



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

RAFAELA MARTINS MORASI

**ANÁLISE DO MICROBIOMA DE AMOSTRAS DE LEITE DE TANQUE E
ISOLAMENTO DE *Streptococcus* spp. E *Aerococcus viridans* DE LEITE DE
VACAS SAUDÁVEIS E MASTÍTICAS**

CAMPINAS

2023

RAFAELA MARTINS MORASI

**ANÁLISE DO MICROBIOMA DE AMOSTRAS DE LEITE DE TANQUE E
ISOLAMENTO DE *Streptococcus* spp. E *Aerococcus viridans* DE LEITE DE
VACAS SAUDÁVEIS E MASTÍTICAS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia
de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos exigidos para a obtenção
do título de Mestra em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Nathália Cristina Cirone Silva

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA RAFAELA
MARTINS MORASI, E ORIENTADA
PELA PROFA. DRA. NATHÁLIA
CRISTINA CIRONE SILVA.

CAMPINAS

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

M796a Morasi, Rafaela Martins, 1997-
Análise do microbioma de amostras de leite de tanque e isolamento de *Streptococcus* spp. e *Aerococcus viridans* de leite de vacas saudáveis e mastíticas / Rafaela Martins Morasi. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Nathalia Cristina Cirone Silva.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Sequenciamento completo do genoma. 2. Resistência antimicrobiana. 3. Diversidade bacteriana. 4. RNA ribossômico 16S. I. Silva, Nathalia Cristina Cirone. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Microbiome analysis of milk tank samples and isolation of *Streptococcus* spp. and *Aerococcus viridans* from milk of healthy and mastitic cows

Palavras-chave em inglês:

Whole genome sequencing

Antimicrobial resistance

Bacterial diversity

RNA, Ribosomal, 16S

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestra em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Nathalia Cristina Cirone Silva

Anderson de Souza Sant'Ana

Vera Lúcia Mores Rall

Data de defesa: 06-11-2023

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-0708-752X>

- Currículo Lattes do autor: <https://lattes.cnpq.br/6039399565813472>

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Nathália Cristina Cirone Silva

Presidente e Orientadora

FEA/UNICAMP

Prof. Dr. Anderson de Souza Sant'Ana

Membro Titular

FEA/UNICAMP

Profa. Dra. Vera Lúcia Mores Rall

Membro Titular

IBB/UNESP – Botucatu

A Ata de Defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertações/Teses e na Secretaria do Programa de Pós-Graduação

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001. Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - processo nº 144471/2021-3. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – processo nº 2019/17308-4.

Esta pesquisa utilizou instalações do Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR), do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), uma Organização Social supervisionada pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações (MCTI). A equipe da instalação aberta de Sequenciamento de Alto Desempenho (NGS) é reconhecida pela assistência durante os experimentos (propostas 20220396 e 20230568). Em especial, meus agradecimentos ao Douglas Paixão e Emerson Gomes.

Gostaria de agradecer minha família pelo apoio incondicional que me foi dado para que esse sonho pudesse ser realizado. Agradeço meus pais, Célia e Alcir Morasi, minha avó e meu falecido avô, Araceles e Antonio Trevisan, meu irmão, Igor Morasi, minha cunhada, Vitória Nogueira, e minha prima Giulia Garcia. Vocês são minha base!

Agradeço minha orientadora, Profa. Dra. Nathália Cirone, por todos os ensinamentos, pela oportunidade de realizar este projeto, pela confiança depositada em mim e por me transmitir sua calma nos momentos mais difíceis. Agradeço aos queridos amigos que fiz no laboratório, aqueles que permanecem e os que tiveram uma curta passagem: Bruna Crippa, Jaqueline de Almeida, Erik Pereira, Juliana Maffei, Mirian Rubio, Luiz Gustavo de Matos, Karen Munive, Anderson Abreu, Victória Vilaça, Natália Faria, Cayque Alves, Beatriz Paschoalini, Pilar Valente, Daniel Luciano e Jeniffer Ferreira. Vocês foram meu apoio diário nessa jornada! Obrigada por caminharem comigo e tornarem essa experiência ainda mais especial! Agradeço à técnica do laboratório, Alessandra Coelho, por todo o auxílio prestado no desenvolvimento do projeto.

Agradeço minhas queridas amigas pelo amor, carinho e apoio de sempre. Em especial Mariana Beissmann, Larissa Vaccari, Camila Ereno, Larissa Ongaro, Verônica Novais, Loise Moreira, Larysse Alves e Gabriela Greici (República Muvuca, UNESP). Agradeço também Ana Flávia Borin e Luiza Viganó.

Agradeço a Università degli Studi di Milano por me proporcionar muito mais do que um intercâmbio acadêmico. Em especial Prof. Dr. Fabrizio Ceciliani, Profa. Dra. Cristina Lecchi, Prof. Dr. Filippo Biscarini, Patrícia Lainetti, Antonio Leis, Larissa Brouco, Clarissa Zamboni, Yasmine, Fernanda, Giulia Musmeci, Julieta e Chiara Gini.

RESUMO

A mastite bovina é a doença que mais afeta a indústria leiteira no Brasil e no mundo. O gênero *Streptococcus* é considerado um dos principais responsáveis por desencadear tal doença nos rebanhos e *Aerococcus viridans* vem se mostrando uma espécie emergente dentro do âmbito da mastite. Além disso, a composição rica em nutrientes do leite bovino pode favorecer o desenvolvimento de comunidades bacterianas diversas. O objetivo do presente estudo foi avaliar e correlacionar a incidência de *Streptococcus* spp. e *Aerococcus viridans* em amostras de leites de vacas mastíticas e sadias provenientes de fazendas localizadas nas cinco regiões do Brasil, além de verificar e comparar a diversidade bacteriana presente em amostras de leite de tanque, considerando também as diferentes regiões do país, por meio do Sequenciamento de Nova Geração (NGS) do gene 16S rRNA. Do total de 1.447 amostras de leites coletadas nos estados de Santa Catarina, São Paulo, Goiás, Paraíba e Pará, 720 foram provenientes de vacas saudáveis (49,7%), 529 de vacas com mastite subclínica (36,6%) e 198 com mastite clínica (13,7%). Deste total, foram identificados 32 (2,2%) isolados confirmados de *Streptococcus*, sendo 16 (50%) *S. agalactiae*, dez (31,3%) *S. uberis*, cinco (15,6%) *S. dysgalactiae* e um (3,1%) *S. equinus*. O estado da Paraíba apresentou o maior número de isolados de *Streptococcus* spp. (22/32) e a espécie *S. uberis* foi identificada em todos os estados. Estreptomicina (19; 59,4%) e tetraciclina (16; 50%) foram os antimicrobianos com as maiores porcentagens de isolados resistentes e foram encontrados 11 (34,4%) isolados multirresistentes. Nove isolados de *S. agalactiae* foram sequenciados, todos advindos do estado da Paraíba por serem considerados multirresistentes. As análises de MLST identificaram dois tipos sequenciais: ST-67 e ST-103. Além disso, foi identificada a presença de quatro genes de resistência a antimicrobianos (*ant(6)_la_3*, *tet(O)_3*, *mre(A)_1* e *erm(B)_18*) e 77 genes de virulência (*acpC*, *bca*, *cap8J*, *carB*, *ccpA*, *cfa/cfb*, *ciaR*, *clpP*, *cpsABCDEFGHIKLY*, *csrRS*, *cydA*, *cyIABCDEFGHIJKXZ*, *fba*, *fbxA*, *gbs1402*, *gbs1529*, *glnA*, *guaA*, *hasC*, *hylB*, *lepA*, *leuS*, *lgt*, *luxS*, *murF*, *neuABCD*, *pbp1A*, *pepCNX*, *psaC*, *purBHLN*, *rpoE*, *SAK_0517*, *scrB*, *sodA*, *SP_0095*, *SP_0121*, *SP_0320*, *SP_0494*, *SP_0829*, *SP_0856*, *SP_0943*, *SP_1396*, *SP_1398*, *SP_1399*, *SP_1544*, *SP_1847*, *SP_1970*, *vicK*). Foram encontrados 15 (1%) isolados de *Aerococcus viridans*, a maioria considerados sensíveis aos antimicrobianos testados. Para o estudo do microbioma, 57 amostras de leite de tanque dos estados de Santa Catarina, São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Maranhão, Pará e Tocantins foram sequenciadas por metagenômica a partir de NGS. Moraxellaceae (22,3%), Streptococcaceae (14,1%), Acetobacteraceae (13,8%), Pseudomonadaceae (11,0%) e Enterococcaceae (9,0%) foram as principais famílias. *Acinetobacter* (22,3%), *Pseudomonas* (11,7%) e *Acetobacter* (8,1%) foram os principais gêneros. Os resultados obtidos reforçaram os potenciais patogênicos do gênero *Streptococcus* sp. e da espécie *Aerococcus viridans* como responsáveis por desencadear mastite em bovinos de leite. Além disso, o rastreamento de bactérias em leite de tanque permitiu traçar as melhores estratégias de prevenção e controle das contaminações.

Palavras-chave: Sequenciamento do genoma completo, resistência antimicrobiana, diversidade bacteriana, RNA ribossômico 16S.

ABSTRACT

Bovine mastitis is the disease that most affects the dairy industry in Brazil and the world. The genus *Streptococcus* is considered one of the main responsible for triggering this disease in livestock and *Aerococcus viridans* has been shown to be an emerging species within the scope of mastitis. Furthermore, the nutrient-rich composition of bovine milk can favor the development of diverse bacterial communities. The objective of the present study was to evaluate and correlate the incidence of *Streptococcus* spp. and *Aerococcus viridans* in milk samples from mastitic and healthy cows from farms located in the five regions of Brazil, in addition to verifying and comparing the bacterial diversity present in milk tank samples, also considering the different regions of the country, through Next Generation Sequencing (NGS) of the 16S rRNA gene. Of the total of 1,447 milk samples collected in the states of Santa Catarina, São Paulo, Goiás, Paraíba and Pará, 720 came from healthy cows (49.7%), 529 from cows with subclinical mastitis (36.6%) and 198 with clinical mastitis (13.7%). Of this total, 32 (2.2%) confirmed *Streptococcus* isolates were identified, 16 (50%) being *S. agalactiae*, ten (31.3%) *S. uberis*, five (15.6%) *S. dysgalactiae* and one (3.1%) *S. equinus*. The state of Paraíba presented the highest number of *Streptococcus* spp. isolates. (22/32) and the species *S. uberis* was identified in all states. Streptomycin (19; 59.4%) and tetracycline (16; 50%) were the antimicrobials with the highest percentages of resistance and 11 (34.4%) multidrug-resistant isolates were found. Nine isolates of *S. agalactiae* were sequenced, all from the state of Paraíba as they were considered multi-resistant. MLST analyzes identified two sequence types: ST-67 and ST-103. Furthermore, the presence of four antimicrobial resistance genes (*ant(6)_la_3*, *tet(O)_3*, *mre(A)_1* and *erm(B)_18*) and 77 virulence genes (*acpC*, *bca*, *cap8J*, *carB*, *ccpA*, *cfa/cfb*, *ciaR*, *clpP*, *cpsABCDEFGHIKLY*, *csrRS*, *cydA*, *cylABCDEFGHIJKXZ*, *fba*, *ftsA*, *gbs1402*, *gbs1529*, *glnA*, *guaA*, *hasC*, *hylB*, *lepA*, *leuS*, *lgt*, *luxS*, *murF*, *neuABCD*, *pbp1A*, *pepCNX*, *psaC*, *purBHLN*, *rpoE*, SAK_0517, *scrB*, *sodA*, SP_0095, SP_0121, SP_0320, SP_0494, SP_0829, SP_0856, SP_0943, SP_1396, SP_1398, SP_1399, SP_1544, SP_1847, SP_1970, *vicK*) were detected. A total of 15 (1%) isolates of *Aerococcus viridans* were found, most of which were considered sensitive to the antimicrobials tested. For the microbiome study, 57 milk tank samples from the states of Santa Catarina, São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Maranhão, Pará and Tocantins were sequenced by metagenomics using NGS. Moraxellaceae (22.3%), Streptococcaceae (14.1%), Acetobacteraceae (13.8%), Pseudomonadaceae (11.0%) and Enterococcaceae (9.0%) were the main families. *Acinetobacter* (22.3%), *Pseudomonas* (11.7%) and *Acetobacter* (8.1%) were the main genera. The results obtained reinforced the pathogenic potential of the genus *Streptococcus* sp. and the species *Aerococcus viridans* as responsible for triggering mastitis in dairy cattle. Furthermore, tracking bacteria in milk tank made it possible to trace the best strategies for preventing and controlling contamination.

Keywords: Whole genome sequencing, antimicrobial resistance, bacterial diversity, 16S ribosomal RNA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação da porcentagem total de amostras com mastite clínica, mastite subclínica e leites provenientes de vacas saudáveis.....	30
Figura 2. Relação entre os tipos de amostras (mastite clínica, mastite subclínica e leites provenientes de vacas saudáveis) e os estados do Brasil envolvidos no trabalho.....	31
Figura 3(A). <i>Streptococcus agalactiae</i> em placa de ágar sangue de carneiro. 3(B). <i>Streptococcus uberis</i>	34
Figura 3(C). <i>Streptococcus dysgalactiae</i> . 3(D). <i>Streptococcus equinus</i> . Figura 3(E). Visualização de <i>Streptococcus</i> sp. através de coloração de GRAM.....	35
Figura 4. Espécies de <i>Streptococcus</i> spp. identificadas e suas respectivas porcentagens de ocorrência.....	35
Figura 5. Distribuição das espécies de <i>Streptococcus</i> spp. identificadas a partir de amostras de leite de vacas sadias e mastíticas considerando os estados do Brasil envolvidos no presente estudo.....	36
Figura 6. Relação entre as espécies de <i>Streptococcus</i> spp. e sua ocorrência em amostras de leites provenientes de vacas saudáveis e leites mastíticos.....	36
Figura 7. Teste de disco-difusão para susceptibilidade antimicrobiana de isolados de <i>Streptococcus</i> spp.. É possível observar resistência a TET, SUT, CLI, NEO e EST, caracterizando-se como um isolado multirresistente.....	45
Figura 8. Representação da árvore filogenética das amostras de <i>Streptococcus agalactiae</i> . As amostras 1285a, 403b, 404, 396b e 932a fazem parte do ST-67; 390c do ST-103; 1292a, 1288a e 410c fazem parte do ST não identificado.....	49
Figura 9(A). <i>Aerococcus viridans</i> em placa de ágar sangue de carneiro. 9(B). Colônias de <i>Aerococcus viridans</i> visualizadas através de coloração de GRAM.....	56
Figura 10. Relação entre os estados do Brasil e o tipo de amostra em que foram identificados os isolados de <i>Aerococcus viridans</i>	56
Figura 11. Teste de disco difusão para susceptibilidade antimicrobiana de isolados de <i>Aerococcus viridans</i> . É possível observar resistência aos antimicrobianos EST e OXA.....	60
Figura 12. Famílias mais encontradas, representadas por gráficos considerando a abundância total pela prevalência média.....	61
Figura 13. Gêneros mais encontrados, também representados por gráficos considerando a abundância total pela prevalência média.....	61
Figura 14. Gráfico comparando a diversidade bacteriana dentro de cada estado brasileiro analisado. A linha pontilhada em laranja representa o limite do p -valor igual a 0,05.....	62
Figura 15. Boxplot comparando as amostras de alta e baixa CCS dentro de cada um dos índices de diversidade alfa.....	63
Figura 16. Gráfico representando a diversidade beta entre os estados do Brasil. Foram realizadas análises de dissimilaridade múltipla (MDS) considerando a distância de Bray-Curtis como métrica de dissimilaridade. “State.of.Brazil”: Estado do Brasil.....	64
Figura 17. Gráfico representando a diversidade beta entre os valores de CCS. Foram realizadas análises de dissimilaridade múltipla (MDS) considerando a distância de Bray-Curtis como métrica de dissimilaridade. “Somatic.Cell.Count”: Contagem de Células Somáticas; “High”: alta; “Low”: baixa; “NA”: não identificadas.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação entre a mediana dos valores de CCS e CPP dos isolados de <i>Streptococcus</i> spp.....	37
Tabela 2. Resultados dos testes de susceptibilidade antimicrobiana de <i>Streptococcus</i> spp.....	43
Tabela 3. Resultados dos testes de susceptibilidade antimicrobiana de <i>Streptococcus</i> spp. por estado do Brasil.....	44
Tabela 4. Resultados dos testes de susceptibilidade antimicrobiana de <i>Streptococcus</i> spp. por tipo de mastite.....	44
Tabela 5. Relação entre ST e número de fazendas dos isolados sequenciados de <i>Streptococcus agalactiae</i> do estado da Paraíba.....	50
Tabela 6. Relação entre as amostras de <i>Streptococcus agalactiae</i> , respectivos STs e genes de resistência a antimicrobianos.....	51
Tabela 7. Genes de virulência identificados no Sequenciamento do Genoma Completo de isolados de <i>Streptococcus agalactiae</i> , agrupados conforme funções semelhantes.....	52
Tabela 8. Relação entre a mediana dos valores de CCS e CPP dos isolados de <i>Aerococcus viridans</i>	57
Tabela 9. Resultados dos testes de susceptibilidade antimicrobiana de <i>Aerococcus viridans</i>	59
Tabela 10. Tabela de significância dos índices de diversidade alfa considerando os dados de CCS.....	63

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	12
2. OBJETIVOS	14
2.1. Objetivos gerais.....	14
2.2. Objetivos específicos.....	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1. O leite bovino.....	14
3.2. Qualidade do leite bovino.....	15
3.3. A mastite.....	15
3.4. Microrganismos causadores de mastite.....	16
3.5. <i>Streptococcus</i> spp.....	17
3.6. Controle e tratamento da mastite causada por <i>Streptococcus</i> spp.....	18
3.7. Fatores de virulência de <i>Streptococcus</i> spp	19
3.8. <i>Aerococcus viridans</i>	20
3.9. Comunidades microbianas em leite de tanque.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1. Origem e obtenção das amostras de leite de teto.....	21
4.1.1. Determinação dos valores de CCS e CPP por citometria de fluxo.....	22
4.2. Isolamento e identificação de <i>Streptococcus</i> spp. e <i>Aerococcus viridans</i> ..	22
4.2.1. Teste de disco-difusão para susceptibilidade antimicrobiana de isolados de <i>Streptococcus</i> spp. e <i>Aerococcus viridans</i>	23
4.2.2. Extração de DNA.....	24
4.2.3. Confirmação molecular de <i>Streptococcus</i> spp.....	24
4.2.4. Purificação e Sequenciamento Sanger.....	25
4.2.5. Sequenciamento do Genoma Completo de <i>Streptococcus agalactiae</i>	26
4.3. Metagenômica do gene 16S rRNA de amostras de leite de tanque.....	26
4.3.1. Origem e obtenção das amostras.....	26
4.3.2. Extração do DNA total e quantificação.....	27
4.3.3. Amplificação do gene 16S rRNA por PCR convencional.....	27
4.3.4. Primeira purificação e quantificação.....	27
4.3.5. Indexação e segunda purificação.....	28

4.3.6. Construção da biblioteca e Sequenciamento de Nova Geração (NGS) do gene 16S rRNA.....	28
4.3.7. Processamento dos dados e atribuição taxonômica por bioinformática.....	29
4.3.8. Índices de diversidade alfa e beta.....	29
4.4. Análise estatística.....	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1. Caracterização das amostras individuais de leite de teto.....	30
5.2. Isolamento e identificação de <i>Streptococcus</i> spp.....	34
5.3. Relação entre os isolados de <i>Streptococcus</i> spp., Contagem de Células Somáticas (CCS) e Contagem Padrão em Placa (CPP).....	36
5.4. Teste de disco-difusão para susceptibilidade antimicrobiana de <i>Streptococcus</i> spp.....	42
5.5. Sequenciamento do Genoma Completo de <i>Streptococcus agalactiae</i>	48
5.6. Isolamento e identificação de <i>Aerococcus viridans</i>	56
5.7. Relação entre os isolados de <i>Aerococcus viridans</i> , Contagem de Células Somáticas (CCS) e Contagem Padrão em Placa (CPP).....	56
5.8. Teste de disco-difusão para susceptibilidade antimicrobiana de <i>Aerococcus viridans</i>	59
5.9. Diversidade bacteriana e CCS de amostras de leite de tanque.....	60
5.10. Análises de diversidade alfa.....	62
5.11. Análises de diversidade beta.....	63
6. CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS.....	70

1. INTRODUÇÃO GERAL

A mastite bovina é caracterizada como uma resposta inflamatória que acomete a glândula mamária do animal devido sobretudo à invasão por microrganismos (Gomes & Henriques, 2015). Pode ser considerada a principal doença que afeta a indústria leiteira no Brasil e no mundo, ocasionando elevadas perdas econômicas e até mesmo danos irreparáveis nos tecidos glandulares produtores de leite (El-Sayed & Kamel, 2021; Lopes et al., 2022).

Existem duas formas principais de manifestação da doença: clínica e subclínica. A mastite clínica é detectada a partir de sinais clínicos visíveis tanto no animal como no leite, acompanhados de um aumento na Contagem de Células Somáticas (CCS). A mastite subclínica não apresenta sinais clínicos e nem alterações visíveis, mas também acompanha um aumento no valor de CCS (Izquierdo et al., 2017).

Bactérias do gênero *Streptococcus* são consideradas um dos principais patógenos responsáveis por desencadear mastite em vacas produtoras de leite. Dentre as principais espécies envolvidas estão *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus uberis* (Cheng & Han, 2020).

Streptococcus agalactiae classifica-se como agente contagioso de mastite e sua transmissão para outros animais ocorre sobretudo durante a ordenha, já que esta bactéria desenvolve-se preferencialmente no interior do úbere (Lakew et al., 2019; Cheng & Han, 2020). *Streptococcus uberis* classifica-se como agente ambiental. Pode ser encontrado tanto no hospedeiro quanto nos alojamentos do gado, materiais de cama e demais equipamentos e objetos utilizados para a ordenha (Käppeli et al., 2019; Fessia & Odierno, 2021).

A utilização de antimicrobianos representa a alternativa mais eficaz no tratamento de mastite. Entretanto, sua utilização irregular e indiscriminada pode favorecer o desenvolvimento de resistência microbiana (Tian et al., 2019). As principais classes de antimicrobianos utilizadas em fazendas produtoras de leite contra infecções causadas por *Streptococcus* spp. são: β -lactâmicos, aminoglicosídeos, lincosaminas, tetraciclinas e sulfonamidas (Economou & Gousia, 2015; Léger et al., 2017; Haenni et al., 2018; Redding et al., 2019).

A presença de genes que codificam fatores de virulência nas bactérias do gênero *Streptococcus* garantem sua adaptação, sobrevivência e replicação no interior

do hospedeiro, culminando com o estabelecimento da infecção. As capacidades do patógeno em aderir e invadir a célula hospedeira, produzir proteínas específicas e esquivar-se do sistema imunológico representam os principais fatores de virulência de *Streptococcus* (Kabelitz et al., 2021).

A espécie *Aerococcus viridans* também vem sendo associada a casos de mastite em bovinos. É considerada agente ambiental de mastite, porém seu papel no estabelecimento da doença e sua relação com alterações no valor de CCS e composição do leite ainda são incertos (M. Sun et al., 2017).

Considerando o leite bovino um alimento extremamente nutritivo, estudos mostram que sua composição pode favorecer o desenvolvimento de comunidades microbianas diversas, incluindo microrganismos benéficos ou não. Estas comunidades apresentam relação direta com a saúde do rebanho e com questões como segurança e qualidade do leite. A utilização de técnicas moleculares avançadas permitiram a caracterização e a definição do papel que as comunidades microbianas apresentam tanto para o leite como para o hospedeiro (Ryu et al., 2021).

A microbiota presente no leite cru origina-se a partir de várias fontes de contaminação. Embora a quantidade inicial de microrganismos no leite (provenientes de glândulas mamárias saudáveis) seja reduzida, há um aumento constante da população microbiana no leite à medida que este flui do úbere da vaca para o tanque de expansão. As contaminações são nele introduzidas devido à extremidade do teto contaminada, ao sistema de ordenha e ao próprio ambiente da propriedade rural, o que resulta em uma transformação e diversificação notáveis da composição final da microbiota do leite de tanque. Além disso, há a possibilidade de que essas comunidades exerçam um impacto substancial sobre a qualidade do leite e seus produtos derivados (Parente et al., 2020; Porcellato et al., 2021).

Considerando o panorama atual de mastite bovina, a condução de estudos aprofundados a respeito dos microrganismos causadores, sua genética, relação com o hospedeiro e a diversidade de comunidades microbianas são a chave para ampliar os conhecimentos sobre a mastite, contribuindo significativamente para o desenvolvimento de novas medidas de prevenção e controle da doença (Abd El-Aziz et al., 2021; Krishnamoorthy et al., 2021).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O presente estudo teve por objetivo avaliar e correlacionar a incidência de *Streptococcus spp.* e *Aerococcus viridans* em amostras de leite de vacas mastíticas e sadias provenientes de fazendas localizadas nas cinco regiões do Brasil, além de verificar e comparar a diversidade bacteriana presente em amostras de leite de tanque, considerando também as diferentes regiões do país, por meio do Sequenciamento de Nova Geração do gene 16S rRNA.

2.2. Objetivos específicos

- Isolar e determinar a prevalência de *Streptococcus spp.* e *Aerococcus viridans* em leites de vacas com mastite clínica (sinais inflamatórios), subclínica (CCS>200.000 CS/mL), vacas consideradas saudáveis (CCS< 200.000 CS/mL) e entre as regiões do Brasil;
- Correlacionar a presença de *Streptococcus spp.* e *Aerococcus viridans* com a Contagem de Células Somáticas (CCS) e Contagem Padrão em Placas (CPP);
- Realizar o perfil de resistência microbiana dos isolados de *Streptococcus spp.* e *Aerococcus viridans*;
- Realizar o Sequenciamento do Genoma Completo dos isolados de *Streptococcus spp.* considerados multirresistentes;
- Verificar a diversidade bacteriana de amostras de leite de tanque a partir da extração do DNA total e posterior Sequenciamento de Nova Geração do gene 16S rRNA.
- Correlacionar a diversidade bacteriana entre os estados brasileiros e os valores de CCS.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. O leite bovino

O Brasil assume hoje uma posição de destaque com relação à cadeia produtiva do leite bovino, sendo considerado o terceiro maior produtor do mundo. Segundo o Anuário Leite (2023), a produção prevista no Brasil em 2021 foi de 35,30 bilhões de

litros, com destaque para as regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste como as principais produtoras. Minas Gerais foi o estado com a maior contribuição, registrando 27,22% do total produzido no país, seguido pelo Paraná (12,51%), Rio Grande do Sul (12,42%), Santa Catarina (8,96%) e Goiás (8,84%). As regiões Nordeste (15,7%) e Norte (5,26%) contabilizaram as menores porcentagens (Embrapa, 2023).

Além de sua relevância no cenário econômico, o leite é considerado uma importante fonte de nutrição e energia alimentar, sendo composto principalmente por água, proteínas, carboidratos, gorduras, vitaminas e minerais (Foroutan et al., 2019).

3.2. Qualidade do leite bovino

Segundo a Instrução Normativa N^o76 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), para que o leite cru seja considerado de qualidade, este deve apresentar (a) coloração, odor e aspectos característicos; (b) composição físico-química adequada e Contagem Padrão em Placa (CPP) que respeitem os limites estabelecidos; (c) deve ser livre de substâncias como resíduos de produtos de uso veterinário, contaminantes, neutralizantes e aditivos (Brasil, 2018a).

Existem diversos fatores que podem afetar negativamente a qualidade do leite, como: alimentação, manejo, saúde dos animais, clima e condições higiênico-sanitárias inadequadas (sejam do ambiente, dos utensílios e equipamentos de ordenha ou de etapas como armazenamento e transporte do leite) (Leira et al., 2018).

A verificação da qualidade do leite pode ser realizada, principalmente, através de análises microbiológicas (Oliveira et al., 2020). As condições de pH, temperatura e presença de nutrientes tornam o leite um ambiente favorável para o crescimento de microrganismos, sejam estes benéficos ou não. A presença de microrganismos patogênicos ou deteriorantes, como resultado de contaminação externa, traz sérios prejuízos tanto para a saúde do animal quanto para a qualidade do leite (Guo et al., 2023).

3.3. A mastite

A mastite em bovinos pode ser definida como a inflamação da glândula mamária do animal acarretada principalmente pela invasão por microrganismos patogênicos, sobretudo bactérias. É a doença que mais afeta a indústria leiteira no mundo, sendo responsável pela diminuição da produção, descarte de leite, abate prematuro e aumento de custos com tratamentos veterinários (Ashraf & Imran, 2020; Azooz et al., 2020).

Pode-se considerar a mastite uma doença multifatorial, ou seja, aquela que depende de um conjunto de fatores para se desenvolver, sejam estes ambientais, sobre o agente causador ou referentes a própria resposta do animal à doença. As principais formas de transmissão da mastite são a partir de equipamentos contaminados (ordenhadeiras, teteiras), pelas mãos do ordenhador ou pelo próprio animal já infectado. Além disso, fatores como danos físicos no úbere e/ou teto, o estado de saúde do animal e o estágio de lactação determinam e influenciam o grau da doença (Kibebew, 2017).

