic Press, 1976

HAVELL, E. A. Evidence that tumor necrosis factor has an important role in antibacterial resistance. *J. Immunol.*, v. 143(9), p. 2894-2899, 1989.

HEALD, C. W. Morphometric study of experimentally induced *Staphylococcus bovis* mastitis in the cow. *Am. J. Vet. Res.* v. 40, p.1294 – 1298, 1979;

HEALTH CANADA (HC, 2006). Evidence for Safety and Efficacy of Finished Natural Health Products. [online]. Ottawa (ON): Natural Health Products Directorate, Health Canada. Disponível em <[http://www.hc-sc.gc.ca/dhpmpps/prodnatur/legislation/docs/efe-paie\\_e.html](http://www.hc-sc.gc.ca/dhpmpps/prodnatur/legislation/docs/efe-paie_e.html)> Acessado 08 out. 2014.

HÉBERT, A.; SAYASITH, K.; SÉNÉCHAL, S.; DUBREUIL, P.; LAGACÉ, J. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 193, p. 57-62, 2000.

HEIKKILÄ, M. P.; SARIS, P. E. J. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J Appl Microbiol*, v. 95, p. 471-478, 2003.

HEIKKILÄ, A. M.; NOUSIAINEN, J. I.; PYÖRÄLÄ, S. Costs of clinical mastitis with special reference to premature culling. *J. Dairy Sci.*, v. 95 (1), p.139-150, 2012.

HELLEMANS, J.; MORTIER, G.; PAEPE, A. D.; SPELEMAN, F.; VANDESOMPELE, J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.*, v. 8, R19, p. 1-14, 2007.

HEMME, D.; FOUCAUD-SCHEUNEMANN, C. *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *Int. Dairy J.*, v. 14, p. 467–494, 2004.

HERREROS, M.; SANDOVAL, H.; GONZALEZ, L.; CASTRO, J.; FRESNO, J.; TORNADIJO, M. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *Food Microbiol.*, v. 22, p. 455–459, 2005.

HONEYMAN, A. L.; FRIEDMAN, H.; BENDINELLI, M.; FOX, L. K.; BAYLES, K. W.; BOHACH, G. A. *Staphylococcus aureus* Mastitis. In: Bendinelli, M., Friedman, H., (editors). *Staphylococcus aureus; Infection and disease*. US: Springer, p. 271–94, 2002.

HUNT, K. M.; FOSTER, J. A.; FORNEY, L. J.; SCHÜTTE, U. M. E.; BECK, D. L., et al. Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PLoS ONE.*, v. 6(6), e21313, 2011.

HUOVINEN, P. Bacteriotherapy: the time has come. *BMJ.* v. 323, p. 353–354. 2001.

HUYNH, H. T.; ROBITAILLE, G.; TURNER, J. D. Establishment of bovine mammary epithelial cells (MAC-T): an in vitro model for bovine lactation. *Exp. Cell. Res.*, v. 197 (2), p. 191-199, 1991.

IEBBA, V.; TOTINO, V.; GAGLIARDI, A.; SANTANGELO, F.; CACCIOTTI, F.; TRANCASSINI, M.; MANCINI, C.; CICERONE, C.; CORAZZIARI, E.; PANTANELLA, F.; SCHIPPA, S. Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota. *New Microbiol.*, v. 39 (1), p. 1-12, 2016.

INNOCENTIN, S.; GUIMARÃES, V.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V.; LANGELLA, P.; CHATEL, J. M.; LEFÈVRE, F. *Lactococcus lactis* expressing either *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein A or *Listeria monocytogenes* internalin A can efficiently internalize and deliver DNA in human epithelial cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 75 (14), p. 4870-4878, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Rebanho bovino brasileiro cresce e chega a 212,3 milhões de cabeças de gado, 2016. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2015/10/rebanho-bovino-brasileiro-cresce-e-chega-a-212-3-milhoes-de-cabecas-de-gado>>. Acesso em: 04. jul. 2016.

INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 62, DE 29 DE DEZEMBRO DE 2011 DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Disponível em <<http://www.apcbrh.com.br/files/IN62.pdf>>. Acesso em: dez, 2016.

INTERNATIONAL SCIENTIFIC ASSOCIATION FOR PROBIOTICS AND PREBIOTICS. (ISAPP) Probiotics: a consumer guide for making smart choices, 2009. Disponível em <[http://www.isapp.net/docs/Consumer\\_Guidelines-probiotic.pdf](http://www.isapp.net/docs/Consumer_Guidelines-probiotic.pdf)>. Acesso em: jul. 2009.

ISAACS, C.E. Human milk inactivates pathogens individually, additively and synergistically. *J. Nutr.*, v. 135, p. 1286-1288, 2005

JAMI, E.; ISRAEL, A.; KOTSER, A.; MIZRAHI, I. Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. *ISME J.*, v. 7 (6), p. 1069-79, 2013.

JANS, C.; FOLLADOR, R.; HOCHSTRASSER, M.; LACROIX, C.; MEILE, L.; STEVENS, M. J. Comparative genome analysis of *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* CJ18, an African fermented camel milk isolate with adaptations to dairy environment. *BMC Genomics*, v. 14, 200, 2013.

JEWELL, K. A.; MCCORMICK, C. A.; ODT, C. L.; WEIMER, P. J.; AND SUEN, G. Ruminant bacterial community composition in dairy cows is dynamic over the course of two lactations and correlates with feed efficiency. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 81, p. 4697–4710, 2015.

JIMÉNEZ, E.; DELGADO, S.; MALDONADO, A.; ARROYO, R.; ALBUJAR, M.; GARCIA, N.; JARIOD, M.; FERNANDEZ, L. et al. *Staphylococcus epidermidis*: a differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants. *BMC Microbiol.*, v. 8, 143, 2008.

JIMÉNEZ, E.; FERNÁNDEZ, L.; MALDONADO, A.; MARTÍN, R.; OLIVARES, M.; XAUS, J.; RODRÍGUEZ, J. M. Oral Administration of strains *Lactobacillus* isolated from breast milk as an alternative for the treatment of infectious mastitis during lactation. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 74, n. 15, 4650-4655, 2008.

JIMÉNEZ, E.; LADERO, V.; CHICO, I.; MALDONADO-BARRAGÁN, A.; LÓPEZ, M.; MARTÍN, V.; FERNÁNDEZ, L.; FERNÁNDEZ, M.; ÁLVAREZ, M. A.; TORRES, C.; RODRÍGUEZ, J. M. Antibiotic resistance, virulence determinants and production of biogenic amines among enterococci from ovine, feline, canine, porcine and human milk. *BMC Microbiol.*, v. 10 (13) : 288, 2013.

JUÁREZ TOMÁS, M. S.; OTERO, M. C.; OCAÑA, V.; NADER-MACÍAS, M. E. F.. Production of antimicrobial substances by lactic acid bacteria I: determination of hydrogen peroxide. In: Spencer, R. J.; Ragout de Spencer, A. (editors). *Methods in Molecular Biology*. Totowa: Humana Press Inc.; p. 337, e46, 2004.

KEEFE, G. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. *Can. Vet. J.*, v. 38(7), p. 429 –437, 1997.

KELTON, D. F.; LISSEMORE, K. D.; MARTIN, R. E. Recommendations for recording and calculating the incidence of selected clinical diseases of dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, v. 81, p. 2502 – 2509, 1998.

KEMPER, N.; GERJETS, I. Bacteria in milk from anterior and posterior mammary glands in sows affected and unaffected by postpartum dysgalactia syndrome (PPDS). *Acta. Vet. Scand.* v. 51(1):26, 2009.

KIM, J.; CHUN, J.; HAN, H. U. *Leuconostoc kimchii* sp. nov., a new species from kimchi. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 50, p. 1915–1919, 2000.

KIRJAVAINEN, P. V.; APOSTOLOU, E.; ARVOLA, T.; SALMINEN, S. J.; GIBSON, G. R.; ISOLAURI, E. Characterizing the composition of intestinal microflora as a prospective treatment target in infant allergic disease. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v. 32, p. 1–7, 2001.

KIRK, J. H.; BARTLETT, P. C. Nonclinical *Pseudomonas aeruginosa* mastitis in a dairy herd. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 184, p. 671–673, 1984.

KLINDWORTH, A.; PRUESSE, E.; SCHWEER, T.; PEPLIES, J.; QUAST, C.; HORN, M.; GLÖCKNER, F. O. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.*, v. 41 (1), e1, 2013.

