

RICHARD COSTA POLVEIRO

**MASTITE CAPRINA: ESTUDO DA MICROBIOTA DO LEITE POR TÉCNICAS
ÔMICAS E MICROBIOLOGIA TRADICIONAL E O SEU USO COMO FORMA DE
TRATAMENTO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientadora: Maria Aparecida Scatamburlo
Moreira

Coorientadores: Ricardo Seiti Yamatogi
Pedro Marcus Pereira Vidigal
Tiago Antônio de O. Mendes

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

Polveiro, Richard Costa, 1985-

P779m
2022

Mastite caprina: estudo da microbiota do leite por técnicas
ômicas e microbiologia tradicional e o seu uso como forma de
tratamento / Richard Costa Polveiro. – Viçosa, MG, 2022.

1 tese eletrônica (151 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexo.

Orientador: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Veterinária, 2022.

Referências bibliográficas: f. 131-149.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.503>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Caprinos - Doenças. 2. Mastite. 3. Bactérias.
4. Metagenômica. 5. Microbiota. I. Moreira, Maria Aparecida
Scatamburlo, 1963-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária. III. Título.

CDD 22. ed. 636.39089

Bibliotecário(a) responsável: Bruna Silva CRB-6/2552


RICHARD COSTA POLVEIRO

**MASTITE CAPRINA: ESTUDO DA MICROBIOTA DO LEITE POR TÉCNICAS
ÔMICAS E MICROBIOLOGIA TRADICIONAL E O SEU USO COMO FORMA DE
TRATAMENTO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 19 de julho de 2022.

Assentimento:



Richard Costa Polveiro
Autor



Maria Aparecida Scatamburlo Moreira
Orientadora

A Deus, meus pais e minha esposa

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, Nossa Senhora, Santos e meus Anjos por guiarem meu trabalho e todos os meus passos durante esse trajeto. “A ciência sem religião é manca, a religião sem a ciência é cega”. By Dr. Einstein.

Agradeço a minha esposa e grande amor, Luciana, pelo seu amor, por me apoiar, alegrar, me dar forças durante esse trajeto e estar sempre ao meu lado.

Agradeço a minha família, principalmente a meus pais, Rosa e Nenê por acreditarem em mim e sempre me apoiarem em meus estudos e trabalho. Sem eles eu não chegaria até aqui.

Agradeço a família de minha esposa Luciana, em especial Eudes e Glória que me apoiaram e me ajudaram sempre quando precisei.

Agradeço à Maria Aparecida Scatamburlo Moreira, a Cidinha, que muito mais que orientadora se tornou uma amiga, que acreditou em mim, me deu a oportunidade, abriu as portas do seu laboratório quando eu procurei alguém que pudesse me orientar na Pós-Graduação. Obrigado Cidinha por acreditar em meu trabalho, em minhas propostas e sempre me apoiar quando precisei.

Agradeço ao professor Ricardo Seiti, que além de professor é meu amigo e um grande companheiro de trabalho que contribuiu todos os dias em minha pesquisa.

Agradeço ao Doutor Pedro Vidigal, meu mentor em bioinformática, que com o tempo se tornou um amigo nos meus momentos de desespero a frente de meu computador.

Agradeço ao professor Tiago Antônio de Oliveira Mendes, um grande pesquisador e professor em bioinformática que me conduziu a criar esse trabalho e pesquisa.

Agradeço aos amigos e colegas do LDBAC, sem o apoio de todos eu não conseguiria concluir meus trabalhos. Obrigado a todos por me aguentarem no dia a dia do laboratório.

Agradeço às estagiárias e aos estagiários que passaram pelo LDBAC desde 2015, por aceitarem os desafios de estarem comigo na bancada, desvendando e inventando ensaios, me ajudando a cumprir meus objetivos. Espero que tenhamos incentivado pelo menos um de vocês para seguirem nossos passos na pesquisa científica.

Agradeço a todos meus amigos do setor de preventiva da veterinária, de todos os laboratórios que fizeram parte de minha pesquisa, por serem apoio e leveza, por me auxiliarem nas tarefas árduas, tirarem minhas dúvidas e partilharem minhas angústias.

Aos funcionários do setor, Sr. Luiz, Nívia, Marquinho, Élcio, Batalha, Dagoberto, Alex e a Paulinha, que tornaram tudo mais fácil na condução do experimento. Cada um com sua habilidade, contribuiu de alguma forma para a realização desse trabalho. Aos que me esqueci

de citar, ou que já se foram, um grande abraço. Agradecimento especial ao Sr. Luiz, que sempre foi uma pessoa paciente e de coração enorme, sempre disposto a ajudar em qualquer trabalho.

Agradeço à Rosi, excepcional pessoa e secretária. Sempre disponível para ajudar os achados e perdidos na pós. Sem ela, acredito que as burocracias jamais seriam vencidas.

Agradeço aos professores do Departamento de Veterinária, em especial do Setor de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública por cederem reagentes, equipamentos e laboratórios. Sem essas parcerias, nenhum resultado teria sido alcançado.

Agradeço aos professores Mateus MatiuZZi da Costa, uma pessoa maravilhosa que acreditou em mim e me inspira, me ajudou com inúmeros *insights* e auxiliou com os sequenciamentos desse trabalho.

Agradeço ao Sr. Anderson, funcionário do DZO e caprinocultura, meu parceiro de trabalho no infectório. Sem ele nosso experimento jamais poderia ter ocorrido tão bem.

Agradeço às minhas queridas cabrinhas que fizeram parte do meu experimento.

Agradeço à CAPES (o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil [CAPES] – Código de Financiamento 001), CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro, essencial para a realização dessa pesquisa.

Agradeço à UFV, pela oportunidade de realizar a pós-graduação. uma universidade de excelência e lindíssima, um orgulho para mim. Obrigado pela formação de excelência.

Obrigado!

“Se eu enxerguei mais longe foi por estar sobre os ombros de gigantes”.

Isaac Newton

BIOGRAFIA

RICHARD COSTA POLVEIRO, filho de Verguemundo Polveiro e Rosa Costa Polveiro, nasceu em Ribeirão Preto - SP, em 13 de dezembro de 1985.

Em março de 2007 iniciou seus estudos em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Viçosa e em janeiro de 2012 graduou-se.

Em agosto de 2015 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa sob orientação da Professora Maria Aparecida Scatamburlo Moreira, tendo defendido a dissertação em julho de 2017 com o tema “Análise do microbioma do leite caprino em diferentes tipos de mastite usando metagenômica e sequenciamento do gene 16S”.

Em agosto de 2017, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, nível de doutorado, na Universidade Federal de Viçosa sob orientação da Professora Maria Aparecida Scatamburlo Moreira, submetendo-se a defesa de tese em julho de 2022.

RESUMO

POLVEIRO, Richard C., D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2022. **Mastite caprina: estudo da microbiota do leite por técnicas ômicas e microbiologia tradicional e o seu uso como forma de tratamento.** Orientadora: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Coorientadores: Pedro Marcus Pereira Vidigal, Ricardo Seiti Yamatogi e Tiago Antônio de Oliveira Mendes.

A mastite caprina é uma das principais doenças que afeta a produção de leite e bem-estar do caprino, sendo uma infecção causada principalmente por um ou mais agentes bacterianos na glândula mamária, como o grupo *Staphylococcus* Coagulase-Negative (SCN) e a espécie *Staphylococcus aureus*. Dentre os SCN, *Staphylococcus warneri* tem sido identificada comumente em casos de mastite clínica e subclínica. Métodos de diagnósticos padrão, como mensurações de contagem de células somáticas (CCS) e isolamento do agente em lactocultura são utilizados para diagnosticar dessa doença. Por outro lado, os estudos metataxonômicos de microbiotas surgiram com o desenvolvimento dos sequenciamentos de alto rendimento do gene 16S, o que criou um ponto de inflexão em novas abordagens de identificação de componentes na microbiota do leite. Nosso objetivo foi induzir a infecção com *S. warneri* para criar um quadro de mastite subclínica em cabras e avaliar a utilização do transplante da microbiota do leite de animais saudáveis como estratégia de tratamento para a mastite caprina. Oito cabras sadias foram alocadas no infectório do Departamento de Veterinária, e seis delas submetidas a indução da infecção por *S. warneri* e mais uma mantida como controle, sendo avaliadas por sete dias. Em uma segunda fase, uma das cabras não infectada foi designada como a doadora de leite. As seis cabras submetidas a indução da infecção, receberam o transplante de microbiota por meio do leite da doadora por nove dias, sendo avaliadas por mais quatro após o término. Testes utilizados identificaram que a indução da infecção obteve sucesso nos animais, apresentando aumento dos valores de CCS e CBT, além de aumento no número de cruces do exame de CMT, redução breve na produção de leite, assim como variações significativas no leucograma. A análise de microbiota por metataxonomia, antes e depois da infecção, revelaram que ocorreram reduções abruptas de vários gêneros e espécies, o que culminou com o predomínio de 90% da microbiota por *S. warneri* e *S. caprae* em abundância no leite dos animais em geral, resultando em uma disbiose. Na fase de transplante de microbiota foi identificado a diminuição da produção de leite após alguns períodos de aplicação da técnica, assim como variações individuais significativas de aumento de CCS, e aumento no número de cruces no CMT para maioria dos animais, no entanto, ocorreu uma melhora de forma geral nos

parâmetros avaliados para um animal, a cabra D. Além disso, dois animais apresentaram resultado negativo na última lactocultura realizada em ágar Sangue. Ademais, de forma positiva, os animais infectados alteraram a estrutura de suas microbiotas, reduzindo a abundância de *S. warneri*, e elevando a microbiota para uma abundância geral das principais espécies como *H. parainfluenzae*, *S. simulans* e *S. aureus*. No transplante, a cabra D apresentou melhora no quadro clínico, sendo o único animal que não eliminou *S. warneri* de sua microbiota geral, a tornando uma bactéria indígena a sua microbiota. Além disso, as análises de beta diversidade demonstraram que grupos diferentes de bactérias foram formados após o transplante, ressaltando que a microbiota final se tornou diferente do que foi durante a infecção. Portanto, com a indução da mastite subclínica por *S. warneri*, foi possível identificar diversas alterações de valores de diagnóstico para esse agente, e por outro lado, essa técnica proporcionou a modificação da microbiota para um estado completamente diferente do animal doador e da microbiota que os animais apresentavam. Assim, o transplante de microbiota do leite demonstrou ser uma técnica promissora, que se aprimorada, pode se tornar uma nova ferramenta de tratamento da mastite futuramente.

.

Palavras-chave: Bactéria. Caprino. Mastite. Metataxonomia. Microbiota do leite. Transplante de microbiota.

ABSTRACT

POLVEIRO, Richard C., D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2022. **Goat mastitis: study of milk microbiota by omic techniques and traditional microbiology and its use as a form of treatment.** Advisor: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Co-advisors: Pedro Marcus Pereira Vidigal, Ricardo Seiti Yamatogi and Tiago Antônio de Oliveira Mendes.

Goat mastitis is one of the main diseases that affects milk production and goat welfare, being an infection caused mainly by one or more bacterial agents in the mammary gland, such as the *Staphylococcus* Coagulase-Negative (SCN) group and *Staphylococcus aureus*. Among the CNS, *Staphylococcus warneri* has been commonly identified in cases of clinical and subclinical mastitis. Standard diagnostic methods such as somatic cell count (SCC) measurements and isolation of the agent from lactoculture are used to diagnose this disease. On the other hand, metataxonomic studies of microbiota emerged with the development of high-throughput sequencing of the 16S gene, which created an inflection point in new approaches to identifying components in the milk microbiota. Our objective was to induce infection with *S. warneri* to create a picture of subclinical mastitis in goats and to evaluate the use of microbiota transplantation from milk from healthy animals as a treatment strategy for goat mastitis. Eight healthy goats were allocated to the Veterinary Department's infectorium, and six of them were subjected to induction of infection by *S. warneri* and one more kept as a control, being evaluated for seven days. In a second phase, one of the uninfected goats was designated as the milk donor. The six goats submitted to infection induction received the microbiota transplant through the donor's milk for nine days, being evaluated for another four after the end. Tests used identified that the induction of infection was successful in the animals, showing an increase in CCS and CBT values, in addition to an increase in the number of crosses in the CMT exam, a brief reduction in milk production, as well as significant variations in the leukogram. The microbiota analysis by metataxonomy, before and after the infection, revealed that there were abrupt reductions of several genera and species, which culminated in the predominance of 90% of the microbiota by *S. warneri* and *S. caprae* in abundance in the milk of the animals in general, resulting in a dysbiosis. In the microbiota transplantation phase, a decrease in milk production was identified after some periods of application of the technique, as well as significant individual variations in the increase of CCS, and an increase in the number of crosses in the CMT for most animals, however, there was a general improvement in the parameters evaluated for one animal, goat D. In addition, two animals showed negative results in the last lactoculture performed on blood agar. Furthermore, in a positive way, the infected animals altered the

structure of their microbiota, reducing the abundance of *S. warneri*, and raising the microbiota to a general abundance of the main species such as *H. parainfluenzae*, *S. simulans* and *S. aureus*. In the transplant, goat D showed improvement in the clinical picture, being the only animal that did not eliminate *S. warneri* from its general microbiota, making it an indigenous bacterium in its microbiota. In addition, beta diversity analyzes demonstrated that different groups of bacteria were formed after transplantation, highlighting that the final microbiota became different from what it was during infection. Therefore, with the induction of subclinical mastitis by *S. warneri*, it was possible to identify several changes in diagnostic values for this agent, and on the other hand, this technique provided the modification of the microbiota to a completely different state from the donor animal and from the microbiota that the animals showed. Thus, the transplantation of milk microbiota proved to be a promising technique, which, if improved, could become a new tool for the treatment of mastitis in the future.

Keywords: Bacteria. Goat. Mastitis. Metataxonomy. Milk microbiota. Microbiota transplantation.

LISTA DE FIGURAS

Introdução Geral

Figura 1 - Abordagem holística na teoria das coevoluções.....26

Capítulo 1

Figura 1 - Produção média de leite no período sadio e na fase de infecção.....45

Figura 2 - Boxplot da variação de produção de leite das cabras no período sadio em P0 e nas fases de infecção de P2 até P8.....46

Figura 3 – Contagem de células somáticas (CCS) e contagem de bacteriana total (CBT) no período sadio e na fase de infecção experimental nos úberes do lado direito.....47

Figura 4 - Leucograma das cabras no período sadio e fase de infecção: leucócitos totais, linfócitos, neutrófilos e monócitos.....51

Figura 5 - Porcentagem de identificação de bactérias por ágar cromogênico Accumast® no período dos animais sadios e na fase das cabras induzidas a mastite por *S. warneri*.....52

Figura 6 - Composição da microbiota bacteriana dos 25 táxons mais abundantes, ao nível de gênero e espécies da cabra controle (B) ao longo da fase de infecção.....54

Figura 7 - Composição da microbiota bacteriana dos 25 táxons mais abundantes, ao longo da fase de infecção com *S. warneri* e período em que estavam sadias, ao nível de gênero e espécies.....56

Figura 8 - Composição da microbiota bacteriana somada os 25 táxons mais abundantes, identificando o período em que as cabras estavam sadias e a fase de infecção com *S. warneri*, ao nível de gênero e espécie das bactérias.....57

Figura 9 - Índices de diversidade alfa da microbiota do leite da cabra controle (B), subdividida entre úbere esquerdo (EI) e direito (DI), representados pelos índices de riqueza observada por ASVs, de riqueza Chao1, e o de diversidade por amostra com o índice de Shannon.....58

Figura 10 - Índices de diversidade alfa da microbiota do leite dos animais induzidos a infecção (C, D, E, F, G e H) subdividida entre úbere esquerdo sadio (E.S), direito sadio (DS) em P0 e direito infectado (DI) representados pelos índices de riqueza observada por ASVs, de riqueza Chao1, e o de diversidade por amostra com o índice de Shannon.....	59
Figura S1 - Composição da microbiota absoluta bacteriana dos 25 táxons mais abundantes, ao longo da fase de infecção com <i>S. warneri</i> e período sadio ao nível de gênero e espécies.....	67

Capítulo 2

Figura 1 - Produção média de leite por períodos na fase de transplante e da cabra doadora.....	71
Figura 2 - Boxplot da variação de produção de leite das cabras receptoras do transplante nos períodos P8 até PA e da cabra doadora.....	72
Figura 3 - Contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) da fase de transplante de microbiota, referente aos animais transplantados e doadora de microbiota (cabra A - úbere direito e esquerdo)	74
Figura 4 - Leucograma das cabras na fase de transplante de microbiota, compreendendo leucócitos totais, linfócitos, neutrófilos e monócitos dos animais transplantados e da cabra doadora de microbiota.....	77
Figura 5 - Porcentagem de isolamento e identificação de bactérias por ágar cromogênico Accumast® no período inicial do transplante e na fase total de transplante.....	79
Figura 6 - Composição da microbiota bacteriana dos 25 táxons mais abundantes, ao nível de gênero e espécies da cabra controle B, no período sadio e ao longo da fase de infecção.....	81
Figura 7 - Composição da microbiota bacteriana dos 25 táxons mais abundantes, ao nível espécies do animal doador de microbiota do leite (cabra A), somado o conjunto de períodos da fase de transplante.....	82
Figura 8 - Composição da microbiota bacteriana ao nível de espécies dos 25 táxons mais abundantes, das cabras receptoras da microbiota do leite ao longo da fase de transplante.....	84

Figura 9 - Composição da microbiota bacteriana dos 25 táxons mais abundantes, ao nível espécies do animal doador de microbiota do leite (cabra A), somado o conjunto de períodos da fase de transplante.....	85
Figura 10 - Índices de diversidade alfa da microbiota do leite da cabra doadora de leite (A) subdividida entre úbere esquerdo (ET) e direito (DT), representados pelos índices de riqueza observada por ASVs, de riqueza Chao1, e o de diversidade por amostra com o índice de Shannon.....	86
Figura 11 - Índices de diversidade alfa da microbiota do leite dos animais transplantados (C, D, E, F, G e H) subdividida entre úbere do lado esquerdo sadio ou controle (E.S) e lado direito transplantado (D.T), representados pelos índices de riqueza observada por ASVs, de riqueza Chao1, e o de diversidade por amostra com o índice de Shannon.....	87
Figura S1 - Composição da microbiota bacteriana absoluta dos 25 táxons mais abundantes ao longo da fase de transplante do animal doador de microbiota ao nível de gênero e espécies.....	96
Figura S2 - Composição da microbiota bacteriana absoluta das cabras transplantadas ao nível de gêneros e espécies, dos 25 táxons mais abundantes.....	97

Capítulo 3

Figura 1 - Produção média de leite no período de sadios e nas fases de indução a infecção e transplante, juntamente com dados da cabra doadora de leite.....	102
Figura 2 - Boxplot da variação de produção de leite das cabras no período sadio (P0) e nas fases de infecção e transplantados.....	103
Figura 3 - Contagem de células somáticas (CCS) e contagem de bacteriana total (CBT) nas fases de infecção experimental, transplante e o período sadio dos animais no lado direito dos úberes.....	105
Figura 4 - Leucograma das cabras no período de sadios, fase de infecção e de transplante: leucócitos totais, linfócitos, neutrófilos e monócitos.....	110
Figura 5 - Porcentagem de identificação de bactérias por ágar cromogênico Accumast® no período sadio, nas fases de indução a infecção e transplante.....	112

Figura 6 - Composição da microbiota bacteriana dos 25 táxons mais abundantes, ao nível de gênero e espécies dos subgrupos experimentais.....	114
Figura 7 - Índices de diversidade alfa dos animais experimentais em subgrupos.....	115
Figura 8 - Análise de Coordenadas Principais Canônicas (CAP) construída sobre uma matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis entre os subgrupos experimentais.	116
Figura 9 - Diversidade beta baseada na dissimilaridade da Distância Euclidiana e escalonamento pela Análise de Coordenadas Principais da Matriz (PCoA).....	117
Figura 10 - Gráfico de Venn referente ao período e os subgrupos experimentais.....	120

LISTA DE QUADROS

Materiais e Métodos

Quadro 1 - Separação dos caprinos subgrupos nos períodos para a análise de microbiota.....35

Capítulo 1

Quadro S1 - Exames de hemograma e bioquímico das cabras divididos em período de sadios e fase de infecção.....64

Quadro S2 - Identificação de bactérias de leite de cabras por lactocultura em ágar cromogênico Accumast®, proveniente do lado direito do úbere, no período de sadios e fase de infecção.....65

Capítulo 2

Quadro S1 - Exames de hemograma e bioquímicos das cabras na fase de transplante e da cabra doadora de microbiota (Cabra A)93

Quadro S2 - Identificação de bactérias de leite de cabras por lactocultura em ágar cromogênico Accumast®, proveniente do lado direito do úbere na fase de transplante.....94

Capítulo 3

Quadro S1 - Exames de hemograma e bioquímico das cabras divididos em período sadios, fase de indução a infecção, transplante e da cabra doadora de microbiota (Cabra A).....126

Quadro S2 - Identificação de bactérias do leite de cabras por lactoculturas em ágar cromogênico Accumast® do úbere do lado direito, na fase de indução a infecção, transplante e da cabra doadora de microbiota (Cabra A).....127

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1 - <i>California Mastitis Test</i> (CMT) das cabras em três períodos durante a fase de indução da infecção.....	48
---	----

Capítulo 2

Tabela 1 - <i>California Mastitis Test</i> (CMT) de cabras em três períodos durante a fase de transplante de microbiota.....	75
--	----

Capítulo 3

Tabela 1 - <i>California Mastitis Test</i> (CMT) das cabras no período sadio (P0), e nos períodos referentes as fases de indução de infecção e de transplante de microbiota.....	106
Tabela 2 - Testes estatísticos para as análises de beta diversidade para os diferentes subgrupos das cabras.....	118
Tabela suplementar 1 - Caracterização do número de isolados identificados no leite das cabras durante período sadio, fase de infecção e transplante por meio do ágar cromogênico.....	130

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	21
2. OBJETIVOS	27
2.1. OBJETIVO GERAL	27
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1. COMITÊ DE ÉTICA	29
3.2. TAMANHO AMOSTRAL	29
3.3. ALOCAÇÃO E SELEÇÃO DE ANIMAIS	30
3.3.1. SELEÇÃO DA CABRA DOADORA DE MICROBIOTA DO LEITE	31
3.3.2. ORGANIZAÇÃO EXPERIMENTAL DAS CABRAS PARA A FAZE DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM <i>S. WARNERI</i> E DE TRANSPLANTE DE MICROBIOTA	32
3.3.3. INDUÇÃO DA INFECÇÃO, TRANSPLANTE E RELAÇÃO DOS PERÍODOS PARA CADA FASE	33
3.3.4. SEPARAÇÃO DOS PERÍODOS E FASES EM SUBGRUPOS PARA AS ANÁLISES DA MICROBIOTA REALIZADAS NO CAPÍTULO 3	34
3.4. COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS	35
3.4.1. AMOSTRAS DE LEITE E MONITORAMENTO DAS CONDIÇÕES CLÍNICAS DOS ÚBERES	35
3.4.2. TESTES BACTERIOLÓGICOS E COLETAS DE AMOSTRAS DE SANGUE.....	36
3.5. EXTRAÇÃO DE DNA, AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S rRNA E SEQUENCIAMENTO	37
3.6. ESTATÍSTICAS	38
3.7. BIOINFORMÁTICA	38
3.7.1. ANÁLISES DE SEQUÊNCIA E PROCESSAMENTO DOS DADOS	38
3.7.2. ANÁLISES ECOLÓGICAS E ESTATÍSTICAS	39
3.7.3. ANÁLISE DE DIVERSIDADE E COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA	39
CAPÍTULO 1 – INDUÇÃO DA MASTITE SUBCLÍNICA PELA INOCULAÇÃO DE <i>STAPHYLOCOCCUS WARNERI</i> EM CABRAS SADIAS.	41
1. INTRODUÇÃO	42
2. RESULTADOS	44

2.1.	PRODUÇÃO DE LEITE, CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS), CONTAGEM BACTERIANA TOTAL (CBT), <i>CALIFÓRNIA MASTITIS TEST</i> (CMT) E LACTOCULTURAS	44
2.2.	HEMOGRAMA E IDENTIFICAÇÕES BACTERIOLÓGICAS	49
2.3.	DADOS DO SEQUENCIAMENTO	53
2.4.	ABUNDÂNCIA RELATIVA DA MICROBIOTA DAS GLÂNDULAS MAMARIAS DA CABRA CONTROLE	53
2.5.	ABUNDÂNCIA RELATIVA DA MICROBIOTA DOS ÚBERES DAS CABRAS INFECTADAS	55
2.6.	ALFA DIVERSIDADE DA MICROBIOTA DO LEITE DA CABRA CONTROLE B	57
2.7.	ALFA DIVERSIDADE DA MICROBIOTA DO LEITE DAS CABRAS INFECTADAS	58
3.	DISCUSSÃO	59
4.	MATERIAL SUPLEMENTAR	65
CAPÍTULO 2 – TRANSPLANTE DE MICROBIOTA DE CABRA SADIA PARA GLÂNDULA MAMARIA DE CABRAS INDUZIDAS À MASTITE SUBCLÍNICA		
		68
1.	INTRODUÇÃO	69
2.	RESULTADOS	70
2.1.	PRODUÇÃO DE LEITE, CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS), CONTAGEM BACTERIANA TOTAL (CBT), <i>CALIFÓRNIA MASTITIS TEST</i> (CMT) E LACTOCULTURAS	70
2.2.	HEMOGRAMA E IDENTIFICAÇÕES BACTERIOLÓGICAS	76
2.3.	DADOS DO SEQUENCIAMENTO	79
2.4.	ABUNDÂNCIA RELATIVA DA MICROBIOTA DOS ÚBERES DA CABRA DOADORA.....	80
2.5.	ABUNDÂNCIA RELATIVA DA MICROBIOTA NOS ÚBERES DAS CABRAS TRANSPLANTADAS	82
2.6.	ALFA DIVERSIDADE DA MICROBIOTA DO LEITE DE AMBOS OS LADOS DO ÚBERE DA CABRA DOADORA DE MICROBIOTA	85
2.7.	ALFA DIVERSIDADE DA MICROBIOTA DO LEITE DE AMBOS OS LADOS DO ÚBERE DAS CABRAS INFECTADAS	86
3.	DISCUSSÃO	87
4.	MATERIAL SUPLEMENTAR	93
CAPÍTULO 3 – ANÁLISE DA MICROBIOTA BACTERIANA DE ANIMAIS INFECTADOS COM <i>S. WARNERI</i> E POSTERIORMENTE TRATADOS COM O TRANSPLANTE EXPERIMENTAL DE MICROBIOTA DO LEITE.		
		98

1. INTRODUÇÃO	99
2. RESULTADOS	101
2.1. PRODUÇÃO DE LEITE, CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS), CONTAGEM BACTERIANA TOTAL (CBT) E <i>CALIFÓRNIA MASTITIS TEST</i> (CMT)	101
2.2. COMPARAÇÃO DO HEMOGRAMA E IDENTIFICAÇÕES BACTERIOLÓGICAS	107
2.3. DADOS DO SEQUENCIAMENTO	112
2.4. COMPARAÇÃO DA ABUNDÂNCIA RELATIVA DA MICROBIOTA DAS GLÂNDULAS MAMARIAS.....	113
2.5. COMPARAÇÃO DA ALFA DIVERSIDADE DA MICROBIOTA DO LEITE NOS SUBGRUPOS .	114
2.6. COMPARAÇÃO DA BETA DIVERSIDADE NA MICROBIOTA DO LEITE NOS SUBGRUPOS .	115
2.7. DISTINÇÃO DA MICROBIOTA DO LEITE POR UM GRÁFICO DE VENN.....	118
3. DISCUSSÃO	120
4. MATERIAL SUPLEMENTAR	126
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131
CONCLUSÕES GERAIS.....	150
ANEXO-CERTIFICADO DO COMITE DE ÉTICA (CEUA).....	151

1. INTRODUÇÃO GERAL

A produção de leite de cabra tem crescido de forma substancial nos últimos 20 anos devido ao reconhecimento dos seus valores nutricionais e propriedades nutracêuticas (KUMAR et al., 2016). O caprino é um animal rústico, resistente, e o seu leite detém características físicas únicas em termos de perfil de sabor, tamanho do glóbulo de gordura, propriedades de coagulação e alergenicidade, o que torna o leite de cabra o produto lácteo de escolha para muitos consumidores (CLARK; MORA GARCÍA, 2017a). Ademais, o leite de cabra tem apenas uma pequena parcela do mercado global de leite, embora seja o suprimento básico em muitos países subdesenvolvidos, sendo produzido para subsistência ou para abastecendo do comércio local (MILLER; LU, 2019).

Pequenos, médios e grandes produtores de leite caprino, que criam esses animais para subsistência ou mercado, enfrentam um desafio antigo e constante na produção de leite, que é a mastite. Essa doença reduz a produção e qualidade do leite, aumenta os custos de produção com o tratamento e interfere diretamente no bem-estar animal, podendo determinar o descarte do animal devido à destruição parcial ou total do tecido da glândula mamária. A definição de mastite ou infecção intramamária (IMI) é a infecção da glândula mamária causada por um ou mais agentes. Embora a mastite possa ocorrer como resultado de algum distúrbio fisiológico ou trauma no úbere, a causa mais frequente em pequenos ruminantes leiteiros ainda é bacteriana (BERGONIER et al., 2003). Nesse sentido, a mastite é uma das principais doenças que causa problemas em animais leiteiros no mundo, sendo a infecção primária e mais onerosa das cabras leiteiras (CLARK; MORA GARCÍA, 2017b).

A IMI em animais leiteiros, conseqüentemente em pequenos ruminantes, pode se manifestar em formas clínicas de níveis variados de acometimento, de acordo com a gravidade dos sintomas, caso contrário, com ausência total de sinais macroscópicos visíveis da doença, na forma de infecção subclínica (CÔTÉ-GRAVEL; MALOUIN, 2019). Portanto, a mastite caprina pode ser caracterizada por mastite subclínica e clínica, gangrenosa e crônica ou persistente. A mastite crônica é um tipo de mastite persistente que pode ser classificada em mastite persistente subclínica e clínica (BERGONIER et al., 2003).

A IMI quando causada por uma infecção por patógenos pode variar de relativamente benigna a letal. O grau de dano causado durante a infecção pode ser determinado por aspectos da biologia do patógeno, como a transmissibilidade (RAFALUK-MOHR, 2019), dose infectante (LEGGETT; CORNWALLIS; WEST, 2012), facultativos/obrigatórios (BROWN; CORNFORTH; MIDEO, 2012), bem como pela biologia do hospedeiro e o ambiente

circundante, como ambiente biótico ou abiótico (BERNARDO-CRAVO et al., 2020). Embora os hospedeiros possam ser geneticamente predispostos à suscetibilidade (STEVENS; BATES; KING, 2021a), os resultados da doença podem piorar se os hospedeiros tiverem uma comorbidade (ESPER et al., 2006) ou uma resposta imune prejudicada ou super-reativa (PINSKY, 2004).

Vários patógenos podem causar mastite direta ou indiretamente, mas dentro do domínio Bactérias, *Staphylococcus Coagulase-Negative* (SCN) e *Staphylococcus aureus* são as causas mais frequentemente diagnosticadas de IMI subclínica e clínica em caprinos, respectivamente (CONTRERAS et al., 2007; DORE et al., 2016). SCN mais prevalentes na mastite caprina são *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus caprae* (BERGONIER et al., 2003; CONTRERAS et al., 2007; MORONI et al., 2005a), sendo que *Staphylococcus warneri* é comumente isolado na mastite subclínica (DA SILVA et al., 2004b; DEINHOFER; PERNTANER, 1995a). Outros patógenos também são importantes na IMI, mas aparecem com baixa prevalência, como *Streptococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Corynebacterium* spp., *Enterobacteriaceae* e *Mannheimia* spp. (BERGONIER et al., 2003; CONTRERAS et al., 2007; DORE et al., 2016; MENZIES; RAMANOON, 2001b; SCATAMBURLO et al., 2015; STEEVE; JOHN; PATRICIA, 2013). *Mycoplasmas* spp., são agentes que têm sido isolados mais raramente, mas desempenham um papel importante nas causas de IMI em caprinos (CORRALES et al., 2007).

Além disso, alguns fatores são preponderantes para classificar a mastite, como: sinais clínicos do animal (MENZIES; RAMANOON, 2001c), determinação da contagem diferencial de leucócitos no leite, com a técnica de contagem de células somáticas (CCS) (ALBENZIO et al., 2015). Ademais, pode ser realizado o isolamento do agente que está em abundância no leite (por exemplo, identificação bacteriana) e contagem padrão em placas, por lactoculturas aeróbica ou por outra técnica (ROVAI et al., 2014), e assim identificar características genotípicas e fenotípicas do agente (BALABAN et al., 2019; BRAUNER et al., 2016; SOUZA et al., 2012b).

O CCS do leite de cabras saudáveis ($270-2000 \times 10^3$ células mL⁻¹) é maior do que o CCS observado no leite de vacas e ovelhas não infectadas (SOUZA et al., 2012b). Em caprinos, DE CRÉMOUX et al., (1996) estabeleceram um limite de 750×10^3 células mL⁻¹ para prever a presença de patógenos menores (menos identificados pela literatura) e um limite de 1750×10^3 células mL⁻¹ para patógenos principais (mais identificados pela literatura). Ao contrário do leite de vacas e ovelhas, as células polimorfonucleares (PMNLs) compreendem o principal tipo de leucócitos (40-87%) no leite de cabra (SOUZA et al., 2012b). Como os neutrófilos

atuam como a primeira linha de defesa imunológica contra infecções, isso poderia explicar por que as cabras são mais resistentes à mastite (SOUZA et al., 2012b; TIAN et al., 2005b).

O teste de mastite da Califórnia (CMT) tem sido amplamente utilizado em ruminantes para medir indiretamente o CCS porque não é invasivo para o animal, também barato e rápido de realizar (LAFI, 2006; MCDUGALL et al., 2001; NUNES et al., 2008; PERSSON; OLOFSSON, 2011). Em caprinos, a maioria dos estudos propôs um escore 2 como limiar para a detecção de glândulas infectadas (CONTRERAS et al., 1996; DOSSANTOS; CASTRO; DACOSTA, 1995; HAENLEIN, 2002; MCDUGALL et al., 2001, 2010; PEIXOTO; MOTA; DA COSTA, 2010b; PERSSON; OLOFSSON, 2011). Da mesma forma, PEIXOTO et al. (2010b) relataram melhor concordância (81,4%) com exames bacteriológicos para os escores $CMT \geq 2$. Também foram observadas fortes correlações entre os escores do CMT e a contagem microscópica e automática (SOUZA et al., 2012b), o que pode estar relacionado à maior proporção de neutrófilos, ao invés de partículas citoplasmáticas, em amostras de leite de cabra de metades não infectadas. Essas partículas citoplasmáticas não reagem com o reagente CMT, pois não contém núcleo (PETTERSEN, 1981; SOUZA et al., 2012b).

Contudo, um dos problemas do diagnóstico da mastite é que os testes indiretos, como o CCS, são comparados com o “padrão ouro” da bacteriologia, que seria a lactocultura (SOUZA et al., 2012b), no entanto, a IMI nem sempre exige a presença da infecção estabelecida por um patógeno que seja determinantemente isolado (PYÖRÄLÄ, 2003). A mastite pode não ser acompanhada do isolamento do agente etiológico por vários motivos: os microrganismos podem ser excretados de forma intermitente e em pequenas quantidades; patógenos relacionados à infecção não são detectáveis usando testes microbiológicos convencionais; algumas enzimas ou proteínas do leite (ou seja, lisozima e lactoferrina) podem impedir a detecção de patógenos; e a infecção é suportada por endotoxinas bacterianas e compostos bioativos liberados por neutrófilos que sobrevivem à eliminação das bactérias invasoras (ALBENZIO et al., 2002; ARSENAULT et al., 2008; NUNES et al., 2008; SOUZA et al., 2012b).

Por conseguinte, algumas bactérias podem estar presentes no canal do teto sem causar inflamação significativa, e outras podem estar presentes como contaminantes (ARSENAULT et al., 2008). Com isso em mente, alguns autores isolaram os patógenos da mastite de amostras de leite com CCS muito baixas, enquanto outros encontraram altas proporções de amostras de leite bacteriologicamente negativas com CCS altas (ALBENZIO et al., 2002; DELLA LIBERA et al., 2011; LEITNER et al., 2001; NUNES et al., 2008). Esses achados sugerem que o CCS e os exames bacteriológicos, embora considerados os indicadores mais confiáveis de mastite em

curso, podem falhar no diagnóstico da mastite quando não utilizados de forma integrada (ALBENZIO et al., 2002; SOUZA et al., 2012b).

As recentes abordagens de sequenciamento de alto rendimento (incluindo metataxonômicas, metagenômica e metatranscriptômica) têm sido aplicadas para identificar a associação entre a saúde do hospedeiro e a composição e funcionalidade da microbiota intestinal (KOOTTE et al., 2012; COSTEA et al., 2017). A discriminação de uma comunidade microbiana saudável frente a uma disbiótica ou “doente”, como em mastites, pode auxiliar na compreensão da microbiota comensal, e essa pode excluir competitivamente patógenos ou microrganismos não indígenas, estimular e programar as defesas imunológicas e contribuir para a nutrição do hospedeiro. Estudos de microbioma de leite de cabras (MCINNIS et al., 2015a; POLVEIRO et al., 2020b; ZHANG et al., 2017a) e de vacas (ADDIS et al., 2016b; BONSAGLIA et al., 2017a; OIKONOMOU et al., 2014a) em diversas situações têm demonstrado a complexidade das interações de patógenos e comensais presentes em situações de saúde e doença.

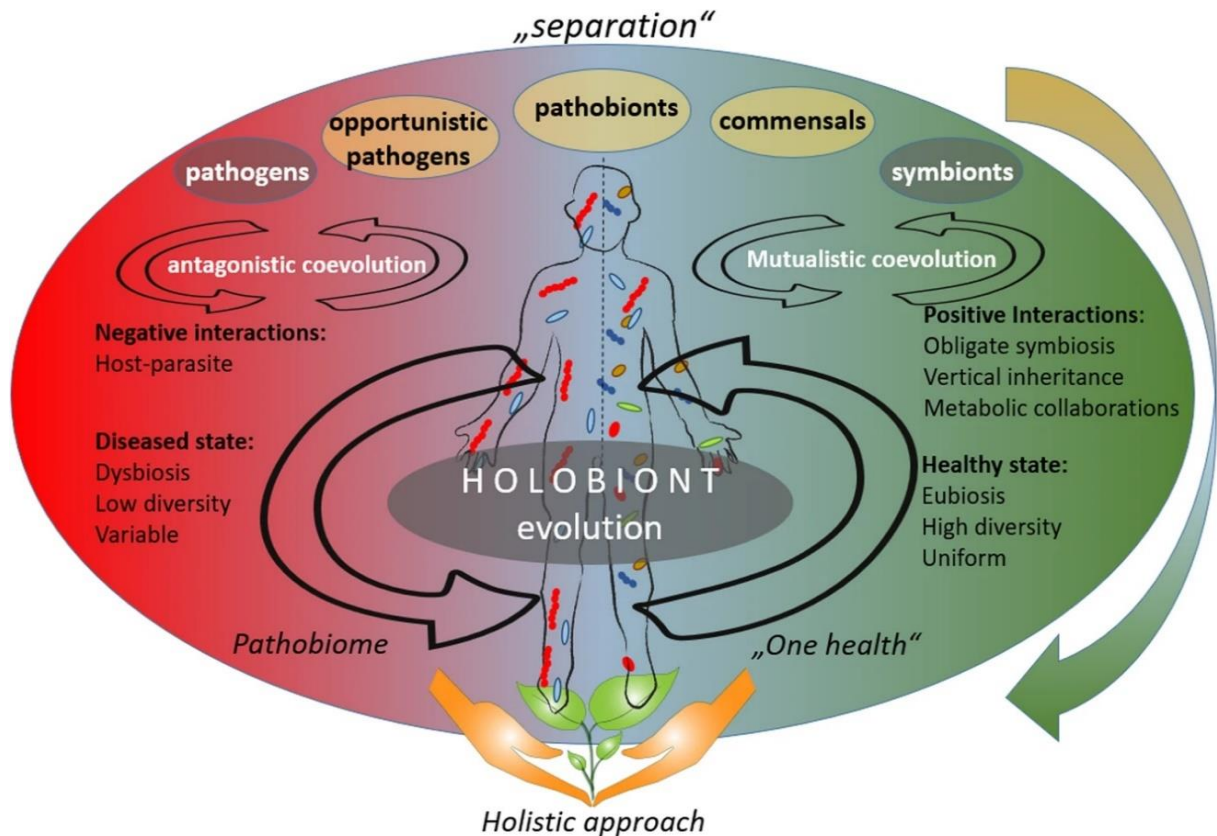
Essas novas abordagens em pesquisas do leite possibilitam a reconstrução de sistemas de interações entre de patógenos e hospedeiros que determinam a IMI (ECKHARDT et al., 2020a; GARIRA, 2019a). Poucos estudos revelaram microbiota no leite de cabra; no entanto, os principais filos bacterianos encontrados são *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, além de uma variedade de gêneros como *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alkalibacterium*, *Bacteroides*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Escherichia/Shigella*, *Fusobacterium*, *Klebsiella*, *Massilia*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Phyllobacterium*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas*, *Shewanella*, *Streptococcus* e *Yersinia* (MCINNIS et al., 2015a; POLVEIRO et al., 2020b; ZHANG et al., 2017a).

Diante disso, a microbiota bacteriana do leite de cabras e outros mamíferos (OIKONOMOU et al., 2020) têm demonstrado a existência de uma rede complexa, vital para o funcionamento de seus organismos hospedeiros multicelulares. Essa percepção tem alimentado grande interesse nos efeitos dos microrganismos na saúde das plantas (KUROSE et al., 2012) e do hospedeiro animal (OTTMAN et al., 2012). A proteção mediada por microrganismos contra a infecção é um fenômeno generalizado em todas as espécies hospedeiras (FORD; KING, 2016), com componentes da microbiota e suas interações com um hospedeiro e a comunidade microbiana mais ampla mediando a suscetibilidade a patógenos invasores e patobiontes internos (FONS; GOMEZ; KARJALAINEN, 2009; SCHNEITZ, 2005).

Muitos gêneros e espécies antes denominados de patogênicos demonstram apresentar papéis centrais nas interações das doenças sem possivelmente causá-las primordialmente. O

microbioma do leite coevolui com o hospedeiro e o ambiente, formando uma rede de interações como um único ser denominado de Holobionte (Figura 1) (BERG et al., 2020). Os microrganismos interagem uns com os outros, e essas interações simbióticas têm diversas consequências para a aptidão microbiana, dinâmica populacional e capacidades funcionais dentro do microbioma (BANERJEE; SCHLAEPPI; VAN DER HEIJDEN, 2018). Alguns microrganismos podem se beneficiar com o aumento ou redução de nutrientes e causar perturbações ecológicas, nas quais os microrganismos comensais podem se tornarem novos oportunistas, os patobiontes, que é seguida por perdas ou ganhos de diferentes espécies microbianas, o que pode levar a disbiose da microbiota da glândula mamária, ocasionando a IMI (JOCHUM; STECHER, 2020; PORCELLATO et al., 2020; SÁNDEZ et al., 2022).

Figura 1 – **Abordagem holística na teoria das coevoluções.** A abordagem holística vê o hospedeiro e sua microbiota associada como uma unidade (denominado de holobionte), que coevolui como uma entidade. De acordo com a abordagem holística, o estado da doença do holobionte está ligado à disbiose, baixa diversidade da microbiota associada e sua variabilidade: um estado chamado de “patobioma”. O estado saudável, por outro lado, é denominado de eubiose, acompanhado de alta diversidade e uniformidade da respectiva microbiota. O fluxo dinâmico de microrganismos de um hospedeiro para outro e para o meio ambiente, descrito pelo conceito *One Health*, sustenta a abordagem holística na coevolução.



Fonte: adaptado de BERG et al., (2020).

Em vacas, foi determinado que são várias as fontes externas que podem servir para a constituição da microbiota do leite, como a ordenha, os insetos, a cama, a mamada dos bezerros, entre outros (DERAKHSHANI et al., 2018a), no entanto uma fonte interna ao corpo do animal seria a principal, na qual os microrganismos chegariam à glândula mamária por uma via entero-mamária (HU et al., 2020; MA et al., 2018). Desvendar a microbiota do leite é de grande importância para a compreensão de processos específicos, como de surtos de patógenos em aplicações biotecnológicas e de processamento de alimentos (GIRAFFA, 2004), bem como para prever e controlar os microbiomas (STEGEN; BOTTOS; JANSSON, 2018), e apresentar novas propostas clínicas de tratamentos baseados na recuperação da disbiose para eubiose (OOIJEVAAR et al., 2019).

Poucas técnicas têm sido utilizadas com o objetivo de reorganizar a microbiota de forma que ela seja reconduzida para um estado de eubiose. Assim, a principal técnica que aborda a reconstrução da microbiota para um estado de eubiose é o transplante, sendo que o mais realizado atualmente é o de microbiota fecal (FMT). Os FMT são atualmente utilizados para tratar com sucesso a infecção recorrente por *Clostridium difficile* em humanos (KELLY et al., 2016), sendo que o seu uso como tratamento é superior à utilização do antibiótico vancomicina como tratamento convencional (BAUNWALL et al., 2020). No entanto, um efeito colateral

potencial é a transferência não intencional de microrganismos patogênicos do doador para o receptor (LO VECCHIO; COHEN, 2014), como *Escherichia coli* altamente patogênica, qual pode levar a óbito o receptor (SER et al., 2021). Também estão surgindo evidências de efeitos extra intestinais e sistêmicos da reposição da microbiota intestinal (CRYAN; O'MAHONY, 2011) incluindo melhoras no quadro de depressão (KUROKAWA et al., 2018), obesidade (LEE; YACYSHYN; YACYSHYN, 2019), hipertensão (LI et al., 2017) e distúrbios autoimunes (ROSSER; MAURI, 2016). O FMT pode ajustar significativamente a riqueza de espécies intestinais e restaurar a proporção de bactérias anti-inflamatórias e, portanto, está sendo cada vez mais considerado no tratamento de síndromes e infecções persistentes (XU et al., 2021a).

Em suínos, juntamente com abordagens ômicas, o FMT tem sido utilizado para reduzir a diarreia pós desmame em sistemas intensivos de criação (SU et al., 2021). O transplante de microbiota do leite em casos de IMI tem sido explorado com intuito de retornar o equilíbrio de microrganismos no úbere, rompendo assim com o estado de disbiose da glândula mamaria ocasionado pela infecção (HU et al., 2020; MA et al., 2018), mas ainda são modelos estipulados em monogástricos. Em ruminantes, essa técnica tem sido utilizada para realizar a transfaunação da microbiota do rumem, a fim de intervir de forma positiva na microbiota responsável por processos metabólicos relacionados a eficiência da digestão de bovinos (STEINER et al., 2020; ZHOU et al., 2018). O transplante de microbiota do trato gastrointestinal em bezerros também já foi testado e demonstrou resultados positivos (KIM et al., 2021). Diante disso, esperamos com esse trabalho entender melhor o processo da infecção causada pelo agente *S. warneri*, que é uma importante bactéria na mastite caprina. Também esperamos que o controle da disbiose e recuperação da microbiota para um estado com alta diversidade e riqueza com o transplante de leite, possa recuperar o animal ou eliminar o agente causador da mastite.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Realizar a indução da infecção com *S. warneri* para criar um quadro de mastite subclínica em cabras e avaliar a utilização do transplante da microbiota do leite de animais saudáveis como estratégia de tratamento para a mastite caprina.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar animais clinicamente saudáveis, sem histórico de mastite e induzir a mastite subclínica caprina com o agente *Staphylococcus warneri*;
- Realizar o transplante de microbiota do leite de um animal escolhido como doador, para os animais com mastite subclínica induzida;
- Realizar análises hematológicas e bioquímicas do sangue dos animais durante as fases de infecção, transplante e compará-las;
- Realizar análises de CBT, CCS, CMT e microbiológica das amostras de leite dos animais durante as fases de infecção, transplante e compará-las;
- Realizar análises metataxonômicas das amostras dos animais durante as fases de infecção, transplante e compará-las.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Comitê de ética

As atividades desenvolvidas nessa pesquisa pertencem ao projeto “Mastite caprina: estudo da microbiota do leite por técnicas ômicas e microbiologia tradicional e o seu uso como forma de tratamento”, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFV, sob protocolo de n.º 62/2018 (anexado ao final).

3.2. Tamanho amostral

Para o cálculo do n, foi empregada a fórmula proposta por COCHRAN; CHAMBERS, (1965), denominado amostragem aleatória simples, e dada por:

$$n = \left(\frac{Z \cdot \sigma}{e_0} \right)^2$$

Em que,

n, estimativa do tamanho da amostra que se deseja obter;

Z, valor tabelado (tabela Z) que representa o valor sob a curva normal que se adota com determinado intervalo de confiança $(1 - \alpha)$. Intervalo utilizado: 95%; sendo Z, portanto, igual a 1,96, para os dois experimentos propostos, indução da infecção e transplante;

σ , desvio padrão da característica estudada. Neste caso, como serão estudadas várias características, será utilizado o valor 1 como referência para os dois experimentos propostos;

e, nível de precisão desejado. Na indução da infecção, será utilizada a seguinte relação: a precisão de detecção de alteração será, no mínimo, igual ao desvio padrão, ou seja, $e = 1,0$. Para o transplante de microbiota, como é esperada uma variação maior entre os resultados, pretende-se que a precisão de detecção de alteração seja de, no mínimo, 70% do desvio padrão, ou seja, $e = 0,7$.

Indução da infecção (1)

Temos,

$$n = \frac{1,96^2 \cdot 1^2}{1^2} = \frac{3,8416}{1} = 3,8416$$

Assim, devem ser utilizados o mínimo de quatro animais por grupo;

Transplante de microbiota (2)

Temos,

$$n = \frac{1,96^2 \cdot 1^2}{0,7^2} = \frac{3,8416}{0,49} = 7,84$$

Diante disso, o número mínimo aproximado de oito animais pode ser utilizado nessa fase experimental de transplante. Para o capítulo 3, como o delineamento experimental prevê uma análise pareada dos dados, ou seja, os mesmos animais serão avaliados antes e depois da aplicação do tratamento com o transplante, foram utilizados 8 animais no total.

3.3. Alocação e seleção de animais

Previamente ao início do experimento, o Infectório do Departamento de Veterinária (DVT) foi totalmente pintado e reformado antes da chegada dos animais, com previa higienização, limpeza e desinfecção com vassoura de fogo. Os animais foram alocados em baias separadas, suspensas do chão com paletes, com completo impedimento de contato uns com os outros, além de água e alimentação individual, sendo os recintos higienizados diariamente. As janelas e portas foram cobertas com telas milimetradas, para impedir a entrada de insetos e pássaros. O ar de dentro do local era trocado por exaustores. O controle de animais sinantrópicos foi realizada por uma empresa terceirizada que já atendia ao departamento. A entrada do local possuía uma ante-sala com dois pedilúvios com cal virgem, com separação de áreas limpas e sujas, banheiro para higienização e descontaminação na entrada e saída do local.