A mastite manifesta-se de forma clínica ou subclínica. A mastite clínica é detectada a partir de alterações visíveis no leite, como a presença de grumos e pela ausência de coloração característica, podendo estar associada a sinais clínicos perceptíveis ou não como dor, temperatura elevada, aumento de volume e coloração avermelhada da glândula mamária, até mesmo febre e falta de apetite. A mastite clínica ocasiona um aumento na Contagem de Células Somáticas (CCS), que por sua vez diminui a qualidade final do leite. A mastite subclínica não apresenta alterações visíveis no úbere ou no leite, e os sinais clínicos não são perceptíveis. Neste tipo de mastite a qualidade do leite também é afetada, visto que ocorre diminuição da produção, modificações em sua composição e aumento nos valores de CCS (Izquierdo et al., 2017).

3.4. Microrganismos causadores de mastite

Os microrganismos causadores de mastite são classificados conforme a via de transmissão e o reservatório em que são encontrados, sendo agrupados em agentes contagiosos e agentes ambientais. Os agentes contagiosos são encontrados no úbere e na pele do teto contaminados, sendo transmitidos para outras vacas principalmente por meio da ordenha. Associam-se predominantemente a casos de mastite subclínica, com aumento no valor de CCS. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma bovis* e *Corynebacterium* são exemplos de agentes contagiosos. Os agentes ambientais de mastite agem de maneira oportunista. Estão presentes no ambiente, nos alojamentos do rebanho, em instrumentos contaminados e em matéria orgânica, sendo transmitidos para a glândula mamária do animal e desencadeando principalmente casos clínicos de pequena duração. São exemplos de agentes ambientais *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. e até mesmo fungos e algas. A mastite causada pelos agentes ambientais ocorre quando a resistência do hospedeiro está enfraquecida ou quando as condições de

higiene e saneamento são inadequadas (Acosta et al., 2016; Cheng & Han, 2020; Bertolini et al., 2022).

3.5. *Streptococcus* sp.

As bactérias do gênero *Streptococcus* apresentam grande relevância para a medicina veterinária. São cocos Gram-positivos, catalase-negativos e anaeróbios facultativos, que morfológicamente são organizados em cadeias de tamanhos diversos. Meios de cultura enriquecidos com sangue são muito utilizados para o cultivo deste gênero em laboratório (Trabulsi & Althertum, 2015).

O sistema de classificação dos estreptococos é considerado complexo, apoiando-se principalmente em fatores hemolíticos e antigênicos. Inicialmente, sua identificação ocorre a partir do tipo de hemólise observado em placas de ágar sangue, sendo agrupados em β -hemolíticos (quando ocorre o rompimento total das hemácias), α -hemolíticos (rompimento parcial das hemácias) ou γ -hemolíticos/não-hemolíticos (quando não ocorre o rompimento das hemácias). A classificação sorológica é baseada nas propriedades antigênicas do chamado carboidrato C, um polissacarídeo de estrutura variada localizado na parede celular bacteriana. A partir disso, os estreptococos foram separados em 20 grupos sorológicos distintos (Grupos de Lancefield), sendo representados pelas letras maiúsculas A, B, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U e V (Trabulsi & Althertum, 2015).

Streptococcus agalactiae ou *Streptococcus* do Grupo B de Lancefield (GBS) é uma bactéria β -hemolítica, encapsulada (Rogers et al., 2018) e altamente contagiosa, onde a ordenha de um animal já contaminado representa sua principal forma de transmissão. *S. agalactiae* desenvolve-se apenas no interior do úbere, entretanto é capaz de persistir por pouco tempo na pele do teto, nas mãos do ordenhador e nos equipamentos de ordenha (Lakew et al., 2019). Associa-se principalmente a casos de mastite subclínica, com redução na produção de leite e aumento no valor de CCS (Kibebew, 2017).

Streptococcus uberis associa-se a casos de mastite clínica e subclínica. É um patógeno amplamente distribuído no ambiente, sendo este o principal tipo de transmissão, podendo ser encontrado nas camas e nos aparelhos de ordenha. Entretanto, também há relatos de transmissão contagiosa, de vaca para vaca, o que eleva a complexidade deste agente (Vezina et al., 2021). A classificação de *Streptococcus uberis* segundo os Grupos de Lancefield é variável, porém técnicas bioquímicas e moleculares são utilizadas em sua identificação (Reinoso, 2017).

Existem outras espécies de *Streptococcus* responsáveis por desencadear mastite em bovinos. *Streptococcus dysgalactiae* descreve-se como patógeno contagioso e ambiental, sendo capaz de permanecer vivo tanto no interior do hospedeiro como no ambiente, associando-se a casos de mastite clínica e subclínica. Pertence ao Grupo C de Lancefield e suas subespécies variam entre α e β -hemolíticas. *Streptococcus canis* caracteriza-se como agente contagioso, β -hemolítico, pertencente ao Grupo G de Lancefield e associa-se principalmente a casos de mastite subclínica. *Streptococcus equinus* pertence ao Grupo D de Lancefield e possui hemólise variável. Patógeno ambiental, pode ser encontrado no trato gastrointestinal e nas fezes dos animais (Clarke et al., 2016; Kabelitz et al., 2021; Xu et al., 2021; Pagnossin et al., 2022).

3.6. Controle e tratamento da mastite causada por *Streptococcus* sp.

O controle da mastite é norteado pelo monitoramento do ambiente e das vacas leiteiras. Cuidados sanitários básicos como correta higienização dos equipamentos de ordenha, das mãos do ordenhador e dos tetos pré ordenha são práticas fundamentais. Além disso, num primeiro momento deve-se ordenhar todas os tetos em um recipiente para verificar ou não a possível presença de mastite. As vacas mastíticas devem ser ordenhadas por último e seu leite deve ser descartado (Iraguha, 2023).

A associação entre diagnóstico precoce e tratamento apropriado dos animais é fundamental para um bom programa de controle. O tratamento deve ter início logo que a doença é descoberta, impedindo, assim, que haja disseminação para outros animais do rebanho ou para quartos não infectados do mesmo animal (Langoni et al., 2017).

A administração de antimicrobianos representa a alternativa mais utilizada no tratamento de mastite, seja para fins terapêuticos e/ou profiláticos. Entretanto, seu uso inadequado pode gerar sérios riscos para a cadeia produtiva do leite e para a saúde do rebanho como redução da eficácia da droga ao longo do tempo, redução da resposta do animal ao tratamento, redução da produtividade das vacas e a possibilidade de desencadear resistência microbiana. Além disso, resíduos de antimicrobianos podem estar presentes no leite, alterando sua composição e consequentemente comprometendo a segurança do alimento (Tian et al., 2019; Tomanic et al., 2023).

A escolha do antimicrobiano depende do alvo a ser combatido, por isso o correto diagnóstico do patógeno é de extrema importância para a seleção do melhor tratamento (Ashraf & Imran, 2020). As principais classes de antimicrobianos utilizadas

contra infecções causadas por *Streptococcus* spp. são: β -lactâmicos, aminoglicosídeos, lincosaminas, tetraciclinas e sulfonamidas (Economou & Gousia, 2015; Léger et al., 2017; Haenni et al., 2018; Redding et al., 2019). De acordo com Naranjo-Lucena & Slowey (2023), os estreptococos apresentam níveis reduzidos de resistência aos aminoglicosídeos e β -lactâmicos, níveis variáveis às tetraciclinas (dependendo da espécie) e níveis elevados de resistência aos macrolídeos, lincosaminas e estreptogramina B.

3.7. Fatores de virulência de *Streptococcus* sp.

A habilidade das espécies de *Streptococcus* em invadir, colonizar e se multiplicar no hospedeiro é determinada pela codificação dos chamados fatores de virulência, que reforçam seu potencial patogênico. Considerando a espécie *Streptococcus agalactiae*, os principais genes de virulência responsáveis pela adesão à célula hospedeira são *fsbA* (proteína de ligação à fibronectina A), *fsbB* (proteína de ligação à fibronectina B), *pavA* (proteína de ligação à fibronectina), *bibA* (adesina imunogênica bacteriana) e *lmb* (proteína de ligação à lamimina); as ilhas de patogenicidade (Pathogenicity Islands - PI) PI-1, PI-2a e PI-2b são responsáveis pela adesão e invasão; C5a peptidase (*scpB*), serina protease (*cspA*), β -antígeno da proteína C (*bac*) e α -antígeno da proteína C (*bca*) pela evasão do sistema imune do hospedeiro; *hyB* (hialuronato liase) e *cfb* (fator CAMP) pela degradação dos tecidos do hospedeiro e *cyE* (beta hemolisina citolisina) pela degradação dos tecidos e disseminação sistêmica (Lin et al., 2021). *Streptococcus dysgalactiae* apresenta genes semelhantes aos de *Streptococcus agalactiae* como *lmb*, *cyl*, *bca*, *bac*, *scpB*, C5a peptidase e *cfb*. Isso ocorre por conta da capacidade de *Streptococcus agalactiae* transferir estes genes para que *Streptococcus dysgalactiae* pudesse se adaptar ao ambiente bovino. Além disso, possui os genes *napr* e *eno* que promovem a adesão e invasão do patógeno (Shen et al., 2022).

Com relação a *Streptococcus uberis*, o gene *sua* atua na adesão e invasão celular, codificando a molécula de adesão de superfície (*Streptococcus uberis* adhesion molecule - SUAM). O gene *hasC* constitui uma cápsula de ácido hialurônico para impedir a fagocitose do patógeno e diminuir a atividade de antimicrobianos sobre ele. As proteínas PauA e SkC atuam na invasão da célula hospedeira degradando a parede extracelular e as proteínas Opp transportam solutos imprescindíveis para que a bactéria seja capaz de crescer no leite (Kabelitz et al., 2021; Zouharova et al., 2022).

Informações a respeito dos fatores de virulência de *Streptococcus canis* e *Streptococcus equinus* ainda são escassas. Mesmo sendo um patógeno causador de mastite, a incidência de *Streptococcus canis* em bovinos é baixa e a suscetibilidade a antimicrobianos é elevada. Os principais fatores de virulência relatados de *Streptococcus equinus* referem-se a fatores que geram respostas inflamatórias e fatores de adesão à célula hospedeira (Jans et al., 2015; Pagnossin et al., 2022).

3.8. *Aerococcus viridans*

Aerococcus viridans é uma espécie que compreende bactéria Gram-positiva, catalase-negativa ou fraca-positiva, anaeróbia facultativa, morfológicamente organizada em cocos e normalmente apresenta α -hemólise de coloração esverdeada (Liu et al., 2015). Para a medicina veterinária, existem relatos da associação de *Aerococcus viridans* com síndromes respiratórias graves (Guccione et al., 2013) e mastite em bovinos (sendo um agente abundante no ambiente e já sido detectado em amostras de leite com mastite clínica e subclínica) (Devriese et al., 1999; Pitkälä et al., 2004; Spaková et al., 2012). Em termos de classificação, o fato desta espécie possuir características bioquímicas e de identificação semelhantes ao gênero *Streptococcus*, as infecções causadas por *Aerococcus viridans* podem ser erroneamente identificadas e até mesmo subestimadas. Além disso, sua diversidade genética e perfil de sensibilidade a antimicrobianos ainda não são totalmente compreendidos (Liu et al., 2015).

3.9. Comunidades bacterianas em leite de tanque

Atualmente, a utilização de técnicas avançadas de biologia molecular como o Sequenciamento de Nova Geração permitiram um maior entendimento a respeito da diversidade bacteriana presente no leite cru e sua relação direta com saúde do rebanho, qualidade e segurança do leite, já que este apresenta condições favoráveis para o desenvolvimento de diversos microrganismos, benéficos ou não (Addis et al., 2016; Ryu et al., 2021).

Tanques de expansão direta são reservatórios presentes nas propriedades rurais responsáveis pelo armazenamento e refrigeração de todo leite cru obtido após ordenha, preservando-o em temperatura menor ou igual a 4°C. Assim como todo o processo de ordenha, o tanque de resfriamento também necessita de práticas corretas de limpeza e higiene. Além disso, este deve ser abrigado em áreas cobertas,

pavimentadas, com paredes, pontos de água corrente e que apresentem boas condições de iluminação e ventilação (Brasil, 2018b).

A detecção de microrganismos, sobretudo os patogênicos, em amostras de leite de tanque apresenta grande relevância em termos de qualidade e segurança do alimento, pois sua ocorrência naquele meio indica a existência de animais contaminados no rebanho ou contaminação vinda do próprio ambiente (Bi et al., 2016).

Considerando todos os tópicos aqui apresentados, este estudo teve por objetivo avaliar a incidência de *Streptococcus* spp. e *Aerococcus viridans* em amostras de leite de vacas mastíticas e sadias, além de verificar e comparar a diversidade bacteriana presente em amostras de leite de tanque. Este trabalho possui um caráter inédito pois, até o momento, não foram encontrados estudos que envolvam amostras de leite provenientes das cinco regiões do Brasil.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi dividido em duas etapas. Na primeira, foi realizado o isolamento de *Streptococcus* sp. e *Aerococcus viridans* em leite de vacas com mastite clínica, subclínica e vacas saudáveis. Na segunda etapa, foi realizado o microbioma de amostras de leite de tanque.

4.1. Origem e obtenção das amostras de leite de teto

Foram coletadas e avaliadas 1.447 amostras de leite de rebanhos das cinco regiões do Brasil provenientes de vacas classificadas como saudáveis e vacas com mastite (clínica e subclínica). Quanto à localização dos rebanhos e número de fazendas envolvidas, as coletas da região Sul foram conduzidas no estado de Santa Catarina em quatro fazendas; da região Sudeste em São Paulo em uma fazenda; da região Centro-Oeste em Goiás em três fazendas; da região Nordeste na Paraíba em cinco fazendas e da região Norte no Pará em três fazendas, totalizando 16 fazendas. Os estados foram escolhidos com base em sua relevância no cenário nacional de produção de leite e segundo disponibilidade de envio de amostras para a realização do trabalho.

As amostras de leite foram obtidas imediatamente após o diagnóstico de mastite clínica ou subclínica e os animais não haviam sido tratados com

antimicrobianos no período das coletas. As coletas foram realizadas após a antissepsia dos óstios dos tetos com álcool iodado a 3%.

Foram coletadas amostras de leite provenientes de apenas um dos quatro tetos para cada animal. As amostras de leite foram colhidas em frascos estéreis para a realização de análises microbiológicas. Além disso, as amostras também foram colhidas em frascos estéreis contendo conservante Bronopol para a Contagem de Células Somáticas (CCS) e frascos com Azidiol para a Contagem Padrão em Placas (CPP).

As coletas foram realizadas pelo(s) veterinário(s) responsável(is) da fazenda ou pelos veterinários da equipe de pesquisadores envolvidos no projeto FAPESP 2019/17308-4. As amostras foram transportadas para o laboratório sob refrigeração (4 a 8°C) em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável via transporte aéreo ou terrestre, chegando ao nosso laboratório em um período de 12 a 30 horas. Na chegada, as temperaturas de todas as amostras foram medidas.

O diagnóstico de mastite clínica foi avaliado pelas alterações locais e/ou sistêmicas no leite a partir do teste da caneca de fundo escuro. A interpretação da mastite subclínica foi confirmada a partir da análise da CCS, exame bacteriológico do leite e histórico de CCSs anteriores, considerando o valor de 200.000 CS/mL como determinante de mastite subclínica.

4.1.1. Determinação dos valores de CCS e CPP por citometria de fluxo

As amostras de leite foram avaliadas eletronicamente quanto à CCS e CPP. A análise de CCS foi realizada através da técnica de citometria de fluxo em equipamento Fossomatic 5000basic® seguindo os procedimentos preconizados pela Norma Internacional ISO 13366-2 (ISO/IDF, 2006). A análise de CPP também foi realizada por citometria de fluxo, conforme descrito em ISO 16297 (ISO/IDF, 2013), em equipamento BactoScan FC® (Foss Electric, Hillerod, Dinamarca). As análises eletrônicas foram realizadas no Laboratório de Qualidade do Leite da Universidade Federal de Goiás (UFG).

4.2. Isolamento e identificação de *Streptococcus spp.* e *Aerococcus viridans*

A identificação de *Streptococcus spp.* baseou-se na metodologia descrita por Brito et al., (1999). Uma alíquota de 10 µL de cada amostra de leite foi semeada em ágar sangue de carneiro (5%) (Oxoid) e incubadas a 37°C para leituras após 24 e 48 horas. As colônias foram analisadas quanto à morfologia, tamanho, pigmentação e

presença de hemólise (Shome et al., 2012) e aquelas consideradas características de *Streptococcus* sp. foram submetidas a coloração de GRAM e teste da catalase para confirmação do gênero (Reyher et al., 2012; Tomazi et al., 2018a).

A identificação a nível de espécie foi realizada por meio de análises proteômicas pela técnica de MALDI-TOF (Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight), conduzida no Laboratório de Pesquisa em Qualidade do Leite do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP, Pirassununga). Cada isolado foi reativado em caldo BHI (Brain Heart Infusion), incubado a 37°C/24h e posteriormente isolado em placas contendo ágar BHI, também incubadas a 37°C/24h. A análise ocorreu a partir das colônias formadas na placa.

A identificação de isolados de *Aerococcus viridans* também foi realizada por meio da técnica de MALDI-TOF a partir da seleção de colônias suspeitas em placas de ágar sangue.

4.2.1. Teste de disco-difusão para susceptibilidade antimicrobiana de isolados de *Streptococcus* spp. e *Aerococcus viridans*

Os isolados foram testados quanto à suscetibilidade antimicrobiana por meio de teste de disco-difusão. Uma suspensão de cada isolado, inoculado em caldo BHI e incubado a 35°C/18-24h foi padronizada a 0,5 na escala de McFarland em tubos de solução 0,85% de NaCl e semeada com o auxílio de um swab estéril em placas de ágar Muller-Hinton com 5% de sangue de carneiro. Os discos de antimicrobianos foram aplicados firmemente sobre a superfície do ágar, mantendo distância uns dos outros. As placas foram, então, incubadas a 35°C/18-24h (Matuschek et al., 2014; EUCAST, 2022) e, após incubação, os halos de inibição foram medidos com paquímetro digital.

Os antimicrobianos testados contra os isolados de *Streptococcus* spp. e suas respectivas concentrações foram: amoxicilina com ácido clavulânico (AMC, 30 ug), clindamicina (CLI, 2 ug), estreptomicina (EST, 10 ug), neomicina (NEO, 30 ug), cefalotina (CFL, 30 ug), oxacilina (OXA, 1 ug), tetraciclina (TET, 30 ug) e sulfazotrim (SUT, 25 ug). A interpretação dos resultados seguiu os métodos recomendados pelo European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2022) considerando *Streptococcus* grupos A, B, C e G. Entretanto, esta diretriz não forneceu critérios interpretativos para determinadas combinações patógeno-antimicrobiano.

Neste caso, os pontos de corte para EST, NEO e CFL originalmente estabelecidos por Bauer et al., (1966) foram considerados (Petrovski et al., 2015).

Para os isolados de *Aerococcus viridans*, foram utilizados os mesmos antimicrobianos incluindo penicilina G (PEN, 10U). Os pontos de corte para PEN, AMC, EST, TET e CLI seguiram metodologia de Martín et al., (2007). Com relação à CFL, NEO, OXA e SUT, os valores de referência foram baseados na metodologia de Bauer et al., (1966) para os dois primeiros e EUCAST (2022) para os dois últimos, porém considerando as diretrizes para *Streptococcus* do grupo B. Não existem critérios interpretativos para *Aerococcus viridans* em diretrizes como o CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute) (Hirunwiwatkul et al., 2012).

4.2.2. Extração de DNA

A partir dos resultados do teste de disco-difusão, foram selecionados nove isolados multirresistentes de *Streptococcus agalactiae*, que apresentaram resistência a três ou mais classes diferentes de antimicrobianos, para realizar o sequenciamento do genoma total. Para assegurar a pureza dos isolados, estes foram inoculados em caldo BHI a 37°C/24h e semeados em placas de CHROMagar StrepB (Plastlabor). Após incubação a 37°C/24h, uma colônia pura foi reisolada em placas de ágar BHI e incubadas sob as mesmas condições.

Para a extração de DNA, uma colônia de cada isolado a partir da placa de BHI foi depositada em eppendorf contendo 100 µL de água Mili-q e centrifugada a 12.000 rpm/5 min. O sobrenadante foi retirado, restando apenas o pellet para extração. O DNA foi extraído com DNeasy PowerFood Microbial Kit (Qiagen) de acordo com o protocolo do fabricante e obtendo um volume total de 50 µL. Após extração, as amostras de DNA foram quantificadas em NanoDrop Lite (Thermo Fischer Scientific).

4.2.3. Confirmação molecular de *Streptococcus* spp.

As linhagens de *Streptococcus* spp. foram submetidas a confirmação genotípica por PCR do gene 16S.

A reação de PCR foi realizada com volume total de 50 µL, sendo 10 µL de 5X Colorless GoTaq Flexi Buffer (Promega), 3 µL de MgCl₂ (25mM) (Promega), 1 µL de dNTP (10 mM) (Promega), 1 µL de primer forward (515F_V4) (Sigma), 1 µL de primer reverse (806R_V4) (Sigma), 0,3 µL de GoTaq Hot Start Polymerase (5U/µL) (Promega), 4 µL de DNA e água Mili-q para completar o volume. A incubação foi realizada em termociclador SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems – Thermo

Fischer Scientific) utilizando os parâmetros: 95°C/2 min seguidos por 25 ciclos de 95°C/20 seg, 55°C/1 min, 72°C/1 min, 72°C/5 min e espera de 4°C. Foi incluído um controle negativo que consistiu em todos os reagentes mais água Mili-q. 5 µL dos produtos de PCR somados com 1 µL de corante Gel Loading Dye Purple 6X (New England BioLabs Inc.) foram submetidos à eletroforese (LPS 600V - Locus) em gel de agarose a 1,5% (Sigma Aldrich) em tampão de ácido bórico-Tris-EDTA (TBE) e revelados com Syber Safe (Invitrogen). Os fragmentos de DNA foram analisados comparativamente com marcadores de DNA de 100 bp (100 Base Pair Ladder – Promega) e posteriormente fotografados em analisador de imagens (UVITEC 441226 UVIsave-HD5 Mini Gel Imager).

4.2.4. Purificação e Sequenciamento Sanger

Os produtos amplificados foram purificados. 60 µL de isopropanol 75% (fresco e a temperatura ambiente) foram adicionados aos produtos de PCR, sendo todo o volume ressuspendido em novo eppendorf e mantido em espera por 20 minutos. Os tubos foram centrifugados a 13.500 rpm/25 min/4°C e todo o isopropanol foi removido. Foram adicionados 500 µL de etanol 70% (fresco e a temperatura ambiente), centrifugados a 13.500 rpm/15 min/ 4°C e descartados ao fim do processo. Os tubos foram mantidos abertos em estufa a 37°C/1-2h para secagem completa. Após secagem, o DNA foi ressuspendido em 20 µL de água Mili-q. Os DNAs foram quantificados em NanoDrop e, após quantificação, os valores de concentração em ng/µL foram considerados para os cálculos de normalização para a realização do Sequenciamento Sanger para confirmação do gênero e espécie.

O Sequenciamento Sanger foi conduzido no Laboratório Multiusuário de Genotipagem e Sequenciamento do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Utilizou-se o Genetic Analyser 3500XL (Life Technologies – Applied Biosystems). As reações de sequenciamento foram feitas com BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit com utilização de capilares de 50 cm com o polímero POP-7.

Considerando as regras do fabricante do equipamento e o tamanho do produto de PCR gerado (358 pb), a quantidade necessária de DNA para a realização do sequenciamento foi 10 ng. Além disso, foi definido um volume de 6,5 µL para cada amostra levando em consideração a capacidade máxima do equipamento, sendo 6 µL de DNA normalizado e 0,5 µL (a 5 uM) de primer forward do gene 16S (515F_V4) adicionado ao fim da normalização.

Para facilitar os cálculos de normalização, foram estabelecidas estimativas considerando o valor em ng das amostras de DNA após purificação: para amostras com até 5 ng de DNA, foram aliqüotados 3 µL de DNA e 3 µL de água Mili-q para atingir a concentração ideal de 10 ng; para amostras de 6 a 8 ng, foram aliqüotados 2 µL de DNA e 4 µL de água Mili-q; para amostras de 9 a 14 ng, foram aliqüotados 1,5 µL de DNA e 4,5 µL de água Mili-q. Posteriormente, em cada amostra, foi adicionado 0,5 µL do primer forward 515F_V4. Todas as amostras foram, então, adicionadas em microplacas PCR-96-FLT-C (Axygen).

Os eletroferogramas com os resultados foram obtidos em formato “.AB1”, analisados em software *Chromas* e as sequências geradas foram comparadas pelo BLAST (NCBI) (Wood et al., 1998).

4.2.5. Sequenciamento do Genoma Completo de *Streptococcus agalactiae*.

Para o preparo da biblioteca de sequenciamento, foi utilizado QIAseq FX DNA Library Core Kit (24) (Qiagen) conforme recomendações do fabricante. A qualidade da biblioteca foi analisada em High Sensitivity D5000 ScreenTape Assay for TapeStation Systems (Agilent) e posteriormente quantificada por qPCR seguindo protocolo do kit QIAseq Library Quant Assay Kit (Qiagen).

O Sequenciamento foi realizado na Instalação Multiusuária de Sequenciamento de Alta Performance do Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM, Campinas) em equipamento MiSeq (Illumina). O alinhamento, interpretação das sequências, busca pelos genes de resistência, virulência e construção da árvore filogenética foram realizados pelos softwares Galaxy Europe (The Galaxy Community, 2022), Center For Genomic Epidemiology (Kaas et al., 2014) e Microreact (Argimón et al., 2016).

4.3. Metagenômica do gene 16S rRNA de amostras de leite de tanque

4.3.1. Origem e obtenção das amostras

Foram coletadas 57 amostras provenientes de tanque de fazendas produtoras de leite, também envolvendo as cinco regiões do país, nos seguintes estados: Santa Catarina (região Sul), São Paulo e Minas Gerais (região Sudeste), Goiás (região Centro-Oeste), Maranhão (região Nordeste), Pará e Tocantins (região Norte). Não foi possível obter informações quanto ao número de fazendas envolvidas. Estes estados também foram escolhidos com base em sua relevância no cenário nacional de

produção de leite e segundo disponibilidade de envio de amostras para a realização do trabalho.

As coletas de leite de tanque seguiram os mesmos procedimentos descritos no item 3.1.. As análises eletrônicas quanto a CCS e CPP também foram realizadas conforme item 3.1.1..

4.3.2. Extração do DNA total e quantificação

Para as extrações de DNA total, uma alíquota de 1,5 mL de leite foi centrifugada a 13.000 rpm/10 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi ressuscitado em 1,5 mL de PBS (Phosphate Buffered Saline), passando por nova centrifugação sob as mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e o pellet resultante foi utilizado para a extração de DNA (adaptado de Abreu et al., 2021). Foi empregado o DNeasy PowerFood Microbial Kit (Qiagen) seguindo recomendações do fabricante e obtendo um volume total de 50 µL. Após extração, os DNAs foram quantificados em Nanodrop Lite (Thermo Fischer Scientific).

4.3.3. Amplificação do gene 16S rRNA por PCR convencional

Todas as amostras de DNA foram submetidas à amplificação do gene 16S rRNA por PCR convencional. A reação de amplificação possuiu volume total de 25 µL e seguiu os mesmos parâmetros descritos no item 3.2.3..

Após a amplificação, foram coletados 5 µL de cada reação mais 1 µL de corante Gel Loading Dye Purple 6X (New England BioLabs Inc.) e pipetados em poços de gel de agarose a 1,5% corado com Syber Safe (Invitrogen). As amostras foram reveladas em transiluminador (UVITEC 441226 UVIsave-HD5 Mini Gel Imager).

4.3.4. Primeira purificação e quantificação

As amostras amplificadas foram purificadas conforme protocolo 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Guide (Illumina, 2013) com algumas modificações. Para os 45 µL restantes da amplificação do 16S, foi adicionado 50 µL de beads magnéticas Mag-Bind Total Pure NGS (Omega Bio-Tek) permanecendo em descanso por 5 minutos a temperatura ambiente. A seguir, a amostra foi colocada em estante magnética Single Place Magnetic Stand (Invitrogen) por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e acrescido 200 µL de etanol 70% fresco, permanecendo por 30 segundos em estante magnética e removido em seguida. Nova lavagem com 200 µL de etanol 70% foi realizada, permanecendo por mais 30 segundos em estante

magnética. Após a retirada do etanol 70%, ainda em estante magnética, os tubos permaneceram abertos por 5 minutos para evaporação de etanol residual. Os tubos foram retirados da estante magnética e o DNA foi ressuspenso em 32,5 µL de água Mili-q, sendo mantido a temperatura ambiente por 5 minutos e, a seguir, por mais 3 minutos em estante magnética. Foram coletados 30 µL do sobrenadante e a quantificação foi realizada em Nanodrop (Thermo Fischer Scientific).

Após a quantificação, os mesmos foram padronizados em 5 ng/ µL para realização da reação de indexação. Os DNAs mais concentrados foram diluídos em água Mili-q ultra pura estéril.