- KLOSTERMANN, K.; CRISPIE, F.; FLYNN, J.; ROSS, R. P.; HILL, C.; MEANEY, W. Intramammary infusion of a live culture of *Lactococcus lactis* for treatment of bovine mastitis: comparison with antibiotic treatment in field trials. *J Dairy Res.* v. 75, p. 365–373, 2008.
- KNOBLOCH, J. K.M.; HORSTKOTTE, M. A.; ROHDE, H.; MACK, D. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med. Microbiol. Immunol.*, v. 191, p. 101-106, 2002.
- KOPP-HOOLIHAN, L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. *J. Am. Diet. Assoc.*, v. 101, p. 229–238, 2001.
- KOPYLOVA, E. Scripts for benchmarking and comparison of short read OTU clustering tools available in QIIME, 2016. Disponível em: < <https://github.com/ekopylova/OTU-clustering>>. Acesso em: 26. jul. 2016.
- KOS, B. et al. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J Appl Microbiol*, v. 94, p. 981 - 987, 2003.
- KOZICH, J. J.; WESTCOTT, S. L.; BAXTER, N. T.; HIGHLANDER, S. K.; SCHLOSS, P. D. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 79 (17); p. 5112-5120, 2013.
- KUANG, Y.; TANI, K.; SYNNOTT, A. J.; OHSHIMA, K.; HIGUCHI, H.; NAGAHATA, H. et al. Characterization of bacterial population of raw milk from bovine mastitis by culture-independent PCR-DGGE method. *Biochem. Eng. J.*, v.45, 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*, v. 8(4) : e61959, 2013.
- LAFARGE, V.; OGIER, J. C.; GIRARD, V.; MALADEN, V.; LEVEAU, J. Y.; GRUSS, A. et al. Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 70, p. 5644-5650, 2004.
- LAGUARDIA-NASCIMENTO, M.; BRANCO, K. M.; GASPARINI, M. R.; GIANNATTASIO-FERRAZ, S.; LEITE, L. R.; ARAUJO, F. M.; SALIM, A. C.; NICOLI, J. R.; DE OLIVEIRA, G. C.; BARBOSA-STANCIOLI, E. F. Vaginal Microbiome Characterization of Nellore Cattle Using Metagenomic Analysis. *PLoS One*, v. 10(11) : e0143294, 2015.
- LAMMERS, A.; NUIJTEN, P. J.; KRUIJT, E.; STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N.; VECHT, U.; SMITH, H. E.; VAN ZIJDERVELD, F.G. Cell tropism of *Staphylococcus aureus* in bovine mammary gland cell cultures. *Vet. Microbiol.* v. 67, p. 77–89, 1999.
- LATUGA, M. S.; STUEBE, A.; SEED, P. C. A review of the source and function of microbiota in breast milk. *Semin. Reprod. Med.*, v. 32 (1), p. 68-73, 2014.
- LAVILLA-LERMA, L.; PÉREZ-PULIDO, R.; MARTÍNEZ-BUENO, M.; MAQUEDA, M.; VALDIVIA, E. Characterization of functional, safety, and gut survival related characteristics of *Lactobacillus* strains isolated from farmhouse goat's milk cheeses. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 163 (2-3), p. 136-145, 2013.
- LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S. C. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 8(3), p. 171-184, 2010.

LECCHI C.; DILDA, F.; SARTORELLI, P.; CECILIANI, F. Widespread expression of SAA and Hp RNA in bovine tissues after evaluation of suitable reference genes. *Vet Immunol Immunopathol.* v. 145, p. 556–562, 2012.

LEE, J.; BANNERMAN, D. D.; PAAPE, M. J.; HUANG, M.; ZHAO, X.; Characterization of cytokine expression in milk somatic cells during intramammary infections with *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* by real-time PCR. *Vet. Res.* v. 37, p. 219–229, 2006.

LEITNER, G.; SHOSHANI, E.; KRIFUCKS, O.; CHAFFER, M.; SARAN, A. Milk leucocyte population patterns in bovine udder infection of different etiology. *J. Vet. Med. B.* v. 47, p. 581–58, 2000.

LEPAGE, E.; BRINSTER, S.; CARON, C. et al. Comparative genomic hybridization analysis of *Enterococcus faecalis*: identification of genes absent from food strains. *J. Bacteriol.*, v. 188, p. 6858 – 6868, 2006.

LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol.*, v. 15, p. 67 – 78, 2004.

LEVAY, P. F.; VILJOEN, M. Lactoferrin: a general review. *Haematol.* v. 80, n. 3, p. 252-267, 1995.

LI, H. P.; GUO, Y. J.; ZHU, H. S.; ZHONG, K.; ZHA, G. M.; WANG, L. F.; WANG, Y. L.; LU, W. F.; WANG, Y. Y.; YANG, G. Y. IL-8 mRNA expression in the mouse mammary glands during pregnancy and lactation. *Genet. Mol. Res.*, v. 11 (4), p. 4746 – 4753, 2012.

LIAO, X.; PENG, F.; FORNI, S.; MCLAREN, D.; PLASTOW, G.; STOTHARD, P. Whole genome sequencing of Gir cattle for identifying polymorphisms and loci under selection. *Genome*, v. 56 (10), p. 592-598, 2013.

LILLY, D. M.; STILLWELL, R. H. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*, v. 147, p. 747-748, 1965.

LIMA, M. C. G.; DE SENA, M. J.; MOTA, R. A.; MENDES, E. S.; DE ALMEIDA, C. C.; R. P. SILVA, P. E. Contagem de células somáticas e análises físico-químicas e microbiológicas do leite cru tipo c produzido na região agreste do estado de Pernambuco. *Arq Inst Biol* v. 73 (1), p. 89-95, 2006.

LIU, Z.; LOZUPONE, C.; HAMADY, M.; BUSHMAN, F. D.; KNIGHT, R. Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Res.*, v. 35, n. 8, e120, 2007.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, v. 25, p. 402–408, 2001.

LORCA, G.; TORINO, M. I.; FONT, D.; LJUNGH, V. A. A. Lactobacilli express cell surface proteins which mediate binding of immobilized collagen and fibronectin. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 206, p. 31–37, 2002.

LYCZAK, J. B.; CANNON, C. L.; PIER, G. B. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect.*, v. 2, p. 1051–1060, 2000.

MACPHERSON, A. J.; UHR, T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science*. v. 303, p. 1662–1665, 2004.

MAGALHAES, H. R.; EL FARO, L.; CARDOSO, V. L.; DE PAZ, C. C. P.; CASSOLI, L. D.; MACHADO, P. F. Effects of environmental factors on somatic cell count and reduction of milk yield on Holstein cows. *Brazil J. Anim. Sci.*, v. 35 (2), p. 415-421, 2006.

MAGURRAN, A. E. Ecological diversity and its measurement. New Jersey: Princenton University Press, 1988.

MAIDAK, B. L.; COLE, J. R.; LILBURN, T. G.; PARKER, C. T. J.; SAXMAN, P. R.; FARRIS, R. J. et al. The RDP-II (Ribosomal database project). *Nucleic Acids Res*, v. 29, p. 173–174, 2001.

MAO, S.; ZHANG, R.; WANG, D.; ZHU, W. The diversity of the fecal bacterial community and its relationship with the concentration of volatile fatty acids in the feces during subacute rumen acidosis in dairy cows. *BMC Vet, Res.*, v. 8:237, 2012.

MAPA. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 62, DE 29 DE DEZEMBRO DE 2011. Disponível em : < [http://www.sindilat.com.br/gomanager/arquivos/IN62\\_2011%282%29.pdf](http://www.sindilat.com.br/gomanager/arquivos/IN62_2011%282%29.pdf)>. Acessado em 20 de nov. de 2014.

MARTÍN, R.; LANGA, S.; REVIRIEGO, C.; JIMENEZ, E.; MARIN, M. L.; OLIVARES, M.; BOZA, J.; JIMENEZ, J.; FERNANDEA, L.; XAUS, J.; RODRIGUEZ, J. M. The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. *Trends Food Sci Technol*, v. 15, p.121–127, 2004.

MARTÍN, R.; HEILIG, H. G. H. J.; ZOETENDAL, E.G.; JIMENEZA, E.; FERNANDEZ, L.; SMIDT, H.; RODRIGUEZA, J. M. Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. *Res Microbiol*, v. 158, p. 31-37, 2007a.

MARTÍN, R.; HEILIG, G.H.; ZOETENDAL, E.G.; SMIDT, H.; RODRIGUEZ, J. M. Diversity of the *Lactobacillus* group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut. *J. Appl. Microbiol.* v.103(6), p. 2638 – 2644, 2007b.

MARTÍN, R.; JIMÉNEZ, E.; HEILIG, H.; FERNÁNDEZ, L.; MARÍN, M. L.; et al. Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. *Appl. Env. Microbiol.* v. 75, p. 965–969, 2009.

MARTÍN, R.; OLIVARES, M.; PEREZ, M.; XAUS, J.; TORRE, C.; FERNANDEZ, L.; et al. Identification and evaluation of the probiotic potential of lactobacilli isolated from canine milk. *Vet. J.* v. 185(2), p. 193 – 198, 2010.

MARTÍN, R.; SUÁREZ, J. E. Biosynthesis and degradation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by vaginal lactobacilli. *Appl Environ Microbiol*, v. 76 (2), p. 400-405, 2010.

MARTEAU, P.; VAERMAN, J. P.; DEHENNIN, J. P.; et al. Effect of intrajejunal perfusion and chronic ingestion of *Lactobacillus johnsonii* strain La1 on serum concentrations and jejunal secretions of immunoglobulins and serum proteins in healthy humans. *Gastroenterol Clin Biol*, v. 21, p. 293 – 298, 1997.

MATHUR, S.; SINGH, R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria – a review. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 105, p. 281– 295, 2005.

MCDUGALL, S. Bovine mastitis: epidemiology, treatment and control. *N. Z. Vet. J.*, v. 50, p. 81– 84, 2002.

MEIRELLES, F. V.; ROSA, A.J.; LÔBO, R. B.; GARCIA, J. M.; SMITH, L. C.; DUARTE, F. A. Is the American zebu really *Bos indicus*? *Genetics and Molecular Biology*, v. 22, p. 543-546, 1999.

MENA, K. D.; GERBA, C. P. Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, v. 201, p. 71–115, 2009.

MENTEM, J. F. M. Aditivos alternativos na produção de aves: probióticos e prebióticos. In: *Anais da 38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*. Piracicaba, SP: SBZ, p. 141-157. 2001.

MENZIES, F.D.; BRYSON, D.G.; MCCALLION, T.; MATTHEWS, D.I. A study of mortality among suckler and dairy cows in Northern Ireland in 1992. *Vet. Rec.* v. 137, p. 531–536, 1995.