Uma cabra doadora de microbiota e outras sete cabras fêmeas sadias da raça Parda Alpina foram selecionadas para esse experimento, sendo todas adquiridas da unidade de caprinocultura da Universidade Federal de Viçosa, no mês de outubro de 2019. Todos os animais selecionados eram fêmeas primíparas, estavam em período de lactação, e apresentaram histórico clínico individual sem antibioticoterapia prévia ou outros medicamentos que pudessem interferir nos resultados de nossas análises. Também foram avaliados clinicamente, quanto a sinais de mastite e presença de leite visualmente anormal (ou seja, presença de flocos, coágulos, sangue ou leite seroso), assim como, alterações na glândula mamária, como aumento do volume e da temperatura corporal, e presença de dor e vermelhidão, dentre outras condições. A seleção desses animais se baseou também na melhor proximidade possível em parentesco genealógico, com base no histórico e inventário desses animais catalogados pela administração do capril. Essas foram transportadas, alocadas no Infectório, e mantidas por um período de duas semanas

de adaptação ambiental. Posteriormente, durante os meses de novembro e dezembro do mesmo ano, foi desenvolvido o experimento.

Logo, os animais pré-selecionados foram testados para IMI em três lactoculturas com ágar Sangue, de forma consecutiva e apresentaram resultado negativo (anterior ao período de pré-infecção) durante os 14 dias transcorridos antes do início da indução da infecção. Esses também foram avaliados quanto a infestação de helmintos, sendo coletadas amostras de fezes para exames de coprocultura (HOFFMANN, 1987). Além disso, foram coletadas amostras de sangue para teste sorológico de Linfadenite Caprina (*Corynebacterium pseudotuberculosis*) por meio da técnica de imuno-absorção enzimática (ELISA-indireto), o qual foi realizado no Laboratório de Imunologia e Biologia Celular - Instituto de Ciências da Saúde - Universidade Federal de Bahia (UFBA). Também foram realizados testes para Artrite Encefalite Caprina (CAE), por meio da técnica de imunodifusão em gel de agarose (IDGA), no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da Universidade do Vale do São Francisco (Univasf).

3.3.1. Seleção da cabra doadora de microbiota do leite

A seleção da cabra doadora, que posteriormente foi classificada como cabra (A), ocorreu em um período prévio ao experimento, seguindo os mesmos critérios já elencados na seção anterior e com outros novos descritos a seguir. Resumidamente, foi realizada uma varredura dos animais no setor de caprinocultura quanto a critérios alto parentesco genealógico, de boa sanidade e de alta produção de leite. Dessa forma, as cabras analisadas com excelentes condições clínicas, sem sinais de mastite e assim considerados sadios, foram avaliados posteriormente em três lactoculturas consecutivas, e os que não apresentaram qualquer crescimento de colônias em placas com ágar Sangue, passaram para a próxima etapa de seleção.

A partir desses pontos, nós procuramos identificar animais que poderiam apresentar características no leite e seus constituintes, como propriedades que poderiam retardar o crescimento bacteriano em placas e, com isso, foram coletadas alíquotas de leite de três animais com a maior agregação de características as quais buscávamos. Assim, o leite desses animais passou por processamento de separação do soro da massa celular com centrifugações intensas de 7.000 rpm até 15.000 rpm, sendo coletado posteriormente. Após essa etapa, separamos um isolado específico (102E-UFV) de *Staphylococcus aureus* causador de mastite em cabras e o cultivamos em BHI a 37°C “overnight”, o qual ajustamos para uma densidade de aproximadamente 3×10^8 UFC/ml. Após isso, foi realizado o espalhamento das três amostras do soro de leite em placas, e separamos mais uma placa sem o soro, sendo um controle positivo, o

qual iria conter apenas o isolado na placa de forma espalhada. Assim, nas placas contendo o soro foi inoculada o isolado específico, relatado anteriormente, e após, realizamos a contagem de unidades formadoras de colônias por cerca de 16 horas em todas as placas.

Com a colheita dos dados, transformamos os números de colônias em escalas logarítmicas, realizamos testes estatísticos nas fases de crescimento (log) bacteriano, estacionária e morte. Os dados foram analisados estatisticamente por comparação de médias com testes de ANOVA, no software SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EUA) e teste T, para comparar apenas duas fases de crescimento ($P \leq 0,05$). Diante dos resultados, foi demonstrado que a amostra da cabra denominada de A deteve a atividade de interferência no crescimento bacteriano nas diferentes fases, e com isso, selecionamos esse animal como o doador de leite para o transplante de microbiota. A metodologia descrita aqui para seleção do animal doador de leite foi construída com auxílio de professores e pesquisadores que colaboraram ao longo de toda a pesquisa.

3.3.2. Organização experimental das cabras para a fase de infecção experimental com *S. warneri* e de transplante de microbiota

Nas fases relacionadas, cada um desses animais selecionados receberam uma letra do alfabeto como forma de identificação experimental: Cabra A – Doadora de leite, Cabra B - controle externo, Cabra C - Infectada/Transplantada, Cabra D - Infectada/Transplantada, Cabra E - Infectada/Transplantada, Cabra F - Infectada/Transplantada, Cabra G - Infectada/Transplantada, Cabra H - Infectada/Transplantada. Desses, seis animais tiveram apenas um lado do úbere infectado e transplantado (D - lado direito), sendo o outro mantida como controle interno (E - lado esquerdo), e com isso as cabras da letra C até a letra H foram infectadas e receberam transplante apenas no úbere do lado direito. Na fase relacionada ao transplante, esses mesmos animais continuaram com a mesma letra do alfabeto como forma de identificação experimental, no entanto, obedecendo a uma nova designação de transplantadas.

A cabra A foi mantida como doadora de leite, e o úbere do lado esquerdo e direito apenas foi manipulado para colheita do leite que foi utilizado para o transplante. A cabra B foi mantida como controle externo, não tendo nenhum dos lados do úbere infectados ou recebido transplante, tendo apenas um dos lados (direito) inoculado com uma solução salina 0.9% estéril, utilizada como placebo no mesmo dia de indução de infecção e transplante aos outros animais. Portanto, seis úberes do lado direito dos animais foram infectados e posteriormente receberam transplante de leite, e os pares esquerdos ficaram como controle interno, e outras dois lados do úbere de

um único animal (Cabra B - úbere lado direito e esquerdo), foram mantidos sadios, no intuito de serem estudadas como controle externo e assim determinarem variações ambientais e de manejo no local.

Durante todo o experimento as cabras foram ordenhadas manualmente, com pré-dipping e pós-dipping, sendo que a ordenha e todo e qualquer contato, sempre seguiu as letras alfabéticas em ordem crescente, com isso, a primeira cabra a ser sempre ordenhada foi a cabra A e a última a cabra H. Somente pessoas autorizadas estiveram em contato com os animais, seguindo as normas regulares de controle sanitário.

3.3.3. Indução da infecção, transplante e relação dos períodos para cada fase

Os animais foram avaliados em 12 períodos (P) consecutivos e duas fases, infectados e transplantados. Na fase de infecção, os animais foram inoculados com uma cepa de *S. warneri* entre os períodos P0 e P2. Esses foram avaliados durante oito dias e oito períodos (P0 até P7), sendo que P0 foi o período e dia em que os animais se apresentavam ainda sadios. Na fase de transplante, os animais foram avaliados por sete períodos, do período P8 até o último período PA. Entre P8 e P9 os animais receberam o primeiro transplante de microbiota, no entanto, em P8 os animais ainda não haviam sido transplantados.

Antes da inoculação, foram estabelecidas as características bacteriológicas e celulares do leite, realizada a ordenha completa e antisepsia em ambos os úberes com álcool 70%. Após a inoculação (2 ml), foi realizada uma massagem envolvendo movimentos ascendentes para que o inóculo fosse distribuído por toda a glândula mamária. As inoculações foram realizadas utilizando-se a via intramamária com uma sonda uretral nº06 estéril, acoplada a uma seringa plástica esterilizada. Apenas uma cepa de *S. warneri* foi utilizada na dose infecciosa de $1,2 \times 10^8$ UFC (DE MORAES PEIXOTO et al., 2015). Este isolado de campo foi obtido de um caso de mastite subclínica caprina e identificada por suas características microbiológicas e genéticas. O DNA da amostra utilizada na infecção dos animais foi extraído e submetido ao sequenciamento completo de seu genoma, pela Universidade do Vale do São Francisco (UNIVASF), a qual confirmou a espécie como *S. warneri*.

Durante a fase de transplante, o leite da cabra A era coletado diariamente em frascos reagentes graduados e esterilizados. Após esses procedimentos, o volume de 120 ml de leite proveniente da cabra A era introduzida lentamente no úbere do lado direito desses animais com o auxílio de seringas estéreis, por meio de uma sonda uretral nº06 estéril, e então realizada uma

massagem envolvendo movimentos ascendentes para que a microbiota presente no leite fosse distribuída por toda a glândula mamária.

Em síntese, todo o período experimental foi compreendido por 23 dias em que os animais foram induzidos a mastite subclínica e receberam o transplante em seus úberes do lado direito o leite de cabra doadora, sendo os últimos quatro dias da fase de transplante relacionado ao período em que observamos o final da evolução do quadro geral, denominado de resiliência. Logo, foram estabelecidos os seguintes períodos experimentais para a indução da infecção e transplante de microbiota: P0 - antes da infecção; P2 - 24 horas após-infecção; P4 - 72 horas após-infecção; P6 - 120 horas após-infecção; P7 - 144 horas ou seis dias após-infecção; P8 - 168 horas ou sete dias pós-infecção e início do transplante; P9 – três dias de transplante; P10 - cinco dias de transplante; P11 - sete dias de transplante; P12 - nove dias de transplante; P13 – dois dias de término de transplante e PA - quatro dias de término do transplante.

Os animais foram monitorados frequentemente por meio de avaliações clínicas, quanto a sinais de mastite e presença de leite visualmente anormal (ou seja, presença de flocos, coágulos, sangue ou leite seroso), assim como alterações na glândula mamaria, como aumento do volume e da temperatura corporal, e presença de dor e vermelhidão durante a realização da ordenha, sempre na presença de um médico veterinário. Durante os períodos analisados nas fases de indução da infecção e transplante, foram estabelecidas as características bacteriológicas e celulares do leite, e anterior a cada procedimento, foi realizada a ordenha completa, pré-dipping e pós-dipping, e antisepsia em ambos os tetos com álcool 70%.

3.3.4. Separação dos períodos e fases em subgrupos para as análises da microbiota realizadas no capítulo 3

Para facilitar a comparação e compreensão entre as análises posteriores, de todos os períodos durante as análises de microbiota pelo sequenciamento do gene 16S, foram criados subgrupos de períodos para o capítulo 3, compreendendo: Grupo A (cabra doadora) todos os tetos, direito e esquerdo; Grupo C.E - controle externo - (cabra B) - todos os tetos, direito e esquerdo; Grupo C.I - controle interno - todos os tetos esquerdos, das cabras C, D, E, F, G, H; Grupo I - Todos os tetos direitos induzidos a mastite subclínica das cabras C, D, E, F, G, H; Grupo PS - todos os tetos do lado direito das cabras C, D, E, F, G, H no período P0 (sadio); Grupo Ti - Transplante inicial - Todos os tetos do lado direito referentes aos períodos na fase de Transplante das cabras C, D, E, F, G, H, entre P8, P9, P10; Grupo Tf - Transplante final -

Todos os tetos do lado direito referentes aos períodos da fase de Transplante das cabras C, D, E, F, G, H, entre P11, P12, P13 e PA.

Quadro 1 - Separação dos caprinos subgrupos nos períodos para a análise de microbiota.

Períodos	Grupo A	Grupo C.E	Grupo C.I	Grupo PS	Grupo I	Grupo Ti	Grupo Tf
P0	A - U.E - U.D	B - U.E - U.D	C.D.E.F.G.H - UE	C.D.E.F.G.H - UD			
P2	A - U.E - U.D	B - U.E - U.D	C.D.E.F.G.H - UE		C.D.E.F.G.H - UD		
P4	A - U.E - U.D	B - U.E - U.D	C.D.E.F.G.H - UE		C.D.E.F.G.H - UD		
P6	A - U.E - U.D	B - U.E - U.D	C.D.E.F.G.H - UE		C.D.E.F.G.H - UD		
P7	A - U.E - U.D	B - U.E - U.D	C.D.E.F.G.H - UE		C.D.E.F.G.H - UD		
P8	A - U.E - U.D	B - U.E - U.D	C.D.E.F.G.H - UE			C.D.E.F.G.H - UD	
P9	A - U.E - U.D	B - U.E - U.D	C.D.E.F.G.H - UE			C.D.E.F.G.H - UD	
P10	A - U.E - U.D	B - U.E - U.D	C.D.E.F.G.H - UE			C.D.E.F.G.H - UD	
P11	A - U.E - U.D	B - U.E - U.D	C.D.E.F.G.H - UE				C.D.E.F.G.H - UD
P12	A - U.E - U.D	B - U.E - U.D	C.D.E.F.G.H - UE				C.D.E.F.G.H - UD
P13	A - U.E - U.D	B - U.E - U.D	C.D.E.F.G.H - UE				C.D.E.F.G.H - UD
PA	A - U.E - U.D	B - U.E - U.D	C.D.E.F.G.H - UE				C.D.E.F.G.H - UD

Cada letra representa uma cabra: A, B, C, D, E, F, G, H. Separação dos úberes contralaterais: U.E: Úbere esquerdo; U.D: Úbere direito. Separação dos subgrupos: Cabra A (animal doador de microbiota do leite); cabra B (controle externo - C.E); úberes não infectados esquerdo - C.I; úberes induzidos a infecção - I; período P0, em que os animais estavam saudáveis - PS; períodos finais do transplante - Tf; períodos iniciais do transplante - Ti. Separação das fases, subfases e períodos por cores: Cor azul: Período em que os animais estavam saudáveis. Cor vermelha: Fase de infectados. Cor roxa: Fase inicial do transplante. Cor verde: Fase final do transplante. Fonte: Elaborado pelo autor.

3.4. Coleta e processamento de amostras

3.4.1. Amostras de leite e monitoramento das condições clínicas dos úberes

A quantidade de leite produzida por cada animal foi mensurada diariamente com um copo medidor graduado. Para as mensurações da produção de leite, foi adicionado o período P8.1 no capítulo 2, devido ao maior número de medições nessa fase. As coletas de amostras de leite para exames foram realizadas em duplicata em todos os períodos experimentais, em tubos de centrifugação do tipo Falcon de 50ml de fundo cônico, estéril e livre de DNase e RNase - ®Kasvi durante a ordenha manual e prontamente levadas ao laboratório para serem separadas em alíquotas e dar destino adequado. Além disso, para cada amostra, uma alíquota de 2 mL de leite foi armazenada a -80 °C até posterior extração de DNA ou outra análise requisitada. O diagnóstico da mastite subclínica e monitoramento das condições de saúde das glândulas mamárias, assim como a verificação da “carga microbiana” no leite, foram realizadas a partir de avaliações clínicas citadas anteriormente, análises do leite por meio de lactoculturas bacterianas, exames laboratoriais sanguíneos, contagem de células somáticas (CCS), *California Mastitis Test* (CMT) e contagem bacteriana total (CBT).

O CCS foi mesurado em unidade de 10^3 x CS/ml, o CBT 10^3 x UFC/ml, e o CMT foi avaliado como medida indireta que variou entre negativo, traço, 1+, 2+ e 3+, conforme descrito por Schalm e Noorlander (SCHALM, 1957). Os seguintes valores foram considerados como indicadores da doença: CCS: $>1 \times 10^6$ CS/ml e/ou CMT: $\geq 2+$ (DE MORAES PEIXOTO et al., 2015; SOUZA et al., 2012a). Por outro lado, o CCS no leite de cabras livres de infecção intramamária (IM) ou saudáveis podem variar entre 270 e 1.000×10^3 células mL^{-1} (MCDOUGALL et al., 2001; SOUZA et al., 2012a). A CBT foi utilizada como valor comparativo de UFC/ml entre os períodos elencados. Nas fases analisadas, os exames de CMT foram realizados apenas nos períodos P0, P5, P8 e PA.

O leite para realização das análises de CCS e CBT foi fracionado em frascos de polipropileno com aproximadamente 40 mL contendo conservantes na forma de pastilhas de Bronopol® e Azidiol, respectivamente, e então refrigeradas a temperaturas de 2 a 6°C em geladeira e enviadas para a unidade de Embrapa Gado de Leite situada na cidade de Juiz de Fora - MG, dentro de 3 dias após coleta. As amostras eram então processadas assim que chegavam à unidade, com prévia verificação das condições de envase e da temperatura. A análise do leite para determinação da CCS foi realizada pelo método citometria de fluxo, por meio do equipamento eletrônico da marca ®Bentley Instruments, NexGen modelo Somacount FCM Bentley FTS. A determinação da CTB foi realizada pelo equipamento eletrônico da marca ®Bentley Instrument, modelo Bactcount IBC.

3.4.2. Testes bacteriológicos e coletas de amostras de sangue

O cultivo bacteriano foi utilizado como teste confirmatório da mastite juntamente com os outros métodos de diagnósticos citados nesse trabalho, como o CCS, os exames clínicos e o teste da caneca de fundo preto e telada. Além disso, o cultivo foi utilizado para fins de identificação e isolamento bacteriano, sendo realizado de acordo com os critérios estabelecidos pelo National Mastitis Council (HOGAN et al., 1999). Para o cultivo das bactérias, amostras de 100 μL de leite pré-homogeneizado foram utilizadas para cultura bacteriológica, as quais foram espalhadas em placas de ágar Sangue e ágar cromogênico Accumast® (GANDA et al., 2016), as quais eram incubadas a 37°C, utilizando das técnicas de cultivo padrão. O ágar cromogênico não foi utilizado para diagnóstico da mastite. Esse contém três meios seletivos que permitem selecionar e identificar bactérias, a partir de uma paleta de cores específicas com bactérias pré catalogadas e comumente isoladas em casos de mastites. As placas foram lidas após 24, 48 e 72 horas. No ágar Sangue, as placas com mais de três colônias após 48 a 72 horas de incubação

a 37 °C foram consideradas positivas em uma amostra de leite individual (BUELOW et al., 1996).

As amostras de sangue dos animais foram coletadas através da venopunção a vácuo da veia jugular, em tubos com e sem anticoagulante (EDTA) para a realização do hemograma e das provas bioquímicas. Logo, foram realizadas: a contagem de hemácias, determinação da hemoglobina, hematócrito, o volume corpuscular médio (VCM), a concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), a contagem de leucócitos totais, assim como foram realizadas as contagens de neutrófilos, bastonetes, linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos, plaquetas, proteína e fibrinogênio. Exclusivamente para as análises dos capítulos 1 e 3, nós subdividimos as coletas de amostras de sangue em mais períodos amostrais, para melhor averiguar as alterações, logo, consideramos as seguintes divisões: P0, P0.1, P2, P2.1, P4, P4.1, P4.2, P6, P7 e P8.

3.5. Extração de DNA, amplificação do gene 16s rRNA e sequenciamento

O DNA total das amostras de leite foi extraído utilizando o QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA), seguindo o protocolo de processo “Blood or Body Fluid Spin Protocol” (Spin Protocol), com modificações descritas por KUEHN et al., (2013). A concentração e a pureza do DNA foram quantificadas por dois métodos diferentes, sendo o primeiro por espectroscopia (densidade óptica) em um espectrofotômetro NanoDrop® Therm Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, EUA) (OIKONOMOU et al., 2012), e o segundo por meio do kit Qubit™ dsDNA BR, com um fluorômetro Qubit 2.0 (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

Amostras de DNA extraídas foram posteriormente liofilizadas no DVT / UFV em um liofilizador a vácuo Edwards® e enviadas ao Laboratório da empresa Neopropecta (Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil) em caixa isotérmica, devidamente identificadas, para sequenciamento. Nesse laboratório, o preparo das bibliotecas seguiu um protocolo próprio. As regiões hipervariáveis V3/V4 do gene 16S rRNA bacteriano foram amplificadas a partir de DNA genômico por reação em cadeia da polimerase usando os primers 341F (CCTACGGGRSGCAGCAG) (WANG; QIAN, 2009) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT)(CAPORASO et al., 2012) otimizados para a plataforma Illumina MiSeq (Illumina Inc., San Diego, CA)112, com MiSeq Reagent Kit V2 de 500 ciclos no modelo *paired-end*.

3.6. Estatísticas

Para realizar comparações entre os períodos elencados acima, nas análises referentes ao CCB, CCS e entre as séries sanguíneas (Leucócitos, Linfócitos, Neutrófilos e Monócitos) utilizamos o teste t pareado, tendo o P0 ou P8 como referência, dependendo da fase analisada. Portanto, comparou-se as médias do P0 e P8 com as médias dos outros períodos. O software utilizado foi o SPSS V.20 (IBM, 2012).

3.7. Bioinformática

3.7.1. Análises de sequência e processamento dos dados

As análises seguiram pipelines executadas no programa R (R TEAM CORE, 2018). Inicialmente, as sequências do adaptador das bibliotecas sequenciadas foram removidas dos arquivos FASTQ, usando o software Cutadapt v4.0 (MARTIN, 2011). Por conseguinte, as variantes de sequências de “amplicons” (ASVs) foram inferidas utilizando o pacote “DADA2” (versão 1.20.0) em R.

O processamento dos dados seguiu o tutorial de referência do DADA2 (CALLAHAN et al., 2016; CALLAHAN; MCMURDIE; HOLMES, 2017) (<https://benjjneb.github.io/dada2/tutorial.html>). Depois de uma análise preliminar da qualidade das sequências, os arquivos FASTQ “brutos” foram filtrados com a função *fastqFilter* de acordo com os seguintes parâmetros: as sequências foram truncadas para um comprimento de 280 na sequência “forward” e 170 na sequência “reverse” (*truncLen* = 280, 170), e descartadas as com mais de 3 a 5 erros esperados para cada uma das fitas citadas anteriormente (*maxEE* = 3,5). A partir desse ponto, foi seguida o pipeline padrão do método, com os ASVs inferidos independentemente. As sequências “quimeras” identificadas para cada amostra foram removidas pelo método de consenso.

A atribuição taxonômica foi realizada em nível de gênero e espécie de acordo a pipeline descrita com o tutorial do DADA2 e parte fornecida por um autor em: <https://github.com/ycl6/16S-rDNA-V3-V4>. Os bancos de dados utilizados foram o Silva v.138.1 (PRUESSE et al., 2007) e NCBI (FEDERHEN, 2012) que contém os nomes de todos os organismos associados às submissões aos bancos de dados de sequências do National Center for Biotechnology Information (NCBI). A busca e classificação foi realizada pela implementação do Classificador Ribossomal Database Project (RDP), um classificador bayesiano, utilizando parâmetros padrões (QUAST et al., 2013; WANG et al., 2007). A região hipervariável V4 já permite a classificação a nível de espécie entre ASVs com 99% a 100% de

identidade para muitas bactérias entre bancos (EDGAR, 2018), e as regiões variáveis V3-V4 agrupadas do gene 16S rRNA permitem uma classificação taxonômica ainda maior a nível de espécies para muitas bactérias (BUKIN et al., 2019). Assim, para alcançar uma classificação taxonômica mais acurada a nível de espécie, uma curadoria manual foi realizada entre os dois bancos citados e apenas táxons entre 100% e 99% de identidade de sequência em pelo menos um dos bancos foram mantidas a esse nível, e o restante foi deixado a nível de gênero ou outro nível de taxonômico. A reavaliação classificatória foi realizada apenas entre os táxons mais abundantes. Outras técnicas similares têm sido utilizadas em outros estudos (GWAK; RHO, 2020).

3.7.2. Análises ecológicas e estatísticas

Todas as análises estatísticas de identificação taxonômica foram realizadas utilizando-se diversos pacotes e funções implementadas no software R. Em seguida, utilizando o pacote Phyloseq (McMurdie e Holmes, 2013a), inspecionamos os dados para remoção de quaisquer contaminações de ASVs com atribuições filogenéticas de famílias relacionados a cloroplastos e mitocôndrias. Para simplificar as análises a jusante e reduzir ainda mais o ruído das análises, aplicamos um limiar de prevalência e abundância para ASVs bacterianos, nos quais a taxa só era mantida se fossem encontradas em uma frequência mínima de 1% de ASV em pelo menos uma amostra.

3.7.3. Análise de diversidade e composição da microbiota

A diversidade alfa foi analisada no pacote Phyloseq (MCMURDIE; HOLMES, 2013b) utilizando métricas dos índices de diversidade de Shannon (SHANNON, 1948), de riqueza Chao1 (CHAO, 1984) e Espécies Observadas com o software estatístico R (R TEAM CORE, 2018). Para testar a normalidade estatisticamente, fizemos o teste de normalidade shapiro-wilk antes de comparar diferentes valores de diversidade alfa nos diferentes grupos. Os valores dos índices para diferentes grupos foram comparados pela ANOVA ($\alpha < 0,05$), seguido pelo teste pós-hoc de Tukey utilizando o pacote Vegan V2.5.7 (JARI OKSANEN, F. GUILLAUME BLANCHET, MICHAEL FRIENDLY, ROELAND KINDT, PIERRE LEGENDRE, DAN MCGLINN; R. MINCHIN, R. B. O'HARA, GAVIN L. SIMPSON, PETER SOLYMOS, M. HENRY H. STEVENS, 2019).

As diferenças na estrutura comunitária ou análise de Beta diversidade entre diferentes grupos foram avaliadas pela ordenação de coordenadas principais (PCoA), de dimensionamento

multidimensional não métrico (NMDS), análise canônica das coordenadas principais (CAP) (ANDERSON; WILLIS, 2003), usando a distância de dissimilaridade de Bray-Curtis (BRAY; CURTIS, 1957) e Euclidiana (LEGENDRE; GALLAGHER, 2001), com base em dados de abundância para distinguir diferenças nas estruturas da comunidade. A análise CAP confere a flexibilidade de utilizar várias medidas de distância, similaridade ou dissimilaridade, como a dissimilaridade de Bray-Curtis (ANDERSON; WILLIS, 2003). Explorando os dados mais profundamente, foram realizadas a Análise de Variância Multivariada Permutacional (PERMANOVA) para as diferenças nas comunidades entre os grupos, sendo conduzidas utilizando-se a função `adonis` do pacote `Vegan` (JARI OKSANEN, F. GUILLAUME BLANCHET, MICHAEL FRIENDLY, ROELAND KINDT, PIERRE LEGENDRE, DAN MCGLINN; R. MINCHIN, R. B. O'HARA, GAVIN L. SIMPSON, PETER SOLYMOS, M. HENRY H. STEVENS, 2019) e diferenças Bray-Curtis acima de 1.000 permutações no software R (R TEAM CORE, 2018). Os testes pós-hoc em pares foram realizados utilizando a função `pairwise.adonis` do pacote `pairwiseadonis` (MARTINEZ RIO ARBIZU, 2020) com correção de Bonferroni para calcular a significância estatística.

A composição da microbiota foi analisada em gráficos de barra utilizando-se o pacote `Phyloseq` (MCMURDIE; HOLMES, 2013b), `Microbial` (<https://github.com/guokai8/microbial>) e `ggplot2` em R. Os pacotes `MicrobiotaProcess` (XU S, 2020), `Venn` (<https://github.com/dusadrian/venn>) e `VennDiaGram` (Chen e Boutros, 2011) foram usados para construir um diagrama de Venn com os diferentes grupos.

Capítulo 1 – Indução da mastite subclínica pela inoculação de *Staphylococcus warneri* em cabras sadias.

1. INTRODUÇÃO

A mastite, ou inflamação da glândula mamária (IMI) (MENZIES; RAMANOON, 2001b; SAR et al., 2018), é causada principalmente pela infecção bacteriana intramamária, sendo a doença de pequenos ruminantes mais relevante, que causa graves perdas econômicas para a indústria de laticínios em todo o mundo (DORE et al., 2016; OIKONOMOU et al., 2014a), com o risco à saúde pública devido à presença de patógenos e toxinas liberadas nos alimentos, bem como resíduos de antimicrobianos (CONTRERAS et al., 2007). A maioria dos casos de IMI são crônicos, difíceis de tratar e propensos ao ressurgimento e, portanto, são frequentemente acompanhados por tratamento antibiótico de custo intensivo de longa duração e descarte prematuro de animais (GRUNERT et al., 2018; MENZIES; RAMANOON, 2001b; SCHUKKEN et al., 2011; WHITE; HINCKLEY, 1999). Os estafilococos são as bactérias mais frequentemente isoladas da mastite caprina e, portanto, são considerados os mais importantes agentes etiológicos para esta infecção (SILVA et al., 2004).

Embora menos patogênico que o *Staphylococcus aureus*, os *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) também pode produzir mastite subclínica persistente, aumentar significativamente a contagem de células somáticas (CCS) no leite e causar mastite clínica (CONTRERAS et al., 1997, 2007). A persistência de IMI subclínica durante a lactação é variável de acordo com o patógeno causador, mas geralmente é alta, uma vez que os estafilococos representam os mais frequentes. As IMI subclínicas são em geral mal detectadas e não eliminadas, pelo menos durante a lactação. Em geral, a mastite subclínica em caprinos é mais frequentemente causada por SCN (BERGONIER et al., 2003). *S. warneri* é um SCN que geralmente tem sido relacionado na maioria das vezes a casos de mastite subclínica, e outros poucos casos de mastite clínica em caprinos (DA SILVA et al., 2004b; DEINHOFER; PERNTANER, 1995a; PEREIRA et al., 2021), inclusive em casos de mastite persistentes (BERNIER GOSSELIN et al., 2019).

Além disso, vários outros *Staphylococcus* sp., em diferente tipos de mastite tem sido isolados de leite de cabra como: *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. caprae*, *S. lentus*, *S. simulans*, *S. capitis*, *S. lugdunensis*, *S. xylosus*, *S. chromogenes*, *S. hominis*, *S. arlettae*, *S. sciuri*, *S. saccharolyticus*, e *S. saprophyticus* (DA SILVA et al., 2004a; DEINHOFER; PERNTANER, 1995b), e outros SCN como *S. cohnii*, *S. equorum*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. lentus* (BERNIER GOSSELIN et al., 2019). Por outro lado, a etiologia da mastite clínica está envolvida também com os seguintes patógenos: *Staphylococcus aureus*, membros da família *Enterobacteriaceae*, *Corynebacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Mycoplasma* spp., alguns SCN, e fungos, como *Aspergillus fumigatus* (NOVAC; ANDREI, 2020a).

Na maioria das vezes, IMI é acompanhada pela multiplicação de bactérias no leite, determinando o aumento de contagem de bactérias totais no leite (CBT) e pelo aumento do células somáticas (CCS). Ambos os indicadores desempenham um papel fundamental na avaliação da qualidade do leite (BAGNICKA et al., 2011; PODHORECKÁ et al., 2021). O diagnóstico de mastite, denominado como padrão ouro deve ser realizado a partir da cultura bacteriana (CONTRERAS et al., 2007). O uso de técnicas como CCS é excelente para o controle da mastite no rebanho, e o CBT é uma técnica utilizada para acompanhamento da qualidade higiênica e sanitária do ambiente de ordenha. As CBTs no leite do tanque expressam a quantidade de contaminação microbiana nele contida (BAGNICKA et al., 2011; LIANOU et al., 2021; LOPES et al., 2012). O teste denominado “*California Mastitis Test*”, é amplamente utilizado, com certa precaução, para medir indiretamente a CCS em caprinos, porque é barato, rápido e fácil de ser realizado, o qual tem se observado altas correlações com outros testes (SOUZA et al., 2012b).

Outra forma mais recente de abordar as IMI, são os estudos de microbioma do leite de cabras (MCINNIS et al., 2015b; POLVEIRO et al., 2020a; ZHANG et al., 2017b) e leite de vaca (ADDIS et al., 2016a; BONSAGLIA et al., 2017b; OIKONOMOU et al., 2014b). Esses estudos em diversas situações têm demonstrado a complexidade das interações de patógenos e comensais presentes em situações de adoecimento ou não do animal. As doenças podem ser consequência de uma soma de muitas variáveis complexas que interagem, que podem ir além da mera interação entre hospedeiro, patógeno e ambiente, como o conhecemos (HEDRICK, 1998). As análises ômicas do leite têm desvendado novas variáveis para compreensão dos diferentes tipos de mastite, o que permite a reconstrução de sistemas que abordam essa doença infecciosa (ECKHARDT et al., 2020b; GARIRA, 2019b).

Poucos estudos têm revelado a real microbiota do leite caprino (MCINNIS et al., 2015a; POLVEIRO et al., 2020b; ZHANG et al., 2017a), e são quase inexistentes os estudos que puderem relacionar uma infecção experimental com o desenvolvimento da IMI (GANDA et al., 2017). Assim, o objetivo desse estudo foi realizar a infecção com *S. warneri* para criar um quadro de mastite subclínica em cabras, e identificar as modificações que ocorreram na microbiota bacteriana a partir de técnicas de diagnóstico padrão de mastite, sequenciamento de alto rendimento do gene 16S rRNA e análise metataxonômica.

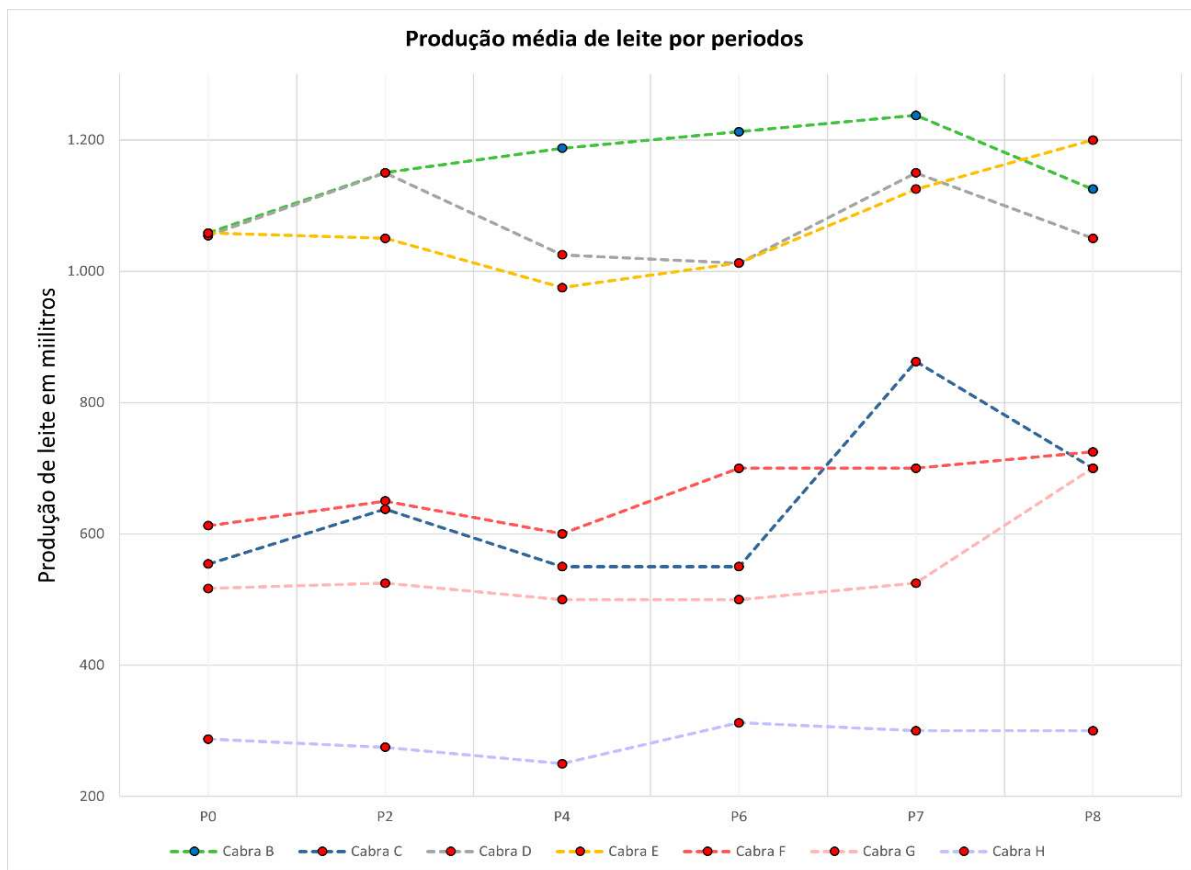
2. RESULTADOS

2.1. Produção de leite, Contagem de células somáticas (CCS), Contagem bacteriana total (CBT), *Califórnia mastitis test* (CMT) e Lactoculturas

A produção total de leite dos animais infectados (Cabra C, D, E, F, G, H) e do controle externo (cabra B) que foram mensuradas diariamente se encontram na figura 1. Os animais encontravam-se sadios no período P0, e em P2 foi o primeiro dia em que os animais estavam infectados, ou seja, havia passado um período de 24 horas após a inoculação do agente *S. warneri*. Na figura 1 é possível observar que entre os períodos P2 e P4, ocorreu uma redução na produção de leite (7% no total), sendo que apenas o animal B, o controle externo, manteve a produção em pequeno aumento diário. Após o período P6 os animais passaram a recuperar a produção de leite, e as cabras C (aumento de 57% de P6 para P7) e E (aumento de 11% de P6 para P7) foram os animais que recuperaram a produção superando até mesmo a quantidade produzida antes do período de inoculação.

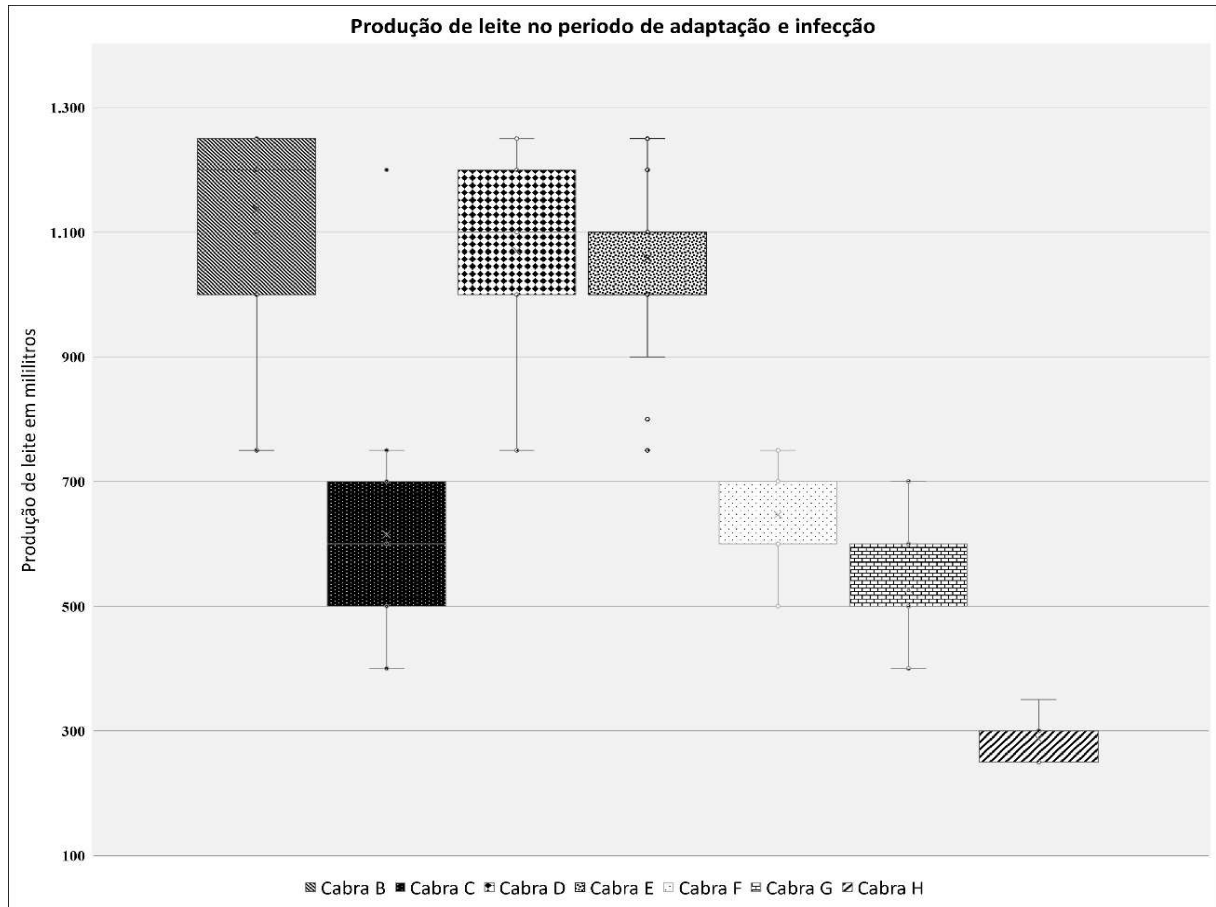
No entanto, por algum fator ainda não identificado, ocorreu uma queda na produção de leite dos animais inoculados D (queda de 7% de P7 para P8) e C (queda de 26% de P7 para P8), e do controle externo B (queda de 17% de P7 para P8) enquanto os outros animais continuaram a aumentar suas produções de leite. Em geral, as cabras C, D e E foram as que mais produziram leite nesse período, deixando as cabras F e G com uma produção mediana, e a cabra H com a pior produção inicial e no pós indução da mastite, em todos os períodos estudados.

Figura 1 - Produção média de leite no período sadio e na fase de infecção. A produção de leite dos animais do úbere nos lados esquerdo e direito somados tiveram seus valores distribuídos em medias de mililitros de leite produzidos por período estudado. Período de sadios (P0) compreende uma fase de 6 dias antes da inoculação do *S. warneri*. Os períodos P2, P4, P6, P7 e P8 compreendem desde o início da infecção induzida até o período final catalogado. Cada cor nas linhas do gráfico compreende um animal experimental. A cabra B, em verde, foi o animal mantido como controle externo, sem infecção, e as cabras C, D, E, F, G e H em outras cores foram os animais induzidos a mastite subclínica.



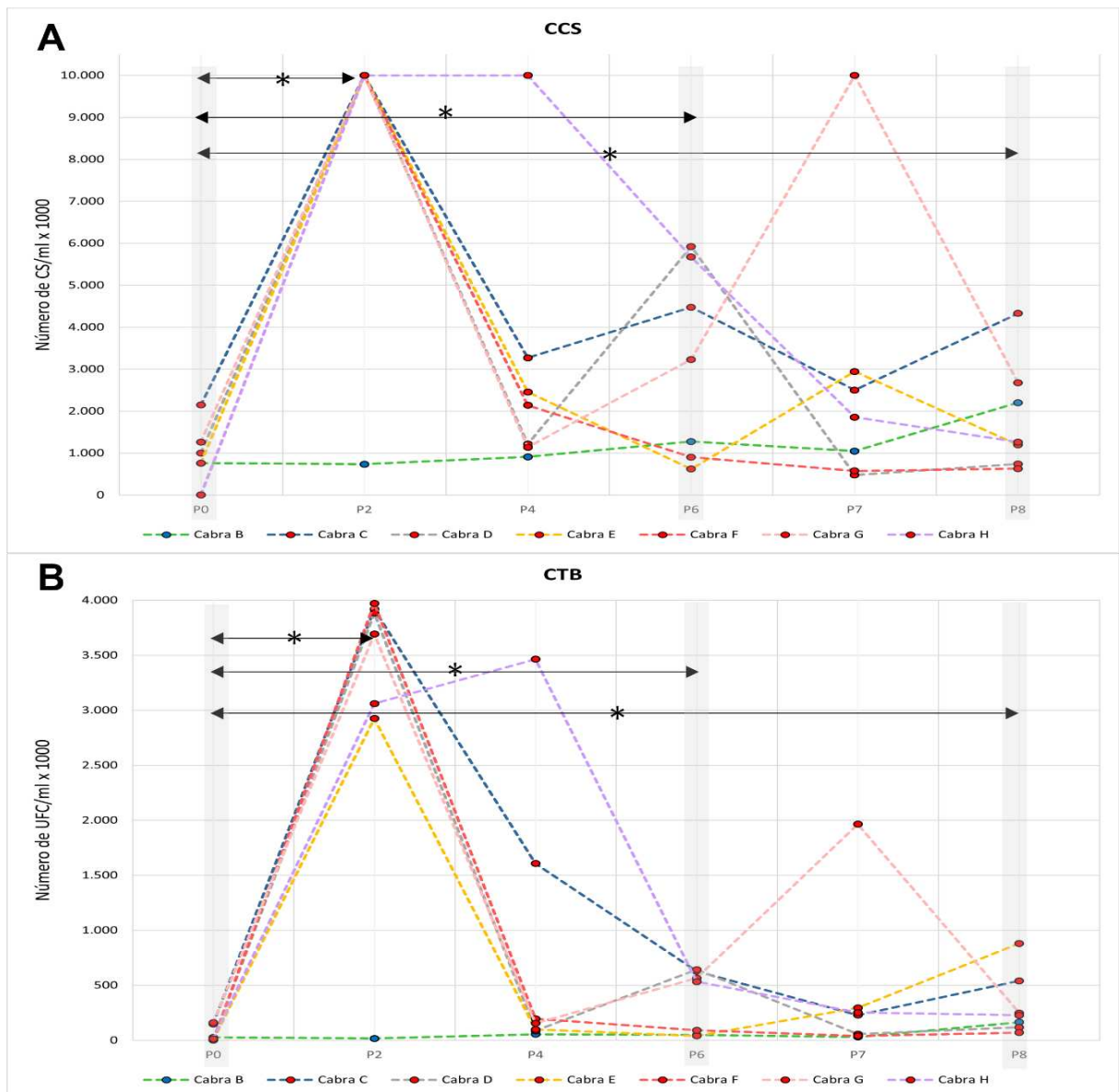
A produção de leite também foi explorada em um gráfico de boxplot na figura 2 abaixo, o que permite identificar as maiores e menores variações de produção de leite dos animais em todos os períodos aqui elencados. Isso permite demonstrar de uma forma diferente, quais animais apresentaram uma menor ou maior produção, e observar a variação na quantidade de leite produzida dentre os períodos P0, P2, P4, P6, P7 e P8 somados. Diante disso, é possível observar que as cabras D e E, em geral foram as que mais produziram leite no período em que estiveram sadias e na fase de indução à infecção por *S. warneri*, as cabras C, F e G apresentaram uma produção intermediária, enquanto a cabra H deteve a menor produção de leite.

Figura 2 - Boxplot da variação de produção de leite das cabras no período sadio em P0 e na fase de infecção de P2 até P8. A variação da produção de leite dos animais somando-se os úberes esquerdo e direito distribuídos em mililitros de leite por animal. Cada cor e ranhura nas linhas do gráfico, compreende um animal experimental somando todos os períodos elencados. A cabra B na posição inicial a esquerda, foi o animal mantido como controle externo, sem infecção, e as cabras C, D, E, F, G e H, em outras cores e ranhuras, foram os animais induzido a mastite subclínica.



A figura 3A demonstra o número de contagem de células somáticas (CCS) do úbere direito de cada cabra durante a fase de infecção e período de sadios. Retomando brevemente os valores de diagnóstico, foi estipulado que para ser diagnosticado a mastite a partir da contagem de células no leite, deve ser detectado valores SCC acima de: $>1 \times 10^6$ CS/ml. As cabras que foram induzidas a infecção tiveram uma “explosão” em número de células enviadas até as glândulas mamárias em P2 (24 horas pós infecção), da ordem de chegar a 9.999×10^3 CS/ml no leite do úbere animal, a não ser a cabra B, que foi a controle externo experimental e por isso não foi infectada. O mesmo ocorreu para a CBT na figura 3B, a qual apresentou contagens até o limite de detecção instrumental em P2, a não ser pela cabra E e H que alcançaram a contagem de 3.000×10^3 UFC/ml, e mesmo assim a cabra H aumentou o número de UFC/ml em P4. Alguns animais apresentaram um leve aumento de contagem de CCS e CTB após a queda em P4, dando ênfase à cabra G que deteve um súbito aumento em P7, para ambas as contagens e depois uma queda.

Figura 3 - Contagem de células somáticas (CCS) e contagem de bacteriana total (CBT) no período sadio e na fase de infecção experimental nos úberes do lado direito. A figura 3A apresenta a contagem de número de células somáticas de cada cabra no período de sadio (P0) e nos respectivos períodos de indução da mastite subclínica ou infecção (P2, P4, P6, P7, P8) pelo agente *S. warneri*. Cada cor de linha diferente representa uma cabra diferente. A contagem exibida deve ter sua escala multiplicada por $\times 10^3$ para alcançar os valores reais de contagem. A figura 3B representa a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) para cada animal em seus respectivos períodos, como denotado na figura, assim como os argumentos escalares. As marcações com asteriscos, setas e sombras em cinza demarcam onde ocorreram diferenças estatísticas entre os períodos avaliados.



Os testes estatísticos realizados para CTB, teste t pareado, demonstraram que ocorreram diferenças entre os períodos P0-P2 ($P < 0.001$), P0-P6 ($P < 0.01$) e P0-P8 ($P < 0.05$). Nos testes realizados para o CCS dentro dos mesmos padrões anteriores, indicaram diferenças entre P0-P2 ($P < 0.001$), P0-P6 ($P < 0.05$) e P0-P8 ($P < 0.01$). Esses resultados reforçam a significância do que foi visualizado nas figuras anteriores, indicando alterações proeminentes estabelecidas nesses úberes após a indução a infecção por *S. warneri* em relação ao número de UFC/ml e CCS/ml.

A tabela 1 indica os valores de CMT encontrados durante o experimento. O animal B, controle externo, não apresentou mudanças durante o período inicial e final. Além dessas, a cabra F também não indicou por esse teste, sinal de mastite nos períodos analisados. Contudo, os outros animais inoculados apresentaram 2+ ou 3+ como sinal de mastite. Levando em consideração que os seguintes valores foram considerados como indicadores da doença: SCC: $> 1 \times 10^6$ CS/ml e/ou CMT: $\geq 2+$, apenas as cabras F poderia ser considerada não mastítica, ao final do período analisado, e a cabra D ainda poderia ser considerada mastítica devido ao teste de CMT 3+, mesmo demonstrando um baixo valor de CCS.

Tabela 1 - *California Mastitis Test* (CMT) das cabras em três períodos durante a fase de indução da infecção.

Período	Identificação	Teto Esquerdo	Teto Direito
P0	Cabra B	0 Cruz	0 Cruz
P0	Cabra C	0 Cruz	0 Cruz
P0	Cabra D	Traço	0 Cruz
P0	Cabra E	0 Cruz	0 Cruz
P0	Cabra F	Traço	0 Cruz
P0	Cabra G	1 Cruz	0 Cruz
P0	Cabra H	1 Cruz	Traço
P5	Cabra B	1 Cruz	0 Cruz
P5	Cabra C	0 Cruz	2 Cruzes
P5	Cabra D	1 Cruz	2 Cruzes
P5	Cabra E	0 Cruz	2 Cruzes
P5	Cabra F	2 Cruzes	1 Cruz
P5	Cabra G	3 Cruzes	1 Cruz
P5	Cabra H	3 Cruzes	1-2 Cruzes

P8	Cabra B	1 Cruz	0 Cruz
P8	Cabra C	0 Cruz	2 Cruzes
P8	Cabra D	0 Cruz	3 Cruzes
P8	Cabra E	1 Cruz	2 Cruzes
P8	Cabra F	1 Cruz	1 Cruz
P8	Cabra G	3 Cruzes	2 Cruzes
P8	Cabra H	3 Cruzes	2 Cruzes

Período experimental, identificação da cabra, e os úberes aos quais foram submetidos aos testes.

As lactoculturas com ágar Sangue demonstraram resultados negativo em P0 e no período P8 positivo, para todos os úberes do lado direito dos animais induzidos a infecção. As demais lactoculturas nesse estudo apresentaram resultados correspondentes aos de CCS e CMT para tipificação da mastite, ou seja, quando as técnicas elencadas apresentaram resultados para diagnóstico de mastite subclínica ou clínica, as lactoculturas apresentaram mais de três colônias.

