

LIS SOUZA ROCHA

**ESTUDO DA VARIABILIDADE E ORGANIZAÇÃO DE GENES QUE CODIFICAM
PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ASSOCIADAS
À MASTITE BOVINA**

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

Orientadora: Andrea de Oliveira Barros Ribon

Coorientador: Tiago Antônio de Oliveira Mendes

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

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

T

R672e
2021
Rocha, Lis Souza, 1993-
Estudo da variabilidade e organização de genes que
codificam proteínas de superfície de cepas de *Staphylococcus
aureus* associadas à mastite bovina / Lis Souza Rocha. – Viçosa,
MG, 2021.

1 tese eletrônica (117 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Andrea de Oliveira Barros Ribon.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2021.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.108>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Staphylococcus aureus*. 2. Bovinos de leite - Doenças.
3. Mastite - Prevenção. 4. Lipoproteínas. I. Ribon, Andrea de
Oliveira Barros, 1971-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. III. Título.

CDD 22. ed. 636.2089819

Bibliotecário(a) responsável: Renata de Fátima Alves CRB6/2578

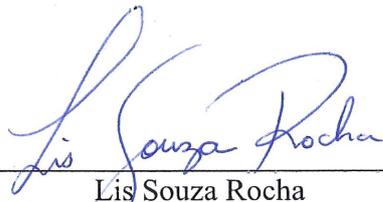
LIS SOUZA ROCHA

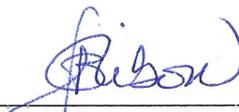
**ESTUDO DA VARIABILIDADE E ORGANIZAÇÃO DE GENES QUE CODIFICAM
PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ASSOCIADAS
À MASTITE BOVINA**

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

APROVADA: 16 de dezembro de 2021.

Assentimento:


Lis Souza Rocha
Autora


Andrea de Oliveira Barros Ribon
Orientadora

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus por ter guiado todos os meus passos e ter colocado tantos anjos de luz em meu caminho ao longo dos meus 10 anos na UFV;

Ao Ensino Público Brasileiro, à Kennesaw State University, ao Google, ao Ciência sem Fronteiras, à Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, a todos os professores e funcionários, por me mostrarem que independente de raça, nacionalidade, gênero, cor ou condição social, todo ser humano tem algo a ensinar. Meus agradecimentos especiais também aos funcionários do RU, BBT, e DRI, por proverem condições logísticas e estruturais para a condução do meu trabalho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento da pesquisa (APQ-00582-16);

À professora e orientadora Andréa de Oliveira Barros Ribon pela orientação, paciência, encorajamento e suporte nos últimos 5 anos, sempre conduzindo meus passos rumo à excelência;

Ao professor Tiago Antônio de Oliveira Mendes, por toda a orientação, paciência e suporte;

Ao professor J. Ross Fitzgerald, por ter acreditado no meu potencial e ter aberto as portas do seu laboratório para o meu recebimento junto à Universidade de Edimburgo, Escócia;

Aos professores Mateus Ferreira Santana, Mary Hellen Fabres-Klein e Ciro César Rossi, que gentilmente aceitaram o convite para participação da banca e enriquecimento deste trabalho;

A todos os meus alunos e alunas, estagiários, assessorados, por me ensinarem que ainda que eu falasse todas as línguas e entendesse de todas as ciências, sem amor, humildade e paciência, eu nada seria;

A vovó Adelícia, meu grande exemplo de vida, cristianismo, amor ao próximo, e paz de Deus no coração, que ainda me abriga sob suas asas de luz, e me motiva a ter a braveza de um leão e a serenidade de um beija flor em meu sangue latino;

A vó Leontina e vó Inês (*in memorian*), também exemplos de fé, resiliência, trabalho duro, simplicidade, amor e alegria à moda mineira valadarense;

A meu pai José de Souza e minha mãe Maria de Lourdes, que sempre me encorajaram a alçar voos cada vez maiores, a ter coragem, soltude, bondade, força e autenticidade para lidar com todos os obstáculos rumo a realização dos meus sonhos;

Aos meus irmãos Karak, Blenda e Marina, sangue do meu sangue, vida da minha vida, por todo o amor incondicional, cumplicidade, suporte, puxões de orelha, rolês, e companheirismo aonde quer que eu vá;

Ao meu companheiro Anoar, pelo amor e cumplicidade compartilhados, por me motivar a ser uma pessoa melhor, mais forte, corajosa, e mais serena.

Aos meus tios e tias, Cristina, Júlia, Natália, Dora, Davina, Rita, Rocha, King, Hélio, Jussara, Kleber, Silvana, Gilvana, que também foram meus pais, e me rodearam de todo o amor, carinho e cuidado desde que nasci,

A todos os meus primos, Joeima, Juliana, Hiago, Bruno, Bharbara, Bryan, Zeus, Mateus, Hannah, Sophia, Lucas, Anna Clara, Lorenzo, Valentina, por serem também meus amigos companheiros, e garantirem que o amor da família Adélicia está perpetuado em nossos corações;

Aos meus amigos que fiz em Viçosa, Deyse, João Guilherme, Samira, Guilherme, Zito, Laguna, Lucas, Eduardo, Silvana, Luana, à galera da OCR, o pessoal do forró, dos rocks no Teddies, do pastel na feira. Vocês me ajudaram a ser mais humana e a reconhecer que existe uma cidade acolhedora, divertida e cheia de possibilidades para além das 4 pilastras;

Aos colegas do LBM Ananda, Fernanda, Camila, Gilza, Higor, Thays, Grazi, Júlia, Alexandre, Bruno Ribeiro, Bruno Campos, Lílian, Lucas Almeida, Lucas Maia, Patrícia, Renato, Sérgio, Roberta, João Pedro, Larissa, Ramila, Camila, Valquíria, e, pela convivência, pela paciência, pelas ajudas constantes, pelas risadas que até me doíam a barriga, e por terem se tornado amigos queridos;

Ao Eduardo Pereira Monteiro, secretário do Programa de Pós-graduação em Bioquímica Aplicada, e Roberto Kikuchii, técnico da CAPES, por tamanhas competência e sensibilidade com as quais me auxiliaram,

Ao município de Viçosa que me acolheu como moradora ao longo dos 10 anos em que fui aluna da UFV, onde fiz grandes amizades e de onde carrego memórias de muita alegria e aprendizado.

RESUMO

ROCHA, Lis Souza, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2021. **Estudo da variabilidade e organização de genes que codificam proteínas de superfície de cepas de *Staphylococcus aureus* associadas à mastite bovina.** Orientadora: Andréa de Oliveira Barros Ribon. Coorientador: Tiago Antônio de Oliveira Mendes.

Staphylococcus aureus é um importante patógeno causador de mastite bovina em rebanhos de gado leiteiro. A doença, que acomete os quartos mamários de vacas leiteiras, é de alta prevalência, difícil tratamento, e pode evoluir para quadros mais graves afetando o bem-estar animal, e reduzindo a rentabilidade dos produtores. A doença pode se manifestar de forma clínica, com sinais inflamatórios sistêmicos visíveis, ou de forma subclínica, sem sintomas aparentes exceto pelo aumento da alta contagem de células somáticas no leite. Diversos estudos têm tentado entender os mecanismos moleculares associados pelos quais cepas de *S. aureus*, promovem invasão, evasão e modulação do sistema imune de seus hospedeiros. Neste trabalho, foi realizada a comparação de proteínas de superfície e secretadas de cepas de *S. aureus* visando identificar fatores bacterianos associados à mastite clínica ou subclínica. No Capítulo 1, análises *in silico* realizadas com as cepas bovinas 302, 170, 1269, 1364, (subclínicas), RF122 e N305 (clínicas) mostraram a alta similaridade em relação ao conteúdo de genes de virulência e reguladores. No entanto, vários polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) não sinônimos foram identificados, especialmente em genes que codificam proteínas envolvidas na evasão imune do hospedeiro e proteínas de superfície. Uma lipoproteína foi identificada como exclusiva de bactérias pertencentes ao grupo clínico. No Capítulo 2, bactérias coletadas em cinco estados brasileiros foram usadas para validar os achados do Capítulo 1. O gene da lipoproteína foi amplificado a partir do DNA total de 108 isolados com um par de *primers* complementares apenas à sequência encontrada nas cepas clínicas N305 e RF122. Os resultados mostraram um *amplicon* do tamanho esperado em 34/38 (89,47%) isolados de mastite clínica, e em apenas 3/34 (8,82%) isolados de mastite subclínica. No Capítulo 3, foi estudada a organização do *cluster lpl*, região do genoma de *S. aureus* onde se localiza o gene que codifica a lipoproteína identificada no Capítulo 1, visando elucidar os mecanismos com os quais uma lipoproteína de membrana pode interferir na forma como *Staphylococcus aureus* se manifesta como um patógeno bacteriano de grande importância internacional. Análises *in silico* mostraram diferenças no C-terminal da lipoproteína, região implicada na internalização bacteriana.

Em resumo, este trabalho identificou que, a despeito da alta similaridade no conteúdo gênico de cepas bovinas de *S. aureus*, existem diferenças em lipoproteínas que podem influenciar o processo de infecção da glândula mamária.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*. Mastite bovina. Fatores de virulência. Lipoproteína. *Cluster lpl*.

ABSTRACT

ROCHA, Lis Souza, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2021. **Study of the variability and organization of genes encoding surface proteins of *Staphylococcus aureus* strains associated with bovine mastitis.** Adviser: Andréa de Oliveira Barros Ribon. Co-adviser: Tiago Antônio de Oliveira Mendes.

Staphylococcus aureus is an important pathogen causing bovine mastitis in dairy herds. The disease, which affects the breast quarters of dairy cows, is highly prevalent, difficult to treat, and can progress to more serious conditions, affecting animal welfare, and reducing the profitability of producers. The disease can manifest clinically, with visible systemic inflammatory signs, or subclinically, with no apparent symptoms except for an increase in the high somatic cell count in milk. Several studies have tried to understand the associated molecular mechanisms by which *S. aureus* strains promote invasion, evasion and modulation of the immune system of their hosts. In this work, a comparison of surface and secreted proteins of *S. aureus* strains was performed in order to identify bacterial factors associated with clinical or subclinical mastitis. In Chapter 1, *in silico* analyzes performed with bovine strains 302, 170, 1269, 1364, (subclinical), RF122 and N305 (clinical) showed the high similarity in relation to the content of virulence and regulator genes. However, several non-synonymous single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been identified, especially in genes encoding proteins involved in host immune evasion and surface proteins. A lipoprotein was identified as exclusive to bacteria belonging to the clinical group. In Chapter 2, bacteria collected from five Brazilian states were used to validate the findings in Chapter 1. The lipoprotein gene was amplified from the total DNA of 108 isolates with a pair of primers only complementary to the sequence found in clinical strains N305 and RF122. The results showed an amplicon of the expected size in 34/38 (89.47%) isolates from clinical mastitis, and in only 3/34 (8.82%) isolates from subclinical mastitis. In Chapter 3, the organization of the *lpl* cluster, a region of the *S. aureus* genome where the lipoprotein identified in Chapter 1 is located, was studied, aiming to elucidate the mechanisms with which a membrane lipoprotein can interfere in the way in which *Staphylococcus aureus* manifests as a bacterial pathogen of great international importance. *In silico* analyzes showed differences in the C-terminus of the lipoprotein, a region involved in bacterial internalization. In summary, this work identified that, despite the high similarity in the gene content of *S. aureus* bovine strains, there are differences in lipoproteins that can influence the process of infection of the mammary gland.

Keywords: *Staphylococcus aureus*. Bovine mastitis. Virulence factors. Lipoprotein. *Lpl* cluster.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

CAPÍTULO 1

Fig 1. Classificação funcional de CDS de genomas sequenciados de <i>Staphylococcus aureus</i> de origem bovina, realizada usando o banco de dados SEED.....	42
Fig 2. SNPs não sinônimos em genes associados à virulência presentes nos genomas das cepas subclínicas.....	43
Fig 3. Gráfico MDS de proteínas transmembrana, de superfície e secretadas, geradas a partir de proteínas de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> de origem bovina.....	46
Fig 4. Matriz de identidade pareada gerada pelo alinhamento de fatores de virulência selecionados de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> de origem bovina.	48
Tabela 1. <i>Primers</i> usados para validar os resultados obtidos <i>in silico</i>	40
Tabela 2. Resultados (outputs) dos programas utilizados para a predição de proteínas de superfície e secretadas das cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> estudadas.....	45
Tabela 3. Resumo dos resultados de PCR usando os <i>primers</i> descritos na Tabela 1.....	50
Fig. Sup. 1 (S1 Fig) - Fluxograma que descreve a metodologia usada para encontrar e testar a lipoproteína cl3700.....	60
Fig. Sup. 2 (S2 Fig) - SNPs totais em genes associados à virulência presentes nos genomas das cepas subclínicas.....	61
Fig. Sup. 3 (S3 Fig) - Análises <i>in silico</i> da lipoproteína cl3700. No topo, a matriz de porcentagem de identidade criada com Clustal 2.1 da lipoproteína, construída com a sequência de aminoácidos para os genomas das cepas de <i>S. aureus</i> Sau170, Sau302, Sau1269, Sau1364, RF122 e N305.....	62
Fig. Sup. 4 (S4 Fig) - Amplificação do gene da nuclease de <i>Staphylococcus aureus</i> de origem bovina.....	63
Fig. Sup. 5 (S5 Fig.) – Amplificação do gene que codifica a proteína transportadora cl3316 de isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> de origem bovina.....	63
Fig. Sup. 6 (S6 Fig.) - Amplificação de um gene de lipoproteína de isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> de origem bovina.....	64
Tabela S1. Presença (+) ou ausência (-) de genes associados à virulência nos genomas de <i>Staphylococcus aureus</i> bovinos analisados.....	65
Tabela S2. Anotação de proteínas presentes no gráfico MDS por meio de um lote BLASTp contra <i>Staphylococcus aureus</i> RF122.....	65
Tabela S3. Matriz de identidade de proteínas secretadas e proteínas envolvidas na adesão e aquisição de ferro codificadas pelos genomas subclínicos e clínicos.....	65
Tabela S4. Curadoria manual dos <i>clusters</i> ortoMCL que eram possivelmente exclusivos dos genomas de cepas subclínicas de <i>Staphylococcus aureus</i>	65

CAPÍTULO 2

Fig 1. Mapa do Brasil mostrando a origem e tipo de spa dos isolados de campo testados neste estudo.	74
Fig 2. Dendrograma mostrando a similaridade genética entre isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> bovinos determinados por VNTR.	79
Fig 3. Amplificação de uma região da seqüência codificadora do gene da lipoproteína de 57 isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> estudados neste trabalho. Os <i>primers</i> LipoP-F-CS e LipoP-RC foram utilizados com DNA extraído de mastite bovina isolados de <i>S. aureus</i>	81
Fig 4. Análise <i>in silico</i> da lipoproteína de seis cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	82
Tabela 1 – Isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> usados neste estudo e resumo dos resultados.	75
Tabela 2 – Oligonucleotídeos usados neste estudo.....	77
Fig. Sup. 1. Tipagem MLVA dos isolados de campo de <i>Staphylococcus aureus</i> usados neste estudo. Corridas diferentes foram combinadas para mostrar um representante de cada perfil de MLVA.....	95
Tabela S1. - Tipagem de Spa dos isolados usados neste estudo.....	96
Tabela S2. - Porcentagem de identidade das regiões encontradas na lipoproteína.....	97

CAPÍTULO 3

Fig 1 – Análise de sintenia do <i>cluster</i> de lipoproteínas nas cepas <i>Staphylococcus aureus</i> 302 e RF122.....	105
Fig 2 - Alinhamento múltiplo das lipoproteínas dos <i>clusters lpls</i> de <i>Staphylococcus aureus</i> RF122 e <i>S. aureus</i> Sau302.....	106
Fig 3 – Matriz de identidade entre as lipoproteínas do <i>lpl cluster</i> de <i>Staphylococcus aureus</i> RF122 e <i>S. aureus</i> 302.....	107
Fig 4 – Representação esquemática da lipoproteína cl3700 de <i>Staphylococcus aureus</i> RF122. As cadeias lipídicas estão ancoradas ao resíduo de cisteína na porção N-terminal.....	108
Fig 5 – Clonagem do gene da lipoproteína cl3700 em <i>S. aureus</i> RF122, 302 e USA300..	110
Fig 6 - Expressão heteróloga das lipoproteínas de <i>Staphylococcus aureus</i> 302, USA300 e RF122 em <i>Escherichia coli</i> BL21.....	110
Fig 7 - Expressão heteróloga das lipoproteínas de <i>Staphylococcus aureus</i> 302 e USA300 em <i>Escherichia coli</i> C41.....	111
Tabela 1 – Informações a respeito dos genes <i>lpl</i> presentes no contig 160 do genoma de <i>Staphylococcus aureus</i> 302.....	103

LISTA DE ABREVIATURAS

- ATCC – American Type Culture Collection
- BHI – Caldo infusão de cérebro e coração
- BLAST – Ferramenta de busca de alinhamento local
- CC – Complexo clonal
- CCS - Contagem de células somáticas
- CDS – Sequência de DNA codificante
- CMT – California Mastitis Test
- COG - *Cluster of Orthologous Group*
- DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium
- DUF576 – domínio de função desconhecida 576
- Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IL – interleucina
- LBM - Laboratório de Biotecnologia Molecular
- lpl* – *lipoprotein-like* (associado ao *cluster lpl*)
- lpp* – lipoproteína
- MAC-T – Linhagem celular epitelial de glândula mamária bovina
- MLST – Tipagem por sequenciamento de multilocus
- MLVA - Repetições em tandem de número variável
- MRSA - *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente
- NCBI – *National Center for Biotechnology Information*
- NF- κ B - fator nuclear κ B
- ORF - Janela aberta de leitura
- PFGE - Eletroforese em gel de campo pulsado
- RAST - Rapid Annotation using Subsystem Technology
- SAPs - Ilhas de patogenicidade de *Staphylococcus aureus*
- SCC - Cassetes de cromossomos estafilocócicos
- SNP - polimorfismos de nucleotídeo único
- SSL - *Staphylococcal superantigen-like* (superantígenos estafilocócicos)
- ST – *Sequence type* (tipo de sequência)
- TLR – Receptor do tipo *toll*
- TNF- α - Tumor necrosis factor alfa (fator de necrose tumoral alfa)

VNTR - repetição em tandem de número variável
vSαα – ilha de patogenicidade estafilocócica vSαα

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	15
REVISÃO DE LITERATURA.....	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
CAPÍTULO 1	32
RESUMO.....	32
INTRODUÇÃO.....	33
MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
Declaração de ética.....	34
Microrganismos e condições de cultura.....	34
Animais usados e diagnóstico de mastites clínica e subclínica.....	34
Proteínas ortólogas.....	35
Avaliação do polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) em fatores de virulência (FV).....	36
Predição de proteínas superficiais e secretadas.....	37
Reação em cadeia da polimerase.....	39
RESULTADOS.....	40
Classificação funcional e análise genômica comparativa.....	40
Análise genômica de diferenças de virulência.....	41
Predição de proteínas de superfície presentes nos genomas das cepas bovina <i>S. aureus</i> e validação da análise de escalonamento multidimensional (MDS).....	44
Identificação de proteínas ortólogas.....	45
Reação em cadeia da polimerase.....	47
DISCUSSÃO.....	50
CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS.....	54
MATERIAL SUPLEMENTAR – CAPÍTULO 1.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
CAPÍTULO 2.....	70
RESUMO.....	71
1. INTRODUÇÃO.....	71
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	73
2.1 Microrganismos e condições de cultura.....	73
2.2. Diagnóstico de mastite bovina.....	76

2.2 Extração total de DNA.....	76
2.3 Análise MLVA.....	76
2.4 Tipagem <i>spa</i>	77
2.5 Amplificação do gene que codifica a lipoproteína.....	77
2.6 Análise <i>in silico</i> da estrutura da lipoproteína.....	78
3. RESULTADOS.....	78
3.1 Diversidade genética dos isolados de campo.....	78
3.2 Discriminação dos isolados usando o gene que codifica a lipoproteína.....	80
3.3 Estrutura da lipoproteína.....	81
4. DISCUSSÃO	83
5. CONCLUSÃO.....	85
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
MATERIAL SUPLEMENTAR – CAPÍTULO 2.....	95
CAPÍTULO 3.....	98
INTRODUÇÃO.....	98
METODOLOGIA	100
Análises <i>in silico</i>	100
Expressão heteróloga da lipoproteína cl3700.....	101
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	102
Análise de sintenia.....	102
Expressão da lipoproteína cl3700.....	109
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	111
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112
CONCLUSÕES GERAIS.....	117

INTRODUÇÃO

A mastite bovina é um processo inflamatório que ocorre nos tetos mamários de vacas leiteiras, considerada a doença mais comum e mais cara para a indústria de laticínios em todo o mundo. No Brasil, a doença é altamente prevalente nos estados produtores de leite, difícil de tratar com antibióticos e pode culminar em sacrifício do animal infectado. Os microrganismos causadores podem ser origem ambiental, como *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, e *Enterobacter*, ou oportunistas, como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, que se alojam nas glândulas mamárias de animais infectados e podem ser transmitidos durante a ordenha para quartos mamários sadios. Na maioria dos países, *S. aureus* é um dos principais agentes etiológicos de infecções intramamárias.

A mastite pode se apresentar de forma clínica ou subclínica. Na manifestação clínica, existem sinais evidentes de inflamação, tais como edema, aumento de temperatura, endurecimento e dor na glândula mamária, além do aparecimento de grumos e pus no leite produzido. Em formas mais graves, a mastite pode ocasionar gangrena dos quartos mamários envolvidos, com comprometimento sistêmico do bem-estar do animal. Por outro lado, a manifestação subclínica não resulta em alterações visíveis no aspecto do leite ou do úbere, sendo assim uma infecção silenciosa que resulta em mudanças na composição do leite, detectáveis pelo *California Mastitis Test* (CMT) e/ou contagem de células somáticas. A ausência de sintomas faz com que a manifestação subclínica seja aproximadamente quarenta vezes mais prevalente que a manifestação clínica. Além disso, a dificuldade de tratamento com antibióticos favorece a persistência da bactéria no úbere da vaca, podendo resultar em sacrifício do animal infectado.

O desenvolvimento do processo inflamatório não depende somente da fisiologia do animal, mas também de fatores produzidos pela bactéria. O conteúdo gênico de cepas de *S. aureus* associadas à mastite bovina é bastante similar, o que dificulta o estabelecimento de relações entre fatores de virulência e sintomologia. Entretanto, sabe-se que a produção de biofilme e de proteínas como coagulase, fatores de aglutinação A e B (ClfA e ClfB), proteína de ligação de fibrinogênio (Fib), proteínas de ligação de fibronectina A (FnbA) e B (FnbB) são essenciais para a adesão da bactéria ao epitélio mamário bovino, etapa primordial para a

colonização do hospedeiro. Como resultado, esses fatores ocasionam persistência e disseminação da bactéria, resistência à opsonização por células do sistema imune, e acabam por dificultar a eliminação do patógeno. *S. aureus* também produz hemolisinas, proteínas que formam poros na célula do hospedeiro, induzindo a sua lise e morte por necrose, e facilitando a aquisição de ferro, nutriente essencial para o crescimento bacteriano. Os superantígenos produzidos por *S. aureus* induzem a superprodução de citocinas inflamatórias e assim formam um ambiente favorável para a colonização bacteriana.

O genoma de *S. aureus* possui aproximadamente 2,8 Mpb, com 33% de conteúdo CG, e um core composto por 75% de genes constitutivos conservados, necessários para o crescimento e sobrevivência da bactéria. Existem clones predominantemente associados ao hospedeiro bovino, como os complexos clonais (CCs) 151, CC97, CC479, CC398, CC133 e CC126, sendo o CC126 predominante no Brasil. Acredita-se que eles difiram nos mecanismos moleculares de patogenicidade, visto que cada um exibe um conteúdo único e altamente conservado de genes relacionados à evasão do sistema imune e de proteínas de superfície para interação com células do hospedeiro. Em humanos, por exemplo, infecções causadas por *S. aureus* MRSA CC398 estão associadas a pacientes mais jovens, que permanecem internados por menos tempo, com infecções menos graves (Hidron *et al.*, 2009). Nos complexos clonais relacionados ao hospedeiro bovino, genes associados ao transporte de oligossacarídeos e dissacarídeos como lactose estão sob pressão positiva, certamente devido à maior necessidade de uso dessas moléculas como fonte de energia para o metabolismo bacteriano. Contrariamente, a ausência de certos genes nas linhagens de *S. aureus* associadas ao hospedeiro bovino, como *set*, *ses*, *cna*, *chp* e *sak*, sugere que a função dos mesmos não é relevante para a patogenicidade bacteriana no hospedeiro bovino. Assim, a compreensão da associação entre os complexos clonais e suas respectivas características de patogenicidade é de suma importância para a elaboração de estratégias de tratamento e controle da mastite bovina causada por *S. aureus*.

Silva *et al.* (2016) sequenciaram os genomas de quatro isolados bovinos de *S. aureus* associados à mastite subclínica, três dos quais pertencentes ao ST 126, muito prevalente em rebanhos do sudeste do Brasil. Rocha (2017), por meio de análises *in silico*, investigou a presença de genes ortólogos que pudessem estar relacionados a isolados que causam mastite

clínica ou mastite subclínica. Uma proteína transportadora (cl3316) e uma proteína hipotética (cl3900) foram identificadas como possivelmente exclusivas das cepas subclínicas, mas a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) revelou a presença dos respectivos genes em isolados de rebanhos leiteiros relacionados aos dois tipos de manifestação de mastite. Análises adicionais permitiram a identificação da lipoproteína cl3700 como possivelmente exclusiva das cepas *S. aureus* RF122 e N305, cepas relacionadas à mastite clínica analisadas no estudo, o que foi confirmado quando o DNA de alguns isolados de rebanho foi usado em PCR.

No presente trabalho, buscou-se analisar proteínas secretadas e de superfície a fim de identificar diferenças entre cepas de *S. aureus* associadas às mastites clínicas ou subclínicas. Os resultados preliminares encontrados por Rocha (2017) foram validados em um maior número de isolados bacterianos coletados em rebanhos de diferentes estados brasileiros. Estudou-se também a organização do gene que codifica uma lipoproteína da cepa *S. aureus* 302, que foi expressa em sistema heterólogo visando estudos futuros a fim de elucidar o seu papel na patogênese bacteriana.

REVISÃO DE LITERATURA

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), a produção mundial de leite em 2017 cresceu 3,3% em relação ao ano anterior, batendo o recorde de 827,9 bilhões de litros. Ásia, Europa e América contribuem com 90,7% do total mundial produzido, enquanto Estados Unidos, Índia e Brasil se destacam como os três maiores produtores (Embrapa, 2019). No cenário brasileiro, a produção de leite vem apresentando um aumento ao longo dos últimos quatro anos e tem 70% da produção concentrada em cinco estados brasileiros (Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Paraná, Goiás, Santa Catarina). Minas Gerais é tradicionalmente um polo leiteiro, abrigando em 2018 44% dos 100 maiores produtores nacionais (Anuário do Leite, 2019). O estado foi responsável por 27,11% da produção brasileira, quase o dobro do Rio Grande do Sul, segundo colocado (IBGE, 2019).

Diversas mudanças metabólicas e fisiológicas acontecem nas vacas leiteiras ao longo do período de transição entre o final da gestação e o início da lactação, que inclui preparação para o parto e produção de leite. Tais mudanças ocasionam maior vulnerabilidade a doenças como mastite, metrite, cetose e deslocamento do abomaso (Wisnieski *et al.*, 2019). A mastite é considerada a doença mais comum e mais cara para a indústria de laticínios em todo o mundo (Getaneh *et al.*, 2017; Aghamohammadi *et al.*, 2018; Soest *et al.*, 2018) e se caracteriza por uma inflamação da glândula mamária causada pela entrada de patógenos no úbere bovino. Ela tem sido um problema crescente não só pela perda da qualidade e quantidade de leite produzido, mas também pela disseminação do uso de antibióticos de amplo espectro (Nonnemann *et al.*, 2019).

Os custos associados à mastite incluem perdas na produção de leite, mão de obra, leite descartado, produção de leite reduzida, cuidados veterinários, descarte, redução da qualidade do leite e do produto, diagnóstico, tratamento, abate de animais afetados, risco de contaminação com antibióticos e penalizações (Cha *et al.*, 2011; Geary *et al.*, 2012). O custo para a indústria global de laticínios é de aproximadamente R\$ 93-151 bilhões por ano com base em uma população global de 271 milhões de vacas leiteiras (<http://www.dairy.ahdb.org.uk>, acessado em julho de 2021). Em média, as perdas financeiras

decorrentes da mastite bovina são estimadas em R\$ 752 por vaca por ano, com descarte de 11-18% da produção de leite (Aghamohammadi *et al.*, 2018).

A mastite pode ser classificada como clínica ou subclínica, de acordo com a maneira como a infecção se manifesta. Enquanto na mastite clínica visualizam-se sintomas, como presença de grumos no leite e sinais de inflamação nos tetos mamários (calor, vermelhidão, inchaço, dor, presença de pus), na mastite subclínica não existem alterações visíveis, e testes adicionais são necessários para o diagnóstico como o *California Mastitis Test* (CMT). Esse teste se baseia no uso de um surfactante aniônico que rompe a membrana celular das células somáticas presentes no leite, extravasando o conteúdo intracelular. O resultado pode ser visualmente classificado numa escala de 0 (mistura permanecendo inalterada) a 3 (formação de um gel semi-sólido pela reação do DNA bacteriano com o reagente surfactante), sendo 2 e 3 considerados resultados positivos. Entretanto, o teste apresenta algumas desvantagens, como um elevado limite de detecção, que é acima de 300.000 células/mL e a incapacidade de identificar a espécie bacteriana causadora da mastite (Aasharaj *et al.*, 2017). Devido ao seu desenvolvimento silencioso, manifestações subclínicas frequentemente evoluem ao estágio de infecções crônicas e difíceis de tratar.

Staphylococcus aureus é um dos principais agentes causadores da mastite subclínica que está mundialmente distribuído nos rebanhos leiteiros. Embora esse patógeno possa causar a mastite bovina clínica, com prevalência de 0,73% a 2,6% no Brasil, a prevalência pode chegar a 48,64% na manifestação subclínica (Acosta *et al.*, 2016; Busanello *et al.*, 2017). A mastite clínica promove uma inflamação da glândula mamária originando os sintomas típicos da doença e que não são visíveis durante a mastite subclínica. Embora fatores do hospedeiro possam influenciar a sintomatologia, é possível que diferenças no conjunto de proteínas bacterianas expressas impactem a resposta imune, contribuindo também para a manifestação apresentada pelo animal.

Isolados geneticamente distintos de *S. aureus* são normalmente encontrados em circulação nos rebanhos leiteiros (Smith *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2020). A estrutura populacional pode ser estudada por diferentes metodologias, sendo a tipagem de sequência multilocus (MLST) um método amplamente empregado que se baseia na análise da sequência parcial de sete genes de função constitutiva (Enright *et al.*, 2000). Como esses genes evoluem

lentamente, o nível de discriminação é suficiente para estudos de epidemiologia global, biologia evolutiva e populacional de *S. aureus*. As sequências dos genes são analisadas e a cada perfil (ou combinação única de alelos) é atribuída um *Sequence Type* (ST). Os STs que compartilham alelos em ≥ 5 loci são considerados pertencentes ao mesmo complexo clonal (CC).

S. aureus isolados de ruminantes com mastite são majoritariamente associados aos CC97, CC133, CC130, CC126 e CC705 (Peton e Le Loir, 2014). A distribuição de genes associados à virulência e resistência antimicrobiana é altamente associada aos diferentes CCs. Enquanto isolados pertencentes ao CC151, CC479 e CC133 apresentam mais genes de virulência do que os demais, CC398 destaca-se pela alta associação a genes de resistência antimicrobiana (Hoekstra *et al.*, 2020). O CC97 está disseminado em rebanhos leiteiros de todo o mundo (Smith *et al.*, 2005; Spoor *et al.*, 2013). Entretanto, nos últimos anos, isolados do CC97 têm sido cada vez mais identificados em infecções em humanos e porcos (Akkou *et al.*, 2018; Schmidt *et al.*, 2017), o que evidencia que bovinos são um reservatório potencial para o surgimento de novos complexos clonais exclusivos do hospedeiro humano (Spoor *et al.*, 2013). No Brasil, predominam isolados de *S. aureus* pertencentes aos ST 126 (CC126) e ST1 (CC1) (Bonsaglia *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2016). Acredita-se que *S. aureus* de origem bovina tenha se adaptado ao hospedeiro por meio da aquisição, perda e diversificação de genes, o que fez com que a bactéria fosse capaz de colonizar e sobreviver em um nicho anatomicamente e fisiologicamente distintos (Fitzgerald, 2012; Richardson *et al.*, 2018). Isso pode ser ilustrado pela maior capacidade de isolados bovinos em utilizarem a lactose, a principal fonte de carboidratos do leite bovino, comparado a *S. aureus* que infecta humanos ou pássaros (Richardson *et al.*, 2018).

Nos últimos anos, tem-se observado um aumento crescente do número de genomas completos de *S. aureus* sendo depositados em bases de dados, devido à ampla disponibilidade de serviços de sequenciamento de alto rendimento e baixo custo. A primeira cepa de *S. aureus* de origem bovina a ter seu genoma sequenciado foi RF122, responsável por causar mastite clínica severa (Herron-Olson *et al.*, 2007). Diferenças foram encontradas ao se comparar a genomas de cepas humanas, revelando uma adaptação do patógeno ao hospedeiro bovino pela alta variação de nucleotídeos em genes codificantes de fatores de virulência e proteínas de

superfície envolvidas nos processos de colonização do hospedeiro, produção de toxinas, metabolismo de ferro, resistência a antibióticos, e regulação gênica. Também foi observado que fatores de virulência muito bem definidos em *S. aureus*, como ClfA, Spa, SdrC, Ehb, FmhA, e SdrC ocorrem na forma de pseudogenes devido à presença de códons de terminação prematuros. Embora RF122 tenha se mostrado resistente à maior parte dos antibióticos testados, foi verificado um menor número de genes relacionados a resistência antimicrobiana, quando comparado aos demais genomas já sequenciados de *S. aureus*. O trabalho de Herron-Olson e colaboradores (2007) foi o primeiro a identificar as ilhas de patogenicidade SaPIbov1 e SaPIbov3, ausentes em cepas que causam infecções em humanos, e que codificam variantes dos genes codificantes de TSST-1 (toxina associada à síndrome do choque tóxico), enterotoxina estafilocócica C associada a bovinos, além da variante especializada da proteína Bap, que está relacionada à produção de biofilme dentro dos tetos mamários de vacas, favorecendo o processo infeccioso da mastite bovina (Ilczyszyn *et al.*, 2018).

Ben Zakour *et al.*, (2008) também relataram a especialização ao hospedeiro bovino na cepa *S. aureus* RF122, ratificando os estudos de Herron-Olson *et al.*, (2007). A análise de distribuição de conteúdo gênico mostrou que aproximadamente 2000 genes eram comuns em todas as cepas de diversos hospedeiros, mas que RF122 possui 228 dos 569 genes considerados variáveis, e 253 dos 406 genes detectados unicamente em cepas de origem bovina. Os estudos também mostraram que complexos clonais de *S. aureus* associados ao hospedeiro bovino (CC151, CC97, CC126, CC115, CC8, CC5) são bastante heterogêneos em termos de conteúdo gênico, resultando em um perfil genotípico bastante singular, de 55-88% de similaridade com outros perfis de PFGE provenientes de outros hospedeiros (Ben Zakour *et al.*, 2008). Muitas dessas diferenças que marcam a especialização para bovinos são codificadas pelo genoma principal, e incluem variações em genes que codificam para proteínas exportadas, possivelmente relacionadas nas interações entre patógeno e hospedeiro. Também foram descobertos *loci* específicos para a patogênese de bovinos, em que há alta variabilidade de genes relacionados à virulência, resistência a antimicrobianos, replicação, reparo e funções de fagos

Análises comparativas entre os genomas de *S. aureus* RF122, de outros 51 isolados de *S. aureus* de origem bovina pertencentes aos CC151, CC1, CC45, CC97, CC8 e CC97 e de

nove isolados de *S. aureus* associados a infecções humanas dos CC1, CC22, CCCC30, CC45, CC5 e CC8 relevaram 16 sequências codificadoras exclusivas de RF122, entre elas as ORFs de proteína hipotéticas, possível sintase de ácido 5- aminolevulínico, proteína de múltipla resistência a drogas, regulador de transcrição, metilase de modificação de DNA, as quais foram apontadas como potenciais marcadores moleculares para distinção entre isolados de infecções humanas e bovinas (Kozytska *et al.*, 2010). Foram observados apenas quatro genes dentro da ilha de patogenicidade SAPIbov3 (sab1890, sab1891, sab1892 e sab1893) presentes na maioria dos isolados de origem bovina e ausentes nos isolados de origem humana. Os autores enfatizaram que os STs ST151, ST771 e ST97 foram majoritariamente associados a infecções em bovinos, embora o ST97 também pudesse ser reportado em humanos, porém com uma frequência reduzida.

Dada a importância do patógeno na mastite bovina, inúmeros estudos foram realizados visando caracterizar isolados de *S. aureus* coletados em rebanhos leiteiros mundiais. Os estudos iniciais tinham por objetivo entender a estrutura populacional e revelaram a existência de diferentes isolados em um mesmo rebanho (Smith *et al.*, 2005). Num segundo momento, passou-se a investigar a presença de fatores de virulência reconhecidos como importantes para a patogênese de *S. aureus* isolados de humanos e buscar associações entre os genes e/ou complexos clonais e os tipos de manifestações apresentadas pelos animais. Os genes codificantes de enterotoxinas *seh* e *sek* tendem a ser mais frequentes em isolados que causam mastite subclínica, enquanto *sed* e *sej* estão principalmente associados à mastite persistente (Haveri *et al.*, 2007). Estudos comparativos envolvendo genes de virulência de isolados de *S. aureus* de casos clínicos e subclínicos de mastite bovina no nordeste do Brasil mostraram que todos os isolados clínicos apresentavam os genes *hla* e *lukE-D*, embora estes também estivessem presentes em alguns isolados subclínicos (Almeida *et al.*, 2013). Esse mesmo estudo também identificou o gene *sec* (Enterotoxina C) em 44.1% dos isolados de mastite subclínica do tipo ST-750 e ST-1728.