MICHEL, V.; HAUWUY, A.; CHAMBA, J. Raw milk microbial composition: differences in links with microbial practices. *Rencontres Rech. Rumin.*, v. 13, p. 309–312, 2006.

MILANOV, D.; LAZIĆ, S.; VIDIĆ, B.; PETROVIĆ, J.; BUGARSKI, D.; ŠEGULJEV, Z. Slime production and biofilm forming ability by *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates. *Acta Vet.* v. 60(2-3), p. 217-226, 2010.

MOHAMMED, R.; BRINK, G. E.; STEVENSON, D. M.; NEUMANN, A. P.; BEAUCHEMIN, K. A.; SUEN, G.; WEIMER, P. J. Bacterial communities in the rumen of Holstein heifers differ when fed orchard grass as pasture vs. hay. *Front. Microbiol.*, v. 5:689, 2014.

MOREIRA, J. L. S. et al. Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S-23S rRNA restriction profiling. *BMC Microbiol.* v. 5, n. 15, p. 1-9, 2005.

MORROW, A.L.; RANGEL, J.M. Human milk protection against infectious diarrhea: implications for prevention and clinical care. *Sem Pediatr Infect Dis.* v. 15, p. 221–228, 2004.

NADER-MACÍAS, M. E.; OTERO, M. C.; ESPECHE, M. C.; MALDONADO, N. C. Advances in the design of probiotic products for the prevention of major diseases in dairy cattle. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 35(11), p. 1387-1395, 2008.

NAIDU, A. S.; BIDLACK, W. R.; CLEMENS, R. A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v. 39, p. 13–126, 1999.

NAIKI, Y.; MICHELSEN, K. S.; ZHANG, W.; CHEN, S.; DOHERTY, T. M.; ARDITI, M. Transforming growth factor-beta differentially inhibits MyD88 dependent, but not TRAM- and TRIF-dependent, lipopolysaccharide-induced TLR4 signaling. *J. Biol. Chem.*, v. 280 : 5491-5, 2005.

NATIONAL ANIMAL HEALTH MONITORING SYSTEM. Reference of dairy cattle health and management practices in the United States. USDA: APHIS: VS: CEAH, Fort Collins, CO. (NAHMS) 2007.

NESTLÉ. Disponível em <http://www.nestle.com.br/site/cozinha/enciclopedia/ingredientes/leite/introducao.aspx>. Acesso em: 07 mar. 2013.

NEUMANN, E. Comportamento “in vitro” de estirpes de *Lactobacillus acidophilus* sensível e resistente à bacteriocina sob condições do trato digestivo. 1991. 86 f. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1991.



- NEUTRA, M. R.; FREY, A.; KRAEHNBUHL, J. P. M Cells: Gateways: for Mucosal Infection and Immunization. *Cell*, v. 86, p. 345-348, 1996.
- NEWBURG, D.S. Innate immunity and human milk. *J. Nutr.*, v. 135, p. 1038-1312, 2005.
- NG, S. C.; HART, A. L.; KAMM, M. A.; STAGG, A. J.; KNIGHT, S.C.. Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflamm. Bowel Dis.* v. 15, n. 2, p. 300-310, 2009.
- NICOLI, J. R.; VIEIRA, L. Q. Probióticos, prebióticos e simbióticos: Moduladores do sistema digestivo. *Ciência Hoje*, v. 28, p. 34-38, 2000.
- NISSLE, A. Explanations of the significance of colonic dysbacteria & the mechanism of action of *E. coli* therapy (Mutaflor). *Medizinische*, v. 4, n. 21, p. 1017–1022, 1959.
- NMC. Guidelines on normal and abnormal raw milk based on somatic cell counts and signs of clinical mastitis. 2001.
- NOTEBAER, T S.; MEYER, E. Mouse models to study the pathogenesis and control of bovine mastitis. A review, *Vet Quart.* v. 28:1, p. 2-13, 2006.
- OCANA, V. S.; HOLGADO, A. P .R.; NADER-MACIAS, M. E. Selection of vaginal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating *Lactobacillus* species for probiotic use. *Curr. Microbiol.*, v. 38, p. 279–284, 1999.
- OGIER, J. C.; SON, O.; GRUSS, A.; TAILLIEZ, P.; DELACROIX-BUCHET, A. Identification of bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, v. 68 (8), p. 3691-3701, 2002.
- OHRIS, S. P.; JOSHI, B. K. Composition of camel milk. *Indian Vet. J.*, v. 38, p.514-516, 1961.
- OIKONOMOU, G.; MACHADO, V. S.; SANTISTEBAN, C.; SCHUKKEN, Y. H.; BICALHO, R. C. Microbial diversity of bovine mastitic milk as described by pyrosequencing of metagenomics 16s rDNA. *PLoS One*, v. 7(10):e47671, 2012.
- OIKONOMOU, G.; BICALHO, M. L.; MEIRA, E.; ROSSI, R. E.; FODITSCH, C.; MACHADO, V. S.; TEIXEIRA, A. G.; SANTISTEBAN, C.; SCHUKKEN, Y. H.; BICALHO, R. C. Microbiota of cow's milk; distinguishing healthy, sub-clinically and clinically diseased quarters. *PLoS One*, v. 9 (1) : e85904, 2014.
- OLIVARES, M.; DÍAZ-ROPERO, M. P.; SIERRA, S.; LARA-VILLOSLADA, F.; FONOLLÁ, J.; NAVAS, M. et al. Oral intake of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 enhances the effects of influenza vaccination. *Nutrition*. v.23, p. 254–260, 2007.
- OLIVEIRA, M.; BEXIGA, R.; NUNES, S. F.; CARNEIRO, C.; CAVACO, L. M.; BERNARDO, F. et al., Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Vet. Microbiol.*, v. 118, p. 133-140, 2006.
- OLIVEIRA, C. C. et al . Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 31, n. 2, p. 104-110, 2011.
- OTERO, M. C.; MORELLI, L.; NADER-MACIAS, M. E. Probiotic properties of bovine vaginal lactic acid bacteria to prevent metritis. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 43, p. 91–97, 2006.
- OTERO, M. C.; NADER-MACÍAS, M.E. *Lactobacillus* adhesion to epithelial cells from bovine vagina. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed) *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Badajoz, Spain: Formatex, p. 749–757, 2007.

OUADGHIRI, M.; VANCANNEYT, M.; VANDAMME, P.; NASER, S.; GEVERS, D.; LEFEBVRE, K.; SWINGS, J.; AMAR, M. Identification of lactic acid bacteria in Moroccan raw milk and traditionally fermented skimmed milk 'lben'. *J Appl Microbiol*, v. 106 (2), p. 486-495, 2008.

OVIEDO-BOYSO, J.; VALDEZ-ALARCÓN, J. J.; CAJERO-JUÁREZ, M.; OCHOA-ZARZOSA, A.; LÓPEZ-MEZA, J. E.; BRAVO-PATIÑO, A.; BAIZABAL-AGUIRRE, V. M. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J. Infect.*, v. 54 (4), p. 399-409, 2007.

PAAPE, M.; MEHRZAD, J.; ZHAO, X.; DETILLEUX, J.; BURVENICH, C. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *J Mamm Gland Biol Neoplasia*. v. 7, p. 109-121, 2002.

PACINI, F.; CARIOLATO, D.; ANDRIGHETTO, C.; LOMBARDI, A. Occurrence of *Streptococcus macedonicus* in Italian cheeses. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 261, p. 69 – 73, 2006.

PARENTE, E.; COGAN, T. M. Starter cultures: general aspects. In: FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUINEE, T. P. (Eds.) *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*. London, UK: Chapman and Hall, p. 123–148, 2004.

PARVEZ, S.; MALIK, K. A.; AH KANG, S.; KIM, H. Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J Appl Microbiol*, v. 100, p. 1171–1185, 2006.

PATEL, R. D.; MURRAY, I. A.; FLAVENY, C. A.; KUSNADI, A.; PERDEW G. H. Ah receptor represses acute-phase response gene expression without binding to its cognate response element. *Laboratory Investigation*, v. 89, p. 695–707, 2009.

PATTERSON, J. L.; GIRERD, P. H.; KARJANE, N. W.; JEFFERSON, K. K. Effect of biofilm phenotype on resistance of *Gardnerella vaginalis* to hydrogen peroxide and lactic acid. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v. 197, e170, 2008.

PEIXOTO, M.G.C.D.; PENNA, V.M.; TEODORO, R.L. et al. Progreso genético no Guzerá leiteiro MG. *Anais 6o Encontro de Produtores de Gado Leiteiro F1*. p.47-69, 2008.

PENNA, V. M.; PEIXOTO, M. G. C. D.; VERNEQUE, R. S. O programa de melhoramento da aptidão leiteira da raça Guzerá. Disponível em: < <http://www.guzeraibituruna.com.br/textooprograma.html> >. Acesso 18 de out. 2014.

PERDIGÓN, G.; ALVAREZ, S.; MEDINA, M.; VINTIÑI, E.; ROUX, E. Influence of the oral administration of lactic acid bacteria on IgA producing cells associated to bronchus. *Int. J. Immunol. Pharmacol.*, v. 12, p. 97–102, 1999.

PEREIRA, A. R.; MACHADO, P.F.; SARRIÈS, G. A. Contagem de células somáticas e características produtivas de vacas da raça holandesa em lactação. *Scientia Agric*, v.58 (4), p.649-654, 2001.