4.3.5. Indexação e segunda purificação

Após as normalizações dos DNAs purificados, estes foram submetidos à reação de indexação por PCR como consta no protocolo 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Guide (Illumina, 2013). Para indexação foi realizada uma reação de 50 µL contendo 10 µL de 5x Q5 Reaction Buffer (New England BioLabs Inc.), 10 µL de 5X Q5 High GC Enhancer (New England BioLabs Inc.), 1 µL de dNTP 10 mM (Invitrogen), 5 µL de cada par de index Nextera XT Index Primer 1 (N7xx) e Nextera XT Index Primer 2 (S5xx) (Illumina), 0,5 µL de Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs Inc.), 8 µL de DNA e água Mili-q ultra pura para completar. Com todas as amostras indexadas, as mesmas foram purificadas conforme descrito em 4.3.4. e posteriormente quantificadas pelo método de Qubit (Invitrogen).

Para a quantificação por Qubit, foram seguidas as recomendações específicas do fabricante, dado valor em nanograma por microlitro que foi convertido em nanomolar para realização da quantificação por qPCR KAPA Library Quantification kits (Kapa Biosystems).

Estas etapas foram realizadas na Instalação Multiusuária de Sequenciamento de Alta Performance do Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM, Campinas).

4.3.6. Construção da biblioteca e Sequenciamento de Nova Geração (NGS) do gene 16S rRNA

Para o estudo da diversidade bacteriana, foi realizado o sequenciamento metagenômico do gene 16S rRNA com o objetivo de identificar os rankings taxonômicos presentes nas amostras coletadas, principalmente famílias e gêneros.

Depois da realização da qPCR, foi efetuado o processo de desnaturação e diluição das bibliotecas em equipamento Illumina MiSeq utilizando o MiSeq Reagent Kit V3 (Illumina) conforme protocolo específico (Illumina, 2013).

Assim como a indexação, o preparo da biblioteca e o sequenciamento do gene 16S foram realizados em parceria com a Instalação Multiusuária de Sequenciamento de Alta Performance do Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM, Campinas).

4.3.7. Processamento dos dados e atribuição taxonômica por bioinformática

Após a demultiplexação dos dados brutos, as sequências *forward* e *reverse* (*paired-ends*) geradas pelo sequenciamento passaram por controle de qualidade pelo software MultiQC (Ranilla et al., 2023). As sequências correspondentes ao primer 16S foram removidas e a união destas em uma só sequência foi conduzida utilizando o C++ package SeqPrep. As sequências passaram por filtragem conforme qualidade baseadas em: i) permissão de no máximo três *basecallings* consecutivas de baixa qualidade (Phred < 19); ii) fração de *basecallings* consecutivas de alta qualidade (Phred > 19) em uma leitura total com comprimento de leitura $\geq 0,75$; iii) proibição de bases marcadas com "N" (ausentes/não chamadas). Sequências fora destes parâmetros foram descartadas. As sequências remanescentes foram unidas em um único arquivo FASTA. A identificação, classificação e quantificação das Unidades Taxonômicas Operacionais (Operational Taxonomic Unit - OTUs) foi realizada comparando os resultados com a base de dados de SILVA v. 132 considerando 97% de identidade de cluster (Quast et al., 2013; Yilmaz et al., 2014; Glöckner et al., 2017). A partir da base de dados de referência, os principais táxons foram identificados (reino, filo, classe, ordem, família e gênero) e agrupados, gerando uma tabela de OTUs com suas respectivas abundâncias. OTUs com contagens totais inferiores a 15 em menos de duas amostras foram excluídas. A interpretação e filtragem dos OTUs foi realizada a partir do programa RStudio (RStudio Team, 2020). Todos os comandos utilizados nesta etapa seguiram metodologia adaptada de Biscarini et al. (2018). Esta etapa foi realizada no Departamento de Medicina Veterinária e Ciência Animal da Universidade de Estudos de Milão (Università degli Studi di Milano, UNIMI, Lodi, Itália).

4.3.8. Índices de diversidade alfa e beta

A diversidade bacteriana foi avaliada dentro (diversidade alfa) e entre (diversidade beta) amostras. Considerando o número de OTUs observados,

contabilizados diretamente da tabela de OTUs, os índices de riqueza e diversidade dentro e entre amostras baseou-se na metodologia de Biscarini et al., (2018).

A estimativa de ambas as diversidades e o desenvolvimento de gráficos e figuras foram conduzidas através do software RStudio (RStudio Team, 2020). Para os índices de diversidade alfa, foi utilizado o pacote “phyloseq” (Mcmurdie & Holmes, 2013). Para a diversidade beta, além do “phyloseq”, o pacote “vegan” (Oksanen, 2022) também foi utilizado. Os gráficos e figuras foram desenvolvidos através do pacote “ggplot2” (Wickham, 2016).

4.4. Análise estatística

A partir dos resultados obtidos em todas as análises, foram avaliadas as características microbiológicas (presença de *Streptococcus* spp. e *Aerococcus viridans*) e de diversidade entre as amostras de leite, relacionando-as com os estados do Brasil e as chamadas características de qualidade (CCS e CPP).

Os cálculos estatísticos sobre a frequência de ocorrência de *Streptococcus* spp. e *Aerococcus viridans* e sua relação com CCS e CPP foi realizada por meio do software SAS Studio (Fouda, 2020) considerando valor de significância ($p < 0,0001$). Com relação a análise do microbioma das amostras de leite de tanque, para a avaliação das características de diversidade (alfa e beta), foram utilizadas ANOVA e PERMANOVA respectivamente. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software estatístico R (R CORE TEAM, 2015) e considerando a metodologia de Biscarini et al. (2018).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização das amostras individuais de leite de teto

Do total de 1.447 amostras, 720 (49,7%) foram provenientes de vacas consideradas saudáveis, 529 (36,6%) de leites com mastite subclínica e 198 (13,7%) com mastite clínica (Figura 1). As coletas foram realizadas em 16 fazendas diferentes.

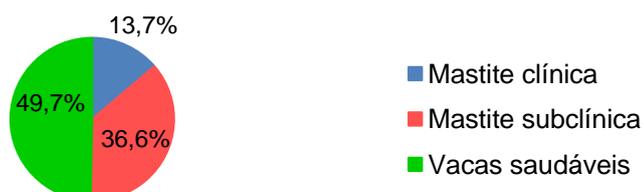


Figura 1. Representação da porcentagem total de amostras com mastite clínica, mastite subclínica e leites provenientes de vacas saudáveis.

Com relação ao número de amostras por estado do Brasil, São Paulo, Pará e Paraíba contabilizaram 353 (24,4%), 299 (20,7%) e 279 (19,3%) amostras, respectivamente. Os estados de Santa Catarina e Goiás apresentaram o mesmo número de amostras: 258 (17,8%). De acordo com a Figura 2, é possível notar que as amostras de leite provenientes de vacas saudáveis foram maioria nos estados de São Paulo (133/353), Pará (226/299) e Goiás (174/258). Amostras de leite com mastite subclínica foram maioria nos estados da Paraíba (166/279) e Santa Catarina (118/258), e o estado de São Paulo apresentou o maior número de amostras de leite com mastite clínica (122).

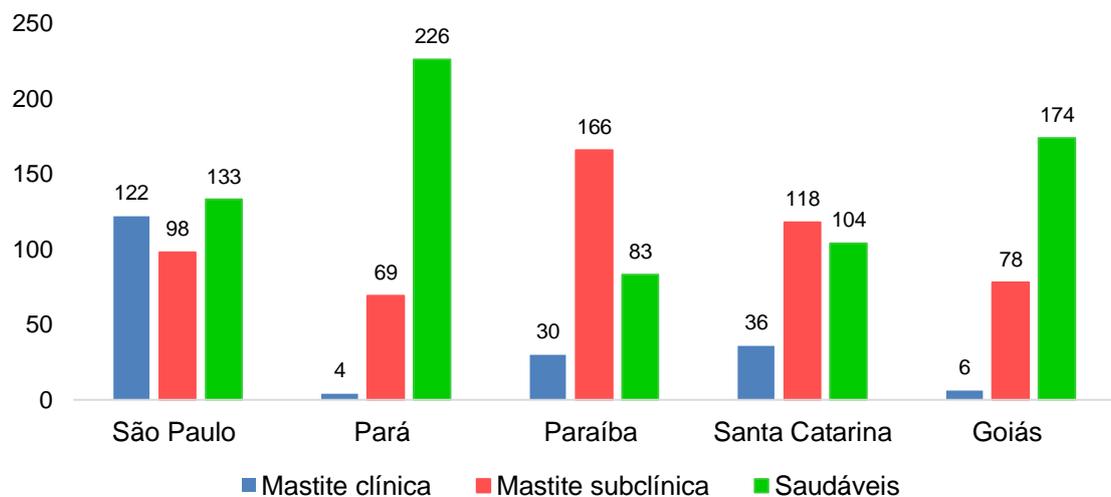


Figura 2. Relação entre os tipos de amostras (mastite clínica, mastite subclínica e leites provenientes de vacas saudáveis) e os estados do Brasil envolvidos no trabalho.

Estudos sobre a incidência de mastite bovina comparando os diferentes estados e regiões brasileiras são escassos, o que acaba limitando a capacidade de confrontar os resultados. Neste caso, com o intuito de estabelecer um parâmetro comparativo, foram realizadas pesquisas sobre a ocorrência da doença nos mesmos estados aqui citados em períodos anteriores a 2023.

No presente estudo, das 1.447 amostras obtidas das cinco regiões do Brasil, 49,7% foram provenientes de vacas consideradas saudáveis, 36,6% foram diagnosticadas com mastite subclínica e 13,7% com mastite clínica.

Com relação específica aos estados brasileiros, trabalho conduzido por Júnior et al. (2015) em Goiás (região Centro-Oeste) obtiveram resultados superiores aos apresentados no atual estudo: de um total de 256 quartos mamários analisados, 88,3% de amostras foram positivas para mastite subclínica e 11,7% para mastite

clínica, comparado com 30,2% (78/258) e 2,3% (6/258), respectivamente, neste trabalho.

Considerando o estado da Paraíba (região Nordeste), o presente estudo apresentou resultados superiores comparado ao trabalho realizado por Lima et al. (2022). De 920 quartos mamários (ou 230 animais), 40,2% foram positivos para mastite subclínica e 5,5% para mastite clínica, contra 59,5% (166/279) e 10,8% (30/279) no presente estudo.

Em comparação com estudo realizado no Pará (região Norte) por Oliveira et al. (2011) envolvendo 237 animais, o atual estudo obteve 23,1% (69/299) de vacas positivas para mastite subclínica contra 15,6%. Entretanto, o inverso ocorreu com relação a mastite clínica: 1,3% (4/299) no presente estudo contra 4,7% no estudo de 2011.

Em Santa Catarina (região Sul), estudos recentes de Niero et al. (2021) e Almeida et al. (2021) com 442 e 26 amostras, respectivamente, obtiveram resultados superiores ao presente trabalho com relação à mastite subclínica: 76,9% e 65% contra 45,7% (118/258) neste estudo. Com relação à mastite clínica, o atual trabalho obteve resultado intermediário: 35% em Almeida et al. (2021), 14% (36/258) neste estudo e 4,3% em Niero et al. (2021).

No estado de São Paulo (região Sudeste), estudos de Bueno et al. (2002) obtiveram, de um total de 799 quartos mamários, 63,7% de amostras com mastite subclínica e 7,5% de mastite clínica, superior (27,7% [98/353]) e inferior (34,6% [122/353]), respectivamente, ao presente estudo. Segundo Santos et al. (2014), de 259 vacas, 45,1% foram acometidas por mastite subclínica e 9,5% por mastite clínica, resultados também superiores e inferiores ao presente trabalho. Estudos recentes de Pinto et al. (2021) com um total de 239 vacas, obtiveram 30,5% de animais com mastite subclínica, resultado também superior ao presente estudo.

Mesmo sendo um dos destaques da indústria leiteira no mundo, diversos produtores brasileiros ainda enfrentam sérias dificuldades como a falta de acesso à tecnologias avançadas de gestão da produção, à programas de aprimoramento da qualidade do leite e à metodologias de diagnóstico de mastite. Além disso, é importante ressaltar as diferenças presentes dentro e entre as regiões do Brasil em termos de causa, origem e epidemiologia da mastite. Sendo assim, o desenvolvimento de estudos analisando a incidência de mastite clínica e subclínica nos rebanhos brasileiros são excelentes ferramentas para a criação de medidas de controle e prevenção da doença (Busanello et al., 2017; Tomazi et al., 2018b).

Foi possível observar que houve redução nas porcentagens de animais acometidos por mastite clínica e subclínica em Goiás (região Centro-Oeste) comparando os anos de 2015 e 2023 e em Santa Catarina (região Sul) nos anos de 2021 e 2023; redução na porcentagem de mastite clínica no Pará (região Norte) nos anos de 2011 e 2023, e mastite subclínica em São Paulo (região Sudeste) nos anos de 2002, 2014, 2021 e 2023. Essa redução pode ser explicada pela adoção de medidas apropriadas de prevenção, controle e tratamento de mastite nos rebanhos brasileiros, principalmente nas regiões Sul e Centro-Oeste. Dentre eles, o manejo correto da ordenha, o treinamento dos ordenhadores, práticas adequadas de higiene dos equipamentos de ordenha, dos tetos dos animais (antes e após ordenha), a higiene pessoal dos ordenhadores, cuidados com os ambientes ocupados pelos animais, ordenhar primeiro os animais saudáveis e por último os animais doentes, descarte de animais com mastite crônica e correto tratamento dos animais acometidos. Além disso, a realização de testes de diagnósticos de mastite logo no início da ordenha são práticas fundamentais, principalmente levando em consideração os casos de mastite subclínica onde os sinais clínicos da inflamação não são evidentes, dificultando o diagnóstico. Dentre eles, o CMT (*California Mastitis Test*) para mastite subclínica e o teste da caneca de fundo escuro para mastite clínica, por exemplo (Massote et al., 2019).

Entretanto, houve aumento nas porcentagens de animais acometidos por mastite clínica e subclínica na Paraíba (região Nordeste) entre os anos de 2022 e 2023, de mastite subclínica no Pará (região Norte) nos anos de 2011 e 2023 e de mastite clínica em São Paulo (região Sudeste) nos anos de 2002, 2014, 2021 e 2023. Isso representa que ainda existem falhas no manejo destes rebanhos em alguma(s) etapa(s) anteriormente citada(s), principalmente na região Nordeste.

Os casos de mastite subclínica costumam ocorrer em maior frequência comparado aos casos de mastite clínica (Ranasinghe et al., 2021), o que pode ser visto no presente estudo. Segundo Oliveira et al. (2020), para um caso de mastite clínica em um rebanho leiteiro, é possível ter até 20 animais com mastite subclínica. Alguns dos possíveis fatores de risco associados aos casos de mastite subclínica no Brasil são: tratamento inadequado (utilização imprópria de antimicrobianos ou pela presença de microrganismos resistentes no rebanho), o local de ordenha (áreas externas e com condições precárias de limpeza aumentam os riscos de contaminação em relação à locais limpos, seguros e específicos para a ordenha), elevada paridade e idade dos animais (aumento da exposição do animal devido à quantidade de partos

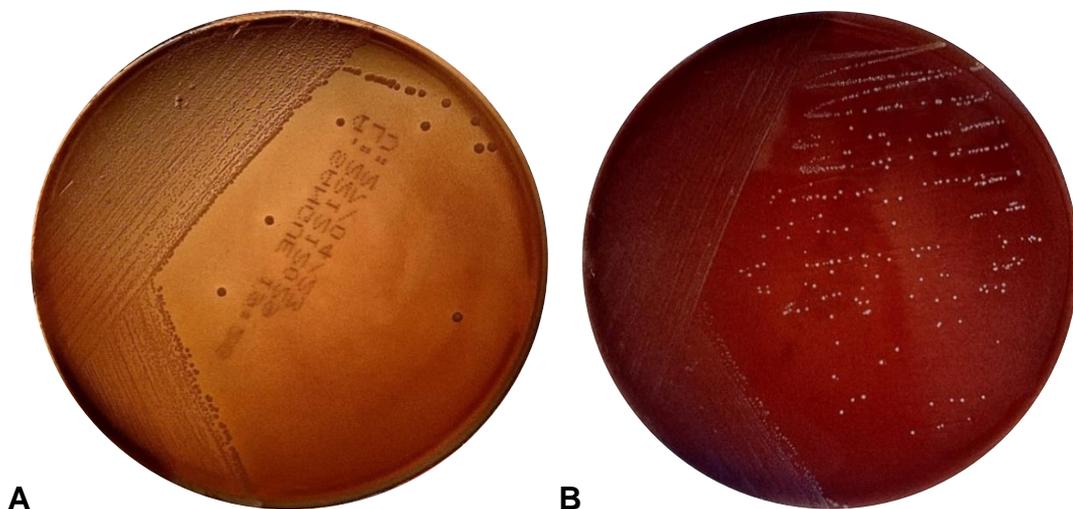
ocorridos, à calosidade das extremidades dos tetos, ao envelhecimento do tecido do úbere e o sistema imunológico enfraquecido), além de uma junção de fatores como o método de ordenha empregado, práticas de higiene, manejo e condições do ambiente (Cardozo et al., 2015; Ranasinghe et al., 2021).

Estudos de Steeneveld et al. (2008), Oliveira et al. (2015) e Tomazi et al. (2018b) descrevem que alguns dos possíveis fatores de risco associados aos casos de mastite clínica no Brasil são: o histórico de CCS do animal associado a quantidade de casos que este já teve em toda a sua vida e no mês anterior à lactação, o tratamento ineficiente ou incorreto de mastite clínica nas fazendas (momentaneamente os sinais clínicos e os sintomas podem desaparecer, mas estes retornam depois de um período, ainda configurando a mesma infecção e não uma nova), idade e paridade dos animais. Ademais, descobrir o patógeno que desencadeou o caso clínico (se contagioso ou ambiental; Gram-positivo ou Gram-negativo) auxilia na condução do tratamento correto.

Considerando todos estes fatores, a adoção de medidas como monitoramento contínuo da CCS do rebanho, análise dos fatores de risco para o desenvolvimento de mastite, correção de falhas e diagnóstico dos patógenos são essenciais para a criação de medidas favoráveis para o controle e prevenção da doença, permitindo consequentemente a produção de leite de qualidade.

5.2. Isolamento e identificação de *Streptococcus* spp.

Do total de 1.447 amostras de leite, foram identificados 32 (2,2%) isolados confirmados de *Streptococcus*, sendo 16 (50%) *S. agalactiae* (Figura 3A), dez (31,3%) *S. uberis* (Figura 3B), cinco (15,6%) *S. dysgalactiae* (Figura 3C) e um (3,1%) *S. equinus* (Figura 3E) (Figura 4).



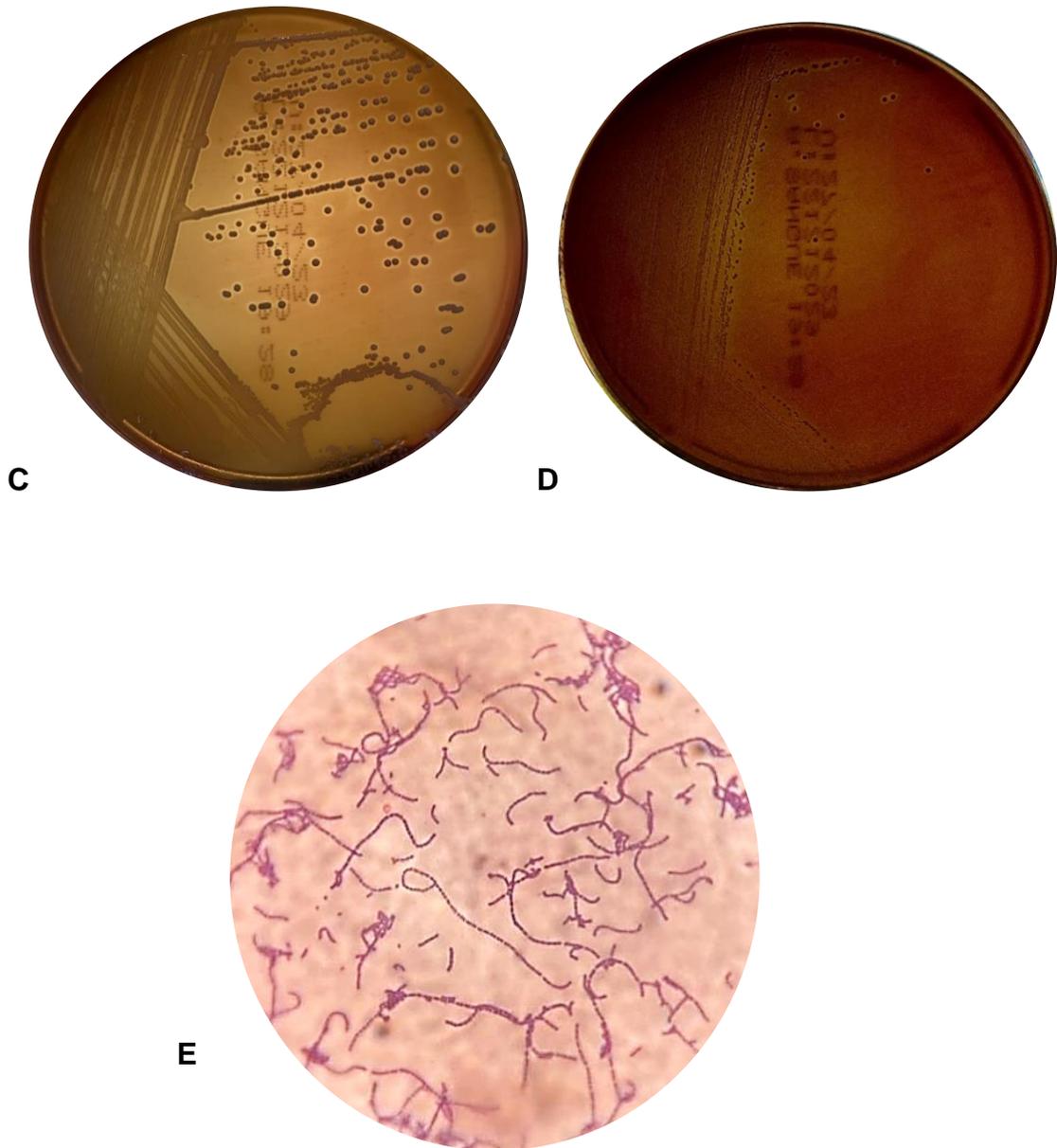


Figura 3A. *Streptococcus agalactiae* em placa de ágar sangue de carneiro. **3B.** *Streptococcus uberis*. **3C.** *Streptococcus dysgalactiae*. **3D.** *Streptococcus equinus*. **3E.** Visualização de *Streptococcus* sp. através de coloração de GRAM.



Figura 4. Espécies de *Streptococcus* spp. identificadas e suas respectivas porcentagens de ocorrência.

Com relação aos estados de coleta, é possível notar que o estado da Paraíba apresentou o maior número de isolados de *Streptococcus* spp.: todos os 16 (72,7%) de *S. agalactiae*, cinco (22,7%) *S. uberis* e um *S. dysgalactiae* (4,6%), totalizando 22 (68,7%). Além disso, foi identificado pelo menos um isolado de *Streptococcus uberis* em cada um dos estados brasileiros (Figura 5).

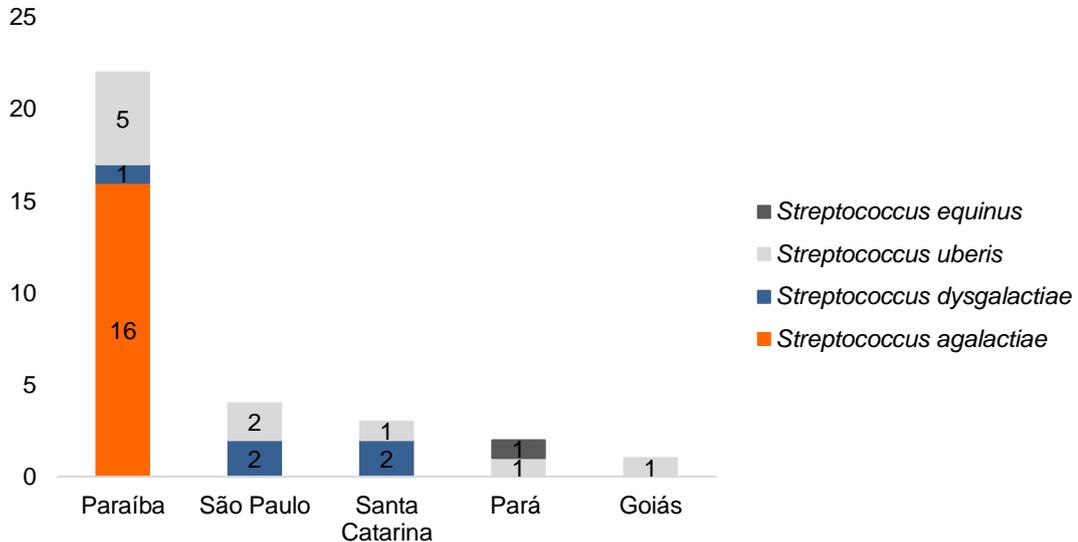


Figura 5. Distribuição das espécies de *Streptococcus* spp. identificadas a partir de amostras de leite de vacas sadias e mastíticas considerando os estados do Brasil envolvidos no presente estudo.

5.3. Relação entre os isolados de *Streptococcus* spp., Contagem de Células Somáticas (CCS) e Contagem Padrão em Placa (CPP).

Dos 32 isolados de *Streptococcus* spp., 18 (56,3%) foram identificados a partir de amostras de leites com mastite subclínica, 13 (40,6%) com mastite clínica e um (3,1%) isolado a partir de leite de vaca saudável, classificado como *S. equinus* (Figura 6).

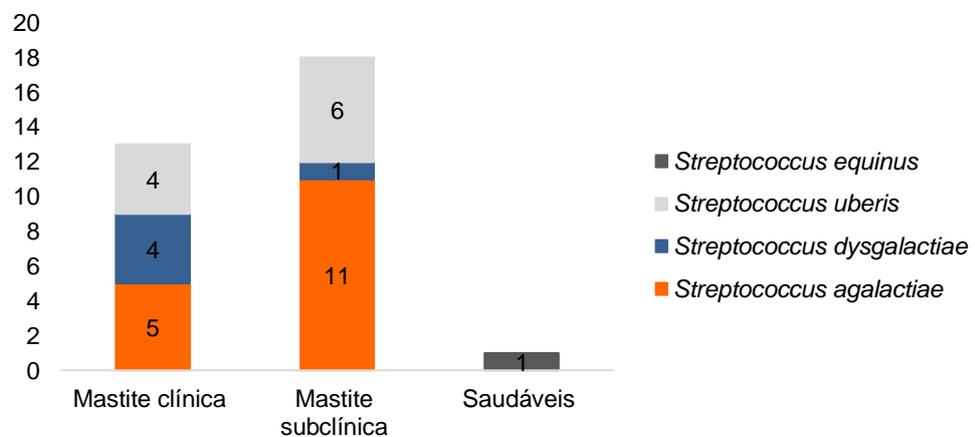


Figura 6. Relação entre as espécies de *Streptococcus* spp. e sua ocorrência em amostras de leites provenientes de vacas saudáveis e leites mastíticos.

Através de análises estatísticas, foi possível obter a mediana dos valores de CCS e CPP dos isolados de *Streptococcus* spp. (Tabela 1). Considerando os resultados abaixo, é possível observar que o valor da mediana de CCS (1.696.000 CS/mL) excede o limite de até 200.000 CS/mL como indicativo de glândulas mamárias saudáveis. Com relação à CPP, a Instrução Normativa Nº76 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) define o valor máximo de 900.000 UFC/mL para o leite cru refrigerado antes do beneficiamento. A mediana do valor de CPP está dentro dos limites legais (201.000 UFC/mL).

Tabela 1. Relação entre a mediana dos valores de CCS e CPP dos isolados de *Streptococcus* spp.

Patógeno	Variável	Mediana	p valor
<i>Streptococcus</i> spp.	CCS	1.696.000	< 0,0001
	CPP	201.000	

CCS: Contagem de Células Somáticas; CPP: Contagem Padrão em Placa.

Ainda com o objetivo de estabelecer um parâmetro comparativo envolvendo a incidência de *Streptococcus* spp. nos rebanhos leiteiros das diferentes regiões brasileiras, foram realizadas pesquisas sobre a ocorrência do microrganismo nos mesmos estados aqui envolvidos em períodos anteriores a 2023. Entretanto, este tipo de estudo comparativo ainda é escasso.

O gênero *Streptococcus* é um dos principais envolvidos em casos de mastite no mundo (Wente et al., 2019; Hernandez et al., 2021; Krishnamoorthy et al., 2021). No Brasil este fato não é diferente: junto com *Staphylococcus aureus*, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, espécies como *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus uberis* representam aproximadamente 95% dos agentes causadores de mastite no país (Brito & Sales, 2007; Santos et al., 2007; Oliveira et al., 2015).