O gene *seg*, que codifica uma enterotoxina, foi associado a uma diminuição da probabilidade de bactérias causarem infecções intramamárias durante a lactação em vacas leiteiras (Veh *et al.*, 2015). A comparação entre *S. aureus* Newbould 305 (N305), uma cepa que pode induzir recorrentemente mastite leve e crônica em um ambiente experimental (Peton

et al., 2014), e *S. aureus* RF122, cepa virulenta representativa isolada de vacas com mastite severa (Herron-Olson *et al.*, 2007), revelou diferenças que podem estar associadas à gravidade da doença (Peton *et al.*, 2014). Mais especificamente, N305 apresentou menor diversidade de genes de toxinas, mas secretou maiores quantidades dessas toxinas, e foi associado a um maior potencial de citotoxicidade, maior capacidade de adesão e internalização em células epiteliais mamárias bovinas (Peton *et al.*, 2014). No entanto, ainda há muito a descobrir em termos da patogênese de *S. aureus*, o que está dificultando estratégias eficazes de combate à mastite bovina (Rainard *et al.*, 2018).

Vesículas extracelulares são produzidas por *S. aureus* e usadas como rotas de secreção de proteínas, entre elas fatores de virulência. A comparação no perfil de secreção de vesículas de cepas de *S. aureus* de origem bovina, ovina e humana mostrou que o conteúdo e quantidade do material transportado pode diferir de acordo com a cepa (Tartaglia *et al.*, 2020). Esses autores reportaram que aquelas relacionadas a infecções de mastite severas (RF122 e O11) produziram vesículas com conteúdo mais abundante em fatores de virulência (como δ -hemolisina) do que cepas relacionadas a infecções mais brandas (N305 e O46). Adicionalmente, algumas vesículas de transporte foram detectadas apenas nas cepas relacionadas à mastite bovina (N305 e RF122), como a variante bovina da proteína de ligação ao fator de Von Willebrand, a leucocidina LukMF', peptídeo antoindutor de lactona cíclica, transportadores do tipo ABC (Fe^{3+} e $\text{Mn}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$), sintase do ácido lipoteicóico e lipoproteínas do tipo tandem (*lpI*).

Åvall-Jääskeläinen *et al.*, (2021) avaliaram se a presença ou ausência de genes que codificam fatores de virulência em *S. aureus* estava associada à manifestação clínica de mastite bovina. Os autores sequenciaram os genomas de catorze bactérias isoladas de animais com mastite severa e de seis isolados de *S. aureus* provenientes de vacas com mastite subclínica ou clínica com sintomas mais brandos. Não foi possível uma associação entre os CCs testados e o tipo de mastite, entretanto a prevalência dos genes *lukM* e *lukF*, codificadores de uma leucotoxina bicomponente, foi maior em isolados oriundos de mastite gangrenosa do que em isolados de mastite não gangrenosa. Isso corrobora outros estudos que revelaram que a leucotoxina LukMF é a toxina mais abundante e mais potente em *S. aureus*, causando as maiores taxas de morte de neutrófilos bovinos (Vrieling *et al.*, 2016).

Em trabalho previamente desenvolvido por nosso grupo de pesquisa (Silva *et al.*, 2016), foram anunciadas as sequências de quatro genomas isolados a partir de animais com mastite subclínica. Em particular a bactéria Sau302 pertencente ao ST126, foi isolada por seis meses seguidos a partir de leite coletado de um mesmo animal com mastite subclínica. A comparação desses genomas com os de RF122 e de N305, cepa causadora de mastite branda, não identificou fatores de virulência exclusivos de cada tipo de manifestação. Rocha (2017) mostrou a alta similaridade entre as proteínas de superfície e secretadas das cepas, porém, uma comparação de ortólogos identificou uma lipoproteína denominada cl3700, com regiões de maior similaridade entre as duas cepas clínicas. Os resultados obtidos mostraram que a variação de sequência entre isolados bovinos de *S. aureus*, e não apenas presença ou ausência de fatores de virulência, é um fator importante a se considerar na análise comparativa entre isolados responsáveis pelas diferentes manifestações de mastite.

Lipoproteínas (Lpps) são uma classe de proteínas ancoradas aos lipídeos de membrana, e que em bactérias Gram-positivas desempenham um papel na detecção e sinalização molecular, secreção de proteínas, resistência a antibióticos, adesão e absorção de nutrientes como ferro, zinco e aminoácidos, além de participarem nos processos de modulação da resposta imune induzida, aumentarem a invasividade celular e patogenicidade bacteriana (Nguyen *et al.*, 2015; Shahmirzadi *et al.*, 2016; Nguyen e Gotz, 2016). Lpps atuam na ativação da resposta imune através do receptor do tipo Toll 2 (*Toll-like receptor 2*) (Nguyen e Götz, 2016), culminando na ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B) e indução de citocinas pró-inflamatórias (Müller *et al.*, 2010).

S. aureus possui em seu genoma o *cluster lpl* (*lipoprotein-like*) que consiste de um agrupamento de genes que codificam lipoproteínas localizado na ilha de patogenicidade vSa α (Nguyen *et al.*, 2015). Essas proteínas têm um domínio funcional chamado de DUF576 e durante o processo de infecção interagem com receptores do tipo TLR2 desencadeando a produção de sinais pró-inflamatórios, invasão de queratinócitos e de células cancerosas (Nguyen *et al.*, 2018). Outro estudo revelou que essas lipoproteínas também interagem com proteínas Hsp90 presentes em células epiteliais, induzindo produção de F-actina e internalização bacteriana (Tribelli *et al.*, 2020). Adicionalmente, lipoproteínas do *cluster lpl*

têm sido estudadas como possível alvo para o desenvolvimento de vacinas contra *S. aureus* (Schluepen *et al.*, 2013).

Nguyen e colaboradores (2015) deletaram o *cluster lpl* de *S. aureus* USA300, o que resultou numa expressiva diminuição na produção de citocinas pró-inflamatórias em células do sistema imune humano e diminuição de 2,5 vezes na capacidade de invasão bacteriana. A expressão heteróloga do *cluster* na cepa não patogênica *S. carnosus* fez com que ela adquirisse capacidade de invasão e desencadeasse resposta imunológica em células monocíticas 16 vezes mais intensa do que a resposta induzida pela cepa selvagem *S. aureus* USA300, comprovando o impacto que o *lpl cluster* exerce na estimulação da resposta imune inata do hospedeiro. Devido ao papel dos genes *lpl* na virulência de cepas humanas de *S. aureus*, estudos devem ser realizados para avaliar a presença desse *cluster* em *S. aureus* de origem bovina, seu papel no processo inflamatório e sua relação com os sintomas clínicos apresentados pelo animal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aasharaj, Vinodkumar, K.; Tresamol, P. V.; Deepa, P.M.; Latha, C. Comparison of Efficacy of Three Cow Side Tests for the Diagnosis of Subclinical Mastitis in Dairy Cattle. **Imperial Journal of Interdisciplinary Research**, 3, 417–418. 2017.
- Acosta, A.C.; da Silva, L.B.G.; Medeiros, E.S.; Pinheiro-Júnior, J.W.; Mota, R.A. Mastitis in ruminants in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 36, 565–573. 2016. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016000700001>
- Aghamohammadi, M.; Haine, D.; Kelton, D.F.; Barkema, H.W.; Hogeveen, H.; Keefe, G.P.; Dufour, S. Herd-level mastitis-associated costs on Canadian dairy farms. **Front. Veterinary Science**, 5, 1–12. 2018. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00100>
- Akkou, M.; Bouchiat, C.; Antri, K.; Bes, M.; Tristan, A.; Dauwalder, O.; Martins-Simoes, P.; Rasigade, J.P.; Etienne, J.; Vandenesch, F.; Ramdani-Bougoussa, N.; Laurent, F. New host shift from human to cows within *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis and nasal carriage of animal’s caretakers. **Veterinary Microbiology**, 223, 173–180. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.08.003>
- Almeida, L.M.; Almeida, M.Z.P.R.B.; Mendonça, C.L.; Mamizuka, E.M. Comparative analysis of agr groups and virulence genes among subclinical and clinical mastitis *Staphylococcus aureus* isolates from sheep flocks of the Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 44, 493–498. 2013. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000200026>
- Babu, M.M.; Priya, M.L.; Selvan, A.T.; Madera, M.; Gough, J.; Aravind, L.; Sankaran, K. A database of bacterial lipoproteins (DOLOP) with functional assignments to predicted lipoproteins. **Journal of Bacteriology**, 188, 2761–2773. 2006. <https://doi.org/10.1128/JB.188.8.2761-2773.2006>
- Bagnoli, F.; Rita, M.; Soldaini, E.; Mishra, R.P.N.; Fiaschi, L.; Cartocci, E.; Nardi-dei, V.; Ruggiero, P.; Nosari, S.; Grazia, M.; Falco, D.; Lofano, G.; Marchi, S. Vaccine composition formulated with a novel TLR7-dependent adjuvant induces high and broad protection against *Staphylococcus aureus* 112. **PNAS**, 112, 12. 2015. <https://doi.org/10.1073/pnas.1424924112>
- Belikova, D.; Jochim, A.; Power, J.; Holden, M.T.G.; Heilbronner, S. “Gene accordions” cause genotypic and phenotypic heterogeneity in clonal populations of *Staphylococcus aureus*. **Nature Communications**, 11. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17277-3>
- Ben Zakour, N.L.; Sturdevant, D.E.; Even, S.; Guinane, C.M.; Barbey, C.; Alves, P.D.; Cochet, M.F.; Gautier, M.; Otto, M.; Fitzgerald, J.R.; Le Loir, Y. Genome-wide analysis of ruminant *Staphylococcus aureus* reveals diversification of the core genome. **Journal of Bacteriology**, 190, 6302–6317. 2008. <https://doi.org/10.1128/JB.01984-07>
- Bolger, A.M.; Lohse, M.; Usadel, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, 30, 2114–2120. 2014. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Busanello, M.; Rossi, R.S.; Cassoli, L.D.; Pantoja, J.C.F.; Machado, P.F. Estimation of prevalence and incidence of subclinical mastitis in a large population of Brazilian dairy herds. **Journal of Dairy Science**, 100, 6545–6553. 2017.

- <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12042>
- Cha, E.; Bar, D.; Hertl, J.A.; Tauer, L.W.; Bennett, G.; González, R.N.; Schukken, Y.H.; Welcome, F.L. The cost and management of different types of clinical mastitis in dairy cows estimated by dynamic programming. **Journal of Dairy Science**, 94, 4476–4487. 2011. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-4123>
- Citti, C.; Kim, M.F.; Wise, K.S. Elongated versions of Vlp surface lipoproteins protect *Mycoplasma hyorhinis* escape variants from growth-inhibiting host antibodies. **Infection and Immunity**, 65, 1773–1785. 1997. <https://doi.org/10.1128/iai.65.5.1773-1785.1997>
- Elde, N.C.; Child, S.J.; Eickbush, M.T.; Kitzman, J.O.; Rogers, K.S.; Shendure, J.; Geballe, A.P.; Malik, H.S. Poxviruses deploy genomic accordions to adapt rapidly against host antiviral defenses. **Cell** 150, 831–841. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.049>
- Enright, M.C.; Day, N.P.J.; Davies, C.E.; Peacock, S.J.; Spratt, B.G. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, 38, 1008–1015. 2000. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.3.1008-1015.2000>
- Fitzgerald, J.R. Livestock-associated *Staphylococcus aureus*: Origin, evolution and public health threat. **Trends in Microbiology**, 20, 192–198. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.01.006>
- Fueyo, J.M.; Mendoza, M.C.; Rodicio, M.R.; Muñiz, J.; Alvarez, M.A.; Martín, M.C. Cytotoxin and pyrogenic toxin superantigen gene profiles of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical mastitis in dairy cows and relationships with macrorestriction genomic profiles. **Journal of Clinical Microbiology**, 43, 1278–1284. 2005. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.3.1278-1284.2005>
- Geary, U.; Lopez-Villalobos, N.; Begley, N.; McCoy, F.; O'Brien, B.; O'Grady, L.; Shalloo, L. Estimating the effect of mastitis on the profitability of Irish dairy farms. **Journal of Dairy Science**, 95, 3662–3673. 2012. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4863>
- Getaneh, A.M.; Alemu, S.; Hogeveen, H. Stochastic bio — economic modeling of mastitis in Ethiopian dairy farms. **Preventive Veterinary Medicine**, 138, 94–103. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.01.014>
- Haveri, M.; Roslöf, A.; Rantala, L.; Pyörälä, S. Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. **Journal of Applied Microbiology**, 103, 993–1000. 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03356.x>
- Herron-Olson, L.; Fitzgerald, J.R.; Musser, J.M.; Kapur, V. Molecular correlates of host specialization in *Staphylococcus aureus*. **PLoS One**, 2, 2007. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001120>
- Hidron, A.I.; Low, C.E.; Honig, E.G.; Blumberg, H.M. Emergence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300 as a cause of necrotising community-onset pneumonia. **The Lancet Infectious Diseases**, 9, 384–392. 2009. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70133-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70133-1)
- Hoekstra, J.; Zomer, A.L.; Rutten, V.P.M.G.; Benedictus, L.; Stegeman, A.; Spaninks, M.P.; Bennedsgaard, T.W.; Biggs, A.; Vliegheer, S. De, Mateo, D.H.; Schlenstedt, R.H. Genomic analysis of European bovine *Staphylococcus aureus* from clinical versus subclinical mastitis. **Science Reports**, 1–11. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020->

75179-2

- Ilczyszyn, W.M.; Kosecka-Strojek, M.; Międzobrodzki, J. Phage-Associated Virulence Determinants of *Staphylococcus aureus*. **Pet-to-Man Travel**, Staphylococci A World Prog. 173–183. 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813547-1.00014-5>
- Kim, D.; Perte, G.; Trapnell, C.; Pimentel, H.; Kelley, R.; Salzberg, S. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. **Genome Biology**, 14, 1–13. 2013. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-4-r36>
- Kozytska, S.; Stauß, D.; Pawlik, M.; Hensen, S.; Eckart, M.; Ziebuhr, W.; Witte, W.; Ohlsen, K. Identification of specific genes in *Staphylococcus aureus* strains associated with bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, 145, 360–365. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.03.020>
- Kuroda, M.; Ohta, T.; Uchiyama, I.; Baba, T.; Yuzawa, H.; Kobayashi, I.; Kobayashi, N.; Cui, L.; Oguchi, A.; Aoki, K.I.; Nagai, Y.; Lian, J.Q.; Ito, T.; Kanamori, M.; Matsumaru, H.; Maruyama, A.; Murakami, H.; Hosoyama, A.; Mizutani-Ui, Y.; Takahashi, N.K.; Sawano, T.; Inoue, R.I.; Kaito, C.; Sekimizu, K.; Hirakawa, H.; Kuhara, S.; Goto, S.; Yabuzaki, J.; Kanehisa, M.; Yamashita, A.; Oshima, K.; Furuya, K.; Yoshino, C.; Shiba, T.; Hattori, M.; Ogasawara, N.; Hayashi, H.; Hiramatsu, K. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet**, 357, 1225–1240. 2001. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04403-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04403-2)
- Langmead, B.; Salzberg, S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, 9, 357–359. 2012. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Mao, G.; Zhao, Y.; Kang, X.; Li, Z.; Zhang, Y.; Wang, X.; Sun, F.; Sankaran, K.; Zhang, X.C. Crystal structure of *E. coli* lipoprotein diacylglyceryl transferase. **Nature Communications**, 7. 2016. <https://doi.org/10.1038/ncomms10198>
- Mohammad, M.; Na, M.; Hu, Z.; Nguyen, M.; Koppurapu, P.K.; Jarneborn, A.; Karlsson, A.; Ali, A.; Pullerits, R.; Götz, F.; Jin, T. *Staphylococcus aureus* lipoproteins promote abscess formation in mice, shielding bacteria from immune killing. **Communications Biology**, 4, 1–12. 2021. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01947-z>
- Moon, B.Y.; Park, J.Y.; Robinson, D.A.; Thomas, J.C.; Park, Y.H.; Thornton, J.A.; Seo, K.S. Mobilization of genomic islands of *Staphylococcus aureus* by temperate bacteriophage. **PLoS One**, 11, 1–16. 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151409>
- Müller, P.; Müller-Anstett, M.; Wagener, J.; Gao, Q.; Kaesler, S.; Schaller, M.; Biedermann, T.; Götz, F. The *Staphylococcus aureus* lipoprotein SitC colocalizes with toll-like receptor 2 (TLR2) in murine keratinocytes and elicits intracellular TLR2 accumulation. **Infection and Immunity**, 78, 4243–4250. 2010. <https://doi.org/10.1128/IAI.00538-10>
- Nguyen, M.-T.; Peisl, L.; Barletta, F.; Luqman, A.; Götz, F. Toll-Like Receptor 2 and Lipoprotein-Like Lipoproteins Enhance *Staphylococcus aureus* Invasion in Epithelial Cells. **Infection and Immunity**, 86. 2018. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/IAI.00343-18>
- Nguyen, M.; Uebele, J.; Kumari, N.; Nakayama, H.; Peter, L.; Ticha, O.; Woischnig, A.; Schmalzer, M.; Khanna, N.; Dohmae, N.; Lee, B.L.; Bekeredjian-ding, I.; Götz, F. Lipid moieties on lipoproteins of commensal and non-commensal staphylococci induce differential immune responses. **Nature Communications**, 8, 1–12. 2017.

- <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02234-4>
- Nguyen, M.T.; Götz, F. Lipoproteins of Gram-Positive Bacteria: Key Players in the Immune Response and Virulence. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 80, 891–903. 2016. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00028-16>.
- Nguyen, M.T.; Kraft, B.; Yu, W.; Demicrioglu, D.D.; Hertlein, T.; Burian, M.; Schmalzer, M.; Boller, K.; Bekeredjian-Ding, I.; Ohlsen, K.; Schitteck, B.; Götz, F. The vSaa Specific Lipoprotein Like *Cluster (lpl)* of *S. aureus* USA300 Contributes to Immune Stimulation and Invasion in Human Cells. **PLoS Pathogens**, 11, 1–27. 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004984>
- Nonnemann, B.; Lyhs, U.; Svennesen, L.; Kristensen, K.A.; Klaas, I.C.; Pedersen, K. Bovine mastitis bacteria resolved by MALDI-TOF mass spectrometry. **Journal of Dairy Science**, 102, 2515–2524. 2019. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15424>
- Oliveira, L.; Rodrigues, A.C.; Hulland, C.; Ruegg, P.L. Enterotoxin production, enterotoxin gene distribution, and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* recovered from milk of cows with subclinical mastitis. **American Journal of Veterinary Research**, 72, 1361–1368. 2011. <https://doi.org/10.2460/ajvr.72.10.1361>
- Peton, V.; Bouchard, D.S.; Almeida, S.; Rault, L.; Falentin, H.; Jardin, J.; Jan, G.; Hernandez, D.; François, P.; Schrenzel, J.; Azevedo, V.; Miyoshi, A.; Berkova, N.; Even, S.; Le Loir, Y. Fine-tuned characterization of *Staphylococcus aureus* Newbould 305, a strain associated with mild and chronic mastitis in bovines. **Veterinary Research**, 45, 1–15. 2014. <https://doi.org/10.1186/s13567-014-0106-7>
- Peton, V.; Le Loir, Y. *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. **Infection, Genetics and Evolution**, 21, 602–615. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.08.011>
- Rainard, P.; Foucras, G.; Fitzgerald, J.R.; Watts, J.L.; Koop, G.; Middleton, J.R. Knowledge gaps and research priorities in *Staphylococcus aureus* mastitis control. **Transboundary and Emerging Diseases**, 65, 149–165. 2018. <https://doi.org/10.1111/tbed.12698>
- Richardson, E.J.; Bacigalupe, R.; Harrison, E.M.; Weinert, L.A.; Lycett, S.; Vrieling, M.; Robb, K.; Hoskisson, P.A.; Holden, M.T.G.; Feil, E.J.; Paterson, G.K.; Tong, S.Y.C.; Shittu, A.; van Wamel, W.; Aanensen, D.M.; Parkhill, J.; Peacock, S.J.; Corander, J.; Holmes, M.; Fitzgerald, J.R. Gene exchange drives the ecological success of a multi-host bacterial pathogen. **Nature Ecology and Evolution**, 2, 1468–1478. 2018. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0617-0>
- Rocha, L.S.; Silva, D.M.; Silva, M.P.; Vidigal, P.M.P.; Silva, J.C.F.; Guerra, S.T.; Ribeiro, M.G.; De Mendes, T.A.O.; De Ribon, A.O.B. Comparative genomics of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical and clinical bovine mastitis. **PLoS One**, 14, 1–19. 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220804>
- Santos, R.P.; Souza, F.N.; Oliveira, A.C.D.; de Souza Filho, A.F.; Aizawa, J.; Moreno, L.Z.; da Cunha, A.F.; Cortez, A.; Della Libera, A.M.M.P.; Heinemann, M.B.; Cerqueira, M.M.O.P. Molecular typing and antimicrobial susceptibility profile of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis and nasal samples. **Animals**, 10, 1–9. 2020. <https://doi.org/10.3390/ani10112143>
- Schenk, M.; Belisle, J.T.; Modlin, R.L. TLR2 Looks at Lipoproteins. **Immunity**, 31, 847–849. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.11.008>
- Schluenzen, C.; Malito, E.; Marongiu, A.; Schirle, M.; McWhinnie, E.; Lo Surdo, P.;

- Biancucci, M.; Falugi, F.; Nardi-Dei, V.; Marchi, S.; Fontana, M.R.; Lombardi, B.; De Falco, M.G.; Rinaudo, C.D.; Spraggon, G.; Nissum, M.; Bagnoli, F.; Grandi, G.; Bottomley, M.J.; Liberatori, S. Mining the bacterial unknown proteome: Identification and characterization of a novel family of highly conserved protective antigens in *Staphylococcus aureus*. **Biochemical Journal**, 455, 273–284. 2013. <https://doi.org/10.1042/BJ20130540>
- Schmaler, M.; Jann, N.J.; Ferracin, F.; Landolt, L.Z.; Biswas, L.; Götz, F.; Landmann, R. Lipoproteins in *Staphylococcus aureus* Mediate Inflammation by TLR2 and Iron-Dependent Growth In Vivo. **Journal of Immunology**, 182, 7110–7118. 2009. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804292>
- Schmidt, T.; Kock, M.M.; Ehlers, M.M. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis and close human contacts in South African dairy herds: Genetic diversity and inter-species host transmission. **Frontiers in Microbiology**, 8. 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00511>
- Shahmirzadi, S. V.; Nguyen, M.T.; Gotz, F. Evaluation of *Staphylococcus aureus* lipoproteins: Role in nutritional acquisition and pathogenicity. **Frontiers in Microbiology**, 7, 1–15. 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01404>
- Silva, D.M.; da Silva, M.P.; Vidigal, P.M.P.; Barcelos, R.M.; Klein, R.C.; Aguilar, A.P.; Fabres-Klein, M.H.; Oliveira, G.; Ribon, A.O.B. Draft genome sequences of *Staphylococcus aureus* strains isolated from subclinical bovine mastitis in Brazil. **Genome Announcements**, 4, 15–17. 2016. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01594-15>
- Smith, E.M.; Green, L.E.; Medley, G.F.; Bird, H.E.; Fox, L.K.; Schukken, Y.H.; Kruze, J. V.; Bradley, A.J.; Zadoks, R.N.; Dowson, C.G. Multilocus sequence typing of intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, 43, 4737–4743. 2005. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.9.4737-4743.2005>
- Soest, F.J.S. Van, Abbeloos, E.; Mcdougall, S.; Hogeveen, H. Addition of meloxicam to the treatment of bovine clinical mastitis results in a net economic benefit to the dairy farmer. **Journal of Dairy Science**, 1–11. 2018. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12869>
- Spoor, L.E.; McAdam, P.R.; Weinert, L.A.; Rambaut, A.; Hasman, H.; Aarestrup, F.M.; Kearns, A.M.; Larsen, A.R.; Skov, R.L.; Ross Fitzgerald, J. Livestock origin for a human pandemic clone of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **MBio**, 4. 2013. <https://doi.org/10.1128/mBio.00356-13>
- Tartaglia, N.R.; Nicolas, A.; Rodovalho, V. de R.; Luz, B.S.R. da, Briard-Bion, V.; Krupova, Z.; Thierry, A.; Coste, F.; Burel, A.; Martin, P.; Jardin, J.; Azevedo, V.; Le Loir, Y.; Guédon, E. Extracellular vesicles produced by human and animal *Staphylococcus aureus* strains share a highly conserved core proteome. **Science Reports**, 10, 1–13. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64952-y>
- Tribelli, P.M.; Luqman, A.; Nguyen, M.T.; Madlung, J.; Fan, S.H.; Macek, B.; Sass, P.; Bitschar, K.; Schitteck, B.; Kretschmer, D.; Götz, F. *Staphylococcus aureus* *Lpl* protein triggers human host cell invasion via activation of Hsp90 receptor. **Cellular Microbiology**, 22, 1–14. 2020. <https://doi.org/10.1111/cmi.13111>
- Tsuru, T.; Kobayashi, I. Multiple Genome Comparison within a Bacterial Species Reveals a Unit of Evolution Spanning Two Adjacent Genes in a Tandem Paralog Cluster. **Molecular Biology Evolution**, 25, 2457–2473. 2008. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn192>

- Van Der Woude, M.W.; Bäumler, A.J. Phase and antigenic variation in bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, 17, 581–611. 2004. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.3.581-611.2004>
- Veh, K.A.; Klein, R.C.; Ster, C.; Keefe, G.; Lacasse, P.; Scholl, D.; Roy, J.P.; Haine, D.; Dufour, S.; Talbot, B.G.; Ribon, A.O.B.; Malouin, F. Genotypic and phenotypic characterization of *Staphylococcus aureus* causing persistent and nonpersistent subclinical bovine intramammary infections during lactation or the dry period. **Journal of Dairy Science**, 98, 155–168. 2015. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8044>
- Vrieling, M.; Boerhout, E.M.; Van Wigcheren, G.F.; Koymans, K.J.; Mols-Vorstermans, T.G.; De Haas, C.J.C.; Aerts, P.C.; Daemen, I.J.J.M.; Van Kessel, K.P.M.; Koets, A.P.; Rutten, V.P.M.G.; Nuijten, P.J.M.; Van Strijp, J.A.G.; Benedictus, L. LukMF' is the major secreted leukocidin of bovine *Staphylococcus aureus* and is produced in vivo during bovine mastitis. **Scientific Reports**, 6, 1–12. 2016. <https://doi.org/10.1038/srep37759>
- Wisnieski, L.; Norby, B.; Pierce, S.J.; Becker, T.; Gandy, J.C.; Sordillo, L.M. Predictive models for early lactation diseases in transition dairy cattle at dry-off. **Preventive Veterinary Medicine**, 163, 68–78. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.12.014>

CAPÍTULO 1

Genômica comparativa de *Staphylococcus aureus* associado à mastite bovina subclínica e clínica

Artigo publicado na Revista Plos One -
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220804>

RESUMO

Muitos esforços têm sido feitos para entender a patogênese da mastite bovina, a fim de se reduzir as perdas e promover o bem-estar animal. *Staphylococcus aureus* pode causar mastite clínica bovina, mas está principalmente associado à infecção subclínica, que geralmente é persistente e pode facilmente reaparecer. Aqui, realizamos uma análise genômica comparativa entre cepas de *S. aureus* causando infecção subclínica (Sau170, 302, 1269, 1364), previamente sequenciadas por nosso grupo, e duas cepas bem caracterizadas causando mastite clínica (N305 e RF122) para encontrar diferenças que possam estar relacionadas ao tipo de manifestação de mastite. Um total de 146 genes associados à virulência foram comparados e nenhuma diferença significativa foi encontrada entre as cepas. No entanto, vários polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) não sinônimos foram identificados em genes presentes nas cepas subclínicas quando comparados a RF122 e N305, especialmente em genes que codificam proteínas envolvidas na evasão imune do hospedeiro e proteínas de superfície. As proteínas secretadas e de superfície preditas pelas ferramentas *in silico* foram comparadas por meio da análise de escalonamento multidimensional (MDS), revelando um alto grau de similaridade entre as cepas. A comparação de genes ortólogos pelo OrthoMCL identificou um transportador de membrana e uma lipoproteína como exclusivos de bactérias pertencentes aos grupos subclínico e clínico, respectivamente. Nenhum *hit* foi encontrado em RF122 e N305 para o gene codificante do transportador de membrana usando o algoritmo BLAST. Para a lipoproteína, as sequências de Sau170, 302, 1269 e 1364 com

identidades entre 68-73% foram encontradas no conjunto de dados MDS. Uma região conservada encontrada apenas nos genes de lipoproteína de RF122 e N305 foi usada para desenhar um par de *primers*. Embora a reação em cadeia da polimerase (PCR) em isolados de campo de *S. aureus* não tenha validado os achados para o transportador, a lipoproteína foi capaz de distinguir os isolados clínicos dos subclínicos. Esses resultados mostram que a variação da sequência entre *S. aureus* bovinos, e não apenas a presença / ausência de fatores de virulência, é um aspecto importante a ser considerado ao comparar isolados que causam diferentes manifestações de mastite.

INTRODUÇÃO

A mastite bovina é a doença mais comum e dispendiosa em gado de leite no mundo. Suas consequências incluem a contaminação do leite por bactérias e suas toxinas, além da redução da produção de leite e um período de carência devido à presença de resíduos de antibióticos (Vrieling *et al.*, 2016). Além disso, a mastite também pode causar a morte ou exigir o abate de animais cronicamente infectados.

A mastite pode se manifestar de forma clínica ou subclínica, embora a forma subclínica seja de maior prevalência (Mdegela *et al.*, 2009; Moges *et al.*, 2012; Argaw, 2016; Siddiquee *et al.*, 2013). A mastite subclínica tem maior incidência sobre os rebanhos leiteiros, e é caracterizada pela ausência de sintomas, sem que haja alterações aparentes no leite, exceto pela queda na quantidade e qualidade do produto, nem sempre detectada pelos produtores. Devido ao desenvolvimento silencioso, as manifestações subclínicas frequentemente evoluem para infecções crônicas. *Staphylococcus aureus* é uma das bactérias patogênicas mais representativas que causam mastite bovina e está amplamente distribuída em rebanhos de gado leiteiro em vários países (Schmidt *et al.*, 2017). Acredita-se que as cepas de *S. aureus* associadas a infecções crônicas sejam diferentes daquelas que causam infecções transitórias (Schukken *et al.*, 2011), mais propensas a serem transmitidas e permanecerem no rebanho devido à ausência de sinais clínicos (Sakwinska *et al.*, 2011; Whelehan *et al.*, 2011).

Estudos anteriores foram realizados buscando associar os fatores de virulência (FV) presentes em *S. aureus* à evolução clínica da mastite bovina, com o objetivo de distinguir isolados virulentos de outros menos nocivos. Por exemplo, o gene *seg*, que codifica uma

enterotoxina, foi associado a uma diminuição da probabilidade de bactérias causarem infecções intramamárias durante a lactação em vacas leiteiras (Veh *et al.*, 2015). A comparação entre *S. aureus* Newbould 305 (N305), cepa isolada de mastite branda, e *S. aureus* RF122, associada à mastite clínica grave, revelou diferenças que podem estar associadas à gravidade da doença (Peton *et al.*, 2014). No entanto, ainda há muito a descobrir em termos de patogênese de *S. aureus*, o que dificulta estratégias eficazes de combate à mastite bovina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Declaração de ética

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP / Botucatu, São Paulo, (protocolo 136/2017) e da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais (protocolo 85/2014).

Microrganismos e condições de cultura

As bactérias utilizadas neste estudo foram mantidas em ágar BHI (Brain Heart Infusion, BHI HiMedia, Mumbai, Índia) a 37°C, e armazenadas a longo prazo em BHI contendo 20% de glicerol. Isolados de campo (308, 340, 403, 1001, 1311, 1315, 1323, 76, 216, 1439, 2555, 3909, 5T18-19, 9T18-16, 10T18-59, 10T18-68, 14T18-13, 22T18-52 e 22T17-54) foram utilizados para validar a análise *in silico* e foram originados de animais acometidos por mastite subclínica ou clínica conforme descrito a seguir.

Animais usados e diagnóstico de mastites clínica e subclínica

No presente estudo, foi usada uma amostra de conveniência de vacas com diagnóstico de mastite clínica (n = 8) ou subclínica (n = 4) causada por *S. aureus*. Os animais foram oriundos de 12 fazendas localizadas no estado de São Paulo (n = 3) e Minas Gerais (n = 9), região sudeste do Brasil, onde a pecuária leiteira é comum, com condições semelhantes de nutrição, manejo e instalações. Em apenas uma fazenda foram retiradas amostras de leite de casos clínicos e subclínicos de mastite, embora de animais diferentes. Todos os animais foram submetidos ao teste da caneca do fundo preto e ao *California Mastitis Test* - CMT (pontuações 1+ a 3+) para o diagnóstico de mastite clínica e subclínica (Constable *et al.*,

2016), respectivamente, de acordo com o parecer veterinário das fazendas. O diagnóstico de mastite clínica foi baseado em anormalidades macroscópicas no leite (pus, caroços e grumos), presença de sinais clínicos de inflamação na glândula mamária (inchaço, dor ou congestão da glândula mamária afetada) e/ou sinais sistêmicos de doença (inapetência, febre, taquicardia, taquipnéia, decúbito e alterações dos movimentos ruminais) (Pinzon-Sanchez & Ruegg 2016)

Os isolados 76, 216, 1439, 2555, 3909, 5T18-19, 9T18-16, 10T18-59, 10T18-68, 14T18-13, 22T18-52 e 22T17-54 foram coletados de vacas com sinais clínicos de mastite em oito fazendas diferentes. Os isolados 308, 340, 403, 1001, 1311, 1315 e 1323 vieram de vacas que sofriam de mastite subclínica (pontuações 2+ ou 3+), oriundos de fazendas diferentes e sem a apresentação de sinais visíveis de mastite clínica ao longo da lactação, durante os nove meses em que os rebanhos foram visitados.

Proteínas ortólogas

Os genomas de *S. aureus* 1269 (ST1), *S. aureus* 302 (ST126), *S. aureus* 170 (ST126) e *S. aureus* 1364 (ST126), associados à mastite subclínica, foram previamente sequenciados (Ion Torrent Personal Genome Machine) e depositados no NCBI como LN0000000000, LNOR000000000, LNOQ000000000 e LNOP000000000, respectivamente (Veh *et al.*, 2015). Neste presente texto, eles serão referidos como Sau1269, Sau302, Sau170 e Sau1364. Duas cepas que causam infecção clínica, *S. aureus* RF122 (ST151) (Herron-Olson *et al.*, 2007) e *S. aureus* N305 (ST115) (Peton *et al.*, 2014), foram usadas para análise comparativa; seus genomas foram totalmente sequenciados e disponibilizados em DDBJ/EMBL/GeneBank sob os números de acesso NC_007622 e AKYW000000000, respectivamente. A fim de evitar artefatos gênicos de montagem devido ao uso de diferentes métodos e programas para predições de sequência de codificação, a versão 2.50 do Prodigal (Hyatt *et al.*, 2010) foi usada para predição gênica em todos os genomas analisados. A análise de completude da montagem do genoma foi realizada pelo software BUSCO v3 (Simão *et al.*, 2015) usando o Bacteria Dataset para a ordem *Bacillales*. Foram considerados genomas de alta qualidade aqueles que apresentavam valores de completude acima de 95%. Buscas BLAST (<http://Blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) foram utilizadas para a anotação funcional de conjuntos de proteínas, o que permitiu que elas fossem agrupadas em grupos de *clusters* de genes

ortólogos (COG) (Tatusov *et al.*, 2001). Os contigs também foram submetidos à anotação automática no servidor RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*), por meio de buscas de homologia no banco de dados do SEED (Overbeek *et al.*, 2005), e contrastados automaticamente por meio de uma busca BLAST com os contigs já anotados das cepas *S. aureus* RF122 e *S. aureus* N305. O algoritmo OrthoMCL, com um índice de inflação de 1,5 (Li *et al.*, 2003), foi usado para agrupar as sequências de proteínas em *clusters* ortólogos. O software Bowtie2 versão 2.2.8 (Langmead & Salzberg, 2012) foi usado para alinhar leituras sequenciadas para os genomas RF122 e N305, a fim de verificar regiões mal montadas e de baixa cobertura. A ausência de um gene foi considerada como sendo um artefato de montagem se as leituras originais de alta qualidade (com qualidade phred acima de 20) fossem mapeadas com cobertura de 100% do gene, com conservação de densidade, quando comparadas à sequência do gene no genoma de referência.

Avaliação do polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) em fatores de virulência (FV)

O repertório de FV presente nas cepas de mastite subclínica foi definido com base em aqueles anteriormente listados no genoma de *S. aureus* RF122 (Herron-Olson *et al.*, 2007), complementado por outros genes associados à virulência (Baba *et al.*, 2008; Ono *et al.*, 2008; Collery *et al.*, 2009; Holtfreter *et al.*, 2010; McCarthy & Lindsay, 2013; Peton *et al.*, 2014; Hisatsune *et al.*, 2017; Langley *et al.*, 2017) e o banco de dados VF (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>) (Tabela S1). As sequências FASTA das proteínas foram utilizadas em uma pesquisa BLAST de proteína (Altschul *et al.*, 1990) contra os genomas N305, RF122, Sau170, Sau302, Sau1269 e Sau1364. A proteína foi considerada presente (+) no genoma se a correspondência apresentasse uma cobertura $\geq 65\%$, e-value $\leq 10^{-10}$ e identidade de sequência $\geq 30\%$. Também foi feita curadoria manual e comparação com a literatura para verificar se a ausência ou presença de proteínas nos genomas era autêntica ou decorrente dos limiares aplicados na busca do BLAST. Além disso, a análise com o software Bowtie2 também foi aplicada para validar a presença ou ausência de genes, usando leituras de alta qualidade e genes previamente montados, a fim de evitar resultados falsos negativos causados por artefatos de montagem, como genes localizados em quebras de contigs ou

quebras em regiões repetitivas, que poderiam dificultar o processo de identificação por meio alinhamento do BLAST.