PEREYRA, E. A.L.; DALLARD, B. E.; CALVINHO, L. F. Aspectos de la respuesta inmune innata en las infecciones intramamarias causadas por *Staphylococcus aureus* en bovinos. *Revista Argentina de Microbiología*, v. 46 (4), p. 363-375, 2014.

PEREZ, P. F.; MINNARD, Y.; DISALVO, E. A.; DEANTONI, G. L. Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. *Appl. Environ. Microb.*, v. 64, p. 21–26, 1998.

PEREZ, P. F.; DORE, J.; LECLERC, M.; LEVENEZ, F.; BENYACOUB, J.; SERRANT, P., et al. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics*. v.119 (3), p. 724 – 732, 2007.

PÉREZ-IBARRECHE, M.; CASTELLANO, P.; VIGNOLO, G. Evaluation of anti-Listeria meat borne *Lactobacillus* for biofilm formation on selected abiotic surfaces. *Meat. Sci.*, v. 96 (1), p. 295-303, 2014.

PERSSON-WALLER, K.; COLDITZ, I. G.; LUN, S.; OSTENSSON, K. Cytokines in mammary lymph and milk during endotoxin-induced bovine mastitis. *Res. Vet. Sci.*, v. 74 (1), p. 31-36, 2003.

PITKÄLÄ, A.; HAVERI, M.; PYÖRÄLÄ, S.; MYLLYS, V.; HONKANEN-BUZALSKI, T. Bovine mastitis in Finland 2001--prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *J. Dairy Sci.*, v. 87(8), p. 2433-2441, 2004.

POGACIC, T.; MANCINI, A.; SANTARELLI, M.; BOTTARI, B.; LAZZ, C.; NEVIANI, E.; GATTI, M. Diversity and dynamic of lactic acid bacteria strains during aging of a long ripened hard cheese produced from raw milk and undefined natural starter. *Food Microbiol*, v. 36, p. 207-215, 2006.

POWER, E. Gangrenous mastitis in dairy herds. *Vet. Rec.*, v. 153, p. 791–792, 2003.

POZNANSKI, E.; CAVAZZA, A.; CAPP, F.; COCCONCELLI, P. S. Indigenous raw milk microbiota influences the bacterial development in traditional cheese from an alpine natural park. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 92, 141–151, 2004.

PSONI, L.; TZANETAKIS, N.; LITOPOULOU-TZANTAKI, E. Microbiological characteristics of Batzos, a traditional Greek cheese from raw goat's milk. *Food Microbiol.*, v. 20, p. 575–582, 2003.

PYORALA, S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Vet. Res.* v. 34(5), p. 565– 578, 2003.

QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F. O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res, Database issue:D590-6*, 2013.

QUIGLEY, L.; O'SULLIVAN, O.; BERESFORD, T. P.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; COTTER, P. D. Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 150, p. 81 –94, 2011.

QUIGLEY, L.; O'SULLIVAN, O.; STANTON, C.; BERESFORD, T. P.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; COTTER, P. D. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol Rev.*, v. 37, p. 664–698, 2013.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>. Acesso em: 26 jul. 2016.

RAINARD, P.; RIOLLET, C. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet. Res.* v. 37, p. 369–400, 2006.

RAMSEY, D. T.; KENT, J. C.; OWENS, R. A.; HARTMANN, P. E. Ultrasound imaging of milk ejection in the breast of lactating women. *Pediatrics*. v. 113, p. 361–367, 2004.

REID, G.; MCGROARTY, J. A.; ANGOTTI, A.; COOK, R. L. Lactobacillus inhibitor production against *Escherichia coli* and coaggregation ability with uropathogens. *Can. J. Microbiol.*, v. 34, p. 344–351, 1988.

RENIERO, R.; COCCONCELLI, P. S.; BOTTAZZI, V.; MORELLI, L. High frequency conjugation in lactobacillus mediated by na aggregation promoting factor. *J. Gen. Microbiol.*, v. 138, p. 763–768, 1991.

REVIRIEGO, C.; EATON, T.; MARTIN, R.; JIMENEZ, E.; FERNANDEZ, L.; GASSON, M. J.; RODRIGUEZ, J. M. Screening of virulence determinants in *Enterococcus faecium* strains isolated from breast milk. *J. Hum. Lact.*, v. 21, p. 131–137, 2005.

REYSENBACH, A. L.; LONGNECKER, K.; KIRSHTEIN, J. Novel bacterial and archaeal lineages from an in situ growth chamber deployed at a mid-atlantic ridge hydrothermal vent. *Appl Environ Microbiol*, v. 66, n. 9, p. 3798 - 3806, 2000.

RICHTER, R. L.; LEDFORD, R. A.; MURPHY, S. C. Milk and milk products. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. (Ed). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 3rd ed. Washington DC: American Public Health Association, p. 837–838, 1992.

RINALDI, M.; LI, R. W.; CAPUCO, A. V. Mastitis associated transcriptomic disruptions in cattle. *Vet Immunol Immunopathol.* v. 138, p. 267–279, 2010.

RIOLLET, C.; RAINARD, P.; POUTREL, B. Differential induction of complement fragment C5a and inflammatory cytokines during intramammary infections with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v. 7 (2), p. 161-167, 2000.

RIOLLET, C.; RAINARD, P.; POUTREL, B. Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. *J. Dairy Sci.*, v. 84, p.1077-1084, 2001.

RODRIGUEZ, C.; COFRE, J. V.; SANCHEZ, M.; FERNANDEZ, P.; BOGGIANO, G.; CASTRO, E. Lactobacilli isolated from vaginal vault of dairy and meat cows during progesteronic stage of estrous cycle. *Anaerobe*, v. 17, p.15-18, 2011.

ROSSITTO, P. V.; RUIZ, L.; KIKUCHI, Y.; GLENN, K.; LUIZ, K.; WATTS, J. L.; CULLOR, J. S. Antibiotic susceptibility patterns for environmental streptococci isolated from bovine mastitis in central California dairies. *J. Dairy Sci.*, v. 85(1), p. 132-138, 2002.

ROWSON, A. D.; WANG, Y. Q.; AALSETH, E.; FORSBERG, N. E.; PUNTENNEY, S. B.. Effects of an immunomodulatory feed additive on the development of mastitis in a mouse infection model using four bovine-origin isolates. *Animal*, v. 5, p. 220-229, 2011.

RUSSELL, J.; RYCHLIK, J. Factors that alter rumen microbial ecology. *Science*, v. 292, p. 1119–1122, 2001.

RYAN, M. P.; MEANEY, W. J.; ROSS, R. P.; HILL, C. Evaluation of lacticin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. *Appl Environ Microbiol.* v. 64, p. 2287–2290, 1998.

RYAN, M. P.; PEMBROKE, J. T.; ADLEY, C. C. Genotypic and phenotypic diversity of *Ralstonia pickettii* and *Ralstonia insidiosa* isolates from clinical and environmental sources including High-purity Water. *Diversity in Ralstonia pickettii*. *BMC Microbiol.*, v. 11:194, 2011.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDEN, R.; MATTO, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.*, v. 84, p. 197–215, 2000.

SALMINEN, S.; ISOLAURI, E.; SALMINEN, E. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie Leeuwenhoek*, v. 70, p. 347–358, 1996.

SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. (Eds.) *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects*. New York: Basel, Marcel Dekker, 2004.

SAM MA, Z.; GUAN, Q.; YE, C.; ZHANG, C.; FOSTER, J. A.; FORNEY, L. J. Network analysis suggests a potentially 'evil' alliance of opportunistic pathogens inhibited by a cooperative network in human milk bacterial communities. *Sci. Rep.*, v. 5:8275, 2015.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning v. 2*, New York: Cold spring harbor laboratory press, 1989.

SANDES, S. H., ALVIN, L.B.; SILVA, B. C.; ZANIRATI, D.F.; JUNG, L. R.; NICOLI, J. R.; NEUMANN, E.; NUNES, A. C. Lactobacillus species identification by amplified ribosomal 16S-23S rRNA restriction fragment length polymorphism analysis. *Benef. Microbes*, v. 5(4), p. 471-481, 2014.

SANDRI, M.; MANFRIN, C.; PALLAVICINI, A.; STEFANON, B. Microbial biodiversity of the liquid fraction of rumen content from lactating cows. *Anim. Int. J. Anim. Biosci.*, v. 8, p. 572–579, 2014.

SANTOS, M. V. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/qualidade-do-leite/impacto-economico-da-mastite-parte-12-16201n.aspx>>. Acesso em 07. mar 2013.

SANTOS, T. M.; GILBERT, R. O.; BICALHO, R. C. Metagenomic analysis of the uterine bacterial microbiota in healthy and metritic postpartum dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v. 94(1), p.291-302, 2011.

SARGEANT, J. M.; SCHUKKEN, Y. H.; LESLIE, K. E. Ontario bulk milk somatic cell count reduction program: progress and outlook. *J. Dairy Sci.*, v. 81, p. 1545–1554, 1998.

SARTOR, R. B. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics and prebiotics. *Gastroenterology*, v. 126, p. 1620–1633, 2004.

SCHUKKEN, Y. H.; WILSON, D.J.; WELCOME, F.; GARRISON-TIKOFSKY, L.; GONZALEZ, R. N. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Vet. Res.*, v. 34 (5), p. 579-596, 2003.

SCHULTZ, M.; STRAUCH, U. G.; LINDE, H.; WATZL, S.; OBERMEIER, F.; GÖTTL, C.; DUNGER, N.; GRUNWALD, N.; SCHÖLMERICH, J.; RATH, H. C. Preventive effects of *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on acute and chronic intestinal inflammation in two different murine models of colitis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v. 11, n. 2, p. 372–378, 2004.