2.2. Hemograma e identificações bacteriológicas

A figura 4 demonstra os principais tipos de células de defesa que variaram no hemograma. Outros perfis celulares e bioquímicos não representados no gráfico abaixo estão dispostos no quadro S1 na secção complementar. A figura 4 demonstra a variação de leucócitos totais do sangue (LT), linfócitos, neutrófilos e monócitos dos animais desde o período sadio (P0) até o final das medições da fase de infecção. Na figura 4A é interessante observar que os animais iniciaram o experimento com diferentes valores padrões no leucograma, tendo a cabra E um dos valores mais altos estabelecidos, e a cabra H um dos menores. Na mesma figura é possível observar a queda do número de LT dos animais após 24 horas de infecção em P2, com leve retorno dos índices em P4 e nova queda em P4.2. Aparentemente, em P6 ocorreu uma melhora no quadro de níveis dessas células nos animais, em virtude de uma melhora geral no estado clínicos desses animais e depois uma queda contínua para todos os animais até P8.

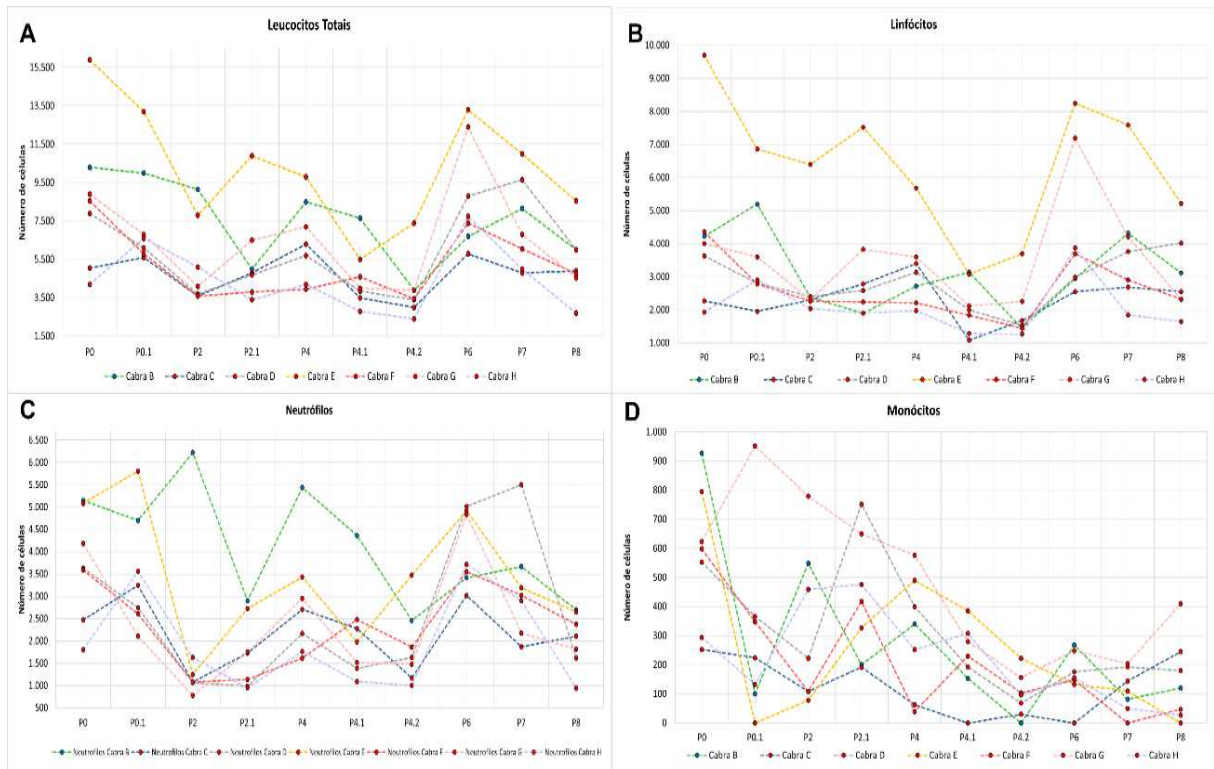
Aparentemente as variações na cabra B, que é o controle externo, não deveriam acontecer, uma vez que apenas a solução salina era introduzida no úbere, mas esse animal teve um recrutamento de linfócitos (Figura 4B) de maneira repentina e mais abrupta do que os outros, no entanto, os neutrófilos não acompanharam essa tendência. Logo, outro tipo de infecção não bacteriana pode ter levado a esse quadro. A solução salina era produzida sempre 12 horas antes e autoclavada dentro dos padrões laboratoriais. Por outro lado, a cabra B também não teve

aumento de CCS no leite, assim essas alterações podem ter sido de fato por outras causas desconhecidas ou “stress” ambiental. De qualquer forma, esse animal demonstrou padrões diferentes dos outros, o que denota a sua separação das demais. As células LT, geralmente, em quadros de mastites são recrutadas para a glândula mamaria e por consequência para o leite para combater a infecção instalada, levando um quadro de leucocitose no animal, o que pode ter ocorrido na maioria dos animais induzidos a infecção. A variação de neutrófilos (Figura 4C) nos animais demonstrou ser muito parecida, com queda em P2 e aumento subsequente nos períodos consecutivos. Ademais, uma queda abrupta ocorreu em P8 para as cabras C e H, no entanto, essa queda geral apresentou curvas diferentes para o animal B, como relatado acima.

Os monócitos na figura 4D, que são células precursoras dos macrófagos, tiveram aumento substancial em P2, em virtude da infecção, com queda acentuada nos períodos posteriores. No laudo técnico dos leucogramas foi apontado monócitos reativos logo no período P2 para cabra G, o que de fato se confirma nesses dados, e aparentemente esse animal foi o mais responsivo para esse tipo célula durante toda a fase de infecção.

Os testes estatísticos realizados para a contagem de leucócitos totais, teste t pareado, demonstraram que ocorreram diferenças entre os períodos P0 - P2 ($P < 0.05$), P0 - P2.1 ($P < 0.01$), P0 - P4.1 ($P < 0.01$), P0 - P4.2 ($P < 0.01$) e P0 - P8 ($P < 0.01$). Nos testes realizados para a contagem de linfócitos, neutrófilos e monócitos não foram encontradas diferenças. Esses resultados demonstraram que apenas o conjunto de leucócitos, das demais variações de células incluídas nesse rol, apresentou alterações na quantidade presente na corrente sanguínea, o que decorreu de uma maior produção dessas células e ao recrutamento delas para serem enviadas para a glândula mamaria.

Figura 4 - Leucograma das cabras no período sadio e fase de infecção: leucócitos totais, linfócitos, neutrófilos e monócitos. Cada cabra está demonstrado por uma cor diferente. As linhas tracejadas representam a contagem de células das séries medidas, e estão subdivididas em figuras distintas. O animal controle externo (Cabra B) é representado pela linha tracejada em verde e marcador círculo azul.

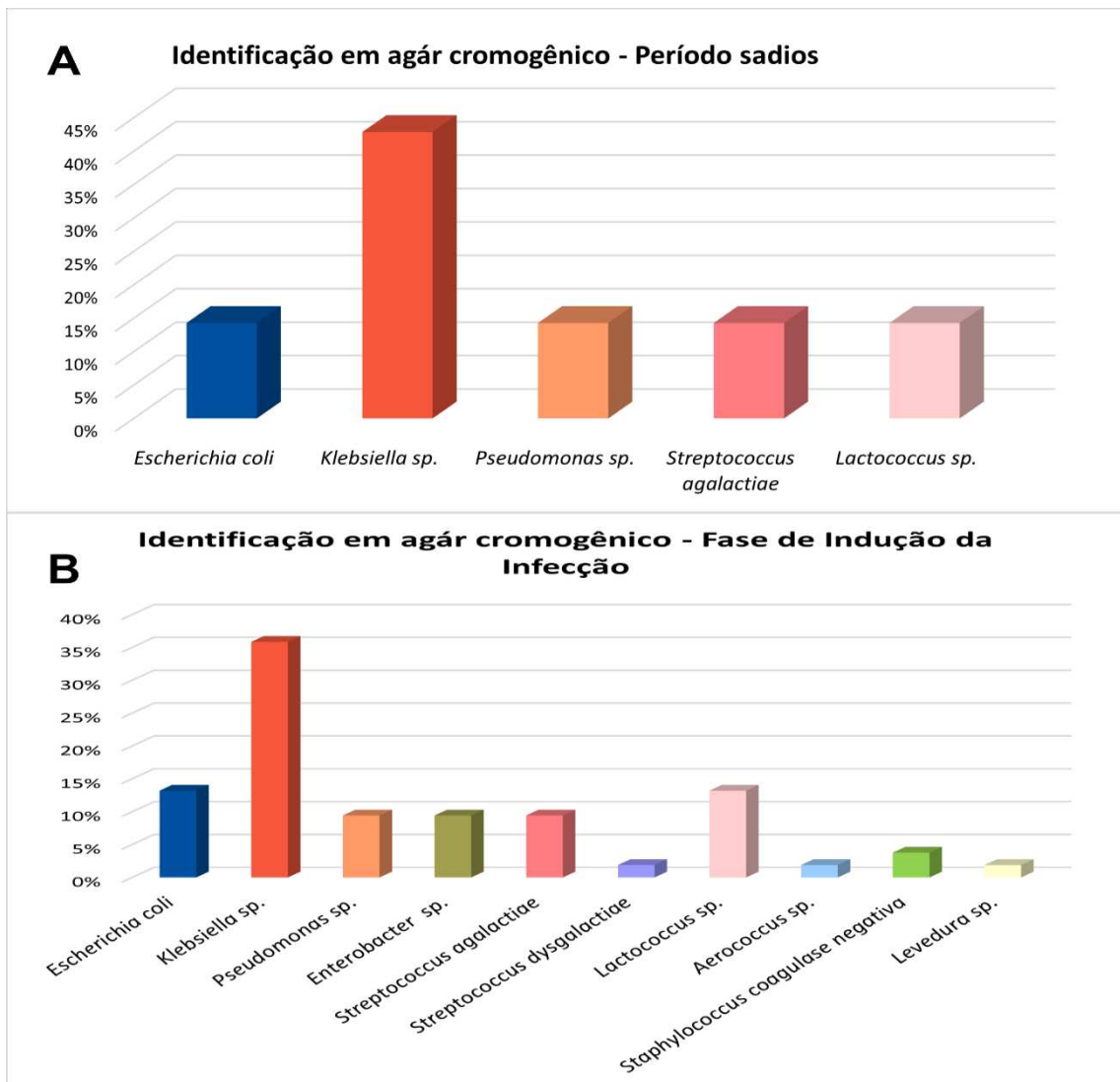


Na figura 5, estão representadas as bactérias que foram identificadas no úbere direito por meio do ágar cromogênico Accumast®, as quais foram dispostas em porcentagem de identificação no período sadio (P0) e fase de infecção. No quadro S2, localizado no material suplementar, foram apresentadas todas as bactérias identificadas por secção, por animal e período experimental. No período de sadio encontramos sete táxons, sendo cinco diferentes e na fase de infecção identificamos 53 táxons, sendo 10 diferentes. Em P0 encontramos predominantemente bactérias Gram (-), dando ênfase para os gêneros *Klebsiella* sp., *Escherichia coli* e *Pseudomonas* sp. Na fase de infecção, identificamos também em maiores proporções esses mesmos gêneros citados, além de *Enterobacter* sp., *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Lactococcus* sp. e com isso aumentamos a gama de bactérias relacionadas a Gram (+).

O agente SCN foi interessante de ter sido isolado na fase de infecção nas cabras C e H, uma vez que eles podem ser correspondentes ao *S. warneri* utilizado na indução da infecção. Não ter encontrado SCN em outros animais induzidos, pode ser devido ao fato da abundância menor desse agente no leite utilizado para as lactoculturas. A cabra B, controle externo, não teve muitas identificações diferentes após P2. As demais cabras que foram inoculadas, começaram a apresentar um número bem maior de táxons bacterianos identificados após o período P2. O que nos chamou atenção foi o número de grande de bactérias Gram (-) identificadas após a inoculação, e que não tem provavelmente relação com o *S. warneri*

utilizado, mas dentro do campo de estudo em microbiotas, sabemos que essa fase poderia causar um distúrbio nos microrganismos indígenas presentes, e partir disso, outros agentes poderiam apresentar alta no crescimento no leite do úbere.

Figura 5 - Porcentagem de identificação de bactérias por ágar cromogênico Accumast® no período dos animais sadios e na fase das cabras induzidas a mastite por *S. warneri*. A figura 5A representa os animais, incluindo a cabra B (controle externo), no período P0 ou em que estavam sadios. A figura 5B apresenta os isolados na fase de infecção, de P2 até P8 de todos os animais induzidos a infecção, incluindo a cabra B. Cada barra representa uma bactéria diferentemente isolada e sua porcentagem de identificação em relação a todos os isolados.



2.3. Dados do sequenciamento

As amostras SBRP2-FE e SBRP8-BE dos dados analisados não geraram sequências para as análises seguintes. Os dados foram separados em dois conjuntos, sendo o primeiro referente ao animal controle externo (cabra B) em todos os períodos analisados: P0, P2, P4, P6, P7 e P8, e o segundo remete aos animais induzidos a infecção (C, D, E, F, G e H) e os mesmos períodos analisados anteriormente. Um total de 82 amostras de leite de cabra foram coletadas, e o DNA sequenciado na região V3 eV4 do gene 16S rRNA. A cabra de letra B, gerou um total de 164.219 sequências em 11 amostras, que foram usadas para análises abaixo (média = 14.929,000 ± Desvio padrão = 18.632,409 leituras/amostra). Ao todo, 5.184 táxons identificados foram utilizados nessas análises. Os induzidos a infecção geraram um total de 11.174,561 sequências em 71 amostras, que foram usadas para análises abaixo (média = 157.388,183 ± SD = 243.906,093 leituras/amostra). Ao todo, 5.351 táxons identificados foram utilizados nessas análises. O comprimento médio para todas as leituras foi de 450 bp. De antemão, a classificação do gênero *Escherichia* sp. a nível de espécie ainda pode ser reavaliada com a técnica de lactocultura, uma vez que a identificação de algumas espécies com o sequenciamento gene 16S rRNA são de difícil resolução (EDGAR, 2018; GWAK; RHO, 2020).

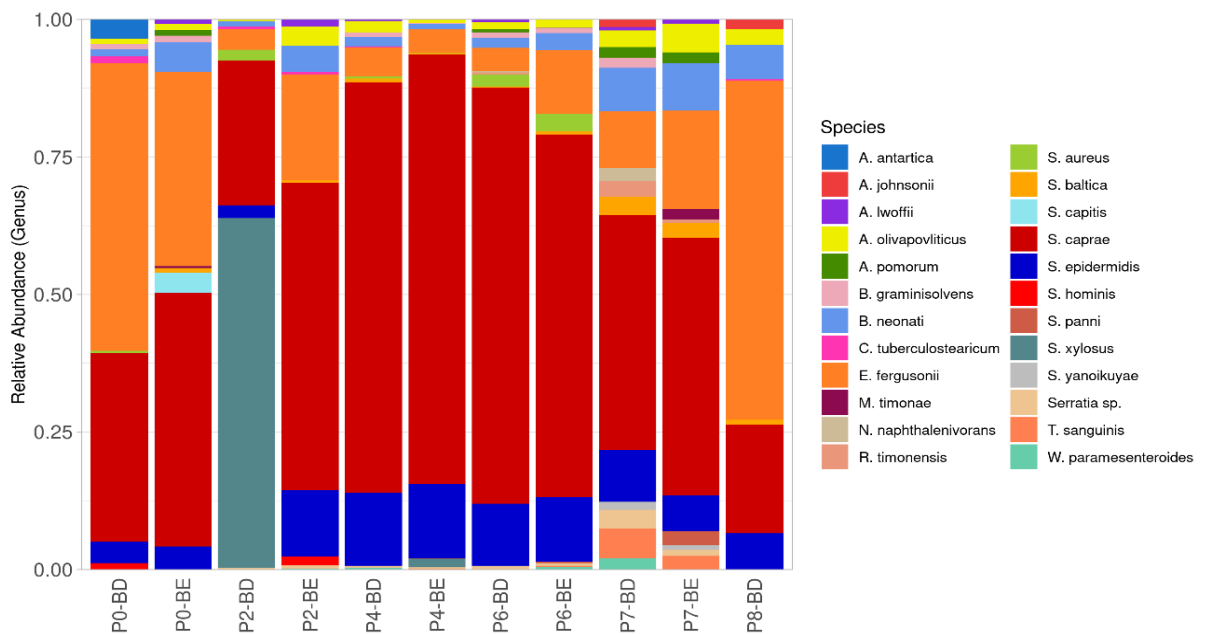
2.4. Abundância relativa da microbiota das glândulas mamárias da cabra controle

A figura 6 demonstra a variação ao longo da fase de infecção das espécies de bactérias identificadas para a cabra controle B. Dentre as 11 amostras a seguir, o gênero mais representativo é o *Staphylococcus caprae*. Essa bactéria apresentou as seguintes porcentagens relativas durante os períodos: P0-BD: 20%, P0-BE: 31%, P2-BD: 20%, P2-BE: 37%, P4-BD 55%, P4-BE 59%, P6-BD 55%, P6-BE 48%, P7-BD 26%, P7-BE 30%, P8-BD 11%. Interessante observar que tivemos um aumento da abundância dessa espécie *S. caprae* durante o transcorrer da fase de infecção, e depois uma queda retornando a valores parecidos ao inicial. O segundo gênero e espécie mais representativos foi *Escherichia fergusonii*, a qual apresentou as seguintes porcentagens: P0-BD: 48%, P0-BE: 29%, P2-BD: 4%, P2-BE: 17%, P4-BD 50%, P4-BE 42%, P6-BD 40%, P6-BE 11%, P7-BD 76%, P7-BE 14%, P8-BD 47%. Depois, como mais representativa, nós temos a *Staphylococcus epidermidis*, e na amostra P2-BD observamos uma alta abundância da bactéria *Staphylococcus xylosus*. Além dessas, apesar de menos representativo, mas talvez de grande relevância, identificamos a bactéria *Bacteroides neonati* e *Staphylococcus aureus*. Interessante observar, na figura 6, que a microbiota do animal controle

B, apresentou um perfil de espécies diferente dos animais induzidos a mastite nas figuras 7 e 8, sendo este o propósito desse animal experimental.

Figura 6 - Composição da microbiota bacteriana dos 25 táxons mais abundantes, ao nível de gênero e espécies da cabra controle B, no período sadio e ao longo da fase de infecção.

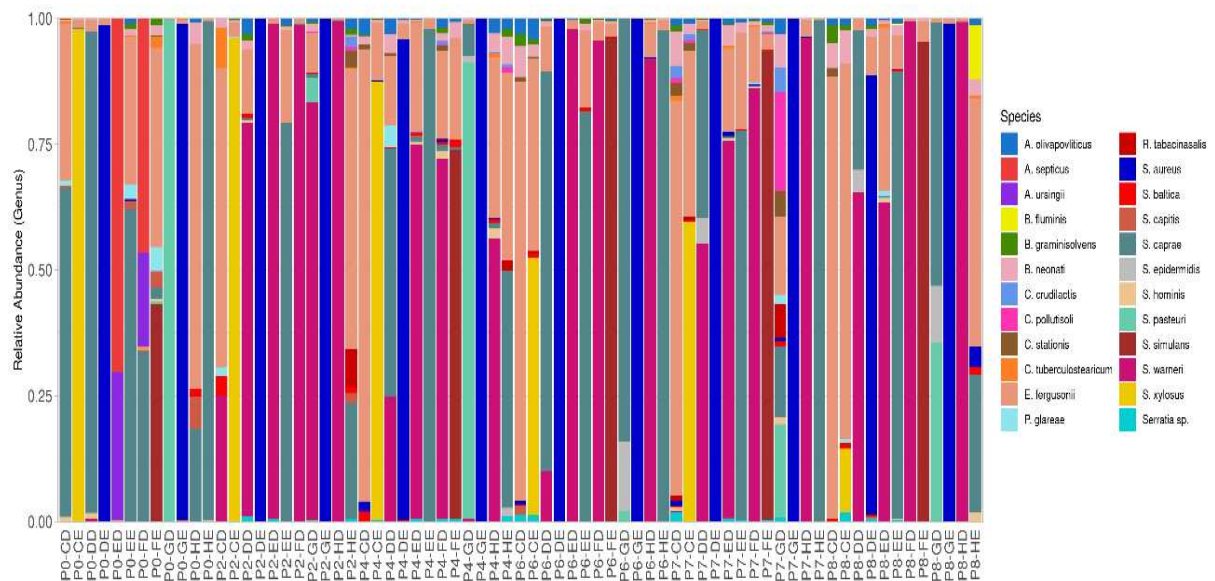
As abundâncias dos gêneros e espécies foram distribuídas de forma relativa a 100% da amostra para cada período na fase de infecção, sendo que cada cor corresponde uma espécie diferente e seu respectivo gênero. A letra D ao final da nomenclatura da amostra corresponde ao úbere do lado direito e a letra E ao lado esquerdo.



2.5. Abundância relativa da microbiota dos úberes das cabras infectadas

A figura 7 demonstra a variação ao longo da fase de infecção das espécies de bactérias identificadas durante a fase de infecção de todas as cabras que receberam o agente inoculado *S. warneri*. A Figura S1 localizada no material suplementar, correspondente aos números absolutos de ASVs para cada gênero e espécie, correspondente aos animais durante a fase de infecção e período em que estavam sadios. Dentre as 71 amostras a seguir, não identificamos o *S. warneri* nas primeiras amostras do período sadio (P0). No período P2, o qual já havíamos inoculado o agente, observamos que todos os úberes do lado direito apresentaram alta porcentagem relativa do agente, o que foi confirmado pela técnica de sequenciamento de alto rendimento do gene 16S, o sucesso da indução da infecção no úbere. O agente, apesar de persistir, diminui sua porcentagem relativa em P4, principalmente na cabra de letra C e G, e desaparece das amostragens em P6, P7 e P8. Notamos que a microbiota da cabra C no período P0 era predominantemente dominada pelos microrganismos, *S. caprae* (53%) e *E. fergusonii* (29%), e em P8, a cabra C detinha predominantemente *E. fergusonii* (71%) na sua microbiota. Por outro lado, o animal G, apresentava em P0 predominância do gênero e espécie *Staphylococcus pasteurii* (80%), e no período final da infecção em P8, se tornam predominantes, *S. caprae* (52%), *Staphylococcus pasteurii* (35%) e *S. epidermidis* (11%). As cabras H e F, mantiveram as porcentagens altas do agente *S. warneri* nas microbiotas do leite.

Figura 7 - Composição da microbiota bacteriana dos 25 táxons mais abundantes, ao longo da fase de infecção com *S. warneri* e período em que estavam sadias, ao nível de gênero e espécies. As abundâncias dos gêneros e espécies foram distribuídas de forma relativa a 100% da amostra para cada período em que as cabras estavam sadias e na fase de infecção, sendo que cada cor corresponde a uma espécie diferente e seu respectivo gênero. As amostras estão alinhadas em ordem crescente por período. A letra D ao final da nomenclatura da amostra corresponde ao úbere do lado direito e a letra E ao esquerdo.

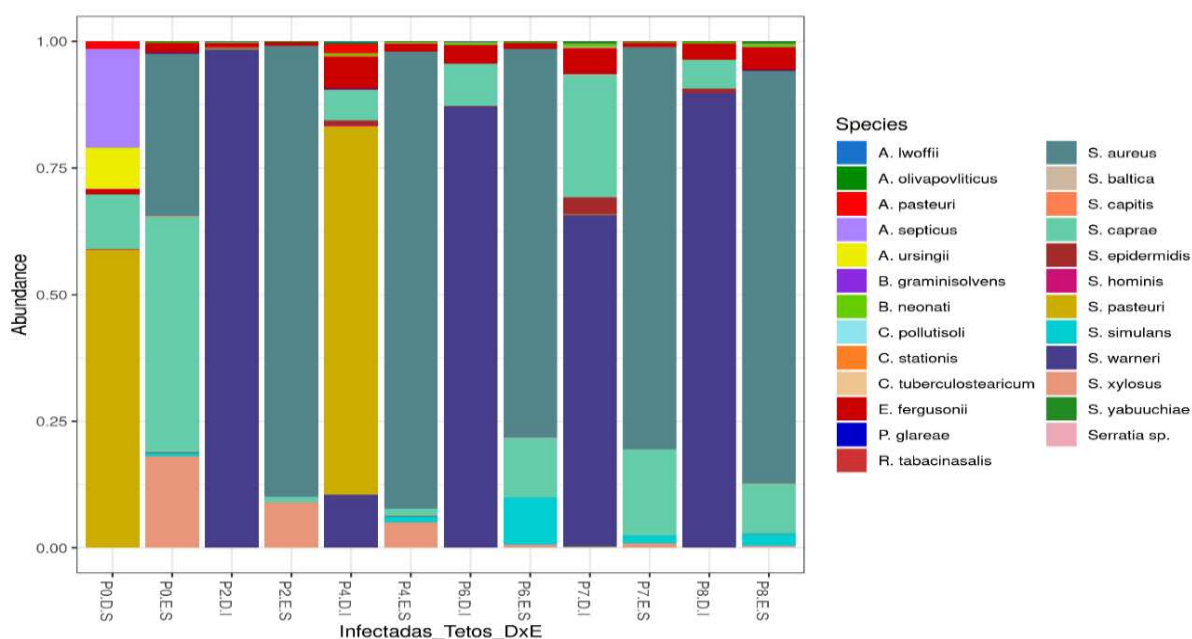


A figura 8 demonstra a evolução da microbiota do leite dos animais ao longo da fase de indução a infecção. Observamos que no período P0.D.S, os animais não haviam sido inoculados com o agente e por isso sua microbiota era predominantemente dominada por *Staphylococcus pasteurii* (58%), *Acinetobacter septicus* (19%), *S. caprae* (11%), *Acinetobacter ursingii* (8%) e *E. fergusonii* (1%). Após a inoculação, observamos uma mudança na microbiota, o que gerou as diminuições abruptas de vários gêneros e espécies, com predomínio de cerca de 98% de *S. warneri* e 1% de *E. fergusonii* em P2, e ao longo dos períodos, a microbiota começou a retomar de forma gradativa, mas alguns táxons como *Acinetobacter ursingii* e *Acinetobacter septicus* praticamente desapareceram, assim como outros gêneros destacados na figura 7. Em P8, 90% da microbiota dos animais era composta por *S. warneri* e *S. caprae*.

A figuras 7 e 8 também demonstraram as microbiotas dos úberes esquerdo não infectados. Ao observar a figura 8, notamos que a microbiota do úbere esquerdo pouco se alterou ao longo dos períodos mensurados, e isso nos mostra que as flutuações que observamos nos úberes infectados foram desencadeadas provavelmente pela infecção que provocamos. Outros fatores

importantes que constatamos foi que os úberes contralaterais, esquerdos e direitos, são independentes e a microbiota não se modifica em ambos por fatores que estejam ligados diretamente a uma infecção induzida em apenas um dos úberes, se não havéramos observado o *S. warneri* no úbere do lado esquerdo. De forma geral, *S. warneri* no úbere do lado direito aparentemente causou uma disbiose na glândula mamaria.

Figura 8 - Composição da microbiota bacteriana somada os 25 táxons mais abundantes, identificando o período em que as cabras estavam sadias e a fase de infecção com *S. warneri*, ao nível de gênero e espécie das bactérias. As abundâncias dos gêneros e espécies foram distribuídas de forma relativa a 100% da amostra para cada período na fase de infecção e período de sadios, sendo que cada cor corresponde uma espécie diferente e seu respectivo gênero. As amostras estão alinhadas em ordem crescente por período. A letra D.I ao final da nomenclatura da amostra corresponde ao úbere do lado direito infectado e a letra E.S ao lado esquerdo que prevaleceu sadio em cada animal.

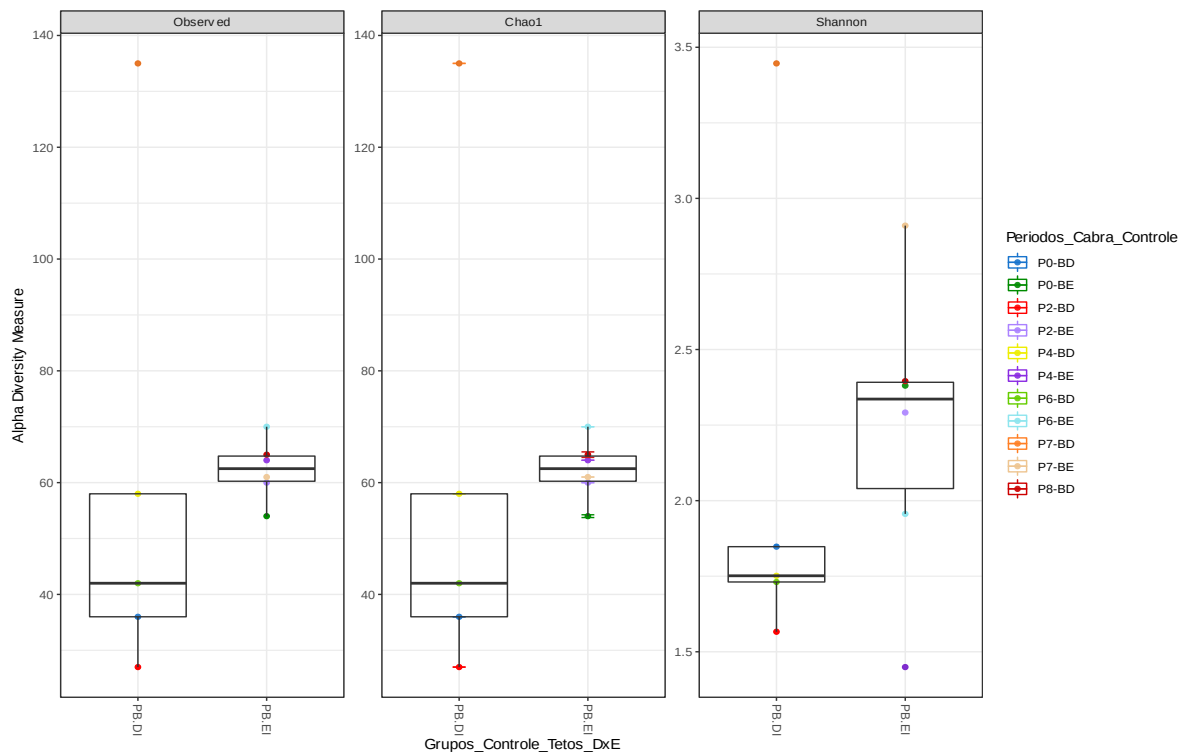


2.6. Alfa diversidade da microbiota do leite da cabra controle B

A figura 9 apresenta a variação da riqueza e diversidade amostral da cabra controle durante o período sadio e de indução a infecção. Nessa figura observamos que ocorreu uma variação menor na riqueza do úbere esquerdo da cabra controle B, sendo que as maiores variações foram no período P6-BE e menor no P0-BE, o que significa que ocorreu um pequeno aumento de riqueza entre esses períodos. Por outro lado, o índice de diversidade de Shannon,

demonstrou uma variação um pouco maior, principalmente entre os períodos P4-BE e P7-BE. O úbere direito apresentou variações maiores nos índices, nos quais a riqueza e a diversidade aumentaram muito em P7-DD e menores índices em P2-BD.

Figura 9 - Índices de diversidade alfa da microbiota do leite da cabra controle B, subdividida entre úbere esquerdo (EI) e direito (DI), representados pelos índices de riqueza observada por ASVs, de riqueza Chao1, e o de diversidade por amostra com o índice de Shannon. Cada período e lado do úbere foi identificado com uma cor diferente ao lado da figura.

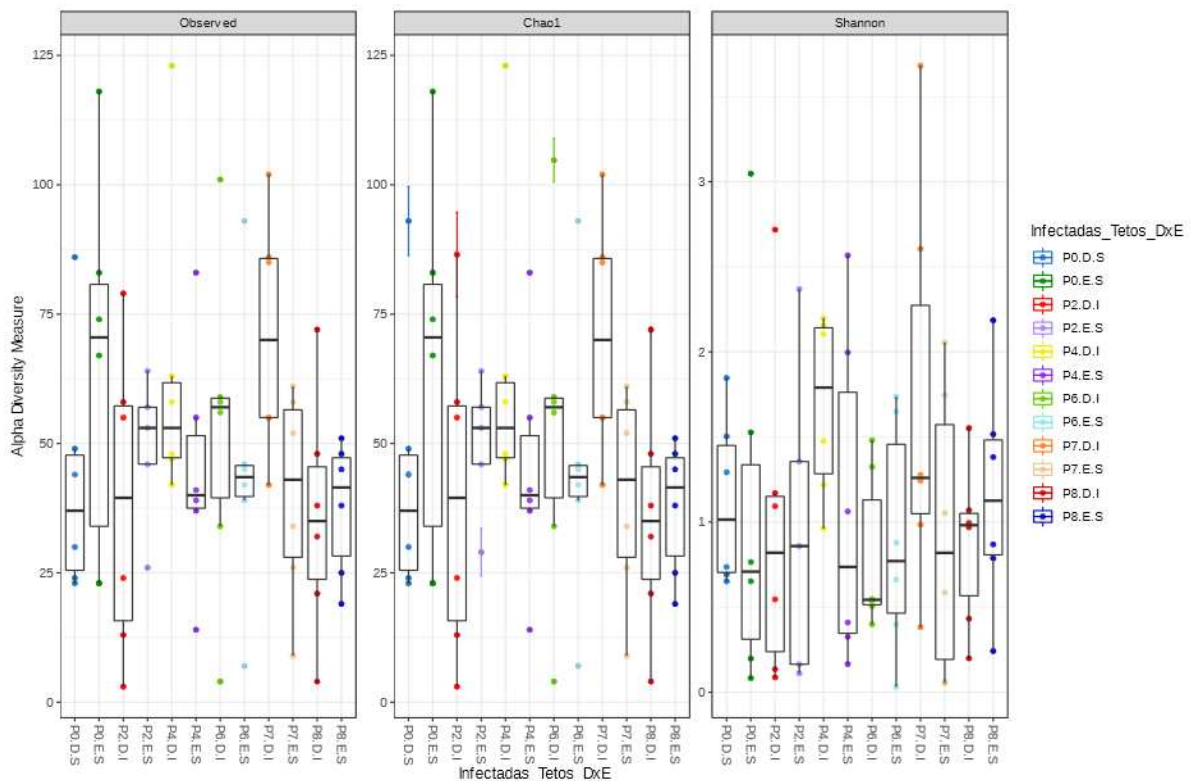


2.7. Alfa diversidade da microbiota do leite das cabras infectadas

A figura 10 avaliou os índices de diversidade alfa entre os períodos de P0 até P8, dos animais induzidos a infecção e saudáveis, separando o úbere em lados esquerdo e direito. Ao analisar os índices de diversidade do úbere inoculados com *S. warneri*, lado direito, podemos observar que a riqueza Chao1 e a riqueza observada por ASVs apresentaram um leve aumento de P0.D.S até P7.D.I o que pode ser decorrente da infecção induzida. Em P8 os índices de riqueza retornam próximo ao patamar de P0, o que poderia representar uma adaptação da microbiota de alguns animais ao novo agente introduzido no teto, e para outros, uma autolimitação do agente por mecanismos de defesa da glândula e da própria microbiota indígena

local. O índice de Shannon apresentou uma flutuação em formato de onda ao longo dos períodos analisados, culminando numa semelhança do índice final P8, com o índice inicial P0. Como induzimos uma infecção subclínica, esse tipo de mastite pode ser autolimitante ao longo do tempo, e os índices tenderiam a se estabilizar por mais alguns períodos. Portanto, no período final P8, tanto os índices de riqueza quanto de diversidade, demonstraram estarem maiores no lado esquerdo sadio, do que no direito induzido a mastite.

Figura 10 - Índices de diversidade alfa da microbiota do leite dos animais induzidos a infecção (C, D, E, F, G e H) subdividida entre úbere esquerdo sadio (E.S), direito sadio (DS) em P0 e direito infectado (DI) representados pelos índices de riqueza observada por ASVs, de riqueza Chao1, e o de diversidade por amostra com o índice de Shannon. Cada período e lado do úbere foi identificado com uma cor diferente ao lado da figura.



3. DISCUSSÃO

O leite possui uma microbiota complexa, que pode ser amplamente alterada por diversos fatores inerentes à espécie, raça e saúde do animal, bem como nos diferentes tipos de mastite (BHATT et al., 2012; HOQUE et al., 2019; LI et al., 2018; OIKONOMOU et al., 2014; POLVEIRO et al., 2020). O sequenciamento do material genético microbiano do leite caprino, juntamente com outras abordagens tradicionais utilizadas no monitoramento do quadro de

mastite, pode relevar populações microbianas anteriormente negligenciadas e padrões de assinaturas populacionais, que podem ajudar a compreender melhor o desenvolvimento das infecções na glândula mamária. Nossos dados indicam que a progressão da mastite subclínica, quando induzida por *S. warneri*, reduz por um curto espaço de tempo a produção de leite, modifica o leucograma sanguíneo, contagem de CCS e CBT e a estrutura da microbiota bacteriana do leite caprino, alterando a riqueza e diversidade e acentuando o quadro de disbiose.

Embora ambas as formas de mastite clínica e subclínica tenham efeitos negativos na produção de leite, a variação na produção depende do agente patogênico envolvido na IMI (NOVAC; ANDREI, 2020a). Estudos conduzidos em caprinos focados no efeito de IMI na produção leiteira em sistemas intensivos são controversos, pois demonstraram que a mastite pode ser associada a valores mais baixos (LEITNER; MERIN; SILANIKOVE, 2004), semelhantes (MIN; TOMITA; HART, 2007; MORONI et al., 2005b) ou mesmo com um aumento na produção de leite em cabras doentes em comparação com as saudáveis (KOOP et al., 2012a). LEITNER et al., (2004) demonstraram que certas espécies de SCN, como *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. caprae*, *S. chromogenes* ou *S. xylosus*, podem reduzir a produção de leite. Embora a maioria dos estudos relacionados não tenha citado *S. warneri* e sua relação com a produção de leite em caprinos, identificamos que a recuperação da produção de leite após induzida a mastite subclínica por *S. warneri* parece ser presumível de acontecer em até ao menos quatro dias após indução a infecção. Além disso, é interessante observar que em geral, após alguns dias de indução da infecção, alguns animais superaram a produção de leite de antes da inoculação do agente.

Em amostras de leite caprino o gênero *Staphylococcus* sp. geralmente pode estar relacionado à mastite (DEINHOFER; PERNTHANER, 1995b; PEIXOTO; MOTA; DA COSTA, 2010a), embora espécies desse gênero tenham apresentado importância em animais saudáveis (POLVEIRO et al., 2020b). Esse gênero tem se destacado nas glândulas mamárias saudáveis de cabras, assim como foram identificadas no microbioma do leite saudável de humanos e vacas (HUNT et al., 2011; MARTÍN et al., 2007; OIKONOMOU et al., 2014a). Assim como identificamos *S. epidermidis* e *S. aureus* no leite do animal controle, o leite materno humano, por exemplo, mesmo coletado assepticamente de uma mulher saudável, pode conter esses mesmos gêneros (JEURINK et al., 2013), logo não é incomum identificar essas espécies em mamíferos clinicamente saudáveis. Algumas espécies de SCN estão relacionadas ao aumento na CCS do leite, bem como já foram isolados de achados patológicos do úbere, como *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. lugdunensis*, *S. chromogenes* e *S. warneri*, que foi utilizado nesse experimento (DEINHOFER; PERNTHANER, 1995b).

Como descrito em nossos dados, os animais variaram muito em quantidade e tipo de leucócitos sanguíneos no início e ao longo da infecção, e concomitantemente os CCS também variaram. Estudos indicam a possível existência de migrações intensas de leucócitos da corrente sanguínea para a glândula mamária (MCKENZIE; ANDERSON, 1981; SEELIG; BEER, 1978), no entanto, essa não é uma migração simples de células, uma vez que existe uma complexa rede de sinais para que esse evento aconteça, principalmente pela movimentação de neutrófilos que são de grande importância em infecções intramamárias (ALNAKIP et al., 2014; RAINARD; FOUCRAS; MARTINS, 2022; TIAN et al., 2005a).

Diferentes tipos de células podem ser encontrados no leite de vacas, as quais incluem leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos), linfócitos, eosinófilos, macrófagos e células epiteliais (PAAPE et al., 2002). Por outro lado, o número de CCS do leite de cabras saudáveis é maior do que o observado no leite de vacas e ovelhas não infectadas e ao contrário destas, os neutrófilos compreendem o principal tipo de leucócitos (40-87%) em caprinos, isso pode explicar por que as cabras são mais resistentes à mastite (TIAN et al., 2005b).

Segundo BLAGITZ et al., (2011) alguns animais podem, de forma contínua, apresentar níveis baixos de leucócitos, o que sugere que cabras com menor número de células leucocitárias consequentemente geram um menor número de CCS no leite, e diante disso geralmente estão associadas a maior incidência de mastites (BERGONIER et al., 2003; MORONI et al., 2005b; SOUZA et al., 2012b). Portanto, características intrínsecas ao animal, com a diminuição da viabilidade de neutrófilos polimorfonucleares está associada a função fagocítica e bactericida prejudicada (TIAN et al., 2005b; VAN OOSTVELDT et al., 2002). O exame CMT, apesar de ter seus resultados aparentemente contestados em caprinos, SOUZA et al., (2012b) relataram que foram observadas fortes correlações entre os escores de CMT, contagem microscópica e automática em leite de caprinos, pressupondo assim que maiores scores encontrados em leite dessa espécie podem estar relacionados à maior proporção de neutrófilos, em vez de partículas citoplasmáticas (SOUZA et al., 2012b). Essas partículas citoplasmáticas não reagem com o reagente CMT, pois não possuem núcleos celulares (PETTERSEN, 1981).

Algumas bactérias foram identificadas em maior abundância no leite de animais saudáveis, como *S. pasteurii*, *A. septicus*, *S. caprae*, *A. ursingii* e *E. fergusonii* e por outro lado, algumas espécies se destacaram no leite dos animais mastíticos como *S. warneri* e *E. fergusonii*, *S. caprae*, que geralmente são isolados em leite de caprinos (DA SILVA et al., 2004a; DEINHOFER; PERNTHANER, 1995b), especialmente em animais mastíticos. No entanto, somente a presença do microrganismo não define a ocorrência da infecção, uma vez que esta necessita da conexão de uma série de fatores para ser desencadeada, como um desequilíbrio da

composição microbiana da glândula mamária, denominado disbiose (DERAKHSHANI et al., 2018b).

Além disso, a microbiota pode estimular a resposta imune do hospedeiro, alterando sua suscetibilidade a patógenos invasores e com isso a infectividade do patógeno pode ser indiretamente reduzida pela microbiota do hospedeiro (STEVENS; BATES; KING, 2021b). *S. pasteurii* tem sido isolado de alimentos e ambientes alimentares, e demonstrado resistência a antibióticos e formação de biofilme (MARINO et al., 2011), mas foi a primeira vez que foi relatado a sua possível presença em leite caprino. O gênero *Acinetobacter* sp., não é incomum de ser isolado de leite caprino, principalmente a espécie *A. ursingii* (DE PAIVA ANCIENS RAMOS; DOS SANTOS NASCIMENTO, 2019), mas *A. septicus* não tem relatos de ter sido identificado nesse tipo de amostra, uma vez que é uma espécie catalogada recentemente (KILIC et al., 2008).

Alguns animais apresentaram a diminuição constante do agente inoculado em resposta a própria infecção, algo esperado naturalmente após uma resposta imunológica normal, mas também pode ter ocorrido porque a microbiota pode estimular a resposta imune do hospedeiro, alterando sua suscetibilidade a patógenos invasores (STEVENS; BATES; KING, 2021b). Portanto, ao invadir um hospedeiro, os patógenos também irão interagir com outras espécies microbianas (PALLEN, 2011). Diante disso, a infectividade do patógeno pode ser indiretamente reduzida pela microbiota do hospedeiro, conforme observamos (CLARKE et al., 2010; GARCÍA-BAYONA; COMSTOCK, 2018; KWONG; MANCENIDO; MORAN, 2017; MUHAMMAD et al., 2019a, 2019b, 2019c; OGAWA et al., 2001).

A espécie *E. fergusonii* esteve presente tanto em animais sadios, quanto animais com a infecção mastítica. Existem poucos relatos dessa espécie relacionada a produtos lácteos (SAAD et al., 2012) ou leite, em especial, em caprinos (HARIHARAN et al., 2007). Geralmente em estudos de microbioma, o gênero *Escherichia* sp. está associado a casos de mastite em caprinos (POLVEIRO et al., 2020b; RIBEIRO et al., 2007), bovinos (GANDA et al., 2017), assim como mastite gangrenosa em casos de isolamento do agente por técnicas padrões de cultivo (AMEH et al., 1994; RIBEIRO et al., 2007). No entanto, esse gênero tem sido associado a microbiotas de cabras (ZHANG et al., 2017a) e ovelhas sadias (ZHANG et al., 2017a), assim como relatado nesse estudo.

Alguns microrganismos podem evoluir rapidamente (BARROSO-BATISTA; DEMENGEOT; GORDO, 2015) por causa de seus grandes tamanhos populacionais e tempos de geração rápidos, o que pode ter ocorrido com *E. fergusonii* em nossos dados. Os componentes da microbiota podem evoluir durante a vida do hospedeiro com consequências

para a saúde do hospedeiro (KOSKELLA; PARR, 2015). Por exemplo, uma cepa levemente patogênica do componente da microbiota intestinal *Enterococcus faecalis* demonstrou em hospedeiros nematoides evoluir para se tornar mais protetor devido a interações competitivas com um patógeno virulento (KING et al., 2016). Da mesma forma, o patógeno *Candida albicans* mostrou evoluir para o mutualismo protetor quando introduzido em um novo hospedeiro, em um estudo tendo como modelo camundongos (STEVENS; BATES; KING, 2021b; TSO et al., 2018).

O genoma do gênero *Escherichia* sp., de forma geral, é extremamente relacionado geneticamente, logo os genomas não estão separados claramente em testes filogenéticos, então, não é possível segregar com toda certeza algumas espécies a partir do gene 16SrRNA, como *E. coli* de *E. fergusonii* ou *Escherichia albertii* (LUKJANCENKO; WASSENAAR; USSERY, 2010). Portanto, levando em consideração os achados por ágar cromogênico, podemos estar lidando dentro desses sequenciamentos com outra espécie, como a *E. coli*, ou mesmo, descobrindo algo totalmente novo para essa espécie de *E. fergusonii*. Contudo, por mais que a identificação do agente por meio da cultura seja o padrão ouro para diagnóstico de mastite (CONTRERAS et al., 2007), nesse caso específico, mais análises devem ser realizadas para descobrir qual agente de fato está atuando.

A indução da mastite subclínica decorre da introdução de agentes bacterianos no úbere do animal, e isso conseqüentemente desencadeou uma série de processos inflamatórios que alteraram a composição química e física do leite (NOVAC; ANDREI, 2020b), e conseqüentemente causou uma disbiose alterando a composição da microbiota (DERAKHSHANI et al., 2018a), o que culminou no formato de onda nas análises de alfa diversidade. Com isso, observamos que ao final do experimento, a microbiota começou a estabilizar-se, o que resultou numa microbiota mais rica e diversa nos úberes saudáveis, o que já foi constatado em outros estudos por POLVEIRO et al., (2020), e os úberes infectados obtiveram menor riqueza e menor diversidade. Além disso, no úbere controle, observamos uma microbiota específica e constante ao longo de todos os períodos, o que caracteriza os animais saudáveis sem o distúrbio ou disbiose da microbiota. Diante disso, o princípio de Anna Karenina (ZANEVELD; MCMINDS; THURBER, 2017) (“todas as famílias felizes se parecem, mas cada família infeliz é infeliz à sua maneira”) pode ser aplicado para explicar observações em que a composição da comunidade da microbiota varia mais entre indivíduos doentes do que indivíduos saudáveis (STEVENS; BATES; KING, 2021a).

Portanto, induzimos com sucesso infecção mastítica por *S. warneri* em cabras e demonstramos como ocorre a dinâmica de sua patofisiologia, com análises de CCS, CBT,

CMT, perfil de células sanguíneas, juntamente com análises de microbiota por meio do sequenciamento do gene 16SrRNA. As análises permitiram identificar alterações na produção de leite, assim como a caracterização da demanda de células leucocitárias pela glândula mamária no decorrer da infecção para cada animal, ou seja, existe uma série de fatores inerentes ao animal para que ocorra o combate à infecção. Demonstramos também como o leucograma pode apresentar variações significativas ao longo da infecção e avaliamos por meio de ágar cromogênico o aumento na identificação de táxons de bactérias e outros, após a indução de mastite subclínica. Além disso, identificamos as alterações da microbiota a qual no período sadio detínhamos bactérias de espécies como *S. pasteurii*, *A. septicus*, *S. caprae*, *A. ursingii* e *E. fergusonii* e, após a inoculação, observamos uma mudança na microbiota, o que gerou as diminuições abruptas de vários gêneros e espécies, com predomínio de *S. warneri* e de *E. fergusonii*. Por fim, os índices de alfa diversidade se comportaram de maneira errática durante a evolução da infecção, se estabilizando com úberes sadios com uma maior riqueza e diversidade em relação aos infectados.

4. MATERIAL SUPLEMENTAR

Quadro S1 - Exames de hemograma e bioquímico das cabras divididos em período de sadios e fase de infecção.