A análise de SNPs foi realizada usando CLC Genomics Workbench versão 8.5.4 (Qiagen) mapeando as leituras das cepas de *S. aureus* sequenciadas 170, 302, 1269, e 1364 para o genoma da referência de estirpes de *S. aureus* RF122 (GenBank NC_007622) e *S. aureus* N305 (AKYW01.1). Apesar de seu genoma haplóide, as populações bacterianas podem apresentar heteroziguidade ao longo das gerações das cepas. No entanto, na análise dos SNPs, buscamos identificar apenas os polimorfismos que foram fixados no genoma analisado em comparação com os genomas de referência, e que poderiam possivelmente estar associados à manifestação de mastite. Na análise de SNPs, as leituras foram inicialmente selecionadas de acordo com a qualidade (pontuação Q20) e com eliminação de nucleotídeos ambíguos e, em seguida, filtradas por comprimento (somente sequências maiores que 50 nt). Em seguida, as leituras selecionadas de cada cepa foram mapeadas no genoma de referência usando um alinhamento global (custo por incompatibilidade, 2; custo de inserção, 3; custo de exclusão, 3; fração de comprimento, 1,0; fração de similaridade, 0,90). Os SNPs foram previstos usando a ferramenta Basic Variant Detection, considerando as configurações de um genoma monoplóide e filtrando os loci polimórficos sequenciados com uma cobertura mínima de 20X (ploidia, 1; cobertura mínima, 20; frequência mínima, 100; qualidade mínima, 20). Para garantir que todas as leituras fossem correspondentes ao mesmo nucleotídeo, o "parâmetro de frequência mínima" [apenas as variantes que estão presentes pelo menos na frequência especificada (calculada como 'contagem' / 'cobertura')] do CLC Genomics Workbench foi ajustado para 100%.

Predição de proteínas superficiais e secretadas

As sequências de proteína de *S. aureus* 170, 302, 1269, 1364, N305 e RF122, foram usados como entrada para a identificação de proteínas superficiais e secretadas, usando os programas PSORTb v3.0 (Yu *et al.*, 2010), TMHMM 2.0c (Krogh *et al.*, 2001), Phobius 1.01 (Kall *et al.*, 2004), LipoP 1.0a (Juncker *et al.*, 2003) e SignalP 4.1 (Petersen *et al.*, 2011). Todos os programas foram usados com parâmetros padrão, e PSORTb e SignalP também foram definidos para bactérias Gram-positivas. Os arquivos de saída desses softwares foram combinados e as sequências de proteínas que passaram por todos os filtros foram escolhidas.

As sequências selecionadas foram alinhadas com Clustal -Omega 1.2.3 (Sievers *et al.*, 2011), e então usadas para criar uma matriz de distância na qual as distâncias foram expressas como o número de substituições por 100 aminoácidos (Swofford *et al.*, 1996). As distâncias da matriz foram usadas para construir um gráfico espalhado de escalonamento multidimensional (MDS), usando o RStudio Versão 1.0.136 e o pacote bios2mds (de *BIOlogical Sequences to MultiDimensional Scaling*) (Pele *et al.*, 2012). As proteínas de *S. aureus* 170, 302, 1269 e 1364 (mastite subclínica), foram coloridas de azul, enquanto que as de RF122 e N305 (mastite clínica) foram coloridas de vermelho. Para identificar as diferenças entre as estirpes que causam infecções clínicas ou subclínicas, a anotação das 5111 proteínas foi recuperada através de uma análise BLAST utilizando BLASTp (e-valor 10^{-10}) contra a base de dados de proteínas de *S. aureus* RF122. Em seguida, as sequências de aminoácidos de fatores de virulência selecionados foram utilizadas em um alinhamento de sequência múltipla pelo algoritmo Muscle (Edgar *et al.*, 2004). Uma matriz de identidade de pares de nucleotídeos foi gerada usando Sequence Demarcation Tool versão 1.2 (SDT v1.2) versão Linux (Muhire *et al.*, 2014) e a matriz de plot foi obtida usando pacotes ggplot2 no software R (<https://cran.r-project.org/>).

Tabela 1. *Primers* usados para validar os resultados obtidos *in silico*.

<i>Primer</i>	Sequência (5'-3')	Alvo	Origem do isolado	Amplicon esperado	Condições de amplificação ^{b,c}	Fonte
c13316F/ c13316R	F-ACGCAAAACCCTTTACTAGT; R-GCAACAACACTAGTAGGAGTGA	Proteína transportadora (c13316)	Mastite subclínica	548 bp	Anelamento: 55°C por 45s; Extensão: 72°C por 45 s	Este estudo
LipoP-F-CS/ LipoP-R-C	F-ACGCAAAACCCTTTACTAGT; R-TGCCTTCATCATTAATTGGACCAATC	Lipoproteína (c13700)	Mastite clínica	331 bp	Anelamento: 55°C por 45s; Extensão: 72°C por 45 s	Este estudo
LipoP-F-CS/ LipoP-R-CS	F- CGCAAAACCCTTTACTAGT; R-GGTAAAYTCAATGTCTTATRCC	Lipoproteína (c13700)	Mastite subclínica e clínica	582 bp	Anelamento: 55°C por 45s; Extensão: 72°C por 1min	Este estudo
au-F3/ au-nucR	F-GYTTTGCGAAAACGTTAGAYATGTA; R-GGTAAAYTCAATGTCTTATRCC	Termonuclease	<i>S. aureus</i>	359 bp	^c	Sasaki <i>et al</i> (2010)

^aTipo de manifestação apresentada pelo animal do qual a bactéria foi isolada.

^bPara todos os pares de *primers* exceto auR-F3 e auR-nucR: desnaturação inicial: 95,0 ° C por 5 min; 35 ciclos de desnaturação a 95,0 ° C por 45 s, reconhecimento e extensão conforme descrito na tabela; extensão final a 72,0 ° C por 10 min.

^c Condições descritas por Sasaki et al (2010)

As sequências presentes no *cluster* c13700, exclusivas dos genomas de cepas clínicas de acordo com OrthoMCL, também foram identificadas no gráfico MDS. Uma pesquisa BLASTp foi realizada contra o conjunto de dados MDS para encontrar a melhor correspondência para as sequências c13700 nas cepas que causam mastite subclínica. Em seguida, as CDS de seis cepas foram alinhadas, e *primers* complementares às regiões de alta variabilidade entre as sequências foram desenhados e posteriormente utilizados nas reações de PCR. A Fig S1 mostra um fluxograma das análises feitas para identificar e validar o c13700.

Reação em cadeia da polimerase

A extração de DNA de isolados de campo de *S. aureus* foi realizada com o kit PureLink Genomic DNA (Invitrogen), com adição de lisozima (20 µg.ml⁻¹) (Ultrapure Lysozyme, J18645, Affymetrix / USB) na etapa inicial. As sequências de *primer*, tamanhos de

amplicon e condições de amplificação estão resumidos na Tabela 1 . Os *primers* que amplificam o gene da nuclease (Sasaki *et al.*, 2010) foram usados para confirmar a identificação dos isolados de *S. aureus*. As misturas de reação consistiram em 50 ng de DNA total, 1 U de DNA polimerase Taq Cellco Biotec, 0,2 μ M de cada primer, 0,2 mM de mistura desoxirribonucleotídeos trifosfatos, tampão de reação 1X contendo 3,0 mM de $MgCl_2$ e Milli-Q água para um volume final de 25 μ L. extra foi excluído Nas reações de PCR que continham os *primers* LipoP-F-CS/LipoP-RC foram utilizados 2 mM $MgCl_2$. Os amplicons foram analisados por eletroforese em 1X Tris-acetato-EDTA em gel de agarose 1,0% e as imagens foram visualizadas sob luz ultravioleta após coloração com 2 mg.ml⁻¹ de brometo de etídio.

RESULTADOS

Classificação funcional e análise genômica comparativa

A análise BUSCO confirmou a integridade das montagens dos genomas com todas as cepas apresentando mais de 96% de conservação de ortólogos de cópia única para a ordem Bacillales. Aproximadamente 77% das proteínas deduzidas dos genomas das quatro cepas subclínicas sequenciadas foram classificadas em famílias COG, e uma distribuição semelhante da quantidade de proteínas dentro das categorias foi observada. Em média, 10% das proteínas dos genomas sequenciados tinham funções desconhecidas. Dentre as categorias mais representativas, identificamos proteínas relacionadas a aminoácidos e derivados, tradução e metabolismo de carboidratos. A anotação funcional das leituras também foi feita por meio do Banco de Dados de Subsistemas SEED (Fig. 1) e 55% das sequências codificadoras puderam ser categorizadas, das quais 5% foram classificadas como hipotéticas. Sau170, Sau302 e Sau1364 apresentaram 68 CDS atribuídas ao subsistema de virulência, doença e defesa, enquanto Sau1269 apresentou 76. Em Sau1364, somente uma sequência foi caracterizada como pertencente à categoria das fagos, profagos, elementos transponíveis e plasmídeos, enquanto que para os três demais genomas, esse número foi igual ou maior que 19. Algumas categorias foram mais frequentemente representadas em *S. aureus* RF122 em comparação com as outras cepas, como fagos, profagos, elementos transponíveis, plasmídeos e de regulação e sinalização celular.

Análise genômica de diferenças de virulência

A Tabela S1 mostra a prevalência dos genes associados à virulência nos genomas analisados, de acordo com os parâmetros do BLAST usados neste estudo. Um total de 146 genes que codifica para FV foi encontrado, incluindo toxinas, exoenzimas, proteínas de superfície ancoradas na parede celular e de adesão, proteínas relacionadas à evasão do sistema imune do hospedeiro, produção de biofilme, proteínas regulatórias e proteínas de funções diversas. Os genes que codificam toxinas foram distribuídos de forma diferente entre os genomas. Um total de 82 FV foi identificado em todos os seis genomas, enquanto três estavam ausentes em todos eles: proteína inibidora da quimiotaxia (*chp*), adesina de colágeno (*cna*) e estafiloquinase (*sak*). O gene da toxina esfoliativa A (*eta*), conhecido por causar a síndrome da pele escaldada estafilocócica, e o gene Repressor SaPI transcricional (*stl*), que controla a retenção das ilhas de patogenicidade de *S. aureus* (SaPIs) no cromossomo hospedeiro, foram encontrados apenas nos genomas de cepas associadas à mastite clínica.

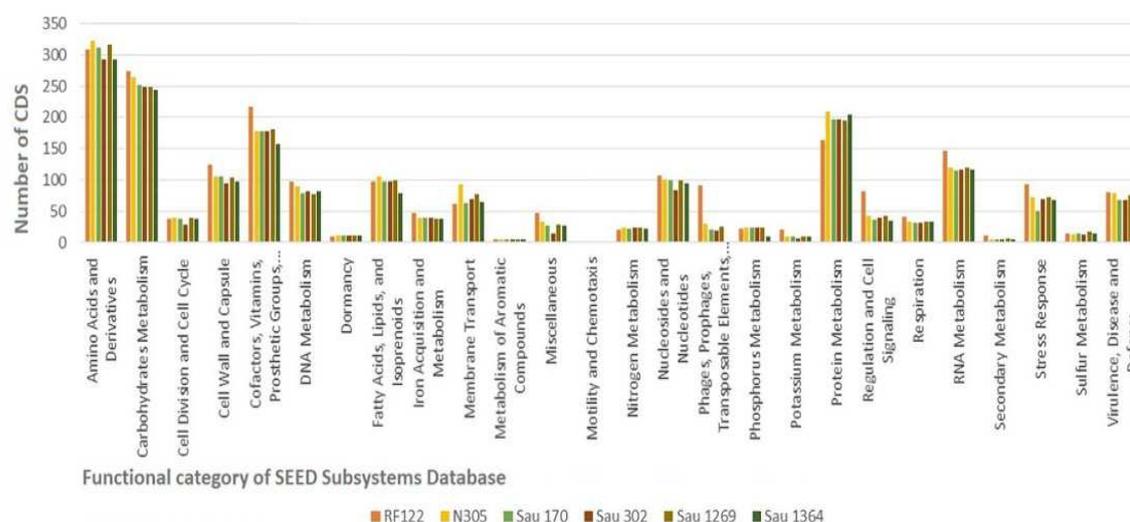
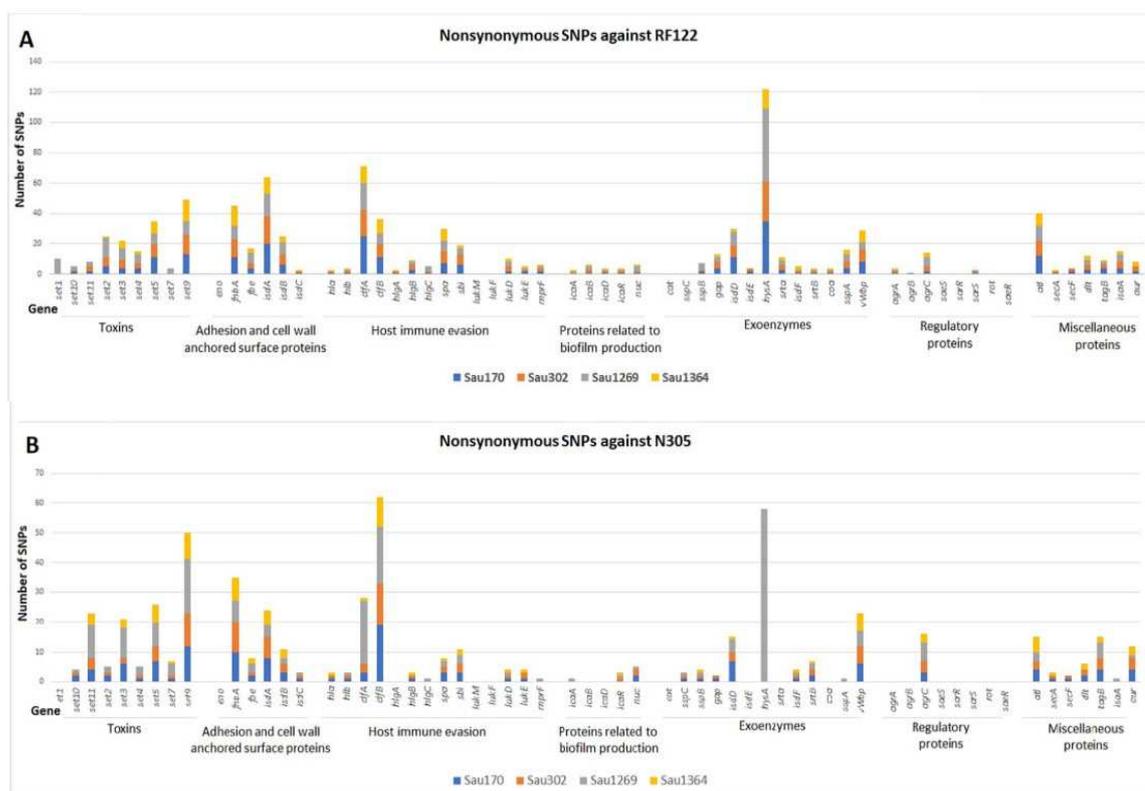


Fig 1. Classificação funcional de CDS de genomas sequenciados de *Staphylococcus aureus* de origem bovina, realizada usando o banco de dados SEED. O gráfico representa uma média das distribuições de CDS para os genomas das cepas *S. aureus* 170, 302, 1269 e 1364, isoladas de animais que sofrem de mastite subclínica, e das cepas *S. aureus* N305 e *S. aureus* RF122, isoladas de casos de mastite clínica.



todas as cepas, exceto N305. Entre as cepas que causam infecção subclínica, Sau1269 apresentou o maior número de genes associados à virulência (123), seguido por Sau170 (105), Sau1364 (103) e Sau302 (104) (Tabela S1). A cepa Sau1269 também apresentou mais genes relacionados a toxinas (29/37) em relação às cepas Sau170 (15/37), Sau302 (16/37) e Sau1364 (14/37). Dezesete proteínas regulatórias foram encontradas em Sau1269, que também apresentou 23 dos 28 genes que codificam proteínas envolvidas na evasão imune do hospedeiro. Sau170 foi a cepa com o maior número de genes que codificam exoenzimas (13/15), proteínas de adesão e proteínas de superfície ancoradas na parede celular (20/25).

Todos os genes que codificam FV comuns aos dois genomas clínicos e aos seis genomas subclínicos foram usados para análise de SNPs (Fig. 2 , Fig. S2). Os SNPs encontrados nas CDSs dos genomas das cepas associadas à infecção subclínica foram mapeados nos genomas de referência de RF122 e N305. Nesses genes, um total de 32 a 36% dos SNPs foram não sinônimos, enquanto a maioria deles foram sinônimos. A maioria das mutações não sinônimas ocorreu entre aminoácidos da mesma classe, conservando as propriedades físico-químicas dos resíduos. Embora o número total de SNPs tenha sido diferente para cada cepa de *S. aureus*, houve uma distribuição semelhante dos tipos de SNPs entre elas.

Em geral, mais SNPs foram encontrados quando os genomas das cepas subclínicas foram mapeados em RF122. Apenas os genes *clfB* e *set11* exibiram mais SNPs quando mapeados em N305 do que quando mapeados em RF122. Quando o número de SNPs para ambos RF122 e N305 foi somado para cada gene, o maior número de SNPs não sinônimos (180, 99, 98, e 98) foram observados no gene *hysA* , que codifica para a hialuronato liase, no gene da enterotoxina *set9* , e nos genes de adesina *clfA* e *clfB* (Fig. 2). Similarmente, os maiores números de SNPs totais (329, 281, 221 e 217) foram observados em *hysA* , *clfB* , *isdA* (que codifica a proteína A determinante de superfície regulada por ferro) e *clfA* (Fig S2). Não foram encontrados SNPs nos genes que codificam os precursores das subunidades M e F da leucocidina, ambos relacionados à evasão imune do hospedeiro, e no gene do regulador de resposta SaeR.

Predição de proteínas de superfície presentes nos genomas das cepas bovina *S. aureus* e validação da análise de escalonamento multidimensional (MDS)

Os programas PSORTb, TMHMM, Phobius, LipoP e SignalP fizeram a predição de um número diferente de proteínas transmembrana, de superfície e secretadas para cada um dos seis genomas analisados. Após a combinação de resultados e a eliminação de proteínas redundantes, um total de 922 proteínas foi previsto para N305, 971 para RF122, 947 para Sau170, 962 para Sau302, 984 para Sau1269 e 954 para Sau1364 (Tabela 2). TMHMM e Phobius fizeram a predição do maior número de proteínas, em comparação com os outros programas. A maioria das sequências de proteínas mostrou-se altamente conservada entre os genomas.

Tabela 2. Resultados (outputs) dos programas utilizados para a predição de proteínas de superfície e secretadas das cepas de *Staphylococcus aureus* estudadas.

Cepa	LipoP	Phobius	PSORTb	SignalP	TMHMM	Total ¹	Total ¹
<i>S. aureus</i> RF122	338	653	125	157	698	1971	971
<i>S. aureus</i> N305	321	666	160	151	689	1987	922
<i>S. aureus</i> 170	325	624	137	146	671	1903	947
<i>S. aureus</i> 302	323	637	145	136	673	1914	962
<i>S. aureus</i> 1269	356	654	130	161	688	1989	984
<i>S. aureus</i> 1364	317	633	146	139	670	1905	954

1 - Número total de proteínas secretadas previstas sem redundância

Após o alinhamento das sequências FASTA das proteínas e criação de uma matriz de distância, um gráfico MDS foi construído (Fig. 3). Os resultados não mostraram separação entre as cepas. A fim de encontrar possíveis diferenças, as proteínas analisadas no MDS foram anotadas (Tabela S2). Sequências de aminoácidos de algumas proteínas envolvidas na adesão e aquisição de ferro e algumas proteínas secretadas foram selecionadas e usadas para gerar uma matriz de identidade (Fig. 4, Tabela S3). No geral, as proteínas ortólogas apresentaram alta identidade entre as cepas estudadas. Com base nos valores de identidade de sequência, não houve separação entre grupos de cepas associadas à mastite subclínica ou clínica. Em Sau170, 302 e 1364, seis das dez proteínas ortólogas tinham 100% de identidade. Para FnbpA, a identidade de sequência variou de 82,2% a 99,8%. Valores de identidade entre

42,3% - 50% foram observados entre ClfB e ClfA de Sau RF122, N305 e 1269. Ssl5 apresentou cerca de 40% de identidade com Ssl2 independentemente da cepa analisada.

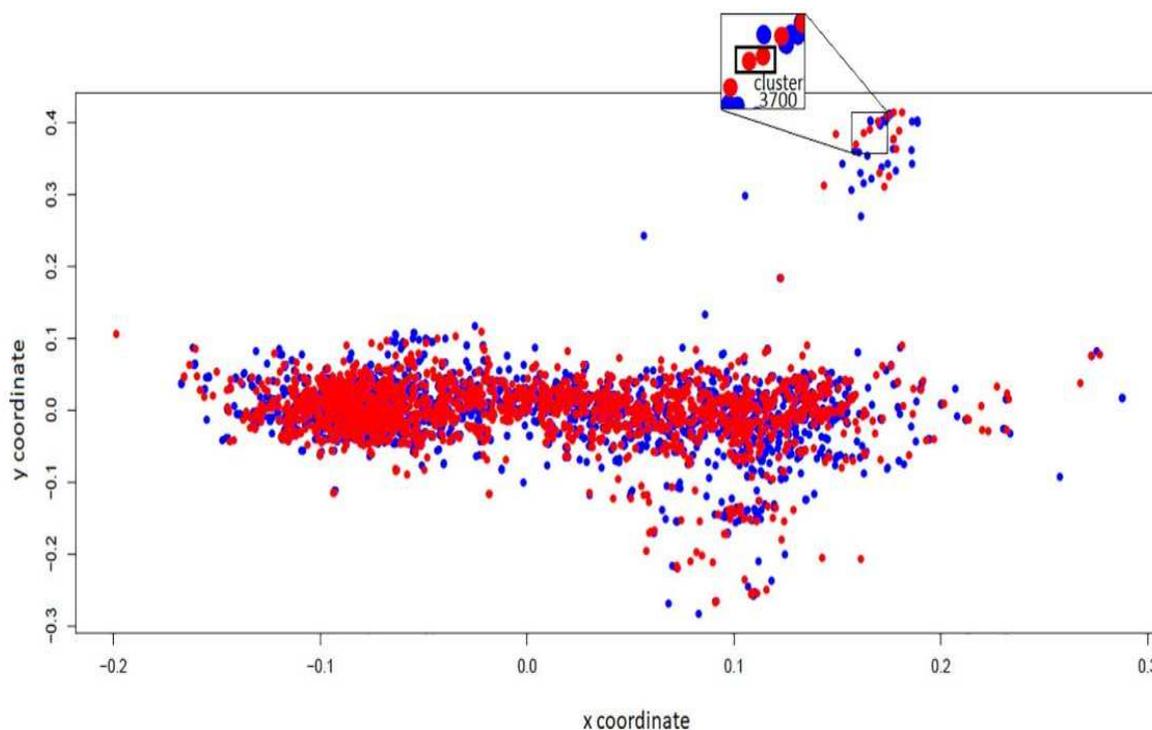


Fig 3. Gráfico MDS de proteínas transmembrana, de superfície e secretadas, geradas a partir de proteínas de cepas de *Staphylococcus aureus* de origem bovina. Os genomas de *S. aureus* 170, 302, 1269 e 1364 estão em azul e os genomas de *S. aureus* N305 e RF122 estão em vermelho. Pontos próximos representam sequências de proteínas mais idênticas. No canto superior esquerdo e no canto superior direito, os *clusters* cl3009 e cl3700, respectivamente, são ampliados. Pontos azuis sobrepostos podem ser vistos, correspondendo a uma proteína altamente conservada nos genomas das cepas isoladas de vacas com mastite subclínica.

Identificação de proteínas ortólogas

A análise de proteínas preditas pelo OrthoMCL, um algoritmo que permite a identificação de grupos ortólogos, recuperou vários agrupamentos (*clusters*) que poderiam ser exclusivos nos genomas das cepas causadoras de mastite subclínica (Tabela S4). No entanto, a curadoria manual por meio do alinhamento de leituras curtas de alta qualidade com phred superior a 30 para os genomas RF122 e N305, usando programa Bowtie 2, mostrou que essa exclusividade só era real para nove *clusters*. De fato, a falta de correspondência de

sequências entre as cepas era causada principalmente por artefatos de montagens genômicas, uma vez que as leituras alinhavam e abrangiam um gene correspondente nos genomas das cepas causadoras de mastite clínica e, portanto, não podiam ser consideradas exclusivas. O *cluster* (cl3316) tinha sequências homólogas a membros da superfamília de facilitadores principais (MFS), o maior grupo de transportadores de membrana ativos secundários. Considerando que os MFS são proteínas de superfície, as sequências de cl3316 foram usadas em uma pesquisa do BLAST para encontrar as sequências correspondentes em RF122 e N305 no conjunto de dados MDS. Nenhuma correspondência foi encontrada, apesar da presença de outras sequências de MFS nas cepas clínicas (Tabela S2). Portanto, para validar as diferenças encontradas *in silico*, *primers* foram desenhados e usados na PCR. OrthMCL também revelou 60 *clusters* exclusivamente presentes nos genomas das cepas clínicas (Tabela S4). Novamente, a curadoria manual mostrou que a maioria deles eram artefatos de montagem. Entre os quatro candidatos restantes, havia um *cluster* (cl3700) composto por duas sequências identificadas como uma lipoproteína do tipo tandem. Como as lipoproteínas são proteínas de superfície, usamos o conjunto de dados MDS para encontrar sequências presentes em Sau170, 302, 1269 e 1364 com semelhança a cl3700. A pesquisa recuperou apenas uma correspondência em cada cepa. O alinhamento de CDS revelou uma região conservada encontrada nas sequências das cepas RF122 e N305 que não estava presente nas outras cepas (Fig S3) e que foi usada para validar as diferenças entre elas por PCR.

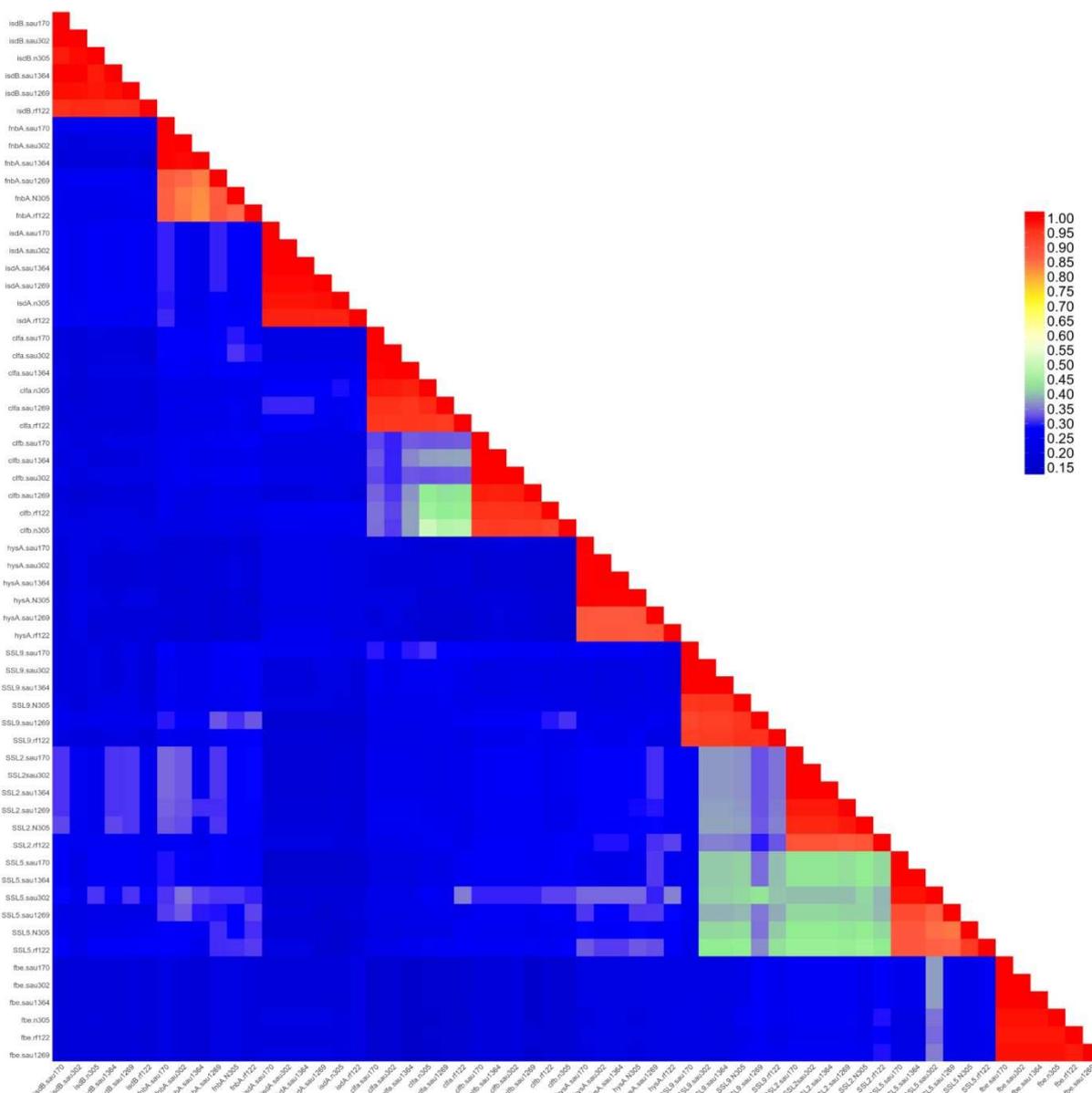


Fig 4. Matriz de identidade pareada gerada pelo alinhamento de fatores de virulência selecionados de cepas de *Staphylococcus aureus* de origem bovina. Cada célula colorida representa a porcentagem de identidade entre duas sequências de aminoácidos que se cruzam na célula, variando de vermelho (identidade mais baixa) a azul (identidade mais alta)

Reação em cadeia da polimerase

Para investigar se os resultados encontrados na comparação de várias amostras seriam capazes de discriminar entre isolados de campo causando mastite subclínica e clínica, realizamos PCRs com diferentes conjuntos de primer (Tabela 1). O DNA total das quatro

cepas que tiveram seu genoma sequenciado também foi testado. Um amplicon do tamanho esperado foi visto quando o DNA total foi amplificado com *primers* para o gene *nuc*, confirmando os isolados como *S. aureus* (Fig S4). A validação experimental dos resultados derivados da análise *in silico* de cl3316 mostrou um amplicon de 548 bp em 22/24 amostras (Fig S5). Portanto, os resultados da PCR não confirmaram os achados do OrthoMCL.

Dois conjuntos de *primers* (Tabela 1) foram usados para amplificar diferencialmente a lipoproteína (*cluster3700*): LipoP-F-CS / Lipo-R-CS, com base em uma região conservada no gene da lipoproteína dos seis genomas sequenciados, e LipoP-F-CS / LipoP-RC, baseado em uma região conservada apenas nos genomas das cepas clínicas RF122 e N305 (Figura S3). Um fragmento de 582pb, produto do conjunto de primer LipoP-F-CS / LipoP-R-CS, foi amplificado em 22/24 isolados de campo, independentemente do tipo de manifestação (Fig. S6A). Por outro lado, um fragmento de 331pb, produto do conjunto de *primers* LipoP-F-CS / LipoP-RC, foi detectado apenas nos isolados originados de animais com manifestações clínicas de mastite, enquanto o DNA de bactérias isoladas de mastite subclínica não foi amplificado (Fig. S6B). A Tabela 3 resume os resultados de PCR para os conjuntos de primários para cada isolado testado.

Tabela 3. Resumo dos resultados de PCR usando os *primers* descritos na Tabela 1.

Isolado de <i>S. aureus</i>	Tipo de manifestação	nucAur	cl3316F/R	LipoP-F-CS/ LipoP-R-C	LipoP-F-CS/ LipoP-R-CS
170	Subclínica	+	+	-	+
302	Subclínica	+	+	-	+
1269	Subclínica	+	+	-	+
1364	Subclínica	+	+	-	+
308	Subclínica	+	+	-	+
340	Subclínica	+	+	-	-
403	Subclínica	+	+	-	+
1001	Subclínica	+	+	-	+
1311	Subclínica	+	+	-	+
1315	Subclínica	+	+	-	+
1323	Subclínica	+	+	-	+
76	Clínica	+	+	-	+
216	Clínica	+	-	+	+
1439	Clínica	+	+	+	+
3909	Clínica	+	+	-	+
2555	Clínica	+	+	+	+
5T18-19	Clínica	+	+	+	-
9T18-16	Clínica	+	+	+	+
10T18-59	Clínica	+	+	+	+
10T18-68	Clínica	+	+	+	+
14T18-13	Clínica	+	+	+	+
22T18-52	Clínica	+	+	+	+
22T17-54	Clínica	+	+	+	-
ATCC 29213*	*Humana	+	-	+	+

* ATCC 29213 é uma cepa isolada de uma infecção humana e foi usada como controle para o primer nucAur, específico para *S. aureus*.

DISCUSSÃO

Previamente, este grupo de pesquisa sequenciou os genomas de *S. aureus* isolados (Herron-Olson *et al.*, 2007) de cepas que causam mastite subclínica (Silva *et al.*, 2016). Neste estudo, uma análise comparativa foi realizada com os genomas de *S. aureus* RF122 e N305, duas cepas bem caracterizadas isoladas de vacas com mastite clínica, a fim de encontrar fatores bacterianos que poderiam estar ligados à manifestação da doença.

Esta é a primeira análise genômica de isolados de *S. aureus* pertencentes ao ST126, um tipo prevalente em rebanhos brasileiros (Rabello *et al.*, 2007), que tem sido apontado como importante para nortear estudos de métodos para controlar infecções de *S. aureus* por especificidades geográfica e de hospedeiro (Smith *et al.*, 2005). Mais de 70% dos genes foram agrupados em categorias COG específicas, de modo semelhante ao descrito para o *S. aureus* RF122 (Herron-Olson *et al.*, 2007) e N305 (Peton *et al.*, 2014). Além disso, os resultados do BUSCO mostraram extensa conservação de ortólogos de cópia única nos Bacillales, confirmando a integridade dos genomas montados. Independentemente da base de dados utilizada (COG ou SEED), a categorização dos genes e sua distribuição nos subsistemas foram semelhantes entre os genomas sequenciados. No entanto, *S. aureus* RF122 tinha mais sequências relacionadas à resposta ao estresse, regulação e sinalização celular, metabolismo do potássio, cofatores e vitaminas, plasmídeos, elementos transponíveis e profagos, o que poderia conferir a capacidade da bactéria de causar mastite severa. Os fagos, profagos, elementos transponíveis e subsistema de plasmídeos de todas as cepas subclínicas, exceto Sau1364, tinham um número semelhante de genes. Isso pode ser explicado pela variabilidade genética entre as cepas e diferenças nas regiões genômicas cobertas pelos contigs montados. Em *S. aureus* de origem humana, grande variabilidade entre cepas tem sido relatada nos elementos genômicos móveis; isso também pode ser verdadeiro para cepas de origem bovina. Por exemplo, quatro profagos integrados foram identificados em *S. aureus* Newman e apenas um foi identificado em *S. aureus* COL.

O repertório de FV anteriormente descrito para as cepas de *S. aureus* de origem bovina foi expandido (Haveri *et al.*, 2007; Peton *et al.*, 2014), e outros determinantes relatados para cepas humanas foram analisados (Holtfreter *et al.*, 2010; McCarthy & Lindsay 2013; Ono *et al.*, 2008 ; Hisatsune *et al.*, 2017; Collery e al., 2009; Langley *et al.*, 2017; Baba

et al., 2008). O conteúdo genômico foi bastante semelhante entre as cepas, o que dificultou associações entre a manifestação da mastite e FV. No entanto, algumas exceções puderam ser observadas. Os genes que codificam enterotoxinas estavam presentes principalmente em RF122 e Sau1269, como as enterotoxinas A, B, G, I, J, K, L, M, N e as proteínas enterotoxina-like U e V. As enterotoxinas são consideradas superantígenos devido a sua estimulação da proliferação de células T (Ortega *et al.*, 2010) e podem impactar a gravidade da doença em um modelo cunicular (Stach *et al.*, 2016). No entanto, Sau1269 foi isolado de um animal com diagnóstico de infecção subclínica, sugerindo que fatores do hospedeiro, além da presença de toxinas, afetam o resultado da mastite. Além disso, pode haver diferenças regulatórias entre RF122 e Sau1269, embora a expressão de genes de enterotoxinas não tenha sido investigada neste trabalho.

O gene da toxina esfoliativa A (*eta*) e o gene Repressor SaPI da transcrição (*stl*) foram encontrados apenas em RF122 e N305. Outros genes, como os que codificam para enterotoxina t (*set*), toxina da síndrome do choque tóxico 1 (*tst*) e homólogos da proteína SagB / D associada à estreptolisina S (*sagB* e *sagD*), foram exclusivos de RF122 e podem ter um papel no desenvolvimento grave da mastite causado por essa cepa. Capra *et al.* (2017) também sequenciaram os genomas de seis S . cepas de aureus (ST398 e ST8), que causam mastite subclínica, e que foram divididas em dois grupos (baixa e alta prevalência de rebanho (Capra *et al.*, 2017). Ao contrário de suas descobertas, o gene que codifica a proteína de ligação ao colágeno (*cna*) não foi encontrado nas cepas que causam mastite subclínica. Além disso, os genes que codificam a proteína do fator de aglutinação (*clfB*), a proteína de ligação à fibronectina (*fnbA*) e a leucotoxina D e E (*lukD* e *lukE*) estavam presentes em todas as cepas, incluindo N305 e RF122.

Um total de 933 e 565 SNPs sinônimos e não sinônimos foi encontrado quando os genes de virulência foram mapeados nos genomas RF122 e N305, respectivamente. A grande maioria foi SNPs sinônimos, conforme observado em isolados da mesma espécie (Maddamsetti *et al.*, 2015; Parkhill & Wren., 2011.) Dado que essas cepas pertencem a diferentes complexos clonais (CCs), a maioria das mutações não sinônimas foi provavelmente removida por meio de seleção purificadora. No entanto, mutações não sinônimas que provavelmente foram fixadas nos CCs são alvos importantes para discriminar cada complexo,

como mostrado recentemente para *Streptococcus* do Grupo B (Almeida *et al.*, 2017). Nesse patógeno, genes com papéis centrais durante o processo de infecção ou colonização têm uma assinatura mutacional significativa exclusivamente em cepas de CC 17 hipervirulenta, quando comparados a outros CCs associados a humanos.

No geral, houve mais SNPs quando os genes presentes nas cepas subclínicas foram comparados aos do RF122, especialmente os genes que codificam a evasão imune do hospedeiro (*spa*, *clfA*, *sbi*— 120 SNPs) e proteínas de superfície (*fnbA*, *isdA*— 109 SNPs). Por outro lado, o número de SNPs nesses genes foi de 47 e 59, respectivamente, quando a comparação foi feita com o N305. Proteínas de ligação à fibronectina, como FnbA e FnbB, são importantes para a adesão e invasão nas células da glândula mamária bovina (Sutra *et al.*, 1994; Loffler *et al.*, 2014). Variações genéticas em *fnbA* e *ClfA* prejudicam a detecção de *S. aureus* pelo teste de aglutinação do látex, provavelmente devido à menor ligação das adesinas às moléculas de fibrinogênio acopladas às partículas de látex (Stutz *et al.*, 2011). Uma vez que maior adesão está associada a maior invasão nas células epiteliais mamárias, as variações em genes associados podem levar a diferenças fenotípicas entre as cepas, o que pode impactar a progressão da doença. Trabalhos adicionais para testar o efeito de cada SNP nos aspectos de toxicidade e virulência devem ser realizados para confirmar essas proposições.