SCOTT, J.; ROBERTSON, M.; FITZPATRICK, J.; KNIGHT, C.; MULHOLLAND, S. Occurrence of lactational mastitis and medical management: A prospective cohort study in Glasgow. *Int. Breastfeed J.* v. 3 (1), p. 1 –6, 2008.

SENGUPTA, R.; ALTERMANN, E.; ANDERSON, R. C.; MCNABB, W. C.; MOUGHAN, P. J.; ROY, N. C. The role of cell surface architecture of lactobacilli in host-microbe interactions in the gastrointestinal tract. *Mediators Inflamm.*, 2013:237921, 2013.

SERVIN, A.L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev*, v. 28, p. 405–440, 2004.

SHANKS, O. C.; KELTY, C. A.; ARCHIBEQUE, S.; JENKINS, M.; NEWTON, R. J.; MCLELLAN, S. L.; HUSE, S. M.; SOGIN, M. L. Community structures of fecal bacteria in cattle from different animal feeding operations. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 77(9), p. 2992-3001, 2011.

SHARMA, R.; SANODIYA, B. S.; THAKUR, G. S.; JAISWAL, P.; PAL, S.; SHARMA, A.; BISEN, P. S. Characterization of Lactic Acid Bacteria from Raw Milk Samples of Cow, Goat, Sheep, Camel and Buffalo with Special Elucidation to Lactic Acid Production. *Brit Microbiol Res J*, v. 3 (4), p. 743-752, 2013.

SHARPE, M. E. Identification of the lactic acid bacteria. In: SKINNER, F.A.; LOVELOCK, D.W. (eds). *Identification Methods for Microbiologists*. London: Academic Press, p. 233- 259, 1979.

SHORTT, C. The probiotic century: historical and current perspectives. *Trends Food Sci Technol*, v. 10, p. 411-417, 1999.

SIEZEN, R. J.; KOK, J.; ABEE, T.; SCHAAF SMA, G. *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2002.

SILVA, A. M.; BAMBIRRA, E. A.; OLIVEIRA, A. L.; SOUZA, P. P.; GOMES, D. A.; VIEIRA, E. C.; NICOLI, J. R. Protective effect of bifidus milk on the experimental infection with *Salmonella Typhimurium* in conventional and gnotobiotic mice. *J Appl Microbiol*, v. 86, p. 331-336, 1999.

SILVA, B.C.; JUNG, L.R.; SANDES, S.C. et al. In vitro assessment of functional properties of lactic acid bacteria isolated from faecal microbiota of healthy dogs for potential use as probiotics. *Benef. Microbes*, v.4, p.267-275, 2013.

SINGH, B.; GAUTAM, S. K.; VERMA, V.; KUMAR, M.; SINGH, B. Metagenomics in animal gastrointestinal ecosystem: potential biotechnological prospects. *Anaerobe*. v. 14, p. 138-144, 2008.

SINGH, P.; PRAKASH, A. Screening of lactic acid bacteria for antimicrobial properties against *Listeria monocytogenes* isolated from milk products at Agraregion. *Intern. J Food Safety*, v. 11, p. 81-87, 2009

SMIT, G.; SMIT, B. A.; ENGELS, W. J. M. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 29, p. 591 –610, 2005.

SORDILLO, L. M. Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Livest. Prod. Sci.* v. 98, p. 89– 99, 2005.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKI, I.; SAVI, B.; SVABI-VLAHOVI, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods*, v. 40, p. 175-179, 2000.

STOCK, L.; ZOCCAL, R. Mudanças na produção mundial de leite, 2013. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/panorama/mudancas-na-producao-mundial-de-leite-85143n.aspx>>. Acesso em: 28. jul. 2016

STRAUSS, E. Fighting bacterial fire with bacterial fight. *Science*, v. 290, p. 2231–2233, 2000.

SU, Y. A.; SULAVIK, M. C.; HE., P.; MAKINEN, K. K.; MAKINEN, P-L.; FIEDLER, S.; WIRTH, R.; CLEWELL, D. B. Nucleotide sequence of the gelatinase gene (gelE) from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. *Infect. Immun.*, v. 59, p. 415–420, 1991.

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 Res.*, v. 38(22): e205, 2010.

TAKAHASHI, H.; KOMATSU, T.; HODATE, K.; HORINO, R.; YOKOMIZO, Y. Effect of intramammary injection of RbIL-8 on milk levels of somatic cell count, chemiluminescence activity and shedding patterns of total bacteria and *S. aureus* in Holstein cows with naturally infected-subclinical mastitis. *J. Vet. Med. B.* v. 52, p. 32–37, 2005.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.*, v. 17, p. 1-14, 2005.

TAMILSELVAM, B.; ALMEIDA, R. A.; DUNLAP, J. R.; OLIVER, S. P. *Streptococcus uberis* internalizes and persists in bovine mammary epithelial cells. *Microb. Pathog.* v. 40, p. 279–285, 2006.

TEITELBAUM, J. E.; WALKER, W. A. Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. *Annu. Rev. Nutr.*, v. 22, p. 107-138, 2002.

TEIXEIRA, L. M.; MERQUIOR, V. L.; VIANNI, M. C.; CARVALHO, M. G.; FRACALANZZA, S. E.; STEIGERWALT, A. G.; BRENNER, D. J.; FACKLAM, R. R. Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garvieae* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 46(3), p. 664-668, 1996.

TENHAGEN, B. A.; KÖSTER, G.; WALLMANN, J.; HEUWIESER, W. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J. Dairy Sci.*, v. 89(7), 2542-2551, 2006.

THAKER, H.; BRAHMBHATT, M.; NAYAK, J.; THAKER, H. C. Isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from milk and milk products and their drug resistance patterns in Anand, Gujarat. *Vet. World*, v.6, p.10– 13, 2013.

THORNTON, P.K. Livestock production: recent trends, future prospects. *Philos. Trans. R. Soc. B. Biol. Sci.* v.365, p. 2853–2867, 2010.

TILSALA-TIMISJÄRVI, A.; ALATOSSAVA, T. Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *J Food Microbiol*, v. 35, n. 1, p. 49 - 56, 1997.

TOGO, M. A.; FERESU, S. B.; MUTUKUMIARA, A. N. Identification of lactic acid bacteria isolated from opaque beer (Chibuko) for potential use as starter culture. *J. Food Technol.*, v. 7 (3), p. 93-97, 2002.

TOLEDO-ARANA, A.; VALLE, J.; SOLANO, C.; ARRIZUBIETA, M. J.; CUCARELLA, C.; LAMATA, M.; AMORENA, B.; LEIVA, J.; PENADES, J. R.; LASA, I. The enterococcal surface protein, esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *App Environ Microbiol*, v. 67 (10), p. 4538–4545, 2001.

TORMO, M.; KNECHT, E.; GÖTZ, F.; LASA, I.; PENADÉS, J. Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer. *Microbiology*, v. 151, p. 2465-2475, 2005.

TORRIANI, S.; FELIS, G. E.; DELLAGLIO, F. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex pcr assay with *reca* gene-derived primers. *App Environ Microbiol*, v. 67(8), p. 3450–3454, 2001.

TURPIN, W.; HUMBLLOT, C.; NOORDINE, M. L.; THOMAS M.; GUYOTM J. P. *Lactobacillaceae* and cell adhesion: genomic and functional screening. *PLoS One*, v. 7(5) : e38034, 2012.

TWOMEY, D. P.; WHEELLOCK, A. I.; FLYNN, J.; MEANEY, W. J.; HILL, C.; ROSS, R. P. Protection against *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cows using a bismuth-based teat seal containing the bacteriocin, lacticin 3147. *J. Dairy Sci.*, v. 83, p. 191–198, 2000.

UEHARA, Y.; KIKUCHI, K.; NAKAMURA, T.; NAKAMA, H.; AGEMATSU, K.; KAWAKAMI, Y.; MARUCHI, N.; TOTSUKA, K. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced by viridans group streptococci may contribute to inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization of oral cavities in newborns. *Clin. Infect. Dis.*, v. 32, p. 1408–1413, 2001.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Disponível em <<http://www.usda.gov>>. Acesso em: 10 ago. 2016. USDA. 2014.

VACHEYROU, M.; NORMAND, A-C.; GUYOT, P.; CASSAGNE, C.; PIARROUX, R.; BOUTON, Y. Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 146, p. 253–262, 2011.

VAN DER MEULEN, R.; GROSU-TUDOR, S.; MOZZI, F.; VANINGELGEM, F.; ZAMfIR, M.; FONT DE VALDEZ, G. et al. Screening of lactic acid bacteria isolates from dairy and cereal products for exopolysaccharide production and genes involved. *Intern J Food Microbiol*, v. 118, p. 250–258, 2007.

VASEDUVAN, P.; NAIR, M. K. M.; ANNAMALAI, T.; VENKITANARAYANAN, K. S. Phenotypic and genotypic characterisation of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet. Microbiol.*, v. 92, p. 179-185, 2003.

VASUDEVAN, P.; NAIR, M. K.; ANNAMALAI, T.; VENKITANARAYANAN, K. S. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet. Microbiol.*, v. 92(1-2), p. 179-185, 2003.

VAYSSIER-TAUSSAT, M.; ALBINA, E.; CITTI, C.; COSSON, J. F.; JACQUES, M. A.; LEBRUN, M. H.; LE LOIR, Y.; OGLIASTRO, M.; PETIT, M. A.; ROUMAGNAC, P.; CANDRESSE, T. Shifting the paradigm from pathogens to pathobiome: new concepts in the light of meta-omics. *Front. Cell Infect. Microbiol.*, v. 4:29, 2014.