Comparando estudos ao redor do mundo, de 12 amostras de leite com mastite subclínica na Indonésia, foram identificados seis (50%) isolados de *S. sanguinis*, dois (16,7%) de *S. uberis*, e um (8,3%) de *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, *S. mitis* e *S. agalactiae* cada (Harjanti et al., 2018). Holko et al. (2019) obtiveram de 521 amostras de leite um total de 57 (10,9%) isolados de *S. uberis*, 30 (5,8%) de *S. agalactiae*, seis (1,1%) de *S. bovis* e três (<1%) de *S. dysgalactiae* na Eslováquia. Na China, de 1.153 amostras de leites mastíticos foram identificados 50 (4,3%) *S. agalactiae*, 46 (4%) *S. uberis* e 20 (1,7%) *S. dysgalactiae* (Song et al., 2020). É possível notar que as espécies *S. agalactiae*, *S. uberis* e *S. dysgalactiae* foram

encontradas em todos os estudos, porém as duas primeiras estiveram presentes em maiores quantidades comparadas à *S. dysgalactiae*, assim como no presente estudo, reforçando o fato de que *S. agalactiae* e *S. uberis* são os principais agentes causadores de mastite dentro do gênero *Streptococcus* (Leelahapongsathon et al., 2016). Além disso, nota-se uma heterogeneidade de espécies de *Streptococcus spp.* no estudo conduzido na Indonésia em relação aos demais, provavelmente devido às condições climáticas do local, características do rebanho (genética, fase de lactação) e às rotinas conduzidas nas fazendas (condições da ordenha, secagem das vacas e tipos de tratamento realizados) (Bangar et al., 2015).

Considerando os resultados aqui apresentados, o estado brasileiro com o maior número de isolados de *Streptococcus spp.* foi a Paraíba (n=22; 68,7%), que a espécie *Streptococcus agalactiae* foi a mais encontrada (n=16; 50%), que a espécie *Streptococcus uberis* foi identificada em todos os estados e que a maior quantidade de isolados foram detectados em amostras de leite com mastite subclínica (n=18; 56,3%).

No Pará (região Norte), estudos de Freitas et al., (2012) envolvendo 178 amostras de leite com mastite subclínica obtiveram 22 isolados de *Streptococcus spp.*, sendo sete *S. uberis*, seis *S. equinus*, cinco *S. agalactiae* e quatro *S. dysgalactiae*. Com relação ao atual estudo, dois isolados foram obtidos de um total de 299 amostras, sendo um isolado de *S. uberis* de amostra com mastite subclínica e um isolado de *S. equinus* de uma amostra de leite de vaca até então considerada saudável.

Estudos de Bueno et al. (2003) em São Paulo (região Sudeste) analisaram 543 amostras de leite com mastite clínica ou subclínica e obtiveram um total de 95 isolados de *Streptococcus spp.*, sendo: 60 *S. agalactiae*, 23 *S. uberis* e 12 *S. dysgalactiae*. Langoni et al. (2011) encontraram 45 isolados em 218 amostras de leite. As 210 amostras com mastite subclínica continham: 25 *S. dysgalactiae*, 15 *S. agalactiae*, dois *S. uberis* e um *S. bovis*. As oito amostras de mastite clínica continham: um *S. dysgalactiae* e um *S. agalactiae*. O presente estudo identificou quatro isolados de *Streptococcus spp.* em 353 amostras de leite, sendo dois *S. dysgalactiae* (ambos de amostras de leite com mastite clínica) e dois *S. uberis* (um de mastite clínica e outro de mastite subclínica).

Com relação ao estado da Paraíba (região Nordeste), estudo já citado de Lima et al. (2022) detectou 53 isolados de *Streptococcus sp.* de um total de 421 amostras de leite, sendo 43 obtidos de leites com mastite subclínica e 10 com mastite clínica. Porém, o estudo não caracterizou os isolados a nível de espécie. De um total de 279

amostras, foram obtidos 22 isolados de *Streptococcus* spp. no presente trabalho, sendo 15 obtidos de leites com mastite subclínica e sete com mastite clínica. Com relação às espécies, foram encontrados 16 isolados de *S. agalactiae*, cinco *S. uberis* e um *S. dysgalactiae*.

No estado de Santa Catarina (região Sul), estudos de Jobim et al. (2010) envolvendo 628 amostras de leites com mastite clínica ou subclínica encontraram 103 isolados de *Streptococcus* spp., sendo 68 de *S. agalactiae* e 35 de *S. bovis*. Valmorbidia et al. (2017) em 345 amostras de leites com mastite clínica ou subclínica encontraram 120 isolados de *Streptococcus* spp.. Destes, 75 pertenciam à espécie *S. uberis*, 15 à *S. dysgalactiae*, oito à *S. agalactiae* e 22 não foram identificados. O atual estudo apresentou um total de três isolados em 258 amostras, sendo dois *S. dysgalactiae* e um *S. uberis*, todos isolados de amostras com mastite clínica.

Trabalho de Moreira et al. (1997a) no estado de Goiás (região Centro-Oeste) envolvendo 231 amostras de leite com mastite clínica identificaram 51 isolados de *Streptococcus* sp., porém não houve identificação a nível de espécie. Martins et al. (2015) encontraram em 332 amostras de leite com mastite subclínica 161 *S. uberis*, 123 *S. agalactiae* e 72 *S. dysgalactiae*. De 258 amostras analisadas no presente estudo, foi encontrado apenas um isolado de *S. uberis* em amostra com mastite subclínica.

Comparando os estados brasileiros ao longo do tempo, foi possível analisar que houve redução no número de isolados de *Streptococcus* spp. nos rebanhos leiteiros. No presente estudo, *S. uberis* (principal exemplo de patógeno ambiental) esteve presente em todos os estados brasileiros e, com relação a *S. agalactiae* (principal exemplo de patógeno contagioso), todos os isolados foram provenientes de amostras da Paraíba.

Streptococcus uberis pode ser considerado o principal exemplo de agente ambiental causador de mastite, fato este que pôde ser observado no presente estudo, sendo a espécie encontrada em todos os cinco estados do Brasil. O nível de infecção que esse agente pode causar depende da exposição ao meio ambiente e a resposta imunológica do animal frente à infecção (Wente et al., 2019). Além disso, estudos de Tomazi et al. (2019), focando na biologia molecular de *S. uberis*, mostraram que também pode haver a transmissão do patógeno de forma contagiosa (de vaca para vaca), o que dificulta ainda mais o estabelecimento de medidas de controle e prevenção. *S. uberis* causa principalmente casos clínicos agudos e recorrentes de mastite, podendo variar de leve até severa (Wente et al., 2019). Entretanto, também

pode ser responsável por desencadear mastite subclínica na ocorrência de elevadas variabilidades genóticas e fenóticas do patógeno (Lasagno et al., 2011). É possível notar que a maioria dos isolados de *S. uberis* foram provenientes de amostras de leite com mastite subclínica (seis, contra quatro de mastite clínica), o que mostra que provavelmente esses isolados sofreram variabilidades genóticas e fenóticas ao longo do tempo. Os patógenos ambientais são os mais difíceis de serem controlados e erradicados no rebanho devido a fatores como: sua onipresença no ambiente leiteiro (o que aumenta as chances de exposição dos animais aos patógenos), a ineficiência das medidas de controle ou a redução no número de agentes contagiosos de mastite (estafilococos e outros estreptococos, por exemplo) (Oliveira et al., 2015). Estudos de Kromker et al. (2014) relataram a presença de *S. uberis* em diversas partes dos corpos dos animais como lábios, cavidade oral, amígdalas, trato respiratório, rúmen, reto, orifício do teto, canal do teto, úberes infectados, pele, ferimentos e fezes.

Streptococcus agalactiae é um patógeno altamente contagioso que é capaz de causar em sua maioria infecções subclínicas de elevada duração (Leelahapongsathon et al., 2016), mas também associa-se a casos de mastite clínica recorrentes (Rossi et al., 2018). No presente estudo, a maioria (12/17) dos isolados de *S. agalactiae* foram encontrados em amostras de leite com mastite subclínica e o restante (5/17) em amostras com mastite clínica. A capacidade de formação de um biofilme permite que o patógeno permaneça por mais tempo na glândula mamária, elevando sua resistência em relação ao hospedeiro (Rosini & Margarit, 2015). A adoção de medidas adequadas de controle da mastite em fazendas leiteiras são capazes de reduzir a incidência de agentes contagiosos. Segundo Rossi et al., (2018), a espécie *S. agalactiae* foi eliminada de regiões produtoras de leite em países desenvolvidos. Porém, a concentração de isolados de *Streptococcus agalactiae* encontrados na Paraíba no presente estudo demonstra a existência de falhas no controle da doença neste estado.

Streptococcus dysgalactiae é um patógeno frequentemente isolado de amostras com mastite clínica (Crippa et al., 2023), fato confirmado no presente estudo onde quatro dos cinco isolados (80%) foram encontrados em amostras de leite com mastite clínica. Embora comumente classificado como um patógeno ambiental, estudos também têm apontado que *S. dysgalactiae* pode ser considerado um agente contagioso de mastite. Em contraste com *S. uberis*, o conhecimento sobre a genotipagem de amostras de *S. dysgalactiae* é limitado. Em um rebanho, tipicamente coexistem múltiplas variedades, no entanto, algumas cepas são frequentemente

compartilhadas por diversas vacas, sugerindo disseminação contagiosa entre os animais. Adicionalmente, isolados geneticamente relacionados foram detectados em diversas fazendas, insinuando uma possível propagação contagiosa entre rebanhos ou uma fonte ambiental compartilhada (Baseggio et al., 1997; Bert et al., 1997; Wang et al., 1999; Lundberg et al., 2014).

O único isolado de *Streptococcus equinus* do presente estudo pertencia à uma amostra do Pará, estado que apresentou seis isolados identificados da mesma espécie no estudo de 2012. Isto pode sugerir que esta espécie pode ser comum no estado do Pará, porém estudos mais aprofundados são necessários para comprovar a veracidade dessa informação. *S. equinus* é uma espécie comensal frequentemente encontrada no canal do teto, na pele do teto, no trato gastrointestinal e em fezes, porém sua presença no leite não é usual (Verdier-metz et al., 2012; Clarke et al., 2016). Mesmo fazendo parte de menos de 1% dos casos de mastite (Kabelitz et al., 2021), o fato desta espécie ter sido isolada de uma amostra de leite de vaca previamente classificada como saudável neste estudo mostra que houve alguma possível rota de contaminação do leite.

Streptococcus bovis é um patógeno que faz parte do complexo chamado *Streptococcus bovis/Streptococcus equinus* (SBSEC) que inclui as (sub)espécies *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus*, *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*, *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*, *Streptococcus lutetiensis*, *Streptococcus alactolyticus* e *Streptococcus equinus*, sendo este último também referido como *Streptococcus bovis*. Associam-se a casos de mastite bovina de origem ambiental, porém são patógenos pouco recorrentes graças ao seu baixo potencial virulento e baixa infectividade comparado à *S. uberis* (Jans et al., 2015).

A espécie *Streptococcus agalactiae* é responsável por causar um aumento significativo no valor de CCS (acima de 1.000.000 CS/mL), afetando negativamente a qualidade do leite e a saúde do rebanho (Martins et al., 2015; Juliano et al., 2023). Este fato foi observado no presente estudo, onde o valor da mediana de CCS foi 1.696.000 CS/mL. Além disso, *S. agalactiae* foi a espécie com o maior número de isolados identificados (16/32), fato que contribuiu significativamente para o valor elevado de CCS. Uma meta-análise conduzida por Djabri et al. (2002) na França obteve a média aritmética dos valores de CCS de amostras de quartos mamários contaminados por *S. agalactiae* de 3.792.000 CS/mL, valor superior ao encontrado no presente estudo. Na Polônia, em um total de 18.713 amostras de quartos mamários

com mastite clínica ou subclínica, 57,6% dos isolados de *S. agalactiae* registraram valor de CCS \geq 10.000.000 CS/mL (Malinowski et al., 2006).

O estabelecimento de medidas adequadas de controle da mastite bovina causada por *Streptococcus* spp. no Brasil é fundamental para prevenir que a doença continue afetando cada vez mais a saúde dos animais e a produção de leite no país. Com relação aos agentes contagiosos, minimizar a interação entre os portadores e as vacas saudáveis é a principal forma de prevenção, que pode ser realizada através da manutenção apropriada dos dispositivos de ordenha, da higienização dos tetos após a ordenha, do descarte e do tratamento das vacas secas. Já a diminuição da exposição do orifício do teto aos microrganismos do ambiente e entornos é a principal alternativa para o controle dos patógenos ambientais causadores de mastite.

5.4. Teste de disco-difusão para susceptibilidade antimicrobiana de *Streptococcus* spp.

Foi possível observar que os isolados de *Streptococcus* spp. apresentaram maior resistência a EST, com um total de 19 (59,4%) isolados resistentes. Em seguida, 16 (50%) isolados foram resistentes a TET, 12 (37,5%) a NEO, oito (25%) a OXA e SUT cada e seis (18,8%) resistentes a CLI. Nenhum isolado apresentou resistência a CFL e a AMC.

Com relação às espécies de *Streptococcus* spp., é possível destacar a presença de 15 (93,7%) isolados de *S. agalactiae* resistentes a TET e 12 (75%) resistentes a EST. A maioria dos isolados de *S. uberis* e *S. dysgalactiae* apresentaram sensibilidade aos antimicrobianos testados, entretanto seis (60%) dos 10 isolados de *S. uberis* foram resistentes a EST e apenas um (20%) dos cinco isolados de *S. dysgalactiae* foi resistente a CLI, OXA e TET simultaneamente. O único isolado de *S. equinus* apresentou resistência apenas a EST e SUT (Tabela 2).

Com relação aos estados do Brasil, o único isolado de Goiás apresentou resistência apenas a EST. Os dois isolados do Pará foram 100% resistentes a EST e SUT. Nenhum dos três isolados de Santa Catarina apresentaram resistência aos antimicrobianos. Considerando os quatro isolados de São Paulo, 100% foram sensíveis a CLI, TET, SUT, AMC e CFL. Com relação aos 22 isolados da Paraíba, 16 (72,7%) apresentaram resistência a TET e 14 (63,6%) a EST (Tabela 3).

Tabela 2. Resultados dos testes de susceptibilidade antimicrobiana de *Streptococcus* spp.

Antimicrobiano	<i>Streptococcus</i> spp. (n=32)			<i>S. agalactiae</i> (n=16)			<i>S. uberis</i> (n=10)			<i>S. dysgalactiae</i> (n=5)			<i>S. equinus</i> (n=1)		
	S N (%)	I N (%)	R N (%)	S N (%)	I N (%)	R N (%)	S N (%)	I N (%)	R N (%)	S N (%)	I N (%)	R N (%)	S N (%)	I N (%)	R N (%)
CLI	26 (81,2%)	0	6 (18,8%)	11 (68,7%)	0	5 (31,3%)	10 (100%)	0	0	4 (80%)	0	1 (20%)	1 (100%)	0	0
AMC	32 (100%)	0	0	16 (100%)	0	0	10 (100%)	0	0	5 (100%)	0	0	1 (100%)	0	0
EST	13 (40,6%)	0	19 (59,4%)	4 (25%)	0	12 (75%)	4 (40%)	0	6 (60%)	5 (100%)	0	0	0	0	1 (100%)
NEO	20 (62,5%)	0	12 (37,5%)	9 (56,2%)	0	7 (43,8%)	5 (50%)	0	5 (50%)	5 (100%)	0	0	1 (100%)	0	0
CFL	32 (100%)	0	0	16 (100%)	0	0	10 (100%)	0	0	5 (100%)	0	0	1 (100%)	0	0
OXA	24 (75%)	0	8 (25%)	11 (68,7%)	0	5 (31,3%)	8 (80%)	0	2 (20%)	4 (80%)	0	1 (20%)	1 (100%)	0	0
TET	13 (40,6%)	3 (9,4%)	16 (50%)	0	1 (6,3%)	15 (93,7%)	9 (90%)	1 (10%)	0	3 (60%)	1 (20%)	1 (20%)	1 (100%)	0	0
SUT	24 (75%)	0	8 (25%)	10 (62,5%)	0	6 (37,5%)	9 (90%)	0	1 (10%)	5 (100%)	0	0	0	0	1 (100%)

CLI: clindamicina (classe das lincosamidas); AMC: amoxicilina com ácido clavulânico (classe dos β -lactâmicos); EST: estreptomicina (classe dos aminoglicosídeos); NEO: neomicina (classe dos aminoglicosídeos); CFL: cefalotina (classe das cefalosporinas); OXA: oxacilina (classe dos β -lactâmicos); TET: tetraciclina (classe das tetraciclinas); SUT: sulfazotrim (classe das sulfonamidas); S: sensível; I: intermediário; R: resistente.

Considerando a saúde do úbere, o único isolado de amostra considerada saudável (n=1) foi sensível a todos os antimicrobianos testados, exceto EST e SUT. Para as amostras de leite com mastite clínica, 100% dos isolados (n=13) foram sensíveis a CLI, AMC e CFL, enquanto todas as subclínicas (n=18) foram sensíveis a AMC e CFL. Tanto para as amostras com mastite subclínica e clínica, EST foi o antimicrobiano com a maior porcentagem de isolados resistentes (72,2% e 38,5%, respectivamente) (Tabela 4).

Dentre os 32 isolados de *Streptococcus* spp., foram encontrados um total de 11 (34,4%) considerados multirresistentes, ou seja, resistentes a pelo menos três classes de antimicrobianos diferentes. Destes 11, nove (81,8%) são de *S. agalactiae*, um (9,1%) de *S. uberis* e *S. dysgalactiae* cada. Relacionando os isolados multirresistentes com o tipo de mastite, foi possível concluir que oito (72,8%) foram isolados de leites com mastite subclínica e três (27,2%) com mastite clínica. Dos oito isolados de leites com mastite subclínica, foram identificados seis (75%) *S. agalactiae*, um (12,5%) *S. uberis* e um (12,5%) *S. dysgalactiae*. Todos os três (100%) isolados de leites com mastite clínica foram classificadas como *S. agalactiae*.

Tabela 3. Resultados dos testes de susceptibilidade antimicrobiana de *Streptococcus* spp. por estado do Brasil.

Antimicrobiano	Goiás (n=1)			Pará (n=2)			Santa Catarina (n=3)			São Paulo (n=4)			Paraíba (n=22)		
	S N (%)	I N (%)	R N (%)	S N (%)	I N (%)	R N (%)	S N (%)	I N (%)	R N (%)	S N (%)	I N (%)	R N (%)	S N (%)	I N (%)	R N (%)
CLI	1 (100%)	0	0	2 (100%)	0	0	3 (100%)	0	0	4 (100%)	0	0	16 (72,7%)	0	6 (27,3%)
AMC	1 (100%)	0	0	2 (100%)	0	0	3 (100%)	0	0	4 (100%)	0	0	22 (100%)	0	0
EST	0	0	1 (100%)	0	0	2 (100%)	3 (100%)	0	0	2 (50%)	0	2 (50%)	8 (36,4%)	0	14 (63,6%)
NEO	1 (100%)	0	0	1 (50%)	0	1 (50%)	3 (100%)	0	0	2 (50%)	0	2 (50%)	13 (59,1%)	0	9 (40,9%)
CFL	1 (100%)	0	0	2 (100%)	0	0	3 (100%)	0	0	4 (100%)	0	0	22 (100%)	0	0
OXA	1 (100%)	0	0	1 (50%)	0	1 (50%)	3 (100%)	0	0	3 (75%)	0	1 (25%)	16 (72,7%)	0	6 (27,3%)
TET	1 (100%)	0	0	2 (100%)	0	0	2 (66,7%)	1 (33,3%)	0	4 (100%)	0	0	4 (18,2%)	2 (9,1%)	16 (72,7%)
SUT	1 (100%)	0	0	0	0	2 (100%)	3 (100%)	0	0	4 (100%)	0	0	16 (72,7%)	0	6 (27,3%)

CLI: clindamicina (classe das lincosamidas); AMC: amoxicilina com ácido clavulânico (classe dos β -lactâmicos); EST: estreptomicina (classe dos aminoglicosídeos); NEO: neomicina (classe dos aminoglicosídeos); CFL: cefalotina (classe das cefalosporinas); OXA: oxacilina (classe dos β -lactâmicos); TET: tetraciclina (classe das tetraciclinas); SUT: sulfazotrim (classe das sulfonamidas); S: sensível; I: intermediário; R: resistente.

Tabela 4. Resultados dos testes de susceptibilidade antimicrobiana de *Streptococcus* spp. por tipo de mastite.

Antimicrobiano	Subclínica (n=18)			Clínica (n=13)			Saudável (n=1)		
	S N (%)	I N (%)	R N (%)	S N (%)	I N (%)	R N (%)	S N (%)	I N (%)	R N (%)
CLI	12 (66,7%)	0	6 (33,3%)	13 (100%)	0	0	1 (100%)	0	0
AMC	18 (100%)	0	0	13 (100%)	0	0	1 (100%)	0	0
EST	5 (27,8%)	0	13 (72,2%)	8 (61,5%)	0	5 (38,5%)	1 (100%)	0	1 (100%)
NEO	9 (50%)	0	9 (50%)	10 (77%)	0	3 (23%)	0	0	0
CFL	18 (100%)	0	0	13 (100%)	0	0	1 (100%)	0	0
OXA	13 (72,2%)	0	5 (27,8%)	10 (77%)	0	3 (23%)	1 (100%)	0	0
TET	5 (27,8%)	1 (5,5%)	12 (66,7%)	7 (53,8%)	2 (15,4%)	4 (30,8%)	1 (100%)	0	0
SUT	13 (72,2%)	0	5 (27,8%)	11 (84,6%)	0	2 (15,4%)	0	0	1 (100%)

CLI: clindamicina (classe das lincosamidas); AMC: amoxicilina com ácido clavulânico (classe dos β -lactâmicos); EST: estreptomicina (classe dos aminoglicosídeos); NEO: neomicina (classe dos aminoglicosídeos); CFL: cefalotina (classe das cefalosporinas); OXA: oxacilina (classe dos β -

lactâmicos); TET: tetraciclina (classe das tetraciclinas); SUT: sulfazotrim (classe das sulfonamidas); S: sensível; I: intermediário; R: resistente.

O estado brasileiro com o maior número de isolados multirresistentes foi a Paraíba com 10 (90,9%), seguida por Pará com um isolado (9,1%). Oito (72,8%) apresentaram resistência a três classes diferentes de antimicrobianos e três (27,2%) a quatro classes diferentes (Figura 7).



Figura 7. Teste de disco-difusão para susceptibilidade antimicrobiana de isolados de *Streptococcus* spp.. É possível observar resistência a TET, SUT, CLI, NEO e EST, caracterizando-se como um isolado multirresistente.

Os casos de resistência aos antimicrobianos por *Streptococcus* causadores de mastite são extremamente comuns e o nível de resistência varia conforme a espécie, o tipo de antibiótico (classe), as características do rebanho e onde este se localiza (Haenni et al., 2018).

Os antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos (como amoxicilina com ácido clavulânico e oxacilina), ainda são os mais utilizados e bem-sucedidos para combater mastite bovina causada por bactérias do gênero *Streptococcus* (Rato et al., 2013; Ding et al., 2016; Kabelitz et al., 2021). No presente estudo, 75% e 100% dos isolados foram sensíveis a oxacilina e amoxicilina com ácido clavulânico, respectivamente. Estreptomicina (classe dos aminoglicosídeos) foi o antimicrobiano que apresentou a maior quantidade de isolados resistentes (19/32, 59,4%). Tetraciclina (classe das tetraciclinas) também é um dos antimicrobianos com a maior incidência de isolados resistentes (16/32; 50%), dado o fato de que são antimicrobianos amplamente

utilizados para tratar diversas infecções em bovinos há muitos anos (Minst et al., 2012; Rato et al., 2013). Segundo Guérin-Faublée et al. (2003), são baixos os níveis de resistência apresentados por *Streptococcus* em relação à neomicina (também pertencente à classe dos aminoglicosídeos). No presente estudo, 62,5% dos isolados foram considerados sensíveis a este antimicrobiano. Além disso, muitos aminoglicosídeos são administrados em combinação com β -lactâmicos. Segundo Haenni et al. (2018), os antimicrobianos da classe das lincosamidas (como a clindamicina) também representam uma importante opção no tratamento da mastite, ainda mais em associação com macrolídeos. No presente estudo, 81,2% dos isolados foram sensíveis a clindamicina. A classe das cefalosporinas (como cefalotina) representa mais uma classe comumente utilizada em casos de mastite bovina por *Streptococcus*, possuindo elevada efetividade sobre o patógeno (Ruegg et al., 2015). No presente estudo, 100% dos isolados foram considerados sensíveis a cefalotina. Por fim, os isolados bacterianos foram 75% sensíveis a sulfazotrim (classe das sulfonamidas), também amplamente utilizado no tratamento de mastite bovina (Zhang et al., 2018; Marques-Bastos et al., 2023).

Estudos de Moreira et al. (1997b) em Goiás (região Centro-Oeste) envolvendo 51 isolados de *Streptococcus* sp., 23 (45,1%) apresentaram resistência a TET e 27 (52,9%) a SUT. No presente estudo, o único isolado desse estado foi sensível (100%) aos mesmos antimicrobianos. O trabalho de Moreira e colaboradores não realizou a identificação a nível de espécie, não sendo possível obter tal parâmetro comparativo com o presente estudo.

Estudo já citado de Oliveira et al. (2011) no estado do Pará (região Norte) com quatro isolados de *Streptococcus* spp. obtiveram resultados semelhantes ao presente estudo: 50% de suscetibilidade a NEO e OXA. Porém, o presente estudo obteve para SUT, EST, TET e CFL um total de 100%, 100%, 0% e 0% de resistência, contra 0%, 50%, 50% e 50% de resistência no trabalho de 2011. Também não foi possível estabelecer um parâmetro comparativo entre as espécies. Além disso, o presente estudo identificou um isolado multirresistente de *Streptococcus uberis*.

Estudo também citado de Valmorbida et al. (2017) em Santa Catarina (região Sul) apresentou 91,2%, 63,8% e 59,5% de sensibilidade a AMC, CLI e TET, respectivamente, considerando um total de 120 isolados de *Streptococcus* spp. No presente estudo, 100% dos isolados (n=3) foram sensíveis a AMC, CLI, EST, NEO, CLF, OXA e SUT. Com relação a TET, dois (66,7%) isolados foram sensíveis e um

(33,3%) apresentou resultado intermediário. Também não foi possível estabelecer um parâmetro comparativo entre as espécies.

Com relação ao estado de São Paulo (região Sudeste), estudo já citado de Bueno et al. (2003) obtiveram, de um total de 84 isolados de *Streptococcus* spp.: 100%, 92,9%, 48,8% e 32,1% de resistência a TET, OXA, SUT e NEO, respectivamente, contra 0%, 25%, 0% e 50% de resistência entre os quatro isolados do presente estudo. Pinto et al. (2021) obtiveram 75% de resistência a CLI, contra 0% no presente estudo. Também não foi possível estabelecer um parâmetro comparativo entre as espécies. O presente trabalho identificou um isolado multirresistente de *Streptococcus uberis*, enquanto 50% dos isolados de *Streptococcus* sp. do estudo de 2021 foram considerados multirresistentes.

Não foi possível encontrar estudos relacionando o perfil de resistência microbiana de *Streptococcus* spp. isolados de amostras de leite com mastite bovina na Paraíba (região Nordeste), apenas trabalhos envolvendo *Staphylococcus* spp. e mastite caprina (Salaberry et al., 2016; Silva Júnior et al., 2021). Por isso, faz-se necessário o desenvolvimento de estudos aprofundados nos rebanhos da Paraíba com relação à incidência de resistência microbiana de *Streptococcus* spp., dada a presença de 10 isolados multirresistentes neste trabalho.

Considerando EST como o antimicrobiano que apresentou o maior número de isolados resistentes no presente estudo, Holko et al. (2019) obtiveram resultados superiores na Eslováquia, onde 78,9% e 70% dos isolados de *Streptococcus uberis* e *Streptococcus agalactiae*, respectivamente, apresentaram resistência a EST (contra 60% e 66,7%, respectivamente, no atual estudo). Segundo Tian et al. (2019), na China, de 64 isolados de *Streptococcus* spp., 98,4% apresentaram resistência a TET, contra 50% no presente estudo. Neste trabalho, todos os isolados de *Streptococcus dysgalactiae* apresentaram sensibilidade aos antimicrobianos, diferente do observado por Rato et al. (2013) em Portugal e Shen et al. (2022) na China, com 100% dos isolados de *S. dysgalactiae* resistentes a TET. Atualmente existem poucos estudos sobre a susceptibilidade antimicrobiana de *Streptococcus equinus*, porém segundo Jans et al. (2015), os principais antimicrobianos utilizados contra este patógeno são β -lactâmicos associados com aminoglicosídeos. No presente estudo, o isolado de *S. equinus* apresentou resistência a EST, que pertence a classe dos aminoglicosídeos.

Foram encontrados 11 isolados considerados multirresistentes no presente estudo, sendo 10 de *Streptococcus agalactiae*, um de *S. uberis* e um *S. dysgalactiae*. Estudos de Boireau et al. (2018) em um total de 5.867 *S. uberis* na França,

encontraram 851 isolados multirresistentes, sendo 28 resistentes a todos os sete antimicrobianos testados. Resultados superiores também foram descobertos por Cheng et al. (2019) sendo dois, sete e 12 isolados de *Streptococcus* spp. resistentes a cinco, quatro e três antimicrobianos diferentes, respectivamente, contra um, sete e seis isolados (considerando a mesma quantidade de antimicrobianos) no presente estudo.