O diagnóstico de rotina de *S. aureus* bovino é baseado em cultura bacteriana. Trabalhos descrevem a aplicação de imunoenaios (Fabres-Klein *et al.*, 2014) e espectrometria de massa (Sogawa *et al.*, 2017) para melhorar e acelerar o diagnóstico. No entanto, outras questões devem ser abordadas, como a diferenciação entre cepas esporádicas e contagiosas (Ote *et al.*, 2011) e entre cepas associadas a resultados específicos de mastite. Até o momento, os estudos não conseguiram encontrar marcadores bacterianos robustos para mastite bovina com base na presença ou ausência de FV. Este trabalho mostrou uma alta similaridade de conteúdo gênico entre os genomas de seis linhagens bovinas, o que pode ajudar a explicar as dificuldades em associar fatores bacterianos à manifestação da doença; se isso é devido ao pequeno número de genomas que foram sequenciados até agora, ainda não há evidências.

Semelhanças substanciais no conjunto de proteínas de superfície e secretadas das linhagens bovinas também foram observadas. Embora a análise *in silico* tenha descrito os

membros do cl3316 como exclusivos das cepas associadas à mastite subclínica, os achados não foram validados na análise experimental. É possível que os *primers* projetados para amplificar cl3316 também fossem complementares a outras sequências de MFS presentes em RF122 e N305, uma vez que MFS compreende 74 famílias de proteínas envolvidas em mecanismos de efluxo de drogas (Stach *et al.*, 2016).

Este trabalho explorou a variação de sequência de genes e não simplesmente presença e ausência, como a encontrada na lipoproteína cl3700, que pode ajudar a determinar as diferentes manifestações da mastite. As lipoproteínas são ancoradas aos lipídios da membrana, com um papel importante na ativação imune por meio do receptor Toll-like 2, (Muller *et al.*, 2010) que culmina na ativação do NF- κ B e indução de citocinas pró-inflamatórias (Marklevitz *et al.*, 2016). A deleção da vSaa, contendo o *cluster* exclusivo de lipoproteínas (*LPL*) de *S. aureus* USA300 diminuiu significativamente a capacidade de invasão e a expressão de TNF- α e IL-6 em linhagens de células humanas (Nguyen *et al.*, 2015). Diferenças na composição de aminoácidos podem afetar o dobramento ou função, o que poderia causar menor ativação ou evadir o sistema imunológico do hospedeiro, interferindo nos sintomas clínicos apresentados pelas vacas com mastite. Portanto, a variação observada nas sequências da lipoproteína cl3700 pode influenciar a função da proteína e ainda garantir uma vantagem para a sobrevivência bacteriana no hospedeiro, que se manifesta como uma infecção subclínica e persistente. Embora a análise deva ser expandida para acomodar mais isolados de campo, os resultados preliminares mostram o potencial da lipoproteína cl3700 para diferenciar entre os dois grupos de isolados coletados de animais que sofrem de mastite clínica ou subclínica.

CONCLUSÕES

Este trabalho revelou uma alta similaridade de conteúdo gênico nos genomas de cepas que causam mastite clínica ou subclínica. Porém, uma lipoproteína (cl3700) demonstrou maior potencial para distinguir os dois grupos de bactérias, revelando que a variação de sequência entre *S. aureus* de origem bovina, e não apenas a presença / ausência de fatores de virulência, também é um aspecto importante a ser considerado ao comparar isolados de campo associados a diferentes manifestações de mastite. Os diversos SNPs detectados nos FV

podem conferir vantagens às cepas subclínicas permitindo o sucesso na evasão do sistema imunológico, sem desencadear respostas imunológicas bruscas, facilitando assim o estabelecimento de infecções crônicas e silenciosas.

REFERÊNCIAS

- Almeida A.; Rosinski-Chupin I.; Plainvert C.; Douarre P.E.; Borrego M.J.; Poyart C. Evolution of group B Streptococcus hypervirulent clonal complex 17 unveils new pathoadaptive mutations. **MSystems**, 2(5). pii: e00074–17. 2017.
- Altschul S.F.; Gish W.; Miller W.; Myers E.W.; Lipman D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, 215(3):403–10. 1990.
- Argaw A. Review on epidemiology of clinical and subclinical mastitis on dairy cows. **Food Science and Quality Management**, 52:56–65. 2016.
- Baba T.; Schneewind O.; Takeuchi F.; Hiramatsu K. Genome sequence of *Staphylococcus aureus* strain Newman and comparative analysis of staphylococcal genomes: polymorphism and evolution of two major pathogenicity islands. **Journal of Bacteriology**, 190(1):300–10. 2008.
- Capra E.; Cremonesi P.; Pietrelli A.; Puccio S.; Luini M.; Stella A.; Castiglioni, B. Genomic and transcriptomic comparison between *Staphylococcus aureus* strains associated with high and low within herd prevalence of intra-mammary infection. **BMC Microbiology**, 19;17(1):21. 2017.
- Collery MM.; Smyth DS.; Tumilty JJ.; Twohig JM.; Smyth CJ. Associations between enterotoxin gene cluster types egc1, egc2 and egc3, agr types, enterotoxin and enterotoxin-like gene profiles, and molecular typing characteristics of human nasal carriage and animal isolates of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medical Microbiology**, 58(Pt 1):13–25. 2009.
- Constable PD.; Hinchcliff KW.; Done SH.; Grünberg W. Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. 11th ed. **Saunders Ltd**. 2016.
- Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, 32(5):1792–7. 2004.
- Fabres-Klein MH.; Aguilar AP.; Silva MP.; Silva DM.; Ribon AO. Moving towards the immunodiagnosis of staphylococcal intramammary infections. **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases**, 33(12):2095–104. 2014.
- Haveri M.; Roslöf A.; Rantala L.; Pyörälä S. Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. **Journal of Applied Microbiology**, 103(4):993–1000. 2007.
- Herron-Olson L.; Fitzgerald JR.; Musser JM.; Kapur V. Molecular correlates of host specialization in *Staphylococcus aureus*. **PLoS One**, 2(10):e1120. 2007.
- Hisatsune J.; Hagiya H.; Shiota S.; Sugai M. Complete genome sequence of systemically disseminated sequence type 8 staphylococcal cassette chromosome mec type IVI community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Genome Announcements**, 5(35):e00852–17. 2017.
- Holtfreter S.; Kolata J.; Broker BM 20. Towards the immune proteome of *Staphylococcus aureus*—the anti-*S. aureus* antibody response. **International Journal of Medical**

- Microbiology**, 300(2–3):176–92. 2010.
- Hyatt D.; Chen GL.; LoCascio PF.; Land ML.; Larimer FW.; Hauser LJ. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. **BMC Bioinformatics**, 11(1):119. 2010.
- Juncker AS.; Willenbrock H.; Von Heijne G.; Brunak S.; Nielsen H.; Krogh A. Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. **Protein Sciences**, 12(8):1652–62. 2003.
- Käll L.; Krogh A.; Sonnhammer ELL. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. **Journal of Molecular Biology**, 14;338(5):1027–36. 2004.
- Krogh A.; Larsson B.; Von Heijne G.; Sonnhammer EL. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. **Journal of Molecular Biology**, 9;305(3):567–80. 2001.
- Langley RJ.; Ting YT.; Clow F.; Young PG.; Radcliff FJ.; Choi JM.; Sequeira R.P.; Holtfreter S.; Baker H.; Fraser J.D. Staphylococcal enterotoxin-like X (SEIX) is a unique superantigen with functional features of two major families of staphylococcal virulence factors. **PLoS Pathogens**, 13(9):e1006549. 2017.
- Langmead B.; Salzberg S. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, 9(4):357–9. 2012.
- Li L.; Stoekert CJ.; Roos DS. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. **Genome Research**, 13(9):2178–89. 2003.
- Löffler B.; Tuchscher L.; Niemann S.; Peters G. *Staphylococcus aureus* persistence in non-professional phagocytes. **International Journal of Medical Microbiology**, 304(2):170–6. 2014.
- Maddamsetti R.; Hatcher PJ.; Cruveiller S.; Médigue C.; Barrick JE.; Lenski RE. Synonymous genetic variation in natural isolates of *Escherichia coli* does not predict where synonymous substitutions occur in a long-term experiment. **Molecular Biology Evolution**, 32(11):2897–2904. 2015.
- Marklevitz J.; Harris LK. Prediction driven functional annotation of hypothetical proteins in the major facilitator superfamily of *S. aureus* NCTC 8325. **Bioinformatics**, 26;12(4):254–262. 2016.
- McCarthy AJ.; Lindsay JA. *Staphylococcus aureus* innate immune evasion is lineage-specific: a bioinformatics study. **Infection, Genetics and Evolution**, 19:7–14. 2013.
- Mdegela RH.; Ryoba R.; Karimuribo ED.; Phiri EJ.; Løken T.; Reksen O.; Mtengeti E.; Urio NA. Prevalence of clinical and subclinical mastitis and quality of milk on smallholder dairy farms in Tanzania. **Journal of the South African Veterinary Association**, 80(3):163–8. 2009.
- Moges N.; Hailemariam T.; Fentahun T.; Chanie M.; Melaku A. Bovine mastitis and associated risk factors in small holder lactating dairy farms in Hawassa, Southern Ethiopia. **Global Veterinary**, 9(4):441–6. 2012.
- Muhire BM.; Varsani A.; Martin DP. SDT: a virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. **PLoS One**, 9(9):e108277. 2014.
- Müller P.; Müller-Anstett M.; Wagener J.; Gao Q.; Kaesler S.; Schaller M.; Biedermann T.; Götz F. The *Staphylococcus aureus* lipoprotein SitC colocalizes with Toll-like receptor 2 TLR2 in murine keratinocytes and elicits intracellular TLR2 accumulation. **Infection and Immunity**, 78(10):4243–50. 2010.

- Nguyen MT.; Götz F. Lipoproteins of Gram-positive bacteria: key players in the immune response and virulence. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, 10;80(3):891–903. 2016.
- Nguyen MT.; Kraft B.; Yu W.; Demicrioglu DD.; Hertlein T.; Burian M, Schmalzer M.; Boller K.; Bekeredjian-Ding I.; Ohlsen K.; Schitteck B.; Götz, F. The vSaa specific lipoprotein like *cluster (lpl)* of *S. aureus* USA300 contributes to immune stimulation and invasion in human cells. **PLoS Pathogens**, 17;11(6):e1004984. 2015.
- Ono HK.; Omoe K.; Imanishi KI.; Iwakabe Y.; Hu DL.; Kato H.; Naoyuki S.; Akio N.; Takehiko U.; Kunihiro S. Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins, types S and T. **Infection and Immunology**, 1;76(11):4999–5005. 2008.
- Ortega E.; Abriouel H.; Lucas R.; Gálvez A. Multiple roles of *Staphylococcus aureus* enterotoxins: pathogenicity, superantigenic activity, and correlation to antibiotic resistance. **Toxins (Basel)**, 2(8):2117–31. 2010.
- Ote I.; Taminiou B.; Duprez JN.; Dizier I.; Mainil JG. Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, 153(3–4):285–92. 2011.
- Overbeek R.; Begley T.; Butler RM.; Choudhuri JV.; Chuang HY.; Cohoon M.; Crécy-Lagard V.; Narytza D.; Terry D.; Robert E.; Michael Fonstein. The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. **Nucleic Acids Research**, 7;33(17):5691–702. 2005.
- Parkhill J.; Wren BW. Bacterial epidemiology and biology—lessons from genome sequencing. **Genome Biology**, 12(10):230. 2011.
- Pelé J.; Bécu JM.; Abdi H.; Chabbert M. Bios2mds: an R package for comparing orthologous protein families by metric multidimensional scaling. **BMC Bioinformatics**, 15;13:133. 2012.
- Petersen TN.; Brunak S.; Von HG.; Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, 8(10):785–6. 2011.
- Peton V.; Bouchard DS.; Almeida S.; Rault L.; Falentin H.; Jardin J.; Gwénaél J., David H., François P., Schrenzel J; Azevedo V.; Le Loir Y. Fine-tuned characterization of *Staphylococcus aureus* Newbould 305, a strain associated with mild and chronic mastitis in bovines. **Veterinary Research**, 14;45:106. 2014.
- Piccinini R.; Tassi R.; Daprà V.; Pilla R.; Fenner J.; Carter B. Study of *Staphylococcus aureus* collected at slaughter from dairy cows with chronic mastitis. **Journal of Dairy Research**, 79(2):249–55. 2012.
- Pinzón-Sánchez C.; Ruegg PL. Risk factors associated with short-term post-treatment outcomes of clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, 94(7):3397–410. 2011.
- Rabello RF.; Moreira BM.; Lopes RM.; Teixeira LM.; Riley LW.; Castro AC. Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from cows with mastitis in Brazilian dairy herds. **Journal of Medical Microbiology**, 56(11):1505–11. 2007.
- Rainard P.; Foucras G.; Fitzgerald JR.; Watts JL.; Koop G.; Middleton JR. Knowledge gaps and research priorities in *Staphylococcus aureus* mastitis control. **Transboundary Emerging Diseases**, 65(Suppl 1):149–165. 2018.
- Sakwinska O.; Giddey M.; Moreillon M.; Morisset D.; Waldvogel A.; Moreillon P. *Staphylococcus aureus* host range and human-bovine host shift. **Applied Environmental Microbiology**, 77:5908–5915. 2011.

- Sasaki T.; Tsubakishita S.; Tanaka Y.; Sakusaben A.; Ohtsuka M.; Hirotsuki S.; Tetsuji K.; Tsuneko F.; Keiichi H. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci *Journal of Clinical Microbiology*, 48(3):765–9. 2010.
- Schmidt T.; Kock MM.; Ehlers MM. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis and close human contacts in south african dairy herds: genetic diversity and inter-species host transmission. **Frontiers Microbiology**, 6;8:511. 2017.
- Schukken YH.; Günther J.; Fitzpatrick J.; Fontaine MC.; Goetze L.; Holst O.; Watts J; Yancey R; Zerbe H; Gurjar A; Zadoks RN. Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 15;144(3–4):270–89. 2011.
- Siddiquee NU.; Tripura TK.; Islam MT.; Bhuiyan SA.; Rahman AK.; Bhuiyan AK. Prevalence of sub-clinical mastitis in high yielding crossbred cows using Draminski Mastitis Detector. **Journal of Veterinary Medicine**, 11(1):37–41. 2013.
- Sievers F.; Wilm A.; Dineen DG.; Gibson TJ.; Karplus K.; Li W. Fast scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular System Biology**, 7:539. 2011.
- Silva DM.; da Silva MP.; Vidigal PMP.; Barcelos RM.; Klein RC.; Aguilar AP.; Aguilar AP; Klein MHF; Oliveira GC; Ribon AOR. Draft genome sequences of *Staphylococcus aureus* strains isolated from subclinical bovine mastitis in Brazil. **Genome Announcements**, 4(1):e01594–15. 2016.
- Simão FA.; Waterhouse RM.; Ioannidis P.; Kriventseva EV.; Zdobnov EM. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. **Bioinformatics**, 31(19):3210–2. 2015.
- Smith EM.; Green LE.; Medley GF.; Bird HE.; Fox LK.; Schukken YH. Multilocus sequence typing of intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, 43(9):4737–43. 2005.
- Sogawa K.; Watanabe M.; IshigE T.; Segawa S.; Miyabe A.; Murata S.; Tomoko S.; Akihiro S.; Katsunori F.; Fumio N. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using MALDI-TOF mass spectrometry. **Biocontrol Science**, 22(3):163–9. 2017.
- Stach CS.; Vu BG.; Merriman JA.; Herrera A.; Cahill MP.; Schlievert PM.; *et al.* Novel tissue level effects of the *Staphylococcus aureus* enterotoxin gene cluster are essential for infective endocarditis. **PLoS One**, 11(4):e0154762. 2016.
- Stutz K.; Stephan R.; Tasara T. SpA, ClfA, and FnbA genetic variations lead to Staphaurex test-negative phenotypes in bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, 49(2):638–46. 2011.
- Sutra L.; Poutrel B. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medical Microbiology**, 40(2):79–89. Review. 1994.
- Swofford D.; Olsen G.; Waddell P.; Hillis D. Phylogenetic Inference. In: Hillis DM, Moritz C, Mable BK, editors. **Molecular Systematics**. Sunderland: Sinauer Associates, p. 407–511. 1996.
- Tatusov RL.; Natale DA.; Garkavtsev IV.; Tatusova TA.; Shankavaram UT.; Rao BS.; *et al.* The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from

- complete genomes. **Nucleic Acids Research**, 29(1):22–8. 2001.
- Veh AK.; Klein RC.; Ster C.; Keefe G.; Lacasse P.; Schol D.; Roy J-P.; Haine D.; Dufour S.; Talbot BG.; Ribon AOB; Malouin F. Genotypic and phenotypic characterization of *Staphylococcus aureus* causing persistent and nonpersistent subclinical bovine intramammary-quarter infections during lactation and at dry-off. **Journal of Dairy Science**, 98(1):155–68. 2015.
- Vrieling M.; Boerhout EM.; Van Wigcheren GF.; Koymans KJ.; Mols-Vorstermans TG.; De Haas CJ. LukMF' is the major secreted leukocidin of bovine *Staphylococcus aureus* and is produced *in vivo* during bovine mastitis. **Science Reports.**, 6:37759. 2016.
- Whelehan CJ.; Meade KG.; Eckersall PD.; Young FJ.; O'Farrelly C. Experimental *Staphylococcus aureus* infection of the mammary gland induces region-specific changes in innate immune gene expression. **Veterinary Immunology and Immunopathol**, 15;140(3–4):181–9. 2011.
- Yu NY.; Wagner JR.; Laird MR.; Melli G.; Rey S.; Lo R. PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. **Bioinformatics**, 26(13):1608–15. 2010.
- Zecconi A.; Cesaris L.; Liandris E.; Dapra V.; Piccinini R. Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. **Microbial Pathogens**, 40(4):177–83. 2006.

MATERIAL SUPLEMENTAR – CAPÍTULO 1

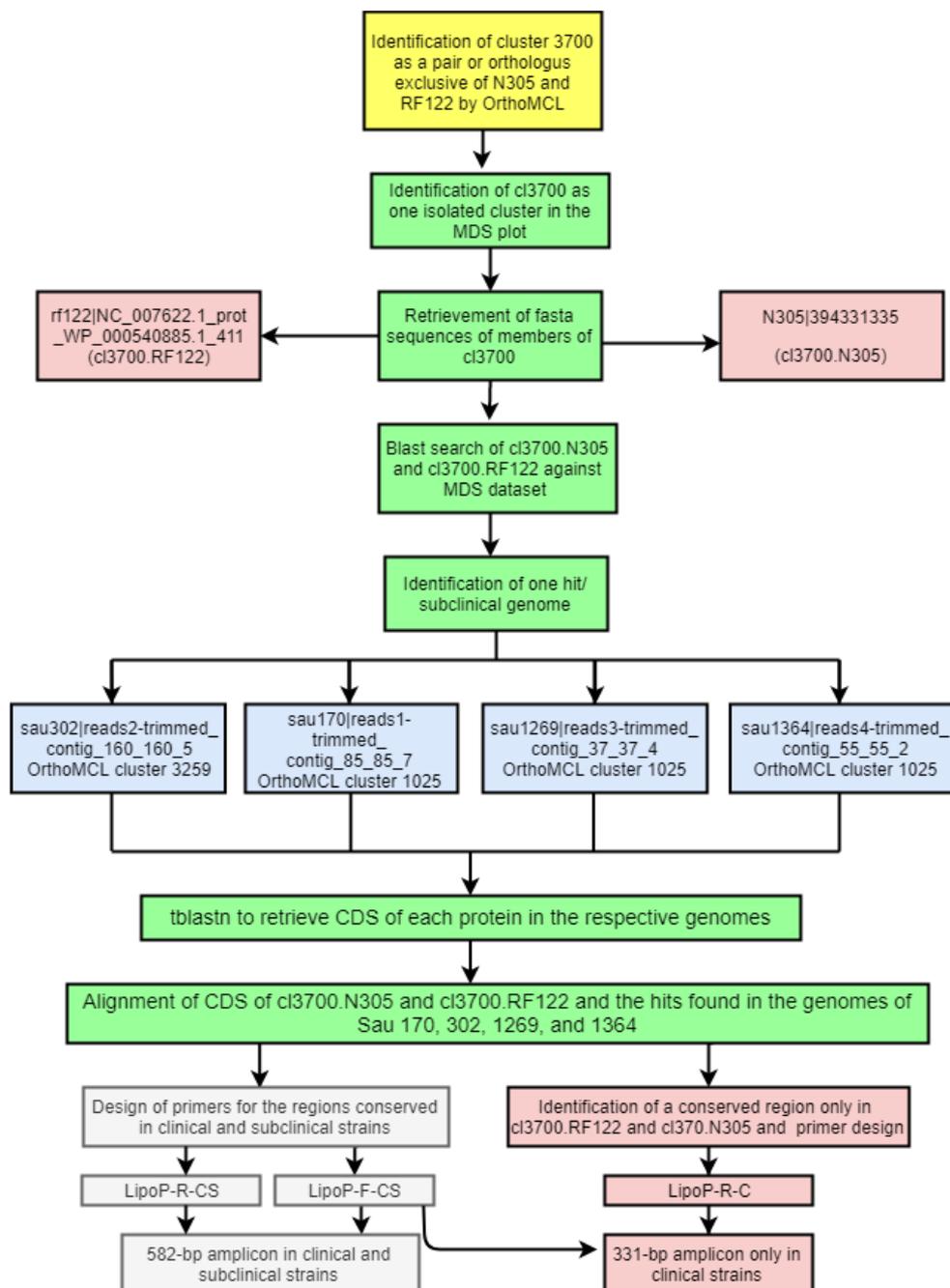


Fig. Sup. 1 (S1 Fig) - Fluxograma que descreve a metodologia usada para encontrar e testar a lipoproteína cl3700. As caixas de cor azul e rosa estão relacionadas às propriedades dos genomas das cepas clínicas e subclínicas, respectivamente, enquanto as etapas metodológicas foram coloridas em verde (disponível em <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220804.s001>)

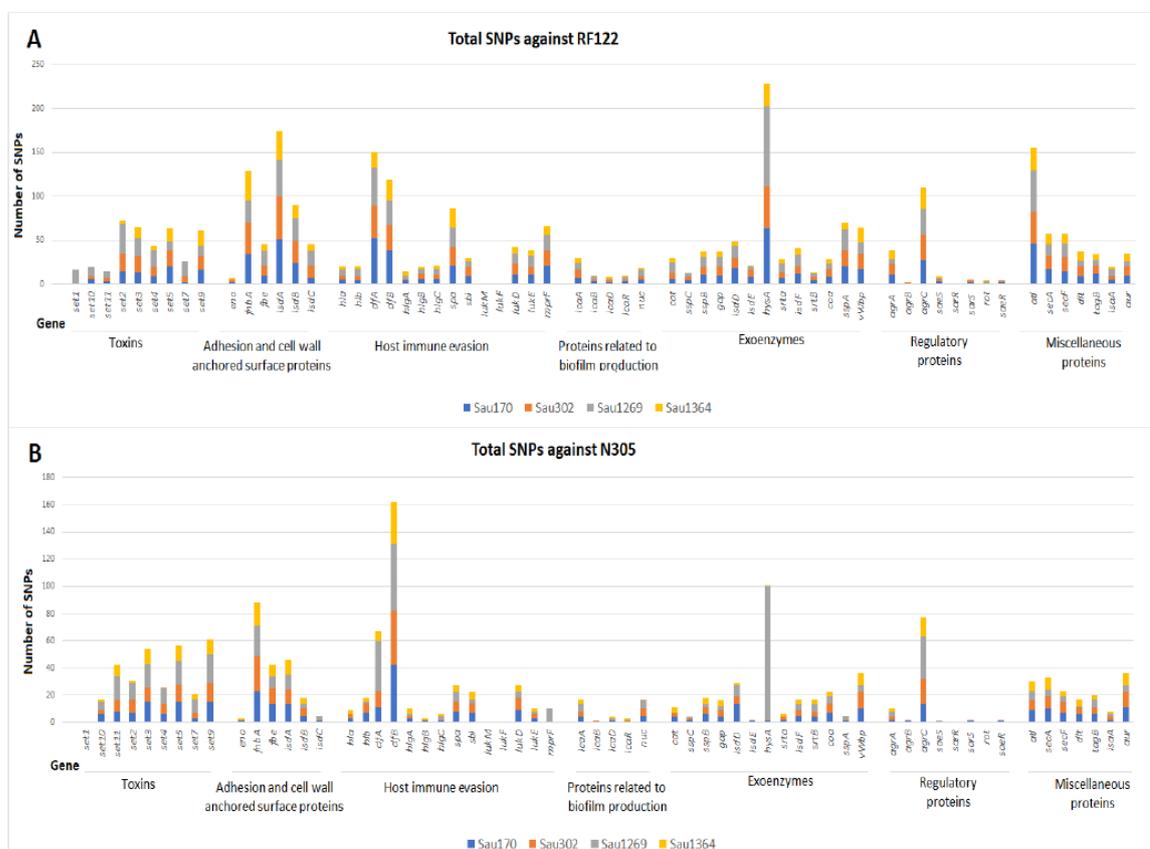


Fig. Sup. 2 (S2 Fig) - SNPs totais em genes associados à virulência presentes nos genomas das cepas subclínicas. (A) SNPs mapeados no genoma da cepa de referência clínica *S. aureus* RF122. (B) SNPs mapeados no genoma da cepa clínica *S. aureus* Newbould 305 (B). Os genes foram agrupados em suas respectivas categorias funcionais. Cada barra representa um gene e cada cor nas barras representa o número de SNPs para o gene que a cepa do genoma correspondente exibe quando mapeada na cepa de referência (disponível em <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220804.s002>)

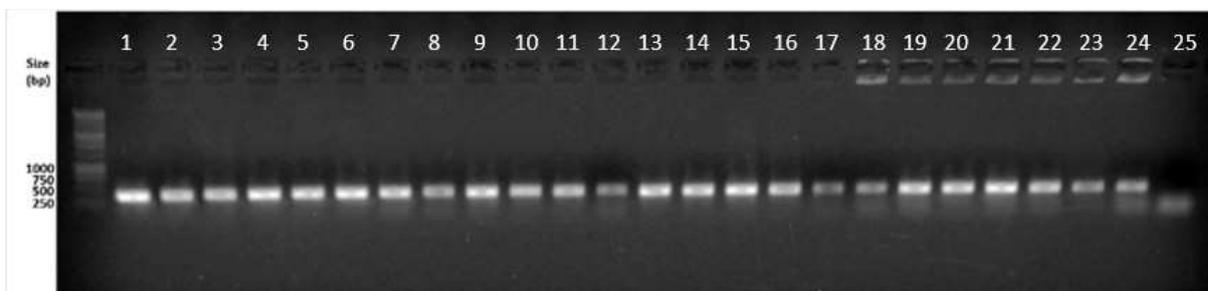


Fig. Sup. 4 (S4 Fig) - Amplificação do gene da nuclease de *Staphylococcus aureus* de origem bovina. A reação de PCR foi realizada com o DNA extraído dos isolados *S. aureus* 170 (1), 302 (2), 1269 (3), 1364 (4), 308 (5), 340 (6), 403 (7), 1001 (8), 1311 (9), 1315 (10), 1323 (11), cepa ATCC 29213 (12) e o DNA extraído dos isolados *S. aureus* 76 (13), 216 (14), 1439 (15), 3909 (16), 2555 (17), 5T18-19 (18), 9T18-16 (19), 10T18-59 (20), 10T18-68 (21), 14T18-13 (22), 22T18-52 (23), 22T17-54 (24). Água foi usada como controle negativo (25). O marcador de peso molecular usado foi o Promega 1 kb DNA Ladder (Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220804.s004>).

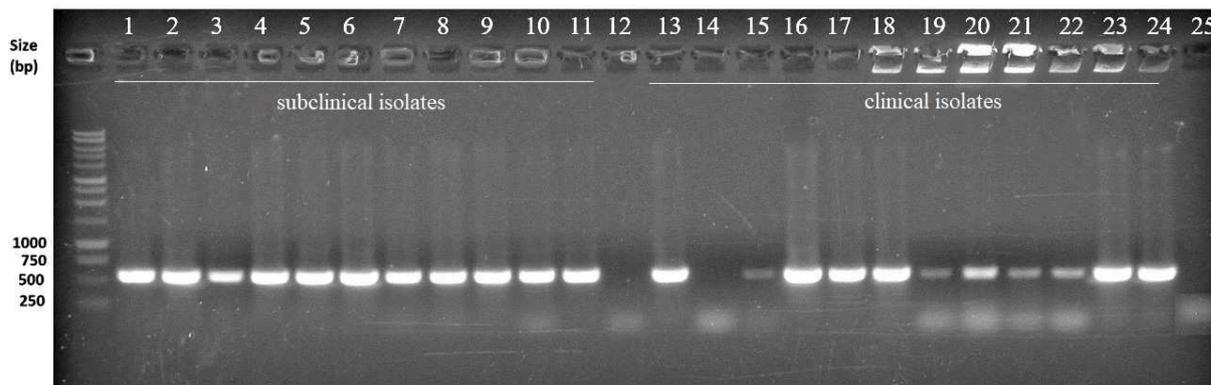


Fig. Sup. 5 (S5 Fig.) – Amplificação do gene que codifica a proteína transportadora cl3316 de isolados de *Staphylococcus aureus* de origem bovina. A reação de PCR foi realizada com DNA total extraído de isolados de mastite subclínica *S. aureus* 170 (1), 302 (2), 1269 (3), 1364 (4), 308 (5), 340 (6), 403 (7), 1001 (8), 1311 (9), 1315 (10), 1323 (11) e dos isolados de mastite clínica *S. aureus* 76 (13), 216 (14), 1439 (15), 3909 (16), 2555 (17), 5T18-19 (18), 9T18-16 (19), 10T18-59 (20), 10T18-68 (21), 14T18-13 (22), 22T18-52 (23), 22T17-54 (24). DNA total de *S. aureus* ATCC 29213 (12). Água foi usada como controle negativo (25). O marcador de peso molecular usado foi o Promega 1 kb DNA Ladder (disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220804.s005>).

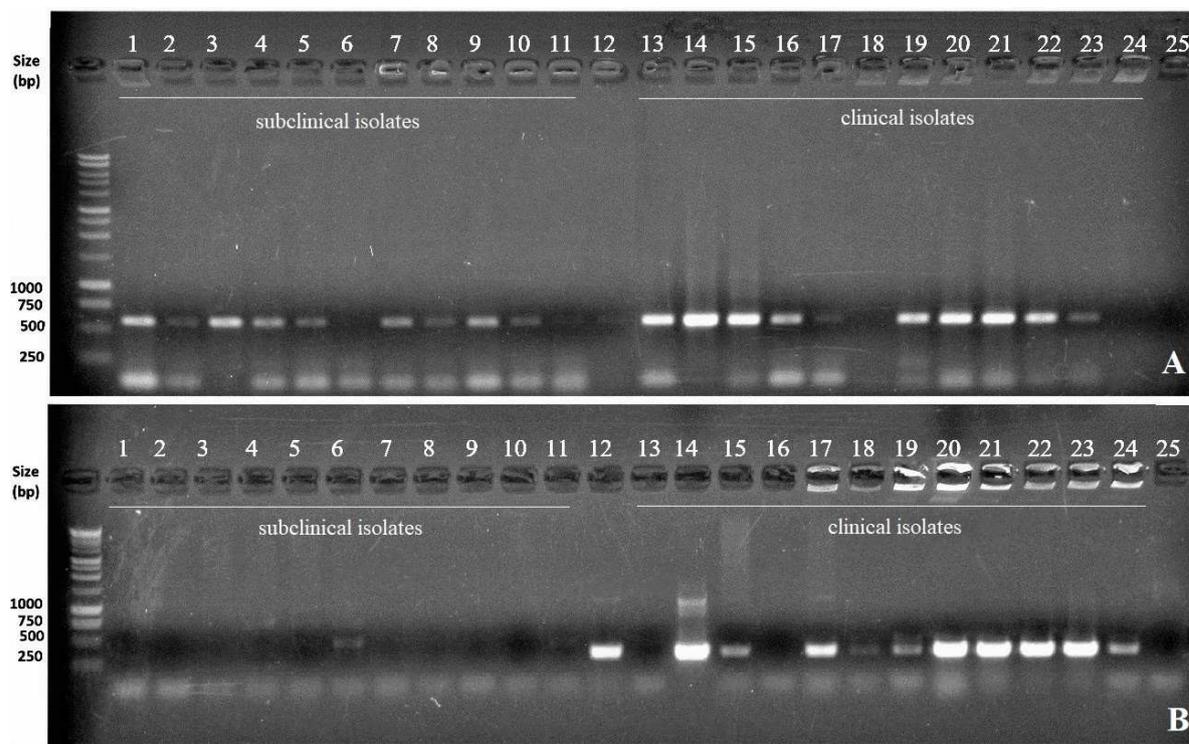


Fig. Sup. 6 (S6 Fig.) - Amplificação de um gene de lipoproteína de isolados de *Staphylococcus aureus* de origem bovina. No topo (A), os *primers* LipoP-F-CS e LipoP-R-CS foram usados em uma reação de PCR com DNA extraído dos isolados de mastite subclínica *S. aureus* 170 (1), 302 (2), 1269 (3), 1364 (4), 308 (5), 340 (6), 403 (7), 1001 (8), 1311 (9), 1315 (10), 1323 (11) e dos isolados clínicos de mastite *S. aureus* 76 (13), 216 (14), 1439 (15), 3909 (16), 2555 (17), 5T18-19 (18), 9T18-16 (19), 10T18-59 (20), 10T18-68 (21), 14T18-13 (22), 22T18-52 (23), 22T17-54 (24). No fundo (B), os *primers* LipoP-F-CS e LipoP-R-C foram usados para amplificar o mesmo DNA. DNA total de *S. aureus* ATCC 29213 (12). Água foi usada como controle negativo (25). O marcador de peso molecular usado foi o Promega 1 Kb DNA Ladder (disponível em <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220804.s006>).

As tabelas suplementares não foram incluídas na listagem de material suplementar do capítulo 1 devido às suas grandes dimensões em quantidade de linhas e colunas. Por gentileza, para acesso ao conteúdo, favor acessar os links específicos para cada tabela, conforme descrição abaixo.

Tabela S1. Presença (+) ou ausência (-) de genes associados à virulência nos genomas de *Staphylococcus aureus* bovinos analisados (Disponível em <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220804.s007>).

Tabela S2. Anotação de proteínas presentes no gráfico MDS por meio de um lote BLASTp contra *Staphylococcus aureus* RF122 (Disponível em <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220804.s008>).

Tabela S3. Matriz de identidade de proteínas secretadas e proteínas envolvidas na adesão e aquisição de ferro codificadas pelos genomas subclínicos e clínicos (Disponível em <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220804.s009>).