VENDRELL, D.; BALCAZAR, J. L.; RUIZ-ZARZUELA, I.; DE BLAS, I.; GIRONES, O.; MUZQUIZ, J. L. *Lactococcus garvieae* in fish: a review. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 29, p. 177– 198, 2006.



VERDIER-METZ, I.; MICHEL, V.; DELBES, C.; MONTEL, M. C. Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk? *Food Microbiol.*, v. 26, p. 305–310, 2009.

VERDIER-METZ, I.; GAGNE, G.; BORNES, S.; MONSALLIER, F.; VEISSEIRE, P.; DELBÈS-PAUS, C.; MONTEL, M. C. Cow teat skin, a potential source of diverse microbial populations for cheese production. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 78, p. 326–333, 2012.

VERNEQUE, R. S. Programa Nacional de Melhoramento do Gir Leiteiro (PNMGL). 2010. Disponível em: < [http://www.universidadedoleite.com.br/conteudo/15/2/10/Programa\\_Nacional\\_de\\_Melhoramento\\_do\\_Gir\\_Leiteiro\\_\(PNMGL\)](http://www.universidadedoleite.com.br/conteudo/15/2/10/Programa_Nacional_de_Melhoramento_do_Gir_Leiteiro_(PNMGL))>. Acesso em 31. jul. 2016.

VERSTEGEN, M. W. A.; WILLIAMS, B. A. Alternatives to the use of antibiotics as growth promoters for monogastric animals. *Anim Biotechnol*, v. 13, p. 113– 127, 2002.

VIGUIER, C.; ARORA, S.; GILMARTIN, N.; WELBECK, K.; O'KENNEDY, R. Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends Biotechnol.*, v. 27 (8), p. 486-493, 2009.

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative in vitro study of probiotic characteristics and biological barriers resistance. *Food Res Intern*, v. 36, p. 895-904, 2003.

VINTIÑI, E.; OCAÑA, V.; NADER DE MACÍAS, M. E. Effect of lactobacilli administration in the vaginal tract of mice: evaluation of side effects and local immune response by local administration of selected strains. *Methods Mol. Biol.* v. 268, p. 401–410, 2004.

VIZOSO-PINTO, M. G.; SCHUSTER, T.; BRIVIBA, K.; WATZL, B.; HOLZAPFEL, W. H.; FRANZ, C. M. Adhesive and chemokine stimulatory properties of potentially probiotic *Lactobacillus* strains. *J. Food Prot.*, v. 70 (1), p.125-134, 2007.

VOGEL, A.; HUTCHISON, B. L.; MITCHELL, E. A. Mastitis in the first year postpartum. *Birth*. v. 26(4), p. 218 –225, 1999.

VU, B.; CHEN, M.; CRAWFORD, R. J.; IVANOVA, E. P. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules*, v. 14, 2535-2554, 2009.

XAUS, J.; MARTÍN, R.; OLIVARES, M.; LANGA, S.; REVIRIEGO, C.; BOZA, J.; JIMÉNEZ, J.; MARÍN, M. L.; FERNÁNDEZ, L.; RODRÍGUEZ, J. M. Human breast milk is a source of probiotics. In: NFIF 2003. New Functional Ingredients and Foods. Safety, Health and Convenience. Copenhagen: EFFoST Meeting, p. 9–11, 2003.

XIE, W.; WANG, Y.; HUANG, Y.; YANG, H.; WANG, J.; HU, Z. Toll-like receptor 2 mediates invasion via activating NF-kappaB in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 379 (4), p. 1027-1032, 2009.

XU, Y.; JIANG, L.; MURRAY, B. E.; WEINSTOCK, G. M. Enterococcus faecalis antigens in human infections. *Infect. Immun.*, v. 65 (10), p. 4207-4215, 1997.

WALKER D. K.; GILLILAND S. E. Relationships Among Bile Tolerance, Bile Salt Deconjugation, and Assimilation of Cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *J Dairy Sci*, v. 76, n. 4, p. 956 - 961, 1993.

WALKER, W. A.; IYENGAR, R. S. Breast milk, microbiota, and intestinal immune homeostasis. *Pediatr. Res.*, v. 77(1-2), p. 220-228, 2015.

- WALL, R. J.; POWELL A. M.; PAAPE, M. J.; KERR, D. E.; BANNERMAN, D. D.; PURSEL, V. G.; WELLS, K. D.; TALBOT, N.; HAWK, H. W.. Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. *Nat. Biotechnol.* v. 23, p. 445–451, 2005.
- WALSH, M. C.; GARDINER, G. E.; HART, O. M.; LAWLOR, P. G; DALY, M.; LYNCH, B. Predominance of a bacteriocin-producing *Lactobacillus salivarius* component of a five-strain probiotic in the porcine ileum and effects on host immune phenotype. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 64, p. 317–327, 2008.
- WALTHER, C.; ROSSANO, A.; THOMANN, A.; PERRETEN, V. Antibiotic resistance in *Lactococcus* species from bovine milk: presence of a mutated multidrug transporter *mdt (A)* gene in susceptible *Lactococcus garvieae* strains. *Vet. Microbiol.*, v. 131, p. 348 –357, 2008.
- WARD, L.J.H.; TIMMINS, M.J. Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Lett Appl Microbiol*, v. 29, p. 90–92, p.1999
- WATTS, J. L. Etiological agents of bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* v. 16, p. 41–66, 1988.
- WEE, Y. J.; YUM, J. S.; KIM, D.; RYU, H. W. Batch and repeated batch production of L (+)-lactic acid by *Enterococcus faecalis* RKY1 using wood hydrolyzate and corn steep liquor. *J. Ind. Microbiol. Biot.*, v. 33, p. 431-435, 2006.
- WEGMANN, U.; O'CONNELL-MOTHERWAY, M.; ZOMER, A. et al. Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *J. Bacteriol.*, v. 189, p. 3256 – 3270, 2007.
- WEIMER, P. J. Redundancy, resilience, and host specificity of the ruminal microbiota: implications for engineering improved ruminal fermentations. *Front. Microbiol.*, v. 6:296, 2015.
- WELLNITZ, O.; KERR, D. E. Cryopreserved bovine mammary cells to model epithelial response to infection. *Vet Immunol Immunopathol.* v. 101, p. 191–202, 2004.
- WILLIAMS, E. J.; FISCHER, D. P.; NOAKES, D. E.; ENGLAND, G. C.; RYCROFT, A.; DOBSON, H.; SHELDON, I. M. The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. *Theriogenology*, v. 68(4), p. 549-559, 2007.
- WOODWARD, W. D.; BESSER, T. E.; WARD, A. C.; CORBEIL, L. B. In vitro growth inhibition of mastitis pathogens by bovine teat skin normal flora. *Can. J. Vet. Res.*, v. 51, p. 27–31, 1987.
- WOUTERS, J. T. M.; AYAD, E. H.; HUGENHOLTZ, J.; SMIT, G. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *Internl Dairy J*, v. 12, p. 91–109, 2002.
- YAMANAKA, H.; HISAEDA, K.; HAGIWARA, K.; KIRISAWA, R.; IWAI, H. ELISA for bovine interleukin-1 receptor antagonist and its application to mastitic sera and whey. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 62 : 661e4, 2000.
- YOUNES, J. A.; VAN DER MEI, H. C.; VAN DEN HEUVEL, E.; BUSSCHER, H. J.; REID, G. Adhesion forces and coaggregation between vaginal staphylococci and lactobacilli. *PLoS One*, v. 7(5) : e36917, 2012.
- ZHANG, H.; ISSEKUTZ, A. C. Down-regulation of monocyte transendothelial migration and endothelial adhesion molecule expression by fibroblast growth factor. *Am. J. Pathol.*, v. 160 : 2219e30, 2002.

ZHANG, Y. J.; LI, S.; GAN, R. Y.; ZHOU, T.; XU, D. P.; LI, H. B. Impacts of Gut Bacteria on Human Health and Diseases. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 16, p. 7493-7519, 2015.

ZHAO, X.; LACASSE P. Mammary tissue damage during bovine mastitis: Causes and control. *J. Anim. Sci.* v. 86, p. 57-65, 2008.

ZINICOLA, M.; LIMA, F.; LIMA, S.; MACHADO, V.; GOMEZ, M.; DÖPFER, D.; GUARD, C.; BICALHO, R. Altered Microbiomes in Bovine Digital Dermatitis Lesions, and the Gut as a Pathogen Reservoir. *PLoS ONE*, v. 10(3): e0120504, 2015.

ZOCCAL, R.; SOUZA, A. D.; GOMES, A. T.; LEITE, J. L. B. Produção de Leite na Agricultura Familiar. Disponível em < <http://www.sober.org.br/palestra/12/09O433.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2012.

ZOETENDAL, E.G.; VAUGHAN, E. E.; DE VOS, W. M. A microbial world within us. *Mol. Microbiol.*, v. 59, p. 1639–1650, 2006.

ZUILY, S.; MAMI, Z.; MEUNE, C. *Lactococcus garvieae* endocarditis. *Arch. Cardiovasc. Dis.*, v. 104, p. 138–139, 2011.