P0	ID	Hemácias	Hemoglobina	Hematócrito	VCM	CHCM	Leucócitos	Neutrófilos	Bastonetes	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos	Basófilos	Total	Plaquetas	Proteína	Fibrinogênio
	A	14	10,1	33	23	31	9300	2604	0	4836	186	1674	0	9300	390.000	6,4	0,2
	B	17	9,5	34	20	28	10300	5150	0	4223	927	0	0	10300	300.000	7,4	0,4
	C	15	9,9	33	22	30	5050	2475	0	2273	253	51	0	5050	270.000	7,2	0,2
	D	15	9,7	33	22	29	7900	3634	0	3634	553	79	0	7900	360.000	7,2	0,2
	E	13	9,9	33	25	30	15900	5088	0	9699	795	318	0	15900	525.000	6,6	0,2
	F	17	10	32	18	31	8550	3591	0	4361	599	0	0	8550	405.000	6,8	0,4
	G	20	11,9	42	21	28	8900	4183	0	4005	623	89	0	8900	195.000	7,2	0,2
	H	14	11,1	37	27	30	4200	1806	84	1932	294	84	0	4200	150.000	6,6	0,2
P0.1	ID	Hemácias	Hemoglobina	Hematócrito	VCM	CHCM	Leucócitos	Neutrófilos	Bastonetes	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos	Basófilos	Total	Plaquetas	Proteína	Fibrinogênio
	A	15	11	31	21	35	8800	1936	0	4400	616	1848	0	8800	250000	6,8	0,4
	B	13	9,3	30	23	31	10000	4700	0	5200	100	0	0	10000	200000	7,2	0,2
	C	13	10,3	31	24	33	5600	3248	0	1960	224	168	0	5600	200000	7,2	0,2
	D	11	10,2	30	28	34	6100	2745	0	2806	366	183	0	6100	200000	7,4	0,6
	E	14	11,4	34	25	34	13200	5808	396	6864	0	132	0	13200	250000	7,2	0,4
	F	14	10,9	30	22	36	5800	2610	58	2784	348	0	0	5800	300000	8	0,4
	G	17	13,2	41	24	32	6800	2108	136	3604	952	0	0	6800	200000	7,8	0,6
	H	15	12,7	37	24	34	6600	3564	0	2904	132	0	0	6600	200000	7,2	0,4
P2	ID	Hemácias	Hemoglobina	Hematócrito	VCM	CHCM	Leucócitos	Neutrófilos	Bastonetes	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos	Basófilos	Total	Plaquetas	Proteína	Fibrinogênio
	A	17	10,6	31	19	34	7000	2170	0	3920	0	910	0	7000	300000	6,8	0,2
	B	15	10	29	19	34	9150	6222	0	2379	549	0	0	9150	250000	7,4	0,2
	C	17	10	30	18	33	3600	1080	108	2304	108	0	0	3600	200000	7,2	0,2
	D	13	9,8	29	23	34	3700	1073	0	2405	222	0	0	3700	350000	7,6	0,2
	E	14	11,1	32	24	35	7800	1248	0	6396	78	78	0	7800	300000	7,2	0,4
	F	15	10,4	30	20	35	3600	1080	0	2268	108	144	0	3600	350000	7,8	0,6
	G	18	12,8	36	20	36	4100	779	246	2296	779	0	0	4100	200000	8,2	0,6
	H	16	12,1	38	24	32	5100	1632	969	2040	459	0	0	5100	200000	7,8	0,6
P2.1	ID	Hemácias	Hemoglobina	Hematócrito	VCM	CHCM	Leucócitos	Neutrófilos	Bastonetes	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos	Basófilos	Total	Plaquetas	Proteína	Fibrinogênio
	A	17	10,5	30	35	35	9000	3780	0	4320	630	270	0	9000	300000	6,6	0,2
	B	14	9,5	28	20	34	5000	2900	0	1900	200	0	0	5000	370000	7,6	0,2
	C	17	10,2	30	17	34	4800	1728	96	2784	192	0	0	4800	240000	7,6	0,4
	D	19	9,5	27	14	35	4700	987	282	2585	752	94	0	4700	300000	7,6	0,4
	E	15	11,3	34	23	33	10900	2725	218	7521	327	109	0	10900	400000	7,4	0,4
	F	16	9,66	30	19	32	3800	1140	0	2242	418	0	0	3800	250000	7,6	0,6
	G	17	13	39	22	33	6500	1755	195	3835	650	65	0	6500	200000	8	0,8
	H	16	11,4	33	20	35	3400	952	68	1904	476	0	0	3400	200000	7,6	1
P4	ID	Hemácias	Hemoglobina	Hematócrito	VCM	CHCM	Leucócitos	Neutrófilos	Bastonetes	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos	Basófilos	Total	Plaquetas	Proteína	Fibrinogênio
	A	17	10,5	31	19	34	8200	2378	0	5084	82	656	0	8200	360000	6,6	0,2
	B	17	9,5	29	17	33	8500	5440	0	2720	340	0	0	8500	300000	7	0,2
	C	17	10	29	17	34	6300	2709	0	3402	63	126	0	6300	280000	7,2	0,2
	D	15	10	29	19	34	5700	2166	0	3135	399	0	0	5700	300000	7,8	0,6
	E	16	10,7	32	21	33	9800	3430	0	5684	490	196	0	9800	300000	6,8	0,4
	F	15	10,1	29	19	35	3950	1620	0	2212	40	79	0	3950	350000	7	0,4
	G	17	12,6	36	21	35	7200	2952	72	3600	576	0	0	7200	200000	7,6	0,4
	H	16	12	36	22	33	4200	1764	168	1974	252	42	0	4200	200000	7	0,4
P4.1	ID	Hemácias	Hemoglobina	Hematócrito	VCM	CHCM	Leucócitos	Neutrófilos	Bastonetes	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos	Basófilos	Total	Plaquetas	Proteína	Fibrinogênio
	A	16	10,9	31	19	35	8400	2184	0	5124	420	672	0	8400	340000	6,6	0,4
	B	18	9,4	28	16	34	7650	4361	0	3137	153	0	0	7650	350000	7	0,2
	C	15	10	30	19	33	3500	2275	140	1085	0	0	0	3500	220000	7,2	0,2
	D	14	10,3	34	24	30	3850	1386	193	2002	193	77	0	3850	360000	7,6	0,6
	E	17	11,4	32	18	36	5500	1980	0	3980	385	0	55	5500	360000	7,2	0,4
	F	14	11,1	36	18	43	4600	2484	46	1840	230	0	0	4600	400000	6,8	0,4
	G	17	12,2	38	23	32	4000	1520	0	2120	280	80	0	4000	260000	7,8	0,4
	H	16	12,3	35	22	35	2800	1092	56	1288	308	56	0	2800	350000	7,2	0,6
P4.2	ID	Hemácias	Hemoglobina	Hematócrito	VCM	CHCM	Leucócitos	Neutrófilos	Bastonetes	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos	Basófilos	Total	Plaquetas	Proteína	Fibrinogênio
	A	16	11,2	31	19	36	4100	1107	0	2788	0	205	0	4100	140000	6,8	0,2
	B	14	9,7	27	19	36	3900	2457	0	1443	0	0	0	3900	340000	7	0,2
	C	16	10,4	30	19	35	3000	1170	90	1680	30	30	0	3000	160000	7,2	0,4
	D	16	10,6	30	19	35	3400	1632	0	1530	68	170	0	3400	300000	7,6	0,4
	E	14	11	31	22	35	7400	3478	0	3700	222	0	0	7400	320000	6,6	0,2
	F	13	10,3	29	22	36	3450	1863	0	1449	104	35	0	3450	400000	6,8	0,4
	G	17	12,9	36	21	36	3900	1482	0	2262	156	0	0	3900	400000	7,8	0,6
	H	14	11,8	38	27	31	2400	1008	24	1272	96	0	0	2400	140000	7	0,4
P6	ID	Hemácias	Hemoglobina	Hematócrito	VCM	CHCM	Leucócitos	Neutrófilos	Bastonetes	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos	Basófilos	Total	Plaquetas	Proteína	Fibrinogênio
	A	17	11,1	34	19	33	7900	2133	0	5135	79	553	0	7900	400000	7,6	0,4
	B	17	9,9	31	18	32	6700	3417	67	2948	268	0	0	6700	300000	7	0,2
	C	15	10,2	32	21	32	5800	3016	116	2552	0	116	0	5800	260000	7,1	0,1
	D	16	10,7	34	21	31	8800	5016	528	2992	176	88	0	8800	400000	7,6	0,4
	E	15	11,4	37	24	31	13300	4921	0	8246	133	0	0	13300	350000	7	0,4
	F	14	10,1	33	24	31	7400	3552	0	3700	148	0	0	7400	350000	6,8	0,4
	G	14	13,3	42	29	32	12400	4836	0	7192	248	124	0	12400	360000	8	0,4
	H	16	12,4	38	24	33	7750	3720	0	3875	155	0	0	7750	400000	7,2	0,4
P7	ID	Hemácias	Hemoglobina	Hematócrito	VCM	CHCM	Leucócitos	Neutrófilos	Bastonetes	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos	Basófilos	Total	Plaquetas	Proteína	Fibrinogênio
	A	18	11,4	34	19	34	11000	3630	0	7150	110	110	0	11000	240000	7,4	0,4
	B	18	10,4	30	17	35	8150	3668	0	4320	82	81,5	0	8150	300000	8,2	0,4
	C	15	9,9	23	16	43	4800	1872	0	2688	144	48	48	4800	240000	7,4	0,2
	D	18	11	33	19	33	9650	5501	0	3764	193	193	0	9650	350000	8,2	0,4
	E	19	11,2	32	17	35	11000	3190	0	7590	110	110	0	11000	400000	7,4	0,6
	F	17	10,3	30	18	34	6050	3025	121	2904	0	0	0	6050	380000	7,6	0,6
	G	19	12,8	36	18	36	6800	2176	0	4216	204	204	0	6800	260000	8,2	0,6
	H	17	12,2	35	20	35	5000	2900	100	1850	50	100	0	5			

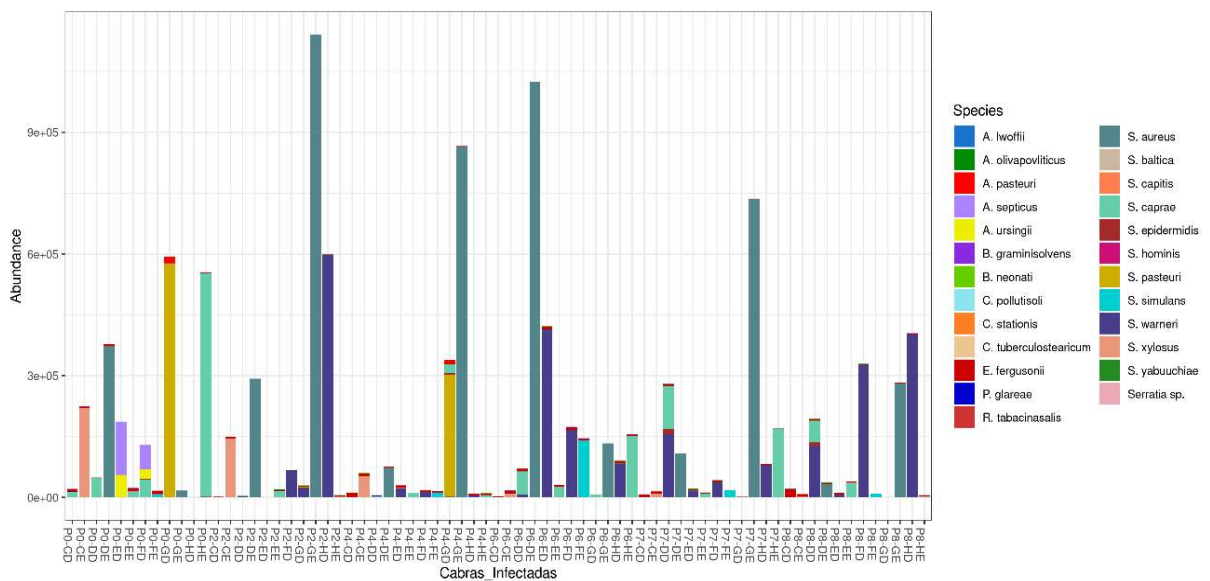
Quadro S2 - Identificação de bactérias de leite de cabras por lactocultura em ágar cromogênico Accumast®, proveniente do lado direito do úbere, no período de sadios e fase de infecção.

Períodos	Secção 1	Secção 2	Secção 3
Bd-P0	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
Cd-P0	<i>Pseudomonas</i> sp.	N.D	N.D
Dd-P0	<i>Escherichia coli</i>	<i>Lactococcus</i> sp.	N.D
	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
Ed-P0	N.D	N.D	N.D
Fd-P0	N.D	N.D	N.D
Gd-P0	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Streptococcus agalactiae</i> .	N.D
Hd-P0	N.D	N.D	N.D
Bd-P2	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Lactococcus</i> sp.	N.D
Cd-P2	N.D	N.D	N.D
Dd-P2	<i>Escherichia coli</i>	N.D	N.D
	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
Ed-P2	<i>Escherichia coli</i>	N.D	N.D
	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
Fd-P2	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
Gd-P2	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Streptococcus agalactiae</i> .	N.D
	N.D	<i>Aerococcus</i> sp.	N.D
Hd-P2	<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i> .	<i>Staphylococcus</i> SCN
	<i>Klebsiella</i> sp.		
Bd-P4	<i>Escherichia coli</i>	<i>Lactococcus</i> sp.	N.D
	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> .	N.D
Cd-P4	N.D	N.D	<i>Staphylococcus</i> SCN
Dd-P4	<i>Levedura</i> sp.	<i>Lactococcus</i> sp.	N.D
Ed-P4	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
Fd-P4	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
Gd-P4	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Streptococcus agalactiae</i> .	N.D
	<i>Enterobacter</i> sp.	N.D	N.D
Hd-P4	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
Bd-P6	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
Cd-P6	N.D	N.D	N.D
Dd-P6	<i>Escherichia coli</i>	<i>Lactococcus</i> sp.	N.D
	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
Ed-P6	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
	<i>Enterobacter</i> sp.	N.D	N.D
Fd-P6	<i>Pseudomonas</i> sp.	N.D	N.D
Gd-P6	<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	N.D

	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Lactococcus</i> sp.	N.D
Hd-P6	<i>Pseudomonas</i> sp.	N.D	N.D
Bd-P8	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
Cd-P8	N.D	N.D	N.D
Dd-P8	<i>Escherichia coli</i>	<i>Lactococcus</i> sp.	N.D
	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
	<i>Enterobacter</i> sp.	N.D	N.D
Ed-P8	<i>Pseudomonas</i> sp.	N.D	N.D
	<i>Enterobacter</i> sp.	N.D	N.D
	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
Fd-P8	<i>Pseudomonas</i> sp.	N.D	N.D
	N.D	N.D	N.D
Gd-P8	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Streptococcus agalactiae</i> .	N.D
	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Lactococcus</i> sp.	N.D
Hd-P8	<i>Pseudomonas</i> sp.	N.D	N.D

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura S1 - **Composição da microbiota absoluta bacteriana dos 25 táxons mais abundantes, ao longo da fase de infecção com *S. warneri* e período sadio ao nível de gênero e espécies.** As abundâncias dos gêneros e espécies foram distribuídas de em números absolutos de ASVs da amostra para cada período na fase de infecção, sendo que cada cor corresponde uma espécie diferente e seu respectivo gênero. As amostras estão alinhadas em ordem crescente por período. A letra D ao final da nomenclatura da amostra corresponde ao úbere direito e a letra E ao esquerdo.



Capítulo 2 – Transplante de microbiota de cabra sadia para glândula mamaria de cabras induzidas à mastite subclínica

1. INTRODUÇÃO

A mastite é uma das principais doenças infecciosas em animais leiteiros no mundo, e assim como ocorre em vacas (HALASA et al., 2007) é a infecção mais onerosa na criação de cabras leiteiras (CLARK; MORA GARCÍA, 2017b). Vários patógenos podem causar mastite direta ou indiretamente, mas dentro do domínio Bactérias, *Staphylococcus* Coagulase-Negative (SCN) e *Staphylococcus aureus* são as causas mais frequentemente identificadas em diagnósticos de infecção intramamárias (IMI) subclínica e clínica em caprinos, respectivamente (DER HAM] et al., 2017; DORE et al., 2016). Os SCN mais prevalentes na mastite caprina são *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus caprae* (BERGONIER et al., 2003; CONTRERAS et al., 2007; MORONI et al., 2005a).

Outra forma mais recente de abordar as IMI, são os estudos de microbioma do leite de cabras (MCINNIS et al., 2015b; POLVEIRO et al., 2020a; ZHANG et al., 2017b) e de vacas (ADDIS et al., 2016a; BONSAGLIA et al., 2017b; OIKONOMOU et al., 2014b). Esses estudos em diversas situações têm demonstrado a complexidade das interações de patógenos e comensais presentes em situações de adoecimento ou não do animal. As doenças podem ser consequência de uma soma de muitas variáveis complexas que interagem, e podem ir além da mera interação entre hospedeiro, patógeno e ambiente, como o conhecemos (HEDRICK, 1998). As análises ômicas do leite têm desvendado essas novas variáveis para uma nova compreensão dos diferentes tipos de mastite. Essa nova abordagem de pesquisa permitiu a reconstrução de sistemas que abordam a IMI (ECKHARDT et al., 2020b; GARIRA, 2019b).

Os transplantes de microbiota fecal (FMT) são atualmente utilizados para tratar com sucesso a infecção recorrente por *Clostridium difficile* em humanos (KELLY et al., 2016). No entanto, os efeitos a longo prazo e fora do objetivo principal desta intervenção permanecem desconhecidos (SANDERS et al., 2019). Um efeito colateral potencial é a transferência não intencional de organismos patogênicos do doador para o receptor (LO VECCHIO; COHEN, 2014), como a *Escherichia coli* altamente patogênica a qual pode levar a óbito o receptor (SER et al., 2021). Também estão surgindo evidências de efeitos positivos, extra intestinais e sistêmicos da reposição da microbiota intestinal (CRYAN; O'MAHONY, 2011), como no tratamento da depressão (KUROKAWA et al., 2018), obesidade (LEE; YACYSHYN; YACYSHYN, 2019), hipertensão (LI et al., 2017) e distúrbios autoimunes (ROSSER; MAURI, 2016). O FMT pode ajustar significativamente a riqueza de espécies intestinais e restaurar a proporção de bactérias anti-inflamatórias e, portanto, está sendo cada vez mais considerado no tratamento de síndromes e infecções persistentes (XU et al., 2021a).

Em suínos, juntamente com abordagens ômicas, a FMT tem sido utilizada para reduzir a diarreia pós desmame em sistemas intensivos de criação (SU et al., 2021). O transplante de microbiota do leite em casos de IMI tem sido explorado com intuito de retornar o equilíbrio de microrganismos no úbere, rompendo assim com o estado de disbiose da glândula mamaria ocasionado pela infecção (HU et al., 2020; MA et al., 2018), mas ainda são modelos estipulados em monogástricos. Em ruminantes essa técnica tem sido utilizada para realizar a transfaunação da microbiota do rumem, a fim de intervir de forma positiva na microbiota responsável por processos metabólicos relacionados à eficiência da digestão de bovinos (STEINER et al., 2020; ZHOU et al., 2018). O transplante de microbiota do trato gastrointestinal em bezerros também já foi testado e demonstrou resultados positivos (KIM et al., 2021).

Assim, o objetivo do estudo foi de aplicar uma técnica de transplante de leite contendo a microbiota residente de uma cabra doadora sadia, como forma de tratamento da mastite, e identificar as modificações bacterianas que ocorreram na microbiota dos transplantados com técnicas de diagnóstico padrão de mastite e sequenciamento de alto rendimento do gene 16S rRNA.

2. RESULTADOS

2.1. Produção de leite, Contagem de células somáticas (CCS), Contagem bacteriana total (CBT), *Califórnia mastitis test* (CMT) e Lactoculturas

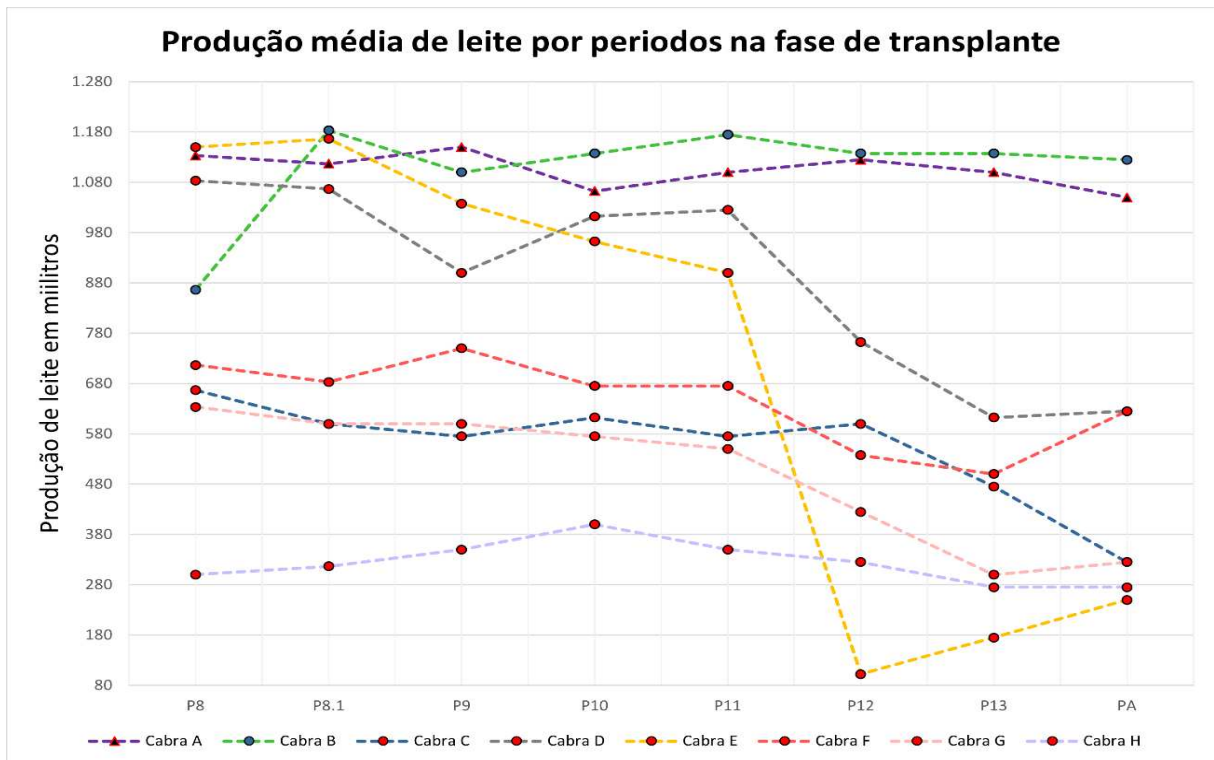
A produção total de leite dos animais transplantados (Cabras C, D, E, F, G, H), da cabra doadora de leite (A) e do controle externo (cabra B) foram mensuradas diariamente e se encontram na figura 1. De acordo com os dados, os animais A e B mantiveram a produção de leite constante na maioria dos períodos apresentados, sendo que apenas a cabra B um leve aumento inicial (36% de P8 para P8.1). As cabras restantes mantiveram a produção constante até o período P11, depois, todas tiveram um acentuado declínio de produção, com relevante destaque para a cabra E, que apresentou um quadro sério de mastite clínica aguda, e por isso declinou a produção de leite intensamente (queda de 88% de P11 para P12). A resposta esperada de recuperação da mastite para o animal E foi lenta após esse episódio, mas constante, com aumento de produção de 140% de PA para P12, uma vez que ela recebeu uma dose do medicamento anti-inflamatório Flunixinina Meglumine de forma subcutânea na dose de 2mg/kg. O período P12 foi o último dia de transplante de microbiota, P13 responde por dois dias de término e PA como quatro dias de término. De forma geral, as cabras responderam

diferentemente ao final do transplante, sendo que as cabras C e D declinaram na produção de leite e as cabras F, G e H após o declínio tiveram um leve aumento ou manutenção da produção.

Além disso, algum fator ainda não identificado determinou a queda repentina de produção após o P11 na maioria dos animais transplantados (queda total de 22% de P10 para P12), no entanto para o animal E a causa foi identificada, mas como um todo, apenas as cabras D e E tiveram de fato uma queda mais abrupta.

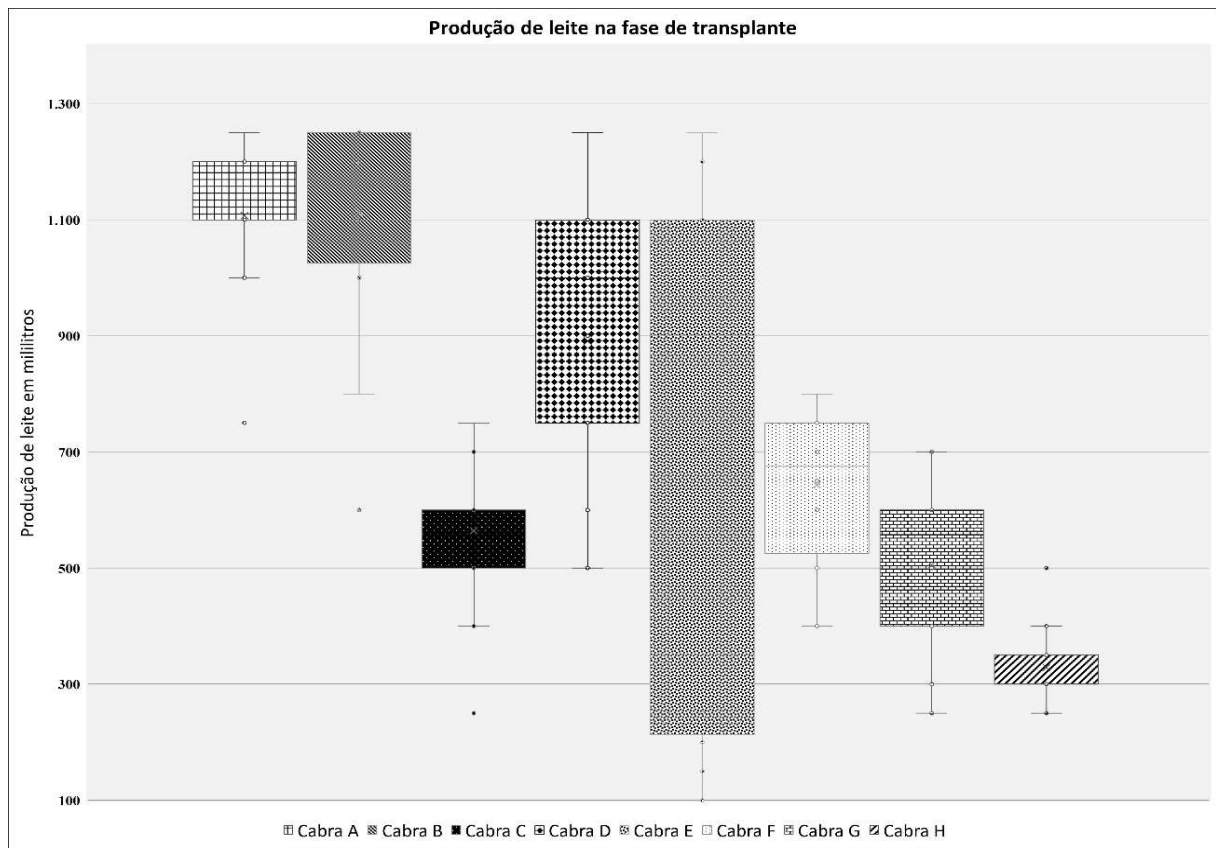
Figura 1 - Produção média de leite por períodos na fase de transplante e da cabra doadora.

A produção de leite dos animais nos lados esquerdo e direito do úbere somados foram distribuídos em valores de médias em mililitros produzidos por período estudado. Cada cor nas linhas do gráfico, compreende um animal experimental. As cabras C, D, E, F, G e H em outras cores foram os animais que receberam o transplante de microbiota após serem induzidos a mastite subclínica previamente com *S. warneri*. A cabra doadora A está representada pela linha tracejada roxa escuro com marcação triangular. A cabra controle externo B está demarcada com linhas verde e marcação de ponto como círculo em azul. Os períodos P8, P8.1, P9, P10, P11, P12, P13 e PA compreendem desde o início do transplante até o período final.



A figura 2 apresenta o gráfico que informa a variabilidade na produção total de leite nos animais em todos os períodos de transplante. A cabra A, doadora de leite, apresentou mínima flutuação e alta capacidade de produção de leite. As cabras C e H, também apresentaram pouca variabilidade na produção de leite, e as cabras D, F e G demonstraram uma variabilidade média de produção. A cabra E, por outro lado, como desenvolveu mastite clínica grave, foi o animal com maior variabilidade na produção. Assim como cabra A (doadora), a cabra B, controle externo, uma vez que elas não foram submetidas previamente a nenhuma infecção na glândula mamária demonstraram produção de leite com pouca variabilidade e alta produção.

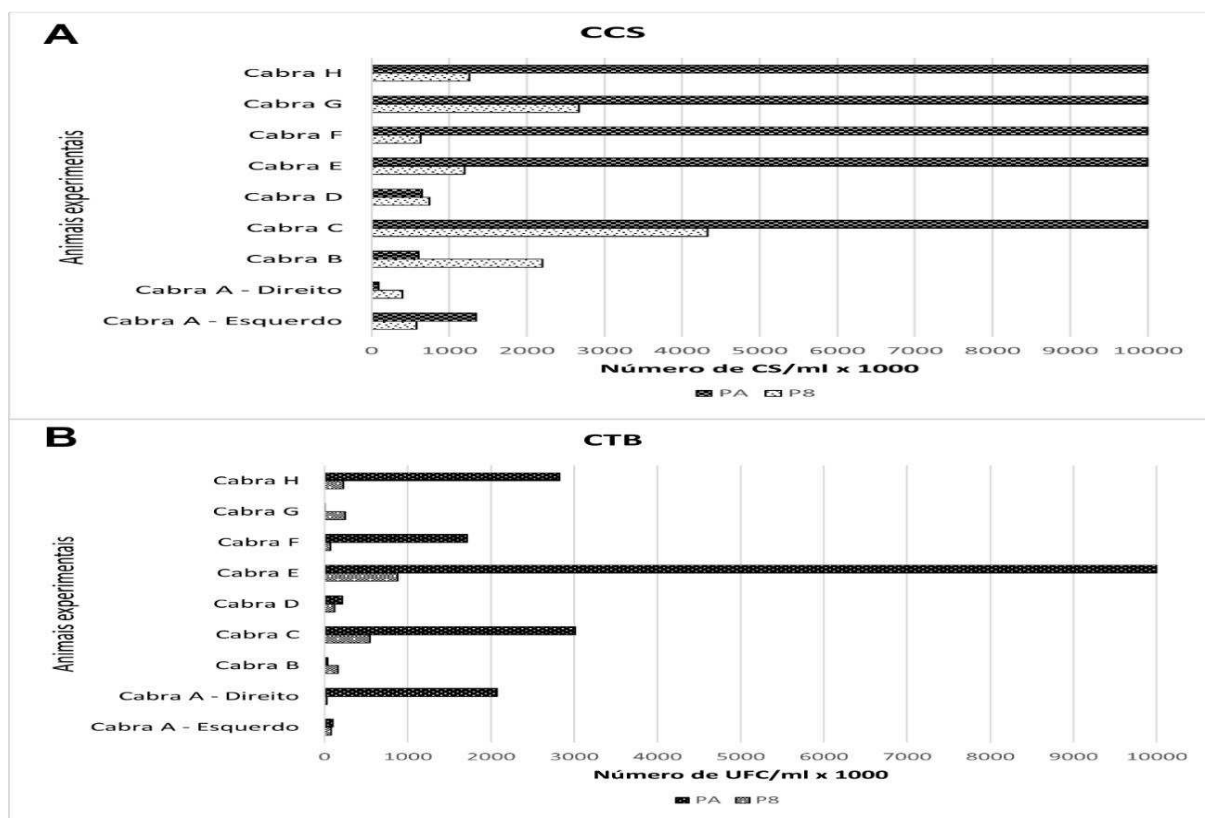
Figura 2 - Boxplot da variação de produção de leite das cabras receptoras do transplante nos períodos P8 até PA e da cabra doadora A. A variação da produção de leite dos animais somando-se os úberes esquerdo e direito distribuídos em mililitros de leite por animal. Cada cor e ranhura nas linhas do gráfico, compreende um animal experimental somando todos os períodos elencados. A cabra A, a primeira a esquerda, foi a doadora de leite e de microbiota. A cabra de letra B na segunda posição a esquerda, foi o animal mantido como controle externo. As cabras C, D, E, F, G e H em outras cores e ranhuras foram os animais submetidos ao transplante de microbiota.



A figura 3 representa as diferentes contagens de CCS e CBT referente ao início (P8) e final (PA) do transplante de microbiota. Dentre as cabras transplantadas, somente a cabra de letra D, obteve uma menor, ou seja, melhor contagem de CCS ao final do transplante, inclusive menor do que o animal controle B. No entanto, esse animal já detinha uma contagem baixa de células somáticas no início das medições. No restante das cabras transplantadas, todas apresentaram um valor final (PA) maior do que no início do tratamento (P8). A cabra doadora A apresentou uma contagem menor do que todas as outras amostradas.

Na contagem de CBT, a cabra de letra G apresentou uma baixa contagem no início e menor ainda ao final das medições, e a cabra D, também apresentou baixas contagens de CBT, no início e final dos períodos experimentais. A cabra A teve alta contagem apenas ao final do tratamento (PA) no úbere direito, mas o úbere esquerdo e a cabra B no geral apresentaram padrões similares às cabras G e D. As cabras C, E, F e H apresentaram contagens de UFC/ml maiores no final do tratamento.

Figura 3 - Contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) da fase de transplante de microbiota, referente aos animais transplantados e doadora de microbiota (cabra A - úbere direito e esquerdo). A figura 3A apresenta a contagem de número de células somáticas de cada cabra no período em que os animais estavam infectados com *S. warneri* (P8 - animais infectados) e ao último período PA (quatro dias após final do transplante ou período de resiliência). A figura 3B representa a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) para cada animal em seus respectivos períodos, como denotado na figura acima, assim como os argumentos escalares. Os tracejados e as diferenças de cores de cada barra de linha diferente representam os períodos, sendo o PA mais escuro, e P8 o mais claro. A contagem exibida deve ter sua escala multiplicada por 10^3 para alcançar os valores reais.



Nos testes estatísticos realizados para CTB, teste t pareado, não foi encontrada diferença entre P8 - PA. Por outro lado, nos testes realizados para o CCS dentro dos mesmos padrões anteriores, indicaram diferenças entre P8 - PA ($P < 0.05$). Esses resultados reforçam a significância do que foi visualizado nos gráficos anteriores, indicando alterações proeminentes estabelecidas nesses úberes após a indução a infecção por *S. warneri* em relação ao número de CCS/ml.

A tabela 1 indica os valores de CMT encontrados durante o experimento. Os animais A e B, doadora e controle externo, respectivamente não apresentaram mudanças nos exames realizados durante o período inicial e final. Lembrando que apenas o úbere direito passou por transplante, sendo assim, apenas o animal de letra D teve melhora no exame de CMT. Diante disso, a cabra D apresentou melhora no diagnóstico de 3+ para 0 cruz e C apresentou manutenção de 2+, e os outros animais transplantados praticamente apresentaram aumento no número de cruces. Levando em consideração que os seguintes valores foram considerados como indicadores da doença: SCC: $> 1 \times 10^6$ CS/ml e/ou CMT: $\geq 2+$, apenas o animal de letra D pode ser considerado não mastítico ao final do transplante.

Tabela 1 - *California Mastitis Test (CMT)* de cabras em três períodos durante a fase de transplante de microbiota.

Período	Identificação	Teto Esquerdo	Teto Direito
P8	Cabra A	0-1 Cruz	0 Cruz
P8	Cabra B	1 Cruz	0 Cruz
P8	Cabra C	0 Cruz	2 Cruzes
P8	Cabra D	0 Cruz	3 Cruzes
P8	Cabra E	1 Cruz	2 Cruzes
P8	Cabra F	1 Cruz	1 Cruz
P8	Cabra G	3 Cruzes	2 Cruzes
P8	Cabra H	3 Cruzes	2 Cruzes
PA	Cabra A	1 Cruz	0 Cruz
PA	Cabra B	0 Cruz	1 Cruz
PA	Cabra C	0 Cruz	2 Cruzes
PA	Cabra D	1 Cruz	0 Cruzes
PA	Cabra E	0 Cruz	3 Cruzes
PA	Cabra F	1 Cruz	2-3 Cruzes
PA	Cabra G	2 Cruzes	3 Cruzes
PA	Cabra H	2 Cruzes	3 Cruzes

Período experimental, identificação da cabra, e os úberes aos quais foram submetidos aos testes. P8 (animais infectados) e PA (quatro dias após final do transplante ou período de resiliência).

Dentre os animais transplantado, as cabras F e G, apresentaram resultado negativo na lactocultura com ágar Sangue. As demais lactoculturas nesse estudo, menos a cabra D, apresentaram resultados correspondentes aos de CCS e CMT para tipificação da mastite, ou seja, quando as técnicas elencadas apresentaram resultados para diagnóstico de mastite subclínica ou clínica, as lactoculturas apresentaram mais de três colônias. No entanto, tendo em consideração o conjunto de todos os testes realizados, a cabra D por mais que tenha apresentado resultado positivo, foi dentre todos os animais a que melhorou os sinais de mastite. Assim, esse resultado discrepante da cabra D pode decorrer devido as limitações da cultura microbiológica e em apenas um tipo de ágar.

2.2. Hemograma e identificações bacteriológicas

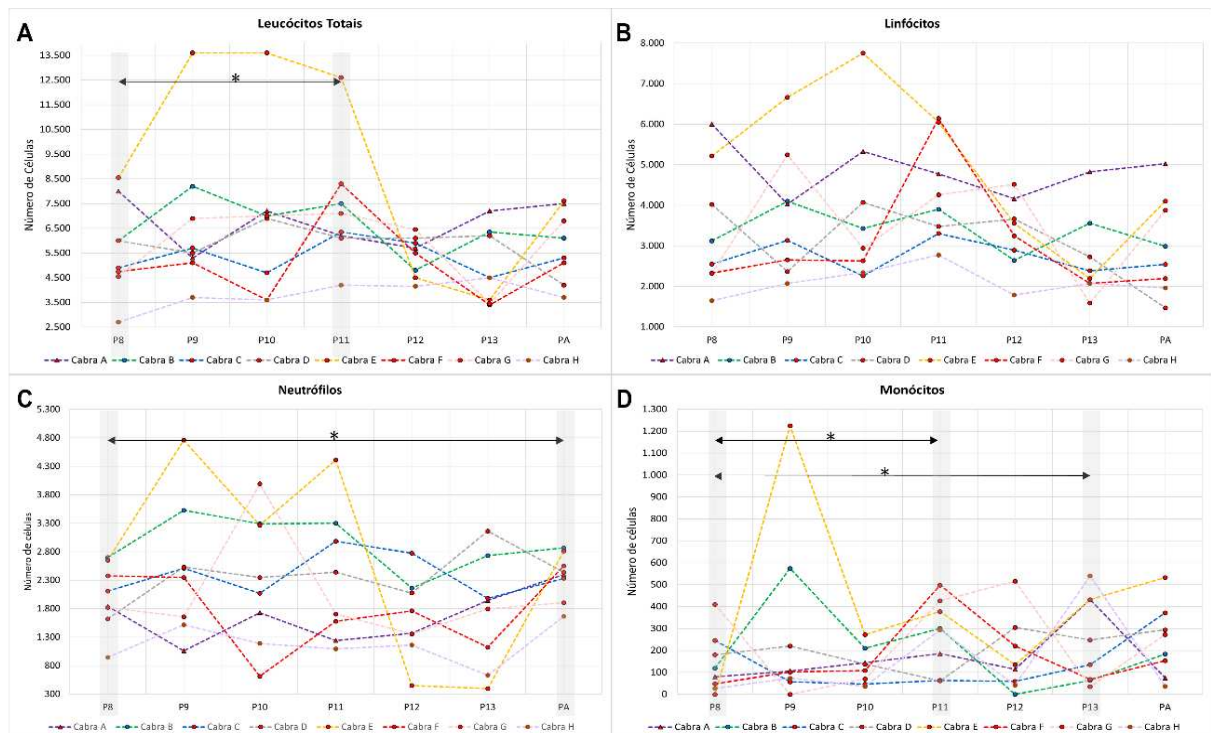
A figura 4 demonstra os principais tipos de células de defesa que variaram no hemograma. Outros perfis celulares e bioquímicos não representados no gráfico abaixo estão dispostos no quadro S1 na seção complementar. A figura 4 apresenta a variação de leucócitos totais do sangue (LT), linfócitos, neutrófilos e monócitos dos animais desde o período (P8) até o final das medições da fase de transplante (PA). A cabra E foi o animal que mais apresentou alterações dentre os valores apresentados, mas como relatado anteriormente, ela apresentou uma grave mastite clínica, diagnosticada por exames clínicos entre os períodos P10 e P11, com elevado decréscimo de produção de leite.

Interessante ressaltar na figura 4A, que os LT começaram de fato a variar de P8 para P9 na cabra E, ou seja, logo no início do transplante e com um retardo em relação ao exame clínico, podendo indicar que algum microrganismo proveniente da cabra doadora pode ter desequilibrado a microbiota do úbere desse animal, ou se não, por outro fator não identificado. Como demonstrado nessa figura 4(B-C-D), os linfócitos, neutrófilos e monócitos foram mobilizados rapidamente da corrente sanguínea para a glândula mamaria, denotando um intenso decréscimo dessas células, que começaram a recuperar valores apenas em P13. A leucocitose, demonstrou ser um bom indicador de mastite em cabras, e entre as células destacadas, os monócitos e neutrófilos aparentaram ser os mais reativos a esse tipo de doença, uma vez que a monocitose e neutrofilia aparentaram ser bem proeminentes, o que pode nos indicar que os macrófagos e leucócitos polimorfonucleares são de suma importância na mastite clínica bacteriana.

A cabra B, o controle externo, demonstrou algumas variações no número de LT, o que pode ter refletido nos exames de CCS demonstrados anteriormente, no entanto, não observamos alterações em outros fatores importantes, como a produção leite ou nos exames clínicos, o que sugere que pode ter sido alguma variação relacionada ao manejo ou ambiental. A cabra D que apresentou melhora durante o transplante, não demonstrou grandes alterações nos valores celulares demonstrados. A cabra A se manteve constante nos valores celulares apresentados. Outro animal com comportamento “estranho” aos demais é a cabra H, pois sempre apresentou valores baixos de leucócitos, pouca reação celular, mas nos exames de CMT, sempre demonstrou 2 ou mais cruces no teto direito. Hipoteticamente, algum fator ainda não identificado para esse animal pode estar caracterizando esse quadro atônito para reatividade a inflamação da glândula mamaria.

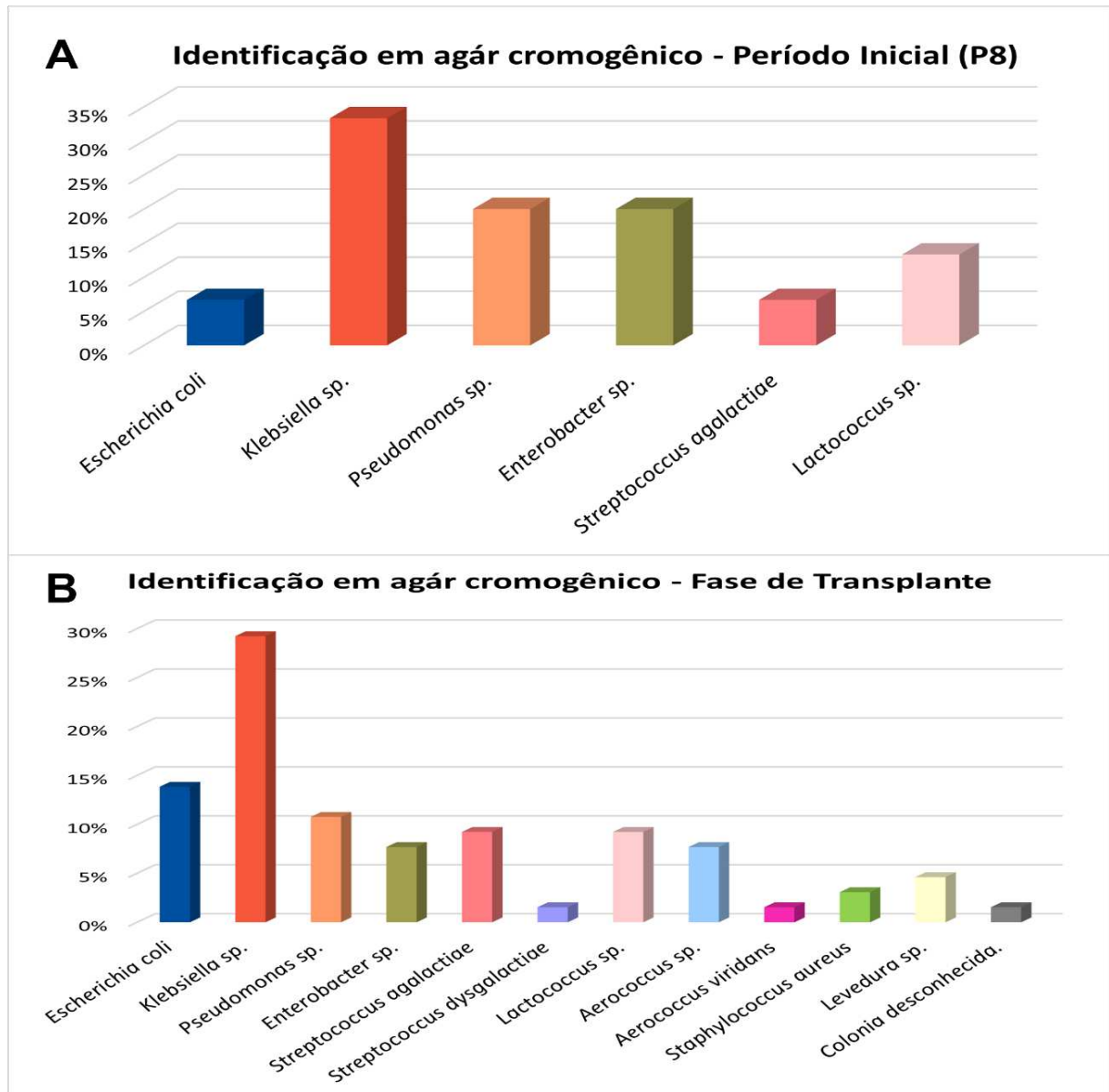
Os testes estatísticos realizados para a contagem de LT demonstraram que ocorreram diferenças entre os períodos P8 - P11 ($P < 0.05$). Na contagem de monócitos, encontramos diferenças entre P8 - P11 ($P < 0.05$) e P8 - P13 ($P < 0.05$). Em relação aos neutrófilos, foi evidenciada a diferença entre P8 - PA ($P < 0.01$). Nos testes realizados para a contagem de linfócitos, não foram encontradas diferenças significativas. As comparações realizadas demonstraram que mudanças nas células do sistema imunológico presentes no sangue dos animais foram evidentes não somente para conjuntos de LT, mas também de alguma forma foi afetada a contagem de monócitos e neutrófilos, demonstrando que durante a transfusão de microbiota pelo leite, essas células podem ser de importância nas alterações ocorridas na glândula mamaria.

Figura 4 - Leucograma das cabras na fase de transplante de microbiota, compreendendo leucócitos totais, linfócitos, neutrófilos e monócitos dos animais transplantados e da cabra doadora de microbiota. Cada cabra está demonstrado por um tracejado de cor diferente. As linhas tracejadas representam a contagem de células das séries medidas, e estão subdivididas em figuras distintas. O animal doador (Cabra A) e o controle externo (Cabra B) são representados pela linha tracejada em verde e marcador bolinha azul, respectivamente. As marcações com asteriscos, setas e sombras em cinza demarcam onde ocorreram diferenças estatísticas entre os períodos avaliados.



Na figura 5, estão representadas as bactérias que foram identificadas no lado direito do úbere por meio do ágar cromogênico Accumast®, as quais foram dispostas em porcentagem de identificação na fase de transplante, correspondendo a todos os períodos analisados (P9 - PA) e período de inicial ao transplante (P8). No quadro S2 localizado, no material suplementar, foram apresentadas todas as bactérias identificadas por secção, por animal e período experimental. No período inicial do transplante (P8) (Figura 5A), identificamos 15 táxons, sendo seis diferentes e na fase de transplante (Figura 5B) identificamos 65 táxons, sendo 12 diferentes. Em P8 encontramos predominantemente bactérias Gram (-), dando ênfase para os gêneros *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp. e *Pseudomonas* sp. Na fase de transplante como um todo, identificamos maiores proporções de bactérias Gram (-), adicionando *E. coli* como uma espécie importante, como evidenciado na figura 5B, mas a quantidade de táxons diferentes de Gram (+) demonstrou um salto de isolados desse tipo, inicialmente em P8 de 2, para 6 diferentes na fase de transplante de P9 até PA. Diante disso, verificamos que a riqueza de bactérias identificadas no transplante aumentou, o que pode significar que bactérias de fato podem ter sido introduzidas no úbere dessas cabras receptoras do transplante, ou um distúrbio da microbiota, disbiose, proporcionou um aumento dessas bactérias no leite, o que nos possibilitou isolar esses gêneros e espécies em lactoculturas seletivas e aeróbicas.

Figura 5 - Porcentagem de isolamento e identificação de bactérias por ágar cromogênico Accumast® no período inicial do transplante e na fase total de transplante. A figura 5A representa os animais no período P8, em que estavam apenas infectados e ainda não transplantados. A figura 5B apresenta os isolados na fase de transplante, de P9 até PA. Cada barra representa uma bactéria diferentemente isolada e sua porcentagem de identificação em relação a todos os isolados.



2.3. Dados do sequenciamento

A amostra SBRP8-BE dos dados analisados não gerou sequências para as análises seguintes. A amostra P13-ED não foi sequenciada por falta de material. Os dados foram separados em dois conjuntos, sendo o primeiro referente ao animal doador de leite (cabra A)

em todos os períodos analisados: P8, P9, P10, P11, P12, P13 e PA, e o segundo remete aos animais transplantados (cabras C, D, E, F, G e H) nos mesmos períodos analisados anteriormente. Um total de 97 amostras de leite de cabra foram coletadas e sequenciadas na região V3 eV4 do gene 16S rRNA. A cabra A, gerou um total de 1.099.045 sequências em 14 amostras, que foram usadas para as análises (média = 78.503,214± Desvio padrão = 144.749,143 leituras/amostra). Ao todo, 5.271 táxons identificados foram utilizados nessas análises. Os animais transplantados geraram um total de 13.631.127 sequências em 83 amostras, que foram usadas para análises abaixo (média = 164.230,446±Desvio padrão = 265.318,795 leituras/amostra). Ao todo, 5.340 táxons identificados foram utilizados nessas análises. O comprimento médio para todas as leituras foi de 450 bp. De antemão, a classificação do gênero *Escherichia* sp. a nível de espécie ainda pode ser reavaliada com a técnica de lactocultura, uma vez que a identificação de algumas espécies com o sequenciamento gene 16S rRNA são de difícil resolução (EDGAR, 2018; GWAK; RHO, 2020).

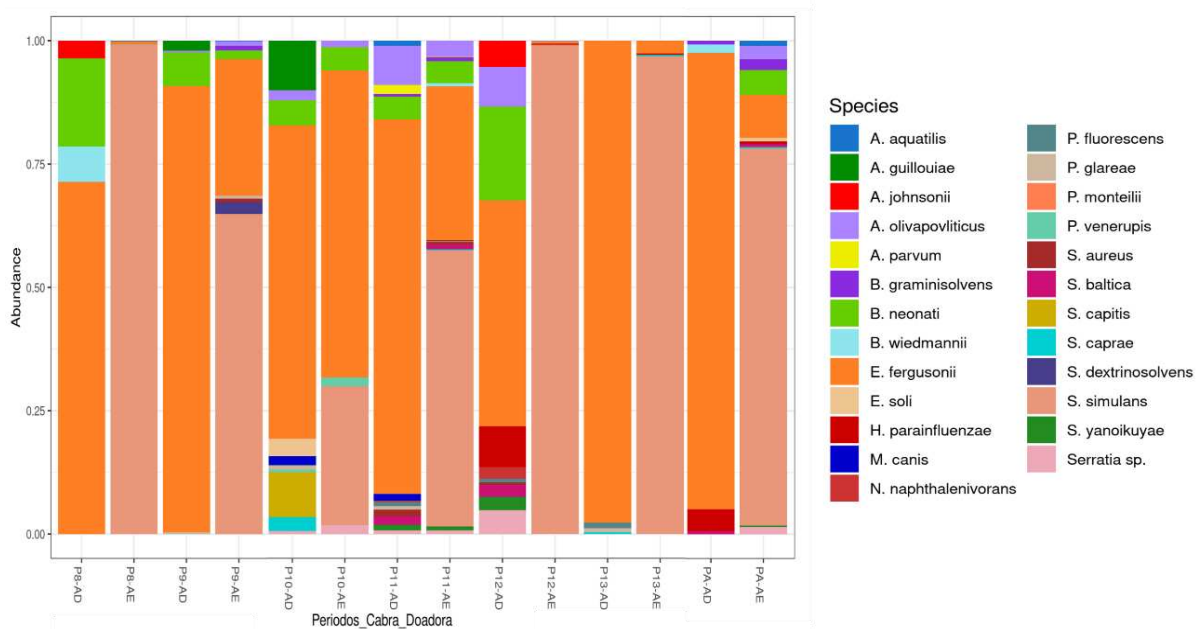
2.4. Abundância relativa da microbiota dos úberes da cabra doadora

A figura 6 apresenta a composição da microbiota bacteriana do animal doador de leite (cabra A) ao longo de toda a fase de transplante de microbiota. A Figura S1 localizada no material suplementar, correspondente aos números absolutos de ASVs para cada gênero e espécie, correspondente ao animal doador na fase de transplante. Observamos que a microbiota apresenta sempre de dois a três microrganismos mais predominantes para o úbere do lado esquerdo e direito em todos animais e períodos analisados, com algumas flutuações que ocorrem, aumentando ou diminuindo alguns microrganismos transeuntes. O úbere do lado direito e esquerdo apresentaram diferentes microrganismos, como: *Acinetobacter johnsonii*, *Bacteroides neonati*, *Bacillus wiedmannii*, *Alkalibacterium olivapovliticus*, *Acinetobacter guillouiae*, *Staphylococcus capitis* entre outros microrganismos. No entanto, o úbere direito apresentou alta abundância de *Escherichia fergusonii* com percentagens de abundância de: P8-AD (57%); P9-AD (75%); P10-AD (41%); P11-AD (68%); P12-AD (41%); P13-AD (91%); PA-AD (80%).