Tabela S4. Curadoria manual dos *clusters* ortoMCL que eram possivelmente exclusivos dos genomas de cepas subclínicas de *Staphylococcus aureus* (Aba A) ou das cepas clínicas (Aba B) (Disponível em <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220804.s010>)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida A.; Rosinski-Chupin I.; Plainvert C.; Douarre P.E.; Borrego M.J.; Poyart C. Evolution of group B *Streptococcus* hypervirulent clonal complex 17 unveils new pathoadaptive mutations. **MSystems**, 2(5). pii: e00074–17. 2017.
- Altschul S.F.; Gish W.; Miller W.; Myers E.W.; Lipman D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, 215(3):403–10. 1990.
- Argaw A. Review on epidemiology of clinical and subclinical mastitis on dairy cows. **Food Science and Quality Management**, 52:56–65. 2016.
- Baba T.; Schneewind O.; Takeuchi F.; Hiramatsu K. Genome sequence of *Staphylococcus aureus* strain Newman and comparative analysis of staphylococcal genomes: polymorphism and evolution of two major pathogenicity islands. **Journal of Bacteriology**, 190(1):300–10. 2008.
- Capra E.; Cremonesi P.; Pietrelli A.; Puccio S.; Luini M.; Stella A.; Castiglioni, B. Genomic and transcriptomic comparison between *Staphylococcus aureus* strains associated with high and low within herd prevalence of intra-mammary infection. **BMC Microbiology**, 19;17(1):21. 2017.
- Collery MM.; Smyth DS.; Tumilty JJ.; Twohig JM.; Smyth CJ. Associations between enterotoxin gene *cluster* types egc1, egc2 and egc3, agr types, enterotoxin and enterotoxin-like gene profiles, and molecular typing characteristics of human nasal carriage and animal isolates of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medical Microbiology**, 58(Pt 1):13–25. 2009.
- Constable PD.; Hinchcliff KW.; Done SH.; Grünberg W. Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. 11th ed. **Saunders Ltd**. 2016.
- Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, 32(5):1792–7. 2004.
- Fabres-Klein MH.; Aguilar AP.; Silva MP.; Silva DM.; Ribon AO. Moving towards the immunodiagnosis of staphylococcal intramammary infections. **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases**, 33(12):2095–104. 2014.
- Haveri M.; Roslöf A.; Rantala L.; Pyörälä S. Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. **Journal of Applied Microbiology**, 103(4):993–1000. 2007.
- Herron-Olson L.; Fitzgerald JR.; Musser JM.; Kapur V. Molecular correlates of host specialization in *Staphylococcus aureus*. **PLoS One**, 2(10):e1120. 2007.
- Hisatsune J.; Hagiya H.; Shiota S.; Sugai M. Complete genome sequence of systemically disseminated sequence type 8 staphylococcal cassette chromosome mec type IVI community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Genome Announcements**, 5(35):e00852–17. 2017.
- Holtfreter S.; Kolata J.; Broker BM 20. Towards the immune proteome of *Staphylococcus aureus*—the anti-*S. aureus* antibody response. **International Journal of Medical Microbiology**, 300(2–3):176–92. 2010.
- Hyatt D.; Chen GL.; LoCascio PF.; Land ML.; Larimer FW.; Hauser LJ. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. **BMC Bioinformatics**, 11(1):119. 2010.
- Juncker AS.; Willenbrock H.; Von Heijne G.; Brunak S.; Nielsen H.; Krogh A. Prediction of

- lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. **Protein Sciences**, 12(8):1652–62. 2003.
- Käll L.; Krogh A.; Sonnhammer ELL. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. **Journal of Molecular Biology**, 14;338(5):1027–36. 2004.
- Krogh A.; Larsson B.; Von Heijne G.; Sonnhammer EL. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. **Journal of Molecular Biology**, 9;305(3):567–80. 2001.
- Langley RJ.; Ting YT.; Clow F.; Young PG.; Radcliff FJ.; Choi JM.; Sequeira R.P.; Holtfreter S.; Baker H.; Fraser J.D. Staphylococcal enterotoxin-like X (SEIX) is a unique superantigen with functional features of two major families of staphylococcal virulence factors. **PLoS Pathogens**, 13(9):e1006549. 2017.
- Langmead B.; Salzberg S. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, 9(4):357–9. 2012.
- Li L.; Stoeckert CJ.; Roos DS. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. **Genome Research**, 13(9):2178–89. 2003.
- Löffler B.; Tuchscher L.; Niemann S.; Peters G. *Staphylococcus aureus* persistence in non-professional phagocytes. **International Journal of Medical Microbiology**, 304(2):170–6. 2014.
- Maddamsetti R.; Hatcher PJ.; Cruveiller S.; Médigue C.; Barrick JE.; Lenski RE. Synonymous genetic variation in natural isolates of *Escherichia coli* does not predict where synonymous substitutions occur in a long-term experiment. **Molecular Biology Evolution**, 32(11):2897–2904. 2015.
- Marklevitz J.; Harris LK. Prediction driven functional annotation of hypothetical proteins in the major facilitator superfamily of *S. aureus* NCTC 8325. **Bioinformatics**, 26;12(4):254–262. 2016.
- McCarthy AJ.; Lindsay JA. *Staphylococcus aureus* innate immune evasion is lineage-specific: a bioinformatics study. **Infection, Genetics and Evolution**, 19:7–14. 2013.
- Mdegela RH.; Ryoba R.; Karimuribo ED.; Phiri EJ.; Løken T.; Reksen O.; Mtengeti E.; Urio NA. Prevalence of clinical and subclinical mastitis and quality of milk on smallholder dairy farms in Tanzania. **Journal of the South African Veterinary Association**, 80(3):163–8. 2009.
- Moges N.; Hailemariam T.; Fentahun T.; Chanie M.; Melaku A. Bovine mastitis and associated risk factors in small holder lactating dairy farms in Hawassa, Southern Ethiopia. **Global Veterinary**, 9(4):441–6. 2012.
- Muhire BM.; Varsani A.; Martin DP. SDT: a virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. **PLoS One**, 9(9):e108277. 2014.
- Müller P.; Müller-Anstett M.; Wagener J.; Gao Q.; Kaesler S.; Schaller M.; Biedermann T.; Götz F. The *Staphylococcus aureus* lipoprotein SitC colocalizes with Toll-like receptor 2 TLR2 in murine keratinocytes and elicits intracellular TLR2 accumulation. **Infection and Immunity**, 78(10):4243–50. 2010.
- Nguyen MT.; Götz F. Lipoproteins of Gram-positive bacteria: key players in the immune response and virulence. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, 10;80(3):891–903. 2016.
- Nguyen MT.; Kraft B.; Yu W.; Demicrioglu DD.; Hertlein T.; Burian M, Schmalzer M.; Boller K.; Bekeredjian-Ding I.; Ohlsen K.; Schitteck B.; Götz, F. The vSaa specific lipoprotein

- like *cluster (lpl)* of *S. aureus* USA300 contributes to immune stimulation and invasion in human cells. **PLoS Pathogens**, 17;11(6):e1004984. 2015.
- Ono HK.; Omoe K.; Imanishi KI.; Iwakabe Y.; Hu DL.; Kato H.; Naoyuki S.; Akio N.; Takehiko U.; Kunihiro S. Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins, types S and T. **Infection and Immunology**, 1;76(11):4999–5005. 2008.
- Ortega E.; Abriouel H.; Lucas R.; Gálvez A. Multiple roles of *Staphylococcus aureus* enterotoxins: pathogenicity, superantigenic activity, and correlation to antibiotic resistance. **Toxins (Basel)**, 2(8):2117–31. 2010.
- Ote I.; Taminiau B.; Duprez JN.; Dizier I.; Mainil JG. Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, 153(3–4):285–92. 2011.
- Overbeek R.; Begley T.; Butler RM.; Choudhuri JV.; Chuang HY.; Cohoon M.; Crécy-Lagard V.; Naryttza D.; Terry D.; Robert E.; Michael Fonstein. The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. **Nucleic Acids Research**, 7;33(17):5691–702. 2005.
- Parkhill J.; Wren BW. Bacterial epidemiology and biology—lessons from genome sequencing. **Genome Biology**, 12(10):230. 2011.
- Pelé J.; Bécu JM.; Abdi H.; Chabbert M. Bios2mds: an R package for comparing orthologous protein families by metric multidimensional scaling. **BMC Bioinformatics**, 15;13:133. 2012.
- Petersen TN.; Brunak S.; Von HG.; Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, 8(10):785–6. 2011.
- Peton V.; Bouchard DS.; Almeida S.; Rault L.; Falentin H.; Jardin J.; Gwénaél J., David H., François P., Schrenzel J; Azevedo V.; Le Loir Y. Fine-tuned characterization of *Staphylococcus aureus* Newbould 305, a strain associated with mild and chronic mastitis in bovines. **Veterinary Research**, 14;45:106. 2014.
- Piccinini R.; Tassi R.; Daprà V.; Pilla R.; Fenner J.; Carter B. Study of *Staphylococcus aureus* collected at slaughter from dairy cows with chronic mastitis. **Journal of Dairy Research**, 79(2):249–55. 2012.
- Pinzón-Sánchez C.; Ruegg PL. Risk factors associated with short-term post-treatment outcomes of clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, 94(7):3397–410. 2011.
- Rabello RF.; Moreira BM.; Lopes RM.; Teixeira LM.; Riley LW.; Castro AC. Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from cows with mastitis in Brazilian dairy herds. **Journal of Medical Microbiology**, 56(11):1505–11. 2007.
- Rainard P.; Foucras G.; Fitzgerald JR.; Watts JL.; Koop G.; Middleton JR. Knowledge gaps and research priorities in *Staphylococcus aureus* mastitis control. **Transboundary Emerging Diseases**, 65(Suppl 1):149–165. 2018.
- Sakwinska O.; Giddey M.; Moreillon M.; Morisset D.; Waldvogel A.; Moreillon P. *Staphylococcus aureus* host range and human-bovine host shift. **Applied Environmental Microbiology**, 77:5908–5915. 2011.
- Sasaki T.; Tsubakishita S.; Tanaka Y.; Sakusaben A.; Ohtsuka M.; Hirotaki S.; Tetsuji K.; Tsuneo F.; Keiichi H. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, 48(3):765–9. 2010.
- Schmidt T.; Kock MM.; Ehlers MM. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis and close human contacts in south african dairy herds:

- genetic diversity and inter-species host transmission. **Frontiers in Microbiology**, 6;8:511. 2017.
- Schukken YH.; Günther J.; Fitzpatrick J.; Fontaine MC.; Goetze L.; Holst O.; Watts J; Yancey R; Zerbe H; Gurjar A; Zadoks RN. Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 15;144(3–4):270–89. 2011.
- Siddiquee NU.; Tripura TK.; Islam MT.; Bhuiyan SA.; Rahman AK.; Bhuiyan AK. Prevalence of sub-clinical mastitis in high yielding crossbred cows using Draminski Mastitis Detector. **Journal of Veterinary Medicine**, 11(1):37–41. 2013.
- Sievers F.; Wilm A.; Dineen DG.; Gibson TJ.; Karplus K.; Li W. Fast scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular System Biology**, 7:539. 2011.
- Silva DM.; da Silva MP.; Vidigal PMP.; Barcelos RM.; Klein RC.; Aguilar AP.; Aguilar AP; Klein MHF; Oliveira GC; Ribon AOR. Draft genome sequences of *Staphylococcus aureus* strains isolated from subclinical bovine mastitis in Brazil. **Genome Announcements**, 4(1):e01594–15. 2016.
- Simão FA.; Waterhouse RM.; Ioannidis P.; Kriventseva EV.; Zdobnov EM. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. **Bioinformatics**, 31(19):3210–2. 2015.
- Smith EM.; Green LE.; Medley GF.; Bird HE.; Fox LK.; Schukken YH. Multilocus sequence typing of intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, 43(9):4737–43. 2005.
- Sogawa K.; Watanabe M.; IshigE T.; Segawa S.; Miyabe A.; Murata S.; Tomoko S.; Akihiro S.; Katsunori F.; Fumio N. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using MALDI-TOF mass spectrometry. **Biocontrol Science**, 22(3):163–9. 2017.
- Stach CS.; Vu BG.; Merriman JA.; Herrera A.; Cahill MP.; Schlievert PM.; *et al.* Novel tissue level effects of the *Staphylococcus aureus* enterotoxin gene cluster are essential for infective endocarditis. **PLoS One**, 11(4):e0154762. 2016.
- Stutz K.; Stephan R.; Tasara T. SpA, ClfA, and FnbA genetic variations lead to Staphaurex test-negative phenotypes in bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, 49(2):638–46. 2011.
- Sutra L.; Poutrel B. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medical Microbiology**, 40(2):79–89. Review. 1994.
- Swofford D.; Olsen G.; Waddell P.; Hillis D. Phylogenetic Inference. In: Hillis DM, Moritz C, Mable BK, editors. **Molecular Systematics**. Sunderland: **Sinauer Associates**, p. 407–511. 1996.
- Tatusov RL.; Natale DA.; Garkavtsev IV.; Tatusova TA.; Shankavaram UT.; Rao BS.; *et al.* The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. **Nucleic Acids Research**, 29(1):22–8. 2001.
- Veh AK.; Klein RC.; Ster C.; Keefe G.; Lacasse P.; Schol D.; Roy J-P.; Haine D.; Dufour S.; Talbot BG.; Ribon AOB; Malouin F. Genotypic and phenotypic characterization of *Staphylococcus aureus* causing persistent and nonpersistent subclinical bovine intramammary-quarter infections during lactation and at dry-off.

- Journal of Dairy Science**, 98(1):155–68. 2015.
- Vrieling M.; Boerhout EM.; Van Wigcheren GF.; Koymans KJ.; Mols-Vorstermans TG.; De Haas CJ. LukMF' is the major secreted leukocidin of bovine *Staphylococcus aureus* and is produced *in vivo* during bovine mastitis. **Science Reports.**, 6:37759. 2016.
- Whelehan CJ.; Meade KG.; Eckersall PD.; Young FJ.; O'Farrelly C. Experimental *Staphylococcus aureus* infection of the mammary gland induces region-specific changes in innate immune gene expression. **Veterinary Immunology and Immunopathol**, 15;140(3–4):181–9. 2011.
- Yu NY.; Wagner JR.; Laird MR.; Melli G.; Rey S.; Lo R. PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. **Bioinformatics**, 26(13):1608–15. 2010.
- Zecconi A.; Cesaris L.; Liandris E.; Dapra V.; Piccinini R. Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. **Microbial Pathogens**, 40(4):177–83. 2006.

CAPÍTULO 2

Uma lipoproteína de *Staphylococcus aureus* discrimina isolados de campo associados a diferentes manifestações de mastite bovina

RESUMO

Staphylococcus aureus é um dos principais patógenos causadores de mastite em gado de leite que se manifestar como uma infecção subclínica ou clínica. Anteriormente, Rocha *et al.* (2019) encontraram diferenças na sequência de nucleotídeos de um gene que codifica uma lipoproteína entre cepas associadas à mastite. Com base na reação em cadeia da polimerase (PCR), isolados de campo foram separados em dois grupos de acordo com a manifestação da mastite. Neste estudo, uma segunda rodada de análises foi realizada com uma coleção maior de bactérias, coletadas em cinco estados brasileiros, para validar os achados. Inicialmente, a diversidade de 108 isolados de campo foi investigada por ensaio do Número Variável de Repetições em Tandem (MLVA) e, em seguida, alguns deles foram escolhidos para tipagem pelo gene *spa*. As bactérias foram separadas em 54 grupos de MLVA e 13 *spa*-type distintos. Esse foi o primeiro registro dos tipos t14515, t337 e t528 nos rebanhos brasileiros. O gene da lipoproteína foi amplificado a partir do DNA total de 76 isolados com um par de *primers* complementares à sequência encontrada nas cepas clínicas estudadas por Rocha *et al.* (2019). Os resultados mostraram um *amplicon* do tamanho esperado em 34/38 (89,47%) isolados de mastite clínica, e em apenas 3/34 (8,82%) isolados de mastite subclínica, independentemente do tipo de *spa*. Análises *in silico* mostraram diferenças no C-terminal da lipoproteína, região implicada na internalização bacteriana. Esses achados fornecem evidências de que diferenças em uma proteína de superfície podem impactar a interação com a célula mamária bovina e, portanto, a forma como a bactéria se manifesta durante a infecção.

1. INTRODUÇÃO

A mastite bovina é uma doença infecciosa que afeta a qualidade e a produção do leite em rebanhos leiteiros em todo o mundo. Na doença, o bem-estar animal é comprometido por um quadro inflamatório nos quartos mamários, que pode levar à fibrose da glândula mamária

e à incapacidade de produção de leite (Zhao e Lacasse, 2007). Embora existam testes que auxiliam no diagnóstico da mastite, eles são subjetivos e incapazes de discriminar o agente infeccioso, uma informação importante para abordagens de tratamento e manejo de rebanho (Ashraf e Imran, 2018). Até o momento, antibióticos ainda são comumente usados no tratamento da doença, mas a ineficácia dos mesmos e a disseminação da resistência antimicrobiana abriram caminho para estratégias alternativas, como o uso de bacteriófagos, nanopartículas e imunoterapia, a qual ainda não teve sua utilidade *in vivo* comprovada (Gomes e Henriques, 2016).

Staphylococcus aureus é considerado um dos principais patógenos causadores da mastite bovina. A bactéria coloniza a pele do teto e outros tecidos intramamários (Haveri *et al.*, 2008; da Costa *et al.*, 2014) e é considerada extremamente difícil de erradicar devido à sua capacidade de formar biofilmes (Li *et al.*, 2017). Embora *S. aureus* possa causar mastite clínica, esse patógeno está amplamente associado à mastite subclínica, uma manifestação silenciosa responsável por enormes prejuízos econômicos. No Brasil, as prevalências de mastite clínica e subclínica são de 2,6% e 48,6%, respectivamente (Acosta *et al.*, 2016). Mais especificamente, nos estados da Bahia e Pernambuco, localizados na região Nordeste do Brasil, a prevalência de mastite subclínica é de 28,2% (Krewer *et al.*, 2013). Por outro lado, a prevalência de mastite subclínica é maior nos estados da região Sudeste, sendo estimada em 39,7% no Rio de Janeiro, 55,4% em Minas Gerais e 63,6% em São Paulo (Vieira-Da-Motta *et al.*, 2001; Busanello *et al.*, 2017). Embora a região Sudeste do Brasil ocupe 10,85% do território nacional, ela é responsável por 34,2% da produção nacional de leite (Embrapa - Gado de Leite, 2019). Enquanto que para a mastite clínica os custos médios estimados são de R\$ 54.330,00 por 100 vacas/ano, para a mastite subclínica esse valor estimado é de R\$ 138.340,00 por 100 vacas/ano (Aghamohammadi *et al.*, 2018).

A patogenicidade de *S. aureus* é complexa, e vários estudos têm sido realizados com o objetivo de compreender os fatores bacterianos que podem determinar a progressão da mastite bovina (Rainard *et al.*, 2018; Fang *et al.*, 2019; Marbach *et al.*, 2019). O controle da doença é dificultado pela presença de isolados com diferentes origens genéticas dentro do mesmo rebanho (Cremonesi *et al.*, 2015; Acosta *et al.*, 2018), a redundância de fatores de virulência (Vandenesch *et al.*, 2012) e diferenças em seu nível de expressão (Jenkins *et al.*,

2015). Até agora, houve algum progresso na associação de características bacterianas e evolução da doença. Um alto nível de expressão de leucotoxinas por isolados de *S. aureus* foi associado à mastite clínica grave (Vrieling *et al.*, 2016). LukF -PV foi superproduzido em cepas de *S. aureus* que induziram mastite grave em comparação com aquelas que induziram mastite subclínica (Le Maréchal *et al.*, 2011). Além disso, isolados que tinham um único polimorfismo de nucleotídeo no promotor do gene que codifica a hemolisina A (*hla*), produziram mais Hla e causaram mastite severa (Hall *et al.*, 2012). Uma maior produção de biofilme foi observada em isolados com maior probabilidade de persistir ao longo do período seco, enquanto que níveis mais elevados de expressão de *hld* foram observados principalmente em cepas não persistentes (Veh *et al.*, 2015).

Anteriormente, Rocha *et al.* (2019) estudaram as proteínas de superfície e secretadas de seis cepas bovinas de *S. aureus*. Embora o conteúdo de genes de virulência tenha sido semelhante entre as cepas associadas à mastite clínica ou subclínica, descobriu-se que um gene que codifica uma lipoproteína possui uma região conservada apenas nas cepas clínicas. Com base na reação em cadeia da polimerase (PCR), os isolados de campo foram separados em dois grupos de acordo com a manifestação da mastite. Aqui, avaliamos esses achados com uma segunda rodada de análise, usando uma coleção maior de isolados de campo coletados de animais com histórico clínico em diferentes estados brasileiros. A diversidade genética entre os isolados foi investigada por análise de Número Variável de Repetições em Tandem (MLVA) e tipagem do gene *spa*. O DNA total de bactérias com diferentes origens genéticas foi extraído, e um amplicon do tamanho esperado, correspondente ao gene da lipoproteína cl3700, foi observado em 34/38 (89,47%) isolados de mastite clínica, e em apenas 3/34 (8,82%) isolados de mastite subclínica. A análise *in silico* mostrou diferenças na região C-terminal de uma lipoproteína relacionada à internalização bacteriana.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismos e condições de cultura

Um total de 108 isolados de *S. aureus* obtidos de vacas com mastite clínica (62) ou subclínica (56) em rebanhos leiteiros de cinco estados brasileiros (Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Pernambuco e Bahia) foram estudados neste trabalho (Fig. 1, Tabela 1). *S. aureus* RF122, cepa de referência associada à mastite clínica severa, também foi usada neste estudo. *S. aureus* RF122 foi gentilmente cedido pelo Dr. Vasco A.C. Azevedo, Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil. As bactérias foram rotineiramente mantidas em placas contendo ágar Luria-Bertani (LB), e foram cultivadas em BHI por 12 h antes da extração do DNA total. As culturas foram armazenadas em LB contendo 20% de glicerol a -80°C .

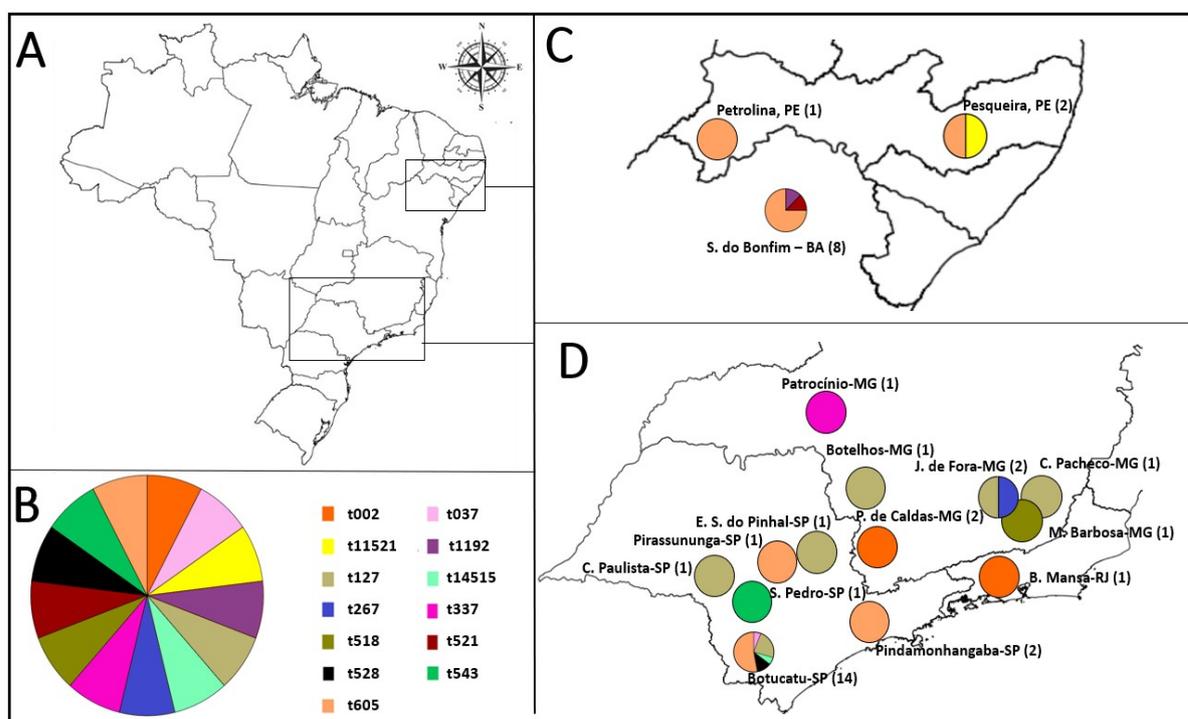


Fig 1. Mapa do Brasil mostrando a origem e tipo de spa dos isolados de campo testados neste estudo. Em A é mostrado o mapa de todo o país, com os estados de Pernambuco e Bahia (C) e São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro (D) em caixas. Em B, o esquema de cores usado para distinguir os tipos de spa. O número de isolados analisados em cada local é mostrado entre parênteses.

Tabela 1 – Isolados de *Staphylococcus aureus* usados neste estudo e resumo dos resultados.

Identificação	Manifestação	Origem	Gene LipoP
RF122	Clínico	Irlanda	+
3212	Subclínico	Barra Mansa - RJ	-
46T-8	Clínico	Botelhos - MG	+
1B, 11B, 17B, 23B, 27B, 80B, 86B, 94B, 103B, 107B, 120B, 126B, 131B, 303B, 311B, 327B, 343B, 350B, 354B, 360B, 366B, 372B, 381B, 386B, 389B, 394B, 400B, 443B, 454B 908B	Subclínico	Botucatu - SP	-
73T-40, 6T, 7T, 8T, 9T, 10T, 11T, 12T, 14T, 15T, 17T, 19T, 22T, 23T, 24T, 25T, 29T, 31T, 32T, 37T, 39T, 41T, 45T, 53T, 54T, 56T, 61T, 69T, 72T, 75T, 77T, 84T	Clínico	Botucatu - SP	+
90T-40	Clínico	Cabralia Paulista - SP	+
5, 11	Clínico	Capim Grosso - BA	-
302, 369/5, 340/5	Subclínico	Coimbra - MG	-
101, 170, 1269, 1364	Subclínico	Coronel Pacheco - MG	-
43T-13	Clínico	Espírito Santo do Pinhal - SP	+
4081, 741	Subclínico	Juiz de Fora - MG	-
3886	Subclínico	Matias Barbosa - MG	-
4182	Subclínico	Patrocínio - MG	-
125PD-276, 94AE-2232	Clínico	Pesqueira - PE	+
53AD-136	Subclínico	Petrolina - PE	+
69/10 63, 69/10 63 d, 4, 11 *, 29, 29 d, 34, 34 d	Subclínico	Pindamonhagaba - SP	-
60, 60 d	Subclínico	Pirassununga - SP	-
92T-64, 95T-10, 95T-4	Clínico	Pirassununga - SP	+
76T-6, 87T-23	Clínico	Poços de Caldas - MG	+
73T-36	Clínico	São Pedro - SP	+
81AE-4953, 23 AD 7206	Subclínico	Senhor do Bonfim - BA	+
49 PE 0051, 81 PE 4953, 18 AE 35, 3 AE 132	Subclínico	Senhor do Bonfim - BA	-
64PD-1002, 70 AD 3044, 18 AD 35	Clínico	Senhor do Bonfim - BA	-
24 DC 114	Clínico	Senhor do Bonfim - BA	+
82T-3	Clínico	Três Corações - MG	+

Todos os isolados descritos nesta tabela eram *nuc* positivos (Sasaki *et al.*, 2010).

2.2. Diagnóstico de mastite bovina

Cento e oito isolados de *S. aureus* de vacas com histórico clínico conhecido de mastite bovina foram utilizados neste trabalho. Todos os animais foram submetidos ao teste de rotina da caneca do fundo preto e ao teste CMT (*California Mastitis Test*) para o diagnóstico de mastite clínica e subclínica, conforme descrito anteriormente (Rocha *et al.*, 2019). Resumidamente, o diagnóstico de mastite clínica foi baseado em anormalidades macroscópicas no leite e/ou sinais sistêmicos de doença (Pinzón-Sánchez e Ruegg, 2011; Constable *et al.*, 2016). Os animais com mastite subclínica não apresentaram sintomas visíveis de mastite clínica durante a lactação. *S. aureus* foi identificado por meio do ensaio de coagulase em tubo e hemólise em placas de ágar sangue, conforme descrito em Brito *et al.* (1999), seguido pela amplificação do gene da nuclease (Sasaki *et al.*, 2010).

2.2 Extração total de DNA

Lisozima (20 µg/ml) (Ultrapure Lysozyme, J18645, Affymetrix / USB) foi adicionada ao um sedimento de células bacterianas suspenso em tampão SET (Tris-HCl 10 mM, EDTA 2 mM, SDS 1%) e o tubo foi mantido por 30 min a 37 °C. A extração foi então conduzida usando o kit PureLink Genomic DNA (Invitrogen). O DNA extraído foi avaliado por eletroforese em gel de agarose a 0,8% seguida de coloração com brometo de etídio (2 mg/mL). A concentração e pureza das amostras foram medidas por espectrofotometria usando espectrofotômetros Nanodrop™ 2000 / 2000c (Thermo Fisher Scientific).

2.3 Análise MLVA

A diversidade genética dos isolados foi avaliada por PCR multiplex usando sete pares de *primers* complementares a regiões altamente variáveis do genoma de *S. aureus* (Tabela 2). O método empregado foi originalmente descrito por Sabat *et al.*, 2003 e François *et al.*, 2005, usando *primers* desenhados para os genes *sdr*, *clfA*, *clfB*, *ssp*, *spa*, *cna* e *fnBP*. Os amplicons foram analisados por eletroforese em 1X Tris-acetato-EDTA em gel de agarose 1,5%, a 100 mV por 90 min, e os resultados foram visualizados sob luz ultravioleta, a após coloração com 2 mg/mL de brometo de etídio. Uma amostra de referência (isolado 54T) foi usada em todos os géis para facilitar a comparação dos padrões de banda. O dendrograma foi construído no software RStudio, calculando a similaridade com o coeficiente de Jaccard, e método de agrupamento *complete-linkage*.

2.4 Tipagem *spa*

A região polimórfica X do gene da proteína A (*spa*) foi amplificada usando os *primers* *spa*-1113f e *spa*-1514r (Tabela 2) com a reação de PCR realizada conforme descrito por Li *et al.*, (2018). Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,0%, conforme descrito na seção anterior. Uma amostra da reação foi usada em reações de sequenciamento (Macrogen Inc.) com sequenciadores Applied Biosystems 3730XL. Os arquivos de sequenciamento *ab1* foram analisados pelo software BioNumerics v7.6 (Applied Maths, SiMartens-Latem, Belgium), e o pacote de tipagem *Spa* foi usado para atribuir um tipo de *spa* a cada isolado, de acordo com o servidor web Ridom (<http://spaserver.ridom.de>).

Tabela 2 – Oligonucleotídeos usados neste estudo.

Gene	Seqüência	Tamanho (bp)	Tipagem	Fonte
<i>clfA</i>	F - 5'GATTCTGACCCAGGTTTCAGA3 ' R - 5'CTGTATCTGGTAATGGTTCTTT3 '	945 ± 22	Tipagem MLVA	Sabat <i>et al.</i> , 2003
<i>clfB</i>	F - 5'ATGGTGATTACAGCAGTAAATCC3 ' R - 5'CATTATTTGGTGGTGAACCTCTT3 '	880 ± 19	Tipagem MLVA	Sabat <i>et al.</i> , 2003, 2005
<i>sdrCDE</i>	F - 5'GTAACAATTACGGATCATGATG3 ' R - 5'TACCTGTTTCTGGTAATGCTTT3 '	648/580/622 bp	Tipagem MLVA	Sabat <i>et al.</i> , 2003
<i>spA</i>	F - 5'AGCACCAAAAAGAGGAAGACAA3 ' R - 5'GTTAACGACATGTACTCCGT3 '	290 ± 4	Tipagem MLVA	Sabat <i>et al.</i> , 2003
<i>sspA</i>	F - 5'ATCMATTTYGCMAYGATGACCA3 ' R - 5'TTGTCTGAATTATTGTTATCGCC3 '	132 ± 2	Tipagem MLVA	Sabat <i>et al.</i> , 2003
<i>cna</i>	F - 5'AAAATGACAAAATGGCAAG3 ' R - 5'CAGGTTTAGTTGGTGGTGT3 '	1888 ± 125	Tipagem MLVA	François <i>et al.</i> , 2005
<i>fnBP</i>	F - 5'GGTCAAGCRCAAGGACCART3 ' R - 5'AATAATCCGCCGAACAACAT3 '	1045 ± 32	Tipagem MLVA	François <i>et al.</i> , 2005
<i>lipoP</i>	F-CS - 'GYTTTGCGAAAACGTTAGAYATGTA3 ' RC - 5'GCAACA ACTAGTAGGAGTGA3 '	5 331 bp	Investigação de lipoproteína	Rocha <i>et al.</i> , 2019
<i>spA</i>	1113f - 5 'TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC 3 ' 1514r - 5 'CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT 3 '	290 bp	Tipagem <i>spa</i>	Strommenger <i>et al.</i> , 2006
<i>nucAur</i>	F - TCGCTTGCTATGATTGTGG 3 ' R - 5 'GCCAATGTTCTACCATAGC 3 '	359 bp	Identificação de espécies	Sasaki <i>et al.</i> 2010

2.5 Amplificação do gene que codifica a lipoproteína

A amplificação do gene que codifica uma lipoproteína conservada em isolados de *S. aureus* foi realizada utilizando os *primers* descritos na Tabela 2, de acordo com o protocolo descrito em Rocha *et al.* (2019). Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v).

2.6 Análise *in silico* da estrutura da lipoproteína

Alinhamentos de sequências múltiplas foram conduzidos com a ferramenta Clustal Omega 2.1 usando as sequências aminoacídicas da lipoproteína cl3700 das cepas clínicas *S. aureus* RF122 e N305 e das cepas subclínicas *S. aureus* 170, 302, 1269 e 1364. O esquema de cores Zappo foi usado no Jalview 2.10.5 como um recurso visual para distinguir resíduos de aminoácidos de diferentes classes.

3. RESULTADOS

3.1 Diversidade genética dos isolados de campo

A amplificação do gene *nuc* resultou em um amplicon de 359 bp em todos os isolados de campo usados neste estudo, confirmando a identidade da bactéria como sendo *S. aureus*. Visto que alguns isolados foram coletados no mesmo rebanho, investigamos a diversidade genética entre eles por MLVA, a fim de garantir que isolados geneticamente distintos fossem usados na análise. Se os isolados apresentassem o mesmo tipo de MLVA e fossem oriundos do mesmo rebanho, apenas um seria posteriormente caracterizado como o isolado representativo desse tipo MLVA. As bactérias foram agrupadas em 54 grupos com base em um ponto de corte de 80% de similaridade (Fig. 2). Os isolados subclínicos e clínicos foram distribuídos em 25 e 32 grupos, respectivamente. Dos 54 grupos, 3 continham representantes de ambas as manifestações, clínica e subclínica. Os perfis de bandas dos isolados causadores de mastite clínica ou subclínica mostraram-se sempre distintos (Fig. S1). Um total de 108 isolados coletados em 13 cidades do Sudeste do Brasil foram distribuídos em 33 grupos distintos, enquanto 15 isolados provenientes da região Nordeste foram colocados em 12 grupos. Alguns isolados obtidos em diferentes rebanhos apresentaram maior similaridade e foram agrupados no mesmo grupo, como 4081 (Juiz de Fora - MG) e 3212 (Barra Mansa - RJ) ou 46T-8 (Botelhos - MG) e 43T-13 (Espírito Santo do Pinhal - SP). Dois isolados (125 PD276 e 64PD-1002) exibiram maior proximidade genética com isolados de outros estados do que com aqueles de onde foram coletados.

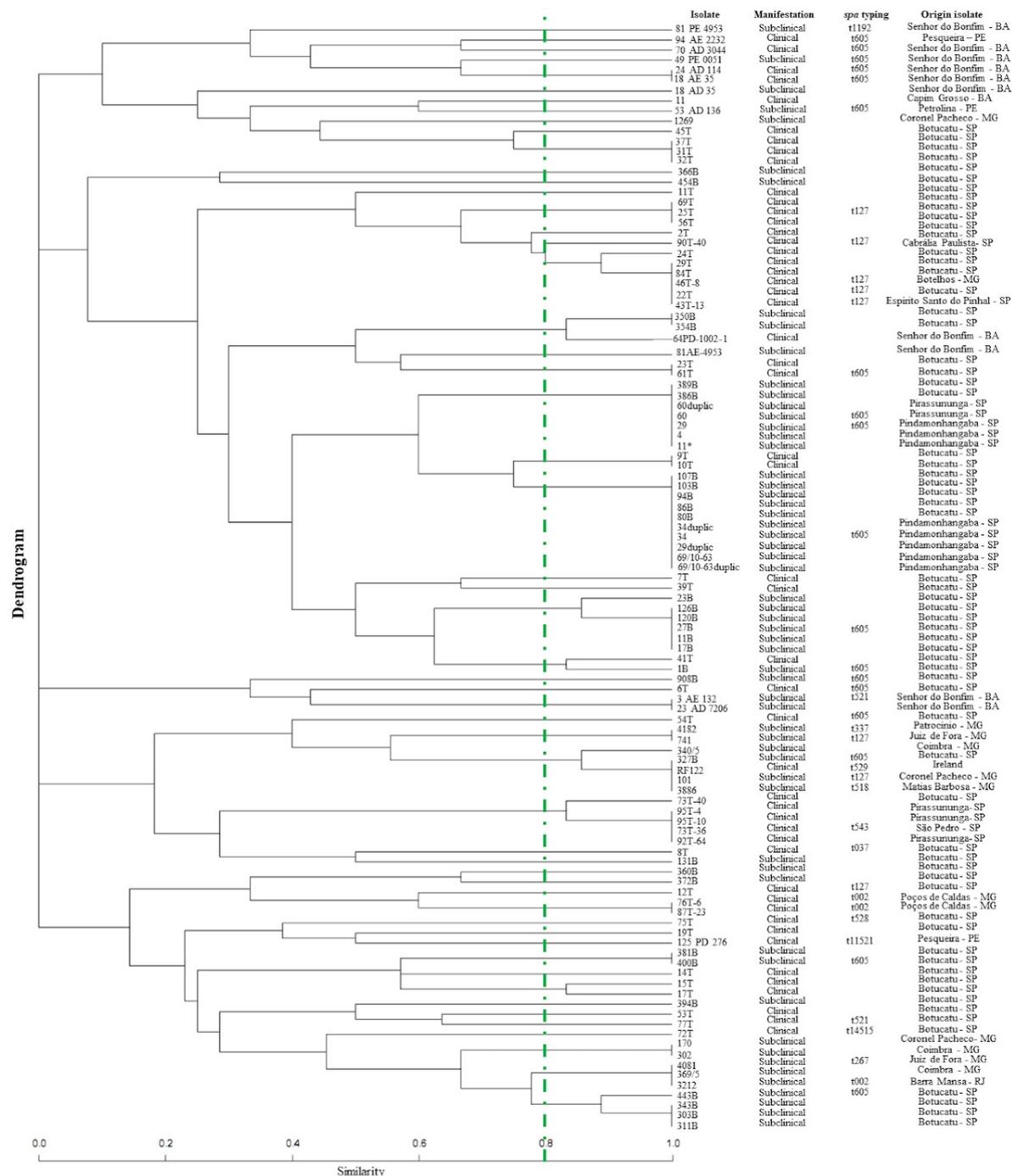


Fig 2. Dendrograma mostrando a similaridade genética entre isolados de *Staphylococcus aureus* bovinos determinados por VNTR. O agrupamento foi feito por meio do software RStudio, calculando a similaridade com o coeficiente de Jaccard.

A diversidade genética de 41 isolados escolhidos entre diferentes grupos também foi avaliada por tipagem de *spa*. Os resultados do sequenciamento revelaram 13 tipos de *spa*,

distribuídos em dezesseis locais (Fig. 2, Tabela S1). Os tipos mais frequentes foram t605 (19/41), t127 (8/41) e t002 (3/41). Os tipos menos frequentes, com apenas um único representante, foram t037, t11521, t1192, t14515, t267, t337, t518, t521, t54. Entre os tipos que foram selecionados para sequenciamento, t11521, t1192, t521 foram encontrados exclusivamente na região Nordeste, enquanto t605 foi amplamente distribuído no país. Foram detectadas disparidades entre os dois métodos usados para avaliar a diversidade genética. Isolados com o mesmo tipo de *spa* foram observados em diferentes grupos MLVA, como 53 AD 136, 6T, 27B, 400B (todos t605), enquanto isolados com tipos distintos de *spa*, como 101 (t127), RF122 (t529) e 3386 (t518) foram agrupados no mesmo grupo MLVA. Esses resultados confirmam que esse estudo abrangeu bactérias de diferentes origens genéticas.

3.2 Discriminação dos isolados usando o gene que codifica a lipoproteína

O DNA total foi amplificado por PCR com o par de *primers* LipoP-F-CS/LipoP-RC, que tem como alvo uma região no gene que codifica a lipoproteína, presente apenas em isolados de mastite clínica de acordo com a análise *in silico* prévias. Todas as bactérias isoladas de mastite clínica mostraram amplificação para o gene da lipoproteína, exceto para 70 AD 3044, 18 AD 35, 5, 11 e 64 PD1002 (Fig. 3). Esses falsos negativos foram isolados em rebanhos localizados na região Nordeste. Quando o DNA total dos isolados que causam mastite subclínica foi analisado, 31/34 não produziram amplificação. Os falsos positivos foram os isolados 53AD-136, 81AE-4953, 23AD 7206, também da região Nordeste.