A presença de isolados multirresistentes no rebanho, ou seja, resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos diferentes, é um fator preocupante pois acaba restringindo as opções terapêuticas para os animais com mastite. A resistência é um fenômeno dinâmico que exhibe variações em termos de tempo e localização (da Costa et al., 2021). A faixa etária das vacas, o número de vezes que pariram, a limpeza dos materiais de cama, a higienização das instalações e dos equipamentos de ordenha, bem como o protocolo de higiene do úbere, são todos vistos como possíveis elementos de risco que têm um impacto significativo na ocorrência de mastite estreptocócica multirresistente (Saed & Ibrahim, 2020).

É importante ressaltar que a escolha do melhor antimicrobiano no tratamento da mastite bovina depende de fatores como: o patógeno causador, sua suscetibilidade ao antimicrobiano, a manifestação de mastite (se clínica ou subclínica) e a rotina durante o tratamento (Barkema et al., 2006).

Analisando os isolados de *Streptococcus* spp. resistentes aos diversos antimicrobianos testados, principalmente EST e TET, faz-necessário o desenvolvimento de estratégias mais eficazes e severas de vigilância quanto à utilização indiscriminada e/ou inadequada dessas substâncias em vacas de leite com o intuito de evitar a disseminação de isolados resistentes, e até mesmo multirresistentes, pelo rebanho. Um programa eficaz de monitoramento pode ser uma alternativa capaz de acompanhar possíveis padrões de fenótipos resistentes ao longo do tempo.

5.5. Sequenciamento do Genoma Completo de *Streptococcus agalactiae*.

Foram sequenciados nove isolados de *Streptococcus agalactiae*, todos advindos de amostras de leite do estado da Paraíba. A partir dos resultados obtidos, foi possível visualizar que o tamanho dos genomas variaram de 1.975.829 a 2.153.068 pb e o número de contigs nas sequências de DNA por genoma variaram de 18 a 42.

As análises de MLST (Multilocus Sequence Typing) identificaram dois tipos sequenciais (sequence types - ST) principais: ST-67 em cinco isolados (55,6%) e ST-103 em um (11,1%). Não foi possível identificar o ST em três isolados (33,3%). A partir

da construção da árvore filogenética, foi possível visualizar a formação de três clados diferentes, baseados nos STs (Figura 8).



Figura 8. Representação da árvore filogenética das amostras de *Streptococcus agalactiae*. As amostras 1285a, 403b, 404, 396b e 932a fazem parte do ST-67; 390c do ST-103; 1292a, 1288a e 410c fazem parte do ST não identificado.

Levando em consideração o tipo de mastite, apenas os isolados 390c e 396b foram identificados em amostras com mastite clínica (20%), enquanto a maioria foi advinda de amostras com mastite subclínica (80%).

Além disso, considerando o ST e o número de fazendas, os isolados sequenciados pertenciam a três (60%) das cinco fazendas analisadas do estado da Paraíba (Tabela 5). As fazendas foram denominadas Fazenda 1, Fazenda 2 e Fazenda 3 respeitando o termo de sigilo elaborado por todos os envolvidos deste trabalho. É possível observar que a Fazenda 1 apresentou isolados de *Streptococcus agalactiae* de ambos os STs, incluindo o ST não identificado. Essa diversidade de STs na mesma fazenda sugere a circulação de diferentes clones de *Streptococcus agalactiae*.

Foi identificada a presença de quatro genes de resistência a antimicrobianos: *ant(6)_la_3*, que confere resistência à estreptomicina (classe dos aminoglicosídeos); *tet(O)_3* à tetraciclina, minociclina e doxiciclina (classe das tetraciclinas); *mre(A)_1* à eritromicina, azitromicina e espiramicina (classe dos macrolídeos); e *erm(B)_18* à quinuprastin, pristinamicina, virginiamicina (classe das estreptograminas), clindamicina e lincomicina (classe das lincosaminas).

Foi possível observar que houve uma relação entre ST e genes de resistência, exceto pela amostra 1292a que não apresentou o gene *mre(A)_1*. Além disso, apenas as amostras 410c e 1288a apresentaram todos os quatro genes simultaneamente (Tabela 6).

Tabela 5. Relação entre ST e número de fazendas dos isolados sequenciados de *Streptococcus agalactiae* do estado da Paraíba.

Amostra	ST	Fazenda
390c	103	Fazenda 1
396b	67	Fazenda 1
403b	67	Fazenda 1
404	67	Fazenda 1
410c	NI	Fazenda 1
932a	67	Fazenda 2
1285a	67	Fazenda 3
1288a	NI	Fazenda 3
1292a	NI	Fazenda 3

ST: Sequence Type; NI: não identificado.

Todos os isolados que foram considerados fenotipicamente resistentes no teste de disco-difusão, apresentaram o(s) gene(s) de resistência correspondente(s) em seu genoma. Entretanto, um isolado (390c) foi considerado resistente a TET e EST, porém não apresentou tais genes de resistência em seu genoma. O mesmo ocorreu com outro isolado considerado resistente a CLI (1285a). Não foram testados antimicrobianos pertencentes à classe dos macrolídeos no teste de disco-difusão. Foram testados antimicrobianos das classes dos β -lactâmicos, cefalosporinas e sulfonamidas, porém não foram encontrados genes de resistência para tais classes.

Um total de 77 genes de virulência foram identificados a partir do Sequenciamento do Genoma Completo, sendo posteriormente agrupados na Tabela 7 de acordo com suas respectivas funções.

Considerando os genes de virulência, foi possível observar quatro padrões diferentes: (1) os genes *acpC*, *bca*, *carB*, *ccpA*, *cfa/cfb*, *ciaR*, *clpP*, *cpsA*, *cpsB*, *cpsC*, *cpsD*, *cpsE*, *cpsF*, *cpsL*, *cpsY*, *csrR*, *csrS*, *cydA*, *cyIA*, *cyIB*, *cyID*, *cyIE*, *cyIF*, *cyIG*, *cyII*, *cyIJ*, *cyIK*, *cyIX*, *cyIZ*, *fba*, *gbs1402*, *glnA*, *guaA*, *hasC*, *lepA*, *leuS*, *lgt*, *murF*, *neuA*, *neuB*, *neuC*, *neuD*, *pbp1A*, *pepC*, *pepN*, *pepX*, *purB*, *purH*, *purL*, *purN*, *rpoE*, SAK_0517, *scrB*, *sodA*, SP_0095, SP_0121, SP_0320, SP_0494, SP_0829, SP_0856, SP_0943, SP_1396, SP_1398, SP_1399, SP_1544, SP_1847, SP_1970 e *vicK* foram encontrados em todos os nove isolados; (2) os genes *cap8J*, *cpsG* e *hybB* foram encontrados em todas as amostras exceto 390c (a única que foi identificada como pertencente ao ST-103); (3) os genes *cpsK*, *fbsA*, *luxS* e *psaC* foram encontrados apenas na amostra 390c; (4) o gene *gbs1529* foi encontrado apenas nas

três amostras em que não foi possível identificar o ST (410c, 1288a e 1292a). Ou seja, as amostras 390c (ST-103), 410c, 1288a e 1292a (ST não identificado) possuem um total de 73 (94,8%) genes cada, e as amostras 396b, 403a, 404, 932a e 1285a (ST-67) possuem 72 genes (93,5%) cada.

Tabela 6. Relação entre as amostras de *Streptococcus agalactiae*, respectivos STs e genes de resistência a antimicrobianos.

Genes de resistência a antimicrobianos					
Amostra	ST	<i>ant(6)-la_3</i>	<i>erm(B)_18</i>	<i>mre(A)_1</i>	<i>tet(O)_3</i>
390c	103	-	-	+	-
396b	67	+	-	+	+
403b	67	+	-	+	+
404	67	+	-	+	+
410c	NI	+	+	+	+
932a	67	+	-	+	+
1285a	67	+	-	+	+
1288a	NI	+	+	+	+
1292a	NI	+	+	-	+

ST: Sequence Type; NI: não identificado; +: presença do gene; -: ausência do gene.

No presente trabalho, foram identificados dois STs principais, ST-67 e ST-103, comumente associados a bovinos de leite. Estes resultados mostram considerada homogeneidade entre os isolados de *Streptococcus agalactiae*, que pode ser possivelmente explicada por eventos de adaptação que tornaram-nos capazes de colonizar a glândula mamária desses animais, consequentemente tendo um papel importante no desencadeamento de infecções (Zadoks et al., 2011; Carvalho-Castro et al., 2017; Churakov et al., 2021), ainda mais considerando que todos os isolados de *Streptococcus agalactiae* são do mesmo estado do Brasil (Paraíba). Além disso, Lin et al. (2021) afirmam que os genótipos predominantes também podem ser disseminados para bovinos saudáveis por meio de falhas de higiene durante o processo de ordenha, principalmente em bovinos com mastite subclínica, que não exibem os sintomas visíveis da doença.

Estudos de Jørgensen et al. (2016) na Noruega e Carvalho-Castro et al. (2017) no Brasil mostraram que o ST-67 foi identificado como o ST dominante em *Streptococcus agalactiae* nestes países, fato em conformidade com o presente estudo sendo esse ST identificado em cinco isolados. Na China, o ST-103 é considerado o

principal (Pang et al., 2017). Já na Colômbia, predominam os STs-61, ST-67 e ST-103 (Reyes et al., 2017; Cobo-Ángel et al., 2018; Cobo-Ángel et al., 2019).

Tabela 7. Genes de virulência identificados no Sequenciamento do Genoma Completo de isolados de *Streptococcus agalactiae*, agrupados conforme funções semelhantes.

Genes	Funções
<i>cfa/cfb; fba; hyb</i>	Invasão da célula hospedeira
<i>ciaR; cpsA,B,C,D,E,F,G,K,L,Y; luxS; neuA,B,C,D; sodA</i>	Evasão do sistema imune do hospedeiro
<i>bca; cap8J; csrR,S; fbsA; vicK</i>	Adesão à célula hospedeira
<i>acpC; cylA,B,D,E,F,G,I,J,K,X, Z; hasC; lepA;</i>	Invasão, evasão e adesão
<i>carB; ccpA; glnA; leuS; pepC,X; purB,H,L,N; scrB; SP_0856;</i> SP_0095; SP_0494; SP_0829; SP_1396; SP_1398; SP_1399; SP_1544; SP_1847; SP_1970	Metabolismo, transporte bacteriano e biossíntese de aminoácidos
<i>clpP; cydA; guaA; lgt; rpoE;</i>	Crescimento e sobrevivência bacteriana
<i>gbs1402</i>	Regulador da resistência múltipla a antimicrobianos
<i>murF; pepN</i>	Composição da parede celular bacteriana
<i>pbplA</i>	Resistência à morte por fagocitose
<i>gbs1529; SP_0121; SP_0320; SP_0943</i>	Funções desconhecidas

Um patógeno que apresenta resistência à diversas classes de antimicrobianos representa elevado risco para a saúde do rebanho, ainda mais pela possibilidade de bactérias resistentes conseguirem transferir o(s) gene(s) para bactérias até então sensíveis, tornando-as resistentes (Mendes et al., 2019). Wang et al. (2016) relatam que a existência de bactérias resistentes é um fato crescente no decorrer dos anos.

No presente estudo, a maioria dos isolados que demonstraram o fenótipo de resistência no teste de disco-difusão para os antimicrobianos EST, TET e CLI possuíam o referido gene em seu genoma. Entretanto, um isolado (390c) apresentou o fenótipo de resistência para TET e EST e outro isolado (1285a) para CLI, porém nenhum destes continham o gene. Considerando a ausência de informações aprofundadas sobre a correlação entre biologia molecular, resistência fenotípica e genotípica, faz-se necessário estudos mais aprofundados para compreender a ocorrência deste fenômeno. Uma possibilidade é a ocorrência de uma mutação

pontual no gene bacteriano que resultou na expressão do fenótipo de resistência (Carattoli, 2001; Gao et al., 2012).

No item 5.4. deste trabalho, foi relatado que EST e TET apresentaram as maiores porcentagens de resistência dentre os outros antimicrobianos testados (59,4% e 50%, respectivamente). Através do sequenciamento do genoma completo de nove isolados de *Streptococcus agalactiae*, foi possível analisar que oito (88,9%) destes apresentaram os referidos genes de resistência em seus genomas. Não foram testados antimicrobianos pertencentes à classe dos macrolídeos no teste de disco-difusão, porém foi possível observar que oito (88,9%) dentre os nove isolados de *Streptococcus agalactiae* apresentaram o gene de resistência *mre(A)_1*, em concordância com o estudo de Naranjo-Lucena & Slowey (2023) que relata níveis elevados de resistência dessa bactéria aos macrolídeos.

Foi possível observar que houve uma ligação entre STs e genes de resistência, exceto pela amostra 1292a que não apresentou o gene *mre(A)_1*.

Com relação aos genes de virulência detectados a partir do Sequenciamento do Genoma Completo, foi possível concluir que os nove isolados de *Streptococcus agalactiae* possuíam 69 (89,6%) do total de 77 genes de virulência, reforçando o elevado potencial patogênico destes isolados e sua capacidade em desencadear infecções em bovinos.

Dentre os 72 genes estão o cluster *cyIXDG-acp-cyZABEFIJK* capaz de sintetizar um pigmento hemolítico com potencial citotóxico e propriedades antioxidantes que atua no estabelecimento da infecção e no processo de evasão do sistema imunológico do hospedeiro; o locus *cps* que contém os genes *cpsA,B,C,D,E,F,L,neuA,B,C,D* responsáveis pela codificação do chamado polissacarídeo capsular de *S. agalactiae* (CPS), estrutura capaz de envolver a bactéria e contribuir para a sua evasão do sistema imune do hospedeiro; o gene *hylB* produz uma enzima hialuronidase capaz de degradar o ácido hialurônico presente na célula hospedeira, rompendo-a e eliminando seu conteúdo. É desta forma que o patógeno é capaz de impossibilitar as vias de sinalização do hospedeiro; os genes *cfa/cfb* são responsáveis pela codificação do fator CAMP capaz de degradar os glóbulos vermelhos do hospedeiro, facilitando a evasão imunológica do patógeno (Amaral et al., 2022); o gene *bca* (cujo locus é representado por SAK_0517) é responsável pela produção da proteína alfa C que tem papel na aderência à células epiteliais do hospedeiro; os genes *csrR* e *csrS* também atuam na aderência bacteriana (Park et al., 2012); o gene *hasC* tem a capacidade de codificar uma cápsula de ácido hialurônico

que preserva o patógeno contra a fagocitose; o gene *pbp1A* também atua contra a morte por fagocitose (Jones et al., 2003); o gene *sodA* também desempenha um papel na evasão do sistema imune do hospedeiro (Burnside et al., 2011; Kabelitz et al., 2021); os genes *pur* e *carB* atuam na regulação do metabolismo bacteriano (Sullivan et al., 2021); *glnA* é responsável pelo metabolismo de nitrogênio (Luque-Almagro et al., 2011) e *ccpA* pelo metabolismo de carbono (Turinsky et al., 2000); o gene *pepC* promove alterações nas enzimas do hospedeiro (Meyer et al., 1995), *pepX* tem participação na lise protéica (Varmanen et al., 2000), *murF* e *pepN* auxiliam no desenvolvimento da parede celular bacteriana (Jones et al., 2000; Nganje et al., 2019), assim como o gene *ciaR* que preserva a estrutura e integridade celular do patógeno (Halfmann et al., 2007); os genes *scrB*, *cydA*, *rpoE*, *lgt* e *guaA* são necessários para o crescimento, sobrevivência do patógeno no interior da célula hospedeira e a posterior colonização deste ambiente (Hiratsuka et al., 1998; Yamamoto et al., 2005; Seepersaud et al., 2006; Chimalapati et al., 2012; Ipe et al., 2021); *cap8J* tem função no desenvolvimento de cápsula bacteriana protetora (Sau et al., 1997); o gene *lepA* confere vantagens adaptativas para o patógeno quando em condições desfavoráveis de crescimento (Pech et al., 2011); o gene *fba* codifica a proteína de ligação à fibronectina que possui importante papel na adesão e invasão do patógeno (Terao et al., 2001) e *leuS* também tem papel na produção de proteínas importantes no processo de tradução (Dwyer et al., 2015); *vickK* é um gene que também apresenta função na adesão bacteriana, crescimento, produção de biofilme e tolerância ao estresse oxidativo (Senadheera et al., 2009); o gene *clpP* é responsável pela eliminação de proteínas defeituosas que possam comprometer a integridade de outras proteínas bacterianas (Kwon et al., 2003); *gbs1402* confere resistência a múltiplos antimicrobianos (Fernandez et al., 2010); as proteínas SP_1970, SP_1544 e SP_0856 participam da síntese de aminoácidos; SP_1847 e SP_0494 da produção de nucleotídeos, nucleosídeos, purinas e pirimidinas; SP_1396, SP_1398 e SP_1399 codificam proteínas de ligação e transporte; SP_0829 auxilia no metabolismo energético bacteriano; SP_0095 é uma proteína hipotética; SP_0121, SP_0320, SP_0943 e *gbs1529* apresentam funções desconhecidas (Hava & Camilli, 2002; Samen et al., 2007). Os genes *cpsK*, *fbsA*, *luxS* e *psaC* foram detectados apenas na amostra 390c, porém suas funções na virulência de *Streptococcus agalactiae* são praticamente semelhantes às características anteriormente citadas: *cpsK* codifica uma estrutura que envolve a bactéria e contribui para a sua evasão do sistema imune do hospedeiro (outros genes representantes do mesmo locus foram encontrados nos

demais isolados) (Amaral et al., 2022); *luxS* está relacionado com quorum sensing (Reinoso, 2017); *fbxA* facilita a invasão da célula hospedeira pelo patógeno (Rajagopal, 2009) e *psaC* é responsável pela codificação de um mecanismo de transporte de manganês (Mccluskey et al., 2004).

De forma geral, não houve diferença entre os isolados de *Streptococcus agalactiae* considerando as funções que os genes de virulência desempenham no estabelecimento da infecção e na sobrevivência do patógeno. Entretanto, foi possível notar que houve uma ligação entre STs e genes de virulência.

Na China, Lin et al. (2021) obtiveram de 42 isolados de *Streptococcus agalactiae* de mastite bovina um padrão de 64,3% de prevalência dos genes *bibA*, *cfb*, *cspA*, *cyIE*, *fbxA*, *fbxB*, *hyIB*, and *pavA*. Destes, apenas *bibA*, *fbxB* e *pavA* não foram encontrados no presente trabalho. Estudos recentes de Amaral et al. (2022) no Brasil, envolvendo três isolados de *Streptococcus agalactiae* de mastite bovina dos estados de São Paulo e Minas Gerais (região Sudeste), sequenciaram e analisaram que 100% destes possuíam os genes do locus *cps* (*cpsA,B,C,D,F,K,L,neuA,B,C,D*), do operon *cyl* (*cyIX,D,G,C,Z,A,B,F,I,J,K*), *hyIB* e *cfa/cfb*. Apenas o gene *cpsE* obteve 99,4% de cobertura. O presente estudo obteve resultados semelhantes em sua maioria, onde os genes *cpsA,B,C,D,E,F,L; neuA,B,C,D; cfa/cfb, cyD,G,Z,A,B,F,I,J,K* estiveram presentes em 100% dos isolados, *hyIB* em 88,9% dos isolados, *cpsK* em 11,1% e *cyIC* não foi encontrado.

Um patógeno é capaz de demonstrar sua capacidade de desencadear infecção através da codificação de vários fatores de virulência ao mesmo tempo (Pietrocola et al., 2018). A não expressão de um gene de virulência pode ser explicada pela ocorrência de mutações (inserção, deleção) e também pela regulação negativa de proteínas que tornam as bactérias adaptadas as condições do ambiente em que está inserida (Sagar et al., 2013; Vasilyeva et al., 2015). Considerando a espécie *Streptococcus agalactiae*, os genes de virulência aqui identificados como locus *cps*, operon *cyl*, *hyIB* e *cfa/cfb* são os principais genes que caracterizam sua patogenicidade, tornando um problema ainda mais sério a ser resolvido no âmbito do combate à mastite.

Considerando a possibilidade de rastreamento dos genes de resistência e virulência de isolados de *Streptococcus agalactiae* de mastite bovina, a utilização de técnicas moleculares avançadas como o Sequenciamento do Genoma Completo são capazes de fornecer informações aprofundadas sobre o processo de infecção

desempenhado pelo patógeno e seus mecanismos de ação, além de ser uma importante ferramenta no desenvolvimento de estratégias de controle e prevenção.

5.6. Isolamento e identificação de *Aerococcus viridans*

Das 1.447 amostras, foram identificados 15 (1%) isolados confirmados como *Aerococcus viridans* (Figuras 9A e 9B). Apenas os estados de São Paulo e Santa Catarina apresentaram tais isolados.

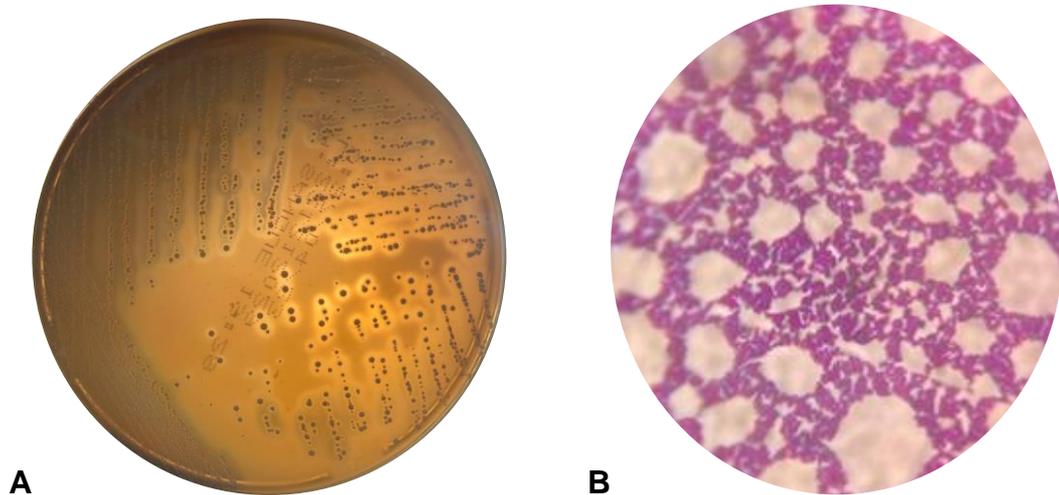


Figura 9A. *Aerococcus viridans* em placa de ágar sangue de carneiro. **9B.** Colônias de *Aerococcus viridans* visualizadas através de coloração de GRAM.

5.7. Relação entre os isolados de *Aerococcus viridans*, Contagem de Células Somáticas (CCS) e Contagem Padrão em Placa (CPP)

Dos 15 isolados de *Aerococcus viridans*, sete (46,6%) foram identificados de leites de vacas saudáveis, quatro (26,7%) de leites com mastite subclínica e quatro (26,7%) de mastite clínica (Figura 10).

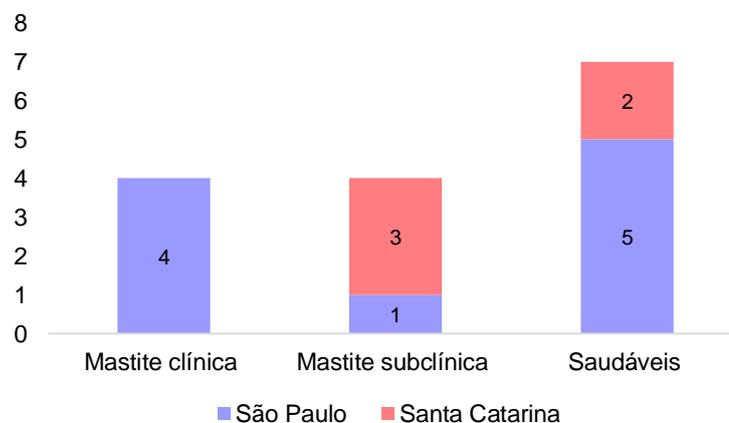


Figura 10. Relação entre os estados do Brasil e o tipo de amostra em que foram identificados os isolados de *Aerococcus viridans*.

Através de análises estatísticas, foi possível obter a mediana dos valores de CCS e CPP das amostras de leite em que foram encontrados os isolados de *Aerococcus viridans* (Tabela 8). Considerando a mediana do valor de CCS, é possível confirmar o fato de que a maioria dos isolados foram identificados a partir de amostras de leites de vacas saudáveis (CCS < 200.000 CS/mL). A mediana do valor de CPP está dentro dos limites estabelecidos pela legislação (CPP < 900.000 CS/mL).

Tabela 8. Relação entre a mediana dos valores de CCS e CPP dos isolados de *Aerococcus viridans*.

Espécie	Variável	Mediana	p valor
<i>Aerococcus viridans</i>	CCS	104.000	< 0,0001
	CPP	13.000	

CCS: Contagem de Células Somáticas; CPP: Contagem Padrão em Placa.

De acordo com a literatura, já foram encontrados casos de infecções causadas por *Aerococcus viridans* associadas à tilápias (Ke et al., 2012), lagostas (Stebbing et al., 2012) e suínos (Martín et al., 2007). Com relação específica aos casos de mastite em bovinos, foram encontrados 279 isolados (n=1674; 16,7%) de *Aerococcus viridans* em amostras de leite com mastite subclínica na China (M. Sun et al., 2017), 38 (n=478; 8%) em amostras com mastite clínica no Japão (Saishu et al., 2015) e 36 (n=243; 14,8%) em amostras com mastite subclínica na Bélgica (Devriese et al., 1999), valores superiores ao encontrado no presente estudo. No Egito, resultado ligeiramente inferior foi encontrado: 11 isolados (n=92; 12%) identificados em amostras de leite com mastite subclínica (Shaker et al., 2019).

Com relação ao Brasil, as pesquisas envolvendo esta espécie associada a casos de mastite são escassas. Em São Paulo, de 162 vacas lactantes com histórico de mastite subclínica, foram encontrados 25 (15,4%) isolados de *Aerococcus viridans* (Vasconcelos et al., 2013), valor acima ao encontrado no presente estudo. Já em Pernambuco, um isolado (n=214; 0,5%) foi encontrado em amostra de leite de cabra com mastite (Aragão et al., 2021) e um isolado (n=111; 0,9%) a partir das mãos de um ordenhador de leite de cabra para a produção de queijo coalho artesanal (Aragão et al., 2022).

A possibilidade de interpretações fenotípicas equivocadas com outros microrganismos como *Streptococcus* sp. ou *Enterococcus* sp. (Spaková et al., 2012; Ezechukwu et al., 2019), associadas a ausência de estudos aprofundados no Brasil, podem colaborar para as baixas estimativas de identificação de *Aerococcus viridans*. No entanto, metodologias avançadas como o sequenciamento do gene 16S rRNA,

contribuem para uma caracterização mais precisa da espécie (Sukru et al., 2018). Ainda sobre a baixa ocorrência de estudos no Brasil, não foi possível estabelecer um parâmetro comparativo aprofundado com relação à incidência de *Aerococcus viridans* nas diferentes regiões do país. No estado de São Paulo, foram identificados 25 isolados segundo Vasconcelos et al. (2013) e 15 no presente estudo, podendo até então ser considerado o estado brasileiro com o maior número de isolados identificados de *Aerococcus viridans* em bovinos. Os estados de Pernambuco e Santa Catarina merecem atenção: o primeiro por já ter casos relatados envolvendo a produção de leite de cabra e o segundo por ter o primeiro caso registrado em vacas de leite.

No presente estudo, a maioria (46,6%) dos isolados de *Aerococcus viridans* foram identificados a partir de amostras de leite de vacas saudáveis. Este fato pode ser associado a possíveis casos de contaminação do leite, já que esta espécie pode ser encontrada no ambiente (solo, vegetação, matéria orgânica, poeira, ar) e até mesmo no trato respiratório superior das vacas (Sukru et al., 2018). Além disso, são pouco identificadas como a única espécie desencadeante da mastite bovina, sendo comumente encontrada em amostras contaminadas e em culturas com diversos outros microrganismos (Owens et al., 1990; Devriese et al., 1999; Pitkälä et al., 2004).

Por outro lado, retomando o estudo de Sun et al. (2015) na China, dos 279 isolados de *Aerococcus viridans* em amostras de leite com mastite subclínica, 80 (28,7%) foram identificados em culturas puras, sem a presença de outras culturas bacterianas na mesma amostra, o que coloca em prova a capacidade deste microrganismo em desencadear mastite no rebanho. Ainda neste trabalho, foram observados nas vacas infectadas uma redução na produção diária, modificações na composição do leite (redução do percentual médio de gordura, lactose e sólidos totais; aumento do percentual de proteínas) e aumento no valor médio de CCS (que caracteriza o estabelecimento da infecção).

Neste trabalho, dos 15 isolados totais, 13 (86,7%) foram identificados de culturas puras e dois (13,3%) em cultura com *Staphylococcus* coagulase negativa. Dos 13, seis (46,1%) foram isolados de amostras de leites de vacas saudáveis, quatro (30,8%) de mastite clínica e três (23,1%) de mastite subclínica. Ou seja, a presença de culturas puras de *Aerococcus viridans* identificadas em amostras de leites mastíticos evidencia a possibilidade da espécie em desencadear tal doença no rebanho. Das amostras de leites mastíticos, São Paulo apresentou quatro (57,1%)

isolados de amostras com mastite clínica e um (14,3%) com mastite subclínica. Santa Catarina apresentou dois (28,6%) isolados de amostras com mastite subclínica.