O úbere do lado esquerdo apresentou alta abundância de *Staphylococcus simulans* em praticamente todos os períodos estudados, com porcentagens de: P8-AE (99%); P9-AE (60%); P10-AE (27%); P11-AE (54%); P12-AE (98%); P13-AE (96%); PA-AE (75%). O microrganismo *E. fergusonii* também foi encontrado do lado esquerdo do úbere, nas abundâncias menores de: P8-AE (0.3%); P9-AE (26%); PA-AE (60%); P11-AE (30%); P12-

AE (0.3%); P13-AE (2%); PA-AE (86%). Além desses, esse lado do úbere apresentou em menores percentagens *A. olivapovliticus* e *Bacteroides Graminisolvans*, sendo esse último também identificado no lado direito, mas em menor número.

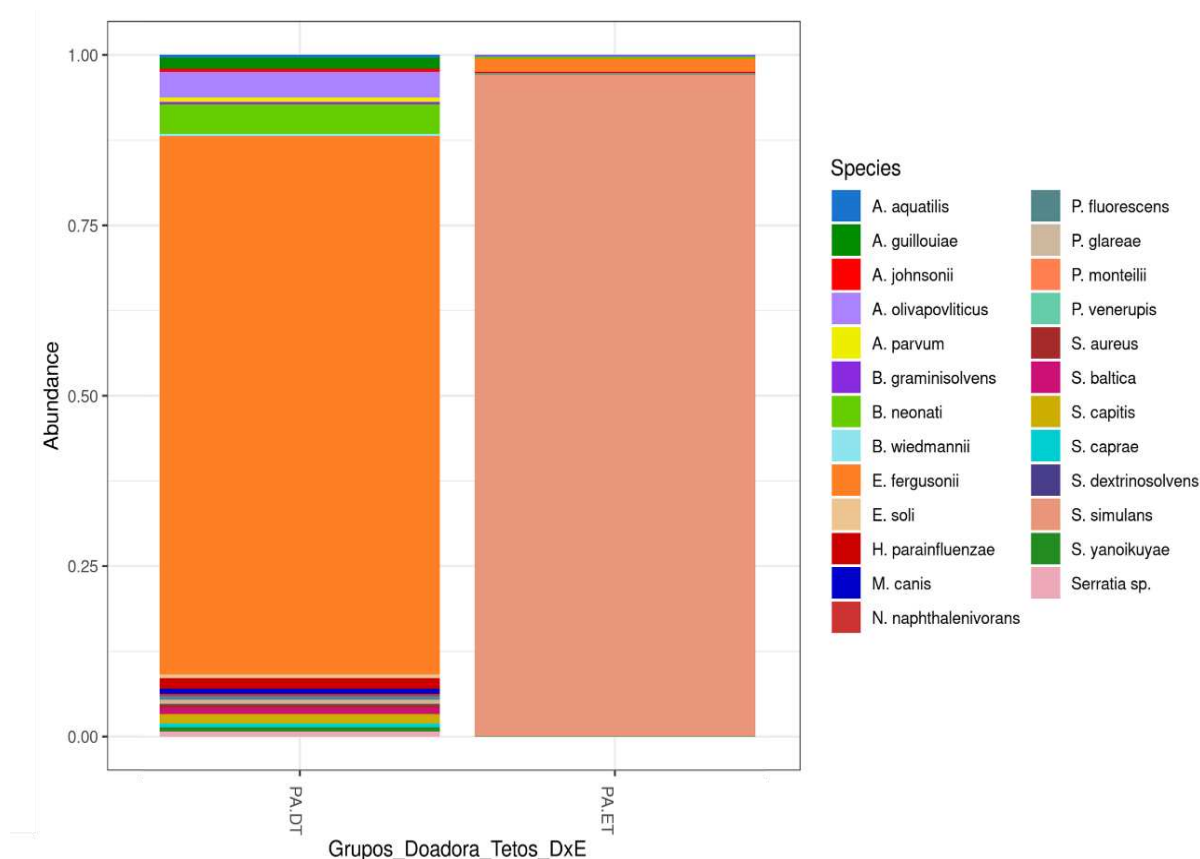
Figura 6 - Composição da microbiota bacteriana dos 25 táxons mais abundantes, ao nível de espécies do animal doador de microbiota do leite (cabra A) ao longo da fase de transplante. As abundâncias dos gêneros e espécies foram distribuídas de forma relativa a 100% da amostra para cada período na fase de transplante, sendo que cada cor corresponde uma espécie diferente e seu respectivo gênero. A letra D ao final da nomenclatura da amostra corresponde ao úbere direito e a letra E ao esquerdo.



A figura 7 reúne a soma dos períodos relacionados ao animal doador de microbiota do leite (cabra A) na fase de transplante. O úbere do lado direito aparenta maior riqueza que o esquerdo, demonstrando assim muito mais espécies diferentes durante toda a fase avaliada na figura. Podemos constatar nessa mesma figura que o úbere do lado direito apresentou alta abundância do gênero *E. fergusonii* somados os períodos da fase transplante, com 73% de abundância total, enquanto o úbere do lado esquerdo apresenta 96% de *S. simulans*. O úbere em seu lado direito apresentou também os seguintes gêneros e espécies em abundância: *B. neonati* (4%), *A. olivapovliticus* (3.6%), *A. guillouiae* (1.6%), *Haemophilus parainfluenzae* (1.4%), *Staphylococcus capitis* (1.3%). O úbere no lado esquerdo, no entanto, apresentou altas abundâncias, em menores percentagens, de *B. neonati* (0.2%), *H. parainfluenzae* (0.1%). Em nossas análises não detectamos o microrganismo *S. simulans* no lado direito do úbere da cabra

doadora A. Diante dessa outra perspectiva da microbiota, evidenciamos que os microrganismos de ambos os úberes não são completamente diferentes, mas possuem microrganismos não comuns uns aos outros e em alta abundância.

Figura 7 - Composição da microbiota bacteriana dos 25 táxons mais abundantes, ao nível de espécies do animal doador de microbiota do leite (cabra A), somado o conjunto de períodos da fase de transplante. As abundâncias dos gêneros e espécies foram distribuídas de forma relativa a 100% da amostra para cada período na fase de transplante, sendo que cada cor corresponde a uma espécie diferente e seu respectivo gênero. A letra DT ao final da nomenclatura da amostra corresponde ao úbere no lado direito e a letra ET, ao esquerdo.



2.5. Abundância relativa da microbiota nos úberes das cabras transplantadas

A figura 8 demonstra a evolução da microbiota das cabras transplantadas durante o período P9 até P12, sendo P8 denotado como marco zero e P13 e PA, como períodos de resiliência da microbiota. A Figura S2 localizada no material suplementar, corresponde aos números absolutos de ASVs para cada gênero e espécie durante a fase de transplante. Os úberes do lado esquerdo foram mantidos como controle. Diante do que foi relatado anteriormente para

a cabra doadora de leite (cabra A), existiam dois principais gêneros presentes nos úberes desse animal, sendo *E. fergusonii* e *S. simulans*. As cabras transplantadas seguiram de um experimento em que foram inoculadas *S. warneri*, sendo que as cabras D, E, F, H detinham altas taxas de abundância desse gênero em P8 como observado na figura 8. O animal de letra D em P8 detinha em sua microbiota *S. warneri* (65%), *S. caprae* (26%), *S. epidermidis* (4%) e outros microrganismos; o animal de letra E detinha *S. warneri* (61%), *E. fergusonii* (31%) e outros microrganismos; o animal de letra F detinha 97% de *S. warneri* e outros microrganismos; o animal de letra H detinha *S. warneri* e outros microrganismos. As cabras restantes, C e G, não demonstraram presença de ASVs de *S. warneri*. A cabra C apresentou em P8 *E. fergusonii* (71%), *B. neonati* (4%), *Achromobacter kerstersii* (3%) e outros microrganismos. A cabra G, apresentou *S. caprae* (52%), *S. pasteurii* (35%), *S. epidermidis* (11%) e outros microrganismos.

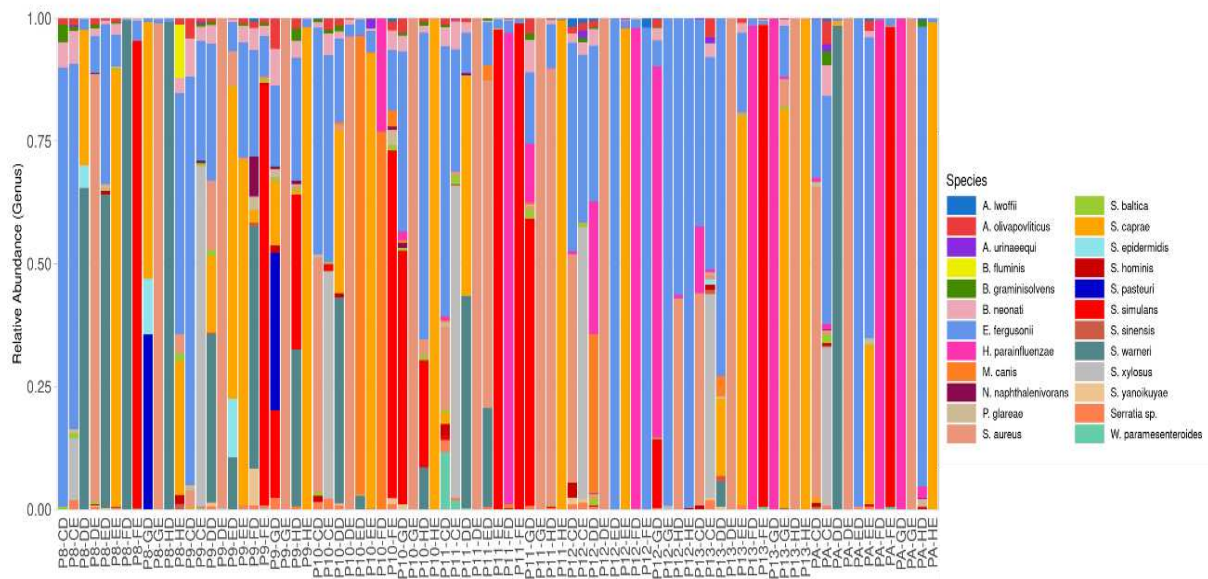
No período PA, a maioria desses animais apresentaram uma microbiota diferente da inicial (P8), diferentemente da cabra D, que ainda apresentou altas abundâncias de *S. warneri*, e diante de todos os resultados ela foi a único animal que apresentou melhoras clínicas após o transplante. Ao longo dos períodos analisados, esse microrganismo chegou a diminuir a sua abundância, mas depois, retomou a microbiota do leite do úbere. Além disso, apresentou no período PA, 97% de abundância de *S. warneri* e outros microrganismos. Os outros animais alteraram a microbiota ao longo dos períodos como demonstrado na figura 8, e em PA foram constatados os seguintes microrganismos bacterianos: a cabra C com *Staphylococcus aureus* (57%) e *E. fergusonii* (29%); a cabra E com *E. fergusonii* (99%) e *S. aureus* (0.5%); a cabra F com *H. parainfluenzae* (98%) e outros microrganismos; a cabra G com *H. parainfluenzae* (99%); a cabra H com *E. fergusonii* (90%), *H. parainfluenzae* (2%) e outros microrganismos. Diante disso tudo, aparentemente os animais ao final do período de transplante herdaram algumas bactérias oriundas da doadora, como *H. parainfluenzae* e *E. fergusonii*, e *S. simulans* deixou de estar presente em altas abundâncias nesses animais.

A cabra E desenvolveu mastite clínica aguda, a qual se intensificou no período P11 e P12, deixando P13 sem amostra e retornando a amostragem em PA. Diante disso, supomos que o agente de maior abundância na microbiota e que seja estranho a microbiota indígena estivesse presente entre esses períodos. Em P10, a microbiota desse animal era composta por *Macrococcus canis* (89%), *E. fergusonii* (3%) e *S. Warneri* (3%) e outros microrganismos. No período P11, apresentou *S. aureus* (64%), *S. warneri* (20%), *E. fergusonii* (8%) e outros microrganismos. Em P12 era praticamente igual a de PA, com 99% de *E. fergusonii*. Na figura 6, relacionada a cabra doadora, identificamos uma maior abundância de *S. aureus* no período P11. Levando em consideração esses microrganismos identificados e os resultados de cultura

microbiológica realizada em ágar cromogênico demonstrada no quadro complementar 4, o único microrganismo estranho entre esses períodos, e incomum nos isolamentos foi *S. aureus*, e com isso supomos que ele é o agente responsável pelo quadro de mastite clínica aguda. Contudo, não podemos descartar que esse microrganismo causou alguma intercorrência junto a outros microrganismos e proporcionou que o agente *E. fergusonii* causasse a mastite clínica, pois esse último foi o isolado mais identificado em P13 e PA.

Figura 8 - Composição da microbiota bacteriana ao nível de espécies dos 25 táxons mais abundantes, das cabras receptoras da microbiota do leite ao longo da fase de transplante.

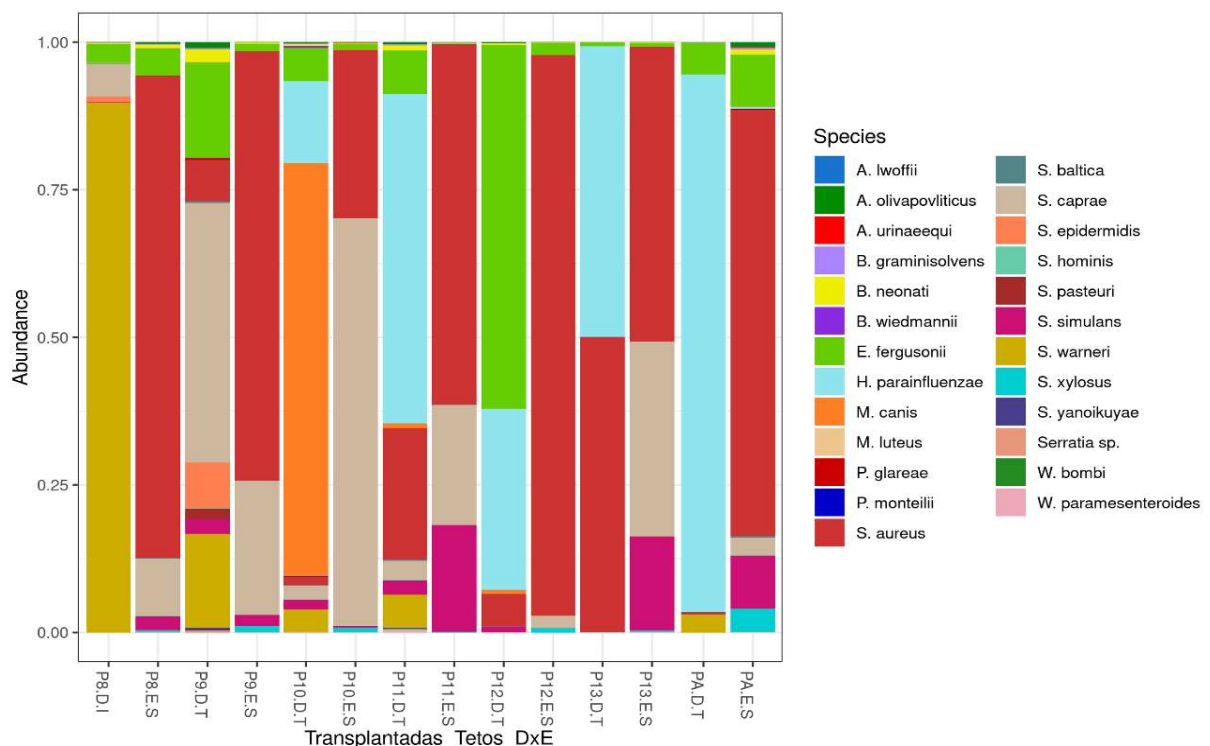
As abundâncias dos gêneros e espécies foram distribuídas de forma relativa a 100% da amostra para cada período na fase de transplante, sendo que cada cor corresponde uma espécie diferente e seu respectivo gênero. A letra D ao final da nomenclatura da amostra corresponde ao úbere do lado direito e a letra E ao esquerdo.



A figura 9 abaixo permite uma visão geral de todos os animais incluídos na fase de transplante. Interessante observar que *E. fergusonii* sempre esteve presente na microbiota desses animais e que no período P8, existiu uma alta abundância de *S. warneri* no úbere direito, decorrente da indução a infecção prévia e anterior ao transplante. Após, em P9 esses animais apresentaram altas abundâncias de *H. parainfluenzae*, *S. simulans* e *S. aureus* no úbere direito, e uma queda quase que constante até PA de *S. warneri*. Os úberes esquerdo desses animais transplantados sempre apresentaram alta abundância de *S. aureus*. Comparando os períodos

P8.D.I com PA.D.T, que são referentes aos úberes transplantados, conseguimos avaliar que ocorreu uma modificação da microbiota levando-se em conta o transplante realizado.

Figura 9 - **Composição da microbiota bacteriana dos 25 táxons mais abundantes, ao nível de espécies do animal doador de microbiota do leite (cabra A), somado o conjunto de períodos da fase de transplante.** As abundâncias dos gêneros e espécies foram distribuídas de forma relativa a 100% da amostra para cada período na fase de transplante, sendo que cada cor corresponde a uma espécie diferente e seu respectivo gênero. A letra D.T ao final da nomenclatura da amostra corresponde ao úbere direito e a letra E.T ao esquerdo.

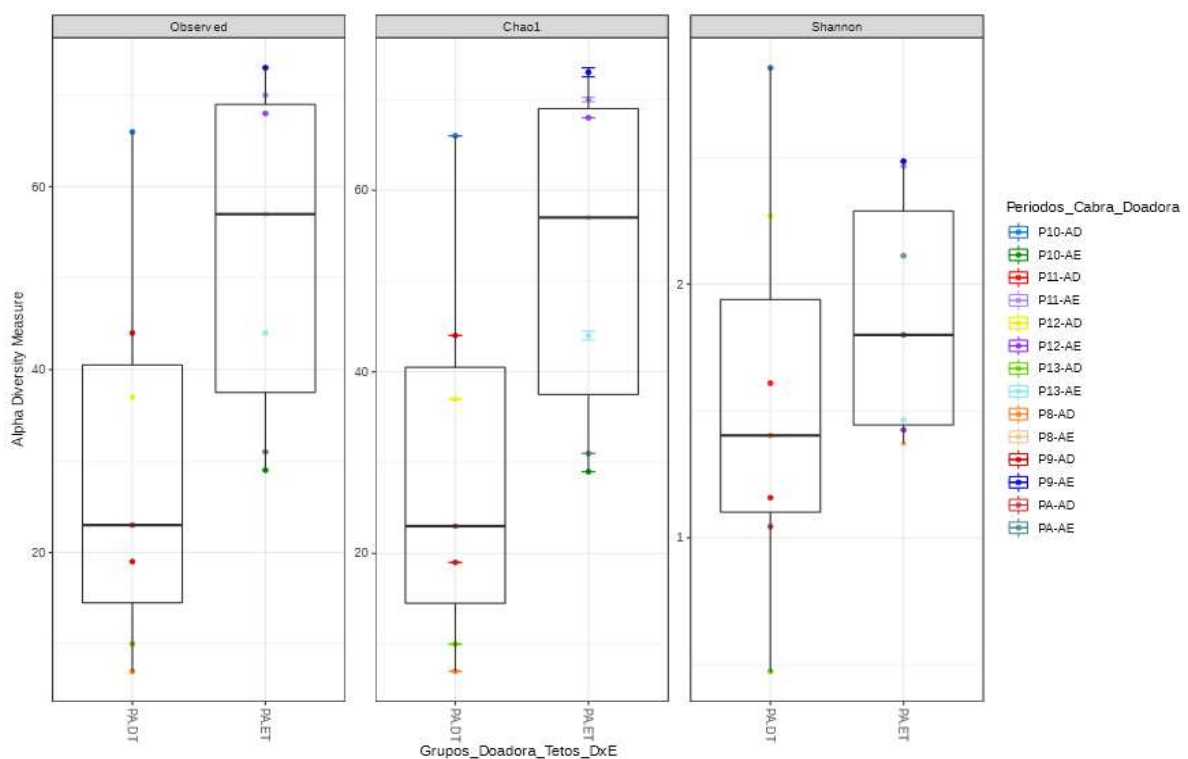


2.6. Alfa diversidade da microbiota do leite de ambos os lados do úbere da cabra doadora de microbiota

A figura 10 apresenta a diversidade e riqueza do leite da cabra doadora de microbiota (A) por meio de índices. O gráfico demonstra que ocorreu uma alta variabilidade de riqueza observada e de diversidade da cabra doadora ao longo da fase de transplante. O úbere esquerdo da cabra doadora apresentou uma maior riqueza e diversidade, assim como notado nos gráficos anteriores. Em P8 o úbere do lado direito apresentou os menores valores de riqueza e maiores em P10, e a diversidade foi menor em P13 e maior em P10. Por outro lado, o úbere do lado esquerdo apresentou a menor riqueza em P10 e maior em P9, e a diversidade foi menor em P8

e maior em P9. Aparentemente as variabilidades dos índices foram em períodos diferentes para cada lado do úbere, mas cada lado do úbere apresentou diversidade e riqueza em maiores proporções em períodos semelhantes.

Figura 10 - Índices de diversidade alfa da microbiota do leite da cabra doadora de leite (A) subdividida entre úbere esquerdo (ET) e direito (DT), representados pelos índices de riqueza observada por ASVs, de riqueza Chao1, e o de diversidade por amostra com o índice de Shannon. Cada período e lado do úbere foi identificado com uma cor diferente ao lado da figura.

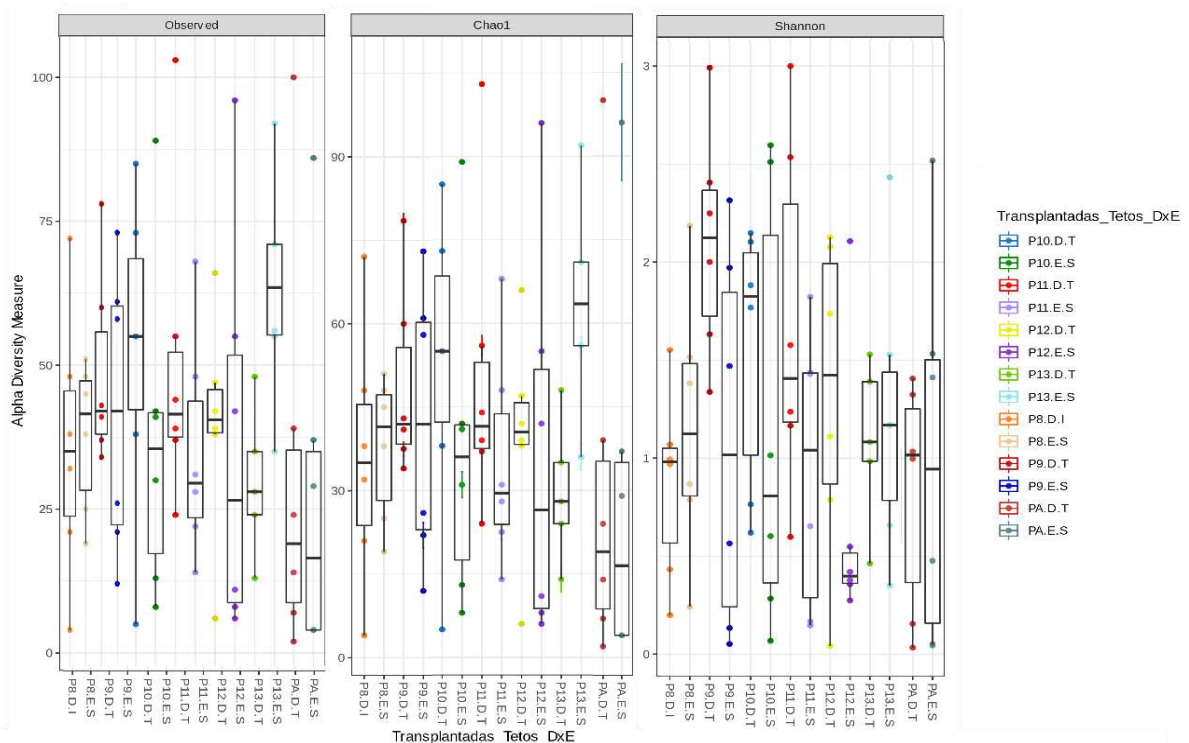


2.7. Alfa diversidade da microbiota do leite de ambos os lados do úbere das cabras infectadas

A figura 11 demonstra os índices de riqueza e diversidade dos animais transplantados por períodos em ordem crescente, desde P8 até o final em PA. Os índices de riqueza demonstraram um aumento até P10, seguido por aumentos e diminuições, até terminar com índices menores do que o inicial, ou seja, a microbiota dos animais transplantados perdeu espécies diferentes ou riqueza até o seu término. Aparentemente ocorreu uma grande variabilidade de riqueza desde o início do transplante e nos períodos finais, de resiliência, nos quais os animais tenderam a estabilizar a queda entre P13 e PA. Os índices de diversidade variaram muito desde o início do

processo de transplante, sendo que o final (PA) apresentou uma média parecida com a inicial (P8), mas PA terminou com uma variabilidade muito maior que P8, ou seja, a diversidade continuou parecida, porém mais instável.

Figura 11 - Índices de diversidade alfa da microbiota do leite dos animais transplantados (C, D, E, F, G e H) subdividida entre úbere do lado esquerdo sadio ou controle (E.S) e lado direito transplantado (D.T), representados pelos índices de riqueza observada por ASVs, de riqueza Chao1, e o de diversidade por amostra com o índice de Shannon. Cada período e lado do úbere foi identificado com uma cor diferente ao lado da figura.



3. DISCUSSÃO

O transplante de comunidades microbianas inteiras mostrou-se promissor no tratamento de doenças humanas, contudo o tratamento de disbioses do leite em úberes de mamíferos é desafiador, pois o sistema celular que envolve a produção de leite, defesa e desenvolvimento da glândula mamária durante a lactação, assim como a microbiota é complexa (BHATT et al., 2012; HOQUE et al., 2019; LI et al., 2018; MICHAEL AKERS, 2017; OIKONOMOU et al., 2014a; POLVEIRO et al., 2020b; RAINARD, 2017). Nosso estudo introduziu uma nova técnica de alteração da microbiota por meio do transplante de microrganismos em um ruminante por meio do leite de um animal sadio, diretamente para animais com mastite subclínica quando

induzida por *S. warneri*. Os dados revelam que essa técnica produziu diferentes efeitos sobre a produção de leite, contagem de células somáticas, assim como alterou diferentemente os padrões de série de células de defesa presentes na corrente sanguínea. Observamos a redução e quase completa eliminação do agente causador de mastite subclínica em grande parte dos animais, e interessante, a técnica conseguiu manter o agente patogênico *S. warneri* na microbiota de um dos animais induzidos a mastite e que se tornou sadio ao final do transplante, permitindo assim que o agente se tornasse indígena aquela microbiota anteriormente disbiótica.

A produção de leite por animais diagnosticados com mastite subclínica, nem sempre apresentaram resultados padrões, ainda mais quando aplicamos uma técnica de tratamento ainda não reproduzida por outros estudos, logo o aumento ou diminuição da produção de leite num curto período não poderia ser uma forma de avaliar a melhora ou piora no quadro. Diante disso, estudos conduzidos em caprinos focados no efeito de IMI com apenas um agente patogênico na produção leiteira em sistemas intensivos são controversos, pois demonstraram que a mastite pode ser associada a valores menores (LEITNER; MERIN; SILANIKOVE, 2004), semelhantes (MIN; TOMITA; HART, 2007; MORONI et al., 2005b) ou mesmo com um aumento na produção de leite em cabras doentes em comparação com as saudáveis (KOOP et al., 2012a). Além disso, observamos que a queda não foi repentina ao início do transplante, logo o que pode ter prejudicado a produção foi a intensa introdução de novos microrganismos, o que segundo WRZOSEK et al., (2018), a alta frequência no transplante pode prejudicar a estabilidade do ecossistema recém-formado ou em formação.

Durante o transplante era esperado que ocorresse uma queda nos valores de CCS e CTB, assim como a melhora de outros sinais clínicos, o que de fato ocorreu apenas para um animal, contudo, algumas espécies de SCN estão relacionadas ao aumento na CCS do leite como *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. lugdunensis*, *S. chromogenes* e *S. warneri* ao (DEINHOFER; PERNTHANER, 1995b). Destacamos que *S. simulans* estava presente em alta abundância no leite da cabra doadora, logo foi introduzida durante o transplante nos animais que foram transplantados. Além do mais, esperávamos um intenso quadro inflamatório com a introdução de uma gama de 5.271 táxons contra os outros que existiam na glândula mamária. Além disso, não seria algo altamente receptivo para o sistema de defesa da glândula mamária, uma vez que além dos microrganismos pré-existentes, a cabra doadora também detinha diferentes tipos de células que poderiam ser encontradas no leite, as quais incluem leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos), linfócitos, eosinófilos, macrófagos, células epiteliais e outras (SOUZA et al., 2012b). Os valores de CTB podem não ter apresentado diferença significativa, mas apresentaram alta contagem, o que poderia ter ocorrido pela introdução de uma alta carga de

novas bactérias e outros microrganismos provenientes do animal doador, criando um ambiente altamente competitivo em que alguns microrganismos poderiam se multiplicar em decorrência dessa mudança ecológica.

Dentre as principais bactérias encontradas no leite do animal doador de microbiota, destacamos que *S. capitis* é geralmente identificada em cabras diagnosticados com mastite subclínica (BERNIER GOSELIN et al., 2019; CONTRERAS et al., 2007) e outros ruminantes com mastite (CONDAS et al., 2017a; FESSLER et al., 2010; PIZAURO et al., 2021). O gênero *Escherichia* sp., comumente está associada a casos de mastites clínicas e gangrenosa em cabras (POLVEIRO et al., 2020b; RIBEIRO et al., 2007), e outras mastites em ruminantes (GANDA et al., 2017; KACZOROWSKI et al., 2022), mas também está presente em microbiota de cabras (ZHANG et al., 2017a) e ovelhas saudáveis (ESTEBAN-BLANCO et al., 2020), assim como encontramos nesse estudo. Diante disso, embora a disbiose da microbiota em geral possa se correlacionar com a doença infecciosa, as assinaturas taxonômicas microbianas para infecções específicas nem sempre podem ser um indicador confiável da doença (MA; LI; GOTELLI, 2019).

Dentre as outras espécies encontradas no doador de microbiota, *Alkalibacterium olivapovliticus* tem sido relacionado a produtos lácteos como queijos (ISHIKAWA et al., 2007) e águas de azeitonas (NTOUGIAS; RUSSELL, 2001), logo sua identificação em leite caprino nesse estudo foi a primeira. *Acinetobacter guillouiae* é uma bactéria que já foi isolada em leite de cabras (DE PAIVA ANCIENS RAMOS; DOS SANTOS NASCIMENTO, 2019) e vacas (WEBER et al., 2014), mas comumente está associada a contaminações do leite. *B. neonati* é uma espécie que foi isolado primeiramente de amostras de fezes de neonatos prematuros, mas carece de estudos recentes e essa é primeira vez que é detectado em amostras de leite (CASSIR et al., 2014). Bactérias anaeróbicas no leite como *B. neonati*, tem sido associada a uma via endógena de rota enteromamária (MA et al., 2018; OIKONOMOU et al., 2020) que comunica a microbiota intestinal com a do leite no úbere.

Os úberes dos animais transplantados alteraram a microbiota com a modificação da estrutura ecológica ao longo dos períodos analisados desde o início do processo de transplante, com transformações na microbiota que levaram ao aumento de abundância de microrganismos que estavam presentes ou não, na microbiota do animal doador. As diferenças de microrganismos entre os úberes do animal sadio e até nos úberes controles, demonstraram a dificuldade de padronizar os transplantes de forma que encontremos os mesmos táxons entre doador e transplantado. Segundo FLORES et al., (2014), as composições da comunidade microbiana saudável podem diferir entre indivíduos e grupos populacionais e dentro do mesmo

indivíduo ao longo do tempo. Consequentemente, nem sempre é possível estabelecer como é uma microbiota disbiótica “típica” durante uma doença infecciosa, logo os táxons encontrados nos transplantados não nos dizem muita coisa.

A introdução de novos microrganismos ou espécies em geral em um nicho aparenta ser um processo desafiador. Um estudo recente relacionado a apicultura demonstrou como as perturbações precoces da microbiota podem ter consequências negativas sustentadas no hospedeiro e aumentar a suscetibilidade a patógenos dentro de uma população (SCHWARZ; MORAN; EVANS, 2016). SCHWARZ et al., (2016) administraram a espécie comensal *Snodgrassella alvi* em abelhas operárias recém-emergidas como uma terapia probiótica potencial para proteger contra o parasita *Lotmaria passim*. No entanto, apesar de *S. alvi* fazer parte da microbiota indígena das abelhas, a inoculação desta espécie sozinha em hospedeiros jovens levou à perturbação da microbiota, possivelmente reduzindo os benefícios protetores normalmente conferidos e, finalmente, aumentando a suscetibilidade ao parasita (SCHWARZ; MORAN; EVANS, 2016; STEVENS; BATES; KING, 2021a).

Alguns animais apresentaram a diminuição constante do agente inoculado devido a resposta a própria infecção durante o transplante, algo esperado naturalmente após uma resposta imunológica normal, mas também pode ter ocorrido porque a nova microbiota pode ter estimulado a resposta imune do hospedeiro, alterando sua suscetibilidade a patógenos invasores (STEVENS; BATES; KING, 2021b). Diante disso, a infectividade do patógeno pode ser indiretamente reduzida pela microbiota do hospedeiro, conforme observamos em um único animal que se tornou clinicamente sadio ao final do transplante (CLARKE et al., 2010; GARCÍA-BAYONA; COMSTOCK, 2018; KWONG; MANCENIDO; MORAN, 2017; MUHAMMAD et al., 2019a, 2019b, 2019c; OGAWA et al., 2001). Logo, o transplante de microbiota do leite demonstrou que pode desencadear diferentes respostas, como na redução, eliminação dos agentes e uma adaptação responsiva com a possível redução da infectividade do patógeno, o tornando um novo microrganismo indígena aquela microbiota transplantada. Ademais, alguns microrganismos considerados patogênicos, podem ser comensais ou indígenas em determinadas microbiotas, logo, a proteção mediada por microbioma pode conduzir a evolução do aumento (MCNALLY; VALE; BROWN, 2015) e diminuição (FORD et al., 2016) da virulência do patógeno.

O hospedeiro e sua microbiota podem possuir uma relação de troca de benefícios, assim como ocorre no rúmen (FRANCO-LOPEZ et al., 2020) e no intestino de humanos (VALDES et al., 2018) e animais (XU et al., 2021b). A diminuição da saúde do hospedeiro pode remover os serviços benéficos que a microbiota normalmente fornece, ou seja, mudanças na saúde do

hospedeiro podem se correlacionar com a disbiose da microbiota do hospedeiro (BOUTIN et al., 2013; MCMURTRY et al., 2015; ZENG et al., 2018), e os microrganismos oportunistas da microbiota podem fazer a transição para se tornarem prejudiciais entre períodos da perturbação (MARTINEZ et al., 2015; TENA et al., 2014; TOVAGLIERI et al., 2019; ZENG et al., 2018), assim como observamos no animal que apresentou quadro grave de mastite. Essa perturbação e transição de comensais para a patogenicidade pode, às vezes, ser causada por patógenos invasores (BRODERICK; RAFFA; HANDELSMAN, 2006; WEI et al., 2017). Além disso, os microrganismos protetores podem tornar-se relativamente “caros” para o hospedeiro na ausência dos patógenos invasores que, de outra forma, suprimiriam (CHROSTEK et al., 2013; MARTINEZ et al., 2015; VORBURGER; GOUSKOV, 2011), ou seja, a mesma espécie microbiana é protetora em um contexto, mas cara em outro (STEVENS; BATES; KING, 2021a).

Segundo MCNALLY et al., (2015), a manipulação da microbiota pode gerar um maior desafio entre competidores comensais e aumentar a intensidade da “guerra bacteriana”. Usando essa teoria, eles descobriram que uma competição mais forte selecionava o aumento da expressão de armas patogênicas (fatores de virulência). A produção aumentada de fatores de virulência por muitas bactérias patogênicas pode conseqüentemente prejudicar o hospedeiro. Por exemplo, a liberação de fago que codifica a toxina Shiga por *E. coli* shigatoxinagênica (GAMAGE et al., 2004), e similarmente TcdA liberado por *Clostridioides difficile*, podem dizimar os comensais diretamente por meio da provocação da inflamação do hospedeiro (LIMA et al., 1988; RODEMANN et al., 2007).

A microbiota dos animais transplantados perdeu espécies diferentes ou riqueza, no entanto, uma comunidade de microbiota saudável geralmente demonstra alta diversidade taxonômica, alta riqueza de genes microbianos e microbiota central estável (FAN; PEDERSEN, 2021). POLVEIRO et al., (2020b) relataram que até mesmo o leite de caprinos saudáveis pode ter sua microbiota reduzida, diante disso, deve-se notar que a distribuição relativa dos microrganismos é única entre os indivíduos e pode sofrer variações (HOU et al., 2022).

Portanto, reduzimos e até eliminamos o agente *S. warneri* causador de mastite subclínica no leite de alguns animais, e a técnica ainda permitiu tornar o agente patogênico *S. warneri*, no animal que se tornou sadio ao final do transplante, permanentemente indígena aquela microbiota anteriormente disbiótica, sem causar sintomas de mastite. Além disso, denotamos uma diferença interessante entre microbiota desejada proveniente do doador e a qual nos deparamos após o transplante. Ademais, microbiota do doador demonstrou uma característica intrigante de bactérias até então consideradas patogênicas pela literatura, mas que não causam doença em determinados animais. Logo, a técnica aparentemente deve ser utilizada por um

tempo menor, pois isso poderia reduzir o risco de diminuição da produção de leite, de alterações de valores importantes como de CCS, CMT, CBT e do leucograma. Assim, o transplante de microbiota do leite demonstrou ser uma técnica interessante, que se aprimorada, poderia se tornar uma nova ferramenta de tratamento da mastite futuramente. Contudo, novos estudos devem ser realizados aprimorando a técnica e de identificação do animal doador de leite, determinando previamente uma microbiota ideal para o transplante, além de possivelmente promover uma eliminação da microbiota pré-existente do transplantado para realizar uma nova colonização limpa e sem interferência da microbiota residente.

4. MATERIAL SUPLEMENTAR

Quadro S1 – Exames de hemograma e bioquímicos das cabras na fase de transplante e da cabra doadora de microbiota (Cabra A).

P8	ID	Hemácias	Hemoglobina	Hematócrito	VCM	CHCM	Leucócitos	Neutrófilos	Bastonetes	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos	Basófilos	Total	Plaquetas	Proteína	Fibrinogênio
	A	17	11	32	19	35	8000	1840	0	6000	80	80	0	100	280000	7	0,4
	B	17	10	31	18	33	6000	2700	60	3120	120	0	0	100	220000	7,4	0,8
	C	16	10	28	18	35	4900	2107	0	2548	245	0	0	100	400000	7,2	0,4
	D	14	11	31	23	34	6000	1620	120	4020	180	60	0	100	550000	7,6	0,6
	E	13	11	34	26	34	8550	2651	342	5216	0	342	0	100	320000	7,2	0,4
	F	11	10	28	26	34	4750	2375	0	2328	48	0	0	100	500000	6,8	0,6
	G	15	13	39	26	34	4550	1820	0	2321	410	0	0	100	400000	7,6	0,4
	H	14	12	35	24	35	2700	945	0	1647	27	81	0	100	400000	7,2	0,6
P9	ID	Hemácias	Hemoglobina	Hematócrito	VCM	CHCM	Leucócitos	Neutrófilos	Bastonetes	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos	Basófilos	Total	Plaquetas	Proteína	Fibrinogênio
	A	18	11	30	17	35	5300	1060	0	4028	106	106	0	100	200000	6,6	0,4
	B	18	10	27	15	36	8200	3526	0	4100	574	0	0	100	270000	6,6	0,2
	C	16	10	29	18	35	5700	2508	0	3135	57	0	0	100	240000	7,2	0,2
	D	15	10	29	19	36	5500	2530	385	2365	220	0	0	100	300000	7,4	0,4
	E	16	11	31	19	36	13600	4760	0	6664	1224	952	0	100	300000	6,8	0,2
	F	12	9	25	20	37	5100	2346	0	2652	102	0	0	100	300000	6,6	0,4
	G	16	13	35	22	37	6900	1656	0	5244	0	0	0	100	200000	7,4	0,4
	H	15	12	33	22	36	3700	1517	0	2072	74	37	0	100	200000	7	0,2
P10	ID	Hemácias	Hemoglobina	Hematócrito	VCM	CHCM	Leucócitos	Neutrófilos	Bastonetes	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos	Basófilos	Total	Plaquetas	Proteína	Fibrinogênio
	A	18	11	31	18	35	7200	1728	0	5328	144	0	0	100	150000	6,8	0,2
	B	15	10	27	18	36	7000	3290	0	3430	210	70	0	100	220000	7	0,4
	C	13	10	28	21	36	4700	2068	94	2256	47	235	0	100	300000	7,2	0,4
	D	14	10	29	20	36	6900	2346	138	4071	138	207	0	100	500000	7,6	0,8
	E	13	11	30	23	35	13600	3264	1904	7752	272	408	0	100	260000	6,8	0,6
	F	12	10	27	22	35	3600	612	252	2628	108	0	0	100	300000	6,8	0,2
	G	17	13	38	23	35	7000	3990	0	2940	70	0	0	100	250000	7,8	0,4
	H	13	11	31	23	35	3600	1188	0	2340	36	36	0	100	420000	6,8	0,4
P11	ID	Hemácias	Hemoglobina	Hematócrito	VCM	CHCM	Leucócitos	Neutrófilos	Bastonetes	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos	Basófilos	Total	Plaquetas	Proteína	Fibrinogênio
	A	20	11	33	16	32	6200	1240	0	4774	186	0	0	100	300000	6,8	0,2
	B	18	10	30	16	33	7500	3300	0	3900	300	0	0	100	200000	7,4	0,2
	C	15	10	31	21	33	6350	2984,5	0	3302	63,5	0	0	100	270000	7,4	0,2
	D	15	10	31	20	32	6100	2440	61	3477	61	61	0	100	500000	7,4	0,4
	E	16	11	33	20	33	12600	4410	252	6048	378	1512	0	100	200000	7	0,2
	F	14	9	25	18	36	8300	1577	83	6142	498	0	0	100	350000	7	0,4
	G	16	13	41	26	32	7100	1704	426	4260	426	284	0	100	400000	8,2	0,4
	H	15	12	35	23	33	4200	1092	42	2772	294	0	0	100	200000	7,2	0,4
P12	ID	Hemácias	Hemoglobina	Hematócrito	VCM	CHCM	Leucócitos	Neutrófilos	Bastonetes	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos	Basófilos	Total	Plaquetas	Proteína	Fibrinogênio
	A	18	11	33	18	33	5700	1368	0	4161	114	57	0	100	200000	6,6	0,2
	B	13	11	29	22	37	4800	2160	0	2640	0	0	0	100	300000	7,2	0,4
	C	15	11	32	22	34	5900	2773	118	2891	59	59	0	100	260000	7,2	0,4
	D	13	10	31	23	33	6100	2074	0	3660	305	61	0	100	400000	7,6	0,6
	E	18	12	38	22	32	4500	450	360	3555	135	0	0	100	300000	7	0,6
	F	14	9	25	18	38	5500	1760	275	3245	220	0	0	100	350000	7,2	0,6
	G	17	14	37	21	37	6450	1355	65	4515	516	0	0	100	180000	7,8	0,6
	H	15	12	33	22	36	4150	1162	1162	1785	41,5	0	0	100	400000	6,8	0,4
P13	ID	Hemácias	Hemoglobina	Hematócrito	VCM	CHCM	Leucócitos	Neutrófilos	Bastonetes	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos	Basófilos	Total	Plaquetas	Proteína	Fibrinogênio
	A	16	11	30	19	37	7200	1944	0	4824	432	0	0	100	270000	6,8	0,2
	B	15	10	30	20	34	6350	2730,5	0	3556	63,5	0	0	100	350000	6,4	0,6
	C	13	11	31	24	34	4500	1980	0	2385	135	0	0	100	300000	7,2	0,2
	D	14	10	30	22	34	6200	3162	0	2728	248	62	0	100	270000	7,6	0,8
	E	16	13	38	24	33	3600	396	288	2196	432	288	0	100	200000	7,4	0,4
	F	13	10	29	23	35	3400	1122	102	2074	68	34	0	100	400000	7,6	0,8
	G	17	12	39	23	31	3450	1794	0	1587	35	35	0	100	200000	7,4	0,4
	H	13	11	34	26	31	4500	630	1260	2070	540	0	0	100	300000	7,2	0,2
PA	ID	Hemácias	Hemoglobina	Hematócrito	VCM	CHCM	Leucócitos	Neutrófilos	Bastonetes	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos	Basófilos	Total	Plaquetas	Proteína	Fibrinogênio
	A	16	10	32	20	31	7500	2400	0	5025	75	0	0	100	380000	6,6	0,2
	B	17	10	31	18	31	6100	2867	0	2989	183	61	0	100	400000	7,4	0,4
	C	14	10	31	22	32	5300	2332	0	2544	371	53	0	100	240000	7,4	0,4
	D	11	9	30	26	31	4200	2436	0	1470	294	0	0	100	350000	7,6	0,4
	E	16	12	40	25	29	7600	2812	152	4104	532	0	0	100	250000	7,6	0,6
	F	12	7	21	17	34	5100	2550	204	2193	153	0	0	100	450000	7,2	0,6
	G	16	13	47	29	28	6800	1904	748	3876	272	0	0	100	260000	8	1
	H	13	12	36	28	32	3700	1665	0	1961	37	37	0	100	300000	7,2	0,6

Fonte: Elaborado pelo autor.

Quadro S2 – Identificação de bactérias de leite de cabras por lactocultura em ágar cromogênico Accumast®, proveniente do lado direito do úbere na fase de transplante.

Períodos	Secção 1	Secção 2	Secção 3
Ae-P8	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
Ad-P8	N.D	N.D	N.D
Bd-P8	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
Cd-P8	N.D	N.D	N.D
Dd-P8	<i>Escherichia coli</i>	<i>Lactococcus</i> sp.	N.D
	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
	<i>Enterobacter</i> sp.	N.D	N.D
Ed-P8	<i>Pseudomonas</i> sp.	N.D	N.D
	<i>Enterobacter</i> sp.	N.D	N.D
	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
Fd-P8	<i>Pseudomonas</i> sp.	N.D	N.D
		N.D	N.D
Gd-P8	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Streptococcus agalactiae</i> .	N.D
	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Lactococcus</i> sp.	N.D
Hd-P8	<i>Pseudomonas</i> sp.	N.D	N.D
Ae-P10	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Streptococcus agalactiae</i> .	N.D
Ad-P10	N.D	N.D	N.D
Bd-P10	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
Cd-P10	<i>Escherichia coli</i>	N.D	N.D
Dd-P10	<i>Escherichia coli</i>	<i>Lactococcus</i> sp.	N.D
	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
Ed-P10	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Lactococcus</i> sp.	N.D
	<i>Enterobacter</i> sp.	N.D	N.D
Fd-P10	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Aerococcus</i> sp.	N.D
Gd-P10	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
Hd-P10	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
Ae-P11	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
Ad-P11	N.D	N.D	N.D
Bd-P11	<i>Levedura</i> sp.	N.D	N.D
Cd-P11	<i>Escherichia coli</i>	N.D	N.D
Dd-P11	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
	<i>Levedura</i> sp.	N.D	N.D
Ed-P11	<i>Escherichia coli</i>	N.D	N.D
	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
	<i>Pseudomonas</i> sp.	N.D	N.D
Fd-P11	<i>Pseudomonas</i> sp.	N.D	N.D
Gd-P11	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D

Hd-P11	<i>Escherichia coli</i>	N.D	N.D
Ae-P12	<i>Klebsiella sp.</i>	<i>Aerococcus sp.</i>	N.D
		<i>Lactococcus sp.</i>	N.D
Ad-P12	N.D	N.D	N.D
Bd-P12	<i>Klebsiella sp.</i>	N.D	N.D
Cd-P12	<i>Escherichia coli</i>	N.D	N.D
Dd-P12	<i>Klebsiella sp.</i>	N.D	N.D
	<i>Levedura sp.</i>	N.D	N.D
Ed-P12	<i>Enterobacter sp.</i>	<i>Aerococcus sp.</i>	<i>Staphylococcus aureus.</i>
		<i>Lactococcus sp.</i>	N.D
Fd-P12	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Streptococcus agalactiae.</i>	N.D
Gd-P12	<i>Klebsiella sp.</i>	<i>Aerococcus sp.</i>	N.D
Hd-P12	<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus agalactiae.</i>	N.D
Ae-Pca	<i>Klebsiella sp.</i>	<i>Streptococcus dysagalactiae.</i>	N.D
Ad-Pca	N.D	N.D	N.D
Bd-Pca	<i>Klebsiella sp.</i>	<i>Aerococcus sp.</i>	N.D
		<i>Lactococcus sp.</i>	N.D
Cd-Pca	<i>Escherichia coli</i>	N.D	N.D
Dd-Pca	<i>Klebsiella sp.</i>	<i>Streptococcus agalactiae.</i>	N.D
	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Colônia desconhecida.</i>	N.D
		<i>Lactococcus sp.</i>	N.D
Ed-Pca	<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus agalactiae.</i>	<i>Staphylococcus aureus.</i>
		<i>Aerococcus viridans.</i>	N.D
Fd-Pca	<i>Klebsiella sp.</i>	N.D	N.D
Gd-Pca	<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	N.D
	<i>Pseudomonas sp.</i>	N.D	N.D
Hd-Pca	<i>Klebsiella sp.</i>	N.D	N.D
	<i>Pseudomonas sp.</i>	N.D	N.D

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura S1 - **Composição da microbiota bacteriana absoluta dos 25 táxons mais abundantes ao longo da fase de transplante do animal doador de microbiota ao nível de gênero e espécies.** As abundâncias dos gêneros e espécies foram distribuídas em números absolutos de ASVs das amostras do animal doador de leite para cada período na fase de transplante, sendo que cada cor corresponde a uma espécie diferente e seu respectivo gênero. A letra D ao final da nomenclatura da amostra corresponde ao úbere direito e a letra E ao esquerdo.