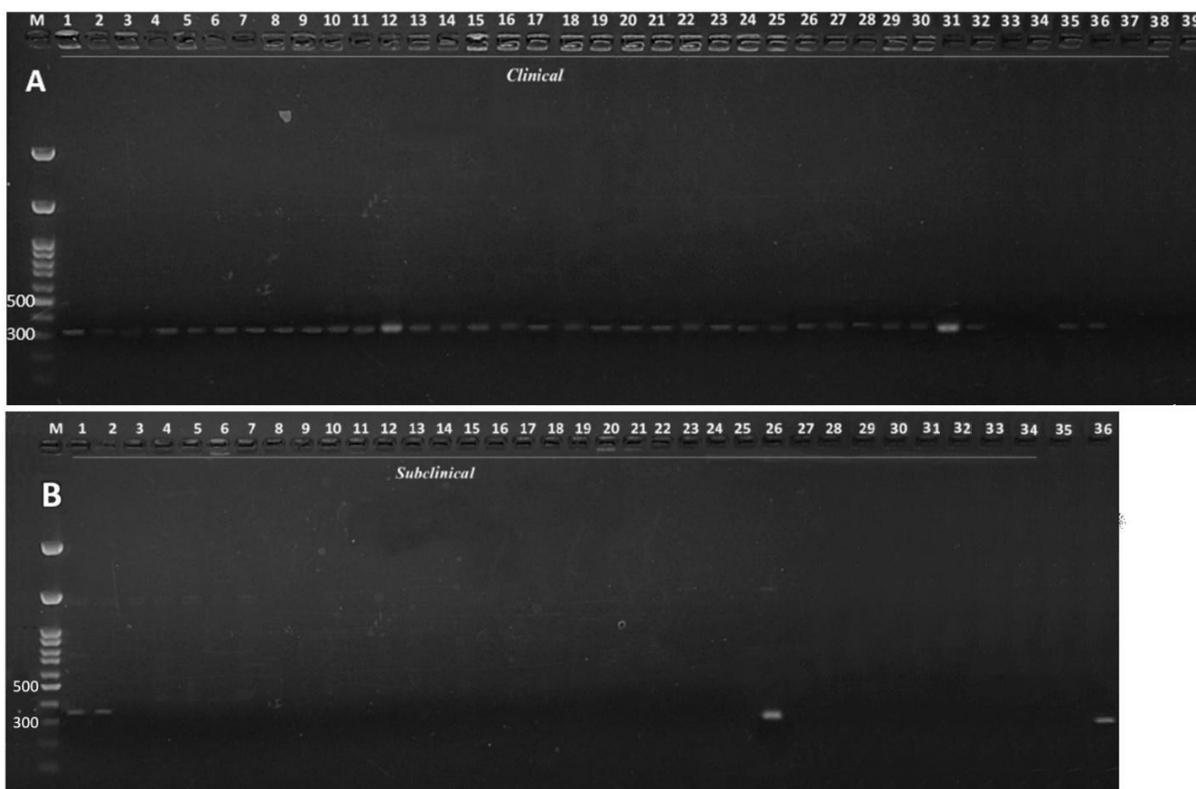


Fig 3. Amplificação de uma região da seqüência codificadora do gene da lipoproteína de 57 isolados de *Staphylococcus aureus* estudados neste trabalho. Os *primers* LipoP-F-CS e LipoP-RC foram utilizados com DNA extraído de mastite bovina isolados de *S. aureus* : A- Bactérias isoladas de animais com mastite clínica: A - Isolados causando mastite clínica: 46T8 (1), 76T6 (2), 43T13 (3), 73T36 (4), 73T 40 (5), 90T 40 (6), 2T (7), 6T (8), 7T (9), 8T (10), 10T (11), 11T (12), 12T (13), 14T (14), 15T (15), 17T (16), 19T (17), 22T (18), 24T (19), 25T (20), 29T (21), 31T (22), 39T (23), 41T (24), 45T (25), 53T (26), 54T (27), 61T (28), 72T (29), 75T (30), 77T (31), RF122 (32), 11 (33), 64 PD 1002 (34), 125 PD 276 (35), 94 AE 2232 (36), 70 AD 3044 (37), 18 AD 35 (38). Água foi usada como controle negativo (33). *FastGene 100bp* foi usado como um marcador de peso molecular (M). B - Bactérias isoladas de animais apresentando mastite subclínica: 23 AD 7206 (1), 81 AE 4953 (2), 369/5 (3), 741 (4), 101 (5), 3886 (6), 4081 (7), 4182 (8), 11 * (9), 29 (10), 60 (11), 1B (12), 23B (13), 27B (14), 80B (15), 131B (16), 303B (17), 327B (18), 350B (19), 360B (20), 366B (21), 372B (22), 381B (23), 389B (24), 394B (25), 53 AD 136 (26), 908B (27), 3212 (28), 454B (29) 340/5 (30), 49 PE 0051 (31), 81 PE 4953 (32), 18 AE 35 (33), 302 (34). Foi usada água como controle negativo (35) DNA total de *S. aureus* RF122 foi usado como controle positivo (36). *FastGene 100bp* foi usado como marcador de peso molecular (M).

3.3 Estrutura da lipoproteína

Uma representação esquemática da lipoproteína cl3700 é apresentada na Fig. 4A e mostra os locais para ligação dos *primers* LipoP-F-CS e LipoP-R-FC. O último tem 100% de

identidade com o local de ligação presente nas cepas RF122 e N305 (clínicos), mas apenas 55,7% com as regiões em 170, 302, 1269, 1364 (subclínicos) (Tabela S2). Portanto, a combinação desses dois *primers* só resultaria em amplificação quando o DNA total dos isolados causadores de mastite clínica fosse analisado. O alinhamento das sequências de aminoácidos da lipoproteína das seis cepas revelou uma região diferencial que tinha baixa conservação de sequência (Fig. 4C). A identidade foi maior (99,2%) entre RF122 e N305, mas menor (65,5%) com outras cepas (Fig. S2). Nesta região, na mesma posição no alinhamento, há uma troca de aminoácidos entre as cepas clínicas e subclínicas (Fig. 4C, 4B, 4D). Por exemplo, a posição 211 contém um resíduo de metionina (hidrofóbico) em RF122 e N305, enquanto a mesma posição é ocupada por um resíduo de arginina (carregado positivamente) nas outras cepas. Da mesma forma, os resíduos nas posições 149 e 174 são ocupadas por uma glicina (sem cadeia lateral) nas cepas clínicas, enquanto as mesmas posições contêm um resíduo de lisina (positivo) e um resíduo de asparagina (negativo), respectivamente, nas outras cepas.

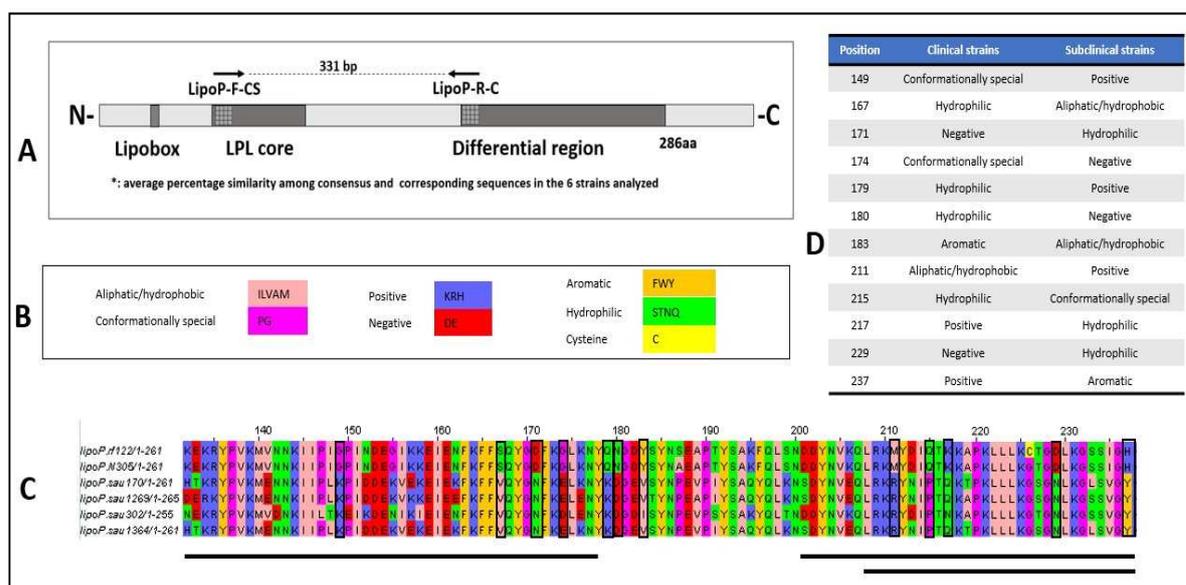


Fig 4. Análise *in silico* da lipoproteína de seis cepas de *Staphylococcus aureus*. Uma representação esquemática que mostra as características encontradas na lipoproteína (A), como a lipobox, o determinante estrutural para a modificação de lipídios bacterianos, o núcleo de *LPL*, característica das lipoproteínas homólogas "semelhantes à lipoproteína" (*lpl*) dispostas em tandem. Os locais de ligação dos *primers* LipoP-F-CS e LipoP-RC são mostrados. Resíduos de aminoácidos de acordo com suas propriedades químicas usando o esquema de cores Zappo (B). Alinhamento de sequência múltipla por Clustal Omega da região diferencial das cepas *S. aureus* RF122 e N305, e *S. aureus* 170, 302, 1269, 1364

em Jalview 2.10.5 (C). As caixas pretas em C destacam as 12 posições com um padrão conservado de substituições de aminoácidos de diferentes classes entre cepas clínicas e subclínicas, que estão resumidas também em D. As barras mostram as regiões onde os peptídeos estudados por Tribelli *et al.* (2020) se sobrepõem.

4. DISCUSSÃO

A mastite bovina causada por *S. aureus* pode se manifestar como uma infecção clínica ou subclínica, sendo essa última mais frequente. Embora esse resultado dependa da interação hospedeiro-patógeno, os determinantes bacterianos podem ajudar a orquestrar a manifestação da doença. Em um trabalho anterior, encontramos diferenças de nucleotídeos em um gene de 780 pb que codifica uma lipoproteína nas cepas *S. aureus* RF122 e N305, que causam mastite clínica severa e leve, respectivamente, em comparação a quatro cepas (170, 302, 1269, 1364), isoladas de animais com mastite subclínica persistente (Rocha *et al.*, 2019). Embora os achados *in silico* tenham sido replicados em 24 isolados brasileiros de campo, essas bactérias foram isoladas de doze rebanhos de dois estados brasileiros sem que o histórico genético das mesmas tenha sido considerado.

Neste estudo, ampliamos o número de isolados para 108, coletados em rebanhos leiteiros de cinco estados localizados nas regiões Nordeste e Sudeste do Brasil. No entanto, alguns deles foram isolados no mesmo rebanho. Para certificar que bactérias distintas foram analisadas neste estudo, avaliamos inicialmente a diversidade genética por tipagem MLVA, um método que tem sido usado para genotipar cepas bovinas de *S. aureus* com bom poder discriminatório (Gilbert *et al.*, 2006; Ikawaty *et al.*, 2009). Os tipos de MLVA foram distribuídos em 54 grupos. Em seguida, 41 isolados foram então selecionados aleatoriamente de diferentes grupos para garantir que pertenciam a tipos distintos de *spa*. Os resultados do sequenciamento confirmaram a presença de treze tipos. t002, t037, t127, t267, t518, t521, t543 t605 e t1192 já haviam sido relatados antes em rebanhos brasileiros (Aires-de-Sousa *et al.*, 2007; de Abreu, 2017; Rodrigues, 2016; Bonsaglia *et al.*, 2018). Este é o primeiro relato dos tipos de *spa* t1451, t337 e t528 no país. De acordo com o Ridom Spa Server, o tipo t1451 foi relatado apenas em um único isolado de *S. aureus* da Austrália. Além disso, t337 e t528 foram relatados em outros estudos com isolados bovinos da América do Norte e Europa (Haran *et al.*, 2012; Bergonier *et al.*, 2014; Boss *et al.*, 2016).

Diferenças na sequência de nucleotídeos de um gene de lipoproteína entre cepas clínicas e subclínicas estudadas por Rocha et al (2019) permitiram desenhar o *primer* LipoP-RC, que tinha 100% de identidade com RF122/N305 (clínicas), mas apenas 55,7% com as outras quatro cepas de manifestação subclínica. Aqui, mostramos que 89,47% dos isolados de campo coletados de animais com mastite clínica produziram um fragmento de DNA com o conjunto de *primers* LipoP-F-CS/LipoP-RC, enquanto o mesmo resultado foi observado apenas em 8,82% dos isolados relacionados à mastite subclínica. Esses resultados sugerem uma variação do gene da lipoproteína entre os isolados de campo estudados, o que pode influenciar no destino da infecção apresentada pelos animais. A variação genética a nível de nucleotídeos pode alterar a estrutura tridimensional da proteína, o que por sua vez, pode ocasionar variações fenotípicas na bactéria. Os aminoácidos presentes em uma região da lipoproteína, designada como região diferencial, apresentaram 99,22% de identidade entre RF122/N305, mas apenas 65,58% de identidade entre 170, 302, 1269, 1364 (subclínicas). O alinhamento desta região confirmou que muitos aminoácidos foram substituídos por outros com propriedades químicas distintas (Fig. 4C).

As lipoproteínas bacterianas (Lpp) são a principal classe de proteínas de superfície em *S. aureus* e algumas delas são organizadas em um agrupamento de genes (*lpl*) dentro da ilha genômica vSaa (Baba et al., 2008). A deleção desse agrupamento do patógeno humano *S. aureus* USA300 diminuiu significativamente seu potencial de invasão nas células hospedeiras e sua patogenicidade (Nguyen et al., 2015). Recentemente, foi demonstrado que a *LPL1* de USA300 interage em seu terminal C com a chaperona Hsp90 na superfície celular do hospedeiro, induzindo a formação da actina F e, portanto, desencadeando uma internalização semelhante à endocitose (Tribelli et al., 2020). Além disso, os peptídeos localizados no C-terminal aumentaram a internalização bacteriana e aumentaram significativamente a formação de F-actina, em comparação com peptídeos localizados em outras regiões da proteína. Dado que esses peptídeos se sobrepõem à região diferencial presente na lipoproteína (barras na Fig. 4C), sugerimos que essas diferenças de sequência podem afetar a internalização bacteriana. Foi demonstrado que *S. aureus* isolado de vacas com mastite subclínica tem a capacidade de invadir as células do hospedeiro, um importante fenótipo que tem sido associado à persistência (Grunert et al., 2018). Nossos resultados

sugerem uma variação do gene da lipoproteína entre os isolados de campo estudados que pode influenciar a invasão bacteriana e o tipo de manifestação apresentada pelos animais. As diferenças encontradas na lipoproteína podem ser decorrentes de amostragem insuficiente ou enviesada, uma vez que a grande maioria dos isolados foi coletada no Sudeste do Brasil. No entanto, nossos achados mostram uma nova evidência que merece uma investigação mais aprofundada.

Em resumo, este estudo encontrou diferenças em uma lipoproteína de isolados de campo de *S. aureus*, as quais foram capazes de separá-los em dois grupos de acordo com as formas clínicas ou subclínicas de mastite bovina. Dado o papel da lipoproteína na invasão bacteriana da célula hospedeira, este estudo fornece evidências de que diferenças na sequência de aminoácidos proteína podem impactar a interação com as células mamárias e o destino bacteriano dentro do hospedeiro.

5. CONCLUSÃO

Mostramos diferenças em um gene de lipoproteína de isolados de campo de *S. aureus* que foram capazes de separá-los em dois grupos de acordo com a manifestação da doença, e que essas diferenças não se restringiram a tipos específicos de MLVA ou de *spa*. Dado o papel da lipoproteína na invasão bacteriana da célula hospedeira, este estudo fornece evidências de que as diferenças a nível de sequência podem impactar a interação com as células mamárias e o destino bacteriano dentro do hospedeiro.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aasharaj, V.K.; Tresamol, P. V.; Deepa, P.M.; Latha, C. Comparison of efficacy of three cow side tests for the diagnosis of subclinical mastitis in dairy cattle. **Imperial Journal of Interdisciplinary Research**, 3, 417–418. 2017.
- Acosta, A.C.; da Silva, L.B.G.; Medeiros, E.S.; Pinheiro-Júnior, J.W.; Mota, R.A. Mastitis in ruminants in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 36, 565–573. 2016. doi:10.1590/S0100-736X2016000700001
- Acosta, A.C.; Matiuzzi Costa, M.; Pinheiro Junior, J.W.; Mota, R.A. Fatores de virulência de *Staphylococcus aureus*. **Medicina Veterinária**, 11, 252. 2018. doi:10.26605/medvet-n4-1955

- Aghamohammadi, M.; Haine, D.; Kelton, D.F.; Barkema, H.W.; Hogeveen, H.; Keefe, G.P.; Dufour, S. Herd-level mastitis-associated costs on Canadian dairy farms. **Frontiers in Veterinary Science**, 5, 1–12. 2018. doi:10.3389/fvets.2018.00100
- Aires-de-Sousa, M.; Parente, C.E.S.R.; Vieira-da-Motta, O.; Bonna, I.C.F.; Silva, D.A.; De Lencastre, H. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from buffalo, bovine, ovine, and caprine milk samples collected in Rio de Janeiro State, **Brazilian Applied Environmental Microbiology**, 73, 3845–3849. 2007. doi:10.1128/AEM.00019-07
- Almeida, L.M.; Almeida, M.Z.P.R.B.; Mendonça, C.L.; Mamizuka, E.M. Comparative analysis of agr groups and virulence genes among subclinical and clinical mastitis *Staphylococcus aureus* isolates from sheep flocks of the Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 44(2). 2013. doi:10.1590/S1517-83822013000200026
- Arnaud, M.; Chastanet, A.; Débarbouillé, M. New Vector for Efficient Allelic Replacement in Naturally Gram-Positive Bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, 70, 6887–6891. 2004. doi:10.1128/AEM.70.11.6887
- Ashraf, A.; Imran, M. Diagnosis of bovine mastitis: from laboratory to farm. **Tropical Animal Health Production**, 50, 1193–1202. 2018. doi:10.1007/s11250-018-1629-0
- Baba, T.; Bae, T.; Schneewind, O.; Takeuchi, F.; Hiramatsu, K. Genome sequence of *Staphylococcus aureus* strain newman and comparative analysis of staphylococcal genomes: Polymorphism and evolution of two major pathogenicity islands. **Journal of Bacteriology**, 190, 300–310. 2008. doi:10.1128/JB.01000-07
- Bardiau, M.; Caplin, J.; Dettileux, J.; Graber, H.; Moroni, P.; Taminiou, B.; Mainil, J.G. Existence of two groups of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis based on biofilm formation, intracellular survival, capsular profile and agr-typing. **Veterinary Microbiology**, 185, 1–6. 2016. doi:10.1016/j.vetmic.2016.01.003
- Bardiau, M.; Dettileux, J.; Farnir, F.; Mainil, J.G.; Ote, I. Associations between properties linked with persistence in a collection of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, 169, 74–79. 2014. doi:10.1016/j.vetmic.2013.12.010
- Ben Zakour, N.L.; Sturdevant, D.E.; Even, S.; Guinane, C.M.; Barbey, C.; Alves, P.D.; Cochet, M.F.; Gautier, M.; Otto, M.; Fitzgerald, J.R.; Le Loir, Y. Genome-wide analysis of ruminant *Staphylococcus aureus* reveals diversification of the core genome. **Journal of Bacteriology**, 190, 6302–6317. 2008. doi:10.1128/JB.01984-07
- Bergonier, D.; Sobral, D.; Feßler, A.T.; Jacquet, E.; Gilbert, F.B.; Schwarz, S.; Treilles, M.; Bouloc, P.; Pourcel, C.; Vergnaud, G. *Staphylococcus aureus* from 152 cases of bovine, ovine and caprine mastitis investigated by Multiple-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). **Veterinary Research**, 45. 2014. doi:10.1186/s13567-014-0097-4
- Bonsaglia, E.C.R.; Silva, N.C.C.; Rossi, B.F.; Camargo, C.H.; Dantas, S.T.A.; Langoni, H.; Guimarães, F.F.; Lima, F.S.; Fitzgerald, J.R.; Fernandes, A.; Rall, V.L.M. Molecular

- epidemiology of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) isolated from milk of cows with subclinical mastitis. **Microbial Pathogens**. 124, 130–135. 2018. doi:10.1016/j.micpath.2018.08.031
- Boss, R.; Cosandey, A.; Luini, M.; Artursson, K.; Bardiau, M.; Breitenwieser, F.; Hehenberger, E.; Lam, T.; Mansfeld, M.; Michel, A.; Mösslacher, G.; Naskova, J.; Nelson, S.; Podpečan, O.; Raemy, A.; Ryan, E.; Salat, O.; Zangerl, P.; Steiner, A.; Graber, H.U. Bovine *Staphylococcus aureus*: Subtyping, evolution, and zoonotic transfer. **Journal of Dairy Science**, 99, 515–528. 2016. doi:10.3168/jds.2015-9589
- Bouchard, D.S.; Rault, L.; Berkova, N.; Le Loir, Y.; Even, S. Inhibition of *Staphylococcus aureus* invasion into bovine mammary epithelial cells by contact with live *Lactobacillus casei*. **Applied Environmental Microbiology**, 79, 877–885. 2013. doi:10.1128/AEM.03323-12
- Brito, M.A.V.P.; Brito, J.R.F.; Ribeiro, M.T.; Veiga, V.M.O. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol.51, pp.129-135. 1999. doi:10.1590/S0102-09351999000200001
- Busanello, M.; Rossi, R.S.; Cassoli, L.D.; Pantoja, J.C.F.; Machado, P.F. Estimation of prevalence and incidence of subclinical mastitis in a large population of Brazilian dairy herds. **Journal of Dairy Science**, 100, 6545–6553. 2017. doi:10.3168/jds.2016-12042
- Cervinkova, D.; Vlkova, H.; Borodacova, I.; Makovcova, J.; Babak, V.; Lorencova, A.; Vrtkova, I.; Marosevic, D.; Jaglic, Z. Prevalence of mastitis pathogens in milk from clinically healthy cows. **Veterinary Medicine (Praha)**, 58, 567–575. 2013. doi:10.17221/7138-VETMED
- Chen, W.; Zhang, Y.; Yeo, W.S.; Bae, T.; Ji, Q. Rapid and Efficient Genome Editing in *Staphylococcus aureus* by Using an Engineered CRISPR/Cas9 System. **Journal of American Chemical Society**, 139, 3790–3795. 2017. doi:10.1021/jacs.6b13317
- Constable, A.J.; Costa, D.P.; Schofield, O.; Newman, L.; Urban, E.R.; Fulton, E.A.; Melbourne-Thomas, J.; Ballerini, T.; Boyd, P.W.; Brandt, A.; de la Mare, W.K.; Edwards, M.; Eléaume, M.; Emmerson, L.; Fennel, K.; Fielding, S.; Griffiths, H.; Gutt, J.; Hindell, M.A.; Hofmann, E.E.; Jennings, S.; La, H.S.; McCurdy, A.; Mitchell, B.G.; Moltmann, T.; Muelbert, M.; Murphy, E.; Press, A.J.; Raymond, B.; Reid, K.; Reiss, C.; Rice, J.; Salter, I.; Smith, D.C.; Song, S.; Southwell, C.; Swadling, K.M.; Van de Putte, A.; Willis, Z. Developing priority variables (“ecosystem Essential Ocean Variables” - eEOVs) for observing dynamics and change in Southern Ocean ecosystems. **Journal of Marine Systems**, 161, 26–41. 2016. doi:10.1016/j.jmarsys.2016.05.003
- Cremonesi, P.; Pozzi, F.; Raschetti, M.; Bignoli, G.; Capra, E.; Graber, H.U.; Vezzoli, F.; Piccinini, R.; Bertasi, B.; Biffani, S.; Castiglioni, B.; Luini, M. Genomic

- characteristics of *Staphylococcus aureus* strains associated with high within-herd prevalence of intramammary infections in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 98, 6828–6838. 2015. doi:10.3168/jds.2014-9074
- da Costa, L.B.; Rajala-Schultz, P.J.; Hoet, A.; Seo, K.S.; Fogt, K.; Moon, B.S. Genetic relatedness and virulence factors of bovine *Staphylococcus aureus* isolated from teat skin and milk. **Journal of Dairy Science**, 97, 6907–6916. 2014. doi:10.3168/jds.2014-7972
- da Silva Duarte, V.; Treu, L.; Sartori, C.; Dias, R.S.; da Silva Paes, I.; Vieira, M.S.; Santana, G.R.; Marcondes, M.I.; Giacomini, A.; Corich, V.; Campanaro, S.; da Silva, C.C.; de Paula, S.O. Milk microbial composition of Brazilian dairy cows entering the dry period and genomic comparison between *Staphylococcus aureus* strains susceptible to the bacteriophage vB_SauM-UFV_DC4. **Science Reports**, 10, 1–13. 2020. doi:10.1038/s41598-020-62499-6
- Eddy, S.R. A New Generation of Homology Search Tools Based on Probabilistic Inference. **Math. Comput. Science Medicine Genome informatics. International Conference of Genome Informatics**, 23, 205–211. 1990. doi:10.1142/9781848165632_0019
- Fang, R.; Cui, J.; Cui, T.; Guo, H.; Ono, H.K.; Park, C.H.; Okamura, M.; Nakane, A.; Hu, D.L. Staphylococcal enterotoxin C is an important virulence factor for mastitis. **Toxins (Basel)**, 11, 1–13. 2019. doi:10.3390/toxins11030141
- Francisco, M.S.; Farias, F.M.; Santos, I.N.S.; Marques-Bastos, S.L.S.; Albano, R.M.; Bastos, M. do C.F. Draft genome sequence of *Staphylococcus aureus* 4185, a strain that produces aureocyclicin 4185. **Genome Announcements**, 5, 1–2. 2017. doi:10.1128/genomeA.01249-17
- Francois, P.; Huyghe, A.; Charbonnier, Y.; Bento, M.; Herzig, S.; Topolski, I.; Fleury, B.; Lew, D.; Vaudaux, P.; Harbarth, S.; Van Leeuwen, W.; Van Belkum, A.; Blanc, D.S.; Pittet, D.; Schrenzel, J. Use of an automated multiple-locus, variable-number tandem repeat-based method for rapid and high-throughput genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, 43, 3346–3355. 2005. doi:10.1128/JCM.43.7.3346-3355.2005
- Fursova, K.K.; Artem'eva, O.A.; Nikanova, D.A.; Larin, A.K.; Zinovieva, N.A.; Brovko, F.A. Draft genome sequences of five *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinically healthy cows in the Russian Federation. **Genome Announcements**, 6, 1–2. 2018. doi:10.1128/genomeA.00275-18
- Geary, U.; Lopez-Villalobos, N.; Begley, N.; McCoy, F.; O'Brien, B.; O'Grady, L.; Shalloo, L. Estimating the effect of mastitis on the profitability of Irish dairy farms. **Journal of Dairy Science**, 95, 3662–3673. 2012. doi:10.3168/jds.2011-4863
- Gilbert, F.B.; Fromageau, A.; G lineau, L.; Poutrel, B. Differentiation of bovine *Staphylococcus aureus* isolates by use of polymorphic tandem repeat typing. **Veterinary Microbiology**, 117, 297–303. 2006. doi:10.1016/j.vetmic.2006.04.029

- Gomes, F.; Henriques, M. Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches. **Current Microbiology**, 72, 377–382. 2016. doi:10.1007/s00284-015-0958-8
- Grunert, T.; Stessl, B.; Wolf, F.; Sordelli, D.O.; Buzzola, F.R.; Ehling-Schulz, M. Distinct phenotypic traits of *Staphylococcus aureus* are associated with persistent, contagious bovine intramammary infections. **Science Reports**, 8, 1–10. 2018. doi:10.1038/s41598-018-34371-1
- Hair, P.S.; Echague, C.G.; Sholl, A.M.; Watkins, J.A.; Geoghegan, J.A.; Foster, T.J.; Cunnion, K.M. Clumping factor A interaction with complement factor I increases C3b cleavage on the bacterial surface of *Staphylococcus aureus* and decreases complement-mediated phagocytosis. **Infection and Immunology**, 78, 1717–1727. 2010. doi:10.1128/IAI.01065-09
- Hair, P.S.; Ward, M.D.; Semmes, O.J.; Foster, T.J.; Cunnion, K.M. *Staphylococcus aureus* Clumping Factor A Binds to Complement Regulator Factor I and Increases Factor I Cleavage of C3b. **Journal of Infectious Diseases**, 198, 125–133. 2008. doi:10.1086/588825
- Haran, K.P.; Godden, S.M.; Boxrud, D.; Jawahir, S.; Bender, J.B.; Sreevatsan, S. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, isolated from bulk tank milk from Minnesota dairy farms. **Journal of Clinical Microbiology**, 50, 688–695. 2012. doi:10.1128/JCM.05214-11
- Haveri, M.; Hovinen, M.; Roslöf, A.; Pyörälä, S. Molecular types and genetic profiles of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine intramammary infections and extramammary sites. **Journal of Clinical Microbiology**, 46, 3728–3735. 2008. doi:10.1128/JCM.00769-08
- Hensen, S.M.; Pavičić, M.J.A.M.P.; Lohuis, J.A.C.M.; Poutrel, B. Use of bovine primary mammary epithelial cells for the comparison of adherence and invasion ability of *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Dairy Science**, 83, 418–429. 2000. doi:10.3168/jds.S0022-0302(00)74898-3
- Herron-Olson, L.; Fitzgerald, J.R.; Musser, J.M.; Kapur, V. Molecular correlates of host specialization in *Staphylococcus aureus*. **PLoS One**, 2. 2007. doi:10.1371/journal.pone.0001120
- Hoekstra, J.; Rutten, V.; Sommeling, L.; van Werven, T.; Spaninks, M.; Duim, B.; Benedictus, L.; Koop, G. High production of LukMF' in *Staphylococcus aureus* field strains is associated with clinical bovine mastitis. **Toxins (Basel)**, 10, 1–10. 2018. doi:10.3390/toxins10050200
- Ikawaty, R.; Brouwer, E.C.; Jansen, M.D.; van Duijkeren, E.; Mevius, D.; Verhoef, J.; Fluit, A.C. Characterization of Dutch *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis using a Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis. **Veterinary Microbiology**, 136, 277–284. 2009. doi:10.1016/j.vetmic.2008.10.034

- Jenkins, A.; Diep, A.; Mai, T.T.; Vo, N.H.; Warrenner, P.; Suzich, J.; Stover, C.K.; Sellman, R. Differential Expression and Roles of. **MBio**, 6, 1–10. 2015. doi:10.1128/mBio.02272-14.Editor
- Kant, R.; Taponen, S.; Koort, J.; Paulin, L.; Åvall-Jääskeläinen, S.; Palva, A. Genome sequences of four *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. **Genome Announcements**, 3, 2006–2007. 2016. doi:10.1128/genomeA.00334-15
- Ko, D.S.; Kim, D.; Kim, E.K.; Kim, J.H.; Kwon, H.J. Evolution of a major bovine mastitic genotype (rpoB sequence type 10-2) of *Staphylococcus aureus* in cows. **Journal of Microbiology**, 57, 587–596. 2019. doi:10.1007/s12275-019-8699-1
- Kosakovsky Pond, S.L.; Frost, S.D.W.; Muse, S. V. HyPhy: Hypothesis testing using phylogenies. **Bioinformatics**, 21, 676–679. 2005. doi:10.1093/bioinformatics/bti079
- Krewer, C.C.; Izabela, I.P.; Amanso, E.S.; Cavalcante, N.B.; de M. Peixoto, R.; Pinheiro, J.W.; da Costa, M.M.; Mota, R.A. Etiology, antimicrobial susceptibility profile of *Staphylococcus spp.* and risk factors associated with bovine mastitis in the states of Bahia and pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 33, 601–606. 2013. doi:10.1590/S0100-736X2013000500009
- Le Maréchal, C.; Seyffert, N.; Jardin, J.; Hernandez, D.; Jan, G.; Rault, L.; Azevedo, V.; François, P.; Schrenzel, J.; van de Guchte, M.; Even, S.; Berkova, N.; Thiéry, R.; Fitzgerald, J.R.; Vauto, E.; Le Loir, Y. Molecular basis of virulence in *Staphylococcus aureus* mastitis. **PLoS One**, 6. 2011. doi:10.1371/journal.pone.0027354
- Li, T.; Lu, H.; Wang, X.; Gao, Q.; Dai, Y.; Shang, J.; Li, M. Molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis between 2014 and 2015. **Frontiers in Cell Infection and Microbiology**, 7, 1–10. 2017. doi:10.3389/fcimb.2017.00127
- Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, 25, 402–408. 2001. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Löffler, B.; Tuchscher, L.; Niemann, S.; Peters, G. *Staphylococcus aureus* persistence in non-professional phagocytes. **International Journal of Medical Microbiology**, 304, 170–176. 2014. doi:10.1016/j.ijmm.2013.11.011
- Lopes, M.A.; Demeu, F.A.; Rocha, C.M.B.M. da, Costa, G.M. da, Franco Neto, A.; Santos, G. dos. Avaliação do impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos leiteiros. **Arquivos do Instituto Biológico**, 79, 477–483. 2012. doi:10.1590/s1808-16572012000400003
- Marbach, H.; Mayer, K.; Vogl, C.; Lee, J.Y.H.; Monk, I.R.; Sordelli, D.O.; Buzzola, F.R.; Ehling-Schulz, M.; Grunert, T. Within-host evolution of bovine *Staphylococcus aureus* selects for a SigB-deficient pathotype characterized by reduced virulence but enhanced proteolytic activity and biofilm formation. **Science Reports**, 9, 1–12. 2019. doi:10.1038/s41598-019-49981-6

- Martignani, E.; Accornero, P.; Miretti, S.; Baratta, M. Bovine Mammary Organoids: A Model to Study Epithelial Mammary Cells. In: Baratta M. (eds) Epithelial Cell Culture.; in: *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, New York, NY. **Humana Press**, pp. 137–144. 2018. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8600-2_14
- McCarthy, A.J.; Lindsay, J.A. *Staphylococcus aureus* innate immune evasion is lineage-specific: A bioinformatics study. **Infection, Genetics and Evolution**, 19, 7–14. 2013. doi:10.1016/j.meegid.2013.06.012
- Müller, P.; Müller-Anstett, M.; Wagener, J.; Gao, Q.; Kaesler, S.; Schaller, M.; Biedermann, T.; Götz, F. The *Staphylococcus aureus* lipoprotein SitC colocalizes with toll-like receptor 2 (TLR2) in murine keratinocytes and elicits intracellular TLR2 accumulation. **Infection and Immunity**, 78, 4243–4250. 2010. doi:10.1128/IAI.00538-10
- Nguyen, M.T.; Götz, F. Lipoproteins of Gram-Positive Bacteria: Key Players in the Immune Response and Virulence. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 80, 891–903. 2016. doi:10.1128/MMBR.00028-16.
- Nguyen, M.T.; Kraft, B.; Yu, W.; Demicrioglu, D.D.; Hertlein, T.; Burian, M.; Schmalzer, M.; Boller, K.; Bekeredjian-Ding, I.; Ohlsen, K.; Schitteck, B.; Götz, F. The vSaa Specific Lipoprotein Like Cluster (*lpl*) of *S. aureus* USA300 Contributes to Immune Stimulation and Invasion in Human Cells. **PLoS Pathogens**, 11, 1–27. 2015. doi:10.1371/journal.ppat.1004984
- Oviedo-Boyso, J.; Cardoso-Correa, B.I.; Cajero-Juárez, M.; Bravo-Patiño, A.; Valdez-Alarcón, J.J.; Baizabal-Aguirre, V.M. The capacity of bovine endothelial cells to eliminate intracellular *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* is increased by the proinflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β . **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 54, 53–59. 2008. doi:10.1111/j.1574-695X.2008.00447.x
- Peton, V.; Bouchard, D.S.; Almeida, S.; Rault, L.; Falentin, H.; Jardin, J.; Jan, G.; Hernandez, D.; François, P.; Schrenzel, J.; Azevedo, V.; Miyoshi, A.; Berkova, N.; Even, S.; Le Loir, Y. Fine-tuned characterization of *Staphylococcus aureus* Newbould 305, a strain associated with mild and chronic mastitis in bovines. **Veterinary Research**, 45, 1–15. 2014. doi:10.1186/s13567-014-0106-7
- Peton, V.; Le Loir, Y. *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. **Infection, Genetics and Evolution**, 21, 602–615. 2014. doi:10.1016/j.meegid.2013.08.011
- Pickering, A.C.; Vitry, P.; Prystopiuk, V.; Garcia, B.; Höök, M.; Schoenebeck, J.; Geoghegan, J.A.; Dufrière, Y.F.; Ross Fitzgerald, J. Host-specialized fibrinogen-binding by a bacterial surface protein promotes biofilm formation and innate immune evasion. **PLoS Pathogens**, 15, 1–24. 2019. doi:10.1371/journal.ppat.1007816
- Pinzón-Sánchez, C.; Ruegg, P.L. Risk factors associated with short-term post-treatment outcomes of clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, 94, 3397–3410. 2011. doi:10.3168/jds.2010-3925