**ANEXOS**

## ANEXO 1 – Tabela total de isolamento de BAL

Isolado	Linhagem	Espécie	Isolado	Raça	Fazenda	Status saúde	Fonte
183	≠	<i>Weissella paramesenteroides</i>	GIR46L4*	GIR	B	SAUDÁVEL	LEITE
186	≠	<i>Weissella paramesenteroides</i>	GIR48L2*	GIR	B	DOENTE (400)	LEITE
207	≠	<i>Weissella paramesenteroides</i>	GIRO31L1*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	LEITE
209	≠	<i>Weissella paramesenteroides</i>	GIRO32L1*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	LEITE
215	~207	<i>Weissella paramesenteroides</i>	GIRO40L1*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	LEITE
216	~209	<i>Weissella paramesenteroides</i>	GIRO46L1*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	LEITE
220	~209	<i>Weissella paramesenteroides</i>	GIRO48L2*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	LEITE
65	≠	<i>Weissella paramesenteroides</i>	GUZ3S4*	GUZERÁ	D	SAUDÁVEL	SWAB
57	~209	<i>Weissella paramesenteroides</i>	GUZ6L1*	GUZERÁ	D	DOENTE(260)	LEITE
311	≠	<i>Weissella paramesenteroides</i>	HOL25S3	HOLÂNDES	E	DOENTE (232)	SWAB
222	≠	<i>Weissella paramesenteroides</i>	GIRO50L1*	GIROLANDO	B	DOENTE	LEITE
307	~186	<i>Weissella paramesenteroides</i>	HOL6S3	HOLÂNDES	E	SAUDÁVEL	SWAB
191	≠	<i>Weissella paramesenteroides</i>	GIR51L1*	GIR	B	SAUDÁVEL	LEITE
193	≠	<i>Weissella paramesenteroides</i>	GIR52L2*	GIR	B	SAUDÁVEL	LEITE
201	~191	<i>Weissella paramesenteroides</i>	GIRO23L2*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	LEITE
185	≠	<i>Weissella confusa</i>	GIR48L1*	GIR	B	DOENTE (400)	LEITE
196	≠	<i>Weissella confusa</i>	GIRO21L1*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	LEITE
202	≠	<i>Weissella confusa</i>	GIRO26L1*	GIROLANDO	B	DOENTE	LEITE
178	≠	<i>Weissella cibaria</i>	GIR44L1*	GIR	B	SAUDÁVEL	LEITE
208	≠	<i>Weissella cibaria</i>	GIRO31L2*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	LEITE
204	≠	<i>Weissella cibaria</i>	GIRO27L2*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	LEITE
155	≠	<i>Streptococcus salivarius</i>	GIRO9S1	GIROLANDO	A	DOENTE	SWAB
50	≠	<i>Streptococcus salivarius</i>	GUZ4S6*	GUZERÁ	D	SAUDÁVEL	SWAB
159	≠	<i>Streptococcus pseudoporcinus</i>	GIR15L3	GIR	A	SAUDÁVEL	LEITE
176	≠	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	GIRO4L4	GIROLANDO	A	SAUDÁVEL	LEITE
154	≠	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	GIRO4S3	GIROLANDO	A	SAUDÁVEL	SWAB
153	~154	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	GIRO4L1	GIROLANDO	A	SAUDÁVEL	LEITE
91	~154	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	GIRO4S3*	GIROLANDO	A	SAUDÁVEL	SWAB
160	~154	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	GIRO4S1	GIROLANDO	A	SAUDÁVEL	SWAB
148	≠	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	GIR25S7	GIR	A	DOENTE (319)	SWAB
149	≠	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	GIR25S8	GIR	A	DOENTE (319)	SWAB
146	≠	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	GIR25S5	GIR	A	DOENTE (319)	SWAB
144	~146	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	GIR25S3	GIR	A	DOENTE (319)	SWAB
147	~146	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	GIR25S6	GIR	A	DOENTE (319)	SWAB
81	≠	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	GIR25S2*	GIR	A	DOENTE (319)	SWAB
82	~81	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	GIR25S1*	GIR	A	DOENTE (319)	SWAB
93	~81	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	GIR25S3*	GIR	A	DOENTE (319)	SWAB
138	≠	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	GIR20S1	GIR	A	SAUDÁVEL	SWAB
358	≠	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	HOL36L2*	HOLÂNDES	E	SAUDÁVEL	LEITE
164	≠	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	GIRO15S2	GIROLANDO	A	DOENTE (412)	SWAB
133	≠	<i>Streptococcus infantarius</i>	GIR14S1	GIR	A	DOENTE (240)	SWAB
134	~133	<i>Streptococcus infantarius</i>	GIR14S2	GIR	A	DOENTE (240)	SWAB
47	≠	<i>Streptococcus henryi</i>	GUZ10S2*	GUZERÁ	D	SAUDÁVEL	SWAB

... continuação

Isolado	Linhagem	Espécie	Isolado	Raça	Fazenda	Status saúde	Fonte
169	≠	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	GIR28S1	GIR	A	SAUDÁVEL	SWAB
139	≠	<i>Streptococcus equinus</i>	GIR20S2	GIR	A	SAUDÁVEL	SWAB
63	≠	<i>Streptococcus bovis</i>	GUZ1S7*	GUZERÁ	D	SAUDÁVEL	SWAB
55	≠	<i>Streptococcus bovis</i>	GUZ1L1*	GUZERÁ	D	SAUDÁVEL	LEITE
357	≠	<i>Pediococcus stilesii</i>	HOL36L1*	HOLÂNDES	E	SAUDÁVEL	LEITE
280	≠	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIR44S3*	GIR	B	SAUDÁVEL	SWAB
285	~280	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIR48S1*	GIR	B	DOENTE (400)	SWAB
288	≠	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIR49S1*	GIR	B	DOENTE	SWAB
289	≠	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIR49S2*	GIR	B	DOENTE	SWAB
290	≠	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIR50S1*	GIR	B	SAUDÁVEL	SWAB
291	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIR52S1*	GIR	B	SAUDÁVEL	SWAB
292	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIR52S2*	GIR	B	SAUDÁVEL	SWAB
293	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIR52S3*	GIR	B	SAUDÁVEL	SWAB
294	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIR53S1*	GIR	B	SAUDÁVEL	SWAB
295	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIR53S2*	GIR	B	SAUDÁVEL	SWAB
296	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIR53S3*	GIR	B	SAUDÁVEL	SWAB
174	≠	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO18S1	GIROLANDO	A	SAUDÁVEL	SWAB
224	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO22S2*	GIROLANDO	B	DOENTE	SWAB
225	≠	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO22S3*	GIROLANDO	B	DOENTE	SWAB
226	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO22S4*	GIROLANDO	B	DOENTE	SWAB
233	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO25S1*	GIROLANDO	B	DOENTE	SWAB
234	≠	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO25S2*	GIROLANDO	B	DOENTE	SWAB
236	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO25S4*	GIROLANDO	B	DOENTE	SWAB
237	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO25S5*	GIROLANDO	B	DOENTE	SWAB
238	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO26S1*	GIROLANDO	B	DOENTE	SWAB
239	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO26S2*	GIROLANDO	B	DOENTE	SWAB
297	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO23S1	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	SWAB
227	≠	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO23S1*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	SWAB
228	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO23S2*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	SWAB
229	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO23S3*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	SWAB
230	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO24S1*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	SWAB
231	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO24S2*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	SWAB
232	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO24S3*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	SWAB
298	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO25S1	GIROLANDO	B	DOENTE	SWAB
240	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO26S3*	GIROLANDO	B	DOENTE	SWAB
244	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO28S1*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	SWAB
300	≠	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO29S1	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	SWAB
247	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO29S1*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	SWAB
248	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO29S2*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	SWAB
249	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO29S3*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	SWAB
250	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO30S1*	GIROLANDO	B	DOENTE	SWAB
251	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO30S2*	GIROLANDO	B	DOENTE	SWAB
255	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO32S2*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	SWAB
257	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO33S1*	GIROLANDO	B	DOENTE	SWAB

... continuação

Isolado	Linhagem	Espécie	Isolado	Raça	Fazenda	Status saúde	Fonte
258	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO33S2*	GIROLANDO	B	DOENTE	SWAB
259	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO33S3*	GIROLANDO	B	DOENTE	SWAB
260	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO35S1*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	SWAB
261	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO37S2*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	SWAB
262	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO39S1*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	SWAB
263	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO39S2*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	SWAB
264	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO39S3*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	SWAB
265	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO40S1*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	SWAB
266	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO40S2*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	SWAB
267	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO40S3*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	SWAB
268	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO41S1*	GIROLANDO	B	DOENTE	SWAB
269	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO43S1*	GIROLANDO	B	DOENTE	SWAB
270	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO43S2*	GIROLANDO	B	DOENTE	SWAB
271	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO43S3*	GIROLANDO	B	DOENTE	SWAB
272	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO44S2*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	SWAB
273	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO44S3*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	SWAB
274	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO45S1*	GIROLANDO	B	DOENTE	SWAB
275	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO45S2*	GIROLANDO	B	DOENTE	SWAB
252	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO31S1*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	SWAB
253	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO31S2*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	SWAB
254	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO32S1*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	SWAB
256	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO32S3*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	SWAB
276	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO47S1*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	SWAB
277	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO47S2*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	SWAB
242	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO27S2*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	SWAB
243	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO27S3*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	SWAB
245	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO28S2*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	SWAB
302	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO34S1	GIROLANDO	B	DOENTE	SWAB
246	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO28S3*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	SWAB
241	~290	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GIRO27S1*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	SWAB
41	≠	<i>Lactococcus lactis</i>	GUZ3S2*	GUZERÁ	D	SAUDÁVEL	SWAB
40	≠	<i>Lactococcus lactis</i>	GUZ3S3*	GUZERÁ	D	SAUDÁVEL	SWAB
68	~40	<i>Lactococcus lactis</i>	GUZ3S6*	GUZERÁ	D	SAUDÁVEL	SWAB
319	≠	<i>Lactococcus lactis</i>	HOL3L1	HOLÂNDES	E	SAUDÁVEL	LEITE
187	≠	<i>Lactococcus lactis</i>	GIR49L1*	GIR	B	DOENTE	LEITE
188	~187	<i>Lactococcus lactis</i>	GIR49L2*	GIR	B	DOENTE	LEITE
182	≠	<i>Lactococcus lactis</i>	GIR46L3*	GIR	B	SAUDÁVEL	LEITE
151	≠	<i>Lactococcus lactis</i>	GIRO5L2	GIROLANDO	A	SAUDÁVEL	LEITE
198	≠	<i>Lactococcus lactis</i>	GIRO22L1*	GIROLANDO	B	DOENTE	LEITE
168	≠	<i>Lactococcus lactis</i>	GIR39S2	GIR	A	SAUDÁVEL	SWAB
330	~168	<i>Lactococcus lactis</i>	HOL15L1	HOLÂNDES	E	DOENTE (270)	LEITE
89	≠	<i>Lactococcus lactis</i>	GIRO11S1*	GIROLANDO	A	SAUDÁVEL	SWAB
217	≠	<i>Lactococcus lactis</i>	GIRO46L2*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	LEITE
92	≠	<i>Lactococcus lactis</i>	GIRO4S8*	GIROLANDO	A	SAUDÁVEL	SWAB