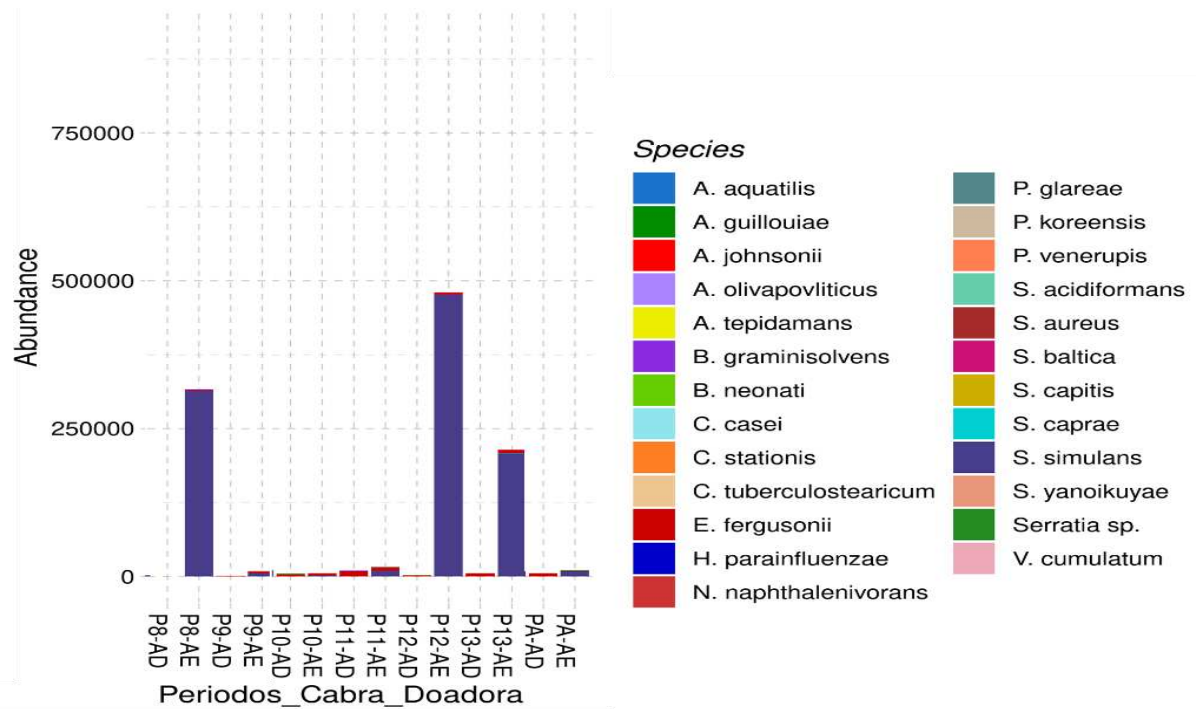
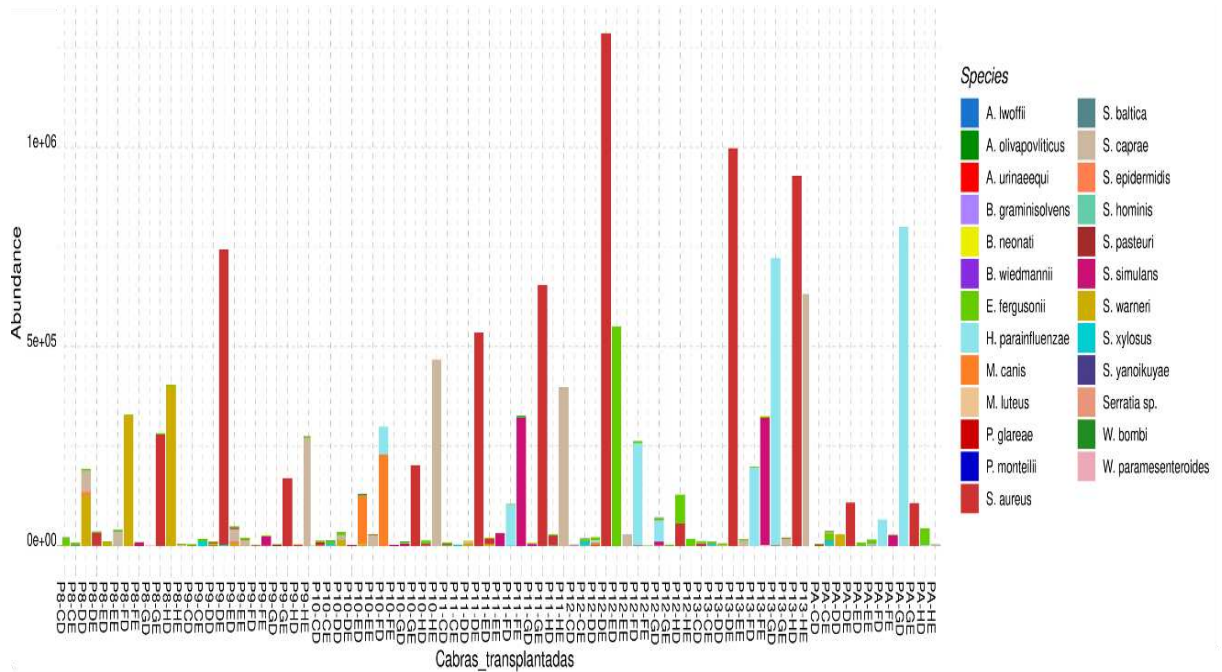


Figura S2 - **Composição da microbiota bacteriana absoluta das cabras transplantadas ao nível de gêneros e espécies dos 25 táxons mais abundantes.** As abundâncias dos gêneros e espécies foram distribuídas em números absolutos de ASVs da amostra para cada período na fase de transplante, sendo que cada cor corresponde a uma espécie diferente e seu respectivo gênero. A letra D ao final da nomenclatura da amostra corresponde ao úbere do lado direito e a letra E ao esquerdo.



Capítulo 3 – Análise da microbiota bacteriana de animais infectados com *S. warneri* e posteriormente tratados com o transplante experimental de microbiota do leite.

1. INTRODUÇÃO

A produção de leite de cabra vem crescendo de forma constante nos últimos 20 anos devido ao reconhecimento dos valores nutricionais e propriedades nutracêuticas (KUMAR et al., 2016). Pequenos, médios e grandes produtores de leite caprino, que criam esses animais para subsistência ou mercado, enfrentam um desafio antigo e constante na produção de leite, que é a mastite. Esta é uma doença que reduz a produção e qualidade do leite, aumenta os custos com o tratamento e interfere diretamente no bem-estar animal, podendo determinar o descarte precoce devido à destruição parcial ou total do tecido da glândula mamária. A definição de mastite ou infecção intramamária (IMI) é a inflamação da glândula mamária causada por um ou mais agentes (MENZIES; RAMANOON, 2001a; SAR et al., 2018).

A mastite em caprinos pode ocorrer como resultado de algum distúrbio fisiológico, trauma no úbere ou um agente patogênico específico, principalmente bacteriano (BERGONIER et al., 2003). Desse modo, a mastite é uma das principais doenças que causa problemas em animais leiteiros no mundo, sendo a infecção primária e mais onerosa para produtores das cabras leiteiras (CLARK; MORA GARCÍA, 2017b). Vários patógenos bacterianos podem causar IMI, mas *Staphylococcus* spp. são os microrganismos causais mais frequentemente diagnosticados em caprinos e ovinos (CONTRERAS et al., 2007). Outros patógenos, como *Streptococcus* spp., da família *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mannheimia haemolytica*, *Corynebacterium* spp. e fungos, podem produzir IMI em pequenos ruminantes, embora com menores taxas de ocorrência. A alta diversidade de microrganismos, principalmente de bactérias causadoras de IMI, dificulta o tratamento e o controle na medicina humana e veterinária (CONTRERAS et al., 2007; WHITE; HINCKLEY, 1999).

Os agentes envolvidos na mastite podem ser estudados por técnicas rotineiras de laboratório, como de biologia molecular, no entanto, outra forma mais recente de abordar as IMI, são os estudos de microbiomas do leite de cabras (MCINNIS et al., 2015b; POLVEIRO et al., 2020a; ZHANG et al., 2017b) e leite de vacas (ADDIS et al., 2016a; BONSAGLIA et al., 2017b; OIKONOMOU et al., 2014b). A microbiota é geralmente definida como o conjunto de microrganismos vivos presentes em um ambiente definido (MARCHESI; RAVEL, 2015), como a comunidade bacteriana do leite. Atualmente a disbiose da microbiota do leite no úbere tem se destacado como causa da mastite (POLVEIRO et al., 2020b). Esses estudos em diversas situações têm demonstrado a complexidade das interações de patógenos e comensais presentes em situações de adoecimento ou não do animal. As doenças podem ser consequência de uma soma de muitas variáveis complexas que interagem e que podem ir além da mera interação entre hospedeiro, patógeno e ambiente, como conhecemos (HEDRICK, 1998). As análises de ômicas

do leite têm desvendado novas variáveis para compreensão dos diferentes tipos de mastite. Essa nova abordagem de pesquisa permitiu a reconstrução de sistemas que compreendem essa doença infecciosa (ECKHARDT et al., 2020b; GARIRA, 2019b).

Além disso, outro problema do setor de produção de leite é o crescente número de microrganismos que não respondem aos atuais protocolos de tratamento de IMI, principalmente por bactérias resistentes a antibióticos (AMR). O surgimento e disseminação da AMR entre os animais e produtos direcionados a alimentação humana, decorrentes principalmente dos animais produtores de leite, podem ser devido a inúmeros fatores, tais como: condições socioeconômicas do país produtor; a estratégia inadequada na terapêutica e prevenção de doenças; acesso a medicamentos de má qualidade; informações técnicas inadequadas fornecidas aos produtores por profissionais não veterinários; baixa escolaridade e falta de conscientização dos produtores (ELIZABETH PISANI, 2015; IBRAHIM et al., 2020; MALIK; BHATTACHARYYA, 2019).

Diante disso, novas abordagens para contornar os problemas no tratamento das mastites têm sido testadas (SHARUN et al., 2021), no entanto, os transplantes da microbiota do leite em ruminantes para contornar a disbiose ainda não foi testada. O transplante de microbiota do leite em casos de IMI tem sido explorado com intuito de retornar o equilíbrio de microrganismos no úbere, rompendo assim com o estado de disbiose da glândula mamaria ocasionado pela infecção (HU et al., 2020; MA et al., 2018), mas ainda são modelos estipulados em monogástricos. Por outro lado, os transplantes de microbiota fecal (FMT) são atualmente utilizados para tratar com sucesso a infecção recorrente por *Clostridium difficile* em humanos (KELLY et al., 2016). Também estão surgindo evidências de efeitos extra intestinais e sistêmicos da reposição da microbiota intestinal (CRYAN; O'MAHONY, 2011) incluindo depressão (KUROKAWA et al., 2018), obesidade (LEE; YACYSHYN; YACYSHYN, 2019), hipertensão (LI et al., 2017) e distúrbios autoimunes (ROSSER; MAURI, 2016). A FMT pode ajustar significativamente a riqueza de espécies intestinais e restaurar a proporção de bactérias anti-inflamatórias e, portanto, está sendo cada vez mais considerado como um possível tratamento de síndromes e infecções persistentes (XU et al., 2021a).

Assim, o objetivo do estudo foi de comparar as microbiotas bacterianas do leite da cabra doadora, juntamente com a microbiota da indução da infecção e dos animais ao longo do transplante, com técnicas de diagnóstico padrão de mastite, sequenciamento de alto rendimento do gene 16S rRNA, a fim de identificar se ocorreram alterações a nível bacteriano que pudesse sugerir que a técnica de transplante de microbiota possa ser condicionada nesse tipo de doença como tratamento.

2. RESULTADOS

2.1. Produção de leite, Contagem de células somáticas (CCS), Contagem bacteriana total (CBT) e *Califórnia mastitis test* (CMT)

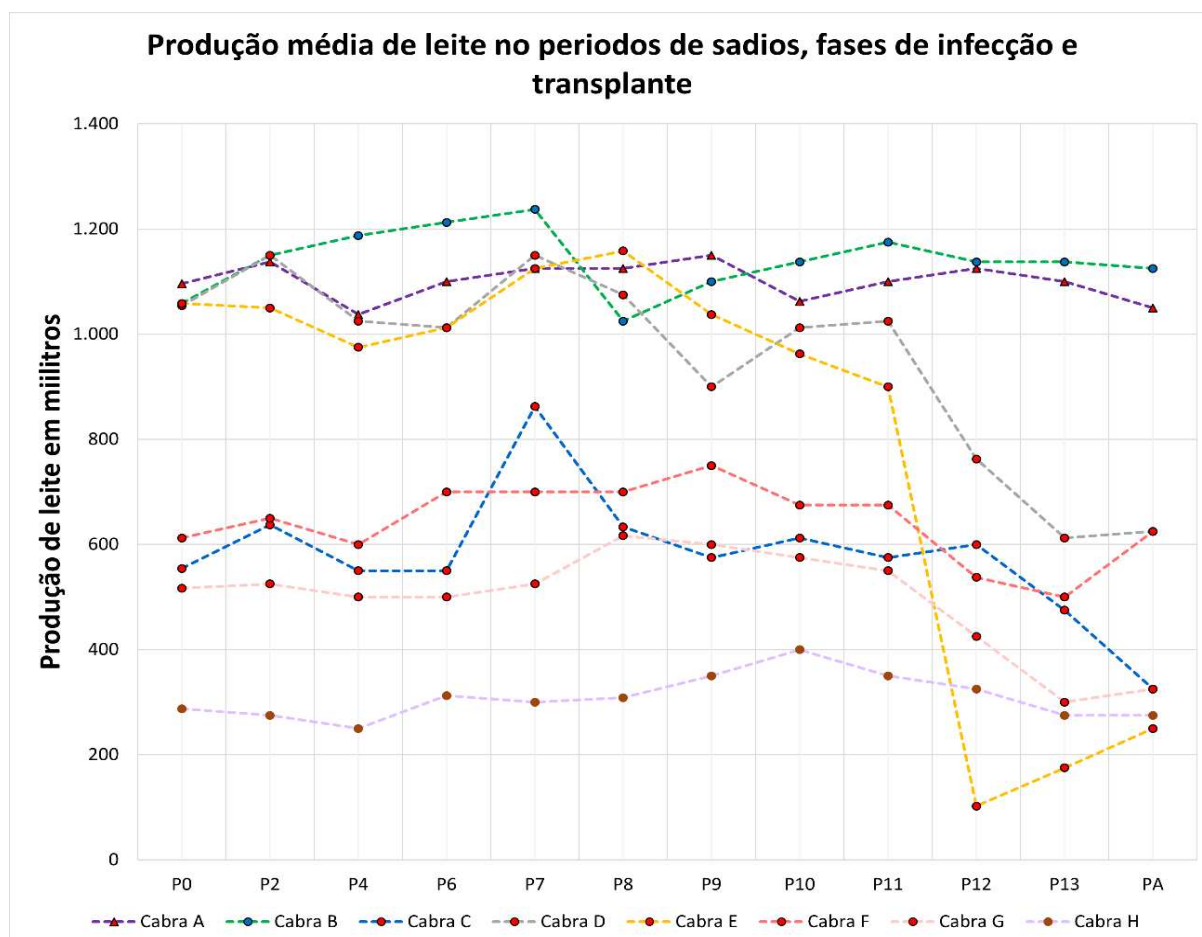
A figura 1 remete às produções médias de leite dos animais durante todos as fases e períodos avaliados, sendo P0 como sadios, P2 até P8, induzidos a mastite, P9 até PA correspondente ao transplante. De forma geral, a indução da mastite subclínica com o agente *S. warneri* resultou em pequenas quedas na produção de leite em P2. A cabra A, doadora de leite, manteve uma produção constante de leite durante todo o experimento, e a cabra B, controle externo, apresentou uma queda na produção de leite (17% em relação a P7) mais proeminente no período P8, devido a alguma variação comportamental ou ambiental, ou por causas não determinadas, já que em P7 não foi realizado nenhum procedimento diferente. O mesmo padrão de produção de leite foi apresentado pelas cabras C e D. Em quase todos os animais transplantados, foi visualizada uma queda de produção de leite entre os períodos P9 e P13 (queda geral de 30%), mais precisamente em P11, tendo apenas a cabra D uma variação de aumento (13% em relação de P9 a P11) entre esses períodos. O transplante de microbiota que se iniciou de fato no período P9, demonstrou reduzir a produção de leite durante a aplicação da técnica, e após o último transplante em P12, os animais começaram a retomar a produção de leite.

Antes mesmo do início do transplante, em P9, a cabra E apresentou queda na produção de leite, e foi diagnosticada clinicamente, entre P10 e P11, com mastite clínica grave. A resposta esperada de recuperação da mastite foi lenta após esse episódio, mas constante, com aumento leve de produção em períodos subsequentes, uma vez que ela recebeu uma dose do medicamento anti-inflamatório Flunixinina Meglumine de forma subcutânea na dose de 2mg/kg entre os períodos P11 e P12.

Figura 1 - Produção média de leite no período de sadios e nas fases de indução a infecção e transplante, juntamente com dados da cabra doadora de leite. A produção de leite dos animais do úbere no lado esquerdo e direito somados foram distribuídos em médias em mililitros produzidos por período estudado. Cada cor nas linhas do gráfico, compreende um animal experimental. As cabras C, D, E, F, G e H em outras cores foram os animais induzidos a mastite subclínica previamente com *S. warneri* e após transplantados. A cabra A, doadora, está representada pela linha tracejada roxa escuro com marcação triangular. A cabra B, controle

externo, esta demarcada com linhas verde e marcação de ponto como círculo em azul. Os períodos compreendem desde o estado clinicamente sadios até o período final de transplante.

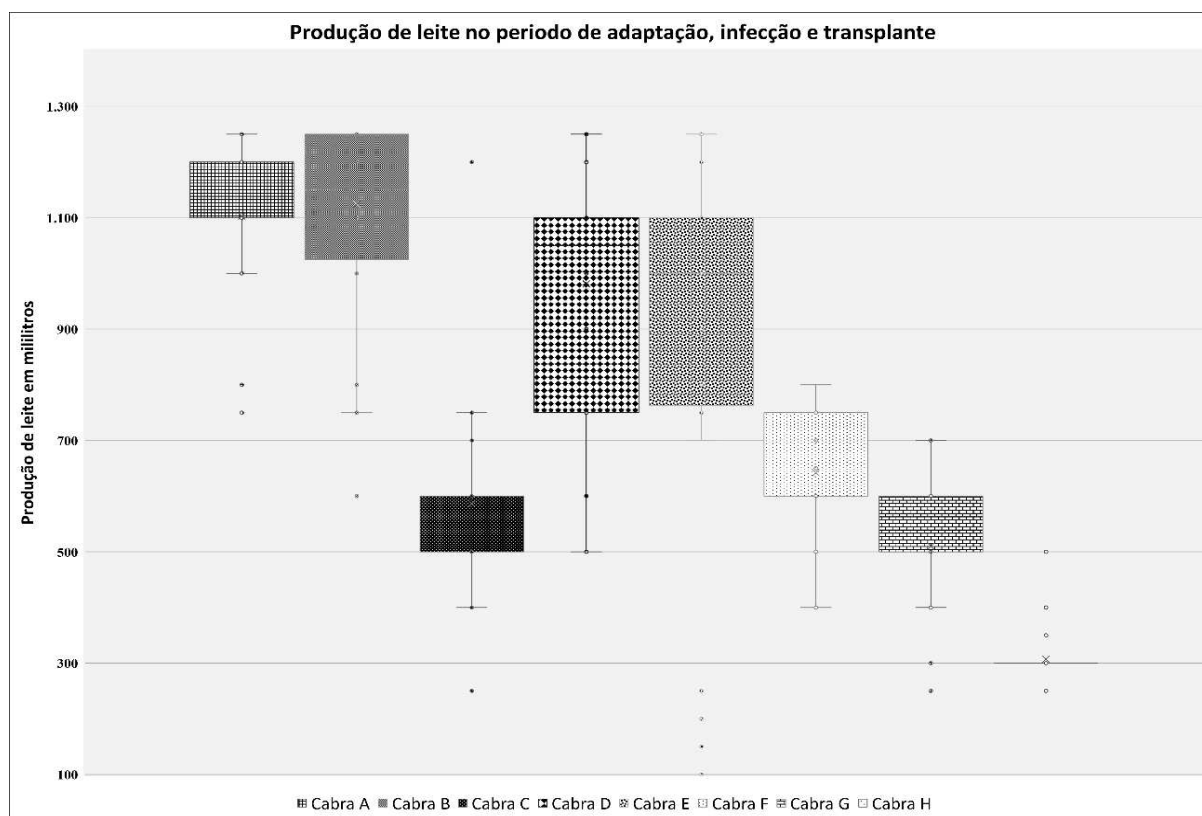
A figura 2 abaixo, demonstra a variação na produção de leite dos animais durante todos os períodos e fases experimentais. A cabra A, doadora, foi o animal que apresentou a maior



produção de leite durante todo o experimento, e menor variação, o que a coloca dentro do seu principal papel que era a doação de leite como animal sadio. A menor variação foi cabra H, a qual apresentou em todo o experimento, mesmo durante a fase de infecção, pouca mudança na pequena produção de leite. O interessante desse tipo gráfico, é que podemos observar que a produção de leite do animal D chegou a superar as variações da cabra E, que apresentou uma mastite clínica grave. As cabras F, G e C apresentaram pouca variação na produção de leite durante todas as fases e períodos experimentais.

Figura 2 - Boxplot da variação de produção de leite das cabras no período sadio (P0) e nas fases de infecção e transplantados. A variação da produção de leite dos animais somando-se os úberes no lado esquerdo e direito distribuídos em mililitros de leite por animal. Cada cor e ranhura nas linhas do gráfico, compreende um animal experimental somando todos os períodos

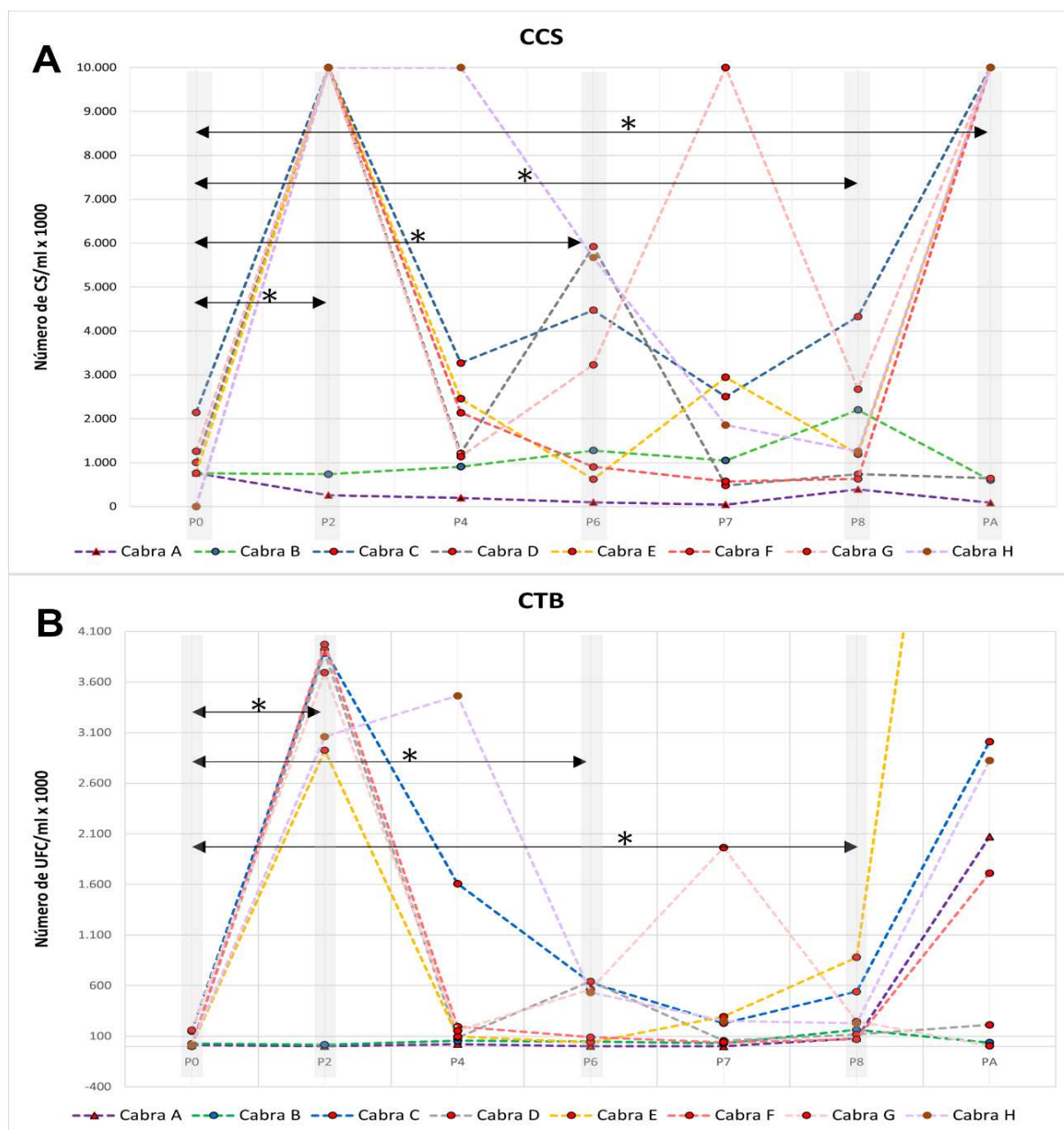
elencados. A cabra A, primeira a esquerda do gráfico representa o animal doador de leite no transplante de microbiota, cabra B foi o animal mantido como controle externo, sem infecção, e as cabras C, D, E, F, G e H, em outras cores e ranhuras, foram os animais induzidos a mastite subclínica e após transplantados a microbiota.



A figura 3 relaciona os dados de CCS e CBT do período sadio dos animais, as fases de indução da infecção e transplante da microbiota. De acordo com o que foi demonstrado nos dados das cabras em P2 (C, D, E, F, G e H), ocorreu um aumento abrupto do número de contagem de CCS e CBT, devido a inoculação do agente *S. warneri*, e as cabras A e B mantiveram os baixos níveis. Esses resultados eram esperados com a infecção subclínica e logo após P2, ocorreram variações na contagem de CCS, principalmente relacionados as cabras G e H. Após o período P8, ocorreram os transplantes de microbiota, e isso proporcionou o aumento das CCS para quase todos os animais, menos para cabra transplantada D, a cabra doadora A e a cabra B, controle externo. Para as variações de CTB, apenas a cabra G teve uma variação atípica no período P7, assim como no CCS, devido algum fator não identificado, como uma pequena alteração no equilíbrio da microbiota do úbere. Após o transplante de microbiota, apenas a cabra D, não teve aumento de CTB. Os dados demonstraram que a cabra D, respondeu

diferentemente das outras para o transplante, tendo os valores mantidos, assim como a cabra B controle e doadora de leite, cabra A.

Figura 3 - Contagem de células somáticas (CCS) e contagem de bacteriana total (CBT) nas fases de infecção experimental, transplante e o período sadio dos animais no lado direito dos úberes. A figura 3A apresenta a contagem de número de células somáticas de cada cabra no período de sadio (P0) e nos respectivos períodos referentes à fase de infecção (P2, P4, P6, P7, P8) pelo agente *S. warneri* e o último período relacionado ao transplante de microbiota (PA). Cada cor de linha representa uma cabra diferente. A contagem exibida deve ter sua escala multiplicada por 10^3 para alcançar os valores reais de contagem. A figura 3B representa a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) para cada um dos animais em seus respectivos períodos, assim como os argumentos escalares. As cabras A e B tem marcadores de pontos diferentes.



A tabela 1 indica os valores de CMT medidos durante todo o experimento. Os animais A e B, doadora e controle externo, respectivamente, não apresentaram mudanças além de 1+ cruz no transcorrer das fases estudadas. Analisando a fase de indução a infecção, a cabra F também não indicou por esse teste sinal de mastite nos períodos analisados. Lembrando que apenas o lado direito do úbere passou por transplante. Contudo, os outros animais inoculados apresentaram 2+ ou 3+ como sinal de mastite. Levando em consideração que os seguintes valores foram considerados como indicadores da doença: SCC: $>1 \times 10^6$ CS/ml e/ou CMT: $\geq 2+$, apenas a cabra F poderia ser considerada não mastítica ao final do período analisado, e a cabra D ainda poderia ser considerada mastítica devido ao teste de CMT 3+, mesmo demonstrando um baixo valor de CCS.

Na fase de transplante, apenas o animal de letra D apresentou melhora no exame de CMT, variando de 3+ para 0 cruz, por outro lado, a cabra C apresentou manutenção de 2+, e os outros animais transplantados praticamente apresentaram aumento no número de cruces. Tendo em consideração que os seguintes valores foram considerados como indicadores da doença: SCC: $>1 \times 10^6$ CS/ml e/ou CMT: $\geq 2+$, apenas o animal de letra D pode ser considerado não mastítico ao final do transplante. Interessantemente, durante a fase de infecção, os animais F, G e H tiveram aumentaram o número de cruces avaliadas no teste de CMT, e na fase de transplante ocorreu uma pequena queda no número de cruces avaliadas.

Nos testes realizados para o CCS dentro dos mesmos padrões anteriores, indicaram diferenças entre P0-P2 ($P < 0.001$), P0-P6 ($P < 0.05$), P0-P8 ($P < 0.01$) e P0-PA ($P < 0.01$). Os testes estatísticos realizados para CTB demonstraram que ocorreram diferenças entre os períodos P0-P2 ($P < 0.001$), P0-P6 ($P < 0.01$) e P0-P8 ($P < 0.05$). Esses resultados reforçam a significância do que foi visualizado nos gráficos anteriores, indicando alterações proeminentes estabelecidas nesses úberes após a indução a infecção por *S. warneri*, e indicam que existe diferença entre a fase final do transplante (PA) e entre o período de sadio (P0) em relação ao número de CS/ml.

Tabela 1 - *California Mastitis Test* (CMT) das cabras no período sadio (P0), e nos períodos referentes as fases de indução de infecção e de transplante de microbiota.

Período	Identificação	Úbere Esquerdo	Úbere Direito
P0	Cabra A	0 Cruz	0 Cruz
P0	Cabra B	0 Cruz	0 Cruz
P0	Cabra C	0 Cruz	0 Cruz
P0	Cabra D	Traço	0 Cruz
P0	Cabra E	0 Cruz	0 Cruz
P0	Cabra F	Traço	0 Cruz
P0	Cabra G	1 Cruz	0 Cruz
P0	Cabra H	1 Cruz	Traço
P5	Cabra A	1 Cruz	0 Cruz
P5	Cabra B	1 Cruz	0 Cruz
P5	Cabra C	0 Cruz	2 Cruzes
P5	Cabra D	1 Cruz	2 Cruzes
P5	Cabra E	0 Cruz	2 Cruzes
P5	Cabra F	2 Cruzes	1 Cruz
P5	Cabra G	3 Cruzes	1 Cruz

P5	Cabra H	3 Cruzes	1-2 Cruzes
P8	Cabra A	0-1 Cruz	0 Cruz
P8	Cabra B	1 Cruz	0 Cruz
P8	Cabra C	0 Cruz	2 Cruzes
P8	Cabra D	0 Cruz	3 Cruzes
P8	Cabra E	1 Cruz	2 Cruzes
P8	Cabra F	1 Cruz	1 Cruz
P8	Cabra G	3 Cruzes	2 Cruzes
P8	Cabra H	3 Cruzes	2 Cruzes
PA	Cabra A	1 Cruz	0 Cruz
PA	Cabra B	0 Cruz	1 Cruz
PA	Cabra C	0 Cruz	2 Cruzes
PA	Cabra D	1 Cruz	0 Cruzes
PA	Cabra E	0 Cruz	3 Cruzes
PA	Cabra F	1 Cruz	2-3 Cruzes
PA	Cabra G	2 Cruzes	3 Cruzes
PA	Cabra H	2 Cruzes	3 Cruzes

Período experimental, identificação da cabra, e os úberes aos quais foram submetidos aos testes.

Toda as cabras apresentaram positividade na lactocultura com ágar Sangue no período P8, e apenas as cabras F e G, apresentaram resultado negativo em PA. No entanto apenas a cabra D apresentou melhora em todos os outros sinais de mastite. Isso pode ter ocorrido devido as limitações das culturas microbiológicas tradicionais. As demais lactoculturas nesse estudo apresentaram resultados correspondentes aos de CCS e CMT para tipificação da mastite, ou seja, quando as técnicas elencadas apresentaram resultados para diagnóstico de mastite subclínica ou clínica, as lactoculturas apresentaram mais de três colônias.

2.2. Comparação do hemograma e identificações bacteriológicas

A figura 4 demonstra os principais tipos de células de defesa que variaram no hemograma. Outros perfis celulares e bioquímicos não representados no gráfico estão dispostos no quadro S1 na secção complementar. A figura 4 demonstra a variação de leucócitos totais do sangue (LT), linfócitos, neutrófilos e monócitos dos animais desde o período sadio (P0), fase de infecção, até o final das medições da fase de transplante de microbiota. Na figura 4A é interessante observar que os animais iniciaram o experimento com diferentes números de

leucócitos, retidos como valores padrões no leucograma, tendo a cabra E um dos valores mais altos estabelecidos, e a cabra H um dos menores. Durante os períodos e fases mensurados, a cabra E aparentemente sempre manteve valores altos de leucócitos, e o seu mínimo foi apenas quando ela desenvolveu a mastite clínica, sendo uma das únicas no experimento a ser diagnosticada com esse tipo de mastite.

A cabra E apresentou uma queda mais brusca de células de defesa de forma geral quando desenvolveu mastite clínica, e foi tratada com Flunixinia Meglumine pela via subcutânea na dose de 2mg/kg a partir de P9 e P10. A mastite em cabras aparenta ser um quadro com uma inflamação mais intensa do que outros animais de produção, o que em alguns casos favorece o desenvolvimento da mastite clínica e até gangrenosa. Apesar da cabra E aparentar um número maior de leucócitos que as outras desde o início das medições e não ser diagnosticada com mastite inicialmente, não sabemos se isso influenciou o aparecimento do quadro agudo de mastite, uma vez que outras variáveis devem ser consideradas. Dos leucócitos estudados, os monócitos (Figura 4D) aparentam ser um bom indicador de início de mastite clínica nesse estudo.

Na mesma figura é possível observar a queda do número de LT após 24 horas de infecção em P2 na maioria dos animais, com leve retorno dos índices em P4 e nova queda brusca em P4.2. Aparentemente, em P6 ocorreu uma melhora no quadro de níveis dessas células nos animais, em virtude de uma melhora geral nos estados clínicos e depois uma queda contínua para todos os animais até P8. Esses aumentos e quedas nos níveis de células, pode ter envolvimento na produção e recrutamento delas para a glândula mamaria, na medida que aparece algum agente estranho a microbiota local, em riqueza e abundância diferentes das características indígenas da microbiota. As células que mais identificaram as fases e períodos foram os linfócitos, com quedas pontuais na indução a infecção, e numa resposta celular com leve aumento ao final do transplante.

Aparentemente as variações na cabra A, doadora de leite, e B, controle externo, não deveriam acontecer uma vez que para cabra A, não teve qualquer manipulação de introdução de soluções no teto, e para cabra B, apenas a solução salina estéril foi introduzida no úbere. Logo, essas variações ocorreram de forma conjunta no rebanho, e por algum fator ambiental ou desconhecido. A cabra B, teve um recrutamento de linfócitos (Figura 4B) de maneira repentina e mais abrupta do que os outros animais, mas os neutrófilos não acompanharam essa tendência. Assim, outro tipo de infecção não bacteriana pode ter levado a esse quadro. A solução salina era produzida sempre 12 horas antes e autoclavada dentro dos padrões laboratoriais. Por outro lado, a cabra B também não teve aumento de CCS no leite, dessa maneira essas alterações

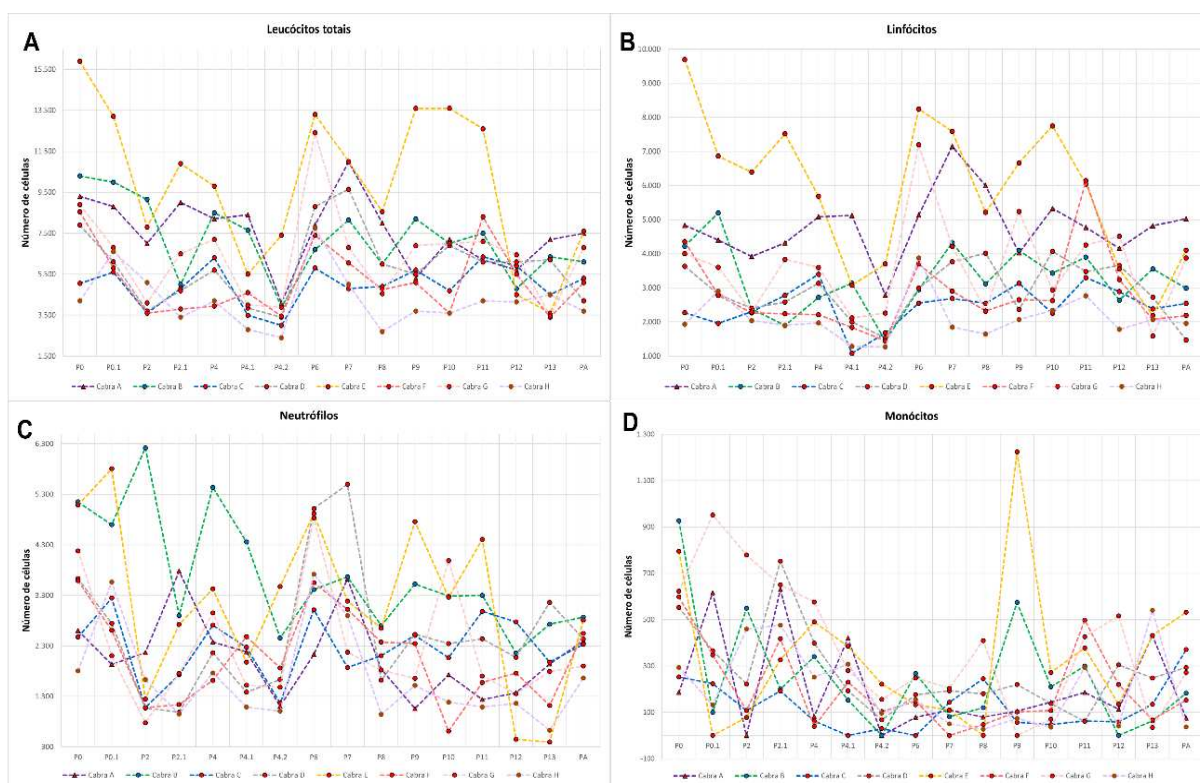
podem ter sido de fato por “stress” a algum fator ambiental ou outras causas desconhecidas. A cabra A, doadora de leite, foi um animal de suma importância experimental, e aparentemente foi que menos alterou os níveis de células avaliados.

Os monócitos na figura 4D, que são células precursoras dos macrófagos, tiveram aumento substancial em P2, em virtude da infecção com ligeira queda acentuada nos períodos posteriores. Em P9, logo no início da fase de transfusão, tivemos aumentos dessas mesmas células para cabra E e B, mas como relatado anteriormente, a cabra E desenvolveu uma mastite grave, e a cabra B pode ter sido afetada por algum fator desconhecido. No laudo técnico dos leucogramas foi apontado monócitos reativos logo no período P2 para cabra G, o que de fato se confirma nesses dados, e aparentemente, esse animal foi o mais responsivo para esse tipo célula durante toda a fase de infecção.

Outro animal com comportamento “diferente” aos demais é a cabra H, pois sempre demonstrou valores baixos de leucócitos, pouca reação celular, mas nos exames de CMT, sempre demonstrou 2 ou mais cruces no úbere do lado direito. Hipoteticamente, algum fator ainda não identificado para esse animal, pode ter caracterizado esse quadro atônito para reatividade a inflamação da glândula mamária. A cabra D, foi o único animal que apresentou melhora e estabilidade nos quadros avaliados após ao transplante, e o conjunto de dados do leucograma sempre demonstrou discreta flutuação de células leucocitárias.

Os testes estatísticos realizados para a contagem de leucócitos totais demonstraram que ocorreram diferenças entre os períodos P0 - P2 ($P < 0.05$), P0 - P2.1 ($P < 0.01$), P0 - P4.1 ($P < 0.01$), P0 - P4.2 ($P < 0.01$) e P0 - P8 ($P < 0.01$), P0 - P9 ($P < 0.01$), P0 - P10 ($P < 0.01$), P0 - P13 ($P < 0.05$) e P0 - PA ($P < 0.05$). Em relação aos linfócitos, neutrófilos e monócitos, não encontramos diferenças significativas. Presumimos que com esse teste específico englobando todos os animais e períodos, que os animais alteraram a série leucocitária, mas não retornaram ao mesmo padrão de P0 após o final da fase de transplante (PA) e que os animais induzidos a mastite alteraram de fato o status de células de defesa, observando-se as diferenças de P2 até P8, tendo P0 como referência. Interessante que em P11 e P12, não encontramos diferença, logo dentro desses períodos os níveis de células leucocitárias ficaram semelhantes a P0.

Figura 4 - Leucograma das cabras no período de sádios, fase de infecção e de transplante: leucócitos totais, linfócitos, neutrófilos e monócitos. Cada cabra está demonstrada por uma cor diferente. As linhas tracejadas representam a contagem células das series medidas, e estão subdivididas em figuras distintas as quais estão indicadas acima das mesmas. O animal doador de leite (cabra A) está com uma linha tracejada de cor roxa e marcador triangular e o controle externo (cabra B) é representada pela linha tracejada em verde e marcador círculo azul.



Na figura 5, estão representadas as bactérias que foram identificadas no úbere do lado direito por meio do ágar cromogênico Accumast®, as quais foram dispostas em porcentagem de identificação no período sadio (P0), fases de infecção e transplante. As porcentagens e os números absolutos podem ser consultados na tabela suplementar 1. No quadro S2 localizado no material suplementar foram apresentadas todas as bactérias identificadas por seção, por animal e período experimental.

No período de sadio, P0, (Figura 5A) encontramos sete táxons, sendo cinco diferentes e na fase de infecção (Figura 5B) identificamos 40 táxons, sendo dez diferentes. No período de transplante (Figura 5C) encontramos 78 táxons, sendo 12 diferentes, representando um salto de 100% ou o dobro em relação ao que foi isolado na fase de indução a infecção.

Em P0, encontramos predominantemente bactérias Gram (-), dando ênfase para os gêneros *Klebsiella* sp., *Escherichia coli* e *Pseudomonas* sp. Na fase de infecção, identificamos também em maiores proporções esses mesmos gêneros citados anteriormente, e adicionalmente

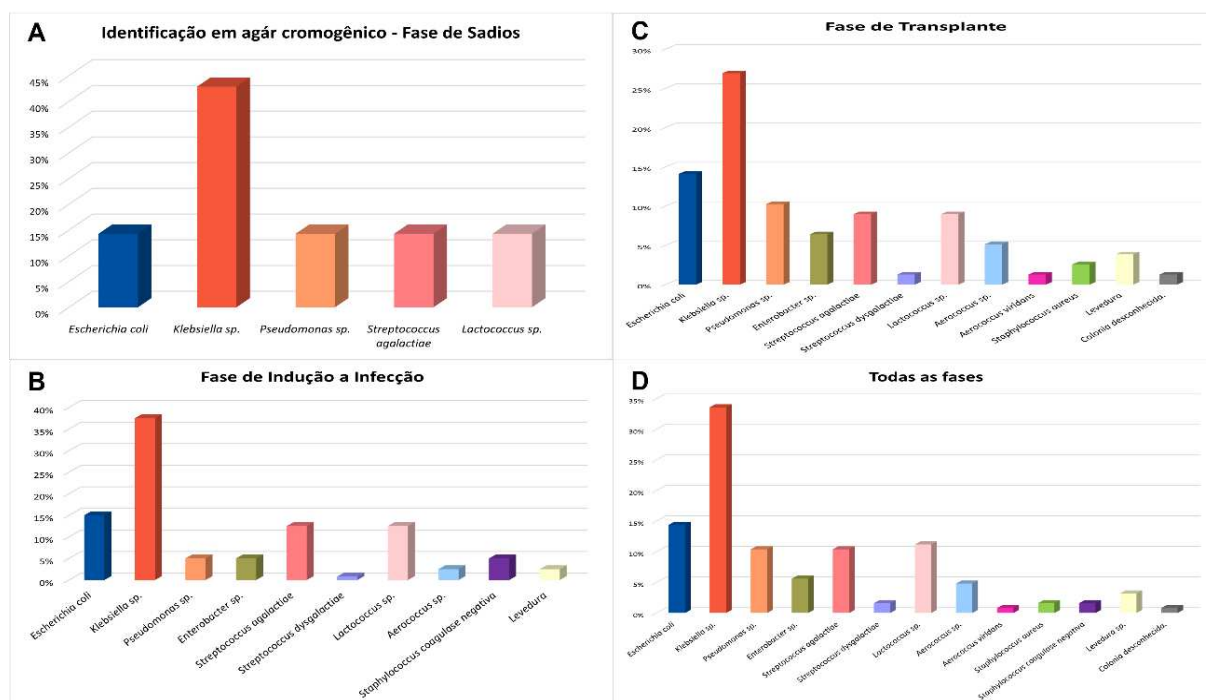
o táxon *Enterobacter* sp., uma Gram (-), que ainda não havia sido isolada em outro momento. Além disso, encontramos *Streptococcus agalactiae* e *Lactococcus* sp., e com isso, aumentamos a gama de bactérias relacionadas a Gram (+).

Na fase de transplante, identificamos maiores números absolutos de táxons e menores proporções de bactérias Gram (-), como *Klebsiella* sp. (31%) e *E. coli* (14%) (tabela suplementar e figura 5C), em relação ao período de infecção. De forma geral, com o transplante ocorreu um aparente aumento de riqueza de bactérias ou táxons diferentes, influenciado provavelmente pela técnica de transplante de leite no úbere desses animais.

O agente *Staphylococcus coagulase negativa* (SCN) foi isolado na fase de infecção nas cabras C e H, provavelmente, eles podem ser correspondentes ao *S. warneri* utilizado na indução da infecção. Não ter encontrado SCN em outros animais induzidos, pode ser devido ao fato da abundância menor desse agente no leite utilizado para as lactoculturas. A cabra B, controle externo, não teve muitas identificações diferentes após P2, quando as demais foram inoculadas. A cabra A, doadora de leite, apresentou isolamento em vários períodos do gênero *Klebsiella* sp., mas foi um gênero identificado em vários períodos e animais, o que deve ser mais bem avaliado do ponto de vista microbiológico por meio do sequenciamento para melhor caracterizar esse agente.

Diante disso, verificamos o aumento de riqueza de bactérias identificadas no transplante, o que pode significar que bactérias de fato podem ter sido introduzidas no úbere dessas cabras receptoras do transplante, ou um distúrbio na microbiota proporcional ao aumento dessas bactérias no leite, o que nos possibilitou isolar esses gêneros e espécies em lactoculturas cromogênicas e seletivas. Esse tipo de isolamento por lactoculturas tem suas limitações, e outras técnicas de sequenciamento de microbiota pode elucidar melhor todo o quadro de identificação.

Figura 5 - Porcentagem de identificação de bactérias por ágar cromogênico Accumast® no período sadio, nas fases de indução a infecção e transplante. Cada barra representa uma bactéria diferentemente isolada e sua porcentagem de identificação em relação a todos os isolados.



2.3. Dados do sequenciamento

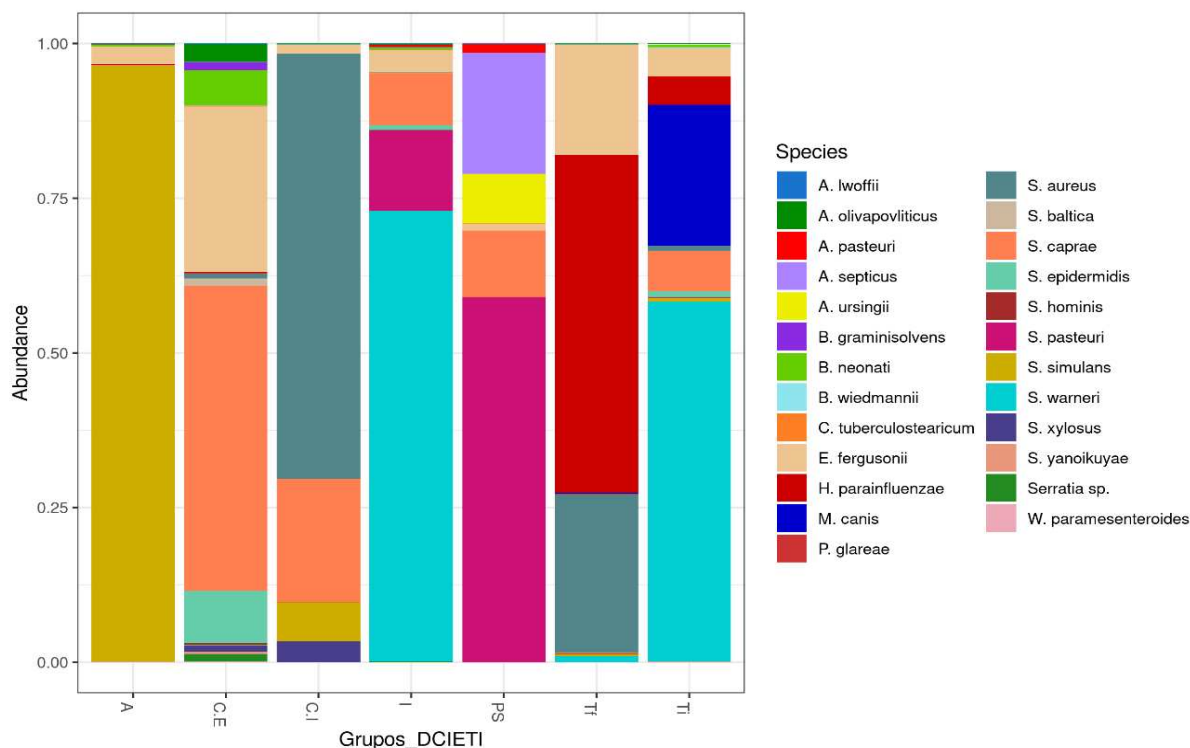
As amostras SBRP2-FE e SBRP8-BE dos dados analisados não geraram sequências para as análises seguintes. Os dados foram alocados de uma forma única em um conjunto total de 189 amostras, referentes as cabras A, B, C, D, E, F, G e H, sendo a cabra A, doadora de leite, e cabra B o controle externo. As amostras de leite de cabra foram sequenciadas na região V3 eV4 do gene 16S rRNA. O comprimento médio para todas as leituras foi de 450 bp. O conjunto gerou um total de 26.096.146 sequências, que foram usadas para análises abaixo (média = 138.074,847± Desvio padrão = 244.758,161 leituras/amostra). Ao todo, 5.356 táxons identificados foram utilizados nessas análises. De antemão, a classificação do gênero *Escherichia* sp. a nível de espécie ainda pode ser reavaliada com a técnica de lactocultura, uma vez que a identificação de algumas espécies com o sequenciamento gene 16S rRNA são de difícil resolução (EDGAR, 2018; GWAK; RHO, 2020).