- Price, M.N.; Dehal, P.S.; Arkin, A.P. FastTree 2 - Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. **PLoS One**, 5. 2010 doi:10.1371/journal.pone.0009490
- Radostits, O.M.; Gay, C.C.; Hinchcliff, K.W.; Constable, P.D. A Textbook of the Disease of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats. **Veterinary Medicine**, 2007.
- Rainard, P.; Foucras, G.; Fitzgerald, J.R.; Watts, J.L.; Koop, G.; Middleton, J.R. Knowledge gaps and research priorities in *Staphylococcus aureus* mastitis control. **Transboundary Emerging Diseases**, 65, 149–165. 2018. doi:10.1111/tbed.12698
- Rocha, L.S.; Silva, D.M.; Silva, M.P.; Vidigal, P.M.P.; Silva, J.C.F.; Guerra, S.T.; Ribeiro, M.G.; De Mendes, T.A.O.; De Ribon, A.O.B. Comparative genomics of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical and clinical bovine mastitis. **PLoS One**, 14, 1–19. 2019. doi:10.1371/journal.pone.0220804
- Rodrigues, M.X.; Rodrigues, M.X. University of São Paulo “ Luiz de Queiroz ” College of Agriculture Molecular characterization of bacterial isolates and microbiome : study of mastitic milk , bulk tank milk , and cheese processing plants. Piracicaba. 2016.
- Ronco, T.; Marc Stegger, K.P. Draft Genome Sequence of a Sequence *Staphylococcus aureus* Isolate from a Danish Dairy Cow with Mastitis. **Genome Announcements**, 5, 12–13. 2017.
- Sabat, A.; Krzyszton-russjan, J.; Strzalka, W.; Filipek, R.; Kosowska, K.; Hryniewicz, W.; Travis, J.; Potempa, J. New Method for Typing. **Society**, 41, 1801–1804. 2003. doi:10.1128/JCM.41.4.1801
- Sambrook, J.; Russell, D. Molecular Cloning, **Cold Spring Harbor Laboratory Press**. 2001. doi:10.21769/bioprotoc.143
- Sasaki, T.; Tsubakishita, S.; Tanaka, Y.; Sakusabe, A.; Ohtsuka, M.; Hirotaki, S.; Kawakami, T.; Fukata, T.; Hiramatsu, K. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, 48, 765–769. 2010. doi:10.1128/JCM.01232-09
- Shahmirzadi, S. V.; Nguyen, M.T.; Gotz, F. Evaluation of *Staphylococcus aureus* lipoproteins: Role in nutritional acquisition and pathogenicity. **Frontiers in Microbiology**, 7, 1–15. 2016. doi:10.3389/fmicb.2016.01404
- Sharp, J.A.; Echague, C.G.; Hair, P.S.; Ward, M.D.; Nyalwidhe, J.O.; Geoghegan, J.A.; Foster, T.J.; Cunnion, K.M. *Staphylococcus aureus* surface protein SdrE binds complement regulator factor H as an immune evasion tactic. **PLoS One**, 7. 2012. doi:10.1371/journal.pone.0038407
- Siemsen, D.W.; Schepetkin, I.A.; Kirpotina, L.N.; Lei, B.; Quinn, M.T. Neutrophil Isolation From Nonhuman Species.; in: Neutrophil Methods and Protocols. **Humana Press**, pp. 21–34. 2007. doi:https://doi.org/10.1007/978-1-59745-467-4_3
- Silva, D.M.; da Silva, M.P.; Vidigal, P.M.P.; Barcelos, R.M.; Klein, R.C.; Aguilar, A.P.; Fabres-Klein, M.H.; Oliveira, G.; Ribon, A.O.B. Draft genome sequences of

- Staphylococcus aureus* strains isolated from subclinical bovine mastitis in Brazil. **Genome Announcements**, 4, 15–17. 2016. doi:10.1128/genomeA.01594-15
- Simão, F.A.; Waterhouse, R.M.; Ioannidis, P.; Kriventseva, E. V.; Zdobnov, E.M. BUSCO: Assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. **Bioinformatics**, 31, 3210–3212. 2015. doi:10.1093/bioinformatics/btv351
- Smith, E.M.; Green, L.E.; Medley, G.F.; Bird, H.E.; Fox, L.K.; Schukken, Y.H.; Kruze, J. V.; Bradley, A.J.; Zadoks, R.N.; Dowson, C.G. Multilocus sequence typing of intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, 43, 4737–4743. 2005. doi:10.1128/JCM.43.9.4737-4743.2005
- Stevens, M.J.A.; Stephan, R.; Johler, S. Draft genome sequence of *Staphylococcus aureus* 1608, a strain that caused toxic mastitis in twin cows. **Genome Announcements**, 5, 7281. 2017. doi:10.1128/genomeA.01438-16
- Stutz, K.; Stephan, R.; Tasara, T. SpA, ClfA, and FnbA genetic variations lead to Staphaurex test-negative phenotypes in bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, 49, 638–646. 2011. doi:10.1128/JCM.01148-10
- Sutra, L.; Poutrel, B. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medical Microbiology**, 40, 79–89. 1994. doi:10.1099/00222615-40-2-79
- Tribelli, P.M.; Luqman, A.; Nguyen, M.T.; Madlung, J.; Fan, S.H.; Macek, B.; Sass, P.; Bitschar, K.; Schitteck, B.; Kretschmer, D.; Götz, F. *Staphylococcus aureus* Lpl protein triggers human host cell invasion via activation of Hsp90 receptor. **Cell Microbiology**, 22, 1–14. 2020. doi:10.1111/cmi.13111
- Vandenesch, F.; Lina, G.; Henry, T. *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? **Frontiers in Cellular Infection and Microbiology**, 2, 12. 2012. doi:10.3389/fcimb.2012.00012
- Veh AK.; Klein RC.; Ster C.; Keefe G.; Lacasse P.; Schol D.; Roy J-P.; Haine D.; Dufour S.; Talbot BG.; Ribon AOB; Malouin F. Genotypic and phenotypic characterization of *Staphylococcus aureus* causing persistent and nonpersistent subclinical bovine intramammary-quarter infections during lactation and at dry-off. **Journal of Dairy Science**, 98(1):155–68. 2015.
- Vieira-Da-Motta, O.; Folly, M.M.; Hagen Sakyiama, C.C. Detection of different *Staphylococcus aureus* strains in bovine milk from subclinical mastitis using PCR and routine techniques. **Brazilian Journal of Microbiology**, 32, 27–31. 2001. doi:10.1590/S1517-83822001000100007
- Vrieling, M.; Boerhout, E.M.; Van Wigcheren, G.F.; Koymans, K.J.; Mols-Vorstermans, T.G.; De Haas, C.J.C.; Aerts, P.C.; Daemen, I.J.J.M.; Van Kessel, K.P.M.; Koets, A.P.; Rutten, V.P.M.G.; Nuijten, P.J.M.; Van Strijp, J.A.G.; Benedictus, L. LukMF' is the major secreted leukocidin of bovine *Staphylococcus aureus* and is produced *in vivo* during bovine mastitis. **Science Reports**, 6, 1–12. 2016. doi:10.1038/srep37759

- Zadoks, R.N.; Middleton, J.R.; McDougall, S.; Katholm, J.; Schukken, Y.H. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. **Journal of Mammary Gland Biology Neoplasia**,16, 357–372. 2011. doi:10.1007/s10911-011-9236-y
- Zhao, X.; Lacasse, P. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. **Journal of Animal Science**, 86(13 Suppl):57-65. 2008

MATERIAL SUPLEMENTAR – CAPÍTULO 2

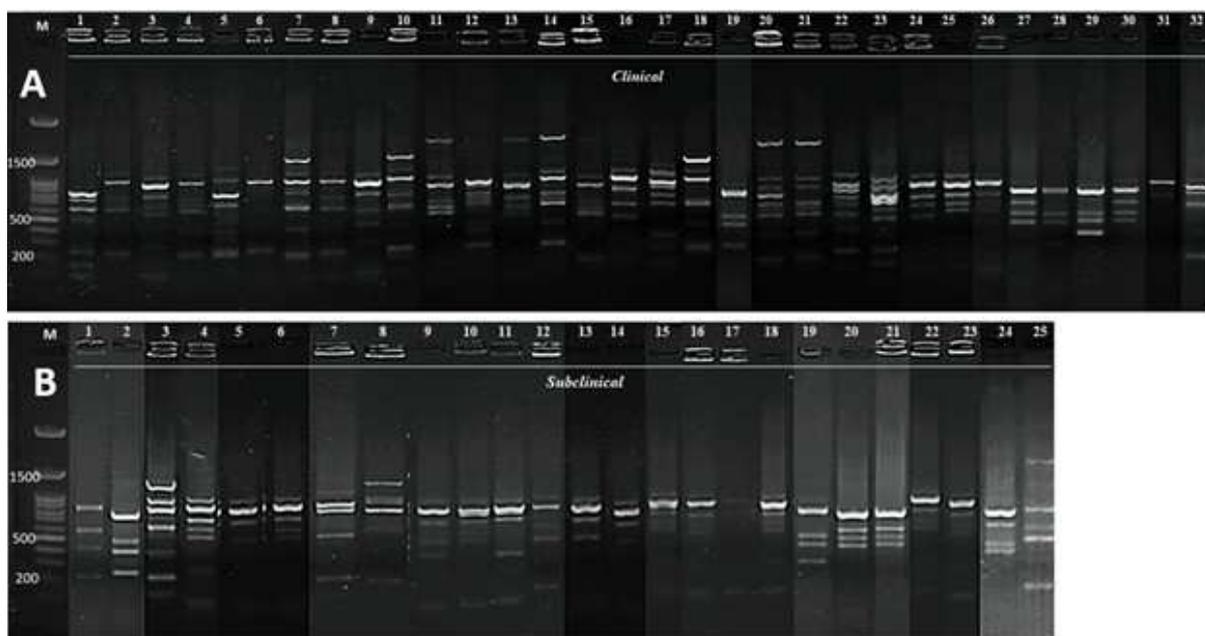


Fig. Sup. 1. Tipagem MLVA dos isolados de campo de *Staphylococcus aureus* usados neste estudo. Corridas diferentes foram combinadas para mostrar um representante de cada perfil de MLVA. Na figura superior (A) - isola 73T-36 (1), 31T (2), 6T (3), 7T (4), 12T (5), 8T (6), 39T (7), 45T (8), 54T (9), 53T (10), 11T (11), 19T (12), 10T (13), 25T (14), 2T (15), 61T (16), 72T (17), 77T (18), 18 AE 35 (19), 90T-40 (20), 29T (21), 76T-6 (22), 75T (23), 14T (24), 17T (25), 41T (26), 94 AE 2232 (27), 70 AD 3044 (28), 11 (29), 64 PD 1002 (30), RF122 (31) e 125 PD 276 (32). Na figura inferior (B) - isola 23 AD 7206 (1), 18 AD 35 (2), 394B (3), 60 (4), 80B (5), 3212 (6), 3886 (7), 131B (8), 303B (9), 350B (10), 741 (11), 27B (12), 908B (13), 126B (14), 360B (15), 372B (16), 381B (17), 81 PE 4953 (18), 49 PE 0051 (19), 81 4953 (20), 53 AD 136 (21), 454B (22), 366B (23), 170 (24) e 1269 (25). FastGene 100bp DNA Ladder foi usado como um marcador de peso molecular (M).

Tabela S1. - Tipagem *spa* dos isolados de *Staphylococcus aureus* usados neste estudo

Tipo <i>Spa</i>	ST / CC relacionado	Isolados	Repetições de <i>spa</i>	Origem
t002	5T-5, 5T-231	3212, 87T-23, 76T-6	26-23-17-34-17-20-17-12-17-16	Barra Mansa-RJ, Poços de Caldas-MG
t037	5T-239, 5T-240, 5T-241	8T	15-12-16-02-25-17-24	Botucatu-SP
t11521	-	125PD-276	07-23-17-34-34-33-34	Pesqueira-PE
t1192	-	81AE-4953	15	Senhor do Bonfim-BA
t127	CC1 / ST1	53T, 90T-40, 22T, 43T-13, 46T-8, 741, 25T, 101	07-23-21-16-34-33-13	Botucatu-SP, Espírito Santo do Pinhal-SP, Cabrália Paulista - SP, Botelhos-MG, Juiz de Fora-MG, Coronel Pacheco-MG
t14515	-	77T	07-23-21-16-34-34	Botucatu-SP
t267	CC1 / ST97	4081	07-23-12-21-17-34-34-34-33-34	Juiz de Fora-MG
t337	-	4182	07-16-23-23-02-12-23-02-34	Patrocínio-MG
t518	CC22 / ST50	3886	04-20-17-23-24-20-17-25	Matias Barbosa-MG
t521	ST97	3 AE 132	07-23-12-21-17-34-34-34-34-33-34	Senhor do Bonfim-BA
t528	CC30 / ST479 CC151 / ST161;	72T, 75T	4	Botucatu-SP
t543	-	73T-36	20-04-17	São Pedro-SP
t605	ST126 / CC12 6	49 PE 0051, 908B, 94AE-2232, 24 AD 114, 18 AD 35, 53AD-136, 70 AD 3044, 60, 27B, 1B, 6T, 327B, 443B, 400B, 18 AE 35, 34, 29, 54T, 61T	23-07	Botucatu-SP, Pirassununga-SP, Pindamonhangaba-SP, Pesqueira- PE, Senhor do Bonfim-BA, Petrolina-PE

Tabela S2. - Porcentagem de identidade das regiões encontradas na lipoproteína.

Lipoproteins CDS and the 25-bp DNA region where LipoP-F-CS aligns									
1: LipoPFCSa/125/1-25	100	100	100	96	100	100	68	86.88889	id%: all strains
2: rf122.lipoprotein.cds/122-146	100	100	92	96	92	96	64		
3: n305.lipoprotein.cds/122-146	92	92	100	96	92	96	64	84.5	%id: subclinical strains only
4: sau170.lipoprotein.cds/119-143	96	96	96	100	88	100	68		
5: sau1269.lipoprotein.cds/134-158	92	92	92	88	100	88	64	96	%id: clinical strains only
6: sau1364.lipoprotein.cds/119-143	96	96	96	100	88	100	68		
7: sau302.lipoprotein.cds/104-128	68	64	64	68	64	68	100		
Lipoproteins CDS and the 205-bp DNA region where LipoP-R-C aligns									
1: LipoPRC revcomp	100	100	96.15	53.85	53.85	53.85	61.54	69.87333	id%: all strains
2: rf122.lipoprotein.cds/426-451	100	100	96.15	53.85	53.85	53.85	61.54		
3: n305.lipoprotein.cds/426-451	96.15	96.15	100	50	50	50	57.69	55.7725	%id: subclinical strains only
4: sau170.lipoprotein.cds/423-448	53.85	53.85	50	100	100	100	57.69		
5: sau1269.lipoprotein.cds/438-463	53.85	53.85	50	100	100	100	57.69	98.075	%id: clinical strains only
6: sau1364.lipoprotein.cds/423-448	53.85	53.85	50	100	100	100	57.69		
7: sau302.lipoprotein.cds/408-433	61.54	61.54	57.69	57.69	57.69	57.69	100		
Comparison between the differential region (68aa) of the lipoproteins									
1: lipoP.rf122/144-212	100	98.55	63.77	63.77	71.01	63.77		76.81167	id%: all strains
2: lipoP.N305/144-212	98.55	100	63.77	63.77	71.01	63.77			
3: lipoP.sau170/143-211	63.77	63.77	100	92.75	73.91	100		65.58	%id: subclinical strains only
4: lipoP.sau1269/148-216	63.77	63.77	92.75	100	73.91	92.75			
5: lipoP.sau302/138-206	71.01	71.01	73.91	73.91	100	73.91		99.275	%id: clinical strains only
6: lipoP.sau1364/143-211	63.77	63.77	100	92.75	73.91	100			

CAPÍTULO 3

Organização do *cluster lpl* em *Staphylococcus aureus* 302 e expressão heteróloga de uma lipoproteína

INTRODUÇÃO

As lipoproteínas (Lpps) são uma classe de proteínas ancoradas aos lipídeos de membrana, e que em bactérias Gram-positivas desempenham papéis diversos, que incluem detecção e sinalização molecular, secreção de proteínas, resistência a antibióticos, e adesão (Shahmirzadi *et al.*, 2016). Lpps também estão envolvidas no processo de aquisição de nutrientes e íons, sendo portanto essenciais para a sobrevivência bacteriana durante a infecção (Schmaler *et al.*, 2009; Nguyen e Götz, 2016).

Em bactérias gram-positivas, lipoproteínas são sintetizadas na forma de pré-lipoproteínas, e são marcadas para modificações pós-traducionais na porção N-terminal, por intermédio de um peptídeo sinal denominado lipobox, de sequência consenso [LVI][ASTVI][GAS]C cuja cisteína é invariável (Babu *et al.*, 2006; Mao *et al.*, 2016). O processo de modificação pós-traducional depende da participação de três enzimas, a saber 1) diacilgliceriltransferase (Lgt), que reconhece a cisteína e catalisa uma reação de transferência para formação de diacilgliceril-prolipoproteína, 2) uma peptidase de sinal de lipoproteína (LspA) que cliva o peptídeo sinal, formando apolipoproteína e 3) N-acil transferase (Lnt), resultando em uma lipoproteína madura. A modificação lipídica do resíduo Cys N-terminal (N-acil-S-diacilgliceril-Cys) permite a ancoragem de proteínas altamente hidrofílicas à membrana.

Staphylococcus aureus possui aproximadamente 55-70 genes que codificam lipoproteínas, a maioria organizada em um *cluster* de genes chamado *lpl* (*lipoprotein-like cluster*) que está localizado na ilha de patogenicidade vSaa (Kuroda *et al.*, 2001; Schmaler *et al.*, 2009). Porém, a organização do *cluster lpl* é variável, sendo que algumas cepas possuem um maior número de genes *lpl* como, por exemplo, o clone pandêmico *S. aureus* USA300 com 10 genes organizados *in tandem*, de similaridade entre 60-87% (Schluepen *et al.*, 2013; Nguyen *et al.*, 2015; Belikova *et al.*, 2020). Nessa cepa, o *cluster* de 10kB encontra-se

separado do *cluster* de superantígenos/exotoxinas (*set*) por dois genes, *hsdM* e *hsdS*, que codificam as enzimas do sistema de modificação-restrição. Todas as lipoproteínas codificadas a partir dessa região possuem o domínio funcional de função desconhecida DUF576 (DUF – *domain of unknown function*) e possuem em torno de 780 aa.

Especula-se que a organização de lipoproteínas na forma de agrupamento de genes *in tandem* seja um indicativo de variação de fase antigênica em resposta a ambientes de mudanças dinâmicas, e que isso estaria relacionado à manutenção de vários genes parálogos dentro de cada *cluster* (Tsuru e Kobayashi, 2008). Esse fenômeno permite que proteínas ou carboidratos de superfície sejam alterados para evitar uma resposta imune do hospedeiro, funcionando como um mecanismo de escape antigênico (Van Der Woude e Bäumlér, 2004). Em *Mycoplasma hyorhinis*, por exemplo, é documentada a variação de fase antigênica das lipoproteínas de superfície Vlp em cepas isogênicas, as quais produzem variantes mais longas de VlpA, VlpB, ou VlpC que são completamente resistentes a anticorpos do sistema imune, enquanto as variantes mais curtas são susceptíveis (Citti *et al.*, 1997).

A deleção do *cluster lpl* de *S. aureus* USA300 reduziu a estimulação de citocinas pró-inflamatórias em células do sistema imune humano, diminuiu a invasão de queratinócitos, e também atenuou a virulência bacteriana em um modelo murino de sepse (Nguyen *et al.*, 2015). A *Lpl1*, codificada pelo primeiro gene *lpl* do *cluster*, promoveu a invasão de células hospedeiras humanas por meio da ativação do receptor Hsp90, sendo a interação com o receptor mediada por aminoácidos localizados na região C-terminal da proteína (Tribelli *et al.*, 2020). Essa interação induziu a formação de F-actina promovendo a internalização bacteriana via endocitose. Injeções subcutâneas de *Lpls* em camundongos levaram à infiltração de neutrófilos e monócitos/macrófagos, e induziram lesões cutâneas (Mohammad *et al.*, 2021). Esse efeito foi causado pela interação entre a parte lipídica das lipoproteínas e o receptor TLR2. Os estudos citados corroboram que as *Lpls* são um importante fator de virulência em *S. aureus*.

Considerando a importância do *cluster lpl* para a patogênese de *S. aureus* USA300 e a identificação de uma lipoproteína (cl3700) capaz de separar isolados associados à mastite clínica dos associados à mastite subclínica (Rocha *et al.*, 2019), neste capítulo foi investigada a organização do gene *lpl* em *S. aureus* 302. Adicionalmente, realizou-se a expressão

heteróloga da lipoproteína cl3700 em *Escherichia coli* a fim de permitir estudos futuros a respeito da sua função na patogênese de *S. aureus* bovino.

METODOLOGIA

Análises in silico

Para identificar o gene da lipoproteína cl3700 no genoma de *S. aureus* 302, o seu *best hit* foi encontrado por meio da ferramenta tBLASTn. Em seguida, todo o *contig* onde ele estava contido (contig 160, 11668pb) foi selecionado para análise de quadros de leitura aberta (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>), e as ORFs (*open reading frames*) vizinhas encontradas foram traduzidas e usadas em busca BLAST. A fim de analisar a vizinhança em que o gene codificador da lipoproteína cl3700 estava inserido, foi feita uma análise usando sequências de 60kb ao redor do *cluster* de genes de lipoproteínas de *S. aureus* RF122. Todos os três quadros de leitura foram avaliados (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>), e as sequências codificadoras foram traduzidas (<https://web.expasy.org/translate/>) e usadas em busca BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Também foi feito o tratamento dos arquivos de saída do sequenciamento do genoma de Sau302 para análise de cobertura das *reads* correspondentes ao locus do *cluster lpl* no genoma de referência de RF122. O software Bowtie2 versão 2.2.8 (Langmead e Salzberg, 2012) foi usado para alinhar leituras sequenciadas no genoma de RF122, a fim de verificar regiões mal montadas e de baixa cobertura. Em seguida, as bases com baixa qualidade do *draft* do genoma de Sau302 foram removidas dos dados FASTQ utilizando o programa Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014), aplicando-se valor de phred de 20. Por fim, o programa TopHat (Kim *et al.*, 2013) foi empregado para tratamento de *reads* de pequeno tamanho (<100), ao dividir todas as leituras de entrada em segmentos menores que foram mapeados independentemente no genoma de referência de RF122.

As sequências codificadoras dos genes das lipoproteínas de *S. aureus* 302, RF122 e USA300 foram obtidas por busca BLAST por meio de *scripts*. Para fins de codificação, foi usado como *input* a sequência consenso definida pelo PFAM para o domínio DUF576 (<http://pfam.xfam.org/family/PF04507.11#tabview=tab0>), cuja presença define os membros da família de lipoproteínas Csa1 (Schluepen *et al.*, 2013), e como bases de dados para busca

os genomas depositados no NCBI das três cepas de *S. aureus* acima mencionadas. Os alinhamentos foram gerados pelo Clustal Omega, visualizados no programa Jalview 2.11.1.4, e as matrizes de identidade foram geradas de forma automática também pelo Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Expressão heteróloga da lipoproteína cl3700

O gene que codifica a lipoproteína foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico de *S. aureus* 302. Para a amplificação e clonagem desse gene, foi desenhado um *primer forward*, que anela na extremidade 5' do gene, com sítio de restrição para a endonuclease *NheI*, e outro *primer reverse*, que anela na extremidade 3' do gene, com sítio de restrição para a endonuclease *XhoI*. Os *primers* foram desenhados de forma a incluir o lipobox. Os mesmos *primers* foram usados na amplificação de um gene *lpl* de RF122 e USA300. A amplificação consistiu dos seguintes reagentes: 1U Taq DNA polimerase high fidelity (Cellco), 0,4 pmol de cada *primer forward* e *reverse*, 0,2 mM de dNTP, 1X tampão da enzima, 50 ng de cada amostra de DNA, e água para volume final de 25 µl. O termociclador foi programado para um ciclo inicial de desnaturação a 98°C por 5min, seguido por 35 ciclos de desnaturação, anelamento (55°C por 30s) e extensão (72°C por 1min), mais extensão final a 72°C por 10min. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1.5% corado com brometo de etídeo.

Os *amplicons* obtidos foram clivados com *NheI* e *XhoI* (Promega), e clonados no vetor de clonagem pGEM T-Easy (Promega). Após a confirmação da presença do inserto (por meio de PCR com primers F e R com sítios para *NheI* e *XhoI* e primers M13), o mesmo foi extraído do gel de agarose e ligado ao vetor de expressão pET-28a(+) (Novagen), por meio de reação de ligação usando-se a T4 DNA ligase (Thermofisher), conforme recomendações de protocolo do fabricante. Células competentes de *E. coli* DH5α foram preparadas utilizando-se cloreto de cálcio (Sambrook e Russell, 2001), e transformadas com o vetor recombinante pelo método do choque térmico, em que os tubos previamente mantidos em gelo foram expostos à temperatura de 42°C por 45s e depois retornados ao gelo. Em seguida, as células transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido contendo antibióticos como marcadores de seleção (ampicilina 100µg/ml para pGEM T-Easy e kanamicina 30µg/ml para pET-28a). A

confirmação da presença do inserto foi feita por PCR de colônia usando-se os mesmos *primers* usados na amplificação inicial do gene completo da lipoproteína, nas mesmas condições de amplificação acima descritas, porém com desnaturação inicial de 10 min. Como segundo método de confirmação da presença do inserto (gene da lipoproteína cl3700) no pET-28a, também foi feita amplificação da região do promotor T7, usando os *primers* e protocolo descritos pelo fabricante (Thermo Scientific). Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1.5% corado com brometo de etídeo.

As colônias de DH5 α que tiveram a presença do gene da lipoproteína no vetor confirmada por PCR foram incubadas a 37°C em meio LB líquido com kanamicina, sob agitação de 180rpm por 16h. A extração e DNA plasmidial foi feita segundo o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). Para expressão do gene da lipoproteína, foram usadas cepas de *E. coli* BL21, C41 e Artic quimiocompetentes, transformadas com os vetores recombinantes. A confirmação da transformação foi feita por PCR da mesma maneira descrita para as células DH5 α , e por digestão com as endonucleases *NdeI* e *XhoI*, conforme condições já descritas. Os clones transformantes foram crescidos em meio LB líquido e induzidos para a produção da lipoproteína pela adição de 0,4 mM Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida (IPTG) ao meio de cultivo celular, durante diferentes tempos de indução. Todas as frações obtidas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5%, seguido por ensaio de Western Blotting, usando anticorpo anti-His.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise de sintenia

Para analisar a organização do gene que codifica a lipoproteína cl3700 no genoma de Sau302, inicialmente o gene mais semelhante a lipoproteína cl3700 de RF122 foi identificado no *contig* 160 de Sau302, que possui 12000pb. O gene possui 813 pb e codifica uma proteína de 271 aa. Próximos a ele, estão outros cinco genes que codificam lipoproteínas de tamanhos que variam de 234 a 267 aa, formando o *cluster lpl* de Sau302. Flanqueando o *cluster* de seis lipoproteínas, a *upstream* e *downstream* estão os genes codificadores de uma fosfolipase C (984pb) e do regulador transcricional ARAC (2235pb), sugerindo que o *cluster* está completo e fora da região de quebra de *contigs*. A Tabela 1 contém a relação dos genes contidos no

contig 160 do genoma de Sau302, com seus respectivos códons de iniciação, de terminação, tamanho do gene e descrição da proteína codificada.

Tabela 1 – Informações a respeito dos genes *lpl* presentes no *contig* 160 do genoma de *Staphylococcus aureus* 302.

Posição do códon de iniciação (pb)	Posição do códon de terminação (pb)	Tamanho do gene (pb)	Posição na ORF	Proteína codificada	Tamanho da proteína codificada
24	1008	984	ORF2, ptn1	Fosfolipase C	328aa/37.0 kDa
1227	1929	702	ORF1, ptn1	Lipoproteína	234aa/ 27.3 kDa
2013	2826	813	ORF3, ptn1	Lipoproteína	271aa/ 31.4 kDa
2847	3648	801	ORF3, ptn2	Lipoproteína	267aa/ 30.6 kDa
3669	4470	801	ORF3, ptn3	Lipoproteína	267aa/ 30.6 kDa
4542	5298	756	ORF1, ptn2	Lipoproteína	252aa/ 29.7 kDa
5376	6132	756	ORF1, ptn3	Lipoproteína	252aa/ 29.7 kDa
6240	8475	2235	ORF1, ptn4	Regulador transcricional AraC	745aa/ 87.9kDa
8616	9801	1185	ORF3, ptn4	Amido-hidrolase	395aa/ 43.5 kDa
9804	11190	1386	ORF1, ptn5	Transportador MSF	462aa/ 49.0 kDa

Análises de mapeamento de *reads* também foram feitas a fim de se avaliar a cobertura das *reads* do sequenciamento do genoma de Sau302 em relação ao genoma de referência RF122. Os resultados foram visualizados com a interface gráfica do programa Tablet, em que foi utilizado um pedaço de 60kB do genoma de RF122, contendo o *cluster lpl* e genes adjacentes, para mapeamento das *reads* tratadas do genoma draft de Sau302. Os dados mostraram que as *reads* do sequenciamento de SAU302 têm cobertura muito baixa na região que contém os sete genes do *cluster* de lipoproteínas de RF122. Por isso, não foi possível realizar uma análise completa da organização do *cluster lpl* e suas adjacências no genoma de Sau302.

À semelhança de RF122 e de USA300, o *cluster lpl* de Sau302 encontra-se possivelmente na ilha de patogenicidade vSaa. Porém, análises revelaram a presença de mais três genes *lpl* distribuídos ao longo do genoma e que estão presentes nos *contigs* n28, n93 e n94. Esses genes possuem respectivamente 774, 141 e 183 pb e codificam proteínas de 258, 47 e 61 aa, respectivamente, todas com domínio DUF576. O tamanho reduzido das *lpl*

codificadas pelos contigs 93 e 94 sugere que os seus genes tenham sido produtos de eventos de duplicação e diversificação/rearranjo, conforme sugerido por Tsuru e Kobayashi (2008), ou que artefatos de montagem do genoma de *S. aureus* 302 tenham prejudicado a obtenção de suas sequências completas. Entretanto, a presença de ORFs completas (com start e stop códon) flanqueando as sequências codificadoras desses três genes sugere que suas sequências estejam completas, sendo eles pseudogenes. Por essa razão, as os genes *lpl* dos contigs n28, n93 e n94 não foram consideradas nas análises de alinhamentos múltiplos de sequência.

O ortólogo da lipoproteína cl3700 foi identificado no genoma de RF122, com o tamanho de 782 pb. Ele localiza-se entre as posições 428.201-428.983pb e está anotado no NCBI sob o código WP_000540885.1 como uma proteína de 261 aa (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_000540885.1/), e representante da família Csa1 (entrada #PF04507 do PFAM - <http://pfam.xfam.org/family/PF04507.11>), definida pela presença do domínio DUF576. Ao todo, foram encontrados sete genes de lipoproteínas, em que teoricamente o terceiro gene seria o único a ser amplificado pelo par de *primers* LipoP-F-CS/LipoP-R-C descrito por Rocha *et al.*, (2019), uma vez que não foi encontrada complementariedade com dos demais genes pelo programa *electronic-PCR* (e-PCR). Embora neste trabalho tenha encontrado sete genes no *cluster lpl* de RF122, outros estudos descrevem a existência de seis genes (Herron-Olson *et al.*, 2007) ou de oito genes (Moon *et al.*, 2016) no mesmo *locus*, dentro da ilha de patogenicidade *Vsaa*. A Figura 1 ilustra a sintenia do *cluster lpl* de Sau302 e RF122.

Ao compararem o *lpl cluster* de sete cepas de *S. aureus*, Tsuru e Kobayashi (2008) identificaram uma sequência conservada em todas as ORFs e variações na ordem dos genes, sugerindo rearranjos genômicos extensivos (Tsuru e Kobayashi, 2008). Recentemente, Belikova *et al* (2020) propuseram o modelo acordeão para explicar que a expressão de genes *lpl* em *S. aureus* é um processo flexível e variável, dirigido pelas demandas das diferentes fases do crescimento bacteriano. Os autores mostraram que isolados de *S. aureus* USA300 possuem de 4 a 200 cópias dos genes *lpl* e que existe uma relação entre número de cópias e resistência à tetraciclina. Isolados com 90 a 200 cópias do gene induziram o aumento de 2 a 3 vezes na secreção de IL-8 em relação aos de baixo número de cópias, embora ensaios de infecção em modelo murino não tenham mostrado relação entre número de cópias e hiper-

virulência. Assim, o estudo de Belikova *et al.* sugere que as variações do número de cópias de genes *lpl* criadas durante a infecção *in vivo* podem ser favorecidas por pressões seletivas do próprio hospedeiro (*bos taurus*). Como consequência, a população divide-se em isolados com alto número de cópias e baixo número de cópias, sendo o baixo número de cópias dos genes uma condição favorecida em condições não seletivas, como a ausência de tetraciclina.

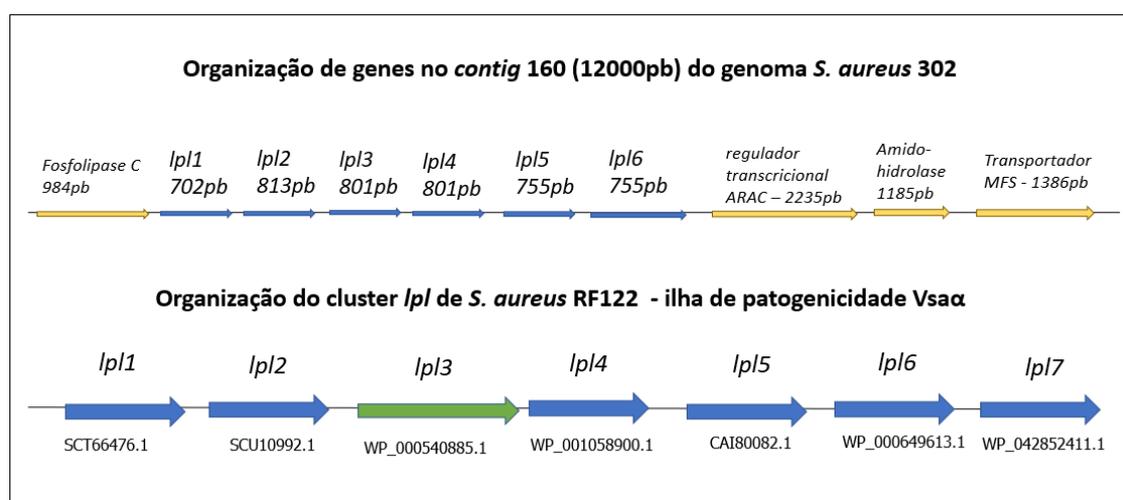


Fig. 1 – Análise de sintenia do *cluster* de lipoproteínas nas cepas *Staphylococcus aureus* 302 e RF122. Na parte superior está representada a organização dos seis genes que codificam *lpls* em *S. aureus* 302, em que o segundo gene, de 813 pb, foi identificado pelo OrthoMCL por Rocha *et al* (2019) como best match do gene da lipoproteína cl3700 de RF122. Na parte inferior está representada a organização das sete lipoproteínas do *cluster lpl* de *S. aureus* RF122, em que o terceiro gene (em verde) representa a lipoproteína cl3700 (WP_000540885.1).

A Fig. 2 representa o alinhamento das sequências de aminoácidos das *Lpls* de Sau302 e RF122. A sequência consenso do lipobox encontra-se no N-terminal e está apresentada acima do alinhamento, enquanto a cisteína invariante está realçada em vermelho. A região de maior similaridade entre as sequências corresponde ao domínio DUF576.

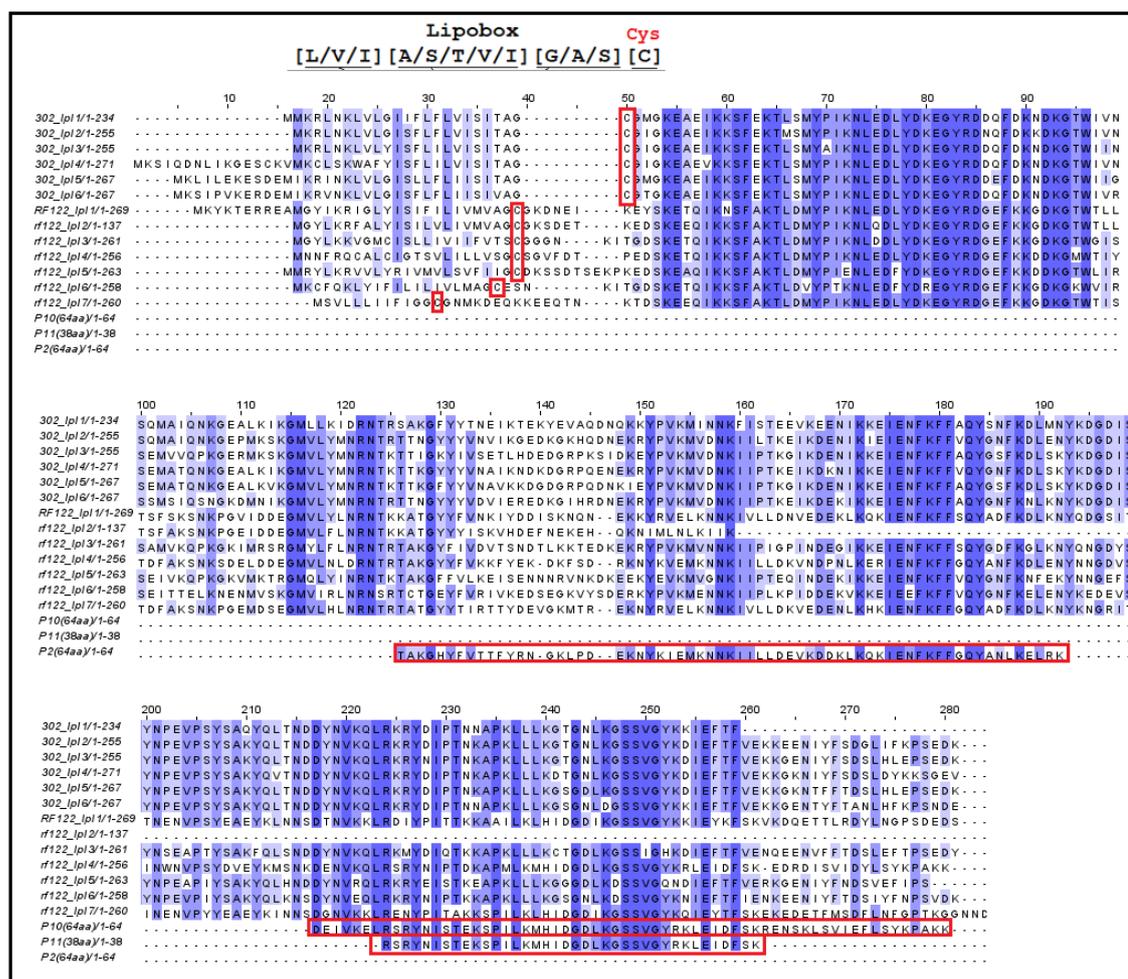


Fig. 2 - Alinhamento múltiplo das lipoproteínas dos *clusters lpl* de *Staphylococcus aureus* RF122 e *S. aureus* Sau302. O resíduo invariante de cisteína, que compõe o lipobox, está destacado em vermelho próximo ao N-terminal. Os peptídeos P2, P10 e P11 analisados por Tribelli *et al.* (2020) em seu trabalho também estão apresentados.