5.8. Teste de disco-difusão para susceptibilidade antimicrobiana de *Aerococcus viridans*.

Foi possível observar que a maioria dos isolados de *Aerococcus viridans* foram considerados sensíveis aos antimicrobianos testados, não apresentando resistência a PEN, AMC, TET e CFL. EST foi o antibiótico com o maior número de isolados resistentes, com um total de quatro (26,7%). Os resultados estão elucidados na Tabela 9 e ilustrados na Figura 11.

Foi encontrado um (6,7%) isolado de *Aerococcus viridans* considerado multirresistente, apresentando resistência a CLI, EST, NEO e OXA simultaneamente. Este isolado foi identificado em uma amostra de leite proveniente de vaca saudável do estado de Santa Catarina.

Tabela 9. Resultados dos testes de susceptibilidade antimicrobiana de *Aerococcus viridans*.

<i>Aerococcus viridans</i> (n=15)				
Antimicrobiano	Classe	S N (%)	I N (%)	R N (%)
Penicilina (PEN)	β - lactâmicos	15 (100%)	0	0
Clindamicina (CLI)	Lincosamidas	14 (93,3%)	0	1 (6,7%)
Amoxicilina com ácido clavulânico (AMC)	β - lactâmicos	15 (100%)	0	0
Estreptomicina (EST)	Aminoglicosídeos	11 (73,3%)	0	4 (26,7%)
Neomicina (NEO)	Aminoglicosídeos	14 (93,3%)	0	1 (6,7%)
Cefalotina (CFL)	Cefalosporinas	15 (100%)	0	0
Oxacilina (OXA)	β - lactâmicos	14 (93,3%)	0	1 (6,7%)
Tetraciclina (TET)	Tetraciclinas	15 (100%)	0	0
Sulfazotrim (SUT)	Sulfonamidas	14 (93,3%)	0	1 (6,7%)

S: sensível; I: intermediário; R: resistente.

Segundo estudos de Shaker et al. (2019), que obtiveram um total de 11 isolados de *Aerococcus viridans*, 100% (n=11) destes foram sensíveis a EST contra 73,3% (n=11) de isolados sensíveis dentre os 15 do presente trabalho. 100% (n=11) dos isolados foram resistentes a PEN, 81,8% (n=9) a AMC e 63,6% (n=7) a TET, enquanto no presente estudo nenhum isolado apresentou resistência aos três antimicrobianos. Resultados semelhantes ao presente trabalho foram obtidos por Saishu et al. (2015).

De 29 isolados representativos de *Aerococcus viridans*, nenhum apresentou resistência a PEN, AMC e TET.



Figura 11. Teste de disco difusão para susceptibilidade antimicrobiana de isolados de *Aerococcus viridans*. É possível observar resistência aos antimicrobianos EST e OXA.

Atualmente, existem poucas informações a respeito da suscetibilidade de *Aerococcus viridans* a diferentes classes de antimicrobianos, porém Martín et al. (2007) e Liu et al. (2015) relataram que a espécie apresenta elevada suscetibilidade a β -lactâmicos, apresentando conformidade com o presente estudo, onde 100% dos isolados foram sensíveis a PEN e AMC e 93,3% sensíveis a OXA. Além disso, uma possível explicação para a variação nos padrões de resistência e sensibilidade entre os estudos reportados pode ser a influência na escolha do antimicrobiano, das práticas veterinárias adotadas entre os diferentes países ou até mesmo a identificação errônea do microrganismo, levando *Aerococcus viridans* a uma adaptação (Liu et al., 2015).

Tendo em conta todos os resultados apresentados, é importante que este microrganismo não seja subestimado dentro do atual cenário da mastite bovina, ainda mais considerando a descoberta, neste trabalho, de um isolado multirresistente presente em amostra de leite de vaca saudável.

5.9. Diversidade bacteriana e CCS de amostras de leite de tanque

Das 57 amostras de leite, 19 (33,3%) foram provenientes do estado do Pará, 13 (22,8%) de Goiás, nove (15,8%) do Maranhão, sete (12,3%) de Tocantins, quatro (7%) de São Paulo, três (5,3%) de Santa Catarina e duas (3,5%) de Minas Gerais.

As sequências obtidas a partir do NGS foram identificadas, comparadas com a base de dados e os resultados foram filtrados. Foram verificados um reino, quatro filos, seis classes, 14 ordens, 28 famílias e 43 gêneros. Dentre estes, podemos destacar Moraxellaceae (22,3%), Streptococcaceae (14,1%), Acetobacteraceae (13,8%), Pseudomonadaceae (11,0%) e Enterococcaceae (9,0%) como as principais famílias (Figura 12); e *Acinetobacter* (22,3%), *Pseudomonas* (11,7%) e *Acetobacter* (8,1%) como os principais gêneros encontrados (Figura 13).

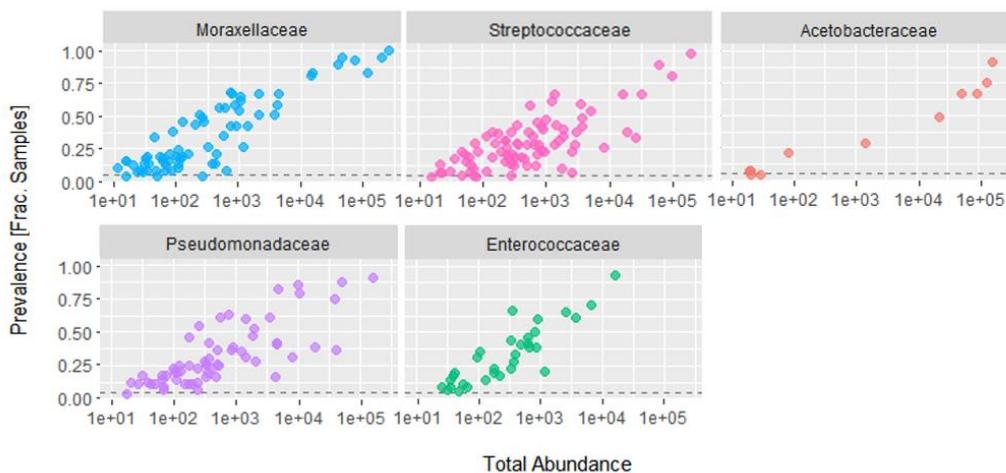


Figura 12. Famílias mais encontradas, representadas por gráficos considerando a abundância total pela prevalência média.

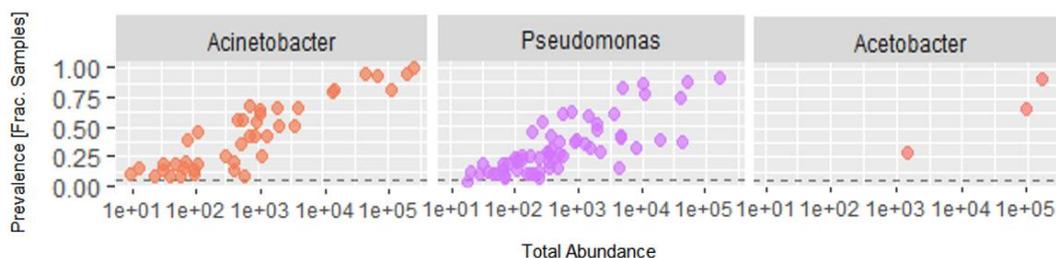


Figura 13. Gêneros mais encontrados, também representados por gráficos considerando a abundância total pela prevalência média.

Dos sete estados representados, não foi possível obter os valores de CCS das amostras de tanque de São Paulo (n=4) e Minas Gerais (n=2), ambos os representantes da região Sudeste. Das 51 amostras com identificação, 30 (58,8%) foram classificadas como alta CCS (CCS > 500.000 CS/mL) e 21 (41,2%) como baixa CCS (CCS < 500.000 CS/mL). Das amostras com alta CCS, estão todas as 19 (63,3%) amostras provenientes do Pará, sete (23,3%) de Goiás e quatro (13,4%) do Maranhão.

Das amostras com baixa CCS, estão todas as sete (33,3%) de Tocantins, todas as três (14,3%) de Santa Catarina, seis (28,6%) de Goiás e cinco (23,8%) do Maranhão.

5.10. Análises de diversidade alfa

Para a análise da diversidade alfa, Goiás foi selecionado como região de referência, cuja diversidade foi fixada em 0. A diversidade bacteriana das amostras de leite de todas as outras regiões foi então testada em relação à de Goiás. Observando o gráfico (Figura 14), é possível notar que a diversidade alfa bacteriana das amostras de leite de tanque dos estados do Maranhão e Pará são significativamente diferentes de Goiás, com os índices de Fisher, Chao1 e ACE dentro da área de significância ($p < 0,05$). A diversidade bacteriana das amostras de Minas Gerais, Santa Catarina e Tocantins não foi significativamente diferente de Goiás ($p > 0,05$), não apresentando nenhum índice na área de significância. A diversidade bacteriana das amostras do estado de São Paulo foi significativamente diferente de Goiás ($p < 0,05$) apenas em termos do índice de Simpson. O valor de p foi obtido por meio de ANOVA.

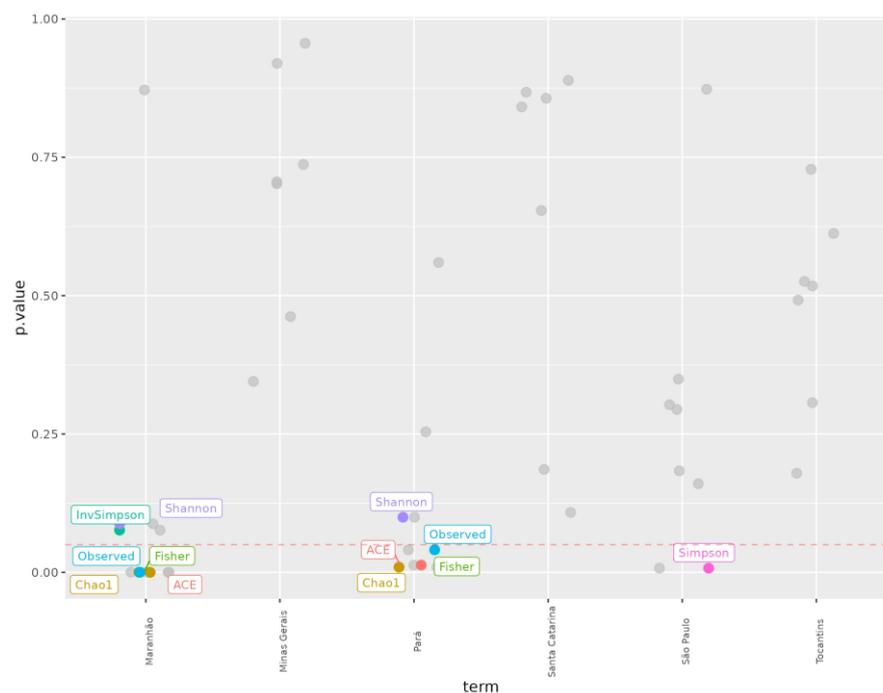


Figura 14. Gráfico comparando a diversidade bacteriana dentro de cada estado brasileiro analisado.

A linha pontilhada em laranja representa o limite do p -value igual a 0,05.

Com relação aos valores de CCS, é possível notar que não houve diferenças significativas entre vacas com valores de CCS altos ou baixos em termos de diversidade bacteriana alfa da microbiota do leite (amostras de tanques de leite) (Figura 15), sendo os valores de p para todos os índices maiores que 0,05. : ACE (p

= 0,32), Chao1 ($p = 0,29$), Fisher ($p = 0,53$), InvSimpson ($p = 0,31$), Observado ($p = 0,60$), Shannon ($p = 0,82$) e Simpson ($p = 0,74$) (Tabela 10). Os valores de p também foram obtidos por meio de ANOVA.

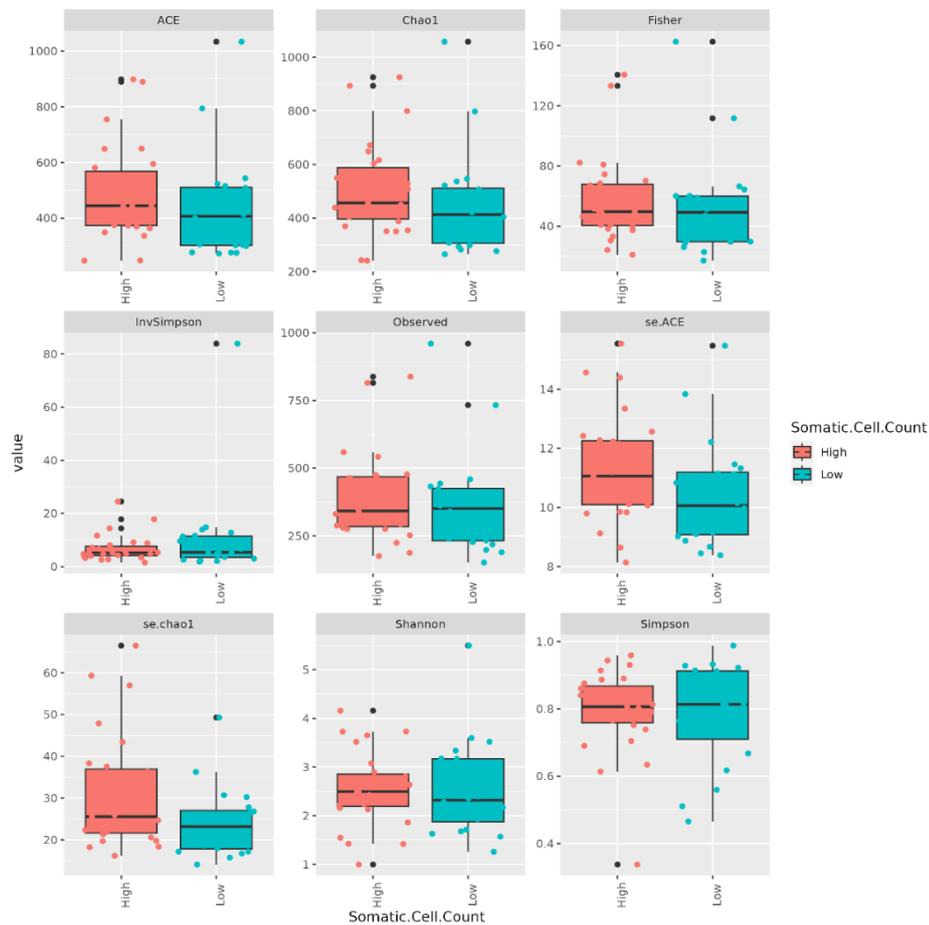


Figura 15. Boxplot comparando as amostras de alta e baixa CCS dentro de cada um dos índices de diversidade alfa.

Tabela 10. Tabela de significância dos índices de diversidade alfa considerando os dados de CCS.

Métrica	Termo	Estimativa	Erro Padrão	Estatística	p valor
ACE	Baixo	-49.0695002876011	48.9808426475199	-1.00181004726112	0,32
Chao1	Baixo	-53.7340045465173	50.1378031418731	-1.07172634577682	0,29
Fisher	Baixo	-5.33711202155751	8.43903719079091	-0.632431390085782	0,53
InvSimpson	Baixo	3.31785312024084	3.25341980586599	1.01980479563648	0,31
Observado	Baixo	-25.4848484848485	48.7823418277199	-0.522419538095383	0,60
Shannon	Baixo	-0.0543839910328033	0.237248555967093	-0.229227911677348	0,82
Simpson	Baixo	-0.0120576667927053	0.0374376821720649	-0.322073004874817	0,74

5.11. Análises de diversidade beta

A relação entre amostras foi avaliada com base nas distâncias de Bray-Curtis a partir de análises de diversidade beta. O cálculo PERMANOVA permitiu concluir que

houve diferença significativa ($p = 0,000999$) entre as amostras dos diferentes estados do Brasil (Figura 16) e entre as amostras pertencentes aos grupos de alta e baixa CCS ($p = 0,000999$) (Figura 17).

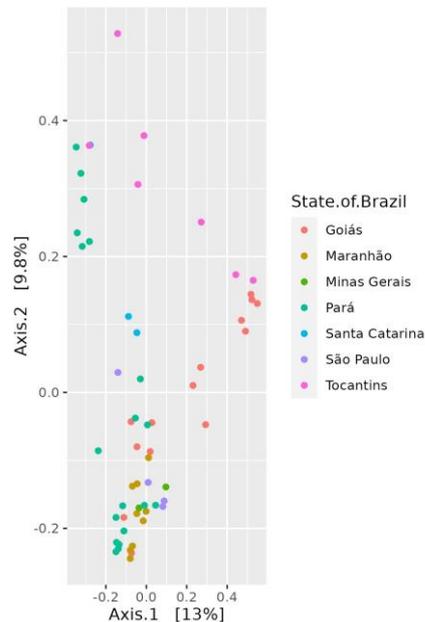


Figura 16. Gráfico representando a diversidade beta entre os estados do Brasil. Foram realizadas análises de dissimilaridade múltipla (MDS) considerando a distância de Bray-Curtis como métrica de dissimilaridade. “State.of.Brazil”: Estado do Brasil.

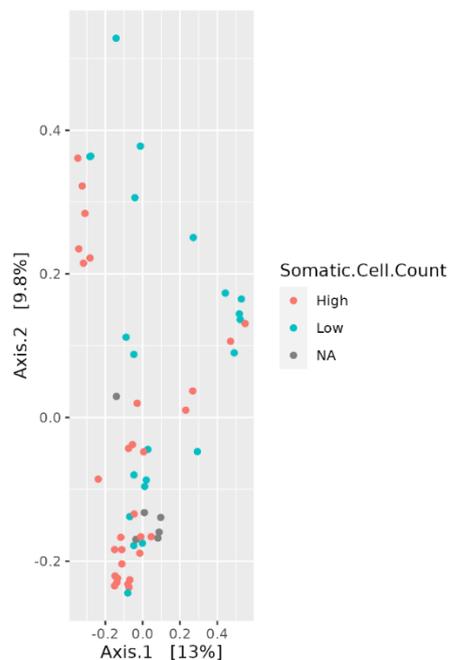


Figura 17. Gráfico representando a diversidade beta entre os valores de CCS. Foram realizadas análises de dissimilaridade múltipla (MDS) considerando a distância de Bray-Curtis como métrica de dissimilaridade. “Somatic.Cell.Count”: Contagem de Células Somáticas; “High”: alta; “Low”: baixa; “NA”: não identificadas.

Com relação à diversidade bacteriana de amostras de leite de tanque, a família Moraxellaceae engloba o gênero *Acinetobacter*, ambos identificados como os mais abundantes neste estudo. Bactérias do gênero *Acinetobacter* são bactérias amplamente encontradas no meio ambiente (solo, sedimentos, água fresca e oceano), porém sua presença compondo a microbiota do leite e a microbiota fecal do gado já foi relatada. Além disso, são bactérias psicrófilas (capazes de sobreviver e multiplicar-se em temperaturas de refrigeração, como a temperatura dos tanques) e com elevado poder de deterioração do leite considerando sua capacidade de produzir enzimas lipolíticas e proteolíticas. A presença deste gênero bacteriano no leite pode ser explicada por: água residual presente nos equipamentos de ordenha, tubulações do tanque e/ou outros equipamentos, incorreta higienização dos equipamentos de ordenha, falhas no transporte e/ou armazenamento do leite, e úbere e tetos contaminados (Rodrigues et al., 2017; Lupo et al., 2018; McHugh et al., 2020; Mohamed et al., 2022).

O gênero *Pseudomonas*, da família Pseudomonadaceae, também foi muito recorrente no presente estudo. A propagação desta bactéria nas amostras de leite de tanque pode ter ocorrido através do contato com água contaminada (utilizada para a higienização dos tetos e dos equipamentos), com a superfície dos tetos dos animais, equipamentos de ordenha e até mesmo com a parte interna dos tanques de expansão. Este gênero engloba bactérias psicrófilas muito presentes em ambientes molhados e lamacentos. Além disso, podem produzir proteases e lipases estáveis ao calor ao longo do período de refrigeração do leite, contaminando-o. Tratamentos intramamários conduzidos de forma incorreta também são capazes de permitir a introdução desta bactéria na glândula mamária das vacas (Brito & Sales, 2007; Fernandes et al., 2009; Vidal et al., 2017).

As famílias Streptococcaceae e Enterococcaceae estão comumente envolvidas em casos de mastite (Nguyen et al., 2020). Os principais representantes da família Enterococcaceae causadores de mastite são *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*. São patógenos Gram-positivos e responsáveis pela transmissão ambiental da doença, devido sua capacidade de sobrevivência no ambiente por longos períodos de tempo (Kim et al., 2022). Os principais representantes da família Streptococcaceae, tanto contagiosos quanto ambientais, foram amplamente apresentados e discutidos no presente trabalho. Considerando o potencial de cada um destes microrganismos

em desencadear mastite em bovinos de leite, sua presença nos tanques de resfriamento não deveria ser comum.

O gênero *Acetobacter*, incluído na família Acetobacteraceae, compreende bactérias que fazem parte da microbiota do rúmen. São responsáveis pela produção de ácido acético a partir da oxidação de açúcares e, além disso, a partir da captação de oxigênio, são capazes de tornar o rúmen um ambiente anaeróbico, permitindo o crescimento de archeas e outras bactérias anaeróbicas (Lyons et al., 2018; Zhao et al., 2019). Sendo um gênero comumente encontrado no rúmen, a provável explicação da sua presença nos tanques de resfriamento pode ser a transferência dessas bactérias do trato gastrointestinal materno para a glândula mamária e conseqüentemente para o leite, ou por meio das fezes (Young et al., 2015). Porém são necessários estudos mais aprofundados para discutir essa possibilidade.

Estudos envolvendo o rastreamento de microrganismos presentes em tanques de resfriamento de leite bovino são práticas comuns ao redor do mundo. Foi possível observar semelhança dos resultados aqui apresentados com trabalhos de Skeie et al. (2019) na Noruega e Sun et al. (2022) na Suécia, onde os gêneros *Pseudomonas* (26,6% e 17,2%), *Acinetobacter* (3,4% e 10,5%) e *Streptococcus* (6,4% e 4,5%) foram uns dos mais encontrados em amostras de leite de tanque. Além disso, os gêneros *Bacillus* (11%) e *Lactococcus* (12%) foram recorrentes no estudo de 2019, e Peptostreptococcaceae não classificados (4,3%) e *Staphylococcus* (3,1%) no estudo de 2022. Na Alemanha, Odenthal et al. (2016) obtiveram *Escherichia coli* (75,6%), *Citrobacter* spp. (9,6%), *Enterobacter cloacae* (6,1%) e *Klebsiella oxytoca* (3,7%) como as espécies mais encontradas em amostras de leite de tanque.

Com relação aos estados do Brasil, ainda são poucos os estudos envolvendo o microbioma de leite de tanque. No estado do Paraná (região Sul), estudos conduzidos em 20 fazendas obtiveram os gêneros *Bacillus*, *Brachy bacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Kocuria*, *Paenibacillus* e *Macrooccus* como os mais presentes em amostras de leite de tanque. Todos estes demonstraram ser potenciais bactérias termodúricas deteriorantes de leite. Além disso, é importante ressaltar a capacidade de produção de esporos do gênero *Bacillus* (Ribeiro Júnior et al., 2018). Apenas os gêneros *Streptococcus* e *Enterococcus* assemelham-se aos resultados obtidos no presente estudo. No estado de Minas Gerais (região Sudeste), estudos de Oliveira et al. (2021) obtiveram *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* não *aureus* e *Streptococcus* não *agalactiae* como os microrganismos mais abundantes em amostras de leite de tanque

provenientes de um total de 11 fazendas. *Pseudomonas* spp. e *Streptococcus agalactiae* assemelham-se com os resultados obtidos no presente estudo (família Pseudomonadaceae/gênero *Pseudomonas*; família Streptococaceae, respectivamente). Diferente do atual trabalho, o gênero *Acinetobacter* não foi encontrado nos estudos de Minas Gerais e Paraná.

Foi possível analisar que os estudos aqui citados sobre o microbioma de leite de tanque no Brasil foram conduzidos nas regiões Sul e Sudeste, ambas regiões de destaque na produção de leite no país. A ausência de estudos nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste compromete o estabelecimento de uma comparação mais apurada sobre a diversidade bacteriana presente nessas amostras que seja capaz de englobar o Brasil como um todo.

Ademais, foi possível notar que a maioria das famílias e gêneros bacterianos detectados no presente estudo representam microrganismos de origem ambiental, evidenciando a importância de implementar procedimentos de manejo sanitário nas fazendas a fim de prevenir a propagação desses agentes nos tanques de resfriamento, ainda mais considerando a capacidade destes de sobreviver em baixas temperaturas.

Com relação a métrica de diversidade beta, foi observado uma diferença significativa ($p = 0,000999$) de gêneros e famílias bacterianas entre os diferentes estados do Brasil, revelando uma heterogeneidade dessas comunidades. Isso pôde ser notado na comparação feita entre o atual estudo e os trabalhos de Ribeiro Júnior et al. (2018) e Oliveira et al. (2021) já citados, mesmo que estes envolvam apenas estados das regiões Sul e Sudeste do Brasil.

Considerando o estado de Goiás como referência, foi possível analisar que a diversidade alfa bacteriana dentro dos estados de Minas Gerais (região Sudeste), Santa Catarina (região Sul) e Tocantins (região Norte) foram semelhantes à diversidade bacteriana de Goiás (região Centro-Oeste). Já os estados de Maranhão (região Nordeste), Pará (região Norte) e São Paulo (região Sudeste) foram significativamente diferentes de Goiás (Fisher, Chao1 e ACE considerando os dois primeiros, e Simpson para o último).

São diversos os fatores que podem explicar as diferentes comunidades bacterianas presentes em leites de tanque nos diferentes estados do país. A microbiota da glândula mamária infectada é diferente em relação a glândula mamária de um animal saudável já que apresenta menor riqueza e diversidade de microrganismos. A mesma relação pode ser feita para o leite: leites ordenhados de

glândula mamária considerada saudável apresentam maior riqueza e diversidade de espécies. A idade das vacas também pode ser um fator a se considerar: quanto mais velho o animal, maior a chance deste apresentar casos de mastite, que serão responsáveis por alterar a composição bacteriana do leite. A estação do ano também pode influenciar: no verão, os casos de mastite são maiores devido ao aumento do contato animal-patógeno, modificando a diversidade bacteriana do leite (Metzger et al., 2018; Gonçalves et al., 2022).

Com relação à diversidade bacteriana das amostras de tanque levando em consideração os valores de CCS, foi observado no presente trabalho que houve diferença significativa ($p = 0,000999$) apenas entre as amostras pertencentes aos grupos de alta e baixa CCS, ou seja, considerando apenas a métrica de diversidade beta. Das famílias encontradas neste estudo, Streptococcaceae, Pseudomonadaceae e Enterococcaceae possuem representantes que são capazes de desencadear mastite em bovinos de leite (Banerjee et al., 2017; Sumon et al., 2017; Rodrigues et al., 2017), sendo uma possível explicação para o valor elevado de CCS da maioria das amostras de tanque (principalmente Streptococcaceae). Ainda são escassos os estudos envolvendo a relação entre comunidades bacterianas em leite de tanque associados com parâmetros de qualidade (CCS e CPP), porém resultados interessantes foram obtidos por Porcellato et al. (2021) em estudo com amostras de leite de tanque de 37 fazendas diferentes na Noruega coletadas em 2017 e novamente em 2019 para compreender a manutenção e as modificações na microbiota ao longo de um período de tempo prolongado. Análises de diversidade beta (distância de Bray-Curtis) entre as amostras mostrou que a CCS média não foi associada à composição da comunidade microbiana ($p = 0,1$), enquanto o sistema de ordenha apresentou um valor p mais elevado (0,012) em relação à composição da microbiota em comparação com o ano, a localização geográfica do rebanho e o nível bacteriano ($p \leq 0,001$).

Diante disso, os métodos moleculares avançados como o Sequenciamento de Nova Geração do gene 16S rRNA permitem compreender a ecologia, a epidemiologia e a diversidade bacteriana encontrada em amostras de leite de tanque. Este rastreamento permite traçar as melhores estratégias de prevenção e controle dos microorganismos, principalmente os patogênicos, consequentemente melhorando a qualidade do leite produzido nas fazendas brasileiras.

6. CONCLUSÃO

Os resultados aqui apresentados reforçam o potencial patogênico do gênero *Streptococcus* sp. como um dos principais responsáveis por desencadear mastite em bovinos de leite no Brasil, principalmente no que diz respeito sobre as espécies *S. agalactiae* e *S. uberis*. A presença de isolados resistentes, multirresistentes e portadores de diversos genes de virulência trazem preocupação quanto ao controle, tratamento e consequente disseminação da doença pelos rebanhos. A espécie *Aerococcus viridans* pode representar uma potencial causadora de mastite no país. Além disso, o rastreamento de diversas famílias e gêneros bacterianos encontrados em amostras de leite de tanque permitiu traçar as melhores estratégias de prevenção e controle das contaminações, consequentemente melhorando a qualidade do leite produzido nas fazendas brasileiras.