2.4. Comparação da abundância relativa da microbiota das glândulas mamárias

A figura 6 demonstra as principais espécies de bactérias encontradas nos subgrupos delimitados para análise de microbiota em todas as fases e períodos experimentais. Como pode ser observado, os subgrupos não apresentaram muitas bactérias em comum, a não ser por *Escherichia fergusonii* e *Staphylococcus caprae*. Encontramos alta abundância de *S. warneri*, nos períodos de infecção e início do transplante, uma vez que a indução de infecção teve sucesso e no período final do transplante o número desse microrganismo caiu bruscamente em abundância, devido ao transplante de microbiota do leite. A cabra doadora A, apresentou alta abundância de *Staphylococcus simulans* (96%) e *E. fergusonii*. O controle externo, animal B, obteve uma microbiota mais variável, com *S. caprae* (45%), *E. fergusonii* (25%), *Staphylococcus epidermidis* (7%), *Bacteroides neonati* (5%), *Alkalibacterium olivapovliticus* (2%) e outros microrganismos. O controle interno, que representa os úberes no lado esquerdo, e não infectados, apresentaram alta abundância de *Staphylococcus aureus* (68%), *S. caprae* (20%), *Staphylococcus simulans* (6%), *Staphylococcus xylosus* (3%) e outros microrganismos. O período P0, que compreendeu todos os animais anteriormente a indução da infecção, ou seja, o período sadio apresentou *Staphylococcus pasteurii* (59%), *Acinetobacter septicus* (20%), *S. caprae* (11%), *Acinetobacter ursingii* (8%) e outros microrganismos.

No subgrupo referente ao início da fase de transplante, a microbiota era composta por *S. warneri* (58%), *Macrococcus canis* (23%), *S. caprae* (6%), *E. fergusonii* (4%) e *Haemophilus parainfluenzae* (4%) e outros microrganismos. Ao final do transplante foram encontradas em baixa abundância de *S. warneri* (1%) e *H. parainfluenzae* (55%), *S. aureus* (25%), *E. fergusonii* (17%), *S. simulans* (0.3%), entre outros microrganismos. Diante disso, apesar de alguns microrganismos dos transplantados serem iguais ao da cabra doadora, aparentemente a microbiota se modificou por completo em quase todas as fases estudadas nos subgrupos.

Figura 6 - Composição da microbiota bacteriana dos 25 táxons mais abundantes, ao nível de gênero e espécies dos subgrupos experimentais. As abundâncias dos gêneros e espécies foram distribuídas de forma relativa a 100% da amostra para cada período na fase de transplante, sendo que cada cor corresponde uma espécie diferente e seu respectivo gênero. Os grupos são subdivididos em: cabra A (animal doador de microbiota do leite); cabra B (controle externo - C.E); lado esquerdo do úbere não infectados - C.I; úberes induzidos a infecção - I; período P0, em que os animais estavam sadios - PS; períodos finais do transplante - Tf; períodos iniciais do transplante – Ti.



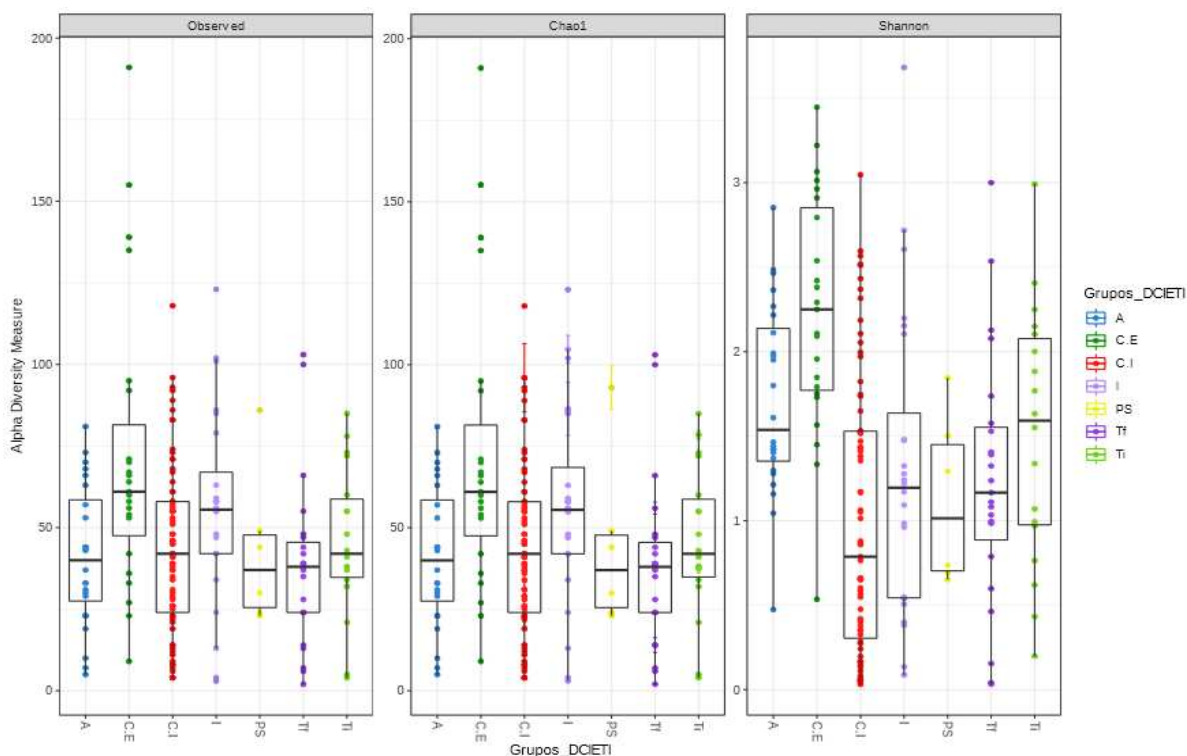
2.5. Comparação da alfa diversidade da microbiota do leite nos subgrupos

A figura 7 representa os índices de diversidade entre os subgrupos experimentais. É interessante destacar que os animais no período sadio (P0), denominado PS, foi muito semelhante graficamente com os subgrupos de final do transplante (Tf) e o inicial (Ti) da fase de transplante, levemente maior. No entanto, destacamos que o número amostral de P0 foi inferior aos demais. Também se apresentaram em faixa similar de riqueza, a microbiota do animal doador (cabra A) e o controle interno (Ci). Por outro lado, o controle externo (CE) e infectados (I) demonstraram a riqueza um pouco maior. Contudo, os testes estatísticos não demonstram diferença entre os grupos.

O índice de diversidade, apresentou uma maior variabilidade do que o índice de riqueza. O controle externo, cabra B, e o animal doador de microbiota, cabra A, apresentaram os maiores índices de diversidade, o controle interno o menor, e o de início de transplante em números intermediários. Os testes estatísticos, teste de anova seguido por teste de Tukey, indicaram uma diferença significativa entre o controle interno (C.I) e externo (C.E) ($P < 0.001$).

Figura 7 - **Índices de diversidade alfa dos animais experimentais em subgrupos.** Os grupos são subdivididos em: cabra A (animal doador de microbiota do leite); cabra B (controle externo – C.E); lado esquerdo do úbere não infectados - C.I; úberes induzidos a infecção - I; período

P0, em que os animais estavam saudáveis - PS; períodos finais do transplante - Tf; períodos iniciais do transplante - Ti. Esses são representados pelos índices de riqueza observados por ASVs, de riqueza Chao1, e o de diversidade por amostra com o índice de Shannon. Cada subgrupo foi identificado com uma cor diferente ao lado da figura.



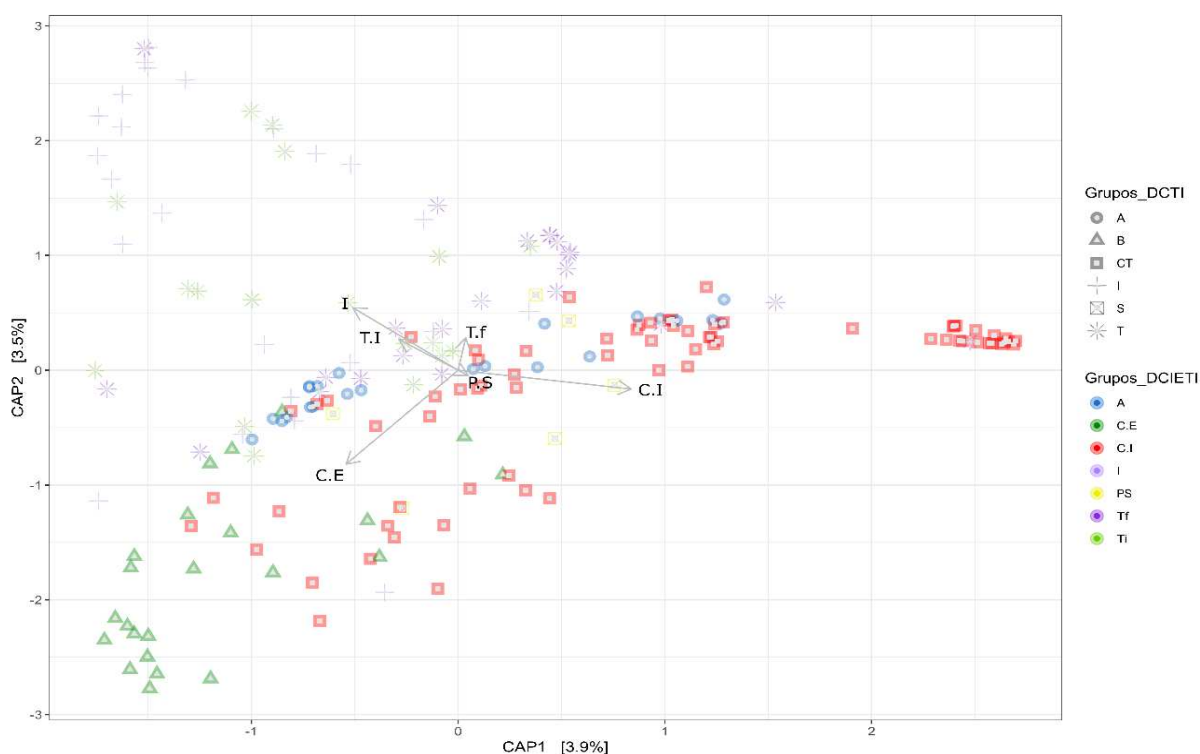
2.6. Comparação da beta diversidade na microbiota do leite nos subgrupos

A figura 8 demonstra as dissimilaridades dos subgrupos elencados para analisar as diferentes fases de infecção e transplante, e períodos específicos. Embora não haja separação clara na figura, houve diferença significativa entre os grupos, com valor de $P = 0.001$ no teste de Anova. Primeiramente, o controle interno (C.I - vermelho) apresentou uma dispersão muito grande no gráfico, devido às dissimilaridades indígenas entre as bactérias das microbiotas dos animais. Além disso, existiu um agrupamento de um perfil de microbiota no gráfico do controle interno (CI), devido a relativa baixa manipulação desse lado esquerdo do úbere, com isso a microbiota nesse curto espaço de tempo avaliado não se alterou demasiadamente em alguns animais, ou seja, por mais que tenha vários períodos, sempre era o mesmo animal avaliado durante as fases e períodos experimentais.

O controle externo, cabra B (CE), variou ao longo do tempo, assim como alguns perfis celulares e composição da microbiota relacionados acima, o que pode ser devido as manipulações desse animal durante os períodos com soluções placebo. A cabra A e o período

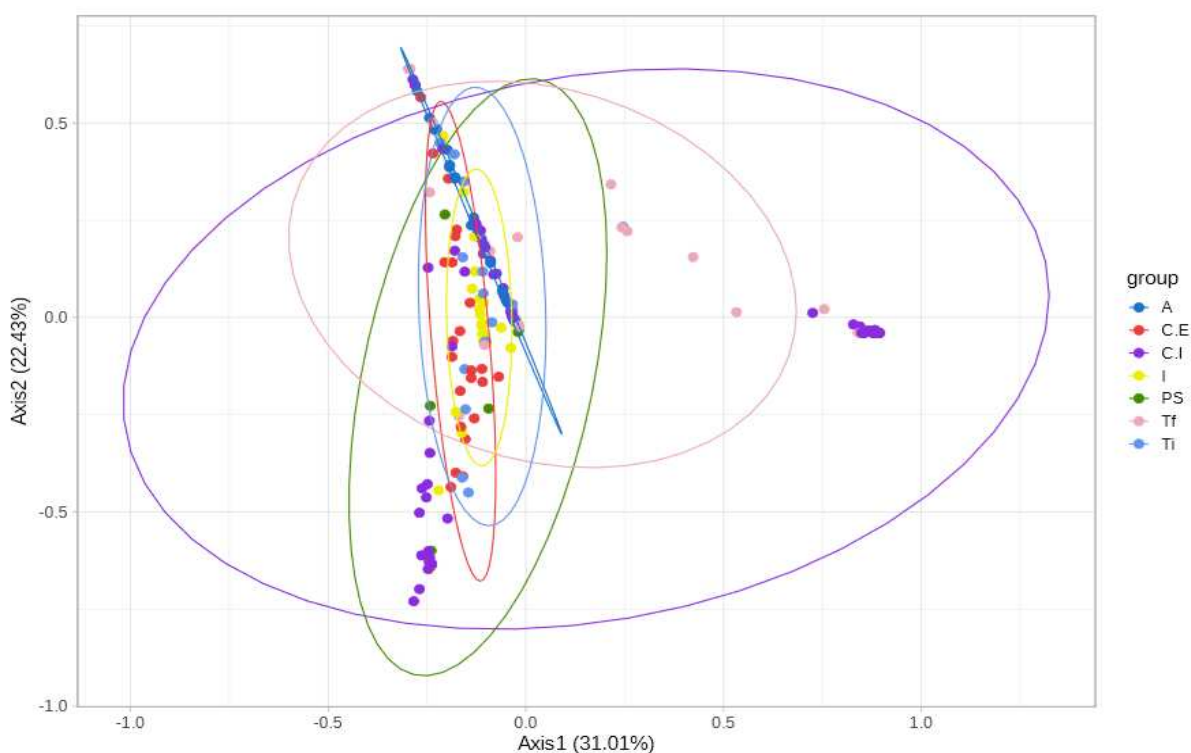
sadio (PS), ficou de forma centrada no gráfico, entre os controles, sempre intercalando entre os úberes considerados sadios. Por outro lado, a microbiota do lado infectado nos úberes (I) se apresentou mais dissimilar dos outros grupos, e os transplantados aparentemente ficaram alocados entre os úberes sadios do experimento e os infectados, com o transplante final (Tf), de cor roxa, mais próximo em número dos sadios. Os valores estatísticos que indicaram a diferença entre os subgrupos de amostras nessas análises podem ser visualizados na tabela 2. Destacamos que A foi diferente da maioria dos outros subgrupos, assim como C.E e C.I. Outro ponto importante, foi que Tf também demonstrou significância nos valores de dissimilaridade para o subgrupo I, o que denota que a microbiota se tornou diferente após o transplante.

Figura 8 - Análise de Coordenadas Principais Canônicas (CAP) construída sobre uma matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis entre os subgrupos experimentais. Os subgrupos compreendem: cabra A (animal doador de microbiota do leite); cabra B (controle externo – C.E); lado esquerdo do úbere não infectados - C.I; úberes induzidos a infecção - I; período P0, em que os animais estavam sadios - PS; períodos finais do transplante - Tf; períodos iniciais do transplante – Ti. Cada subgrupo foi identificado com uma cor diferente e símbolos ao lado da figura. As ordens das setas demonstram a formação de grupos de indivíduos selecionados em diferentes coordenadas, o que denota dissimilaridade e semelhança da composição da microbiota entre amostras e grupos, de acordo com o subgrupo. O valor de $P = 0.001$ foi obtido por meio do teste anova.



Na figura 9, foi avaliada a distância euclidiana entre os subgrupos. Essa medida é baseada em um sistema de coordenadas cartesianas, de comparação de comunidades em função das variáveis para expressar a distância entre amostras por meio das abundâncias de cada espécie. Notamos que o controle interno (C.I) sempre se apresentou de forma mais distante do centro e próximo às bordas da elipse, o que de certa forma demonstra que essas amostras foram mais constantes em microbiota e diferente das demais, assim como elucidado no gráfico anterior. Outro ponto interessante é a presença de parte do subgrupo de Tf próximo ao C.I, o que permite supor que os dois subgrupos se tornaram pouco distantes ou mais similares no experimento.

Figura 9 - Diversidade beta baseada na dissimilaridade da Distância Euclidiana e escalonamento pela Análise de Coordenadas Principais da Matriz (PCoA). Os subgrupos foram delimitados em: cabra A (animal doador de microbiota do leite); cabra B (controle externo – C.E); lado esquerdo do úbere não infectados - C.I; úberes do lado direito induzidos a infecção - I; período P0, em que os animais estavam sadios - PS; períodos finais do transplante - Tf; períodos iniciais do transplante – Ti. Cada subgrupo foi identificado com uma cor diferente ao lado da figura.



Os valores estatísticos que indicaram a diferença entre os subgrupos das amostras nessas análises podem ser visualizados na tabela 2. Destacamos que o C.E aparentemente trabalhou

como esperávamos, funcionando como uma microbiota a parte, e o Tf se demonstrou diferente do I, o que reforça que o transplante modificou a microbiota.

Tabela 2 - Testes estatísticos para as análises de beta diversidade para os diferentes subgrupos das cabras.

Dissimilaridade de Bray Crutis				Distância Euclidiana			
Subgrupos	Valor de P.	P. ajustado.	Sig.	Subgrupos	Valor de P.	P. ajustado.	Sig.
A vs CE	0.001	0.021	*	A vs CE	0.003	0.063	
A vs PS	0.005	0.105		A vs PS	0.057	1	
A vs CI	0.001	0.021	*	A vs CI	0.019	0.399	
A vs Ti	0.002	0.042	*	A vs Ti	0.004	0.084	
A vs Tf	0.001	0.021	*	A vs Tf	0.001	0.021	*
A vs I	0.001	0.021	*	A vs I	0.001	0.021	*
CE vs PS	0.002	0.042	*	CE vs PS	0.001	0.021	*
CE vs CI	0.001	0.021	*	CE vs CI	0.018	0.378	
CE vs Ti	0.001	0.021	*	CE vs Ti	0.001	0.021	*
CE vs Tf	0.001	0.021	*	CE vs Tf	0.001	0.021	*
CE vs I	0.001	0.021	*	CE vs I	0.001	0.021	*
PS vs CI	0.046	0.966		PS vs CI	0.139	1	
PS vs Ti	0.012	0.252		PS vs Ti	0.074	1	
PS vs Tf	0.004	0.084		PS vs Tf	0.311	1	
PS vs I	0.004	0.084		PS vs I	0.097	1	
CI vs Ti	0.002	0.042	*	CI vs Ti	0.031	0,651	
CI vs Tf	0.001	0.021	*	CI vs Tf	0.075	1	
CI vs I	0.001	0.021	*	CI vs I	0.012	0,252	
Ti vs Tf	0.024	0.504		Ti vs Tf	0.014	0,294	
Ti vs I	0.237	1		Ti vs I	0.61	1	
Tf vs I	0.001	0.021	*	Tf vs I	0.001	0.021	*

Os subgrupos: cabra A (animal doador de microbiota do leite); cabra B (controle externo – C.E); lado esquerdo do úbere não infectados - C.I; úberes induzidos a infecção - I; período P0, em que os animais estavam sadios - PS; períodos finais do transplante - Tf; períodos iniciais do transplante – Ti. Valor de P para o teste de PERMANOVA. O P-ajustado refere-se à correção de valores por Bonferroni. Os asteriscos (*) referem-se a significância de P<0.05.

2.7. Distinção da microbiota do leite por um gráfico de Venn

O gráfico de Venn (Figura 10) determina a presença e ausência de bactérias nos diferentes subgrupos estudados, ou seja, delimita as bactérias que estão presentes apenas naquele grupo e as que estão em dois ou mais. A parte centroide do gráfico demonstrou que existiu 31 espécies de bactérias que foram presentes entre todos os subgrupos, não sendo um número muito expressivo, até porque todos os animais estavam alocados nas mesmas condições e ambientes,

apesar das variáveis experimentais. Um ponto muito interessante de avaliar, é que o transplante de microbiota do leite proporcionou subgrupos muito diferentes de Tf e Ti. Ti apresentou 231 bactérias presentes completamente diferentes dos demais grupos, enquanto o Tf apresentou 234, e em comum entre os dois subgrupos, existiu apenas 3 bactérias. Outro ponto importante, é que o grupo de infectados (I) tiveram 18 bactérias em comum com Ti, sinalizando que o transplante inicialmente modificou rapidamente a microbiota. Além disso, I apresentou com o Tf apenas 6 espécies em comum, o que significa que o transplante reduziu o número de bactérias relacionadas ao quadro infeccioso. A cabra doadora (A), não apresentou bactérias que fossem comuns apenas ao Tf, mas seis delas eram comuns ao Tf com CI. Os subgrupos CI, CE e doadora (A) apresentaram uma microbiota muito característica, rica em espécies completamente diferentes dos outros subgrupos, e extremamente relacionadas, provavelmente, ao quadro clínico de sadios. Logo, se o animal é clinicamente sadio, provavelmente ele apresentará mais espécies de bactérias exclusivas.

Figura 10 - Gráfico de Venn referente ao período e os subgrupos experimentais. Cada período e subgrupos foi representado por: cabra A (animal doador de microbiota do leite); cabra B (controle externo – C.E); úberes não infectados esquerdo - C.I; úberes induzidos a infecção - I; período P0, em que os animais estavam sadios - PS; períodos finais do transplante - Tf; períodos iniciais do transplante – Ti. Cada subgrupo foi identificado com uma cor diferente ao lado da figura. Cada cor no gráfico representa um subgrupo ou vários sobrepostos.

técnica de transplante possibilitou curar um animal da mastite, levando o *S. warneri* a se tornar indígena a microbiota do animal. No entanto, as modificações de táxons bacterianos não retornaram a microbiota ao estado original, e muito menos a tornaram similar com a do animal doador.

A mastite clínica e subclínica causada por IMI a partir de SCN é comum em muitos sistemas intensivos de produção leiteira em todo o mundo, o que afeta a produção de leite, reduz a qualidade do leite, aumenta custo com tratamento e gera o descarte prematuro de animais (CONDAS et al., 2017b; FREITAS GUIMARÃES et al., 2016; HOSSEINZADEH; DASTMALCHI SAEI, 2014; THORBERG et al., 2009). As quedas de produção de leite provocadas por *S. warneri*, que é um SCN, durante o quadro de mastite foram baixas para um único período, no entanto, em uma infecção crônica com vários animais no rebanho, ao longo de meses poderia reduzir muito a quantidade final de leite produzida. Por outro lado, estudos relacionados a mastites em sistemas intensivos de produção de leite caprino com identificações por culturas microbiológicas de um único agente patogênico são controversos, pois demonstraram que a mastite pode ser associada a valores mais baixos (LEITNER; MERIN; SILANIKOVE, 2004), semelhantes (MIN; TOMITA; HART, 2007; MORONI et al., 2005b) ou mesmo com um aumento na produção de leite em cabras doentes em comparação com as saudáveis (KOOP et al., 2012a). Além disso, observamos que a queda não foi repentina ao início do transplante, e sim em períodos posteriores, logo, o que pode ter prejudicado a produção foi a intensa introdução de novos microrganismos por vários períodos ocasionando um quadro de disbiose, o que segundo WRZOSEK et al., (2018), a alta frequência no transplante pode prejudicar a estabilidade do ecossistema recém-formado ou em formação.

A mastite geralmente é causada por um ou múltiplos agentes infecciosos e para combater as infecções, a glândula mamária possui uma linha de defesa chamada de células somáticas, que compreende glóbulos brancos e células epiteliais do leite (ALHUSSIEN; PANDA; DANG, 2021). Apesar de diagnosticada a mastite subclínica por *S. warneri*, e o agente se manter presente por vários períodos, aparentemente não houve uma relação direta de CBT e CCS em algumas avaliações com o diagnóstico de determinados animais, assim como relatado por BOIX-AMORÓS et al., (2016). Segundo BOIX-AMORÓS et al., (2016), pode não existir uma correlação direta entre a carga bacteriana e a quantidade de células imunes no leite de humanos, reforçando a ideia de que as bactérias do leite podem não ser percebidas como uma infecção pelo sistema imunológico em determinadas situações. Interessantemente, esses mesmos autores relataram a existência de 10^7 - 10^8 de células bacterianas diariamente no leite de mulheres saudáveis, apesar de terem sido quantificadas pela técnica de PCR em tempo real (qPCR). Essas medições

foram tão altas quanto as nossas mensurações em caprinos de 4.0×10^3 cfu/ml e de outros autores com $0.5 \times 10^1 - 3.8 \times 10^4$ cfu/ml (KUCHTÍK et al., 2021). BOIX-AMORÓS et al., (2016) ressaltam ainda que gêneros como *Staphylococcus* sp., *Acinetobacter* sp. e até *Enterobacter* sp. que encontramos em nosso estudo, tanto em análises de rRNA 16S e plaqueamentos, também foram encontradas no leite de mulheres saudáveis.

Demonstramos uma microbiota rica e diversa nos subgrupos relacionados a infecção e transplantados, tanto pelo sequenciamento e pelas identificações por ágar cromogênico Accumast® em diversos períodos, até mesmo nos animais saudáveis, associados a diferentes valores de CCS. Estudos em amostras saudáveis de leite humano e bovino relataram grande diversidade microbiana independente de seu *status* de CCS (CABRERA-RUBIO et al., 2012; HUNT et al., 2011; KUEHN et al., 2013; OIKONOMOU et al., 2014a). Segundo OIKONOMOU et al., (2014a), as células de defesa na glândula mamária conseguem discernir os microrganismos indígenas ou comensais, dos patogênicos, o que resulta em glândulas saudáveis com altas quantidades CCS sem afetar a microbiota, ou seja, a presença de microrganismos comensais ou transeuntes no leite pode não aumentar o influxo ou ativar uma intensa produção de células de defesa.

Como descrito em nossos dados, os animais variaram muito em quantidade e tipo de leucócitos sanguíneos no início, ao longo da infecção e no início do transplante, concomitantemente a CCS do leite variou. Essas variações conjuntas seriam possíveis devido a migrações intensas de leucócitos da corrente sanguínea para a glândula mamária (MCKENZIE; ANDERSON, 1981; SEELIG; BEER, 1978), principalmente pela movimentação de neutrófilos que são de grande importância em infecções intramamárias (ALNAKIP et al., 2014; RAINARD; FOUCRAS; MARTINS, 2022; TIAN et al., 2005a), os quais são as principais células de defesa no leite em cabras (SOUZA et al., 2012b). Além disso, nossos dados demonstraram variações significativas de leucócitos sanguíneos em pontos específicos no início da infecção e transplante. A avaliação desses valores durante quadros de IMI devem ser realizados com as seguintes distinções, se o animal apresenta mastite crônica ou aguda a campo, ou se o quadro mastítico foi induzido. Segundo ALHUSSIEN et al., (2015), em vacas que apresentavam mastite clínica e subclínica a campo, com possíveis quadros crônicos de IMI, a contagem total de leucócitos juntamente com porcentagem de neutrófilos no sangue, e a porcentagem de neutrófilos do leite aumentaram significativamente em relação aos animais saudáveis. Por outro lado, decréscimos significativos foram observados nos linfócitos e monócitos do sangue e do leite de vacas induzidas a mastite subclínica e clínica, portanto, a avaliação desses parâmetros deve ser relacionada com abordagem da infecção (CREMONESI et al., 2012).

Demonstramos resultados independentes de identificação de bactérias entre a técnicas de sequenciamento do gene 16S rRNA (metataxonômicas) e por cultura microbiológica. No entanto, as abordagens metataxonômicas (OIKONOMOU et al., 2014a) e outras abordagens moleculares específicas (BOBBO; PENASA; CASSANDRO, 2020; SHOME et al., 2011) têm demonstrado que podem caracterizar determinadas bactérias sobre leite normal e mastítico que não podem ser obtidas com o uso de abordagens tradicionais de cultura microbiológica, e isso tem determinado resultados independentes entre as técnicas. Comparativamente, a técnica de sequenciamento denominada de *shotgun* metagenômico completo (metagenômica) de amostras de leite, demonstra melhor acurácia em diagnósticos que a metataxonomia quando comparado com as culturas microbiológicas (HILTON et al., 2016).

Além disso, o ágar cromogênico Accumast® que utilizamos pode apresentar vieses de identificação, assim como a técnica de metataxonomia que utilizamos, uma vez que as placas foram validadas a partir do gene 16S rRNA em seu desenvolvimento, que muitas vezes não é capaz de identificar com clareza a espécie bacteriana (GANDA et al., 2016). Por exemplo, enquanto identificamos *E. fergusonii* pelo sequenciamento, em placas conseguimos identificar *E. coli*, no entanto, o genoma do gênero *Escherichia* sp., de forma geral é extremamente relacionado geneticamente, logo, os genomas não estão separados claramente em testes filogenéticos, então não é possível segregar com toda certeza algumas espécies a partir do gene 16SrRNA, como *E. coli* de *E. fergusonii* ou *Escherichia albertii* (LUKJANCENKO; WASSENAAR; USSERY, 2010). *Escherichia* sp. não aparenta estar incluída na microbiota central do leite humano, de vaca, de búfala ou de porca, mas ZHANG et al., (2017a) relataram que o gênero *Escherichia/Shigella* estava presente no leite de cabras Saanen na mesma proporção que no leite de ovelhas (ESTEBAN-BLANCO et al., 2020), assim como relatamos nesse estudo.

Dentre as principais bactérias encontradas no leite do animal doador de microbiota, relatamos que *S. capitis* é geralmente identificada em cabras diagnosticados com mastite subclínica (BERNIER GOSSELIN et al., 2019; CONTRERAS et al., 2007) e outros ruminantes com mastite (CONDAS et al., 2017a; FESSLER et al., 2010; PIZAURO et al., 2021). Ao final do transplante, identificamos abundância de *E. fergusonii* no leite, sendo um dos poucos microrganismos relacionados a cabra doadora, no entanto, essa espécie sempre foi identificada em várias fases experimentais o que a torna uma bactéria resiliente e muito adaptada a várias mudanças ambientais sobre todos os processos realizados.

Embora esses gêneros, como descritos acima, estejam relacionados a doenças infecciosas, as assinaturas taxonômicas microbianas para infecções específicas nem sempre podem ser um

indicador confiável da doença (MA; LI; GOTELLI, 2019). As identificações relacionadas a abundância de forma geral, com a soma de microbiotas de várias cabras podem suprimir a identificação de bactérias que foram importantes individualmente, e acaba demonstrando espécies que obtiveram uma alta carga microbiana, como *H. parainfluenzae*, que de certa forma foi importante para um animal dentre todo o período de transplante. A espécie *H. parainfluenzae* geralmente está associada a microbiota de fezes (LI et al., 2020), a boca e faringe em humanos (CHEEMA et al., 2022), mas nenhuma citação relacionada a cabras e leite foi encontrada.

A microbiota do leite da cabra doadora e dos úberes sadios, denominados de controle interno, demonstraram abundância relativa de poucos microrganismos, o mesmo encontrado em vacas sadias por PORCELLATO et al., (2020). Segundo PORCELLATO et al., (2020), isso ocorre porque animais sem sinais de mastite detêm uma biomassa microbiana de baixa abundância e, no caso da introdução de táxons no úbere com o desenvolvimento mais rápido, pode ser gerado um grande impacto na abundância da microbiota residente do úbere.

Os dados não demonstraram diferença entre subgrupos para alfa diversidade, no entanto, denota que ocorreram diferenças na beta diversidade no subgrupo de transplantados para os demais. Segundo HUANG et al., (2022), a maior dissimilaridade entre os grupos de beta diversidade dos transplantados também foi encontrada após um tempo maior após o início do transplante de microbiota, assim como no subgrupo de transplante final. Determinar quais as variabilidades que podem afetar a alfa e beta diversidade do leite em quadros de disbioses é bastante complicado devido as inúmeras variáveis (PORCELLATO et al., 2020). Ademais, em questão de horas no dia a microbiota do leite pode ser modificada, como foi determinada em leite de humanos durante a manhã, tarde e noite (CORONA-CERVANTES et al., 2021). Além disso, dependendo da métrica utilizada, em leite de ovelhas, os índices de diversidade e riqueza aparentaram aumentar e diminuir dependendo da quantidade de células somáticas mensuradas (ESTEBAN-BLANCO et al., 2020).

Estudos com transplante de microbiota e agrupamentos de Venn (HUANG et al., 2022; YAN et al., 2021) indicaram que geralmente o receptor de microbiota tem menos táxons incomuns com o doador do que outros grupos, principalmente nos períodos iniciais ao transplante (OHARA, 2019). Nossos dados demonstraram que o agente *S. warneri* esteve presente na fase final do transplante, em parte da microbiota dos animais transplantados, provavelmente devido as características da microbiota do doador e dos receptores do transplante, além das peculiaridades desse novo tipo de técnica que ainda podem ser alterados para um melhor efeito desejado. No estudo realizado por HUANG et al., (2022) para o tratamento de

colite ulcerativa, os receptores de microbiota ou transplantados tiveram que ser separados em dois grupos, os que responderam e não responderam ao tratamento com o transplante, uma vez que a técnica não afetou a microbiota de determinadas pessoas. Além disso, HUANG et al., (2022) encontram um maior diversidade e riqueza nos pacientes responsivos ao tratamento, enquanto menor nos não responsivos.

Portanto, a indução da IMI em cabras por *S. warneri* resultou no aumento dos valores CCS, CBT e altera o CMT do leite, além de reduzir sua produção. As células de defesa sanguíneas podem responder diferentemente em cada animal, no entanto, os leucócitos totais demonstraram diferenças significativas assim que induzida a infecção e durante a fase de transplante de microbiota. Essas alterações foram, provavelmente, ocasionadas pela disbiose causada na glândula mamaria. Os animais responderam de forma diferente quando realizado o transplante, sendo que um animal esteve clinicamente sadio ao final dessa fase, o que corrobora com a expectativa da técnica de transplante e tratamento da mastite. Assim, a microbiota foi alterada pelo transplante em quase todos os animais, eliminando ou reduzindo a abundância do agente *S. warneri* na microbiota, no entanto a microbiota final desses animais se tornou algo diferente em cada animal, sem apresentar identidade de táxons do que era antes da infecção e da microbiota do animal doador. A análise de beta diversidade demonstrou que grupos diferentes foram formados após o transplante, ressaltando que a microbiota final se tornou diferente da microbiota durante a infecção. O transplante de microbiota do leite de um úbere para outro demonstrou ser uma técnica que pode alterar a microbiota, e com a possibilidade de utilização no tratamento da mastite, desde que seja realizado um aprimoramento. Acreditamos que o tempo de transplante poderá ser reduzido para tentar inferir se isso pode auxiliar na retomada da microbiota para um patamar em que mais animais se tornem sadios clinicamente. Novos estudos devem ser realizados aumentando o tempo de resiliência pós transplante mensurado e aprimorando a técnica de identificação do animal doador de leite e sua microbiota. Com isso, estudos futuros poderão fazer dessa técnica uma possibilidade de tratamento da mastite e redução da utilização de antimicrobianos em fazendas.

4. MATERIAL SUPLEMENTAR

Quadro S1 - Exames de hemograma e bioquímico das cabras divididos em período sadios, fase de indução a infecção, transplante e da cabra doadora de microbiota (Cabra A).

PO	ID	Hemácias	Hemoglobina	Hematócrito	VCM	CHCM	Leucócitos	Neutrófilos	Bastonetes	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos	Basófilos	Total	Plaquetas	Proteína	Fibrinogênio
A	14	10,4		33	23	34	9300	2604	0	4836	186	1674	0	9300	330.000	6,4	0,2
B	17	9,5		24	20	28	10300	5150	0	4223	927	0	0	10300	300.000	7,4	0,4
C	15	9,9		33	22	30	5050	2475	0	2273	253	51	0	5050	270.000	7,2	0,2
D	15	9,7		33	22	29	7900	3634	0	3634	553	79	0	7900	360.000	7,2	0,2
E	13	9,9		33	25	30	13900	5988	0	9690	793	318	0	13900	528.000	6,6	0,4
F	17	10		32	18	34	8550	3591	0	4361	599	0	0	8550	405.000	6,8	0,4
G	20	11,9		43	21	28	6900	4183	0	4005	635	69	0	6900	195.000	7,2	0,2
H	14	11,1		37	27	30	4200	1806	84	1932	294	84	0	4200	150.000	6,6	0,2
PO.1	ID	Hemácias	Hemoglobina	Hematócrito	VCM	CHCM	Leucócitos	Neutrófilos	Bastonetes	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos	Basófilos	Total	Plaquetas	Proteína	Fibrinogênio
A	17	11		31	21	35	8200	1936	0	4400	32	1848	0	8200	250000	6,8	0,4
B	13	9,3		30	23	31	10000	4700	0	5200	100	0	0	10000	200000	7,2	0,2
C	13	10,3		31	24	33	5600	3248	0	1960	224	168	0	5600	200000	7,2	0,2
D	17	10,1		30	24	34	6100	2745	0	2896	366	183	0	6100	200000	7,4	0,6
E	14	11,4		34	25	34	13200	5808	396	6864	0	132	0	13200	250000	7,2	0,4
F	14	10,0		30	20	22	8400	2610	58	2784	348	0	0	8400	300000	6,8	0,4
G	17	13,2		41	24	35	6800	2108	136	3604	952	0	0	6800	200000	7,8	0,6
H	15	12,7		37	24	34	6600	3564	0	2904	132	0	0	6600	200000	7,2	0,4
P2	ID	Hemácias	Hemoglobina	Hematócrito	VCM	CHCM	Leucócitos	Neutrófilos	Bastonetes	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos	Basófilos	Total	Plaquetas	Proteína	Fibrinogênio
A	17	10,6		31	19	34	7000	2170	0	3920	0	910	0	7000	300000	6,8	0,2
B	15	10		29	19	34	9150	6222	0	2370	549	0	0	9150	250000	7,4	0,2
C	17	10		30	18	34	3600	1880	108	2304	108	0	0	3600	200000	7,2	0,2
D	13	9,8		29	23	34	3700	1073	0	2405	222	0	0	3700	350000	2,6	0,2
E	14	11,1		37	21	35	7800	1248	0	6296	78	78	0	7800	300000	7,2	0,4
F	15	10,4		30	20	30	3600	1380	0	2468	108	144	0	3600	300000	7,8	0,4
G	18	12,8		36	20	36	4100	779	246	2296	779	0	0	4100	200000	8,2	0,6
H	16	12,1		38	24	32	5100	1632	363	2040	459	0	0	5100	200000	7,8	0,6
P2.1	ID	Hemácias	Hemoglobina	Hematócrito	VCM	CHCM	Leucócitos	Neutrófilos	Bastonetes	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos	Basófilos	Total	Plaquetas	Proteína	Fibrinogênio
A	17	10,5		30	35	35	9000	3780	0	4320	630	270	0	9000	300000	6,6	0,2
B	14	9,5		28	20	34	8200	2928	0	5084	32	656	0	8200	360000	6,6	0,2
C	17	10,2		30	17	34	4800	1728	96	2784	192	0	0	4800	240000	7,6	0,4
D	19	9,5		27	14	35	4700	987	282	2585	752	94	0	4700	300000	2,6	0,4
E	15	11,3		34	23	33	10900	2245	238	2211	327	139	0	10900	430000	7,4	0,4
F	16	9,66		30	19	32	3800	1140	0	2242	418	0	0	3800	250000	7,6	0,6
G	17	11,3		32	29	32	6500	2765	3835	3835	6500	650	0	6500	295000	8,2	0,6
H	16	11,4		33	20	35	3400	952	68	1904	476	0	0	3400	200000	7,6	1
P4	ID	Hemácias	Hemoglobina	Hematócrito	VCM	CHCM	Leucócitos	Neutrófilos	Bastonetes	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos	Basófilos	Total	Plaquetas	Proteína	Fibrinogênio
A	17	10,5		31	19	34	8200	2928	0	5084	32	656	0	8200	360000	6,6	0,2
B	17	9,5		29	17	33	8500	5440	0	2720	630	126	0	8500	300000	7,2	0,2
C	17	10		29	17	34	6300	2709	0	3402	340	0	0	6300	280000	7,2	0,2
D	15	10		29	19	33	3700	1166	0	3700	399	0	0	3700	300000	7,8	0,4
E	16	10,7		32	21	33	9800	3430	0	5684	490	196	0	9800	300000	6,8	0,4
F	15	10,8		30	19	33	3900	1520	0	2320	40	79	0	3900	300000	7,6	0,4
G	17	12,6		36	21	35	7200	2952	72	3600	576	0	0	7200	200000	7,6	0,4
H	16	12		36	22	33	4200	1764	168	1974	252	42	0	4200	200000	7,2	0,4
P4.1	ID	Hemácias	Hemoglobina	Hematócrito	VCM	CHCM	Leucócitos	Neutrófilos	Bastonetes	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos	Basófilos	Total	Plaquetas	Proteína	Fibrinogênio
A	16	10,9		31	19	35	8400	2184	0	5124	420	672	0	8400	340000	6,6	0,4
B	18	9,4		28	16	34	7650	4361	0	3137	153	0	0	7650	350000	7,2	0,2
C	15	10		30	19	30	3500	1245	140	3900	399	0	0	3500	227000	7,2	0,2
D	17	10,3		34	24	30	3850	1386	193	2002	193	77	0	3850	360000	7,6	0,6
E	14	11,4		32	14	36	4500	1080	0	3080	385	0	55	4500	300000	7,2	0,4
F	14	11,4		26	18	43	4650	2484	46	1840	230	0	0	4650	400000	6,8	0,4
G	17	12,2		38	23	32	4000	1520	0	2120	280	80	0	4000	260000	7,8	0,4
H	16	12,3		35	22	35	2800	1092	56	1288	398	56	0	2800	350000	7,2	0,6
P4.2	ID	Hemácias	Hemoglobina	Hematócrito	VCM	CHCM	Leucócitos	Neutrófilos	Bastonetes	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos	Basófilos	Total	Plaquetas	Proteína	Fibrinogênio
A	16	11,2		31	19	36	4100	1107	0	2788	0	205	0	4100	140000	6,8	0,2
B	14	9,7		27	19	36	3900	1207	0	3183	30	0	0	3900	348000	6,8	0,2
C	16	10,6		30	19	35	3000	1170	90	1680	30	30	0	3000	160000	7,2	0,4
D	16	10,4		30	19	35	3400	1632	0	1590	68	170	0	3400	300000	2,6	0,4
E	14	11,1		32	21	33	2450	748	0	3280	322	0	0	2450	320000	7,6	0,4
F	13	10,3		29	22	36	3450	1863	0	1449	104	35	0	3450	400000	6,8	0,4
G	17	12,9		36	21	36	3800	1482	236	2362	156	0	0	3800	480000	7,8	0,6
H	14	11,8		38	27	34	2400	1008	24	1272	96	0	0	2400	140000	7,2	0,4
P6	ID	Hemácias	Hemoglobina	Hematócrito	VCM	CHCM	Leucócitos	Neutrófilos	Bastonetes	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos	Basófilos	Total	Plaquetas	Proteína	Fibrinogênio
A	17	11,1		34	19	33	7900	2133	0	5135	79	553	0	7900	400000	7,2	0,4
B	17	9,9		31	18	32	6700	3417	67	2948	268	0	0	6700	300000	7,2	0,2
C	15	10,2		32	21	32	5800	3016	116	2552	0	116	0	5800	260000	7,1	0,4
D	16	10,7		34	21	33	8800	4916	128	2992	176	88	0	8800	400000	7,6	0,4
E	15	11,4		37	24	31	13300	4921	0	8246	133	0	0	13300	350000	7,2	0,4
F	14	10,3		24	23	24	7400	3522	0	3700	148	0	0	7400	350000	6,8	0,4
G	14	13,3		42	29	32	12400	4836	0	7192	248	124	0	12400	360000	8,2	0,6
H	16	12,4		38	24	33	7750	3220	0	3875	155	0	0	7750	400000	7,2	0,4
P7	ID	Hemácias	Hemoglobina	Hematócrito	VCM	CHCM	Leucócitos	Neutrófilos	Bastonetes	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos	Basófilos	Total	Plaquetas	Proteína	Fibrinogênio
A	14	11,4		34	19	34	11000	3630	0	7150	110	110	0	11000	240000	7,4	0,4
B	18	10,4		30	17	35	8150	3668	0	4320	82	81,5	0	8150	300000	8,2	0,4
C	15	9,9		23	18	43	4800	1472	0	3568	144	48	0	4800	240000	7,4	0,4
D	18	11		33	19	33	9650	5501	0	3764	193	193	0	9650	350000	8,2	0,4
E	19	11,2		32	17	32	11000	4100	0	5900	110	0	0	11000	430000	7,6	0,4
F	17	10,3		30	18	34	6950	3025	121	2904	0	0	0	6950	180000	7,6	0,6
G	19	12,8		36	18	36	6800	2176	0	4216	204	204	0	6800	260000	8,2	0,6
H	17	12,2		35	20	35	5900	2900	100	3890	260	100	0	5900	400000	7,6	0,2
P8	ID	Hemácias	Hemoglobina	Hematócrito	VCM	CHCM	Leucócitos	Neutrófilos	Bastonetes	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos	Basófilos	Total	Plaquetas	Proteína	Fibrinogênio
A	17	10		31	18	33	6000	2790	60	4100	574	0	0	6000	270000	6,6	0,2
B	15	10		29	18	30	4900	2107	0	3568	295	80	0	4900	210000	7,4	0,8
C	16	11		30	20	33	6900	3000	0	3660	295	61	0	6900	410000	7,6	0,6
D	14	11		23	34	34	6000	1620	120	4020	180	360	0	6000	550000		

Quadro S2 – Identificação de bactérias do leite de cabras por lactoculturas em ágar cromogênico Accumast® do úbere do lado direito, na fase de indução a infecção, transplante e da cabra doadora de microbiota (Cabra A).

Períodos	Secção 1	Secção 2	Secção 3
Ad-P0	N.D	N.D	N.D
Bd-P0	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
Cd-P0	<i>Pseudomonas</i> sp.	N.D	N.D
Dd-P0	<i>Escherichia coli</i>	<i>Lactococcus</i> sp.	N.D
	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
Ed-P0	N.D	N.D	N.D
Fd-P0	N.D	N.D	N.D
Gd-P0	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Streptococcus agalactiae</i> .	N.D
Hd-P0	N.D	N.D	N.D
Ad-P2	N.D	<i>Streptococcus agalactiae</i> .	N.D
Bd-P2	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Lactococcus</i> sp.	N.D
Cd-P2	N.D	N.D	N.D
Dd-P2	<i>Escherichia coli</i>	N.D	N.D
	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
Ed-P2	<i>Escherichia coli</i>	N.D	N.D
	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
Fd-P2	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
Gd-P2	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Streptococcus agalactiae</i> .	N.D
	N.D	<i>Aerococcus</i> sp.	N.D
Hd-P2	<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i> .	<i>Staphylococcus</i> SCN
	<i>Klebsiella</i> sp.		
Ad-P4	N.D	N.D	N.D
Bd-P4	<i>Escherichia coli</i>	<i>Lactococcus</i> sp.	N.D
	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> .	N.D
Cd-P4	N.D	N.D	<i>Staphylococcus</i> SCN
Dd-P4	<i>Levedura</i> sp.	<i>Lactococcus</i> sp.	N.D
Ed-P4	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
Fd-P4	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
Gd-P4	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Streptococcus agalactiae</i> .	N.D
	<i>Enterobacter</i> sp.	N.D	N.D
Hd-P4	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
Ad-P6	N.D	N.D	N.D
Bd-P6	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
Cd-P6	N.D	N.D	N.D
Dd-P6	<i>Escherichia coli</i>	<i>Lactococcus</i> sp.	N.D
	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D

Ed-P6	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
	<i>Enterobacter</i> sp.	N.D	N.D
Fd-P6	<i>Pseudomonas</i> sp.	N.D	N.D
Gd-P6	<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	N.D
	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Lactococcus</i> sp.	N.D
Hd-P6	<i>Pseudomonas</i> sp.	N.D	N.D
Ae-P8	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
Ad-P8	N.D	N.D	N.D
Bd-P8	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
Cd-P8	N.D	N.D	N.D
Dd-P8	<i>Escherichia coli</i>	<i>Lactococcus</i> sp.	N.D
	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
	<i>Enterobacter</i> sp.	N.D	N.D
Ed-P8	<i>Pseudomonas</i> sp.	N.D	N.D
	<i>Enterobacter</i> sp.	N.D	N.D
	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
Fd-P8	<i>Pseudomonas</i> sp.	N.D	N.D
		N.D	N.D
Gd-P8	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Streptococcus agalactiae</i> .	N.D
	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Lactococcus</i> sp.	N.D
Hd-P8	<i>Pseudomonas</i> sp.	N.D	N.D
Ae-P10	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Streptococcus agalactiae</i> .	N.D
Ad-P10	N.D	N.D	N.D
Bd-P10	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
Cd-P10	<i>Escherichia coli</i>	N.D	N.D
Dd-P10	<i>Escherichia coli</i>	<i>Lactococcus</i> sp.	N.D
	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
Ed-P10	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Lactococcus</i> sp.	N.D
	<i>Enterobacter</i> sp.	N.D	N.D
Fd-P10	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Aerococcus</i> sp.	N.D
Gd-P10	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
Hd-P10	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
Ae-P11	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
Ad-P11	N.D	N.D	N.D
Bd-P11	<i>Levedura</i> sp.	N.D	N.D
Cd-P11	<i>Escherichia coli</i>	N.D	N.D
Dd-P11	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
	<i>Levedura</i> sp.	N.D	N.D
Ed-P11	<i>Escherichia coli</i>	N.D	N.D
	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
	<i>Pseudomonas</i> sp.	N.D	N.D

Fd-P11	<i>Pseudomonas</i> sp.	N.D	N.D
Gd-P11	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
Hd-P11	<i>Escherichia coli</i>	N.D	N.D
Ae-P12	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Aerococcus</i> sp.	N.D
		<i>Lactococcus</i> sp.	N.D
Ad-P12	N.D	N.D	N.D
Bd-P12	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
Cd-P12	<i>Escherichia coli</i>	N.D	N.D
Dd-P12	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
	<i>Levedura</i> sp.	N.D	N.D
Ed-P12	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Aerococcus</i> sp.	<i>Staphylococcus aureus.</i>
		<i>Lactococcus</i> sp.	N.D
Fd-P12	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Streptococcus agalactiae.</i>	N.D
Gd-P12	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Aerococcus</i> sp.	N.D
Hd-P12	<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus agalactiae.</i>	N.D
Ae-Pca	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Streptococcus dysgalactiae.</i>	N.D
Ad-Pca	N.D	N.D	N.D
Bd-Pca	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Aerococcus</i> sp.	N.D
		<i>Lactococcus</i> sp.	N.D
Cd-Pca	<i>Escherichia coli.</i>	N.D	N.D
Dd-Pca	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Streptococcus agalactiae.</i>	N.D
	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Colônia desconhecida.</i>	N.D
		<i>Lactococcus</i> sp.	N.D
Ed-Pca	<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus agalactiae.</i>	<i>Staphylococcus aureus.</i>
		<i>Aerococcus viridans.</i>	N.D
Fd-Pca	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
Gd-Pca	<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	N.D
	<i>Pseudomonas</i> sp.	N.D	N.D
Hd-Pca	<i>Klebsiella</i> sp.	N.D	N.D
	<i>Pseudomonas</i> sp.	N.D	N.D

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela suplementar 1 - Caracterização do número de isolados identificados no leite das cabras durante período sadio, fase de infecção e transplante por meio do ágar cromogênico.