A fim de avaliar a semelhança entre os *clusters* de lipoproteínas, as sete *lpl* de RF122 e as seis de Sau302 foram usadas em um alinhamento múltiplo de seqüências para construção de uma matriz de identidade par a par pelo Clustal Omega (Fig. 3). Quando analisadas em grupo, as lipoproteínas do *cluster lpl* de Sau302 apresentaram grande homologia entre si, com identidade média de 83,81%. Esse valor é de 62,44% para as lipoproteínas de RF122. Assim, esses resultados indicam que há um grau muito maior de conservação no *cluster lpl* de *S. aureus* 302, e que por outro lado, o *cluster* de RF122 teve maior diversificação na seqüência de suas lipoproteínas.

	1:	2:	3:	4:	5:	6:	7:	8:	9:	10:	11:	12:	13:
	rf122_lpl1	rf122_lpl2	rf122_lpl3	rf122_lpl4	rf122_lpl5	rf122_lpl6	rf122_lpl7	302_lpl1	302_lpl2	302_lpl3	302_lpl4	302_lpl5	302_lpl6
1: RF122_lpl1_SCT66476.1_7_	100	74,5	53,1	59,8	47,5	47,4	71,5	51,1	50,8	49,2	48,5	50	49,8
2: rf122_lpl2 SCU10992.1	74,5	100	53	60,3	51,8	42,8	68,5	47,7	47,7	46,9	49,2	47,7	46,9
3: rf122_lpl3_WP_000540885.1	53,1	53	100	51,4	64	60,7	54,6	58,2	63,8	63,4	60,6	62,6	62,6
4: rf122_lpl4 WP_001058900.1	59,8	60,3	51,4	100	48	49,6	64,6	52,4	50,6	48,6	50,2	50,2	47,4
5: rf122_lpl5 CAI80082.1	47,5	51,8	64	48	100	59,8	47,2	59,2	60,6	63	59,5	61,1	59,9
6: rf122_lpl6 WP_000649613.1	47,4	42,8	60,7	49,6	59,8	100	49,8	56,5	62,7	61,9	59,1	61,1	59,9
7: rf122_lpl7 WP_042852411.1	71,5	68,5	54,6	64,6	47,2	49,8	100	51,8	53,3	50	49,2	51,2	50
8: 302_lpl1	51,1	47,7	58,2	52,4	59,2	56,5	51,8	100	82,8	76,4	79,1	79,5	78,6
9: 302_lpl2	50,8	47,7	63,8	50,6	60,6	62,7	53,3	82,8	100	82,8	83,5	81,2	84,3
10: 302_lpl3	49,2	46,9	63,4	48,6	63	61,9	50	76,4	82,8	100	83,1	85,5	77,7
11: 302_lpl4	48,5	49,2	60,6	50,2	59,5	59,1	49,2	79,1	83,5	83,1	100	80,2	74,9
12: 302_lpl5	50	47,7	62,6	50,2	61,1	61,1	51,2	79,5	81,2	85,5	80,2	100	79,2
13: 302_lpl6	49,8	46,9	62,6	47,4	59,9	59,9	50	78,6	84,3	77,7	74,9	79,2	100

Fig. 3 – Matriz de identidade entre as lipoproteínas do *lpl* cluster de *Staphylococcus aureus* RF122 e *S. aureus* 302. Em negrito, o gene *lpl3* de RF122 identificado como cl3700 por Rocha *et al.* (2019). O *best match* em Sau302 também foi representado em negrito.

A Fig. 4 é uma representação da lipoproteína cl3700 de *S. aureus* RF122. Próximo à região N-terminal está o resíduo de cisteína, onde são ligadas as cadeias de ácidos graxos. Em lipoproteínas bacterianas, as cadeias lipídicas ancoradas à parte proteica criam diversos padrões bioquímicos que desafiam o reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro, aumentando assim as chances de sobrevivência bacteriana (Schenk *et al.*, 2009). O reconhecimento se dá pela ligação ao receptor do tipo *toll-like*, de forma que lipoproteínas diaciladas são reconhecidas pelo dímero TLR2-TLR6, e lipoproteínas triaciladas, como é o caso de *S. aureus*, são reconhecidas pelos receptores TLR2-TLR1 (Nguyen *et al.*, 2017; Schenk *et al.*, 2009). As modificações lipídicas que ocorrem em lipoproteínas bacterianas estão estritamente ligadas à intensidade da resposta imunológica apresentada pela célula hospedeira e por isso, a resposta de TLR2 induzida pelas espécies comensais *S. aureus* e *S. epidermidis* é quase dez vezes menor do que aquela induzida pela espécie não comensal *S. carnosus*, e parte dessas diferenças são provocadas pelas diferentes modificações das porções lipídicas de suas respectivas lipoproteínas (Nguyen e Götz, 2016).

O domínio funcional DUF576 presente na lipoproteína de RF122 é considerado um domínio de função desconhecida presente em proteínas da família Csa1, taxonomicamente restrito a *S. aureus* (Schluepen *et al.*, 2013). Os mesmos autores identificaram em *S. aureus* Newman 18 parálogos Csa com alta similaridade de sequência e expressos na membrana celular ou secretados, dependendo da presença de peptídeo sinal de lipoproteínas. Os autores mostraram que camundongos vacinados com Csa1A apresentaram menor carga bacteriana no rim, sugerindo à semelhança de Bagnoli *et al.*, (2015), que lipoproteínas contendo o domínio DUF576 podem ser candidatas a vacinas contra infecções causadas por *S. aureus*.

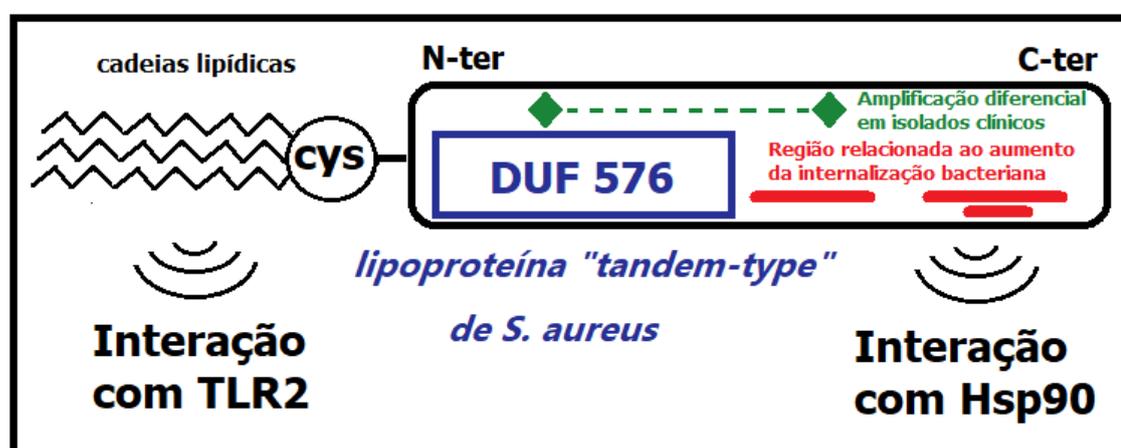


Fig 4 – Representação esquemática da lipoproteína cl3700 de *Staphylococcus aureus* RF122. As cadeias lipídicas estão ancoradas ao resíduo de cisteína na porção N-terminal. Os traços vermelhos representam os três peptídeos estudados por Tribelli *et al.*, 2020. Os losangos verdes representam as regiões equivalentes às sequências de nucleotídeos de alinhamento dos primers LipoP-F-Cs e LipoP-R-C (Rocha *et al.*, 2019).

Tribelli *et al* (2020) sintetizaram 11 peptídeos que cobriam aproximadamente 100% da *Lpl1* de USA300. Ao se incubar os peptídeos com a bactéria durante o ensaio de invasão de queratinócitos, os autores identificaram peptídeos (P2, P10 e P11) que estimularam a formação de F-actina com consequente endocitose da célula bacteriana. Os três peptídeos estão representados como traços vermelhos próximos ao C terminal da lipoproteína na Fig. 4 e suas sequências estão delimitadas por caixas vermelhas na Fig.2. Rocha *et al.* (2019) identificaram variações na sequência de nucleotídeos das *Lpls* de Sau302 e RF122 que permitiram o desenho de *primers* para amplificar apenas o gene de RF122. O *primer* LipoP-F-

CS é complementar à sequência de nucleotídeos que codifica o início do domínio DUF 576 de RF122 e possui 92% de identidade com a cl3700 de Sau302 (Figura S3, Rocha *et al.*, 2019). O *primer* Lipo-F-C foi desenhado com base na sequência de RF122 e possui 52% de identidade com a sequência de Sau302. Quando isolados bacterianos provenientes de animais com mastite clínica e subclínica foram analisados por PCR, observou-se um *amplicon* apenas nas amostras de mastite clínica. Nota-se que o peptídeo P2 cobre a região do gene *lpl* usada para desenhar o *primer* LipoP-F-R-C. Sabe-se que RF122 é uma cepa com baixa capacidade invasiva comparada a outras como N305 (Peton *et al.*, 2014). Sugere-se que as diferenças encontradas entre *Lpl* de RF122 e Sau302 possam impactar na capacidade de invasão das duas cepas. Considerando que a bactéria Sau302 foi isolada de um mesmo animal durante seis meses seguidos, uma maior taxa de invasão poderia estar relacionada à persistência bacteriana no úbere bovino.

Expressão da lipoproteína cl3700

Os genes que codificam as lipoproteínas das cepas *S. aureus* RF122 e 302 foram amplificados com *primers* específicos e clonados em vetor de expressão pET28a. Adicionalmente, os mesmos *primers* foram usados para amplificar o gene no genoma de USA300. Os vetores recombinantes pET28a-LipoP RF122, pET28a-LipoP Sau302 e pET28a-LipoP USA300 foram inicialmente transformados em *E. coli* BL21, sendo a transformação confirmada por meio do crescimento de colônias em meio seletivo e por clivagem do DNA plasmideal ou PCR com os *primers* usados na obtenção dos *amplicons* (Fig. 5). Por SDS-PAGE observou-se a expressão da LipoP de USA300 e da LipoP de Sau 302 (Fig. 6). Para RF122, mesmo após várias tentativas, que incluíram mudanças no tempo de expressão e na concentração de IPTG, não foi observada expressão na cepa BL21. Por essa razão, a expressão foi tentada em C41 e Artic, também sem sucesso (Fig. 7). Observou-se inclusive um comprometimento no crescimento bacteriano, que mesmo após 18 horas de incubação a 37°C, não foi observado turbidez no meio.

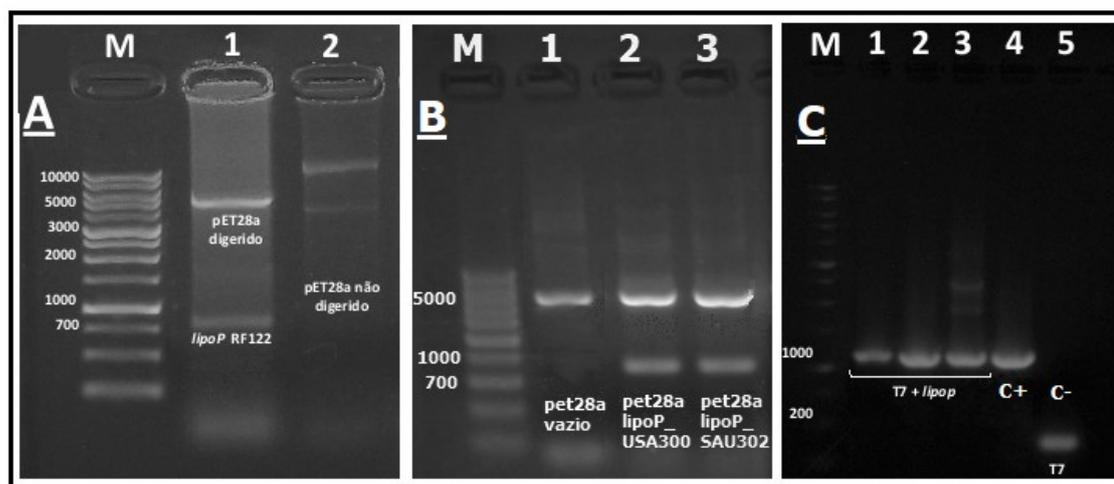


Fig 5 – Clonagem do gene da lipoproteína em *S. aureus* RF122, 302 e USA300 em vetor pET28a. (A) – Digestão enzimática dupla com *Nhe* I e *Xho* I da construção pET28a contendo o gene da lipoproteína cl3700 de *S. aureus* RF122. (B) Digestão enzimática dupla com *Nhe* I e *Xho* I dos vetores recombinantes para confirmação da clonagem dos genes de *S. aureus* USA300 (2) e Sau302(3). (C) – Confirmação da presença do inserto no pET-28a, mediante amplificação usando *primer* para o promotor T7. Em 1, 2 e 3, amplificação da respectivas construções pET-28a-lipoP-RF122, pET-28a-lipoP-Sau302, e pET-28a-lipoP-USA300. C+, amplificação de construção no pET28 conhecida, com inserto de aproximadamente 800pb; C-, amplificação do pET28a vazio (sem inserto) - High Range DNA Ladder (Cellco) foi usado como marcador de peso molecular em A e B, e 1 kb Plus DNA Ladder (Cellco) foi usado em C.

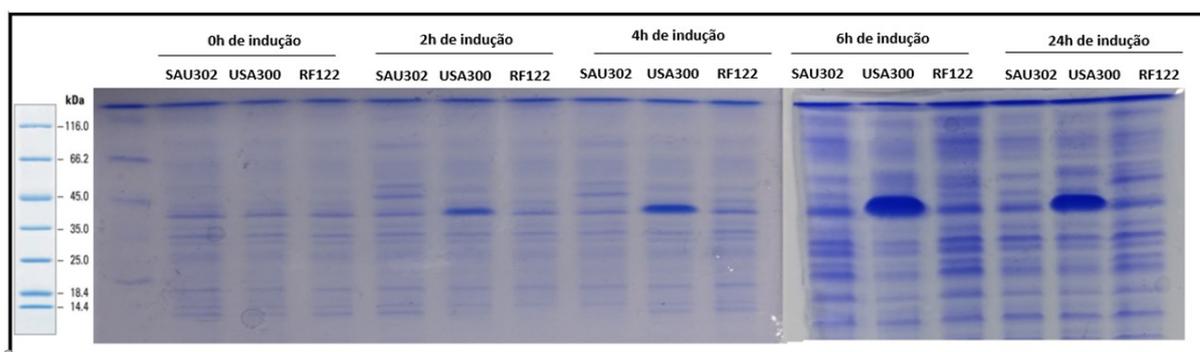


Fig. 6 - Expressão heteróloga das lipoproteínas de *Staphylococcus aureus* 302, USA300 e RF122 em *Escherichia coli* BL21, exibida em SDS-Page dos extratos protéicos preparados a partir dos clones obtidos com os genes de *Staphylococcus aureus* 302 e USA300 e RF122 após 0, 2, 4, 6 e 24 horas de indução (T0, T2, T4, T6 e T24) em BL21.

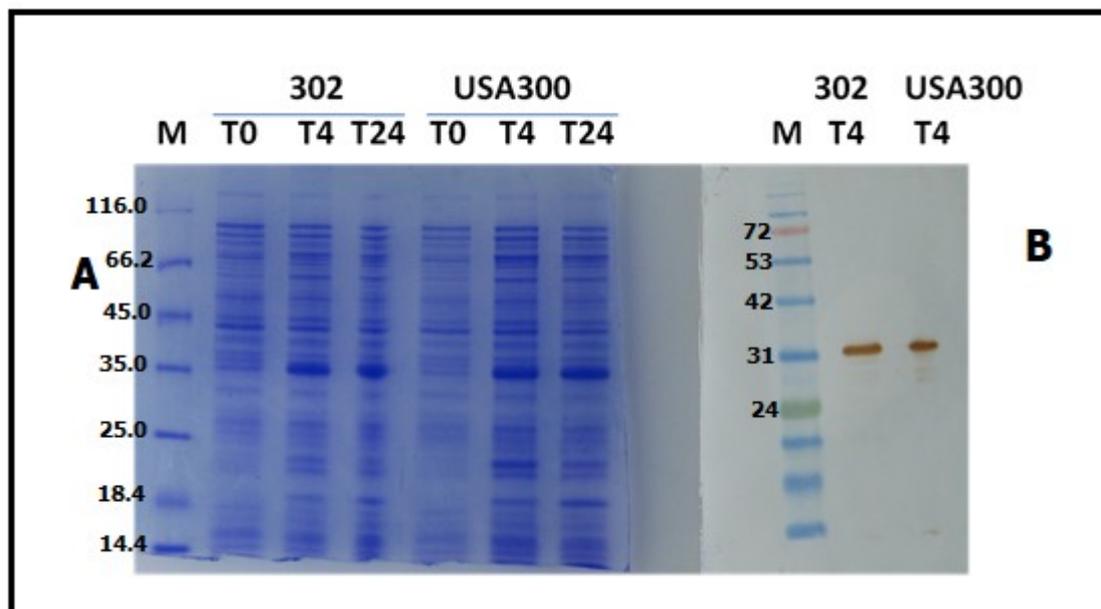


Fig 7 - Expressão heteróloga das lipoproteínas de *Staphylococcus aureus* 302 e USA300 em *Escherichia coli* C41. **(A)** SDS-Page dos extratos protéicos preparados a partir dos clones obtidos com os genes de *Staphylococcus aureus* 302 após 4 e 24 horas de indução (302 T4 e T24), e USA300 (USA300 T4 e T24). Marcador de peso molecular (M), não induzido com IPTG (t0) (NI), 24 horas após adição de IPTG (I). **(B)** Western Blot com anti-histag para a confirmação da expressão das proteínas de Sau 302 e USA300. Controle positivo (C+).

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Recentemente, vários grupos têm estudado o *cluster lpl* em *S. aureus*, com um enfoque na cepa USA300, ratificando a importância das lipoproteínas na virulência bacteriana. Os dados obtidos mostram a presença de um *cluster lpl* no genoma da cepa bovina *S. aureus* 302 que codifica seis lipoproteínas da família Csa. Porém, estudos futuros devem ser realizados para confirmar o seu papel na invasão de células mamárias bovinas ou na estimulação do sistema imune do hospedeiro. Diferenças na organização gênica foram observadas mediante comparação com RF122, cepa bem caracterizada que induz mastite severa. Considerando a sintomatologia apresentada pelos animais infectados com 302 e RF122, torna-se interessante comparar a resposta imune de células bovinas frente às duas proteínas ou a invasão promovida mediante incubação das células com as *Lpls*. A lipoproteína de *S. aureus* 302 foi expressa em *E. coli* e poderá ser usada em ensaios como os descritos acima. Estudos futuros devem focar no melhor entendimento da dinâmica do *cluster* de genes de lipoproteínas das cepas *S. aureus* 302 e *S. aureus* RF122, relacionadas respectivamente à

mastite subclínica e clínica, e do impacto que esse evento poderia ter nas propriedades de invasividade e virulência apresentadas pelas cepas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aasharaj, V.K.; Tresamol, P.V.; Deepa, P.M.; Latha, C. Comparison of Efficacy of Three Cow Side Tests for the Diagnosis of Subclinical Mastitis in Dairy Cattle. **Imperial Journal of Interdisciplinary Research**, 3, 417–418. 2017.
- Acosta, A.C.; da Silva, L.B.G.; Medeiros, E.S.; Pinheiro-Júnior, J.W.; Mota, R.A. Mastitis in ruminants in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 36, 565–573. 2016. doi:10.1590/S0100-736X2016000700001.
- Aghamohammadi, M.; Haine, D.; Kelton, D.F.; Barkema, H.W.; Hogeveen, H.; Keefe, G.P.; Dufour, S. Herd-level mastitis-associated costs on Canadian dairy farms. **Frontiers in Veterinary Science**, 5, 1–12. 2018. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00100>
- Akkou, M.; Bouchiat, C.; Antri, K.; Bes, M.; Tristan, A.; Dauwalder, O.; Martins-Simoes, P.; Rasigade, J.P.; Etienne, J.; Vandenesch, F.; Ramdani-Bouguessa, N.; Laurent, F. New host shift from human to cows within *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis and nasal carriage of animal's caretakers. **Veterinary Microbiology**, 223, 173–180. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.08.003>
- Almeida, L.M. d.; Almeida, M.Z.P.R.B. d.; Mendonça, C.L. d.; Mamizuka, E.M. Comparative analysis of agr groups and virulence genes among subclinical and clinical mastitis *Staphylococcus aureus* isolates from sheep flocks of the Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 44(2). 2013. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000200026>
- Babu, M.M.; Priya, M.L.; Selvan, A.T.; Madera, M.; Gough, J.; Aravind, L.; Sankaran, K.; 2006. A database of bacterial lipoproteins (DOLOP) with functional assignments to predicted lipoproteins. **Journal of Bacteriology**, 188, 2761–2773. 2006. <https://doi.org/10.1128/JB.188.8.2761-2773>.
- Bagnoli, F.; Rita, M.; Soldaini, E.; Mishra, R.P.N.; Fiaschi, L.; Cartocci, E.; Nardi-dei, V.; Ruggiero, P.; Nosari, S.; Grazia, M.; Falco, D.; Lofano, G.; Marchi, S. Vaccine composition formulated with a novel TLR7-dependent adjuvant induces high and broad protection against *Staphylococcus aureus*. **PNAS**, 112(12). 2015. <https://doi.org/10.1073/pnas.1424924112>
- Belikova, D.; Jochim, A.; Power, J.; Holden, M.T.G.; Heilbronner, S. “Gene accordions” cause genotypic and phenotypic heterogeneity in clonal populations of *Staphylococcus aureus*. **Nature Communications**, 11. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17277-3>
- Ben Zakour, N.L.; Sturdevant, D.E.; Even, S.; Guinane, C.M.; Barbey, C.; Alves, P.D.; Cochet, M.F.; Gautier, M.; Otto, M.; Fitzgerald, J.R.; Le Loir, Y. Genome-wide analysis of ruminant *Staphylococcus aureus* reveals diversification of the core genome. **Journal of Bacteriology**, 190, 6302–6317. 2008. <https://doi.org/10.1128/JB.01984-07>
- Bolger, A.M.; Lohse, M.; Usadel, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, 30, 2114–2120. 2014.

- <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Busanello, M.; Rossi, R.S.; Cassoli, L.D.; Pantoja, J.C.F.; Machado, P.F. Estimation of prevalence and incidence of subclinical mastitis in a large population of Brazilian dairy herds. **Journal of Dairy Science**, 100, 6545–6553. 2015. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12042>
- Cha, E.; Bar, D.; Hertl, J.A.; Tauer, L.W.; Bennett, G.; González, R.N.; Schukken, Y.H.; Welcome, F.L. The cost and management of different types of clinical mastitis in dairy cows estimated by dynamic programming. **Journal of Dairy Science**, 94, 4476–4487. 2011. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-4123>
- Citti, C.; Kim, M.F.; Wise, K.S. Elongated versions of Vlp surface lipoproteins protect *Mycoplasma hyorhinis* escape variants from growth-inhibiting host antibodies. **Infection and Immunology**, 65, 1773–1785. 1997. <https://doi.org/10.1128/iai.65.5.1773-1785.1997>
- Elde, N.C.; Child, S.J.; Eickbush, M.T.; Kitzman, J.O.; Rogers, K.S.; Shendure, J.; Geballe, A.P.; Malik, H.S. Poxviruses deploy genomic accordions to adapt rapidly against host antiviral defenses. **Cell**, 150, 831–841. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.049>
- Enright, M.C.; Day, N.P.J.; Davies, C.E.; Peacock, S.J.; Spratt, B.G. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, 38, 1008–1015. 2000. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.3.1008-1015.2000>
- Fitzgerald, J.R. Livestock-associated *Staphylococcus aureus*: Origin, evolution and public health threat. **Trends in Microbiology**, 20, 192–198. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.01.006>
- Fueyo, J.M.; Mendoza, M.C.; Rodicio, M.R.; Muñoz, J.; Alvarez, M.A.; Martín, M.C. Cytotoxin and pyrogenic toxin superantigen gene profiles of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical mastitis in dairy cows and relationships with macrorestriction genomic profiles. **Journal of Clinical Microbiology**, 43, 1278–1284. 2005. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.3.1278-1284.2005>
- Geary, U.; Lopez-Villalobos, N.; Begley, N.; McCoy, F.; O'Brien, B.; O'Grady, L.; Shalloo, L. Estimating the effect of mastitis on the profitability of Irish dairy farms. **Journal of Dairy Science**, 95, 3662–3673. 2012. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4863>
- Getaneh, A.M.; Alemu, S.; Hogeveen, H. Stochastic bio — economic modeling of mastitis in Ethiopian dairy farms. **Preventive Veterinary Medicine**, 138, 94–103. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.01.014>
- Haveri, M.; Roslöf, A.; Rantala, L.; Pyörälä, S. Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. **Journal of Applied Microbiology**, 103, 993–1000. 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03356.x>
- Herron-Olson, L.; Fitzgerald, J.R.; Musser, J.M.; Kapur, V. Molecular correlates of host specialization in *Staphylococcus aureus*. **PLoS One**, 2. 2007. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001120>
- Hidron, A.I.; Low, C.E.; Honig, E.G.; Blumberg, H.M. Emergence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300 as a cause of necrotising community-onset pneumonia. **Lancet Infectious Diseases**, 9, 384–392. 2009. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70133-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70133-1)

- Hoekstra, J.; Zomer, A.L.; Rutten, V.P.M.G.; Benedictus, L.; Stegeman, A.; Spaninks, M.P.; Bennedsgaard, T.W.; Biggs, A.; Vliegheer, S. De, Mateo, D.H.; Schlenstedt, R.H. Genomic analysis of European bovine *Staphylococcus aureus* from clinical versus subclinical mastitis. **Scientific Reports**, 1–11. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75179-2>
- Ilczyszyn, W.M.; Kosecka-Strojek, M.; Międzobrodzki, J. Phage-Associated Virulence Determinants of *Staphylococcus aureus*. **Pet-to-Man Travel**. Staphylococci A World Prog. 173–183. 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813547-1.00014-5>
- Kim, D.; Pertea, G.; Trapnell, C.; Pimentel, H.; Kelley, R.; Salzberg, S. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. **Genome Biology**, 14, 1–13. 2013.
- Kozytska, S.; Stauß, D.; Pawlik, M.; Hensen, S.; Eckart, M.; Ziebuhr, W.; Witte, W.; Ohlsen, K. Identification of specific genes in *Staphylococcus aureus* strains associated with bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**. 145, 360–365. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.03.020>
- Kuroda, M.; Ohta, T.; Uchiyama, I.; Baba, T.; Yuzawa, H.; Kobayashi, I.; Kobayashi, N.; Cui, L.; Oguchi, A.; Aoki, K.I.; Nagai, Y.; Lian, J.Q.; Ito, T.; Kanamori, M.; Matsumaru, H.; Maruyama, A.; Murakami, H.; Hosoyama, A.; Mizutani-Ui, Y.; Takahashi, N.K.; Sawano, T.; Inoue, R.I.; Kaito, C.; Sekimizu, K.; Hirakawa, H.; Kuhara, S.; Goto, S.; Yabuzaki, J.; Kanehisa, M.; Yamashita, A.; Oshima, K.; Furuya, K.; Yoshino, C.; Shiba, T.; Hattori, M.; Ogasawara, N.; Hayashi, H.; Hiramatsu, K.; 2001. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet**, 357, 1225–1240. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04403-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04403-2)
- Langmead, B.; Salzberg, S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods** 9, 357–359. 2012. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Mao, G.; Zhao, Y.; Kang, X.; Li, Z.; Zhang, Y.; Wang, X.; Sun, F.; Sankaran, K.; Zhang, X.C. Crystal structure of *E. coli* lipoprotein diacylglyceryl transferase. **Nature Communications**, 7:10198. 2016. <https://doi.org/10.1038/ncomms10198>
- Mohammad, M.; Na, M.; Hu, Z.; Nguyen, M.; Koppurapu, P.K.; Jarneborn, A.; Karlsson, A.; Ali, A.; Pullerits, R.; Götz, F.; Jin, T. *Staphylococcus aureus* lipoproteins promote abscess formation in mice, shielding bacteria from immune killing. **Communications Biology** 4, 1–12. 2021. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01947-z>
- Moon, B.Y.; Park, J.Y.; Robinson, D.A.; Thomas, J.C.; Park, Y.H.; Thornton, J.A.; Seo, K.S. Mobilization of genomic islands of *Staphylococcus aureus* by temperate bacteriophage. **PLoS One** 11, 1–16. 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151409>
- Müller, P.; Müller-Anstett, M.; Wagener, J.; Gao, Q.; Kaesler, S.; Schaller, M.; Biedermann, T.; Götz, F. The *Staphylococcus aureus* lipoprotein SitC colocalizes with toll-like receptor 2 (TLR2) in murine keratinocytes and elicits intracellular TLR2 accumulation. **Infection and Immunity**, 78(10):4243–50. 2010. <https://doi.org/10.1128/IAI.00538-10>
- Nguyen, M.; Uebele, J.; Kumari, N.; Nakayama, H.; Peter, L.; Ticha, O.; Woischnig, A.; Schmalzer, M.; Khanna, N.; Dohmae, N.; Lee, B.L.; Bekeredjian-ding, I.; Götz, F. Lipid moieties on lipoproteins of commensal and non-commensal staphylococci induce differential immune responses. **Nature Communications**, 8, 1–12. 2017. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02234-4>
- Nguyen, M.T.; Götz, F. Lipoproteins of Gram-Positive Bacteria: Key Players in the Immune

- Response and Virulence. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 80, 891–903. 2016. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00028-16>.
- Nguyen, M.T.; Kraft, B.; Yu, W.; Demicrioglu, D.D.; Hertlein, T.; Burian, M.; Schmalzer, M.; Boller, K.; Bekeredjian-Ding, I.; Ohlsen, K.; Schitteck, B.; Götz, F.; 2015. The vSaa Specific Lipoprotein Like *Cluster (lpl)* of *S. aureus* USA300 Contributes to Immune Stimulation and Invasion in Human Cells. **PLoS Pathogens**, 11, 1–27. 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004984>
- Nguyen, M.-T.; Peisl, L.; Barletta, F.; Luqman, A.; Götz, F. Toll-Like Receptor 2 and Lipoprotein-Like Lipoproteins Enhance *Staphylococcus aureus* Invasion in Epithelial Cells. **Infection and Immunology**, 86. 2018. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/IAI.00343-18>
- Nonnemann, B.; Lyhs, U.; Svennesen, L.; Kristensen, K.A.; Klaas, I.C.; Pedersen, K. Bovine mastitis bacteria resolved by MALDI-TOF mass spectrometry. **Journal of Dairy Science**, 102, 2515–2524. 2019. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15424>
- Oliveira, L.; Rodrigues, A.C.; Hulland, C.; Ruegg, P.L. Enterotoxin production, enterotoxin gene distribution, and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* recovered from milk of cows with subclinical mastitis. **American Journal of Veterinary Research**, 72, 1361–1368. 2011. <https://doi.org/10.2460/ajvr.72.10.1361>
- Peton, V.; Bouchard, D.S.; Almeida, S.; Rault, L.; Falentin, H.; Jardin, J.; Jan, G.; Hernandez, D.; François, P.; Schrenzel, J.; Azevedo, V.; Miyoshi, A.; Berkova, N.; Even, S.; Le Loir, Y. Fine-tuned characterization of *Staphylococcus aureus* Newbould 305, a strain associated with mild and chronic mastitis in bovines. **Veterinary Research**, 45, 1–15. 2014. <https://doi.org/10.1186/s13567-014-0106-7>
- Peton, V.; Le Loir, Y. *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. **Infection, Genetics and Evolution**, 21, 602–615. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.08.011>
- Rainard, P.; Foucras, G.; Fitzgerald, J.R.; Watts, J.L.; Koop, G.; Middleton, J.R. Knowledge gaps and research priorities in *Staphylococcus aureus* mastitis control. **Transboundary Emerging Diseases**, 65(Suppl 1):149–165. 2018. <https://doi.org/10.1111/tbed.12698>
- Richardson, E.J.; Bacigalupe, R.; Harrison, E.M.; Weinert, L.A.; Lycett, S.; Vrieling, M.; Robb, K.; Hoskisson, P.A.; Holden, M.T.G.; Feil, E.J.; Paterson, G.K.; Tong, S.Y.C.; Shittu, A.; van Wamel, W.; Aanensen, D.M.; Parkhill, J.; Peacock, S.J.; Corander, J.; Holmes, M.; Fitzgerald, J.R. Gene exchange drives the ecological success of a multi-host bacterial pathogen. *Nature Ecology Evolution*, 2, 1468–1478. 2018. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0617-0>
- Rocha, L.S.; Silva, D.M.; Silva, M.P.; Vidigal, P.M.P.; Silva, J.C.F.; Guerra, S.T.; Ribeiro, M.G.; De Mendes, T.A.O.; De Ribon, A.O.B. Comparative genomics of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical and clinical bovine mastitis. **PLoS One** 14, 1–19. 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220804>
- Santos, R.P.; Souza, F.N.; Oliveira, A.C.D.; de Souza Filho, A.F.; Aizawa, J.; Moreno, L.Z.; da Cunha, A.F.; Cortez, A.; Della Libera, A.M.M.P.; Heinemann, M.B.; Cerqueira, M.M.O.P. Molecular typing and antimicrobial susceptibility profile of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis and nasal samples. **Animals**, 10, 1–9. 2020. <https://doi.org/10.3390/ani10112143>
- Schenk, M.; Belisle, J.T.; Modlin, R.L. TLR2 Looks at Lipoproteins. **Immunity**, 31, 847–849. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.11.008>

- Schluepen, C.; Malito, E.; Marongiu, A.; Schirle, M.; McWhinnie, E.; Lo Surdo, P.; Biancucci, M.; Falugi, F.; Nardi-Dei, V.; Marchi, S.; Fontana, M.R.; Lombardi, B.; De Falco, M.G.; Rinaudo, C.D.; Spraggon, G.; Nissum, M.; Bagnoli, F.; Grandi, G.; Bottomley, M.J.; Liberatori, S. Mining the bacterial unknown proteome: Identification and characterization of a novel family of highly conserved protective antigens in *Staphylococcus aureus*. **Biochemistry Journal**, 455, 273–284. 2013. <https://doi.org/10.1042/BJ20130540>
- Schmaler, M.; Jann, N.J.; Ferracin, F.; Landolt, L.Z.; Biswas, L.; Götz, F.; Landmann, R. Lipoproteins in *Staphylococcus aureus* mediate inflammation by TLR2 and iron-dependent growth *in vivo*. **Journal of Immunology**, 182, 7110–7118. 2009 <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804292>
- Schmidt, T.; Kock, M.M.; Ehlers, M.M. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis and close human contacts in South African dairy herds: Genetic diversity and inter-species host transmission. **Frontiers Microbiology**, 6;8:511. 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00511>
- Shahmirzadi, S. V.; Nguyen, M.T.; Götztz, F.; 2016. Evaluation of *Staphylococcus aureus* lipoproteins: Role in nutritional acquisition and pathogenicity. **Frontiers in Microbiology**, 7, 1–15. 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01404>
- Silva, D.M.; da Silva, M.P.; Vidigal, P.M.P.; Barcelos, R.M.; Klein, R.C.; Aguilar, A.P.; Fabres-Klein, M.H.; Oliveira, G.; Ribon, A.O.B. Draft genome sequences of *Staphylococcus aureus* strains isolated from subclinical bovine mastitis in Brazil. **Genome Announcements**, 4(1):e01594–15. 2016. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01594-15>
- Smith, E.M.; Green, L.E.; Medley, G.F.; Bird, H.E.; Fox, L.K.; Schukken, Y.H.; Kruze, J. V.; Bradley, A.J.; Zadoks, R.N.; Dowson, C.G. Multilocus sequence typing of intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, 43, 4737–4743. 2005. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.9.4737-4743.2005>
- Soest, F.J.S. Van, Abbeloos, E.; Mcdougall, S.; Hogeveen, H. Addition of meloxicam to the treatment of bovine clinical mastitis results in a net economic benefit to the dairy farmer. **Journal of Dairy Science**, 1–11. 2018. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12869>
- Spoor, L.E.; McAdam, P.R.; Weinert, L.A.; Rambaut, A.; Hasman, H.; Aarestrup, F.M.; Kearns, A.M.; Larsen, A.R.; Skov, R.L.; Ross Fitzgerald, J. Livestock origin for a human pandemic clone of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **MBio** 4. 2013. <https://doi.org/10.1128/mBio.00356-13>
- Tartaglia, N.R.; Nicolas, A.; Rodovalho, V. de R.; Luz, B.S.R. da, Briard-Bion, V.; Krupova, Z.; Thierry, A.; Coste, F.; Burel, A.; Martin, P.; Jardin, J.; Azevedo, V.; Le Loir, Y.; Guédon, E. Extracellular vesicles produced by human and animal *Staphylococcus aureus* strains share a highly conserved core proteome. 2020. **Scientific Reports**, 10, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64>
- Tribelli, P.M.; Luqman, A.; Nguyen, M.T.; Madlung, J.; Fan, S.H.; Macek, B.; Sass, P.; Bitschar, K.; Schitteck, B.; Kretschmer, D.; Götz, F. *Staphylococcus aureus* *Lpl* protein triggers human host cell invasion via activation of Hsp90 receptor. **Cell Microbiology**, 22, 1–14. 2020. doi:10.1111/cmi.13111

CONCLUSÕES GERAIS

Com base nos resultados apresentados neste trabalho, concluiu-se que:

- Existe alta similaridade no conteúdo gênico entre as cepas oriundas de mastite subclínica *S. aureus* 302, 170, 1269, 1364, e as cepas oriundas de mastite clínica RFF12 e N305;
- Muitos SNPs foram detectados nos fatores de virulência das cepas relacionadas à mastite subclínica que podem conferir algum tipo de vantagem no processo infeccioso;
- A variação da sequência de nucleotídeos e não apenas a presença/ausência de fatores de virulência deve também ser considerada ao comparar isolados que causam diferentes manifestações de mastite;
- Variações na sequência de nucleotídeos em uma lipoproteína pertencente ao *lpl cluster* podem ser usadas para separar isolados de mastite com base na manifestação (clínica/subclínica);
- As variações de sequência detectadas na lipoproteína cl3700 estão localizadas na porção C-terminal, mesmo sítio de interação com a chaperona Hsp90 nas células epiteliais do hospedeiro;
- As variações da sequência detectadas na porção C-terminal da lipoproteína se traduzem em aminoácidos de propriedades distintas, o que podem impactar na forma como a proteína interage com a glândula mamária e com o sistema imune do animal hospedeiro;
- A organização do *cluster lpl* é diferente nas cepas Sau302 e RF122. Os genes *lpl* de Sau302 estão em menor número e preservam mais identidade de sequência entre si.