REFERÊNCIAS

- Abd El-Aziz, Norhan K.; Ammar, Ahmed M.; El Damaty, Hend M.; Abd Elkader, Rehab A.; Saas, Hosam A.; El-Kazzaz, Waleed and Khalifa, E. (2021). Environmental *Streptococcus uberis* Associated with Clinical Mastitis in Dairy Cows : Virulence Traits , Antimicrobial and Biocide Resistance, and Epidemiological Typing. *Animals*, 11, 1849;
- Abreu, A. C. S., Carazzolle, M. F., Crippa, B. L.; Barboza, G. R., Rall, V. L. M., Rocha, L. O., Silva, N. C. C. (2021). Bacterial diversity in organic and conventional Minas Frescal cheese production using targeted 16S rRNA sequencing. *International Dairy Journal*, 122. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105139>;
- Acosta, A. C., da Silva, L. B. G., Medeiros, E. S., Pinheiro-Júnior, J. W., & Mota, R. A. (2016). Mastites em ruminantes no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 36(7), 565–573. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016000700001>;
- Addis, M. F., Tanca, A., Uzzau, S., Oikonomou, G., Bicalho, R. C., & Moroni, P. (2016). Molecular perspectives from -omics studies. *Molecular BioSystems*, 12, 2359–2372. <https://doi.org/10.1039/c6mb00217j>;
- Almeida, M., Piaia, N., Baldo, W. G., & Favero, J. F. (2021). Principais agentes causadores de mastite clínica e subclínica em vacas leiteiras da região Oeste de Santa Catarina. *Pubvet*, 15(11), 1–9. <https://doi.org/10.31533/pubvet.v15n11a959.1-9>;
- Amaral, V., Thiago, R., Kato, R. B., Soares, S. D. C., & Matiuzzi, M. (2022). Bacteriocin Producing *Streptococcus agalactiae* Strains Isolated from Bovine Mastitis in Brazil. *Microorganisms*, 10(588), 1–26;
- Aragão, B. B., Trajano, S. C., de Oliveira, R. P., Carvalho, M. C., de Carvalho, R. G., Juliano, M. A., Junior, J. W. P., & Mota, R. A. (2022). Comparative Immunology , Microbiology and Infectious Diseases Occurrence of emerging multiresistant pathogens in the production chain of artisanal goat coalho cheese in Brazil. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 84(February), 101785. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2022.101785>;
- Aragão, B. B., Trajano, S. C., de Oliveira, R. P., da Silva, D. M. S., de Carvalho, R. G., Juliano, M. A., Junior, J. W. P., & Mota, R. A. (2021). Comparative Immunology , Microbiology and Infectious Diseases Multiresistant zoonotic pathogens isolated from goat milk in Northeastern Brazil. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 79, 101701. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2021.101701>;
- Argimón, S., Abudahab, K., Goater, R. J. E., Fedosejev, A., Bhai, J., Glasner, C., Feil, E. J., Holden, M. T. G., Yeats, C. A., Grundmann, H., Spratt, G., & Aanensen, D. M. (2016). Microreact : visualizing and sharing data for genomic epidemiology and phylogeography. *Microbial Genomics*, September. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000093>;
- Ashraf, A., & Imran, M. (2020). Causes, types, etiological agents, prevalence, diagnosis, treatment, prevention, effects on human health and future aspects of bovine mastitis. *Animal Health Research Reviews*, 1–14;
- Azooz, M. F., El-wakeel, S. A., & Yousef, H. M. (2020). Financial and economic analyses of the impact of cattle mastitis on the profitability of Egyptian dairy farms. *Veterinary World*, 13(9), 1750–1759;
- Banerjee, S., Batabyal, K., Joardar, S. N., Isore, D. P., Dey, S., Samanta, I., Samanta, T. K., & Murmu, S. (2017). Detection and characterization of pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* from bovine subclinical mastitis in West Bengal, India. *Veterinary World*, 10(7), 738–742. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.738-742>;
- Bangar, Y. C., Singh, B., Dohare, A. K., & Verma, M. R. (2015). A systematic review

- and meta-analysis of prevalence of subclinical mastitis in dairy cows in India. *Tropical Animal Health and Production*, *47*, 291–297. <https://doi.org/10.1007/s11250-014-0718-y>;
- Barkema, H. W., Schukken, Y. H., & Zadoks, R. N. (2006). Invited Review: The Role of Cow, Pathogen, and Treatment Regimen in the Therapeutic Success of Bovine *Staphylococcus aureus* Mastitis. *Journal of Dairy Science*, *89*(6), 1877–1895. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72256-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72256-1);
- Baseggio, N., Mansell, P. D., Browning, J. W., & Browning, G. F. (1997). Strain differentiation of isolates of streptococci from bovine mastitis by pulsed-field gel electrophoresis. *Molecular and Cellular Probes*, *11*, 349–354;
- Bauer, A. W., M.D., Kirby, W. M. M., M.D., Sherris, J. C., M.D., Turck, M., & M.D. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *The American Journal of Clinical Pathology*, *45*(4), 493–496;
- Bert, F., Branger, C., Poutrel, B., & Lambert-zechovsky, N. (1997). Differentiation of human and animal strains of *Streptococcus dysgalactiae* by pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiology Letters*, *150*, 107–112;
- Bertolini, A. B., Prado, A. M., Thyssen, P. J., Mioni, M. D. S. R., Gouvea, F. L. R. De, Leite, D. da S., Langoni, H., Pantoja, J. C. de F., Rall, V. L. M., Guimarães, F. F., Joaquim, S. F., Guerra, S. T., Hernandez, R. T., Lucheis, S. B., & Ribeiro, M. G. (2022). Prevalence of bovine mastitis-related pathogens, identified by mass spectrometry in flies (Insecta, Diptera) captured in the milking environment. *Letters in Applied Microbiology*, *75*, 1232–1245. <https://doi.org/10.1111/lam.13791>;
- Bi, Y., Wang, Y. J., Qin, Y., Vallverdú, R. G., & García, J. M. (2016). Prevalence of Bovine Mastitis Pathogens in Bulk Tank Milk in China. *PLoS ONE*, *11*(5), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155621>;
- Biscarini, F., Palazzo, F., Castellani, F., Masetti, G., Grotta, L., Cichelli, A., & Martino, G. (2018). Rumen microbiome in dairy calves fed copper and grape-pomace dietary supplementations: Composition and predicted functional profile. *PLoS ONE*, *13*(11), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205670>;
- Boireau, C., Cazeau, G., Jarrige, N., Calavas, D., Madec, J. Y., Leblond, A., Haenni, M., & Gay, É. (2018). Antimicrobial resistance in bacteria isolated from mastitis in dairy cattle in France, 2006–2016. *Journal of Dairy Science*, *101*(10), 9451–9462. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14835>;
- Brasil. (2018a). *Instrução Normativa nº 77, de 26 de novembro de 2018*;
- Brasil. (2018b). *Instrução Normativa Nº76, de 26 de novembro de 2018*;
- Brito, M.A.V.P., Brito, J.R.F., Ribeiro, M.T. & Veiga, V. M. . (1999). Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, *51*(April), 129–135;
- Brito, J. R. F., & Sales, R. de O. (2007). Saúde do UBERÊ. Uma Revisão. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, *1*(1), 67–90;
- Bueno, V. F. F., Nicolau, E. S., de Mesquita, A. J., Ribeiro, A. R., Silva, J. A. B., da Costa, E. O., Coelho, K. O., & Couto, D. V. (2003). Etiologia e suscetibilidade a antimicrobianos dos agentes da mastite bovina isolados na região de Pirassununga-SP-Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, *32*(1), 33–43;
- Bueno, V. F. F., Nicolau, E. S., de Mesquita, A. J., Ribeiro, A. R., Silva, J. A. B., da Costa, E. O., Coelho, K. O., & Neves, R. B. S. (2002). Mastite bovina clínica e subclínica, na região de Pirassununga, SP: frequências e redução na produção. *Ciência Animal Brasileira*, *3*(2), 47–52;
- Burnside, K., Lembo, A., Harrell, M. I., Gurney, M., Xue, L., Connelly, J. E., Jewell, K. A., Schmidt, B. Z., Reyes, M. D. L., Tao, W. A., Doran, K. S., & Rajagopal, L. (2011). The serine / threonine phosphatase Stp1 mediates post transcriptional

- regulation of hemolysin , autolysis and virulence of Group B *Streptococcus*. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 11. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.313486>;
- Busanello, M., Rossi, R. S., Cassoli, L. D., Pantoja, J. C. F., & Machado, P. F. (2017). Estimation of prevalence and incidence of subclinical mastitis in a large population of Brazilian dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 100(8), 1–9. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12042>;
- Carattoli, A. (2001). Review article Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Veterinary Research*, 32, 243–259;
- Cardozo, L. L., Neto, A. T., Souza, G. N., Picinin, L. C. A., Felipus, N. C., Reche, N. L. M., Schmidt, F. A., Werncke, D., & Simon, E. E. (2015). Risk factors for the occurrence of new and chronic cases of subclinical mastitis in dairy herds in southern Brazil. *Journal of Dairy Science*, 98(11), 7675–7685. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8913>;
- Carvalho-Castro, G. A., Silva, J. R., Paiva, L. V, Custódio, D. A. C., Moreira, R. O., Mian, G. F., Prado, I. A., Chalfun-Junior, A., & Costa, G. M. (2017). Molecular epidemiology of *Streptococcus agalactiae* isolated from mastitis in Brazilian dairy herds. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(3), 551–559. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.02.004>;
- Cheng, Wei Nee; Han, S. G. (2020). Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments - A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 33(11), 1699–1713. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32777908/>;
- Cheng, J., Qu, W., Barkema, H. W., Nobrega, D. B., Gao, J., Liu, G., De Buck, J., Kastelic, J. P., Sun, H., & Han, B. (2019). Antimicrobial resistance profiles of 5 common bovine mastitis pathogens in large Chinese dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 102(3), 2416–2426. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15135>;
- Chimalapati, S., Cohen, J. M., Camberlein, E., Macdonald, N., Durmort, C., Vernet, T., Hermans, P. W. M., Mitchell, T., & Brown, J. S. (2012). Effects of Deletion of the *Streptococcus pneumoniae* Lipoprotein Diacylglyceryl Transferase Gene Igt on ABC Transporter Function and on Growth In Vivo. *Plos One*, 7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041393>;
- Clarke, L. L., Fathke, R. L., Sanchez, S., & Stanton, J. B. (2016). *Streptococcus bovis*/S. *equinus* complex septicemia in a group of calves following intramuscular vaccination. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 28(4), 423–428. <https://doi.org/10.1177/1040638716648364>;
- Cobo-a, C., Sanchez, J., Rodriguez-lecompte, J. C., Ceballos-, A., & Zadoks, R. N. (2018). *Streptococcus agalactiae* is not always an obligate intramammary pathogen : Molecular epidemiology of GBS from milk , feces and environment in Colombian dairy herds. *Plos One*, 13(12), 1–14;
- Cobo-Ángel, C. G., Jaramillo-Jaramillo, A. S., Palacio-Aguilera, M., Jurado-Vargas, L., Calvo-Villegas, E. A., Ospina-Loaiza, D. A., Rodriguez-Lecompte, J. C., Sanchez, J., Zadoks, R., & Ceballos-Marquez, A. (2019). Potential group B *Streptococcus* interspecies transmission between cattle and people in Colombian dairy farms. *Scientific Reports*, 9(14025), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50225-w>;
- Crippa, B. L., Rodrigues, M. X., Tomazi, T., Yang, Y., Rocha, L. d O., Bicalho, R. C., & Silva, N. C. C. (2019). Virulence factors , antimicrobial resistance and phylogeny of bovine mastitis-associated *Streptococcus dysgalactiae*. *Journal of Dairy Research*;
- da Costa, G. M., Ribeiro, N. A., Gonçalves, M. S., da Silva, J. R., Custódio, D. A. da C., & Mian, G. F. (2021). Antimicrobial susceptibility profile of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from bovine mastitis. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 58, 178109;

- Devriese, L. A., Hommeez, J., Laevens, H., Pot, B., Vandamme, P., & Haesebrouck, F. (1999). Identification of aesculin-hydrolyzing streptococci, lactococci, aerococci and enterococci from subclinical intramammary infections in dairy cows. *Veterinary Microbiology*, 70, 87–94;
- Ding, Y., Zhao, J., He, X., Li, M., Guan, H., Zhang, Z., & Li, P. (2016). Antimicrobial resistance and virulence-related genes of *Streptococcus* obtained from dairy cows with mastitis in Inner Mongolia, China. *Pharmaceutical Biology*, 54(1), 162–167. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1025290>;
- Djabri, B., Bareille, N., Beaudeau, F., & Seegers, H. (2002). Original article Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta-analysis. *Veterinary Research*, 33, 335–357. <https://doi.org/10.1051/vetres>;
- Dwyer, K. O., Spivak, A. T., Ingraham, K., Min, S., Holmes, D. J., Jakielaszek, C., Rittenhouse, S., Kwan, A. L., Livi, G. P., Sathe, G., Thomas, E., Horn, S. V., Miller, L. A., Twynholm, M., Tomayko, J., Dalessandro, M., Caltabiano, M., Scangarella-oman, N. E., & Brown, R. (2015). Bacterial Resistance to Leucyl-tRNA Synthetase Inhibitor GSK2251052 Develops during Treatment of Complicated Urinary Tract Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(1), 289–298. <https://doi.org/10.1128/AAC.03774-14>;
- Economou, V., & Gousia, P. (2015). Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infection and Drug Resistance*, 49–61;
- El-Sayed, A., & Kamel, M. (2021). Bovine mastitis prevention and control in the post-antibiotic era. *Tropical Animal Health and Production*, 53(2). <https://doi.org/10.1007/s11250-021-02680-9>;
- Embrapa. (2023). *Anuário Leite*;
- EUCAST. (2022). *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0, 2022*. 1–110. <http://www.eucast.org>;
- Ezechukwu, I., Singal, M., & Igbiosa, O. (2019). Aerococcus Viridans: Case Report, Microbiology, and Literature Review. *American Journal of Case Reports*, 20, 697–700. <https://doi.org/10.12659/AJCR.914866>;
- Fernandes, M. C., Ribeiro, M. G., Siqueira, A. K., Salermo, T., Lara, G. H. B., & Listoni, F. J. P. (2009). Surto de mastite bovina causada por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes aos antimicrobianos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 61(3), 745–748;
- Fernandez, A., Lechardeur, D., Derré-Bobillot, A., Couvé, E., Gaudu, P., & Gruss, A. (2010). Two Coregulated Efflux Transporters Modulate Intracellular Heme and Protoporphyrin IX Availability in *Streptococcus agalactiae*. *Plos Pathogens*, 6(4), e1000860. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000860>;
- Fessia, A. S., & Odierno, L. M. (2021). Potential factors involved in the early pathogenesis of *Streptococcus uberis* mastitis: a review. *Folia Microbiologica*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s12223-021-00879-9>;
- Foroutan, A., Guo, A. C., Vazquez-fresno, R., Lipfert, M., Zhang, L., Zheng, J., Badran, H., Budinski, Z., Mandal, R., Ametaj, B. N., & Wishart, D. S. (2019). Chemical Composition of Commercial Cow 's Milk. *Journal of Agricultural And Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00204>;
- Freitas, B. de C. V. de B. J. de A., Laurindo, C., & Soares, M. de L. (2012). Ocorrência de mastite bovina em rebanhos leiteiros, no município de Paraupébas, PA. *Revista Higiene Alimentar*, 26(210/211), 151–156;
- Gao, J., Yu, F.-Q., Luo, L.-P., He, J.-Z., Hou, R.-G., Zhang, H.-Q., Li, S.-M., Su, J.-L., & Han, B. (2012). Antibiotic resistance of *Streptococcus agalactiae* from cows with mastitis. *The Veterinary Journal*, 194(3), 423–424. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.04.020>;
- Glöckner, F. O., Yilmaz, P., Quast, C., Gerken, J., Beccati, A., Ciuprina, A., Bruns, G.,

- Yarza, P., Peplies, J., Westram, R., & Ludwig, W. (2017). 25 years of serving the community with ribosomal RNA gene reference databases and tools. *Journal of Biotechnology*, 261(June), 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.06.1198>;
- Gomes, F., & Henriques, M. (2015). Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches. *Current Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0958-8>;
- Gonçalves, J. L., Young, J., Leite, R. de F., Fidelis, C. E., Trevisoli, P. A., Coutinho, L. L., Silva, N. C. C., Cue, R. I., Rall, V. L. M., & dos Santos, M. V. (2022). The Impact of Selective Dry Cow Therapy Adopted in a Brazilian Farm on Bacterial Diversity and the Abundance of Quarter Milk. *Veterinary Sciences*, 9(550);
- Guccione, J., Nizza, S., Mallardo, K., Cantiello, A., Fiorito, F., Loria, A. Di, & Martino, L. De. (2013). Penicillin-Resistant *Aerococcus viridans*; Bacteremia Associated with Bovine Severe Respiratory Syndrome. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 03(02), 131–135. <https://doi.org/10.4236/ojvm.2013.32021>;
- Guérin-Faubleé, V., Carret, G., & Houffschmitt, P. (2003). In vitro activity of 10 antimicrobial agents against bacteria isolated from cows with clinical mastitis. *Veterinary Record*, 152, 466–471;
- Guo, W., Liu, S., Khan, M. Z., Wang, J., Chen, T., Alugongo, G. M., Li, S., & Cao, Z. (2023). Bovine milk microbiota : Key players , origins , and potential contributions to early-life gut development. *Journal of Advanced Research*, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2023.06.016>;
- Halfmann, A., Kovács, M., Hakenbeck, R., & Brückner, R. (2007). Identification of the genes directly controlled by the response regulator CiaR in *Streptococcus pneumoniae* : five out of 15 promoters drive expression of small non-coding RNAs. *Molecular Microbiology*, 66(August), 110–126. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05900.x>;
- Harjanti, D. W., Ciptaningtyas, R., Wahyono, F., & Setiatin, E. T. (2018). Isolation and identification of bacterial pathogen from mastitis milk in Central Java Indonesia. *Earth and Environmental Science*, 102;
- Hava, D. L., & Camilli, A. (2002). Large-scale identification of serotype 4 *Streptococcus pneumoniae* virulence factors. *Molecular Microbiology*, 45(5), 1389–1406;
- Hernandez, L., Bottini, E., Cadona, J., Cacciato, C., Monteavaro, C., Bustamante, A., & Sanso, A. M. (2021). Multidrug Resistance and Molecular Characterization of *Streptococcus agalactiae* Isolates From Dairy Cattle With Mastitis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11(April), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.647324>;
- Hiratsuka, K., Wang, B., Sato, Y., & Kuramitsu, H. (1998). Regulation of Sucrose-6-Phosphate Hydrolase Activity in *Streptococcus mutans* : Characterization of the scrR Gene. *INFECTION AND IMMUNITY*, 66(8), 3736–3743;
- Hirunwiwatkul, P., Wachirasereechai, K., Khantipong, M., & Chongthaleong, A. (2012). Identifications of hordeolum pathogens and its susceptibility to antimicrobial agents in topical and oral medications. *Asian Biomedicine*, 6(2), 297–302. <https://doi.org/10.5372/1905-7415.0602.057>;
- Holko, I., Tančin, V., Vršková, M., & Tvarožková, K. (2019). Prevalence and antimicrobial susceptibility of udder pathogens isolated from dairy cows in Slovakia. *Journal of Dairy Research*, 86(4), 436–439. <https://doi.org/10.1017/S0022029919000694>;
- Illumina. (2013). *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation*;
- Ipe, D. S., Sullivan, M. J., & Ulett, G. C. (2021). Conserved bacterial de novo guanine biosynthesis pathway enables microbial survival and colonization in the environmental niche of the urinary tract. *The ISME Journal*, 15, 2158–2162. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-00934-w>;

- ISO/IDF, 2006. (2006). *INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. ISO 13366-2 / IDF 148-2 - Milk - Enumeration of somatic cells – Part. 2: Guidance on the operation of fluoro-opto-electronic counters. ISO. 2006*;
- ISO/IDF, 2013a. (2013). *INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. ISO 16297/IDF 161 - Milk bacterial count - Protocol for the evaluation of alternative methods. ISO. 2013*;
- Izquierdo, A. C., Guerra Liera, J. E., Cervantes, R. E., Inzunza Castro, J. F., Villa Mancera, E. A., Huerta Crispin, R., Juarez Mosqueda, M. de L., Vazquez, A. G., Olivares Perez, J., Aparicio, P. S., & Rodriguez Denis, B. E. (2017). Production of Milk and Bovine Mastitis. *Advances in Dairy Research*, 05(02). <https://doi.org/10.4172/2329-888x.1000174>;
- Jans, C., Meile, L., Lacroix, C., & Stevens, M. J. A. (2015). Infection , Genetics and Evolution Genomics , evolution , and molecular epidemiology of the *Streptococcus bovis* / *Streptococcus equinus* complex (SBSEC). *Infection, Genetics and Evolution*, 33, 419–436. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.09.017>;
- Jobim, M. B., Lopes, M. A., da Costa, G. M., & Demeu, F. A. (2010). Patógenos associados à mastite bovina em rebanhos leiteiros na região Sul do Brasil. *Boletim de Indústria Animal*, 67(2), 175–181;
- Jones, A. L., Needham, R. H. V, Knoll, K. M., & Rubens, C. E. (2003). Penicillin-binding proteins in *Streptococcus agalactiae*: a novel mechanism for evasion of immune clearance. *Molecular Microbiology*, 47, 247–256;
- Jørgensen, H. J., Nordstoga, A. B., Sviland, S., Zadoks, R. N., Sølverød, L., Kvitle, B., & Mørk, T. (2016). *Streptococcus agalactiae* in the environment of bovine dairy herds – rewriting the textbooks? *Veterinary Microbiology*, 184, 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.12.014>;
- Juliano, L. C., Fonseca, F. R., Pereira, M. de A., & Pantoja, J. C. de F. (n.d.). Diagnostic accuracy of an experimental chromogenic medium for detection of *Streptococcus agalactiae* intramammary infection of dairy cows. In *Available at SSRN 4415888*;
- Júnior, F. A. T., Ferro, R. A. da C., Júnior, A. F. de L., Ferro, D. A. da C., Sereno, J. R. B., & da Silva, B. A. P. (2015). Mastite clínica e subclínica em rebanhos leiteiros da raça holandesa da região de Palmeiras de Goiás. *Revista Faculdade Montes Belos (FMB)*, 8(5), 130–139;
- Júnior, J. C. R., Tamanini, R., Oliveira, A. L. M. De, Alfieri, A. A., & Beloti, V. (2018). Genetic diversity of thermophilic spoilage microorganisms of milk from Brazilian dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 101(8), 6927–6936. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13948>;
- Kaas, R. S., Leekitcharoenphon, P., Aarestrup, F. M., & Lund, O. (2014). Solving the Problem of Comparing Whole Bacterial Genomes across Different Sequencing Platforms. *PLoS ONE*, 9(8), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104984>;
- Kabelitz, T., Aubry, E., van Vorst, K., Amon, T., & Fulde, M. (2021). The role of *Streptococcus* spp. In bovine mastitis. *Microorganisms*, 9(7), 1–21. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071497>;
- Käppeli, N., Morach, M., Zurfluh, K., Corti, S., Nüesch-inderbinnen, M., & Stephan, R. (2019). Sequence Types and Antimicrobial Resistance Profiles of *Streptococcus uberis* Isolated From Bovine Mastitis. *Frontiers in Veterinary Science*, 6(July), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00234>;
- Ke, X., Lu, M., Ye, X., Gao, F., Zhu, H., & Huang, Z. (2012). Recovery and pathogenicity analysis of *Aerococcus viridans* isolated from tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in southwest of China. *Aquaculture*, 342–343, 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.02.012>;
- Kibebew, K. (2017). Bovine Mastitis: A Review of Causes and Epidemiological Point of View. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 7(2), 1–14;
- Kim, H. J., Youn, H. Y., Kang, H. J., Moon, J. S., Jang, Y. S., Song, K. Y., & Seo, K. H. (2022). Prevalence and Virulence Characteristics of *Enterococcus faecalis* and

- Enterococcus faecium* in Bovine Mastitis Milk Compared to Bovine Normal Raw Milk in South Korea. *Animals*, 12(11), 1–10. <https://doi.org/10.3390/ani12111407>;
- Krishnamoorthy, P., Suresh, K. P., Jayamma, K. S., Shome, B. R., Patil, S. S., & Amachawadi, R. G. (2021). An Understanding of the Global Status of Major Bacterial Pathogens of Milk Concerning Bovine Mastitis: A Systematic Review and Meta-Analysis (Scientometrics). *Pathogens*, 10, 545;
- Kromker, V., Reinecke, F., Paduch, J.-H., & Grabowski, N. (2014). Clinical Microbiology: Open Access Bovine *Streptococcus uberis* Intramammary Infections and Mastitis. *Clinical Microbiology: Open Access*, 3(4), 1000157. <https://doi.org/10.4172/2327-5073.1000157>;
- Kwon, H., Kim, S., Choi, M., Ogunniyi, A. D., Paton, J. C., Park, S., Pyo, S., & Rhee, D. (2003). Effect of Heat Shock and Mutations in ClpL and ClpP on Virulence Gene Expression in *Streptococcus pneumoniae*. *INFECTION AND IMMUNITY*, 71(7), 3757–3765. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.7.3757>;
- Lakew, B. T., Fayera, T., & Ali, Y. M. (2019). Risk factors for bovine mastitis with the isolation and identification of *Streptococcus agalactiae* from farms in and around Haramaya district, eastern Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*, 51(6), 1507–1513. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-01838-w>;
- Langoni, Hélio, Penachio, D. S., Citadella, J. C. C., Laurino, F., Faccioli-martins, P. Y., Lucheis, S. B., Menozzi, B. D., Silva, V., H, A. L., Penachio, D. S., Citadella, J. C. C., & Laurino, F. (2011). Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 31(12), 1059–1065;
- Langoni, Helio, Salina, A., Oliveira, G. C., Junqueira, N. B., Menozzi, B. D., & Joaquim, S. F. (2017). Considerações sobre o tratamento das mastites. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 37(11), 1261–1269. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2017001100011>;
- Lasagno, M. C., Reinoso, E. B., Dieser, S. A., Calvinho, L. F., Buzzola, F., Vissio, C., Bogni, C., & Odierno, L. (2011). Phenotypic and genotypic characterization of *Streptococcus uberis* isolated from bovine subclinical mastitis in Argentinean dairy farms Bacterial isolates. *Revista Argentina de Microbiología*, 43, 212–217;
- Leelahapongsathon, K., Schukken, Y. H., Pinyopummintr, T., & Suriyasathaporn, W. (2016). Comparison of transmission dynamics between *Streptococcus uberis* and *Streptococcus agalactiae* intramammary infections. *Journal of Dairy Science*, 99(2), 1418–1426. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9950>;
- Leira, M. H., Botelho, H. A., Cristhina, H., Soares, D. A., Barreto, B. B., Villela, J. H., & Pessoa, G. O. (2018). Fatores que alteram a produção e a qualidade do leite: Revisão. *Pubvet*, 12(5), 1–13;
- Lima, E. D. S., Ordonho, R. F., Sales, C. S. De, Santos, M. R., Carvalho, L. B. De, Souza, F. N. De, Cezar, A., & Fernandes, D. C. (2022). Perfil microbiológico da mastite bovina no Agreste e Brejo Paraibano. *Medicina Veterinária (UFRPE), Recife*, 16(2), 121–127;
- Lin, L., Huang, X., Yang, H., He, Y., He, X., Huang, J., Li, S., Wang, X., Tang, S., Liu, G., & Pan, Z. (2021). Molecular epidemiology, antimicrobial activity, and virulence gene clustering of *Streptococcus agalactiae* isolated from dairy cattle with mastitis in China. *Journal of Dairy Science*, 104(4), 4893–4903. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19139>;
- Liu, G., Liu, Y., Ali, T., Ferreri, M., Gao, J., Chen, W., & Yin, J. (2015). Molecular and Phenotypic Characterization of *Aerococcus viridans* Associated with Subclinical Bovine Mastitis. *PLoS ONE*, 10(4), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125001>;
- Lopes, T. S., Fussieger, C., Rizzo, F. A., Silveira, S., Lunge, V. R., & Streck, A. F. (2022). Species identification and antimicrobial susceptibility profile of bacteria associated with cow mastitis in southern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*,

42. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-6958>;
- Lundberg, Å., Nyman, A., Unnerstad, H. E., & Waller, K. P. (2014). Prevalence of bacterial genotypes and outcome of bovine clinical mastitis due to *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis*. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 56(80), 1–11;
- Lupo, A., Haenni, M., & Madec, J.-Y. (2018). Antimicrobial Resistance in *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas* spp. *Microbiology Spectrum*, 6(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA>;
- Luque-almagro, M., Gates, A. J., Moreno-vivi, C., Ferguson, S. J., Richardson, D. J., & Rold, M. D. (2011). Bacterial nitrate assimilation: gene distribution and regulation. *Biochemical Society Transactions*, 39, 1838–1843. <https://doi.org/10.1042/BST20110688>;
- Lyons, T., Bielak, A., Doyle, E., & Kuhla, B. (2018). Variations in methane yield and microbial community profiles in the rumen of dairy cows as they pass through stages of first lactation. *Journal of Dairy Science*, 101, 1–13. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14200>;
- Malinowski, E., Lassa, H., Ossowska, A. K. Ł., Markiewicz, H., Kaczmarowski, M. Ł., & Smulski, S. (2006). Relationship between mastitis agents and somatic cell count in foremilk samples. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 50(25), 349–352;
- Marques-Bastos, S. L. S., Coelho, M. L. V, Santos, I. N. de S., Moreno, D. S. A., Barrias, E. S., de Mendonça, J. F. M., Mendonça, L. C., Lange, C. C., Brito, M. A. V. de P., & Bastos, M. do C. de F. (2023). Effects of the natural antimicrobial peptide aureocin A53 on cells of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* involved in bovine mastitis in the excised teat model. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03443-w>;
- Martín, V., Vela, A. I., Gilbert, M., Cebolla, J., Goyache, J., Domínguez, L., & Fernández-Garayzábal, J. F. (2007). Characterization of *Aerococcus viridans* isolates from swine clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 3053–3057. <https://doi.org/10.1128/JCM.00156-07>;
- Martins, J. D., Nicolau, E. S., de Mesquita, A. J., & Jardim, E. A. G. da V. (2015). Mastite subclínica em rebanhos leiteiros de propriedades rurais de Goiás. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, 9(2), 206–214;
- Massote, V. P., Zanateli, B. M., Alves, G. V, Gonçalves, E. S., & Guedes, E. (2019). Diagnóstico e controle de mastite bovina: uma revisão de literatura. *Revista Agroveterinária Do Sul de Minas*, 1(1), 41–54. <https://periodicos.unis.edu.br/index.php/agrovetsulminas/article/view/265/243>;
- Matuschek, E., Brown, D. F. J., & Kahlmeter, G. (2014). Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(4). <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12373>;
- Mccluskey, J., Hinds, J., Husain, S., Witney, A., & Mitchell, T. J. (2004). A two-component system that controls the expression of pneumococcal surface antigen A (PsaA) and regulates virulence and resistance to oxidative stress in *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, 51(6), 1661–1675. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03917.x>;
- McHugh, A. J., Feehily, C., Fenelon, M. A., Gleeson, D., Hill, C., & Cotter, P. D. (2020). Tracking the Dairy Microbiota from Farm Bulk Tank to Skimmed Milk Powder. *Applied and Environmental Science*, 5(2), e00226-20;
- Mcmurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>;

- Mendes, R. E., Paukner, S., Doyle, T. B., Gelone, S. P., Flamm, R. K., & Sader, H. S. (2019). Low Prevalence of Gram-Positive Isolates Showing Elevated Lefamulin MIC Results during the SENTRY Surveillance Mechanisms. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 63(4), 1–9;
- Metzger, S. A., Hernandez, L. L., Skarlupka, J. H., Walker, T. M., Suen, G., & Ruegg, P. L. (2018). A Cohort Study of the Milk Microbiota of Healthy and Inflamed Bovine Mammary Glands From Dryoff Through 150 Days in Milk. *Frontiers in Veterinary Science*, 5(October), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00247>;
- Meyer, C., Bierbaum, G., Heidrich, C., I, M. R., Suling, J., Iglesias-wind, M. I., Kempter, C., Molitor, E., & Sahl, H.-G. (1995). Nucleotide sequence of the lantibiotic Pep5 biosynthetic gene cluster and functional analysis of PepP and PepC Evidence for a role of PepC in thioether formation. *European Journal of Biochemic*, 232, 478–489;
- Mohamed, H. M. A., Abd-Elhafeez, H. H., Al-Jabr, O. A., & El-Zamkan, M. A. (2022). Characterization of *Acinetobacter baumannii* Isolated from Raw Milk. *Biology*, 11(1845), 1–14;
- Moreira, P.C.; Silva, L.A.F.; Mesquita, A. J. (1997). Etiologia da mastite clínica bovina na bacia leiteira de Goiânia (pp. 69–74);
- Moreira, P. C., da Silva, L. A. F., & de Mesquita, A. J. (1997). Resistência de *Staphylococcus coagulase positiva* e *Streptococcus* sp. isolados do leite de vacas com mastite clínica na bacia leiteira de Goiânia. *Anais Da Escola de Agronomia e Veterinária*, 27(2), 61–68;
- Naranjo-lucena, A., & Slowey, R. (2023). Invited review : Antimicrobial resistance in bovine mastitis pathogens : A review of genetic determinants and prevalence of resistance in European countries. *Journal of Dairy Science*, 106(1), 1–23. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22267>;
- Nganje, C. N., Haynes, S. A., Qabar, C. M., Lent, R. C., Ghanem, E. N. B., & Shainheit, M. G. (2019). PepN is a non-essential, cell wall-localized protein that contributes to neutrophil elastase- mediated killing of *Streptococcus pneumoniae*. *Plos One*, 14(2).
- Nguyen, Q. D., Tsuruta, T., & Nishino, N. (2020). Examination of milk microbiota , fecal microbiota , and blood metabolites of Jersey cows in cool and hot seasons. *Animal Science Journal*, June, 1–11. <https://doi.org/10.1111/asj.13441>;
- Niero, T. R., Glienke, C. L., Dick, G., & Oliveira, H. M. De. (2021). Prevalência de mastite bovina no planalto de Santa Catarina. *Ciência Animal*, 31(2), 20–29;
- Odenthal, S., Akineden, Ö., & Usleber, E. (2016). International Journal of Food Microbiology Extended-spectrum β -lactamase producing Enterobacteriaceae in bulk tank milk from German dairy farms. *International Journal of Food Microbiology*, 238, 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.036>;
- Oksanen, J. (2022). Vegan : ecological diversity. *R Project*, 1, 1–12;
- Oliveira, P.V.C.; Neto, E.S.L.; Lucena, N.M.; Abrantes, M.R.; Silva, J.B.A.; Neto, C.O.A.; Luz, K.S.S.; Medeiros, D. A. S. (2020). Avaliação da qualidade do leite cru e prevalência de mastite no município de Mossoró-RN. *Brazilian Journal of Development*, 6, 64027–64042. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n8-728>;
- Oliveira, A. C. D., Souza, F. N., de Sant'Anna, F. M., Faúla, L. L., Chande, C. G., Cortez, A., Della Libera, A. M. M. P., Costa, M., Souza, M. R., Heinemann, M. B., & Cerqueira, M. M. O. P. (2021). Temporal and geographical comparison of bulk tank milk and water microbiota composition in Brazilian dairy farms. *Food Microbiology*, 98(April 2020). <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103793>;
- Oliveira, C. M. C., Sousa, M. G. S., Mendonça, C. L., Silveira, J. A. S., Oaigen, R. P., Juliano, S., Andrade, T., Diomedes, J., C, A. O. C. M., Sousa, M. G. S., Silva, N. S., Mendonça, C. L., & Silveira, J. A. S. (2011). Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará , estado do Pará. *Pesquisa Veterinaria*

- Brasileira*, 31(2), 104–110;
- Oliveira, C. S. F., Hogeveen, H., Botelho, A. M., Maia, P. V., Coelho, S. G., & Haddad, J. P. A. (2015). Cow-specific risk factors for clinical mastitis in Brazilian dairy cattle. *Preventive Veterinary Medicine*, 121(3–4), 297–305. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.08.001>;
- Owens, W. E., Watts, J. L., Greene, B. B., & Ray, C. H. (1990). Minimum Inhibitory Concentrations and Disk Diffusion Zone Diameter for Selected Antibiotics Against *Streptococci* Isolated from Bovine Intramammary Infections. *Journal of Dairy Science*, 73(5), 1225–1231. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78786-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78786-3);
- Pagnossin, D., Smith, A., Oravcov, K., & Weir, W. (2022). *Streptococcus canis*, the underdog of the genus. *Veterinary Microbiology*, 273(June). <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2022.109524>;
- Pang, M., Sun, L., He, T., Bao, H., Zhang, L., Zhou, Y., Zhang, H., & Wei, R. (2017). Molecular and virulence characterization of highly prevalent *Streptococcus agalactiae* circulated in bovine dairy herds. *Veterinary Research*, 48(65), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0461-2>;
- Parente, E., Ricciardi, A., & Zotta, T. (2020). The microbiota of dairy milk: A review. *International Dairy Journal*, 107, 104714. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104714>;
- Park, S. E., Jiang, S., & Wessels, M. R. (2012). CsrRS and Environmental pH Regulate Group B *Streptococcus* Adherence to Human Epithelial Cells and Extracellular Matrix. *INFECTION AND IMMUNITY*, 80(11), 3975–3984. <https://doi.org/10.1128/IAI.00699-12>;
- Pech, M., Karim, Z., Yamamoto, H., Kitakawa, M., Qin, Y., & Nierhaus, K. H. (2011). Elongation factor 4 (EF4 / LepA) accelerates protein synthesis at increased Mg²⁺ concentrations. *PNAS*, 108(8), 3199–3203. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012994108>;
- Petrovski, K. R., Grinberg, A., Williamson, N. B., Abdalla, M. E., Parkinson, T. J., Tucker, I. G., & Rapnicki, P. (2015). Susceptibility to antimicrobials of mastitis-causing *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* and *Str. dysgalactiae* from New Zealand and the USA as assessed by the disk diffusion test. *Australian Veterinary Journal*, 93, 227–233. <https://doi.org/10.1111/avj.12340>;
- Pietrocola, G., Arciola, C. R., Rindi, S., Montanaro, L., & Speziale, P. (2018). *Streptococcus agalactiae* Proteins: Involvement in Colonization and Pathogenesis and Potential as Vaccine Candidates. *Frontiers in Immunology*, 9(April), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00602>;
- Pinto, M. dos S., Fuzatti, J. V. S., Camargo, R. C., Silva, R. A. B., Garcia, M. da S., & Frias, D. F. R. (2021). Prevalência e etiologia da mastite bovina em propriedades rurais da região Noroeste Paulista. *Brazilian Journal of Development*, 7(2), 19184–19192. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n2-525>;
- Pitkälä, A., Haveri, M., Pyörälä, S., Mylly, V., & Honkanen-Buzalski, T. (2004). Bovine Mastitis in Finland 2001 — Prevalence, Distribution of Bacteria, and Antimicrobial Resistance. *Journal of Dairy Science*, 8, 2433–2441. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73366-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73366-4);
- Porcellato, D., Smistad, M., Bombelli, A., Abdelghani, A., Jørgensen, H. J., & Skeie, S. B. (2021). Longitudinal Study of the Bulk Tank Milk Microbiota Reveals Major Temporal Shifts in Composition. *Frontiers in Microbiology*, 12(February). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.616429>;
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), 590–596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>;
- Rajagopal, L. (2009). Understanding the regulation of Group B Streptococcal virulence

- factors. *Review Future Microbiology*, 4(2), 201–221;
- Ranasinghe, R. M. S. B. K., Deshapriya, R. M. C., Abeygunawardana, D. I., Rahularaj, R., & Dematawewa, C. M. B. (2021). Subclinical mastitis in dairy cows in major milk-producing areas of Sri Lanka: Prevalence, associated risk factors, and effects on reproduction. *Journal of Dairy Science*, 104(12), 12900–12911. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20223>;
- Ranilla, M. J., Andrés, S., Gini, C., Biscarini, F., Saro, C., Martín, A., Mateos, I., López, S., Giráldez, F. J., Abdennebi-Najar, L., Pereira, D., Falleh, H., Ksouri, R., Cremonesi, P., Castiglioni, B., & Cecilian, F. (2023). Effects of *Thymbra capitata* essential oil on in vitro fermentation end-products and ruminal bacterial communities. *Scientific Reports*, 13(1), 4153. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31370-9>;
- Rato, M. G., Bexiga, R., Florindo, C., Cavaco, L. M., Vilela, C. L., & Santos-Sanches, I. (2013). Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of streptococci from bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, 161(3–4), 286–294. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.07.043>;
- Reinoso, E. B. (2017). Bovine Mastitis Caused By *Streptococcus uberis*: Virulence Factors and Biofilm. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 9(5), 237–243. <https://doi.org/10.4172/1948-5948>;
- Reyes, J., Chaffer, M., Rodriguez-lecompte, J. C., Sánchez, J., Zadoks, R. N., Robinson, N., Cardona, X., Ramírez, N., & Keefe, G. P. (2017). Short communication: Molecular epidemiology of *Streptococcus agalactiae* differs between countries. *Journal of Dairy Science*, 100(11), 9294–9297. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13363>;
- Reyher, K. K., Haine, D., Dohoo, I. R., & Revie, C. W. (2012). Examining the effect of intramammary infections with minor mastitis pathogens on the acquisition of new intramammary infections with major mastitis pathogens — A systematic review and meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, 95(11), 6483–6502. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5594>;
- Rodrigues, M. X., Lima, S. F., & Bicalho, R. C. (2017). The microbiome of bulk tank milk: Characterization and associations with somatic cell count and bacterial count. *Journal of Dairy Science*, 100(4), 2536–2552. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11540>;
- Rogers, L. M., Gaddy, J. A., Manning, S. D., & Aronoff, D. M. (2018). Variation in Macrophage Phagocytosis of *Streptococcus agalactiae* Does Not Reflect Bacterial Capsular Serotype, Multilocus Sequence Type, or Association with Invasive Infection. *Pathogens and Immunity*, 3(1), 63–71. <https://doi.org/10.20411/pai.v3i1.233>;
- Rosini, R., & Margarit, I. (2015). Biofilm formation by *Streptococcus agalactiae*: influence of environmental conditions and implicated virulence factors. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5(February), 2013–2016. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00006>;
- Rossi, R. S., Amarante, A. F., Correia, L. B. N., Guerra, S. T., Nobrega, D. B., Latosinski, G. S., Rossi, B. F., Rall, V. L. M., & Pantoja, J. C. F. (2018). Diagnostic accuracy of Somaticell, California Mastitis Test, and microbiological examination of composite milk to detect *Streptococcus agalactiae* intramammary infections. *Journal of Dairy Science*, 101(11), 10220–10229. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14753>;
- Ruegg, P. L., Oliveira, L., Jin, W., & Okwumabua, O. (2015). Phenotypic antimicrobial susceptibility and occurrence of selected resistance genes in gram-positive mastitis pathogens isolated from Wisconsin dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 98(7), 4521–4534. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-9137>;
- Ryu, S., Park, W. S., Yun, B., Shin, M., Go, G. woong, Kim, J. N., Oh, S., & Kim, Y.

- (2021). Diversity and characteristics of raw milk microbiota from Korean dairy farms using metagenomic and culturomic analysis. *Food Control*, 127(March), 108160. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108160>;
- Saed, H. A. E.-M. R., & Ibrahim, H. M. M. (2020). Antimicrobial profile of multidrug-resistant *Streptococcus* spp. isolated from dairy cows with clinical mastitis. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 7710(June), 186–197;
- Sagar, A., Klemm, C., Hartjes, L., Mauerer, S., Zandbergen, G. V., & Spellerberg, B. (2013). The β -Hemolysin and Intracellular Survival of *Streptococcus agalactiae* in Human Macrophages. *Plos One*, 8(4), e60160. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060160>;
- Saishu, N., Morimoto, K., Yamasato, H., Ozaki, H., & Murase, T. (2015). Characterization of *Aerococcus viridans* isolated from milk samples from cows with mastitis and manure samples. *Journal of Veterinary Medical Science*, 77(9), 1037–1042. <https://doi.org/10.1292/jvms.15-0100>;
- Salaberry, S. R. S., Saidenberg, A. B. S., Zuniga, E., Gonsales, F. F., Melville, P. A., & Benites, N. R. (2016). Análise microbiológica e perfil de sensibilidade do *Staphylococcus* spp. em mastite subclínica de caprinos leiteiros. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 68(2), 336–344. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-8205>;
- Samen, U., Eikmanns, B. J., & Reinscheid, D. J. (2007). The Surface Protein Srr-1 of *Streptococcus agalactiae* Binds Human Keratin 4 and Promotes Adherence to Epithelial HEp-2 Cells □. *INFECTION AND IMMUNITY*, 75(11), 5405–5414. <https://doi.org/10.1128/IAI.00717-07>;
- Santos, E. M. P., Brito, M. A. V. P., Lange, C., Brito, J. R. F., & Cerqueira, M. M. O. P. (2007). *Streptococcus* e gêneros relacionados como agentes etiológicos de mastite bovina Streptococcus and related genera as etiological agents of bovine mastitis. *Acta Scientiae Veterinariae*, 35, 17–27;
- Sau, S., Sun, J., & Lee, C. Y. (1997). Molecular Characterization and Transcriptional Analysis of Type 8 Capsule Genes in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 179(5), 1614–1621;
- Seepersaud, R., Needham, R. H. V, Kim, C. S., Jones, A. L., Seepersaud, R., Needham, R. H. V, Kim, C. S., & Jones, A. L. (2006). Abundance of the δ Subunit of RNA Polymerase Is Linked to the Virulence of *Streptococcus agalactiae* Abundance of the □ Subunit of RNA Polymerase Is Linked to the Virulence of *Streptococcus agalactiae*. *Journal of Bacteriology*, 188(6). <https://doi.org/10.1128/JB.188.6.2096>;
- Senadheera, D., Krastel, K., Mair, R., Persadmehr, A., Abranches, J., Burne, R. A., & Cvitkovitch, D. G. (2009). Inactivation of Vick Affects Acid Production and Acid Survival of *Streptococcus mutans* □ †. *Journal of Bacteriology*, 191(20), 6415–6424. <https://doi.org/10.1128/JB.00793-09>;
- Shaker, E. M., Hassanien, A. A., & Abd-Elhamed, E. Y. (2019). Incidence of *Aerococcus viridans* in Raw Cow Milk in Sohag City, Egypt. *Advances in Animal and Veterinary Sciences Incidence*, 7(9), 782. <https://doi.org/10.17582/journal.aavs/2019/7.9.782.787>;
- Shen, J., Wu, X., Yang, Y., Lv, Y., Li, X., Ding, X., & Shen, J. (2022). Antimicrobial Resistance and Virulence Factor of *Streptococcus dysgalactiae* Isolated from Clinical Bovine Mastitis Cases in Northwest China . *Infection and Drug Resistance*, 3519–3530. <https://doi.org/10.2147/IDR.S327924>;
- Shome, B. R.; Bhuvana, M.; Mitra, S. das, Krithiga, N.; Shome, R.; Velu, D.; Banerjee, A.; Barbuddhe, S. B.; Prabhudas, K.; Rahman, H. (2012). Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus uberis* isolates from bovine milk. *Tropical Animal Health and Production*, 44, 1981–1992. <https://doi.org/10.1007/s11250-012-0167-4>;

- Silva Júnior, A. E., Vasconcelos, P. C., Saraiva, M. M. S., Filho, L. S., Silva, N. M. V., Givisiez, P. E. N., & Oliveira, C. J. B. (2021). Antimicrobial susceptibility profiles of *Staphylococcus* spp. contaminating raw goat milk. *Veterinary World*, *14*(5), 1074–1079. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.1074-1079>;
- Skeie, S. B., Håland, M., Thorsen, I. M., Narvhus, J., & Porcellato, D. (2019). Bulk tank raw milk microbiota differs within and between farms: A moving goalpost challenging quality control. *Journal of Dairy Science*, *102*, 1–13. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14083>;
- Song, X., Huang, X., Xu, H., Zhang, C., Chen, S., Liu, F., Guan, S., Zhang, S., Zhu, K., & Wu, C. (2020). The prevalence of pathogens causing bovine mastitis and their associated risk factors in 15 large dairy farms in China: an observational study. *Veterinary Microbiology*, *247*, 108757. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108757>;
- Spaková, T., Elecko, J., Vasil, M., Legáth, J., Pristas, P., & Javorsky, P. (2012). Limited genetic diversity of *Aerococcus viridans* strains isolated from clinical and subclinical cases of bovine mastitis in Slovakia. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, *15*(2), 329–335. <https://doi.org/10.2478/v10181-012-0051-1>;
- Stebbing, P. D., Pond, M. J., Peeler, E., Small, H. J., & Greenwood, S. J. (2012). Limited prevalence of gaffkaemia (*Aerococcus viridans* var. *homari*) isolated from wild-caught European lobsters *Homarus gammarus* in England and Wales. *Diseases of Aquatic Organisms*, *100*, 159–167. <https://doi.org/10.3354/dao02491>;
- Steenefeld, W., Hogeveen, H., Barkema, H. W., Broek, J. Van Den, & Huirne, R. B. M. (2008). The Influence of Cow Factors on the Incidence of Clinical Mastitis in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, *91*(4), 1391–1402. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0705>;
- Sukru, K., Ugur, P., Tugba, Y. H., & Ali, O. M. (2018). Molecular Identification of *Aerococcus viridans* Associated with Bovine Mastitis and Determination of Antibiotic Susceptibilities. *Archives of Animal Husbandry & Dairy Science*, *1*(1). <https://doi.org/10.33552/AAHDS.2018.01.000501>;
- Sullivan, M. J., Goh, K. G. K., & Ulett, G. C. (2021). Cellular management of Zinc in group B *Streptococcus* supports bacterial resistance against metal intoxication and promotes disseminated infection. *MSphere*, *6*(3);
- Sumon, S., Ehsan, M., & Islam, M. (2017). Subclinical mastitis in dairy cows: somatic cell counts and associated bacteria in Mymensingh, Bangladesh. *Journal of the Bangladesh Agricultural University*, *15*(2), 266–271. <https://doi.org/10.3329/jbau.v15i2.35073>;
- Sun, L., Lundh, Å., Höjer, A., Bernes, G., Nilsson, D., Johansson, M., Hetta, M., Gustafsson, A. H., Saedén, K. H., & Dicksved, J. (2022). Milking system and premilking routines have a strong effect on the microbial community in bulk tank milk. *Journal of D*, *105*, 123–139. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20661>;
- Sun, M., Gao, J., Ali, T., Yu, D., Zhang, S., Khan, S. U., Fanning, S., & Han, B. (2017). Characteristics of *Aerococcus viridans* isolated from bovine subclinical mastitis and its effect on milk SCC, yield, and composition. *Tropical Animal Health and Production*, *49*(4), 843–849. <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1271-2>;
- Terao, Y., Kawabata, S., Kunitomo, E., Murakami, J., Nakagawa, I., & Hamada, S. (2001). Fba, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus pyogenes*, promotes bacterial entry into epithelial cells, and the fba gene is positively transcribed under the Mga regulator. *Molecular Microbiology*, *42*(June), 75–86;
- The Galaxy Community. (2022). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2022 update. *Nucleic Acids Research*, *50*(April), 345–351;
- Tian, X. Y., Zheng, N., Han, R. W., Ho, H., Wang, J., Wang, Y. T., Wang, S. Q., Li, H. G., Liu, H. W., & Yu, Z. N. (2019). Antimicrobial resistance and virulence genes of

- Streptococcus* isolated from dairy cows with mastitis in China. *Microbial Pathogenesis*, 131(December 2018), 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.03.035>;
- Tomanic, D., Samardzija, M., & Kovacevic, Z. (2023). Alternatives to Antimicrobial Treatment in Bovine Mastitis Therapy : A Review. *Antibiotics*, 12, 683;
- Tomazi, T., Ferreira, G. C., Orsi, A. M., Gonçalves, J. L., Ospina, P. A., Nydam, D. V, Moroni, P., & Marcos, V. (2018). Association of herd-level risk factors and incidence rate of clinical mastitis in 20 Brazilian dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 161(October), 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.10.007>;
- Tomazi, T., Francisco, A., Filho, D. S., & Heinemann, M. B. (2018). Molecular characterization and antimicrobial susceptibility pattern of *Streptococcus agalactiae* isolated from clinical mastitis in dairy cattle. *PLoS ONE*, 13(6), e0199561;
- Tomazi, T., Freu, G., Alves, B. G., Francisco, A., Filho, D. S., Heinemann, M. B., & Veiga, M. (2019). Genotyping and antimicrobial resistance of *Streptococcus uberis* isolated from bovine clinical mastitis. *Plos One*, 14(10), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223719>;
- Turinsky, A. J., Moir-blais, t R., Grundy, F. J., & Henkin, T. M. (2000). *Bacillus subtilis* *ccpA* Gene Mutants Specifically Defective in Activation of Acetoin Biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, 182(19), 5611–5614;
- Valmorbida, M. K., Carneiro, D. C. dos S., Prior, K. C., Griebeler, E., Troncarelli, M. Z., & Dezen, D. (2017). Etiology and in vitro antimicrobial susceptibility profile of strains isolated from bovine mastitis in dairy herds from the midwest region of Santa Catarina state, Brazil. *Acta Veterinaria Brasilica*, 11(4), 219–225. <https://doi.org/10.21708/avb.2017.11.4.7266>;
- Varmanen, P., Savijoki, K., Åvall, S., Palva, A., & Tynkkynen, S. (2000). X-Prolyl Dipeptidyl Aminopeptidase Gene (*pepX*) Is Part of the *glnRA* Operon in *Lactobacillus rhamnosus*. *Journal of Bacteriology*, 182(1), 146–154;
- Vasilyeva, A., Sanches, I. S., Florindo, C., & Dmitriev, A. (2015). Natural Mutations in *Streptococcus agalactiae* Resulting in Abrogation of β Antigen Production. *Plos One*, 10(6), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128426>;
- Verdier-metz, I., Gagne, G., Bornes, S., Monsallier, F., Veisseire, P., & Delbès-paus, C. (2012). Cow Teat Skin , a Potential Source of Diverse Microbial Populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(2), 326–333. <https://doi.org/10.1128/AEM.06229-11>;
- Vezina, B., Al, H., Ramay, H. R., Soust, M., Moore, R. J., Olchow, T. W. J., & Alawneh, J. I. (2021). Sequence characterisation and novel insights into bovine mastitis - associated *Streptococcus uberis* in dairy herds. *Scientific Reports*, 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82357-3>;
- Vidal, A. M. C., Netto, A. S., Vaz, A. C. N., Gonçalves, A. C. S., Rossi, G. M., Annanda, S., & Ruiz, V. L. A. (2017). *Pseudomonas* spp .: contamination sources in bulk tanks of dairy farms. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 37(9), 941–948. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2017000900008>;
- Wang, S. M., Deighton, M. A., Capstick, J. A., & Gerraty, N. (1999). Epidemiological typing of bovine streptococci by pulsed-field gel electrophoresis. *Epidemiology and Infection*, 123, 317–324;
- Wang, Y., Yi, L., Wang, Y., Wang, Y., Cai, Y., Zhao, W., & Ding, C. (2016). Isolation , phylogenetic group , drug resistance , bio fi lm formation , and adherence genes of *Escherichia coli* from poultry in central China. *Microbiology and Food Safety*, 95, 2895–2901. <https://doi.org/10.3382/ps/pew252>;
- Wente, N., Klocke, D., Paduch, J., Zhang, Y., Seeth, M., Reinecke, F., & Mohr, E. (2019). Associations between *Streptococcus uberis* strains from the animal environment and clinical bovine mastitis cases. *Journal of Dairy Science*, 102(10),

- 9360–9369. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16669>;
- Wickham, H. (2016). *Data Analysis 9.1* (pp. 189–201). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4>;
- Wood, J., Scott, K. P., Avgus, G., Newbold, C. J., Flint, H. J., Al, W. E. T., & Icrobiol, A. P. P. L. E. N. M. (1998). Estimation of the Relative Abundance of Different Bacteroides and Prevotella Ribotypes in Gut Samples by Restriction Enzyme Profiling of PCR-Amplified 16S rRNA Gene Sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*(10), 3683–3689;
- Xu, S., Liu, Y., Gao, J., Zhou, M., Yang, J., & He, F. (2021). Comparative Genomic Analysis of *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *dysgalactiae* Isolated From Bovine Mastitis in China Statement of Ethics. *Frontiers in Microbiology*, *12*(October), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.751863>;
- Yilmaz, P., Parfrey, L. W., Yarza, P., Gerken, J., Pruesse, E., Quast, C., Schweer, T., Peplies, J., Ludwig, W., & Glöckner, F. O. (2014). The SILVA and “all-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Research*, *42*(D1), 643–648. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1209>;
- Young, W., Hine, B. C., Wallace, O. A. M., Callaghan, M., & Bibiloni, R. (2015). Transfer of intestinal bacterial components to mammary secretions in the cow. *PeerJ*, *3*:e888, 1–17. <https://doi.org/10.7717/peerj.888>;
- Zadoks, R. N., Middleton, J. R., McDougall, S., Katholm, J., & Schukken, Y. H. (2011). Molecular Epidemiology of Mastitis Pathogens of Dairy Cattle and Comparative Relevance to Humans. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, *16*, 357–372. <https://doi.org/10.1007/s10911-011-9236-y>;
- Zhang, S., Piepers, S., Shan, R., Cai, L., Mao, S., Zou, J., Ali, T., De Vliegher, S., & Han, B. (2018). Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance profiles in *Streptococcus dysgalactiae* isolated from bovine clinical mastitis in 5 provinces of China. *Journal of Dairy Science*, *101*(4), 3344–3355. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14031>;
- Zhao, S., Min, L., Zheng, N., & Wang, J. (2019). Effect of Heat Stress on Bacterial Composition and Metabolism in the Rumen of Lactating Dairy Cows. *Animals*, *9*(925), 1–10. <https://doi.org/10.3390/ani9110925>;
- Zouharova, M., Nedbalcova, K., & Slama, P. (2022). Occurrence of virulence-associated genes in *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis* isolated from bovine mastitis. *Veterinarni Medicina*, *2022*(03), 123–130.