Isolado	Linhagem	Espécie	Isolado	Raça	Fazenda	Status saúde	Fonte
199	≠	<i>Lactococcus lactis</i>	GIRO22L2*	GIROLANDO	B	DOENTE	LEITE
315	≠	<i>Lactococcus lactis</i>	HOL32S2	HOLÂNDES	E	SAUDÁVEL	SWAB
337	≠	<i>Lactococcus garvieae</i>	HOL12S2*	HOLÂNDES	E	SAUDÁVEL	SWAB
327	~337	<i>Lactococcus garvieae</i>	HOL13L1	HOLÂNDES	E	SAUDÁVEL	LEITE
355	~337	<i>Lactococcus garvieae</i>	HOL15L4*	HOLÂNDES	E	DOENTE (270)	LEITE
340	~337	<i>Lactococcus garvieae</i>	HOL25S4*	HOLÂNDES	E	DOENTE (232)	SWAB
318	~337	<i>Lactococcus garvieae</i>	HOL36S3	HOLÂNDES	E	SAUDÁVEL	SWAB
343	~337	<i>Lactococcus garvieae</i>	HOL4L1*	HOLÂNDES	E	DOENTE (249)	LEITE
322	~337	<i>Lactococcus garvieae</i>	HOL4L2	HOLÂNDES	E	DOENTE (249)	LEITE
308	~337	<i>Lactococcus garvieae</i>	HOL6S4	HOLÂNDES	E	SAUDÁVEL	SWAB
348	~337	<i>Lactococcus garvieae</i>	HOL8L1*	HOLÂNDES	E	SAUDÁVEL	LEITE
90	≠	<i>Lactococcus garvieae</i>	GIRO5S1*	GIROLANDO	A	SAUDÁVEL	SWAB
332	≠	<i>Lactococcus garvieae</i>	HOL15L3	HOLÂNDES	E	DOENTE (270)	LEITE
341	≠	<i>Lactococcus garvieae</i>	HOL26S3*	HOLÂNDES	E	SAUDÁVEL	SWAB
336	~341	<i>Lactococcus garvieae</i>	HOL2S2*	HOLÂNDES	E	DOENTE	SWAB
39	≠	<i>Lactobacillus plantarum</i>	GUZ3S1*	GUZERÁ	D	SAUDÁVEL	LEITE
333	≠	<i>Lactobacillus plantarum</i>	HOL25L1	HOLÂNDES	E	DOENTE (232)	LEITE
310	≠	<i>Lactobacillus plantarum</i>	HOL25S1	HOLÂNDES	E	DOENTE (232)	SWAB
200	≠	<i>Lactobacillus plantarum</i>	GIRO23L1*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	LEITE
221	≠	<i>Lactobacillus plantarum</i>	GIRO49L1*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	LEITE
51	≠	<i>Lactobacillus plantarum</i>	GUZ3L2*	GUZERÁ	D	SAUDÁVEL	LEITE
189	≠	<i>Lactobacillus pentosus</i>	GIR50L1*	GIR	B	SAUDÁVEL	LEITE
323	≠	<i>Lactobacillus mucosae</i>	HOL5L1	HOLÂNDES	E	DOENTE	LEITE
210	≠	<i>Lactobacillus brevis</i>	GIRO32L2*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	LEITE
194R	≠	<i>Lactobacillus paracasei</i>	GIR53L1*	GIR	B	SAUDÁVEL	LEITE
46	≠	<i>Enterococcus saccharolyticus</i>	GUZ9S1*	GUZERÁ	D	SAUDÁVEL	SWAB
356	≠	<i>Enterococcus pseudoavium</i>	HOL25L1*	HOLÂNDES	E	DOENTE (232)	LEITE
197	≠	<i>Enterococcus italicus</i>	GIRO21L2*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	LEITE
179	≠	<i>Enterococcus italicus</i>	GIR44L3*	GIR	B	SAUDÁVEL	LEITE
116	≠	<i>Enterococcus hirae</i>	GIR14S6*	GIR	A	DOENTE (220)	SWAB
350	≠	<i>Enterococcus hirae</i>	HOL9L1*	HOLÂNDES	E	SAUDÁVEL	LEITE
136	≠	<i>Enterococcus hirae</i>	GIR17S1	GIR	A	SAUDÁVEL	SWAB
71	≠	<i>Enterococcus hirae</i>	GIR17S5*	GIR	A	SAUDÁVEL	SWAB
121	~71	<i>Enterococcus hirae</i>	GIR14S1*	GIR	A	DOENTE (220)	SWAB
77	~71	<i>Enterococcus hirae</i>	GIR14S10*	GIR	A	DOENTE (220)	SWAB
125	~71	<i>Enterococcus hirae</i>	GIR14S2*	GIR	A	DOENTE (220)	SWAB
119	~71	<i>Enterococcus hirae</i>	GIR14S8*	GIR	A	DOENTE (220)	SWAB
80	~71	<i>Enterococcus hirae</i>	GIR14S9*	GIR	A	DOENTE (220)	SWAB
98	~71	<i>Enterococcus hirae</i>	GIR17L1*	GIR	A	SAUDÁVEL	LEITE
99	~71	<i>Enterococcus hirae</i>	GIR17L5*	GIR	A	SAUDÁVEL	LEITE
72	~71	<i>Enterococcus hirae</i>	GIR17S3*	GIR	A	SAUDÁVEL	SWAB
76	~71	<i>Enterococcus hirae</i>	GIR17S6*	GIR	A	SAUDÁVEL	SWAB
87	~71	<i>Enterococcus hirae</i>	GIR20S5*	GIR	A	SAUDÁVEL	SWAB
126	≠	<i>Enterococcus hirae</i>	GIR11S8*	GIR	A	SAUDÁVEL	SWAB



Isolado	Linhagem	Espécie	Isolado	Raça	Fazenda	Status saúde	Fonte
127	~126	<i>Enterococcus hirae</i>	GIR11S5*	GIR	A	SAUDÁVEL	SWAB
117	~126	<i>Enterococcus hirae</i>	GIR11S6*	GIR	A	SAUDÁVEL	SWAB
42	≠	<i>Enterococcus hirae</i>	GUZ4S4*	GUZERÁ	D	SAUDÁVEL	SWAB
170	≠	<i>Enterococcus hirae</i>	GIR30S1	GIR	A	SAUDÁVEL	SWAB
137	≠	<i>Enterococcus hirae</i>	GIR17S2	GIR	A	SAUDÁVEL	SWAB
74	≠	<i>Enterococcus hirae</i>	GIR20S3*	GIR	A	SAUDÁVEL	SWAB
128	≠	<i>Enterococcus hirae</i>	GIR6S1	GIR	A	DOENTE (392)	SWAB
166	~128	<i>Enterococcus hirae</i>	GIR6L1*	GIR	A	DOENTE (392)	LEITE
349	≠	<i>Enterococcus faecium</i>	HOL8L2*	HOLÂNDES	E	SAUDÁVEL	LEITE
212	≠	<i>Enterococcus faecalis</i>	GIRO33L2*	GIROLANDO	B	DOENTE (543)	LEITE
218	≠	<i>Enterococcus faecalis</i>	GIRO46L3*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	LEITE
283	≠	<i>Enterococcus durans</i>	GIR46S1*	GIR	B	SAUDÁVEL	SWAB
96	≠	<i>Enterococcus casseliflavus/ gallinarum</i>	GIRO5L1*	GIROLANDO	A	SAUDÁVEL	LEITE
162	≠	<i>Enterococcus casseliflavus/ gallinarum</i>	GIR35S3	GIR	A	SAUDÁVEL	SWAB
165	≠	<i>Enterococcus casseliflavus/ gallinarum</i>	GIRO15S3*	GIROLANDO	A	DOENTE (412)	SWAB
213	≠	<i>Enterococcus camelliae</i>	GIRO35L1*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	LEITE
206	≠	<i>Enterococcus camelliae</i>	GIRO28L2*	GIROLANDO	B	SAUDÁVEL	LEITE
223	≠	<i>Enterococcus camelliae</i>	GIRO50L2*	GIROLANDO	B	DOENTE	LEITE