Sadios	Táxons	Porcentagens
<i>Escherichia coli</i>	1	14%
<i>Klebsiella sp.</i>	3	43%
<i>Pseudomonas sp.</i>	1	14%
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	14%
<i>Lactococcus sp.</i>	1	14%
Indução a Infecção	Táxons	Porcentagens
<i>Escherichia coli</i>	6	15%
<i>Klebsiella sp.</i>	15	38%
<i>Pseudomonas sp.</i>	2	5%
<i>Enterobacter sp.</i>	2	5%
<i>Streptococcus agalactiae</i>	5	13%
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1	1%
<i>Lactococcus sp.</i>	5	13%
<i>Aerococcus sp.</i>	1	3%
Staphylococcus coagulase negativa	2	5%
Levedura	1	3%
Transplante	Táxons	Porcentagens
<i>Escherichia coli</i>	11	14%
<i>Klebsiella sp.</i>	21	27%
<i>Pseudomonas sp.</i>	8	10%
<i>Enterobacter sp.</i>	5	6%
<i>Streptococcus agalactiae</i>	7	9%
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1	1%
<i>Lactococcus sp.</i>	7	9%
<i>Aerococcus sp.</i>	4	5%
<i>Aerococcus viridans</i>	1	1%
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	3%
Levedura	3	4%
Colônia desconhecida.	1	1%

Período de sadios (P0), fase de indução a infecção e transplante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADDIS, M. F. et al. The bovine milk microbiota: insights and perspectives from -omics studies. **Molecular bioSystems**, v. 12, n. 8, p. 2359–72, 2016a.
- ADDIS, M. F. et al. The bovine milk microbiota: insights and perspectives from -omics studies. **Molecular BioSystems**, v. 12, n. 8, p. 2359–2372, 19 jul. 2016b.
- ALBENZIO, M. et al. Prevalence and etiology of subclinical mastitis in intensively managed flocks and related changes in the yield and quality of ewe milk. **Small Ruminant Research**, v. 43, n. 3, p. 219–226, 1 mar. 2002.
- ALBENZIO, M. et al. Activities of indigenous proteolytic enzymes in caprine milk of different somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 11, p. 7587–7594, 1 nov. 2015.
- ALHUSSIEN, M. et al. A comparative study on the blood and milk cell counts of healthy, subclinical, and clinical mastitis Karan Fries cows. **Veterinary World**, v. 8, n. 5, p. 685, 2015.
- ALHUSSIEN, M. N.; PANDA, B. S. K.; DANG, A. K. A Comparative Study on Changes in Total and Differential Milk Cell Counts, Activity, and Expression of Milk Phagocytes of Healthy and Mastitic Indigenous Sahiwal Cows. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, p. 667, 21 jun. 2021.
- ALNAKIP, M. E. et al. The Immunology of Mammary Gland of Dairy Ruminants between Healthy and Inflammatory Conditions. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 2014, p. 1–31, 10 nov. 2014.
- AMEH, J. A. et al. Gangrenous caprine coliform mastitis. **Small Ruminant Research**, v. 13, n. 3, p. 307–309, 1994.
- ANDERSON, M. J.; WILLIS, T. J. Canonical analysis of principal coordinates: A useful method of constrained ordination for ecology. **Ecology**, v. 84, n. 2, p. 511–525, 2003.
- ARSENAULT, J. et al. Risk factors and impacts of clinical and subclinical mastitis in commercial meat-producing sheep flocks in Quebec, Canada. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 87, n. 3–4, p. 373–393, 17 nov. 2008.
- BAGNICKA, E. et al. Relationship between somatic cell count and bacterial pathogens in goat milk. **Small Ruminant Research**, v. 100, n. 1, p. 72–77, 1 set. 2011.
- BALABAN, N. Q. et al. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. **Nature Reviews Microbiology**, p. 1, 12 abr. 2019.
- BANERJEE, S.; SCHLAEPI, K.; VAN DER HEIJDEN, M. G. A. Keystone taxa as drivers of microbiome structure and functioning. **Nature reviews. Microbiology**, v. 16, n. 9, p. 567–576, 1 set. 2018.

- BARROSO-BATISTA, J.; DEMENGEOT, J.; GORDO, I. Adaptive immunity increases the pace and predictability of evolutionary change in commensal gut bacteria. **Nature Communications** 2015 **6:1**, v. 6, n. 1, p. 1–13, 30 nov. 2015.
- BAUNWALL, S. M. D. et al. Faecal microbiota transplantation for recurrent *Clostridioides difficile* infection: An updated systematic review and meta-analysis. **EClinicalMedicine**, v. 29–30, p. 100642, 1 dez. 2020.
- BERG, G. et al. **Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges.** **MicrobiomeBioMed Central Ltd**, 30 jun. 2020. Disponível em: <<https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-020-00875-0>>. Acesso em: 11 abr. 2021
- BERGONIER, D. et al. **Mastitis of dairy small ruminants.** **Veterinary Research**, set. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14556701>>. Acesso em: 15 maio. 2017
- BERNARDO-CRAVO, A. P. et al. Environmental Factors and Host Microbiomes Shape Host–Pathogen Dynamics. **Trends in Parasitology**, v. 36, n. 7, p. 616–633, 1 jul. 2020.
- BERNIER GOSSELIN, V. et al. Persistence of coagulase negative staphylococcal intramammary infections in dairy goats. **Journal of Dairy Research**, v. 86, n. 2, p. 211–216, 1 maio 2019.
- BHATT, V. D. et al. Milk microbiome signatures of subclinical mastitis-affected cattle analysed by shotgun sequencing. **Journal of applied microbiology**, v. 112, n. 4, p. 639–650, abr. 2012.
- BLAGITZ, M. G. et al. Apoptosis and necrosis of polymorphonuclear leukocytes in goat milk with high and low somatic cell counts. **Small Ruminant Research**, v. 100, n. 1, p. 67–71, 1 set. 2011.
- BOBBO, T.; PENASA, M.; CASSANDRO, M. Combining total and differential somatic cell count to better assess the association of udder health status with milk yield, composition and coagulation properties in cattle. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2020.1784804>, v. 19, n. 1, p. 697–703, 14 dez. 2020.
- BOIX-AMORÓS, A.; COLLADO, M. C.; MIRA, A. Relationship between milk microbiota, bacterial load, macronutrients, and human cells during lactation. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. APR, p. 492, 20 abr. 2016.
- BONSAGLIA, E. C. R. et al. Milk microbiome and bacterial load following dry cow therapy without antibiotics in dairy cows with healthy mammary gland. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017a.

- BONSAGLIA, E. C. R. et al. Milk microbiome and bacterial load following dry cow therapy without antibiotics in dairy cows with healthy mammary gland. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 8067, 14 dez. 2017b.
- BOUTIN, S. et al. Network Analysis Highlights Complex Interactions between Pathogen, Host and Commensal Microbiota. **PLOS ONE**, v. 8, n. 12, p. e84772, 23 dez. 2013.
- BRAUNER, A. et al. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 320–330, 2016.
- BRAY, J. R.; CURTIS, J. T. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. **Ecological Monographs**, v. 27, p. 325–349, 1957.
- BRODERICK, N. A.; RAFFA, K. F.; HANDELSMAN, J. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 41, p. 15196–15199, 10 out. 2006.
- BROWN, S. P.; CORNFORTH, D. M.; MIDEO, N. Evolution of virulence in opportunistic pathogens: generalism, plasticity, and control. **Trends in Microbiology**, v. 20, n. 7, p. 336–342, 1 jul. 2012.
- BUELOW, K. L. et al. Effect of milk sample collection strategy on the sensitivity and specificity of bacteriologic culture and somatic cell count for detection of *Staphylococcus aureus* intramammary infection in dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 26, n. 1, p. 1–8, fev. 1996.
- BUKIN, Y. S. et al. The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. **Scientific Data 2019 6:1**, v. 6, n. 1, p. 1–14, 5 fev. 2019.
- CABRERA-RUBIO, R. et al. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. **The American journal of clinical nutrition**, v. 96, n. 3, p. 544–551, 1 set. 2012.
- CALLAHAN, B. J. et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, v. 13, n. 7, p. 581–583, 2016.
- CALLAHAN, B. J.; MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. P. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. **The ISME Journal**, v. 11, n. 12, p. 2639–2643, dez. 2017.
- CAPORASO, J. G. et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME Journal**, v. 6, n. 8, p. 1621–1624, 2012.
- CASSIR, N. et al. Non-contiguous finished genome sequence and description of *Bacteroides neonati* sp. nov., a new species of anaerobic bacterium. **Standards in Genomic Sciences 2014 9:3**, v. 9, n. 3, p. 794, 15 jun. 2014.

- CHAO, A. Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population. **Scandinavian Journal of Statistics**, v. 11, n. 4, p. 265–270, 27 out. 1984.
- CHEEMA, A. S. et al. Exclusively Breastfed Infant Microbiota Develops over Time and Is Associated with Human Milk Oligosaccharide Intakes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 5, 1 mar. 2022.
- CHEN, H.; BOUTROS, P. C. VennDiagram: A package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. **BMC Bioinformatics**, v. 12, n. 1, p. 35, 26 jan. 2011.
- CHROSTEK, E. et al. Wolbachia Variants Induce Differential Protection to Viruses in *Drosophila melanogaster*: A Phenotypic and Phylogenomic Analysis. **PLOS Genetics**, v. 9, n. 12, p. e1003896, 2013.
- CLARK, S.; MORA GARCÍA, M. B. A 100-Year Review: Advances in goat milk research. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 10026–10044, 1 dez. 2017a.
- CLARK, S.; MORA GARCÍA, M. B. A 100-Year Review: Advances in goat milk research. **Journal of dairy science**, v. 100, n. 12, p. 10026–10044, 1 dez. 2017b.
- CLARKE, T. B. et al. Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity. **Nature Medicine** 2010 **16:2**, v. 16, n. 2, p. 228–231, 17 jan. 2010.
- COCHRAN, W. G.; CHAMBERS, S. P. The Planning of Observational Studies of Human Populations. **Journal of the Royal Statistical Society. Series A (General)**, v. 128, n. 2, p. 234, 1965.
- CONDAS, L. A. Z. et al. Prevalence of non-aureus staphylococci species causing intramammary infections in Canadian dairy herds. **Journal of dairy science**, v. 100, n. 7, p. 5592–5612, 1 jul. 2017a.
- CONDAS, L. A. Z. et al. Distribution of non-aureus staphylococci species in udder quarters with low and high somatic cell count, and clinical mastitis. **Journal of dairy science**, v. 100, n. 7, p. 5613–5627, 1 jul. 2017b.
- CONTRERAS, A. et al. Physiological threshold of somatic cell count and California Mastitis Test for diagnosis of caprine subclinical mastitis. **Small Ruminant Research**, v. 21, n. 3, p. 259–264, 1996.
- CONTRERAS, A. et al. Evaluation of selected antibiotic residue screening tests for milk from individual goats. **Journal of dairy science**, v. 80, n. 6, p. 1113–1118, jun. 1997.
- CONTRERAS, A. et al. Mastitis in small ruminants. **Small Ruminant Research**, v. 68, n. 1, p. 145–153, 2007.

- CORONA-CERVANTES, K. et al. **Variation of the Human Milk Bacterial Diversity during the Time of the Day**. MDPI AG, 12 jan. 2021.
- CORRALES, J. C. et al. Contagious agalactia in small ruminants. **Small Ruminant Research**, v. 68, n. 1, p. 154–166, 2007.
- COSTEA, P. I. et al. Towards standards for human fecal sample processing in metagenomic studies. **Nature Biotechnology**, 2017.
- CÔTÉ-GRAVEL, J.; MALOUIN, F. Symposium review: Features of *Staphylococcus aureus* mastitis pathogenesis that guide vaccine development strategies. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 5, p. 4727–4740, 1 maio 2019.
- CREMONESI, P. et al. Response of the goat mammary gland to infection with *Staphylococcus aureus* revealed by gene expression profiling in milk somatic and white blood cells. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 1–17, 9 out. 2012.
- CRYAN, J. F.; O'MAHONY, S. M. The microbiome-gut-brain axis: from bowel to behavior. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 23, n. 3, p. 187–192, 1 mar. 2011.
- DA SILVA, E. R. et al. Identification and in vitro antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* species isolated from goat mastitis in the Northeast of Brazil. **SMALL RUMINANT RESEARCH**, v. 55, n. 1–3, p. 45–49, 2004a.
- DA SILVA, E. R. et al. Identification and in vitro antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* species isolated from goat mastitis in the Northeast of Brazil. **Small Ruminant Research**, v. 55, n. 1–3, p. 45–49, 1 out. 2004b.
- DE CRÉMOUX, R. et al. Cell counts for diagnosing caprine bacterial mammary infections. **Somatic Cells and Milk of Small Ruminants; Pudoc: Wageningen, The Netherlands**, p. 35–39, 1996.
- DE MORAES PEIXOTO, R. et al. Treatment of goat mastitis experimentally induced by *Staphylococcus aureus* using a formulation containing *Hymenaea martiana* extract. **Small Ruminant Research**, v. 130, p. 229–235, 1 set. 2015.
- DE PAIVA ANCIENS RAMOS, G. L.; DOS SANTOS NASCIMENTO, J. Characterization of *Acinetobacter* spp. from raw goat Milk. **Ciência Rural**, v. 49, n. 10, 23 set. 2019.
- DEINHOFER, M.; PERNTNER, A. *Staphylococcus* spp. as mastitis-related pathogens in goat milk. **Veterinary Microbiology**, v. 43, n. 2–3, p. 161–166, 1 fev. 1995a.
- DEINHOFER, M.; PERNTNER, A. *Staphylococcus* spp. as mastitis-related pathogens in goat milk. **Veterinary Microbiology**, v. 43, n. 2–3, p. 161–166, 1 fev. 1995b.

- DELLA LIBERA, A. et al. Somatic Cell and Differential Leukocytes Count in Relation to California Mastitis Test in Santa Ines Ewes' Milk. **Indian Veterinary Journal**, v. 88, n. 9, p. 19, 2011.
- DER HAM], M. [PRATS-VAN et al. Molecular resistance mechanisms of *Mycoplasma agalactiae* to macrolides and lincomycin. **Veterinary Microbiology**, v. 211, p. 135–140, 2017.
- DERAKHSHANI, H. et al. Invited review: Microbiota of the bovine udder: Contributing factors and potential implications for udder health and mastitis susceptibility. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 12, p. 10605–10625, 1 dez. 2018a.
- DERAKHSHANI, H. et al. Invited review: Microbiota of the bovine udder: Contributing factors and potential implications for udder health and mastitis susceptibility. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 12, p. 10605–10625, 1 dez. 2018b.
- DORE, S. et al. Survey on small ruminant bacterial mastitis in Italy, 2013–2014. **Small Ruminant Research**, v. 141, p. 91–93, 2016.
- DOSSANTOS, L. D.; CASTRO, R. S.; DACOSTA, E. O. CALIFORNIA-MASTITIS AND MODIFIED-WHITESIDE TESTS AS SCREENING TO CAPRINE MASTITIS. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 295–298, 1995.
- ECKHARDT, M. et al. A systems approach to infectious disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 21, n. 6, p. 339–354, 2020a.
- ECKHARDT, M. et al. A systems approach to infectious disease. **Nature Reviews Genetics**, p. 1–16, 14 fev. 2020b.
- EDGAR, R. C. Updating the 97% identity threshold for 16S ribosomal RNA OTUs. **Bioinformatics**, v. 34, n. 14, p. 2371–2375, 15 jul. 2018.
- ELIZABETH PISANI. Antimicrobial resistance: What does medicine quality have to do with it? **Antimicrobial Resistance and Medicine Quality**, p. 1–45, nov. 2015.
- ESPER, A. M. et al. The role of infection and comorbidity: Factors that influence disparities in sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 34, n. 10, p. 2576–2582, out. 2006.
- ESTEBAN-BLANCO, C. et al. Microbiota characterization of sheep milk and its association with somatic cell count using 16s rRNA gene sequencing. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 137, n. 1, p. 73–83, 1 jan. 2020.
- FAN, Y.; PEDERSEN, O. Gut microbiota in human metabolic health and disease. **Nature reviews. Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 55–71, 1 jan. 2021.
- FEDERHEN, S. The NCBI Taxonomy database. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. D136–D143, 1 jan. 2012.

- FESSLER, A. T. et al. Identification and characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 65, n. 8, p. 1576–1582, 5 jun. 2010.
- FLORES, G. E. et al. Temporal variability is a personalized feature of the human microbiome. **Genome biology**, v. 15, n. 12, p. 531, 2014.
- FONS, M.; GOMEZ, A.; KARJALAINEN, T. Mechanisms of Colonisation and Colonisation Resistance of the Digestive Tract Part 2: Bacteria/Bacteria Interactions. <http://dx.doi.org/10.1080/089106000750060495>, v. 12, n. SUPPL. 2, p. 240–246, 2009.
- FORD, S. A. et al. Microbe-mediated host defence drives the evolution of reduced pathogen virulence. **Nature Communications** 2016 7:1, v. 7, n. 1, p. 1–9, 15 nov. 2016.
- FORD, S. A.; KING, K. C. Harnessing the Power of Defensive Microbes: Evolutionary Implications in Nature and Disease Control. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 4, p. e1005465, 1 abr. 2016.
- FRANCO-LOPEZ, J. et al. Correlations between the Composition of the Bovine Microbiota and Vitamin B 12 Abundance . **mSystems**, v. 5, n. 2, 28 abr. 2020.
- FREITAS GUIMARÃES, F. et al. Comparison phenotypic and genotypic identification of Staphylococcus species isolated from bovine mastitis 1. **Pesq. Vet. Bras**, v. 36, n. 12, p. 1160–1164, 2016.
- GAMAGE, S. D. et al. Diversity and host range of Shiga toxin-encoding phage. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 12, p. 7131–7139, dez. 2004.
- GANDA, E. K. et al. Evaluation of an on-farm culture system (Accumast) for fast identification of milk pathogens associated with clinical mastitis in dairy cows. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. e0155314, 13 maio 2016.
- GANDA, E. K. et al. Normal milk microbiome is reestablished following experimental infection with Escherichia coli independent of intramammary antibiotic treatment with a third-generation cephalosporin in bovines. **Microbiome**, v. 5, n. 1, p. 74, 12 jul. 2017.
- GARCÍA-BAYONA, L.; COMSTOCK, L. E. Bacterial antagonism in host-associated microbial communities. **Science**, v. 361, n. 6408, 21 set. 2018.
- GARIRA, W. The Replication-Transmission Relativity Theory for Multiscale Modelling of Infectious Disease Systems. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–17, dez. 2019a.
- GARIRA, W. The Replication-Transmission Relativity Theory for Multiscale Modelling of Infectious Disease Systems. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–17, 1 dez. 2019b.
- GIRAFFA, G. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. **FEMS microbiology reviews**, v. 28, n. 2, p. 251–260, maio 2004.

- GRUNERT, T. et al. Distinct phenotypic traits of *Staphylococcus aureus* are associated with persistent, contagious bovine intramammary infections. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 15968, dez. 2018.
- GWAK, H. J.; RHO, M. Data-Driven Modeling for Species-Level Taxonomic Assignment From 16S rRNA: Application to Human Microbiomes. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 2866, 12 nov. 2020.
- HAENLEIN, G. F. W. Relationship of somatic cell counts in goat milk to mastitis and productivity. **Small Ruminant Research**, v. 45, n. 2, p. 163–178, 2002.
- HALASA, T. et al. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. **Veterinary Quarterly**, v. 29, n. 1, p. 18–31, 2007.
- HARIHARAN, H. et al. Isolation of *Escherichia fergusonii* from the feces and internal organs of a goat with diarrhea. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 48, n. 6, p. 630, jun. 2007.
- HEDRICK, R. P. Relationships of the host, pathogen, and environment: Implications for diseases of cultured and wild fish populations. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 10, n. 2, p. 107–111, 1998.
- HILTON, S. K. et al. Metataxonomic and metagenomic approaches vs. culture-based techniques for clinical pathology. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. APR, p. 1–12, 2016.
- HOFFMANN, R. P. **Diagnóstico de parasitismo veterinário**. [s.l.] Sulina, 1987.
- HOGAN, J. S. et al. Laboratory handbook on bovine mastitis. **National Mastitis Council, Madison, WI**, p. 6–10, 1999.
- HOQUE, M. N. et al. Metagenomic deep sequencing reveals association of microbiome signature with functional biases in bovine mastitis. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.
- HOSSEINZADEH, S.; DASTMALCHI SAEI, H. Staphylococcal species associated with bovine mastitis in the North West of Iran: Emerging of coagulase-negative staphylococci. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 27–34, 1 jun. 2014.
- HOU, K. et al. Microbiota in health and diseases. **Signal Transduction and Targeted Therapy** **2022 7:1**, v. 7, n. 1, p. 1–28, 23 abr. 2022.
- HU, X. et al. The gut microbiota contributes to the development of *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in mice. **ISME Journal**, v. 14, n. 7, p. 1897–1910, 1 jul. 2020.
- HUANG, C. et al. Ulcerative Colitis in Response to Fecal Microbiota Transplantation via Modulation of Gut Microbiota and Th17/Treg Cell Balance. **Cells**, v. 11, n. 11, p. 1851, 5 jun. 2022.
- HUNT, K. M. et al. Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, p. e21313, 17 jun. 2011.

- IBM. IBM SPSS Advanced Statistics 20. **Ibm**, p. 184, 2012.
- IBRAHIM, M. et al. Current trends of antimicrobials used in food animals and aquaculture. **Antibiotics and Antimicrobial Resistance Genes in the Environment**, p. 39, 1 jan. 2020.
- ISHIKAWA, M. et al. Presence of halophilic and alkaliphilic lactic acid bacteria in various cheeses. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 308–313, 1 mar. 2007.
- JARI OKSANEN, F. GUILLAUME BLANCHET, MICHAEL FRIENDLY, ROELAND KINDT, PIERRE LEGENDRE, DAN MCGLINN, P.; R. MINCHIN, R. B. O'HARA, GAVIN L. SIMPSON, PETER SOLYMOS, M. HENRY H. STEVENS, E. S. AND H. W. **vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5-6.** , 2019.
- JEURINK, P. V. et al. Human milk: A source of more life than we imagine. **Beneficial Microbes**, v. 4, n. 1, p. 17–30, 2013.
- JOCHUM, L.; STECHER, B. Label or Concept – What Is a Pathobiont? **Trends in Microbiology**, v. 28, n. 10, p. 789–792, 1 out. 2020.
- KACZOROWSKI, Ł. et al. The Influence of Bacteria Causing Subclinical Mastitis on the Structure of the Cow's Milk Microbiome. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 27, n. 6, 1 mar. 2022.
- KELLY, C. R. et al. Effect of fecal microbiota transplantation on recurrence in multiply recurrent clostridium difficile infection a randomized trial. **Annals of Internal Medicine**, v. 165, n. 9, p. 609–616, 1 nov. 2016.
- KILIC, A. et al. Acinetobacter septicus sp. nov. association with a nosocomial outbreak of bacteremia in a neonatal intensive care unit. **Journal of clinical microbiology**, v. 46, n. 3, p. 902–908, mar. 2008.
- KIM, H. S. et al. Longitudinal evaluation of fecal microbiota transplantation for ameliorating calf diarrhea and improving growth performance. **Nature Communications 2021 12:1**, v. 12, n. 1, p. 1–16, 8 jan. 2021.
- KING, K. C. et al. Rapid evolution of microbe-mediated protection against pathogens in a worm host. **The ISME Journal 2016 10:8**, v. 10, n. 8, p. 1915–1924, 15 mar. 2016.
- KOOP, G. et al. Differences between coagulase-negative Staphylococcus species in persistence and in effect on somatic cell count and milk yield in dairy goats. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 9, p. 5075–5084, 1 set. 2012a.
- KOOP, G. et al. Differences between coagulase-negative Staphylococcus species in persistence and in effect on somatic cell count and milk yield in dairy goats. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 9, p. 5075–5084, 1 set. 2012b.

- KOOTTE, R. S. et al. **The therapeutic potential of manipulating gut microbiota in obesity and type 2 diabetes mellitus.** *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 2012.
- KOSKELLA, B.; PARR, N. The evolution of bacterial resistance against bacteriophages in the horse chestnut phyllosphere is general across both space and time. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 370, n. 1675, 19 ago. 2015.
- KUCHTÍK, J. et al. Changes in the somatic cells counts and total bacterial counts in raw goat milk during lactation and their relationships to selected milk traits. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2021.1913077>, v. 20, n. 1, p. 911–917, 2021.
- KUEHN, J. S. et al. Bacterial Community Profiling of Milk Samples as a Means to Understand Culture-Negative Bovine Clinical Mastitis. *PLoS ONE*, v. 8, n. 4, p. e61959, 25 abr. 2013.
- KUMAR, H. et al. Nutritional and nutraceutical properties of goat milk - a review. *Indian Journal of Dairy Science*, v. 69, n. 5, p. 513–518, 2016.
- KUROKAWA, S. et al. The effect of fecal microbiota transplantation on psychiatric symptoms among patients with irritable bowel syndrome, functional diarrhea and functional constipation: An open-label observational study. *Journal of Affective Disorders*, v. 235, p. 506–512, 1 ago. 2018.
- KUROSE, D. et al. Endophytic fungi associated with *Fallopia japonica* (Polygonaceae) in Japan and their interactions with *Puccinia polygami-amphibii* var. *tovariae*, a candidate for classical biological control. *Fungal Biology*, v. 116, n. 7, p. 785–791, 1 jul. 2012.
- KWONG, W. K.; MANCENIDO, A. L.; MORAN, N. A. Immune system stimulation by the native gut microbiota of honey bees. *Royal Society Open Science*, v. 4, n. 2, 8 fev. 2017.
- LAFI, S. Q. Use of somatic cell counts and California Mastitis Test results from udder halves milk samples to detect subclinical intramammary infection in Awassi sheep. *Small Ruminant Research*, v. 62, n. 1–2, p. 83–86, 1 mar. 2006.
- LEE, P.; YACYSHYN, B. R.; YACYSHYN, M. B. Gut microbiota and obesity: An opportunity to alter obesity through faecal microbiota transplant (FMT). *Diabetes, Obesity and Metabolism*, v. 21, n. 3, p. 479–490, 1 mar. 2019.
- LEGENDRE, P.; GALLAGHER, E. D. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia* **2001 129:2**, v. 129, n. 2, p. 271–280, 1 out. 2001.
- LEGGETT, H. C.; CORNWALLIS, C. K.; WEST, S. A. Mechanisms of Pathogenesis, Infective Dose and Virulence in Human Parasites. *PLOS Pathogens*, v. 8, n. 2, p. e1002512, fev. 2012.

- LEITNER, G. et al. Udder disease etiology, milk somatic cell counts and NAGase activity in Israeli Assaf sheep throughout lactation. **Small Ruminant Research**, v. 39, n. 2, p. 107–112, 1 fev. 2001.
- LEITNER, G.; MERIN, U.; SILANIKOVE, N. Changes in Milk Composition as Affected by Subclinical Mastitis in Goats. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 6, p. 1719–1726, 1 jun. 2004.
- LI, J. et al. Gut microbiota dysbiosis contributes to the development of hypertension. **Microbiome**, v. 5, n. 1, p. 1–19, 1 fev. 2017.
- LI, N. et al. Variation in Raw Milk Microbiota Throughout 12 Months and the Impact of Weather Conditions. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.
- LI, Y. et al. Changes in Intestinal Flora and Metabolites in Neonates With Breast Milk Jaundice. **Frontiers in Pediatrics**, v. 8, p. 177, 12 maio 2020.
- LIANOU, D. T. et al. Association of Breed of Sheep or Goats with Somatic Cell Counts and Total Bacterial Counts of Bulk-Tank Milk. **Applied Sciences 2021, Vol. 11, Page 7356**, v. 11, n. 16, p. 7356, 10 ago. 2021.
- LIMA, A. A. M. et al. Effects of Clostridium difficile toxins A and B in rabbit small and large intestine in vivo and on cultured cells in vitro. **Infection and Immunity**, v. 56, n. 3, p. 582–588, 1988.
- LO VECCHIO, A.; COHEN, M. B. Fecal microbiota transplantation for Clostridium difficile infection: Benefits and barriers. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 30, n. 1, p. 47–53, jan. 2014.
- LOPES, J. E. F. et al. Relationship between total bacteria counts and somatic cell counts from mammary quarters infected by mastitis pathogens. **Ciência Rural**, v. 42, n. 4, p. 691–696, abr. 2012.
- LUKJANCENKO, O.; WASSENAAR, T. M.; USSERY, D. W. Comparison of 61 Sequenced Escherichia coli Genomes. **Microbial Ecology**, v. 60, n. 4, p. 708–720, 11 nov. 2010.
- MA, C. et al. Cow-to-mouse fecal transplantations suggest intestinal microbiome as one cause of mastitis. **Microbiome**, v. 6, n. 1, 8 nov. 2018.
- MA, Z. (SAM); LI, L.; GOTELLI, N. J. Diversity-disease relationships and shared species analyses for human microbiome-associated diseases. **The ISME Journal 2019 13:8**, v. 13, n. 8, p. 1911–1919, 20 mar. 2019.
- MALIK, B.; BHATTACHARYYA, S. Antibiotic drug-resistance as a complex system driven by socio-economic growth and antibiotic misuse. **Scientific Reports 2019 9:1**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 5 jul. 2019.

- MARCHESI, J. R.; RAVEL, J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. **Microbiome** **2015** **3:1**, v. 3, n. 1, p. 1–3, 30 jul. 2015.
- MARINO, M. et al. Safety-related properties of staphylococci isolated from food and food environments. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, n. 2, p. 550–561, 1 fev. 2011.
- MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. **EMBnet.journal**, v. 17, n. 1, p. 10–12, 2 maio 2011.
- MARTÍN, R. et al. Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. **Research in Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 31–37, jan. 2007.
- MARTINEZ ARBIZU, P. **pairwiseAdonis: Pairwise multilevel comparison using adonis. R package version 0.4.** , 2020.
- MARTINEZ, J. et al. Should Symbionts Be Nice or Selfish? Antiviral Effects of Wolbachia Are Costly but Reproductive Parasitism Is Not. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 7, p. e1005021, 1 jul. 2015.
- MCDOUGALL, S. et al. Relationships among somatic cell count, California mastitis test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. **Small ruminant research: the journal of the International Goat Association**, v. 40, n. 3, p. 245–254, 2001.
- MCDOUGALL, S. et al. Diagnosis and treatment of subclinical mastitis in early lactation in dairy goats. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 10, p. 4710–4721, 1 out. 2010.
- MCINNIS, E. A. et al. Analysis of raw goat milk microbiota: Impact of stage of lactation and lysozyme on microbial diversity. **Food Microbiology**, v. 46, p. 121–131, 2015a.
- MCINNIS, E. A. et al. Analysis of raw goat milk microbiota: Impact of stage of lactation and lysozyme on microbial diversity. **Food Microbiology**, v. 46, p. 121–131, abr. 2015b.
- MCKENZIE, W. N.; ANDERSON, R. R. Endotoxin Induced Migration of Leukocytes from Blood to Milk. **Journal of Dairy Science**, v. 64, n. 2, p. 227–235, 1 fev. 1981.
- MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. **PLoS ONE**, 2013a.
- MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. **PLoS ONE**, 2013b.
- MCMURTRY, V. E. et al. Bacterial diversity and Clostridia abundance decrease with increasing severity of necrotizing enterocolitis. **Microbiome**, v. 3, n. 1, 25 mar. 2015.
- MCNALLY, L.; VALE, P. F.; BROWN, S. P. Microbiome engineering could select for more virulent pathogens. **bioRxiv**, p. 027854, 30 set. 2015.

- MENZIES, P. I.; RAMANOON, S. Z. Mastitis of Sheep and Goats. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 17, n. 2, p. 333–358, 2001a.
- MENZIES, P. I.; RAMANOON, S. Z. Mastitis of Sheep and Goats. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 17, n. 2, p. 333–358, 1 jul. 2001b.
- MENZIES, P. I.; RAMANOON, S. Z. Mastitis of sheep and goats. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 17, n. 2, p. 333–358, 1 jul. 2001c.
- MICHAEL AKERS, R. A 100-Year Review: Mammary development and lactation. 2017.
- MILLER, B. A.; LU, C. D. — Special Issue — Current status of global dairy goat production: An overview. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 32, n. 8, p. 1219–1232, 2019.
- MIN, B. R.; TOMITA, G.; HART, S. P. Effect of subclinical intramammary infection on somatic cell counts and chemical composition of goats' milk. **The Journal of dairy research**, v. 74, n. 2, p. 204–210, maio 2007.
- MORONI, P. et al. Subclinical mastitis and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus caprae* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from two Italian goat herds. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 5, p. 1694–1704, 1 maio 2005a.
- MORONI, P. et al. Risk factors for intramammary infections and relationship with somatic-cell counts in Italian dairy goats. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 69, n. 3–4, p. 163–173, 12 jul. 2005b.
- MUHAMMAD, A. et al. Intestinal Microbiota Confer Protection by Priming the Immune System of Red Palm Weevil *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera: Dryophthoridae). **Frontiers in Physiology**, v. 10, p. 1303, 16 out. 2019a.
- MUHAMMAD, A. et al. Intestinal Microbiota Confer Protection by Priming the Immune System of Red Palm Weevil *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera: Dryophthoridae). **Frontiers in Physiology**, v. 10, p. 1303, 16 out. 2019b.
- MUHAMMAD, A. et al. Intestinal Microbiota Confer Protection by Priming the Immune System of Red Palm Weevil *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera: Dryophthoridae). **Frontiers in Physiology**, v. 10, p. 1303, 16 out. 2019c.
- NOVAC, C. S.; ANDREI, S. The Impact of Mastitis on the Biochemical Parameters, Oxidative and Nitrosative Stress Markers in Goat's Milk: A Review. **Pathogens**, v. 9, n. 11, p. 1–23, 1 nov. 2020a.
- NOVAC, C. S.; ANDREI, S. The Impact of Mastitis on the Biochemical Parameters, Oxidative and Nitrosative Stress Markers in Goat's Milk: A Review. **Pathogens**, v. 9, n. 11, p. 1–23, 1 nov. 2020b.

- NTOUGIAS, S.; RUSSELL, N. J. *Alkalibacterium olivoapovliticus* gen. nov., sp. nov., a new obligately alkaliphilic bacterium isolated from edible-olive wash-waters. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 1161–1170, 1 maio 2001.
- NUNES, G. R. et al. EVALUATION OF THE INDICATORS OF INFLAMMATION IN THE DIAGNOSIS OF OVINE MASTITIS. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75, n. 3, p. 271–278, 15 set. 2008.
- OGAWA, M. et al. Protective effect of *Lactobacillus casei* strain Shirota on Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 infection in infant rabbits. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 2, p. 1101–1108, 2001.
- OHARA, T. Identification of the microbial diversity after fecal microbiota transplantation therapy for chronic intractable constipation using 16s rRNA amplicon sequencing. **PLOS ONE**, v. 14, n. 3, p. e0214085, 1 mar. 2019.
- OIKONOMOU, G. et al. Microbial Diversity of Bovine Mastitic Milk as Described by Pyrosequencing of Metagenomic 16s rDNA. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, 2012.
- OIKONOMOU, G. et al. Microbiota of Cow's Milk; Distinguishing Healthy, Sub-Clinically and Clinically Diseased Quarters. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e85904, jan. 2014a.
- OIKONOMOU, G. et al. Microbiota of Cow's Milk; Distinguishing Healthy, Sub-Clinically and Clinically Diseased Quarters. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e85904, 20 jan. 2014b.
- OIKONOMOU, G. et al. Milk Microbiota: What Are We Exactly Talking About? **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 60, 14 fev. 2020.
- OOIJEVAAR, R. E. et al. Clinical Application and Potential of Fecal Microbiota Transplantation. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-111717-122956>, v. 70, p. 335–351, 28 jan. 2019.
- OTTMAN, N. et al. The function of our microbiota: who is out there and what do they do? **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, p. 104, 2012.
- PAAPE, M. et al. Defense of the Bovine Mammary Gland by Polymorphonuclear Neutrophil Leukocytes. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia** 2002 7:2, v. 7, n. 2, p. 109–121, abr. 2002.
- PALLEN, M. J. The human microbiome and host-pathogen interactions. **Metagenomics of the Human Body**, p. 43–61, 2011.
- PEIXOTO, R. DE M.; MOTA, R. A.; DA COSTA, M. M. Small ruminant mastitis in Brazil. **PESQUISA VETERINARIA BRASILEIRA**, v. 30, n. 9, p. 754–762, 2010a.

- PEIXOTO, R. DE M.; MOTA, R. A.; DA COSTA, M. M. Mastite em pequenos ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 9, p. 754–762, set. 2010b.
- PEREIRA, C. S. et al. Proteomics characterization of *Staphylococcus* spp. from goat mastitis and phenogeno-typical assessment of resistance to beta-lactamics. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 41, p. 2021, 2 abr. 2021.
- PERSSE, Y.; OLOFSSON, I. Direct and indirect measurement of somatic cell count as indicator of intramammary infection in dairy goats. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 53, n. 1, p. 1–5, 4 mar. 2011.
- PETTERSEN, K. E. Cell Content in Goat's Milk. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 22, n. 2, p. 226, 1 jun. 1981.
- PINSKY, M. R. Dysregulation of the Immune Response in Severe Sepsis. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 328, n. 4, p. 220–229, 1 out. 2004.
- PIZAURO, L. J. L. et al. Genomic comparisons and phylogenetic analysis of mastitis-related staphylococci with a focus on adhesion, biofilm, and related regulatory genes. **Scientific Reports 2021 11:1**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 30 ago. 2021.
- PODHORECKÁ, K. et al. Somatic Cell Count in Goat Milk: An Indirect Quality Indicator. **Foods**, v. 10, n. 5, 2021.
- POLVEIRO, R. C. et al. Effects of enrofloxacin treatment on the bacterial microbiota of milk from goats with persistent mastitis. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 4421, 10 mar. 2020a.
- POLVEIRO, R. C. et al. Effects of enrofloxacin treatment on the bacterial microbiota of milk from goats with persistent mastitis. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–13, dez. 2020b.
- PORCELLATO, D. et al. A core microbiota dominates a rich microbial diversity in the bovine udder and may indicate presence of dysbiosis. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 1 dez. 2020.
- PRUESSE, E. et al. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. **Nucleic acids research**, v. 35, n. 21, p. 7188–7196, dez. 2007.
- PYÖRÄLÄ, S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. **Veterinary Research**, v. 34, n. 5, p. 565–578, 1 set. 2003.
- QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, 2013.
- R TEAM CORE, R. T. **A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing**, 2018. Disponível em: <<http://www.r-project.org>>

- RAFALUK-MOHR, C. The relationship between parasite virulence and environmental persistence: a meta-analysis. **Parasitology**, v. 146, n. 7, p. 897–902, 1 jun. 2019.
- RAINARD, P. **Mammary microbiota of dairy ruminants: Fact or fiction?** **Veterinary Research** BioMed Central, , ago. 2017.
- RAINARD, P.; FOUCRAS, G.; MARTINS, R. P. Adaptive Cell-Mediated Immunity in the Mammary Gland of Dairy Ruminants. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, p. 296, 5 abr. 2022.
- RIBEIRO, M. G. et al. An unusual gangrenous goat mastitis caused by Staphylococcus aureus, Clostridium perfringens and Escherichia coli co-infection. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 59, n. 3, p. 810–812, 2007.
- RODEMANN, J. F. et al. Incidence of Clostridium difficile Infection in Inflammatory Bowel Disease. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 5, n. 3, p. 339–344, 1 mar. 2007.
- ROSSER, E. C.; MAURI, C. A clinical update on the significance of the gut microbiota in systemic autoimmunity. **Journal of Autoimmunity**, v. 74, p. 85–93, 1 nov. 2016.
- ROVAI, M. et al. Identifying the major bacteria causing intramammary infections in individual milk samples of sheep and goats using traditional bacteria culturing and real-time polymerase chain reaction. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 9, p. 5393–5400, 1 set. 2014.
- SAAD, N. M. et al. Prevalence of Escherichia albertii and Other Escherichia species in Raw Milk and Some Dairy Products in Assiut City. **Journal of American Science**, v. 8, n. 11, 2012.
- SALABERRY, S. R. S. et al. Microbiological analysis and sensitivity profile of Staphylococcus spp. in subclinical mastitis of dairy goats. **ARQUIVO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINARIA E ZOOTECNIA**, v. 68, n. 2, p. 336–344, 2016.
- SANDERS, M. E. et al. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology** 2019 16:10, v. 16, n. 10, p. 605–616, 11 jul. 2019.
- SÁNDEZ, L. et al. Healthy Cattle Microbiome and Dysbiosis in Diseased Phenotypes. **Ruminants** 2022, Vol. 2, Pages 134-156, v. 2, n. 1, p. 134–156, 23 fev. 2022.
- SAR, T. K. et al. Potential of a polyherbal drug to prevent antimicrobial resistance in bacteria to antibiotics. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 10899, jul. 2018.
- SCATAMBURLO, T. M. et al. Spoilage potential of Pseudomonas species isolated from goat milk. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 2, p. 759–764, 2015.
- SCHALM, O. W. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 130, p. 199–204, 1957.

- SCHNEITZ, C. Competitive exclusion in poultry—30 years of research. **Food Control**, v. 16, n. 8, p. 657–667, 1 out. 2005.
- SCHUKKEN, Y. H. et al. Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 144, n. 3, p. 270–289, 2011.
- SCHWARZ, R. S.; MORAN, N. A.; EVANS, J. D. Early gut colonizers shape parasite susceptibility and microbiota composition in honey bee workers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 33, p. 9345–9350, 16 ago. 2016.
- SEELIG, L. L.; BEER, A. E. Transepithelial Migration of Leukocytes in the Mammary Gland of Lactating Rats. **BIOLOGY OF REPRODUCTION**, v. 17, p. 736–744, 1978.
- SER, H. L. et al. The Use of Fecal Microbiome Transplant in Treating Human Diseases: Too Early for Poop? **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 1005, 13 maio 2021.
- SHANNON, C. E. A mathematical theory of communication. **The Bell System Technical Journal**, v. 27, n. 4, p. 623–656, 1948.
- SHARUN, K. et al. Advances in therapeutic and managemental approaches of bovine mastitis: a comprehensive review. **The Veterinary Quarterly**, v. 41, n. 1, p. 107, 2021.
- SHOME, B. R. et al. Multiplex PCR assay for species identification of bovine mastitis pathogens. **Journal of applied microbiology**, v. 111, n. 6, p. 1349–1356, dez. 2011.
- SILVA], E. R. [DA et al. Identification and in vitro antimicrobial susceptibility of Staphylococcus species isolated from goat mastitis in the Northeast of Brazil. **Small Ruminant Research**, v. 55, n. 1, p. 45–49, 2004.
- SOUZA, F. N. et al. Immune response in nonspecific mastitis: What can it tell us? **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 6, p. 5376–5386, 2012a.
- SOUZA, F. N. et al. Somatic cell count in small ruminants: Friend or foe? **Small Ruminant Research**, v. 107, n. 2–3, p. 65–75, 1 out. 2012b.
- STEEVE, G.; JOHN, F. P.; PATRICIA, M. **Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine**. [s.l.] Wiley, 2013. v. Fifth Edition
- STEGEN, J. C.; BOTTOS, E. M.; JANSSON, J. K. A unified conceptual framework for prediction and control of microbiomes. **Current opinion in microbiology**, v. 44, p. 20–27, 1 ago. 2018.
- STEINER, S. et al. Evaluation of the therapeutic efficacy of rumen transfaunation. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 104, n. 1, p. 56, 1 jan. 2020.
- STEVENS, E. J.; BATES, K. A.; KING, K. C. Host microbiota can facilitate pathogen infection. **PLOS Pathogens**, v. 17, n. 5, p. e1009514, 1 maio 2021a.

- STEVENS, E. J.; BATES, K. A.; KING, K. C. Host microbiota can facilitate pathogen infection. **PLOS Pathogens**, v. 17, n. 5, p. e1009514, 1 maio 2021b.
- SU, Y. et al. Fecal Microbiota Transplantation Shows Marked Shifts in the Multi-Omic Profiles of Porcine Post-weaning Diarrhea. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 343, 23 fev. 2021.
- TAPONEN, S. et al. Bovine milk microbiome: A more complex issue than expected. **Veterinary Research**, v. 50, n. 1, p. 1–15, 6 jun. 2019.
- TENA, D. et al. Peritonitis caused by *Bifidobacterium longum*: Case report and literature review. **Anaerobe**, v. 27, p. 27–30, 1 jun. 2014.
- THORBERG, B. M. et al. Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative staphylococci. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 10, p. 4962–4970, 1 out. 2009.
- TIAN, S. Z. et al. Comparison of morphology, viability, and function between blood and milk neutrophils from peak lactating goats. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 69, n. 1, p. 39–45, 2005a.
- TIAN, S. Z. et al. Comparison of morphology, viability, and function between blood and milk neutrophils from peak lactating goats. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 69, n. 1, p. 39, jan. 2005b.
- TOVAGLIERI, A. et al. Species-specific enhancement of enterohemorrhagic *E. coli* pathogenesis mediated by microbiome metabolites. **Microbiome**, v. 7, n. 1, 20 mar. 2019.
- TSO, G. H. W. et al. Experimental evolution of a fungal pathogen into a gut symbiont. **Science**, v. 362, n. 6414, p. 589–595, 2 nov. 2018.
- VALDES, A. M. et al. Role of the gut microbiota in nutrition and health. **BMJ**, v. 361, p. 36–44, 13 jun. 2018.
- VAN OOSTVELDT, K. et al. Effect of apoptosis on phagocytosis, respiratory burst and CD18 adhesion receptor expression of bovine neutrophils. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 22, n. 1, p. 37–50, 1 mar. 2002.
- VORBURGER, C.; GOUSKOV, A. Only helpful when required: a longevity cost of harbouring defensive symbionts. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 24, n. 7, p. 1611–1617, 1 jul. 2011.
- WANG, Q. et al. Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 16, p. 5261–5267, ago. 2007.
- WANG, Y.; QIAN, P. Y. Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. **PLOS ONE**, v. 4, n. 10, p. e7401, 9 out. 2009.

- WEBER, M. et al. Comparative analysis of bacterial community composition in bulk tank raw milk by culture-dependent and culture-independent methods using the viability dye propidium monoazide. 2014.
- WEI, G. et al. Insect pathogenic fungus interacts with the gut microbiota to accelerate mosquito mortality. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 23, p. 5994–5999, 6 jun. 2017.
- WHITE, E. C.; HINCKLEY, L. S. Prevalence of mastitis pathogens in goat milk. **Small Ruminant Research**, v. 33, n. 2, p. 117–121, 1999.
- WRZOSEK, L. et al. Transplantation of human microbiota into conventional mice durably reshapes the gut microbiota. **Scientific Reports 2018 8:1**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 1 maio 2018.
- XU, H. M. et al. Fecal Microbiota Transplantation: A New Therapeutic Attempt from the Gut to the Brain. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2021, 2021a.
- XU, Q. et al. Gut Microbiota and Their Role in Health and Metabolic Disease of Dairy Cow. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, p. 456, 4 ago. 2021b.
- XU S, Y. G. **MicrobiotaProcess: an R package for analysis, visualization and biomarker discovery of microbiome. R package version 1.0.5.**, 2020. Disponível em: <<https://github.com/YuLab-SMU/MicrobiotaProcess/>>
- YAN, C. et al. Exogenous Fecal Microbial Transplantation Alters Fearfulness, Intestinal Morphology, and Gut Microbiota in Broilers. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, p. 1092, 1 out. 2021.
- ZANEVELD, J. R.; MCMINDS, R.; THURBER, R. V. Stress and stability: applying the Anna Karenina principle to animal microbiomes. **Nature Microbiology 2017 2:9**, v. 2, n. 9, p. 1–8, 24 ago. 2017.
- ZENG, H. et al. Colonic aberrant crypt formation accompanies an increase of opportunistic pathogenic bacteria in C57BL/6 mice fed a high-fat diet. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 54, p. 18–27, 1 abr. 2018.
- ZHANG, F. et al. Bacterial diversity in goat milk from the Guanzhong area of China. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 10, p. 7812–7824, 2017a.
- ZHANG, F. et al. Bacterial diversity in goat milk from the Guanzhong area of China. **Journal of dairy science**, v. 100, n. 10, p. 7812–7824, 1 out. 2017b.
- ZHOU, M. et al. Assessment of microbiome changes after rumen transfaunation: implications on improving feed efficiency in beef cattle. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 62, 27 mar. 2018.

CONCLUSÕES GERAIS

A indução da infecção por *S. warneri* gerou o quadro de mastite subclínica nos animais, e ocasionou alterações nos valores de CCS, CBT e de CMT, assim como mudanças nos valores de leucócitos sanguíneos de forma significativa. Além disso, essas alterações apresentaram variações individuais entre os animais, sendo que alguns apresentaram melhora dos valores aos padrões de quando sadios, diferentemente de outros. A produção de leite entre os animais infectados reduziu de forma momentânea logo após a infecção, no entanto, a recuperação desses valores de produção pode retornar ao que fora anteriormente. Além disso, os animais induzidos a mastite apresentaram alterações da microbiota de espécies como *S. pasteurii*, *A. septicus*, *S. caprae*, *A. ursingii* e *E. fergusonii* para o predomínio de *S. warneri* e de *E. fergusonii*.

O transplante resultou em alterações proeminentes nos valores de CCS, CBT e CMT, além dos valores do leucograma sanguíneo, ocasionado provavelmente pela disbiose na microbiota do leite. Interessantemente, a técnica permitiu tornar o agente patogênico *S. warneri*, no animal que se tornou sadio ao final do transplante, permanentemente indígena aquela microbiota, anteriormente disbiótica, sem causar os sintomas de mastite observados durante a infecção. Além disso, observamos a mudança estrutural da composição bacteriana dos animais, reduzindo e até eliminando a presença do agente *S. warneri* nos outros animais transplantados.

Ademais, a disbiose provocada pelo transplante substituiu as microbiotas indígenas desses animais, em grande parte, pelas espécies *H. parainfluenzae*, *S. simulans* e *S. aureus*. No entanto, notamos que a mudança brusca e contínua no transplante pode provocar diferentes efeitos sobre as microbiotas bacterianas e inclusive, acarretar no aparecimento de disbiose em determinados animais.

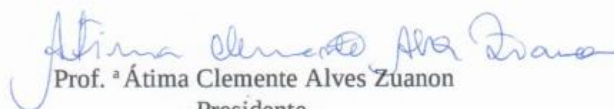
Portanto, a complexidade da microbiota do leite e a adoção da técnica de transplante a partir de um animal sadio, demonstrou que a microbiota estabelecida a partir do processo realizado pode ser completamente diferente da microbiota do animal doador, assim como da microbiota que esses animais apresentavam no período sadio. Contudo, os grupos de microrganismos, de forma geral, além dos mais abundantes, formaram uma nova microbiota nesses animais, as quais foram constatadas através das análises de beta diversidade. O transplante de microbiota do leite de um úbere para outro demonstrou ser uma técnica que pode alterar a microbiota do receptor, e com a possibilidade de utilização no tratamento da mastite, desde que seja realizado um aprimoramento nela.

ANEXO-CERTIFICADO DO COMITE DE ÉTICA (CEUA)**CERTIFICADO**

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 62/2018, intitulado **“Mastite caprina: estudo da microbiota do leite por técnicas ômicas e microbiologia tradicional e o seu uso como forma de tratamento”**, coordenado pela professora Maria A. Scatamburlo Moreira do Departamento de Veterinária, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 05/12/2018, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 62/2018, named **“Caprine mastitis: a study of the microbiota of milk by omic techniques and traditional microbiology and its use as a form of treatment”**, is in agreement with the actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on December 05, 2018 valid for 12 months.



Prof.ª Átima Clemente Alves Zuanon
Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV