

ANANDA PEREIRA AGUILAR

CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES DE *Staphylococcus aureus* E DISPERSÃO DE BIOFILMES POR UMA LECTINA TIPO C DE *Bothrops jararacussu*

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*

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

A283c
2016
Aguilar, Ananda Pereira, 1987-
Caracterização de estirpes de *Staphylococcus aureus* e
dispersão de biofilmes por uma lectina tipo C de *Bothrops
jararacussu* / Ananda Pereira Aguilar. - Viçosa, MG, 2016.
xi, 97f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador : Andréa de Oliveira Barros Ribon.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Staphylococcus aureus*. 2. Mastite Bovina.
3. Proteômica. 4. Lectina. 5. Biofilmes. 6. *Bothrops
jararacussu*. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.
Programa de Pós-graduação em Bioquímica Aplicada.
II. Título.

CDD 22. ed. 579.353

ANANDA PEREIRA AGUILAR

**CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES DE *Staphylococcus aureus* E
DISPERSÃO DE BIOFILMES POR UMA LECTINA TIPO C DE *Bothrops
jararacussu***

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: 29 de julho de 2016.

Analice Cláudia de Azevedo

Denise Mara Soares Bazzolli

Humberto Josué de Oliveira Ramos
(Coorientador)

Luciano Gomes Fietto

Andréa de Oliveira Barros Ribon
(Orientadora)

A Deus
A minha família e amigos
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

A Deus por ter me dado força para progredir nessa longa caminhada;

À Universidade Federal de Viçosa e ao departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela infraestrutura que permitiu a realização deste trabalho;

À Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pela bolsa concedida;

À minha orientadora Andréa de Oliveira Barros Ribon pelos quase dez anos de ensinamentos, orientação e pela oportunidade de novos desafios a cada etapa;

Aos coorientadores Humberto Josué de Oliveira Ramos, Leandro Licursi de Oliveira e Raphael Contelli Klein pelos aconselhamentos e coorientação;

Aos professores Luciano Gomes Fietto, Analice Cláudia de Azevedo e Denise Mara Soares Bazzolli pelas sugestões e participação na banca examinadora;

Aos laboratórios do Bioagro e do Departamento de Bioquímica pela disponibilidade de utilizar equipamentos e materiais. Em especial, gostaria de agradecer ao Thiago Onofre, Raphael Klein e Flaviane Coutinho pela disponibilidade de transmitir seus conhecimentos científicos e laboratoriais;

Aos meus pais e irmãos e, em especial a minha mãe que sempre acreditou e apostou em meus sonhos, sem ela essa caminhada não seria possível;

Aos meus amigos Eduardo, Sandro, Graça e Ruth por estarem presentes na minha vida, apoiando, acompanhando e orientando nos momentos mais imprescindíveis.

Aos amigos do LBM pelo apoio e compreensão e pelos momentos de distração. E, aos demais amigos pelo carinho, amizade e confiança.

BIOGRAFIA

Ananda Pereira Aguilár, filha de João Messias Sousa Aguilár e Francisquita Pereira dos Anjos, nasceu na cidade de Teófilo Otoni, Minas Gerais, em 30 de março de 1987. Em dezembro de 2004 completou o ensino médio no Colégio Comunitário Dr. Fernando Magalhães em Almenara-MG.

Em maio de 2006, ingressou na Universidade Federal de Viçosa, concluindo o curso de bacharelado em Bioquímica em julho de 2010. Em agosto do mesmo ano, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa com defesa de dissertação em 23 de julho de 2012. E, em agosto de 2012 ingressou no doutorado em Bioquímica Aplicada na Universidade Federal de Viçosa submetendo-se à defesa de tese em 29 de julho de 2016.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO GERAL	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	4
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
Capítulo I	24
ABSTRACT	25
INTRODUCTION	26
METHODS	28
Bacterial strains and culture conditions.....	28
DNA-based methods.....	28
Phenotypic assays.....	29
Infection of <i>Galleria mellonella</i> larvae.....	29
Histopathology of <i>G. mellonella</i> infected with <i>S. aureus</i>	30
MAC-T assays	30
Statistical analysis	32
RESULTS	33
Differences in phenotype between genetically related <i>S. aureus</i> strains..	33
Differences in virulence between genetically related <i>S. aureus</i> strains	35
Response of <i>Galleria mellonella</i> to infection with <i>S. aureus</i> strains.....	37
Invasion, persistence and cytotoxicity in MAC-T cells.....	37
DISCUSSION.....	39
CONCLUSION.....	42
CONFLICT OF INTEREST STATEMENT	42
ACKNOWLEDGEMENTS	42
REFERENCES	43

Capítulo II.....	47
RESUMO	48
INTRODUÇÃO.....	49
MATERIAL E MÉTODOS	51
Micro-organismos e condições de cultivo.....	51
Eletroforese em campo pulsado (PFGE)	51
Curvas de crescimento	52
Preparo de extratos proteicos	52
Eletroforese bidimensional	52
RESULTADOS	54
PFGE e Crescimento Bacteriano	54
Análise proteômica.....	55
DISCUSSÃO.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
Capítulo III.....	69
RESUMO	70
INTRODUÇÃO.....	71
MATERIAL E MÉTODOS.....	74
Micro-organismos, condições de cultivo e obtenção do veneno	74
Purificação da lectina	74
Lectinas comerciais.....	74
Efeito das lectinas sobre o biofilme.....	75
Inibição da formação de biofilme em superfícies	76
Inibição da atividade de lectina por açúcares	76
Efeito de antibióticos sobre o biofilme bacteriano	76
HPLC	77
qRT-PCR	77
RESULTADOS	79

DISCUSSÃO.....	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
CONCLUSÕES GERAIS	96

RESUMO

AGUILAR, Ananda Pereira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2016. **Caracterização de estirpes de *Staphylococcus aureus* e dispersão de biofilmes por uma lectina tipo C de *Bothrops jararacussu*.** Orientadora: Andréa de Oliveira Barros Ribon. Coorientadores: Humberto Josué de Oliveira Ramos, Leandro Licursi de Oliveira e Raphael Contelli Klein.

A grande diversidade de estirpes de *Staphylococcus aureus* em circulação nos rebanhos leiteiros reforça a necessidade de uma melhor caracterização dessas bactérias a fim de gerar informações que possam ser usadas no controle da mastite bovina. Neste trabalho, hipotetizou-se que estirpes de *S. aureus* geneticamente relacionadas causam diferentes formas de mastite. As bactérias *S. aureus* 302 e *S. aureus* 322, foram isoladas de vacas com mastite persistente e não-persistente, respectivamente, e apresentaram os mesmos genes de virulência e perfis de bandas idênticos quando genotipadas por análise em multilocus de repetições em tandem de número variável (MLVA). Por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), utilizado como um método genotípico adicional, comprovou-se que as bactérias são geneticamente relacionadas. Apesar dessa proximidade, ensaios *in vitro* de produção de biofilme, hemólise, invasão e persistência em células mamárias bovinas MAC-T e virulência *in vivo* em modelo *Galleria mellonella* comprovaram diferenças significativas entre as estirpes. Os resultados sugerem que apenas a caracterização molecular é insuficiente para correlacionar sintomas da doença à uma determinada estirpe. *S. aureus* 302 e *S. aureus* 322, além de *S. aureus* 469 (mastite persistente) e *S. aureus* 366 (mastite não-persistente) foram contrastadas por uma abordagem proteômica. Extratos de proteínas totais foram preparados a partir de bactérias crescidas até a fase exponencial e separados por eletroforese bidimensional. Um total de 35 *spots* com abundância diferencial foi detectado, dos quais três foram exclusivos de *S. aureus* 302 quando comparada a *S. aureus* 322 e *S. aureus* 366 e podem representar marcadores que indicam a persistência da bactéria no animal. Este trabalho também avaliou a dispersão de biofilmes de *S. aureus* NRS 155 e *S. epidermidis* NRS 101 pela lectina BjcuL, isolada de *Bothrops jararacussu*. Essa lectina não impediu a adesão inicial das células e foi capaz de inibir a formação de biofilmes quando pré-aderida a superfícies abióticas. Houve uma melhor atividade sobre biofilme pré-formado de *S. aureus* NRS 155 em comparação S.

epidermidis NRS 101. Por qRT-PCR, detectou-se uma alteração na expressão de genes envolvidos no controle do operon *ica*, responsável pela produção do polissacarídeo de adesão intercelular. Finalmente, BjuL foi capaz de restaurar a susceptibilidade de bactérias em biofilme pré-formado a antibióticos como gentamicina e ampicilina, revelando o potencial da estratégia antibiofilme no controle de infecções de *S. aureus*.

ABSTRACT

AGUILAR, Ananda Pereira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2016. **Characterization of *Staphylococcus aureus* strains and biofilm dispersion by a C-type lectin of *Bothrops jararacussu*.** Adviser: Andréa de Oliveira Barros Ribon. Co-advisers: Humberto Josué de Oliveira Ramos, Leandro Licursi de Oliveira and Raphael Contelli Klein.

The great diversity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk-producing cattle reinforces the need of bacterial characterization to raise information that can be used in the control of bovine mastitis. In this work, we hypothesized that genetically related *S. aureus* strains can cause different forms of mastitis. The strains *S. aureus* 302 and *S. aureus* 322 were isolated from cows with persistent and non-persistent mastitis, respectively, and harbored the same virulence genes and identical banding profiles when genotyped by multilocus variable-number tandem repeats analysis (MLVA). Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) was used as an additional genotyping method and confirmed that the bacteria were genetically related. Despite close proximity, *in vitro* assays like biofilm production, hemolysis, invasion, and persistence in the bovine mammary epithelial cells (MAC-T) and also *in vivo* assessment of virulence in the *Galleria mellonella* model revealed significant differences between the strains. These results suggest that molecular analysis alone is insufficient to establish a link between a bacterial strain and the clinical symptoms of mastitis. Also in this work, *S. aureus* 302 and *S. aureus* 322 besides the strains *S. aureus* 469 (persistent mastitis) and *S. aureus* 366 (non-persistent mastitis) were analyzed using a proteomic approach. Extracts of intracellular proteins were prepared from bacteria grown until exponential phase and separated by two-dimensional electrophoresis. A total of 35 spots differentially expressed was detected while three of them were exclusive of *S. aureus* 302 when compared to *S. aureus* 322 and *S. aureus* 366, and may represent markers of bacterial persistence in animals. Finally, this study studied the dispersion of *S. aureus* NRS 155 and *S. epidermidis* NRS 101 biofilms by the lectin BjcUL isolated from *Bothrops jararacussu*. The lectin did not prevent the initial adherence of bacterial cells and inhibited biofilm formation when abiotic surfaces were pre-coated with the protein. Anti-biofilm activity was higher on *S. aureus* NRS 155 preformed biofilms in comparison to *S. epidermidis* NRS 101. Change in the expression of genes involved in the control

of the *ica* operon, responsible for the production of polysaccharide intercellular adhesin, was detected by qRT-PCR. BjcuL restored susceptibility of preformed biofilms to gentamicin and ampicillin, revealing the potential of antibiofilm strategy to control *S. aureus* infections.

INTRODUÇÃO GERAL

Minas Gerais é responsável por 26,6 % da produção nacional de leite, o que caracteriza o estado como o principal polo leiteiro do país. Dentre os produtores de leite podemos encontrar aqueles especializados, que investem em tecnologia e produzem um leite de melhor qualidade, conseqüentemente recebendo uma melhor remuneração pelo produto, e os produtores de pequeno porte, que fazem da atividade leiteira uma atividade complementar à agricultura ou à pecuária de corte e utilizam, na maioria das vezes, a mão de obra familiar (Pereira e Andrade, 2006; Carvalho et al., 2007). Os grandes produtores (> 500 litros leite/dia) contribuem com 44,4 % da produção, enquanto os pequenos produtores (< 50 litros leite/dia) são responsáveis por 8 % da produção, embora sejam a maioria (44 %) (Carvalho et al., 2007).

A mastite bovina, uma inflamação da glândula mamária causada principalmente por micro-organismos, é considerada a principal doença do rebanho leiteiro (Viguiet et al., 2009). *Staphylococcus aureus*, uma das principais bactérias causadoras da mastite, é considerado um patógeno contagioso de difícil erradicação por se localizar na pele do teto ou dentro do úbere, o que facilita transmissão entre animais durante a ordenha (Sudhan e Sharma, 2010; Hamadani et al., 2013). *Staphylococcus aureus* pode causar mastite clínica, embora na maioria dos casos a doença se manifeste de modo subclínico. A mastite clínica, onde os sintomas típicos como inchaço e vermelhidão da glândula mamária e a presença de grumos e coágulos no leite são visualizados, representa de 10 a 12 % dos casos na maioria dos rebanhos leiteiros (Schwarz e Santos, 2012). Certas estirpes de *S. aureus* estão associadas à mastite gangrenosa, uma forma de mastite clínica extremamente preocupante que ocorre durante a parição e tem altos índices de mortalidade. Os animais que sobrevivem apresentam geralmente perda parcial ou total da glândula mamária.

Staphylococcus aureus pode causar também a mastite subclínica, que é assintomática, sem sinais de inflamação ou anormalidades no leite, embora sua composição seja alterada. Acredita-se que para cada caso de mastite clínica, existam de 20 a 30 casos de mastite subclínica. Por ser

silenciosa, essa manifestação se dissemina com facilidade pelo rebanho e ocasiona os maiores prejuízos aos produtores. Como agravante, a mastite subclínica tem uma tendência a se tornar crônica que é uma forma de manifestação da doença que persiste por um período de tempo prolongado, podendo permanecer inclusive de uma lactação a outra (Hamadani et al., 2013).

As estirpes de *S. aureus* encontradas nos rebanhos possuem grande heterogeneidade genética (Saei, et al., 2009; Ote et al., 2011; Costa et al., 2012; Klein et al., 2012), o que reforça a necessidade de caracterizar melhor essas bactérias a fim de gerar informações que possam ser usadas no controle da doença. Acredita-se que as diferenças genotípicas entre as estirpes possam levar ao desenvolvimento de diferentes tipos de infecção estafilocócicas (Zecconi et al., 2006). Já foi comprovado que o subtipo ST151, definido pela técnica de sequenciamento multilocus (*Multilocus Sequencing Type* – MLST) é mais virulento, causa maiores danos ao tecido mamário e um aumento da mortalidade em modelo murino (Guinane et al., 2008).

A produção de vários fatores de virulência por *Staphylococcus aureus* contribui para a colonização e infecção da glândula mamária, embora, os mecanismos que propiciam a evolução da doença para as diversas manifestações clínicas observadas não sejam conhecidos até o momento (Peton e Le Loir, 2014). A identificação desses fatores é de fundamental importância para auxiliar no manejo do rebanho, impedindo que a doença se instale ou dissemine entre os animais, e para desenvolver novas formas de tratamento da mastite.

Na tentativa de entender as razões que determinam a evolução para a mastite crônica, pesquisadores têm focado na caracterização de estirpes persistentes que são aquelas isoladas de um mesmo animal durante coletas realizadas em vários meses consecutivos. Acredita-se que as estirpes persistentes de *S. aureus* sejam mais adaptadas ao úbere bovino e por isso causem com mais frequência a mastite crônica (Schukken et al., 2011). Genes que codificam os superantígenos *sed* e *sej*, e o gene *blaZ*, que confere resistência à penicilina, são predominantes nas estirpes persistentes (Haveri et al., 2007). A ausência de expressão do polissacarídeo capsular

(CP5 ou CP8) juntamente com a alta sobrevivência intracelular pode possibilitar com que a bactéria colonize o hospedeiro por um período de tempo prolongado contribuindo para a persistência (Bardiau et al., 2014). Porém, até o momento não se definiu de forma precisa os fatores que seriam responsáveis pela infecção intramamária crônica.

A formação de biofilme é um fator que pode justificar a persistência do patógeno no hospedeiro. Essa estrutura é formada por uma comunidade de células bacterianas cercadas por uma matriz polimérica composta de polissacarídeos, proteínas e DNA. Bactérias formadoras de biofilme tornam-se mais resistentes à ação dos agentes antimicrobianos e encontram-se protegidas do sistema imune, o que pode contribuir para o desenvolvimento das infecções recorrentes. Assim, a descoberta de novas estratégias de controle do biofilme é de grande interesse para melhorar o tratamento e combater as infecções crônicas. Klein et al. (2015) identificaram uma lectina tipo C (BjcuL), isolada do veneno de serpente *Bothrops jararacussu*, com a capacidade de inibir a formação do biofilme e desfazer biofilmes pré-formados de *Staphylococcus* spp. Porém o estudo não avaliou uma possível ação terapêutica dessa proteína.

Neste trabalho foram contrastadas estirpes de *S. aureus* isoladas de animais com manifestação de mastite subclínica persistente ou não-persistente proveniente de um rebanho leiteiro da Zona da Mata de Minas Gerais. Apesar da proximidade genética, as estirpes apresentaram diferenças fenotípicas e alteração na expressão de proteínas intracelulares. Adicionalmente, este trabalho avaliou a ação antibiofilme da lectina BjcuL que mostrou ser efetiva no rompimento de biofilme pré-estabelecido e em impedir a colonização de bactérias em microplacas pré-revestidas com BjcuL.

REVISÃO DE LITERATURA

Em 2014, o Brasil passou a ocupar a quinta posição de maior produtor de leite (35,2 bilhões de litros/ano) do mundo atrás apenas da União Européia, Estados Unidos, Índia e China (Embrapa Gado de Leite, 2015; SEAB, 2015). Minas Gerais é o principal polo leiteiro do país contribuindo com 26,6 % do total de leite produzido, seguido por Rio Grande do Sul (13,3 %) e Paraná (12,9 %) (Embrapa Gado de Leite, 2015).

Apesar da alta produção leiteira, o Brasil possui uma baixa produtividade (1382 litros de leite/animal) comparada a países como EUA (9678 litros de leite/animal) e China (3003 litros de leite/animal) (Embrapa Gado de Leite, 2013). O mesmo é observado na produtividade do estado de Minas Gerais (1635 litros de leite/animal) comparada a outros estados tais como Paraná (2727 litros de leite/animal) e Rio Grande do Sul (3182 litros de leite/animal) (Embrapa Gado de Leite, 2015).

A mastite bovina, considerada a principal doença da pecuária leiteira, é um dos fatores que contribui para a baixa produtividade dos rebanhos. Ela é uma inflamação da glândula mamária causada principalmente por micro-organismos, em especial bactérias. Estima-se que os prejuízos sejam de aproximadamente 200 dólares/vaca/ano (Schroeder, 2012), contabilizados na forma de diminuição da produção, redução da qualidade do leite, gastos com medicamentos, diagnóstico e serviços veterinários, descarte do leite e abate dos animais (Hogeveen et al., 2011).

A mastite pode se apresentar nas formas clínica e subclínica. A mastite clínica é caracterizada por inchaço e vermelhidão da glândula mamária, como a presença de grumos e coágulos no leite, sendo dividida em três categorias. Na mastite clínica hiperaguda ocorre uma inflamação grave, na qual a vaca afetada apresenta sinais sistêmicos de febre, depressão, tremores, perda de apetite e perda de peso além de ocorrer alterações na composição do leite e perda na produção. A mastite clínica aguda é similar à mastite hiperaguda, porém com sinais mais brandos como febre e depressão suave enquanto que na mastite clínica subaguda os sinais de inflamação da glândula mamária são mínimos e os sinais sistêmicos não são visíveis (Hamadani et al., 2013). O teste da caneca telada, recomendado a cada ordenha, é a principal forma de diagnóstico desse tipo de manifestação.

Nele, jatos de leite são colocados numa caneca de fundo escuro, na qual podem ser observadas modificações no leite como a presença de grumos (Sudhan e Sharma, 2010).

A mastite subclínica apresenta-se assintomática e para sua detecção são realizados testes indiretos baseados na determinação da quantidade de células somáticas, como leucócitos e células epiteliais no leite (Bradley, 2002). O *California Mastitis Test* (CMT) é um dos testes mais utilizados para detecção da mastite subclínica por ser rápido, barato, simples e poder ser utilizado no próprio campo (Mahmmod et al., 2013). Amostras de leite são colocadas em contato com um detergente aniônico neutro, que rompe a membrana das células somáticas para liberação do conteúdo celular, seguido de agregação dos ácidos nucléicos, o que forma um gel com viscosidade variada que depende da quantidade de células presentes. Os resultados desse teste são dados em escores, que variam de 0 a 4, sendo negativo (0), traço (1), fracamente positivo (2), positivo (3) e fortemente positivo (4) (Bhutto et al., 2012).

A mastite também pode ser classificada em contagiosa ou ambiental. A primeira é causada por bactérias patogênicas que se localizam na pele do úbere e nas lesões da teta, com transmissão de animal para animal (Tiwarly et al., 2013). Os patógenos mais comuns associados a esse tipo de infecção são *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* (Hamadani et al., 2013). Na mastite ambiental, a transmissão ocorre pelo próprio ambiente (alimento, água, terra e cama) das vacas leiteiras, sendo *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Streptococcus* spp. e *Arcanobacterium pyogenes* os principais patógenos (Sudhan e Sharma, 2010; Hamadani, et al., 2013). *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* sp. têm sido apontados como os patógenos mais prevalentes nos rebanhos leiteiros do Brasil (Medeiros et al., 2008; Andrade et al., 2009; Ribeiro et al., 2009; Chagas et al., 2012).

As estratégias para controle da mastite são baseadas no tratamento com antibióticos, que têm sido amplamente utilizados ao longo dos últimos 40 anos, e de boas medidas de higiene como lavagem e desinfecção das tetas antes e após a ordenha, além da lavagem das mãos do ordenhador. Essas medidas de controle são fundamentais para reduzir a duração das infecções e diminuir a probabilidade de novas infecções (Sharif e

Muhammad, 2009; Tiwari et al., 2013). Para o sucesso da antibioticoterapia, algumas variáveis devem ser analisadas, como a determinação do tipo de agente etiológico predominante em cada fazenda, o perfil de suscetibilidade a antibióticos, além da penetração e distribuição do antibiótico pelo tecido mamário (Mestorino e Errecalde, 2012). Porém, na prática veterinária esses parâmetros nem sempre são considerados e faz com que o uso indiscriminado de antibióticos desencadeie a seleção de estirpes resistentes, comprometendo a eficácia da terapia (Tandon, 2013).

Staphylococcus aureus foi identificado como causador de mastite em bovinos em 1890 e ainda é considerado um dos principais patógenos causadores da doença em todo o mundo (Bogni et al., 2011; Raza et al., 2013; Shaheen et al., 2016). Além de infectar o rebanho bovino, essa bactéria pode também desencadear mastite em outros hospedeiros como seres humanos, cabras, ovelhas e porcos (Chu et al., 2013; Peton e Le Loir, 2014). As taxas de cura das infecções causadas por *S. aureus* variam de 0 % a 80 %, presumivelmente devido a fatores como internalização e localização intracelular (em neutrófilos ou células epiteliais mamárias), a formação de biofilmes intramamários e a persistência *in vivo* devido a formação de um fenótipo peculiar denominado SCVs (*Small Colony Variants*), que tem crescimento lento e a maior capacidade de invasão da célula hospedeira quando comparado à estirpe parental (Tiwari et al., 2013; Penton e Le Loir, 2014).

A tipagem molecular é muito utilizada para examinar a estrutura populacional de *S. aureus* de origem bovina (Rabello et al., 2007). Entre os diferentes métodos que podem ser usados, destaca-se a eletroforese em campo pulsado (*Pulse Field Gel Electrophoresis* - PFGE), onde um perfil de bandas representativo de cada isolado é obtido pela clivagem do cromossomo bacteriano com a enzima *Sma*I, e a tipagem de sequências multilocus (*Multilocus Sequence Typing* - MLST), onde fragmentos internos de sete genes endógenos são sequenciados para revelar polimorfismos existentes entre isolados. Embora o PFGE seja considerado o padrão ouro para análise molecular de *S. aureus*, o MLST tem a vantagem de permitir comparação entre laboratórios, pois os isolados são definidos por um perfil alélico que é usado para definir o tipo de sequência (ST) (Enright et al.,

2000; Larsen et al., 2012). O banco de dados MLST (<http://saureus.mlst.net>) contém mais de 2200 STs diferentes determinados de estirpes isoladas a partir de uma variedade de hospedeiros, embora de origem humana sejam as mais predominantes. Os STs podem ser agrupados em complexos clonais (CC), em alguns casos claramente associados a certos hospedeiros. Estirpes isoladas de casos de mastite em ruminantes, por exemplo, são em sua maioria associada aos complexos clonais CC97, CC133, CC130, CC126 e CC705 (Fitzgerald, 2012). No complexo CC705, encontra-se o ST151, que possui estirpes exclusivamente de origem bovina. Já o CC133 possui estirpes isoladas de bovinos, ovelhas e cabras (Peton e Le Loir, 2014).

A tipagem molecular por MLST de 259 estirpes de origem bovina dos Estados Unidos, Chile, Reino Unido, mais uma estirpe de referência Newbould 305, evidenciou que a maioria (87,4 %) delas pertencia ao complexo clonal CC97 suportando a hipótese que poucos clones têm distribuição mundial e são responsáveis pelas infecções intramamárias bovinas (Smith et al., 2005). Essa hipótese também foi ratificada no Japão e no Brasil onde *S. aureus* de origem bovina pertencente aos complexos clonais CC97 e CC705 (Japão) e CC126 e CC97 (Brasil) foram encontrados (Rabello et al., 2007; Hata et al., 2010). A comparação de 15 estirpes de *S. aureus* isoladas de bovinos da Irlanda e dos Estados Unidos, pertencentes aos ST71, ST97 e ST151 identificou que o ST151 inclui bactérias mais virulentas (Guinane et al., 2008). Por meio de modelo murino foi possível comprovar que essas bactérias causavam maiores danos ao tecido mamário e aumento da mortalidade dos animais, além da elevada expressão dos genes de toxinas citolíticas.

Para colonização e estabelecimento da infecção, *S. aureus* secreta vários fatores de virulência que propiciam a aderência às proteínas da matriz extracelular do tecido hospedeiro (Walsh et al., 2004; Xue et al., 2011). Alguns grupos têm buscado associar a presença de determinados fatores de virulência a um tipo específico de manifestação numa busca por marcadores para o prognóstico da mastite bovina (Haveri et al., 2007; Vautor et al., 2009; Kumar et al., 2011; Veh et al., 2015). O gene *fnbB*, que codifica a proteína ligadora de fibronectina, foi encontrado em estirpes de *S. aureus* causadoras de mastite gangrenosa letal em ovelhas e não em estirpes causadoras de

mastite subclínica (Vautor et al., 2009). Alguns genes de enterotoxinas e adesinas foram mais prevalentes em estirpes causadoras de mastite bovina clínica (Kumar et al., 2011). Um total de 161 estirpes de *S. aureus* de origem bovina foi avaliado por PCR multiplex e simples numa tentativa de correlacionar a presença de 24 genes de virulência com infecções intramamárias persistentes (Haveri et al., 2007). Os resultados mostraram que os genes que codificam os superantígenos *sed* e *sej*, e o gene *blaZ*, que confere resistência à penicilina são predominantes em infecções intramamárias persistentes. Estirpes de *S. aureus* associadas à mastite persistente produzem mais biofilme *in vitro* enquanto, os genes *seg* e *sen*, além do aumento da expressão de *hld* estão mais associados às estirpes não-persistentes (Veh et al., 2015). Klein et al. (2012) identificaram sete importantes genes de virulência em 85 estirpes de *S. aureus* de origem bovina coletadas no sudeste do Brasil. Dentre esses genes *clfB*, *spa*, *sdrCDE* e *fnBP* foram os mais prevalentes detectados em 91,8 %, 85,9 %, 85,9 % e 63,5 % das estirpes, respectivamente. Porém, nenhum estudo foi realizado para estabelecer a virulência *in vivo* das estirpes que apresentaram um maior número de genes.

Uma análise comparativa foi realizada entre as estirpes *S. aureus* O11 e O46, pertencentes ao CC130 e causadores de mastites severa (O11) e suave (O46) em ovelhas, para identificar possíveis fatores relacionados à hipervirulência (Le Maréchal et al., 2011a). Algumas exoproteínas foram identificadas como diferencialmente expressas em O11 e O46. A estirpe O11 apresentou alta expressão de toxinas e proteases, como esperado por ser uma estirpe altamente virulenta, além de um aumento de proteínas responsáveis pela aquisição de ferro, uma adaptação da célula para crescer eficientemente em baixas concentrações desse elemento.

Estudos semelhantes vêm sendo realizados com estirpes de *Escherichia coli* associadas a infecções intramamárias persistentes e não-persistentes (Deگو et al., 2012; Lippolis et al, 2014). Os resultados sugerem que genes responsáveis pela resposta imune (citocinas próinflamatórias, quimiocinas) são mais expressos em resposta à infecção com bactérias causadoras de manifestação não-persistente. Um significativo aumento da expressão dos genes *ler*, *eae*, *flic* e *iutA*, associados à aderência da bactéria

às células hospedeiras foi visto na análise das estirpes persistentes, juntamente com moderada expressão de genes da resposta imune, o que pode facilitar o escape das bactérias dos mecanismos de defesa do hospedeiro e, explicar os sintomas clínicos suaves e a persistência da infecção nas glândulas mamárias. Proteínas associadas à mobilidade, quimiotaxia e membrana celular externa, tiveram uma mudança significativa na expressão. O aumento na expressão das proteínas relacionadas com mobilidade das estirpes persistentes e o maior *swimming* (rotação do flagelo) em relação às outras pode ser indicador de diferenciação entre esses dois tipos de estirpes (Lippolis et al, 2014).

Para sobreviver e replicar eficientemente no ambiente hospedeiro, patógenos intra- e extracelulares devem adaptar seu metabolismo para disponibilidade de nutrientes e condições físicas (pH, disponibilidade de oxigênio e pressão osmótica) das células (Eisenreich et al., 2010; Fuchs et al., 2012). No caso de *S. aureus* associado à mastite bovina, a bactéria deve desenvolver mecanismos de adaptação para superar as condições limitantes de ferro e oxigênio presentes na glândula mamária (Le Maréchal et al., 2011a; 2013). A biodisponibilidade de ferro é baixa (10^{-18} M) devido à alta concentração de proteínas ligadoras de ferro no leite tais como lactoferrina e transferrina. Além disso, a pressão parcial de oxigênio é baixa (23 mm Hg) e diminui mais durante a mastite, onde o nível torna-se dez vezes menor que no leite normal (Peton e Le Loir, 2014). Além de alterar a taxa de oxigênio, a inflamação pode alterar também o pH do leite que passa de 6,4 – 6,6 no leite normal para 7,4 no leite com mastite e alterar o conteúdo de lactose e taxa de caseína/proteínas que diminui $2,1 \text{ g kg}^{-1}$ e 2 %, respectivamente, além de aumentar os teores de sódio e os níveis de proteínas ligadas às respostas inflamatória e imune (Gruet et al., 2001; Le Maréchal et al., 2011b).

As condições descritas acima devem afetar diretamente o metabolismo celular de *S. aureus* influenciando a sobrevivência do patógeno no úbere bovino. Os estudos de proteômica realizados até o momento relatam que os níveis de expressão de proteínas do metabolismo são diferentes entre estirpes de *S. aureus* embora essas informações não sejam suficientemente exploradas para compreender os processos de infecção, associar uma via metabólica a um tipo específico de manifestação ou

mesmo auxiliar na identificação de alvos para o desenvolvimento de drogas. O estudo de Birkenstock et al. (2012) é um bom exemplo de como uma via metabólica pode servir como um alvo potente para combater as infecções estafilocócicas. O potente composto antibacteriano TPBC (*triphenylbismuthdichloride*) age sobre o complexo da piruvato desidrogenase, bloqueando o metabolismo de piruvato e conseqüentemente abolindo as atividades metabólicas centrais de *S. aureus* de origem humana.

É sabido que vias do metabolismo central, como o ciclo do ácido cítrico, podem regular a formação de fatores de virulência em *S. aureus* (Somerville e Proctor, 2009). A inativação do ciclo limita a formação de hexoses a partir da gliconeogênese, impedindo a produção dos precursores do polissacarídeo capsular (CAP 5 e 8) (Sadykov et al., 2010). A falta de glutamato limita a expressão de delta-toxina, o que pode ser revertido com adição desse aminoácido ao meio de cultura (Somerville et al., 2003). Por outro lado, o aumento da atividade do ciclo diminui os níveis de transcrição do operon *icaADBC* e reduz a biossíntese do polissacarídeo de adesão intercelular (PIA), componente do biofilme estafilocócico (Zhu et al., 2009).

Um cenário semelhante pode ser observado em patógenos como *Pseudomonas aeruginosa*. O perfil metabólico de 176 estirpes isoladas de 18 pacientes acometidos com fibrose cística durante um período de infecção de 20 anos revelou que a adaptação ao ambiente pulmonar desencadeou significativas mudanças no perfil metabólico das estirpes como baixa excreção de acetato e alta absorção de aminoácidos aromáticos, o que se acredita ser uma estratégia da bactéria para evitar o alto custo de sua biossíntese (Behrends et al., 2013). Em *Bacillus cereus*, a deleção do gene que codifica lactato desidrogenase A reduz a expressão de enterotoxinas (Laouami et al., 2011). Em *Listeria monocytogenes*, mutantes para a enzima piruvato carboxilase apresentaram deficiência de crescimento intracelular e atenuação da virulência em ensaios desenvolvidos com ratos, comprovando sua importância no processo de infecção (Schar et al., 2010).

A capacidade de *S. aureus* em formar biofilme, uma comunidade de células bacterianas cercada por uma matriz polimérica, é um agravante que contribui para persistência das infecções. O biofilme de estafilococos é constituído principalmente por poli-N-acetil- β -1,6 glicosamina (PNAG),

componente chave da matriz cuja síntese é catalisada por proteínas codificadas pelo operon *ica*, mas possui também proteínas e eDNA (Melchior et al., 2006; Raza et al., 2013). Estudos *in vitro* demonstraram que bactérias associadas a biofilmes são 10 a 1000 vezes mais resistentes aos efeitos dos agentes antimicrobianos comparadas às bactérias crescidas livremente (Olson et al., 2002). A resistência pode ser devida à dificuldade de penetração dos antimicrobianos através da matriz do biofilme, à alteração na taxa de crescimento dos organismos associados ao biofilme e, às mudanças fisiológicas o que incluiu a presença das células persistentes, que têm sido detectadas em números significativos nos biofilmes bacterianos (Melchior et al., 2006; Fauvart et al., 2011).

A lisostafina foi uma das primeiras substâncias identificadas com atividade contra o biofilme *S. aureus* (Wu et al., 2003). A partir dessa descoberta, moléculas que reduzem ou inibem a formação de biofilme têm sido apontadas como aliadas para melhorar a terapia com antimicrobianos e combater as infecções recorrentes (Otto, 2008; Kostakioti et al., 2013). Frações obtidas da planta *Rubus ulmifolius*, ricas em ácido elágico e derivados, diminuíram a formação de biofilme de *S. aureus* e, promoveram o aumento da susceptibilidade aos antibióticos daptomicina, clindamicina e oxacilina (Quave et al., 2012). O óleo de capim-cidreira e seus constituintes (citral e geraniol) inibiram a formação de biofilme e mostraram atividade eficaz sobre biofilme pré-formado de *S. aureus* isolado de mastite bovina (Aiemsraad et al., 2011). Os compostos diterpenos nordehidroabietilamine, (+) ácido dehidroabiético e (+)-dehidroabietilamina reduziram a formação de biofilme de *S. aureus*, tendo o segundo apresentado os melhores resultados, e inclusive de menor citotoxicidade para as células mamárias (Fallarero et al., 2013).

Além das moléculas citadas acima, várias enzimas têm sido avaliadas quanto à ação antibiofilme, dentre elas proteases, DNAses e dispersina (Chung e Toh, 2014; Elchinger et al., 2014; Gawande et al., 2014; Vandecandelaere et al., 2014). A dispersina além de inibir e desfazer o biofilme de MRSA pode atuar em sinergia com agentes antimicrobianos tornando a bactéria mais susceptível a ação desses compostos e tornando o tratamento de infecções clínicas mais eficazes (Gawande et al., 2014).

Lectinas são proteínas que se ligam a carboidratos e que são encontradas em diversos organismos como vírus, fungos, bactéria, invertebrados, animais e plantas (Dias et al., 2015). Elas apresentam um ou mais domínios de ligação de carboidrato (CBD) e ligam-se de modo reversível e específico a um monossacarídeo ou oligossacarídeo (lordache et al., 2015).

As lectinas são geralmente classificadas de acordo a estrutura primária e a sua seletividade de ligação a carboidratos (Gardères et al., 2015). Baseadas na afinidade de ligação aos açúcares podem ser divididas em quatro grupos: Glicose/manose, Galactose e N-acetil-D-galactosamina, fucose e ácido siálico (Kumar et al., 2012). As lectinas de plantas podem ser classificadas estruturalmente em merolectinas – apresenta um domínio de ligação simples; hololectinas – dois ou mais CDB idênticas ou similares, superlectinas – dois ou mais CBD diferentes e quimerolectinas – proteínas fusionadas que apresentam cadeias não relacionadas, um domínio de ligação ao açúcar e o outro domínio com função catalítico ou outra atividade biológica (Teixeira et al., 2012; lordache et al., 2015). As lectinas de plantas, relacionadas estruturalmente e evolutivamente, podem também ser divididas em doze famílias (Dias et al., 2015). Dentre essas famílias podemos mencionar as lectinas ligadora de quitina, lectinas obtidas das leguminosas, proteínas inativadoras do ribossomo do tipo 2 (RIPs), lectinas ligadora de manose obtidas de monocotiledôneas e lectinas da família das amarantinas (Santos et al., 2014; lordache et al., 2015).

As lectinas animais podem ser divididas em 25 tipos diferentes de acordo as características estruturais, dentre esse podemos mencionar lectinas tipo C, tipo I, tipo P, ficolinas, calnexina, galectinas e intelectinas (Dias et al., 2015). As lectinas do tipo C são descritas como proteínas que se ligam a carboidratos de maneira dependente de cálcio (Wang et al., 2013; Santos et al., 2014).

Lectinas obtidas de diferentes fontes têm apresentado atividades antimicrobiana e antibiofilme (Hasan et al., 2014; Klein et al., 2015; Vasconcelos et al., 2014). A lectina obtida da batata (*Solanum tuberosum*), por exemplo, apresentou atividade antimicrobiana tanto para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, quanto para fungos, além de reduzir a

formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* de 5-20 % de maneira dose dependente (Hasan et al., 2014). Klein et al. (2015) identificaram uma lectina do tipo C obtida a partir do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* que inibiu a formação de biofilme de *Staphylococcus* spp. de maneira dose dependente, sem contudo afetar o crescimento bacteriano. Por microscopia eletrônica, comprovou-se que a lectina foi capaz de inibir a produção de biofilme das bactérias *S. aureus* e *S. epidermidis*, ambas consideradas fortes produtoras de biofilme. Porém, a capacidade da lectina em diminuir o processo infectivo estabelecido por *S. aureus* ainda não foi comprovada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aiemsard, J., Aiumlamai, S., Aromdee, C., Taweechaisupapong, S., Khunkitti, W., 2011. The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogens and their mechanisms of action on *Staphylococcus aureus* DMST 4745. Res. Vet. Sci. 91, e31–37.
- Andrade, U.V.C., Hartmann, W., Masson, M.L., 2009. Isolamento microbiológico, contagem de células somáticas e contagem bacteriana total em amostras de leite. ARS Vet. 25, 129-135.
- Bardiau, M., Detilleux, J., Farnir, F., Mainil, J.G., Ote, I., 2014. Associations between properties linked with persistence in a collection of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. Vet. Microbiol. 169, 74-79.
- Behrends, V., Ryall, B., Zlosnik, J.E.A., Speert, D.P., Bundy, J.G., Williams, H.D., 2013. Metabolic adaptations of *Pseudomonas aeruginosa* during cystic fibrosis chronic lung infections. Environ. Microbiol. 15, 398-408.
- Bhutto, A.L., Murray, R.D., Woldehiwet, Z., 2012. California mastitis test scores as indicators of subclinical intra-mammary infections at the end of lactation in dairy cows. Res. Vet. Sci. 92, 13-17.
- Birkenstock, T., Liebeke, M., Winstel, V., Krismer, B., Gekeler, C., Niemiec, M.J., Bisswanger, H., Lalk, M., Peschel, A., 2012. Exometabolome analysis identifies pyruvate dehydrogenase as a target for the antibiotic triphenylbismuthdichloride in multiresistant bacterial pathogens. J. Biol. Chem. 287, 2887-2895.
- Bogni, C., Odierno, L., Raspanti, C., Giraudo, J., Larriestra, A., Reinoso, E., Lasagno, M., Ferrari, M., Ducrós, E., Frigerio, C., Bettera, S., Pellegrino, M., Frola, I., Dieser, S., Vissio, C., 2011. War against mastitis: Current concepts on controlling bovine mastitis pathogens. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. Méndez-Vilas A. (Ed.). World Scientific, Singapore, ISBN-13 1583887284, 483-494.
- Bradley, A.J., 2002. Bovine mastitis: an evolving disease. Vet. J. 164, 116-128.

- Carvalho, M.P., Martins, P.C., Wright, J.T.C., Spers, R.G., 2007. Cenários para o leite no Brasil em 2020. Juiz de Fora, MG: Embrapa Gado de Leite. 190p. Disponível em: [http://201.2.114.147/bds/bds.nsf/0E9DE01C39E70F6D832575B0005FE0B4/\\$File/NT00040DEE.pdf](http://201.2.114.147/bds/bds.nsf/0E9DE01C39E70F6D832575B0005FE0B4/$File/NT00040DEE.pdf). Acesso em: 18 de outubro de 2014.
- Chagas, L.G. da S., Melo, P. de C., Barbosa, N.G., Guimarães, E.C., Brito, D. von D., 2012. Ocorrência de mastite bovina causada por *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp. e *Candida* sp. em uma propriedade rural no município de Indianópolis – Minas Gerais, Brasil. Biosci. J. 28, 1007-1014.
- Chu, C., Wei, Y., Chuang, S.-T., Yu, C., Changchien, C.-H., Su, Y., 2013. Differences in virulence genes and genome patterns of mastitis-associated *Staphylococcus aureus* among goat, cow, and human isolates in Taiwan. Foodborne Pathog. Dis. 10, 256-262.
- Chung, P.Y., Toh, Y.S., 2014. Anti-biofilm agents: recent breakthrough against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. Pathog. Dis. 70, 231-239.
- Costa, G.M., Paiva, L.V., Figueiredo, H.C.P., Figueira, A.R., Pereira, U.P., Silva, N. 2012. Population diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazilian dairy herds. Res. Vet. Sci. 93, 733-735.
- Dego, O.K., Oliver, S.P., Almeida, R.A., 2012. Host–pathogen gene expression profiles during infection of primary bovine mammary epithelial cells with *Escherichia coli* strains associated with acute or persistent bovine mastitis. Vet. Microbiol. 155, 291–297.
- Dias, R.D.O., Machado, L.D.S., Migliolo, L., Franco, O.L., 2015. Insights into animal and plant lectins with antimicrobial activities. Molecules 20, 519-541.
- Eisenreich, W., Dandekar, T., Heesemann, J., Goebel, W., 2010. Carbon metabolism of intracellular bacterial pathogens and possible links to virulence. Nat. Rev. 8, 401-412.
- Elchinger, P.H., Delattre, C., Faure, S., Roy, O., Badel, S., Bernardi, T., Taillefumier, C., Michaud, P., 2014. Effect of proteases against biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Lett. Appl. Microbiol. 59, 507-513.

- Embrapa Gado de Leite. 2013. O que comanda o crescimento da produção de leite no Brasil?, nº 77, Panorama do Leite. Abril de 2013. Disponível em:
http://www.cileite.com.br/sites/default/files/2013_04_PanoramaLeite.pdf.
Acesso em: 24 de julho de 2016.
- Embrapa Gado de Leite. 2015. A Região Sul se fortalece no leite, nº 75, Panorama do Leite. Outubro de 2015. Disponível em:
<https://www.embrapa.br/documents/1355117/1528925/Panorama+do+Leite+-+outubro+2015/f97da482-483f-4451-bd26-e9f7e1d95c4b>. Acesso em: 24 de julho de 2016.
- Enright, M.C., Day, N.P.J., Davies, C.E., Peacock, S.J., Spratt, B.G., 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 38, 1008-1015.
- Fallarero, A., Skogman, M., Kujala, J., Rajaratnam, M., Moreira, V.M., Yli-Kauhaluoma, J. Vuorela, P., 2013. (+)-Dehydroabietic acid, an abietane-type diterpene, inhibits *Staphylococcus aureus* biofilms *in vitro*. Int. J. Mol. Sci. 14, 12054-12072.
- Fauvart, M., De Groote, V.N., Michiels, J., 2011. Role of persister cells in chronic infections: clinical relevance and perspectives on anti-persister therapies. J. Med. Microb. 60, 699-709.
- Fitzgerald, J.R., 2012. Livestock-associated *Staphylococcus aureus*: origin, evolution and public health threat. Trends Microbiol. 20, 192-198.
- Fuchs, T.M., Eisenreich, W., Heesemann, J., Goebel, W., 2012. Metabolic adaptation of human pathogenic and related nonpathogenic bacteria to extra- and intracellular habitats. FEMS Microbiol. Rev. 36, 435-462.
- Gardères, J., Bourguet-Kondracki, M.L., Hamer, B., Batel, R., Schröder, H.C., Müller, W.E.G., 2015. Porifera lectins: diversity, physiological roles and biotechnological potential. Mar. Drugs 13, 5059-5101.
- Gawande, P.V., Clinton, A.P., LoVetri, K., Yakandawala, N., Rumbaugh, K.P., Madhyastha, S., 2014. Antibiofilm efficacy of dispersinB[®] wound spray used in combination with a silver wound dressing. Microbiol. Insights 7, 9-13.

- Gruet, P., Maincent, P., Berthelot, X., Kaltsatos, V., 2001. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 50, 245-259.
- Guinane, C.M., Sturdevant, D.E., Herron-Olson, L., Otto, M., Smyth, D.S., Villaruz, A.E., Kapur, V., Hartigan, P.J., Smyth, C.J., Fitzgerald, J.R., 2008. Pathogenomic analysis of the common bovine *Staphylococcus aureus* clone (ET3): emergence of a virulent subtype with potential risk to public health. *J. Infect. Dis.* 197, 205-213.
- Hamadani, H., Khan, A.A., Banday, M.T., Ashraf, I., Handoo, N., Bashir A., Hamadani, A., 2013. Bovine Mastitis - A disease of serious concern for dairy farmers. *Int. J. Livestock Res.* 3, 42-55.
- Hasan, I., Ozeki, Y., Kabir, S.R., 2014. Purification of a novel chitin-binding lectin with antimicrobial and antibiofilm activities from a Bangladeshi cultivar of potato (*Solanum tuberosum*). *Indian J. Biochem. Biophys.* 51, 142-148.
- Hata, E., Katsuda, K., Kobayashi, H., Uchida, I., Tanaka, K., Eguchi, M., 2010. Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from bovine milk and their relevance to methicillin-resistant isolates from humans. *J. Clin. Microbiol.* 48, 2130-2139.
- Haveri, M., Roslöf, A., Rantala, L., Pyörälä, S., 2007. Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. *J. Appl. Microb.* 103, 993–1000.
- Hogeveen, H., Huijps, K., Lam, T.J.G.M., 2011. Economic aspects of mastitis: new developments. *New Zeal. Vet. J.* 59, 16-23.
- lordache, F., Ionita, M., Mitrea, L.I., Fafaneata, C., Pop, A., 2015. Antimicrobial and antiparasitic activity of lectins. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 16, 152-161.
- Klein, R.C., Fabres-Klein, M.H., Brito, M.A.V.P., Fietto, L.G., Ribon, A.O.B., 2012. *Staphylococcus aureus* of bovine origin: genetic diversity, prevalence and the expression of adhesin-encoding genes. *Vet. Microbiol.* 160, 183-188.

- Klein, R.C., Fabres-Klein, M.H., de Oliveira, L.L., Feio, R.N., Malouin, F., Ribon, A.O.B. 2015. A C-type lectin from *Bothrops jararacussu* venom disrupts staphylococcal biofilms. PloS One 10, e0120514.
- Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., Hultgren, S.J., 2013. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 3, a010306.
- Kumar, K.K., Chandra, K.L.P., Sumanthi, J., Reddy, G.S., Shekar, P.C., Reddy, B.V.R., 2012. Biological role of lectins: a review. J. Orofac. Sci. 4, 20-25.
- Kumar, R., Yadav, B.R., Anand, S.K., Sing, R.S., 2011. Prevalence of adhesin and toxin genes among isolates of *Staphylococcus aureus* obtained from mastitic cattle. World J. Microbiol. Biotechnol. 27, 513-521.
- Laouami, S., Messaoudi, K., Alberto, F., Clavel, T., Duport, C., 2011. Lactate dehydrogenase A promotes communication between carbohydrate catabolism and virulence in *Bacillus cereus*. J. Bacteriol. 193, 1757-1766.
- Larsen, J., Enright, M.C., Godoy, D., Spratt, B.G., Larsen, A.R., Skov, R.L., 2012. Multilocus sequence typing scheme for *Staphylococcus aureus*: revision of the *gmk* locus. J. Clin. Microbiol. 50, 2538-2539.
- 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., Vautor, E., Le Loir, Y., 2011a. Molecular basis of virulence in *Staphylococcus aureus* mastitis. PloS One 6, e27354.
- Le Maréchal, C., Thiéry, R., Vautor, E., Le Loir, Y., 2011b. Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products—a review. Dairy Sci. Technol. 91, 247-282.
- Le Maréchal, C., Jardin, J., Briard-Bion, V., Rault, L., Berkova, N., Vautor, E., Thiéry, R., Even, S., Le Loir, Y., 2013. *Staphylococcus aureus* proteins differentially produced in ewe gangrenous mastitis or ewe milk. Vet. Microbiol. 164, 150–157.
- Lippolis, J.D., Brunelle, B.W., Reinhardt, T.A., Sacco, R.E., Nonnecke, B.J., Dogan, B., Simpson, K., Schukken, Y.H., 2014. Proteomic analysis reveals protein expression differences in *Escherichia coli* strains

- associated with persistent versus transient mastitis. *J. Proteomics* 108, 373-381.
- Mahmmod, Y.S., Toft, N., Katholm, J., Grønbæke, C., Klaas, I.C., 2013. Bayesian estimation of test characteristics of real-time PCR, bacteriological culture and California mastitis test for diagnosis of intramammary infections with *Staphylococcus aureus* in dairy cattle at routine milk recordings. *Prev. Vet. Med.* 112, 309-317.
- Medeiros, E.S., Junior, J.W.P., Peixoto, R.M., Filho, A.P.S., Faria, E.B., Mota, R.A., 2008. Avaliação do exame microbiológico, California Mastitis Test e Somaticell[®] no diagnóstico da mastite subclínica em bovinos leiteiros. *Med. Vet.* 2, 16-22.
- Melchior, M.B., Vaarkamp, H., Fink-Gremmels, J., 2006. Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? *Vet. J.* 171, 398-407.
- Mestorino, N., Errecalde, J.O., 2012. Pharmacokinetic – Pharmacodynamic considerations for bovine mastitis treatment, *A Bird's-Eye View of Veterinary Medicine*, Dr. Carlos C. Perez-Marin (Ed.), ISBN: 978-953-51-0031-7, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/a-bird-s-eye-view-of-veterinary-medicine/pharmacokinetic-pharmacodynamic-considerations-for-bovine-mastitis-treatment>.
- Olson, M.E., Ceri, H., Morck, D.W., Buret, A.G., Read, R.R., 2002. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can. J. Vet. Res.* 66, 86-92.
- Ote, I., Taminiau, B., Duprez, J.N., Dizier, I., Mainil, J.G., 2011. Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 153, 285-292.
- Otto, M., 2008. Staphylococcal Biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 322, 207-228.
- Pereira, M.N., Andrade, G.A., 2006. Bovinocultura de leite em Minas Gerais. Disponível em: http://www.grupodoleite.com.br/site/arquivos/bovinocultura_leite_minas_gerais.pdf. Acesso em: 18 de outubro de 2014.
- Peton, V., Le Loir, Y., 2014. *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. *Infect. Genet. Evol.* 21, 602-615.

- Quave, C.L., Estévez-Carmona M., Compadre, C.M., Hobby, G., Hendrickson, H., Beenken, K.E., Smeltzer, M.S., 2012. Ellagic acid derivatives from *Rubus ulmifolius* inhibit *Staphylococcus aureus* biofilm formation and improve response to antibiotics. *PLoS One* 7, e28737.
- Rabello, R.F., Moreira, B.M., Lopes, R.M.M., Teixeira, L.M., Riley, L.W., Castro, A.C.D., 2007. Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from cows with mastitis in Brazilian dairy herds. *J. Med. Microbiol.* 56, 1505-1511.
- Raza, A., Muhammad, G., Sharif, S., Atta, A., 2013. Biofilm producing *Staphylococcus aureus* and bovine mastitis: a review. *Mol. Microbiol. Res.* 13, 1-8.
- Ribeiro, M.G., Geraldo, J.S., Langoni, H., Lara, G.H.B., Siqueira, A.K., Salerno, T., Fernandes, M.C., 2009. Microrganismos patogênicos, celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite bovino produzido no sistema orgânico. *Pesq. Vet. Bras.* 29, 52-58.
- Sadykov, M.R., Mattes, T.A., Luong, T.T., Zhu, Y., Day, S.R., Sifri, C.D., Lee, C.Y., Somerville, G.A., 2010. Tricarboxylic acid cycle-dependent synthesis of *Staphylococcus aureus* type 5 and 8 capsular polysaccharides. *J. Bacteriol.* 192, 1459–1462.
- Saei, H.D., Ahmadi, M., Mardani, K., Batavani, R.A., 2009. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis based on polymorphism of the coagulase gene in the north west of Iran. *Vet. Microbiol.* 137, 202-206.
- Santos, A.F.S., da Silva, M.D.C., Silva, T.H., Paiva, P.M.G., Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., 2014. Lectins: function, structure, biological properties and potential applications. *Curr. Top. Pept. Protein Res.* 15, 41-62.
- Schär, J., Stoll, R., Schauer, K., Loeffler, D.I.M., Eylert, E., Joseph, B., Eisenreich, W., Fuchs, T.M., Goebel W., 2010. Pyruvate carboxylase plays a crucial role in carbon metabolism of extra- and intracellularly replicating *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* 192, 1774–1784.
- Schroeder, J.W., 2012. Bovine mastitis and milking management. *Drug Ther.* 8, 1-15.

- Schukken, Y.H., Günther, J., Fitzpatrick, J., Fontaine, M.C., Goetze, L., Holst, O., Leigh, J., Petzl, W., Schuberth, H.-J., Sipka, A., Smith, D.G.E., Quesnell, R., Watts, J., Yancey, R., Zerbe, H., Gurjar, Zadoks, R.N., Seyfert, H. -M., 2011. Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 144, 270-289.
- Schvarz, D.W., Santos, J.M.G.D., 2012. Mastite Bovina em rebanhos leiteiros: ocorrência e métodos de controle e prevenção. *R. Agronegócio e Meio Ambiente* 5, 453-473.
- SEAB 2015 - Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento, LEITE - Análise da Conjuntura Agropecuária., 2015/2016. Disponível em:
http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/2016/bovinocultura_de_leite_2016.pdf. Acesso em: 24 de julho de 2016.
- Shaheen, M., Tantary, H.A., Nabi, S.U., 2016. A treatise on bovine mastitis: disease and disease economics, etiological basis, risk factors, impact on human health, therapeutic management, prevention and control strategy. *J. Adv. Dairy Res.* 4, 150.
- Sharif, A., Muhammad, G., 2009. Mastitis control in dairy animals. *Pakistan Vet. J.* 29, 145-148.
- 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., 2005. Multilocus sequence typing of intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 43, 4737-4743.
- Somerville, G.A., Cockayne, A., Dürr, M., Peschel, A., Otto, M., Musser, J.M., 2003. Synthesis and deformylation of *Staphylococcus aureus* δ -toxin are linked to tricarboxylic acid cycle activity. *J. Bacteriol.* 185, 6686–6694.
- Somerville, G.A., Proctor, R.A., 2009. At the crossroads of bacterial metabolism and virulence factor synthesis in staphylococci. *Microbiol. Mol. Biol.* 73, 233-248.
- Sudhan, N.A., Sharma, N., 2010. Mastitis- An important production disease of dairy animals. *SMVS Dairy Year Book*, 72-88.
- Tandon, M., 2013. Bacterial persistence. *Jeevanu Times* 13, 6-9.

- Teixeira, E.H., Arruda, F.V.S., do Nascimento, K.S., Carneiro, V.A., Nagano, C.S., da Silva, B.R., Sampaio, A.H., Cavada, B.S., 2012. Biological applications of plants and algae lectins: an overview. INTECH Open Access Publisher.
- Tiwari, J.G., Babra, C., Tiwari, H.K., Williams, V., De Wet, S., Gibson, J., Paxman, A., Morgan, E., Costantino, P., Sunagar, R., Isloor, S., Mukkur, T., 2013. Trends in therapeutic and prevention strategies for management of bovine mastitis: an overview. *J. Vaccines Vaccin.* 4, 176.
- Vandecandelaere, I., Depuydt, P., Nelis, H.J., Coenye, T., 2014. Protease production by *Staphylococcus epidermidis* and its effect on *Staphylococcus aureus* biofilms. *Pathog. Dis.* 70, 321-331.
- Vasconcelos, M.A., Arruda, F.V.S., Carneiro, V.A., Silva, H.C., Nascimento, K.S., Sampaio, A.H., Cavada, B., Teixeira, E.H., Henriques, M., Pereira, M.O., 2014. Effect of algae and plant lectins on planktonic growth and biofilm formation in clinically relevant bacteria and yeasts. *Biomed Res. Int.* 2014, 1-9.
- Vautor, E., Cockfield, J., Le Maréchal, C., Le Loir, Y., Chevalier, M., Robinson, D.A., Thiry, R., Lindsay, J., 2009. Difference in virulence between *Staphylococcus aureus* isolates causing gangrenous mastitis versus subclinical mastitis in a dairy sheep flock. *Vet. Res.* 40, 1-11.
- 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., 2015. Genotypic and phenotypic characterization of *Staphylococcus aureus* causing persistent and nonpersistent subclinical bovine intramammary infections during lactation or the dry period. *J. Dairy Sci.* 98, 1-14.
- Viguié, C., Arora, S., Gilmartin, N., Welbeck, K., O'Kennedy, R., 2009. Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends Biotechnol.* 27, 486-493.
- Walsh, E.J., O'brien, L.M., Liang, X., Hook, M., Foster, T.J., 2004. Clumping factor B, a fibrinogen-binding MSCRAMM (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) adhesin of *Staphylococcus aureus*, also binds to the tail region of type I cytokeratin 10. *J. Biol. Chem.* 279, 50691-50699.

- Wang, X-W, Wang, J-X., 2013. Diversity and multiple functions of lectins in shrimp immunity. *Dev. Comp. Immunol.* 39, 27-38.
- Wu, J.A., Kusuma, C., Mond, J.J., Kokai-Kun, J.F., 2003. Lysostaphin disrupts *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms on artificial surfaces. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3407-3414.
- Xue, T., You, Y., Shang, F., Sun, B., 2011. Rot and Agr system modulate fibrinogen-binding ability mainly by regulating *clfB* expression in *Staphylococcus aureus* NCTC8325. *Med. Microbiol. Immunol.* 201, 81-92.
- Zecconi, A., Cesaris, L., Liandris, E., Dapra, V., Piccinini, R., 2006. Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microb. Pathog.* 40, 177-183.
- Zhu, Y., Xiong, Y.Q., Sadykov, M.R., Fey, P.D., Lei, M.G., Lee, C.Y., Bayer, A.S., Somerville, G.A., 2009. Tricarboxylic acid cycle-dependent attenuation of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 77, 4256–4264.

Capítulo I

Genetically related *Staphylococcus aureus* show phenotypic variation unrevealed by DNA-based methods

Submitted to Veterinary Microbiology

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is an important pathogen of dairy cattle that frequently causes subclinical mastitis, although other manifestations can be observed. Extensive work has been performed to understand the molecular basis of bacterial traits that promote intramammary infections. Although studies are usually conducted with bacteria of different genetic backgrounds, we hypothesize that genetically related bacteria exhibit different virulence properties that influence disease progression and, consequently, the clinical outcome. In this study, we analyzed the *in vivo* virulence and phenotypic characteristics believed to be important for the pathogenicity of bovine *S. aureus*. Genetically related bacteria isolated from animals with persistent (*S. aureus* 302) and non-persistent (*S. aureus* 322) mastitis were compared. *S. aureus* 302 and *S. aureus* 322 harbored all virulence genes investigated. Despite their genetic proximity, the strains had different capacities for biofilm and hemolysis production and also different levels of invasiveness and persistence in MAC-T cells. The larvae of *Galleria mellonella* were challenged with the bacterial strains, and the mortality rates at 24 h were found to be 85 % for the larvae infected with *S. aureus* 302 and 47 % for *S. aureus* 322. Our results revealed a hidden phenotypic variation in genetically related strains that can contribute to the development of the disease and has yet to be explored.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, bovine mastitis, virulence, phenotypic characterization, MAC-T cells

INTRODUCTION

Bovine mastitis is most commonly caused by bacteria that, once inside the mammary gland, multiply and produce toxins and other factors that damage host tissue and reduce milk production. This condition directly affects animal health and causes considerable economic losses to the dairy industry. *Staphylococcus aureus* is an important pathogen distributed in cattle herds worldwide and is associated with infections that range from acute to gangrenous (Bradley, 2002). However, most cases are subclinical and asymptomatic and progress to a chronic state, which is difficult to eliminate even with antibiotic therapy (Barkema et al., 2006). Thus, rapid and accurate identification of the pathogen is essential for disease control measures.

Many groups have sought to relate genotypes to specific clinical symptoms or identify strains that will negatively impact herd health (Haveri et al., 2005; 2007; Peton et al., 2014). An association between genes encoding pyrogenic toxin superantigens (PTSAg) and persistent infections was found, *sej* gene was described as risk factors for persistent subclinical mastitis (Haveri et al., 2007). Fournier et al. (2008) reported that strains of *S. aureus* harboring the enterotoxin genes *sea*, *sed* and *sej* were more contagious than others. Veh et al. (2015) determined that the presence of the *seg* gene was associated with non-persistent strains found in subclinical intramammary infections (IMI) during lactation. According to the authors the identification of efficient markers that distinguish between epidemiologically relevant strains will help udder-health management decision making.

DNA-based analyses are a powerful tool to study genetic diversity, to establish routes of infection and dissemination of strains within herds, and to reveal the mechanisms involved in bacterial pathogenesis (Bergonier et al., 2014). However, the high degree of similarity in the gene content of *S. aureus* strains associated with bovine mastitis (Herron-Olson et al., 2007) may hinder the correlation between virulence genes and clinical manifestations. Generally, virulence traits are compared among bacteria with different genetic backgrounds. It is also possible that genetically related bacteria exhibit different virulence properties that influence disease progression and, consequently, the clinical outcome. Therefore, the analysis

of phenotypic diversity may be a more useful approach to group isolates and define predictive markers that are correlated with disease strains.

Here, we analyzed the *in vivo* virulence and some phenotypic characteristics believed to be important for the pathogenicity of bovine *S. aureus*. For this study, we compared genetically related bacteria that were isolated from animals with persistent and non-persistent mastitis. The results showed that, despite their genetic proximity, the strains show phenotypic variation unrevealed by DNA-based methods that can contribute to the development of the disease and should be explored further.

METHODS

Bacterial strains and culture conditions

The reference strains *Staphylococcus aureus* ATCC[®] 29213 and *S. epidermidis* NRS 101 (ATCC[®] 35983) were used in this study. *S. aureus* 302 (SAU 302) was isolated from animals with persistent subclinical mastitis and *S. aureus* 322 (SAU 322) was obtained from animals with non-persistent subclinical mastitis. Mastitis was considered to be persistent if infection was recorded from the same cow for more than three consecutive months. All bacterial cultures were grown in brain heart infusion medium (BHI, HiMedia, Mumbai, India) at 37 °C for 16 h with shaking (180 rpm).

DNA-based methods

Total DNA extraction was carried out as described previously (Pospiech and Neumann, 1995). Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) was done by multiplex polymerase chain reaction (PCR) using the primers and PCR conditions described previously (Klein et al., 2012). The presence of toxin genes (*seg*, *sej*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*), hemolysin (*hla*), and biofilm (*icaA*, *icaD*) was assessed as described elsewhere (Ote et al., 2011; Fabres-Klein et al., 2015). *Sma*I macrorestriction analysis of *S. aureus* strains was conducted according to Chung et al. (2000), with 30 U of restriction enzyme (Promega, Madison, WI, USA). The DNA fragments were separated by electrophoresis on a 1.0 % agarose gel. The run was carried out at 14 °C using the CHEF-DRII system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), with pulse times of 5-15 s for 7 h, 12-60 s for 19 h and 1-60 s for 2 h, with an angle of 120° and voltage of 6 V cm⁻¹. After electrophoresis, the gel was stained for 30 min with GelRed™ (Biotium, Hayward, CA, USA), destained in water for 2 min and photographed under UV illumination. The gel was analyzed by visual interpretation of the banding patterns, as suggested by Tenover et al. (1995).

Phenotypic assays

Production of bacterial biofilm was assayed as described by Klein et al. (2015). *S. epidermidis* NRS 101, known as a high biofilm producer, was used as a positive control. Each sample was tested in triplicate, and the assay was repeated three times. The hemolytic activity of the strains was evaluated as described previously, with some modifications (Qiu et al., 2010). The bacterial strains were grown in BHI (Himedia, Mumbai, India) at 37 °C for 14 h with agitation. Aliquots of 1 ml were centrifuged, and 100 µl of the supernatant was added into a polystyrene 96-well microplate containing 50 µl of 4 % rabbit erythrocytes diluted in saline (0.85 % NaCl) in each well. The microplate was incubated at 37 °C for 30 min and then centrifuged (3,500 x g, 1 min). The supernatant (100 µl) was transferred in duplicate to a new microplate followed by optical density measurement at a wavelength of 543 nm using a microplate reader (VersaMax Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Distilled water and the supernatant of a stationary culture of *S. aureus* ATCC® 29213 were used as positive controls and saline as the negative control. The hemolytic potential of each strain was tested in triplicate, and the whole assay was repeated three times.

Infection of *Galleria mellonella* larvae

Insects were provided by the Laboratório de Genética Molecular de Bactérias (DMB) of the Universidade Federal de Viçosa and were reared on an artificial diet at 25 °C. The experiments were conducted as described by Ramarao et al. (2012). Last-instar larvae weighing from 250-300 mg were immune challenged by an injection of a *S. aureus* strain grown to exponential phase and serially diluted in sterile PBS pH 7.4, yielding inocula ranging from 10⁵ to 10⁸ c.f.u. per larva. Aliquots of 10 µl of each dilution were injected into the right first proleg of the larvae using BD insulin syringes. Groups of uninjected larvae and larvae inoculated with PBS only were included as negative controls. Incubation was carried out at 37 °C in the dark. Larvae were individually examined for pigmentation, and the time of death was monitored over a period of 96 h. Larvae were considered dead if they did not move either spontaneously or in response to touch. All tests were replicated three times, and 30 larvae were used in each assay. For *in vivo* bacterial

growth assays, cultures of *S. aureus* were injected into the hemocoel of larvae of *G. mellonella* (10^6 c.f.u. per larva), and bacterial growth was monitored at 0, 6, 10 and 24 h post-injection. Then, the surface of the larvae was disinfected with 70 % ethanol and sterile distilled water, and cuts were made near the prolegs using Westcott microscissors. Hemolymph (10 μ l) collected from 8 individual larvae was serially diluted, and an aliquot of each sample was plated on Mannitol salt agar (Himedia, Mumbai, India) and incubated at 37 °C. C.f.u. ml⁻¹ was calculated as the average number of colonies within a countable range (25-250) obtained from a specified dilution. Uninjected larvae and larvae inoculated with PBS only were included as negative controls.

Histopathology of *G. mellonella* infected with *S. aureus*

For histopathological analysis, a minimum of 10 individuals injected with SAU 302 or SAU 322 were used. The larvae were placed in PBS (phosphate buffered saline, 0.1 M, pH 7.2) and dissected under a stereoscope. The abdominal cavity was opened laterally using microscissors, and visceral organs were removed. The dorsal abdomen, which includes the body fat and dorsal vessel, was separated from the rest of the larval body. The samples were transferred to microcentrifuge tubes containing 4 % paraformaldehyde in 0.1 M PBS, pH 7.2 and stored at 4 °C. The fixed samples were washed with PBS, dehydrated in an ascending series of ethanol (70-100 %) and embedded in historesin (Leica). The samples were sectioned to a thickness of 5-7 μ m using a semi-automated rotary microtome (Leica RM 2245) and mounted on glass slides. The sections were stained with toluidine blue, mounted with EukiT mounting medium (Fluka) and photographed under the light microscope.

MAC-T assays

Bovine mammary epithelial cells (MAC-T) were used in this study to test invasion, persistence and cytotoxicity of the bacteria. MAC -T cells were grown in cell culture flasks (75 cm²) using MAC-T medium: DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10 % sterile fetal calf serum (FCS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The cells were incubated at 37 °C with 5 % CO₂. After reaching confluency, cells were treated with 0.05 %

trypsin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and resuspended in MAC-T medium to a concentration of 2×10^6 cells. For invasion and persistence assays, cells were seeded in 12-well plates (2×10^5 cells/well), and for the cytotoxicity assays, cells were distributed into 96-well plates (1×10^5 cells/well) and incubated overnight at 37 °C in 5 % CO₂ to obtain a confluent monolayer.

Invasion assays and persistence were conducted in accordance with Brouillette et al. (2004), with some adjustments. Before each assay, serial dilutions of inocula prepared from 24 h BHI agar plates and adjusted to the turbidity of a 1.0 McFarland were plated on BHI agar to confirm c.f.u ml⁻¹ to be used. Confluent monolayers of MAC-T cells (2×10^5 cells/well) were washed twice with sterile PBS and then incubated with bacteria suspended in invasion medium (DMEM / 1 % FBS) to obtain a multiplicity of infection (MOI) of 10. After 3 h of incubation at 37 °C, the cells were washed with PBS followed by addition of 1 ml of invasion medium (DMEM / 1 % FBS) supplemented with gentamicin ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and lysostaphin ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Supernatants were discarded, and cell monolayers were rinsed with sterile PBS and treated for 5 min with sterile distilled water to release the intracellular microorganisms. C.f.u. ml⁻¹ was determined by plating on BHI agar. The population of *S. aureus* internalized after 3 h of infection was used as the starting point for the persistence assay. Then, MAC-T cells were rinsed with sterile PBS and incubated in invasion medium (DMEM / 1 % FBS) supplemented with gentamicin and lysostaphin for 24 h. The supernatants were discarded, and cell monolayers were rewashed with PBS and lysed with distilled water to release the intracellular microorganisms. The remaining population of intracellular *S. aureus* was determined by serial dilution and plating.

The cytotoxic effects of the supernatant of *S. aureus* cultures were assessed after 24 h of incubation with MAC-T using methylthiazolyldiphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), as described by Bouchard et al. (2013), with some modifications. The bacterial strains were grown in BHI medium with agitation (180 rpm) at 37 °C. After 14 h of growth, the cultures were centrifuged, supernatants were

filtered through a 0.22 µm filter (GVS Filter Technology, USA) and diluted in DMEM at ratio of 1:1. The diluted supernatants were added to 96-well plates with adherent cells (1×10^5 cells/well) and incubated under 5 % CO₂ for 24 h at 37 °C. The wells were washed twice with sterile PBS and then incubated with MTT (0.5 mg ml^{-1}) for 4 h. The medium was removed and replaced with a developer solution (isopropanol / 0.4 M HCl) for 30 min before absorbance was read at A570 nm. Cells incubated with BHI medium or 0.01 % Triton-X at a ratio of 1:1 were used as a negative (100 % viable) and positive (0 % viability) controls, respectively. Relative viability was calculated based on uninfected cells.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed with R v. 3.2.1 (R Development Core Team, 2012). For *in vitro* tests, the Student's t-test was used to evaluate the differences in biofilm production and hemolytic activity between *S. aureus* strains. The invasion capacity and persistence of *S. aureus* in MAC-T cells were compared using the Mann-Whitney test. Data normality was determined by the Shapiro-Wilk test. Survival curves were plotted using the Kaplan-Meier method, and differences in survival were calculated by the log-rank test. A p value <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Differences in phenotype between genetically related *S. aureus* strains

The bacteria studied here were isolated from animals showing persistent (SAU 302) or non-persistent (SAU 322) mastitis. Identical band profiles were obtained by MLVA and PCR for the virulence genes that were evaluated (Fig. 1 a, b). The *sej* gene was not detected in the strains (data not shown). The PFGE band patterns were the same except for one band present in SAU 302 (Fig. 1c).

Bacteria were then evaluated for biofilm production and hemolytic activity. SAU 322 was considered a high biofilm producer when compared to the reference strain *S. epidermidis* NRS 101 but differed from SAU 302 ($p < 0.001$) (Fig. 2a). However, SAU 302 was more hemolytic than SAU 322 ($p < 0.001$) (Fig. 2b).

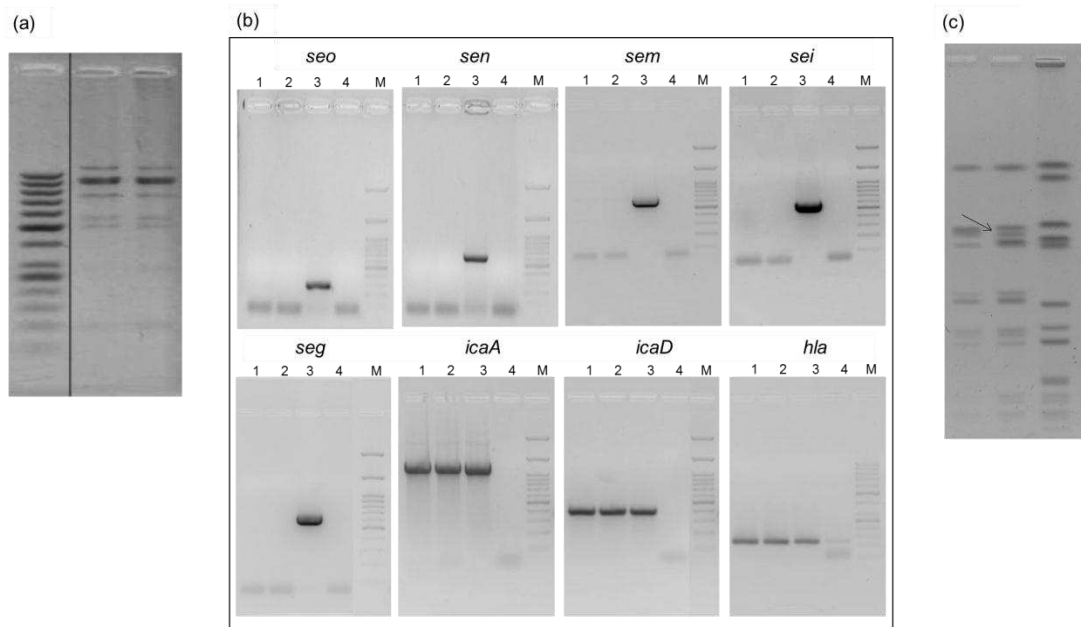


Fig. 1. Genetically related *Staphylococcus aureus* strains show same band profile by DNA based methods. MLVA (a) and PCR (b) profiles of SAU 302 and SAU 322. PCR was conducted with primers for the genes *seo*, *sen*, *sem*, *sei*, *seg*, *icaA*, *icaD*, *hla* that were used. *S. aureus* ATCC[®] 29213, third lanes in PCR, was used as the positive control and water, fourth lanes, was used as the negative control in PCR. PFGE banding patterns (c) for SAU 322, SAU 302 and *S. aureus* ATCC[®] 29213, respectively.

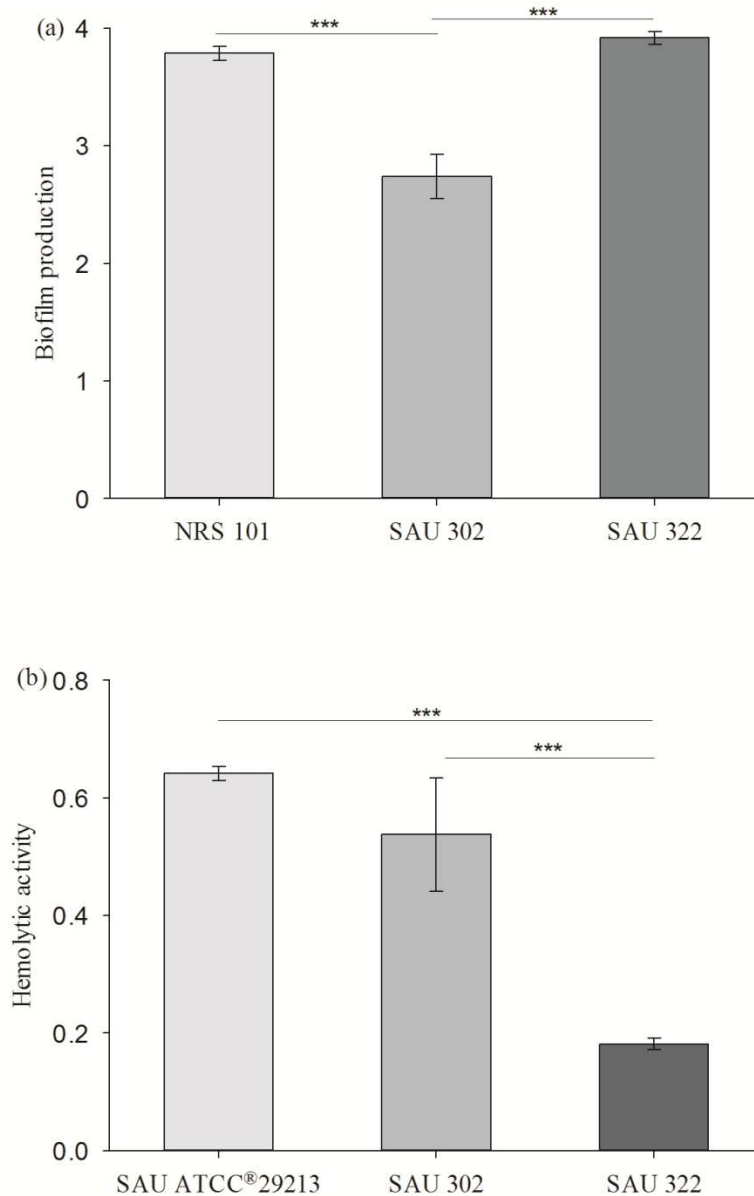


Fig. 2. Genetically related *Staphylococcus aureus* strains differ in production of biofilm and hemolytic activity. Biofilm production (a) of SAU 302 and SAU 322. Biofilm production was assayed after 24 h of growth in BHI supplemented with 0.25 % glucose. *S. epidermidis* NRS 101 was used as control for biofilm production. Hemolytic activity (b) of SAU 302 and SAU 322. The hemolysis assay was conducted with supernatant obtained from cultures grown to the stationary phase. Distilled water was used as the positive control and 0.85 % NaCl as the negative control in the hemolysis assay. The results represent the average of three independent experiments \pm SD, and the differences between the strains were compared by Student's t test (***) $p < 0.001$).

Differences in virulence between genetically related *S. aureus* strains

Galleria mellonella infection with *S. aureus* ATCC® 29213 caused larval death, and the survival time was dependent on the concentration of inoculum (Fig. 3a). Infection with 10^8 c.f.u resulted in 100 % mortality of *G. mellonella* after 12 h of infection. Larvae infected with 10^5 c.f.u showed high percentages of survival after 96 h. Thus, the bacterial concentration of 10^6 c.f.u was selected due to intermediate mortality percentages. The two strains of *S. aureus* caused time-dependent death in at least 80 % of the larvae. SAU 302 caused significantly higher mortality ($p < 0.0001$) than SAU 322 (Fig. 3b). After 24 h, 15 % survival was observed in larvae infected with SAU 302 and 53 % with SAU 322. Dead larvae showed dark pigmentation (Fig. 3c) and were unresponsive to touch.

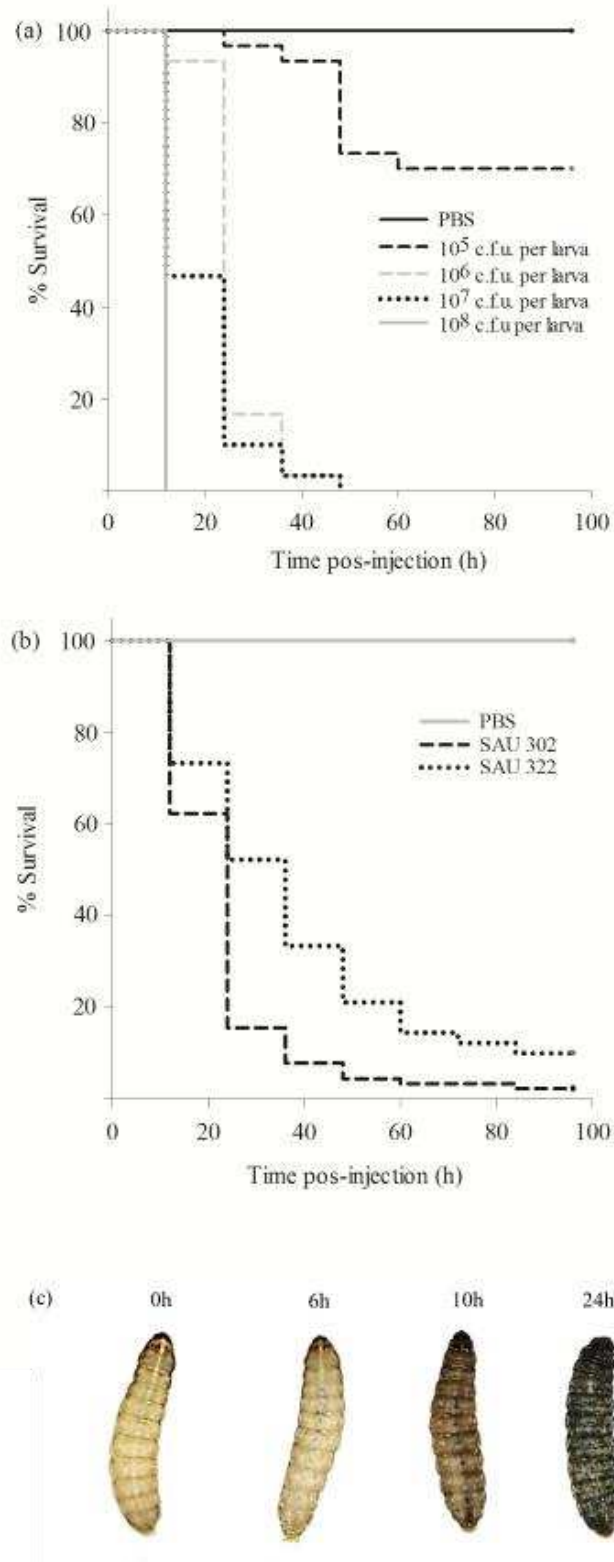


Fig. 3. Genetically related *Staphylococcus aureus* show different levels of virulence. Death of *Galleria mellonella* larvae upon infection with the reference strain *S. aureus* ATCC[®] 29213 was dose dependent (a). Larvae injected with SAU 302 or SAU 322 were monitored for 96 h post-injection. SAU 302 caused higher mortality ($p < 0.0001$) 96 h after injection (b). Dark pigmentation observed in the body of the larvae after injection with SAU 302 (c).

Response of *Galleria mellonella* to infection with *S. aureus* strains

Vigorous humoral and cellular immune responses near the dorsal region of infected *G. mellonella* were observed. Histopathological analysis revealed regions of nodulation and melanization in the pericardium tissues and fat bodies. Significantly larger lesions and hyperpigmentation were observed after 6 h when compared to 1 h post-infection. Melanization regions and nodulation around bacterial cells were also observed in the parietal fat bodies of infected larvae, which were not observed in the control group (data not shown).

To evaluate bacterial growth inside the host, the hemolymph was collected at different time points (0, 6, 10 and 24 h) after inoculation with 10^6 c.f.u / larva of *S. aureus*. There was an initial reduction in the bacterial count 6 h post-injection, followed by an increase in the c.f.u after 10 h of infection. SAU 302 and SAU 322 reached the maximum concentration of 1.63×10^7 and 2.18×10^7 c.f.u / larva, respectively, after 24 h, demonstrating the bacterial ability to grow inside the host (data not shown).

Invasion, persistence and cytotoxicity in MAC-T cells

The invasiveness and persistence of *S. aureus* in MAC-T cells were also evaluated. The results showed a high invasive ability (Fig. 4a) and persistence (Fig. 4b) of SAU 302 ($p < 0.001$) in comparison to SAU 322. The cytotoxicity of culture supernatants harvested from post-exponential phase cultures of *S. aureus* were evaluated with MAC-T cells. Cell viability was reduced by 82.57 % in the presence of the supernatant of SAU 302, although no differences were observed when compared to SAU 322 (88.87 %) and *S. aureus* ATCC[®] 29213 (88.14 %) (Fig. 4c).

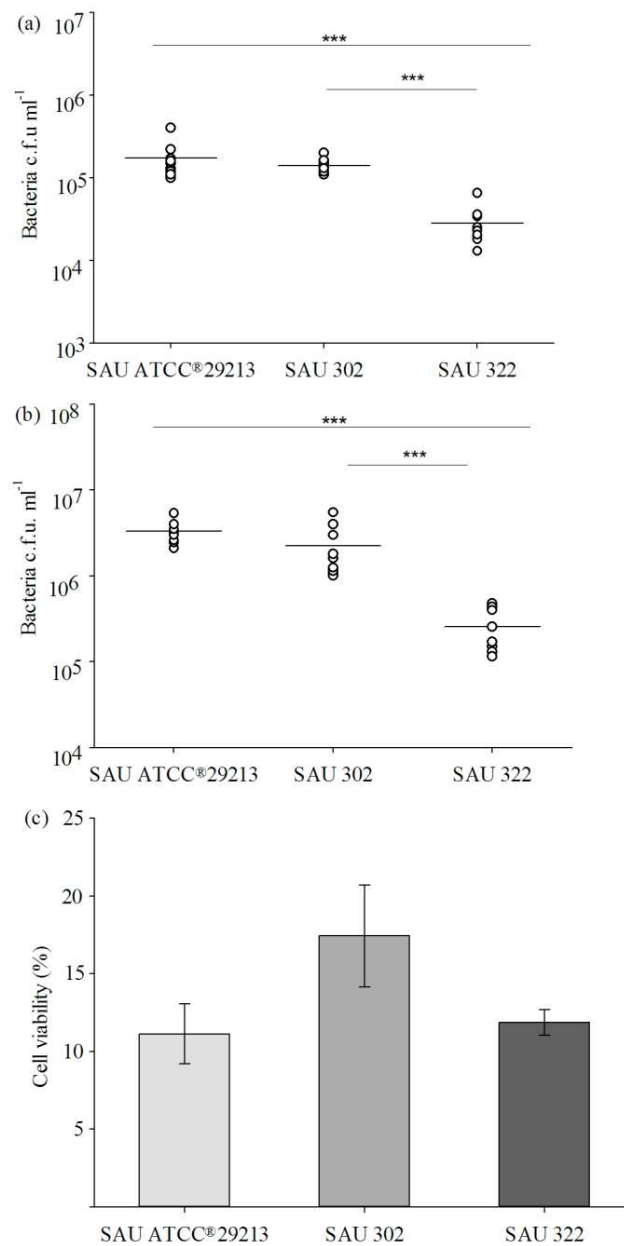


Fig. 4. Genetically related *Staphylococcus aureus* show different degrees of invasion and persistence in MAC-T cells. Invasion (a) and persistence (b) of SAU 302, SAU 322, and *S. aureus* ATCC® 29213 in mammary epithelial cells. Cells were infected at an MOI of 10 for 3 h and then treated with gentamicin and lysostaphin for 30 min. Cytotoxic effect of supernatants of *S. aureus* cultures grown to stationary phase in BHI (c). MAC-T cells were incubated for 24 h with each supernatant. The values indicate means of three separate experiments. The differences between groups were compared using the Mann-Whitney test, *** p < 0.001.

DISCUSSION

The identification of relevant bacterial clones within herds and pathogen traits that are correlated with particular manifestations can aid in preclinical identification of bovine mastitis and help to define management strategies, reducing economic losses. The characterization of *S. aureus* strains present in herds primarily relies on DNA-based methods (Zadoks et al., 2000; Joo et al., 2001; Haveri et al., 2005). These molecular techniques are important from an epidemiological perspective; however, they overlook differences in the genotype that may be related to virulence. In this study, we characterized two closely related strains of *S. aureus* that were found in the same herd and, interestingly, were isolated from animals with persistent (SAU 302) and non-persistent (SAU 322) subclinical mastitis. Remarkable differences in some traits considered important for the pathogenicity of *S. aureus* were found.

SAU 302 and SAU 322 harbored the same virulence genes evaluated in this study, and in the PFGE banding profiles were very similar, allowing their classification as genetically related strains. Bovine intramammary infections caused by different strains of *S. aureus* usually lead to differences in the host immune response (Kim et al., 2011). However, a few studies have explored differences in clinical, molecular and phenotypic features of *S. aureus* subtypes and their impact in disease outcome. Our results show that, despite the relation between SAU 302 and SAU 322, marked phenotypic differences that are likely to impact mastitis progression were observed.

SAU 302 had higher hemolytic activity and lower biofilm production. The opposite was observed for the SAU 322, which produced more biofilm and was less hemolytic. This inverse relationship between the production of biofilm and hemolysis are in agreement with results previously described (Veh et al., 2015) and may be due to differences in the *agr* system, which regulates these two phenotypes (Blevins et al., 2002; Melchior et al., 2009). Additionally, the increased production of biofilm produced by the strain SAU 322 may be an adaptation to the extracellular niche, which could also explain the reduced invasion in MAC-T cells. The opposite was observed for SAU 302.

After 20 h of infection, SAU 302 resulted in increased mortality of larvae compared SAU 322, while the bacterial count remained the same for both bacteria (data not shown). The repertoire of virulence factors is probably different between these two strains. It is possible that virulence determinants are differentially expressed, as observed when the biofilm production and hemolytic activity of the bacteria were compared. This difference demonstrates the importance of phenotypic testing and likely would not have been observed if DNA-based assays such as PCR were conducted to detect virulence genes.

This is the first report to use *G. mellonella* to compare the virulence of field strains of bovine *S. aureus*. The histopathology studies performed on bacteria-infected larvae showed host tissue destruction abscess-like lesions characterized by extensive melanization in the hemolymph, fat body and pericardial region. It has been shown that hemocytes migrate and surround bacteria, promoting the formation of nodules, a process involving the activation of prophenoloxidase and the melanization cascade (Browne et al., 2013). The *S. aureus* strains increased in cell number, suggesting that they are able to survive and replicate in *G. mellonella*. After 24 h, the bacterial burden in the host was very similar despite the significant difference observed in killing assays. Similar results were reported by Peleg et al. (2009) who evaluated the ability of *S. aureus* strains to multiply in the *Galleria* larvae. Further studies are required to understand the interaction between *S. aureus* and *Galleria* and correlate virulence in insect and murine models, which have been shown to be a good model for mastitis studies (Brouillette et al., 2004).

SAU 302 and SAU 322 also showed different abilities to invade and persist inside MAC-T cells, again underscoring a hidden phenotypic variation between the closely related strains. It is possible that differential expression of surface proteins in the *S. aureus* strains interferes with these phenotypes, promoting a different outcome. SAU 302 and SAU 322 had similar cytotoxic effects on MAC-T cells. Cytotoxicity of the culture supernatants is due to extracellular toxins and enzymes produced by bacteria, and their expression is influenced by the culture conditions (Zavizion et al., 1995). For this assay, bacteria were grown until the stationary phase in BHI medium, a condition

that does not replicate the environment found inside the udder and could interfere with the production of virulence determinants.

The *S. aureus* strains studied in this work were isolated from animals with persistent and non-persistent mastitis. Although we cannot rule out that the different clinical outcomes were due to host factors such as age and animal's immune system, the genetic background of the pathogen could also influence the type of manifestation. Phenotypic analysis revealed a divergence between the strains that was not found by DNA-based techniques. If SAU 302 and SAU 322 had been characterized only by PCR, there would be no relationship between virulence genes and symptoms.

It is noteworthy that some important phenotypic traits differentiated SAU 302 from SAU 322. The former was more invasive, had higher hemolytic activity and produced less biofilm when compared to SAU 322. Reports have shown that strains more likely to invade and persist inside MAC-T cells are more adapted to survival inside the mammary gland (Buzzola et al., 2007). For these strains, biofilm production does not appear to be an important trait. Once internalized, *S. aureus* can escape from the endosome, multiply in the cytosol and promote cell apoptosis (Bayles et al., 1998). The nutrient-poor environment encountered inside the endosome stimulates the expression of toxins such as hemolysins that contribute to endosome lysis (Giese et al., 2011). Therefore, highly hemolytic strains could have an adaptive advantage in chronic infections. More strains isolated from persistent and non-persistent mastitis should be investigated to address this hypothesis. These results are in accordance to those previously described for *S. aureus* Newbould 305, a hemolytic strain with high hemolytic activity that causes chronic mastitis (Peton et al., 2014).

SAU 302 was more virulent than SAU 322, which is unexpected as SAU 302 causes a chronic infection. *S. aureus* invasion depends on the expression of staphylococcal surface proteins which recognize integrins on the host cells (Sinha and Fraunhotz, 2010). These specific proteins may be absent from the insect cells, precluding bacteria from intracellular survival. However, we were able to show variation in bacterial virulence reaffirming that phenotypic testing is important to reveal hidden differences between genetically related *S. aureus* strains.

CONCLUSION

In summary, this work showed that genetically related bacteria have phenotypic variations unrevealed by the molecular methods used for bacterial characterization. Despite strong similarities in the PFGE profile, the contrasted strains showed significant differences in the virulence phenotypes which could have implications for mastitis progression. Our present study suggests that a array of phenotypic assays relevant to bovine mastitis should be defined and used to analyze a collection of bacteria for which information on the nature of the clinical manifestation is available.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

All authors declare that they have no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Dr. Maria Aparecida S. Moreira for granting access to laboratory facilities and Dr. Denise M. S. Bazzolli for helping with the *Galleria mellonella* assays. *S. epidermidis* NRS 101 was provided by the Network in Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus* (NARSA). The authors are grateful to the veterinarians from the Programa de Desenvolvimento da Pecuária Leiteira (PDPL) who collected milk samples for bacterial isolation. This work was supported by a grant from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, CBB-APQ-01345-14). M.P.S. and A.C.A were supported by a scholarship from CAPES, and D.S. and A.P.A. received scholarships from FAPEMIG.

REFERENCES

- Barkema, H.W., Schukken, Y.H., Zadoks, R.N., 2006. Invited review: the role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus*. J. Dairy Sci. 89, 1877-1895.
- Bayles, K.W., Wesson, C.A., Liou, L.E., Fox, L.K., Bohach, G.A., Trumble, W.R., 1998. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. Infect. Immun. 66, 336-342.
- Bergonier, D., Sobral, D., Febler, A.T., Jacquet, E., Gilbert, F.B., Schwarz, S., Treilles, M., Bouloc, P., Pourcel, C., Vergnaud, G., 2014. *Staphylococcus aureus* from 152 cases of bovine, ovine and caprine mastitis investigated by multiple-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). Vet. Res. 45, 97.
- Blevins, J.S., Beenken, K.E., Elasri, M.O., Hurlburt, B.K., Smeltzer, M.S., 2002. Strain-dependent differences in the regulatory roles of *sarA* and *agr* in *Staphylococcus aureus*. Infect. Immun. 70, 470-480.
- Bouchard, D.S., Rault, L., Berkova, N., Le Loir, Y., Even, S., 2013. Inhibition of *Staphylococcus aureus* invasion into bovine mammary epithelial cells by contact with live *Lactobacillus casei*. Appl. Environ. Microbiol. 79, 877-885.
- Bradley, A. J., 2002. Bovine mastitis: an evolving disease. Vet. J. 164, 116-128.
- Brouillette, E., Grondin, G., Lefebvre, C., Talbot, B.G., Malouin, F., 2004. Mouse mastitis model of infection for antimicrobial compound efficacy studies against intracellular and extracellular forms of *Staphylococcus aureus*. Vet. Microbiol. 101, 253-262.
- Browne, N., Heelan, M., Kavanagh, K., 2013. An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. Virulence 4, 597-603.
- Buzzola, F.R., Alvarez, L.P., Tuchscher, L.P., Barbagelata, M.S., Lattar, S.M., Calvino, L., Sordelli, D.O., 2007. Differential abilities of capsulated and noncapsulated *Staphylococcus aureus* isolates from diverse *agr* groups to invade mammary epithelial cells. Infect. Immun. 75, 886-891.

- Chung, M., de Lencastre, H., Matthews, P., Tomasz, A., Adamsson, I., de Sousa, M.A., Camou, T., Cocuzza, C., Corso, A., Couto, I., Dominguez, A., Gniadkowski, M., Goering, R., Gomes, A., Kikuchi, K., Marchese, A., Mato, R., Melter, O., Oliveira, D., Palacio, R., Sá-leão, R., Sanches, I.S., Song, J.H., Tassios, P.T., Villari, P., 2000. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb. Drug Resist.* 6, 189-198.
- Fabres-Klein, M.H., Santos, M.J.C., Klein, R.C., de Souza, G. N., Ribon, A.O.B., 2015. An association between milk and slime increases biofilm production by bovine *Staphylococcus aureus*. *BMC Vet. Res.* 11, 1-8.
- Fournier, C., Kuhnert, P., Frey, J., Miserez, R., Kirchhofer, M., Kaufmann, T., Steiner, A., Graber, H.U., 2008. Bovine *Staphylococcus aureus*: association of virulence genes, genotypes and clinical outcome. *Res. Vet. Sci.* 85, 439-448.
- Giese, B., Glowinski, F., Paprotka, K., Dittmann, S., Steiner, T., Sinha, B., Fraunholz, M.J., 2011. Expression of δ -toxin by *Staphylococcus aureus* mediates escape from phago-endosomes of human epithelial and endothelial cells in the presence of β -toxin. *Cell. Microbiol.* 13, 316-329.
- Haveri, M., Roslöf, A., Rantala, L., Pyörälä., 2007. Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. *J. Appl. Microbiol.* 103, 993-1000.
- Haveri, M., Taponen, S., Vuopio-Varkila, J., Salmenlinna, S., Pyörälä, S., 2005. Bacterial genotype affects the manifestation and persistence of bovine *Staphylococcus aureus* intramammary infection. *J. Clin. Microbiol.* 43, 959-961.
- Herron-Olson, L., Fitzgerald, J.R., Musser, J.M., Kapur, V., 2007. Molecular correlates of host specialization in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 2, e1120.
- Joo, Y.S, Fox, L.K., Davis, W.C., Bohach, G.A., Park, Y.H., 2001. *Staphylococcus aureus* associated with mammary glands of cows:

- genotyping to distinguish different strains among herds. *Vet. Microbiol.* 80,131-138.
- Kim, Y., Atalla, H., Mallard, B., Robert, C., Karrow, N., 2011. Changes in Holstein cow milk and serum proteins during intramammary infection with three different strains of *Staphylococcus aureus*. *BMC Vet. Res.* 7, 51-64.
- Klein, R.C., Fabres-Klein, M.H., Brito, M.A.V.P., Fietto, L.G., Ribon, A.O.B., 2012. *Staphylococcus aureus* of bovine origin: genetic diversity, prevalence and the expression of adhesin-encoding genes. *Vet. Microbiol.* 160, 183-188.
- Klein, R.C., Fabres-Klein, M.H., de Oliveira, L.L., Feio, R.N., Malouin, F., Ribon, A.O.B., 2015. A C-type lectin from *Bothrops jararacussu* venom disrupts staphylococcal biofilms. *PLoS One* 10, e0120514.
- Melchior, M.B., Van Osch, M.H.J., Graat, R.M., Van Duijkeren, E., Mevius, D.J., Nielen, M., 2009. Biofilm formation and genotyping of *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: evidence for lack of penicillin-resistance in Agr-type II strains. *Vet. Microbiol.* 137, 83-89.
- Ote. I., Taminiau, B., Duprez, J.L., Dizier, I., Mainil, J.G., 2011. Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 153, 285-292.
- Peleg, A.Y., Monga, D., Pillai, S., Mylonakis, E., Moellering, R.C., Eliopoulos, G.M., 2009. Reduced susceptibility to vancomycin influences pathogenicity in *Staphylococcus aureus* infection. *J. Infect. Dis.* 199, 532-536.
- 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., 2014. Fine-tuned characterization of *Staphylococcus aureus* Newbould 305, a strain associated with mild and chronic mastitis in bovines. *Vet. Res.* 45, 106.
- Pospiech, A., Neumann, B., 1995. A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. *Trends Genet.* 11, 217-218.
- Qiu, J., Wang, D., Xiang, H., Feng, H., Jiang, Y., Xia, L., Dong, J., Lu, J., Yu, L., Deng, X., 2010. Subinhibitory concentrations of thymol reduce

- enterotoxins A and B and α -hemolysin production in *Staphylococcus aureus* isolates. PLoS One 5, e9736.
- Ramarao, N., Nielsen-Leroux, C., Lereclus, D., 2012. The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. J. Vis. Exp. 70, e4392.
- Sinha, B., Fraunholz, M., 2010. *Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion events. Int. J. Med. Microbiol. 300, 170-175.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B., 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol. 33, 2233-2239.
- 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., 2015. Genotypic and phenotypic characterization of *Staphylococcus aureus* causing persistent and nonpersistent subclinical bovine intramammary infections during lactation or the dry period. J. Dairy Sci. 98,155-168.
- Zadoks, R., Van Leeuwen, W., Barkema, H., Sampimon, O., Verbrugh, H., Schukken, Y.H., Van Belkum, A., 2000. Application of pulsed-field gel electrophoresis and binary typing as tools in veterinary clinical microbiology and molecular epidemiologic analysis of bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates. J. Clin. Microbiol. 38, 1931-1939.
- Zavizion, B., Bramley, A.J., Poutis, I., Gilmore, J., Turner, J.D., Patel, A.H., Foster, T.J., 1995. Effects of *Staphylococcus aureus* toxins on the growth of bovine mammary epithelial cells (MAC-T) in culture. J. Dairy Sci. 78, 277-284.

Capítulo II

Análise proteômica de estirpes de *Staphylococcus aureus* causadoras de mastite subclínica

RESUMO

A mastite bovina, caracterizada como uma inflamação da glândula mamária, pode se manifestar nas formas clínica e subclínica. A mastite subclínica, de maior incidência nos rebanhos leiteiros, é a responsável pelos maiores prejuízos econômicos em todo mundo. Compreender os mecanismos que permitem o estabelecimento da doença é importante para o desenvolvimento de novas formas de prevenção e tratamento. Nesse trabalho, uma análise proteômica comparativa foi realizada entre estirpes de *Staphylococcus aureus*, principal patógeno causador de mastite subclínica. Extratos de proteínas intracelulares foram preparados a partir das bactérias *S. aureus* 302 e 469, isoladas de mastite subclínica persistente e *S. aureus* 322 e 366, causadoras de mastite subclínica não-persistente e separados por eletroforese bidimensional em fitas de 13 cm, pH 4-7, em triplicata. Um total de 2887 *spots* foi visualizado, com uma média de 240 *spots*/gel. Na comparação das estirpes persistentes com as não-persistentes foram detectados 35 *spots* com abundância diferencial, dos quais três (151 e 181, PI= 5,3, MM= 35 kDa; 173 e 196, PI= 4,9, MM= 57 kDa; 172, PI= 5,9, MM= 15 kDa) foram exclusivos de SAU 302 quando comparado com SAU 322 e SAU 366. Os *spots* serão identificados por espectrometria de massa e sua associação com a manifestação persistente será futuramente avaliada.

INTRODUÇÃO

A mastite bovina é uma inflamação da glândula mamária causada por diferentes micro-organismos tais como bactérias, fungos, leveduras, algas e vírus (Sharma et al., 2012; Kulkarni e Kaliwal, 2013; Arif et al., 2015). Essa doença provoca significativas perdas econômicas em decorrência da redução na produção de leite, descarte do leite e custo com serviços veterinários (Sharma et al., 2012; Padhy et al., 2015). A mastite subclínica é a forma mais prevalente da doença e estima-se que cause três vezes mais prejuízos que a forma clínica (Haque, 2015; Litwińczuk et al., 2015). No Brasil, considerado o quinto produtor mundial de leite, estudos mostram que a incidência da mastite subclínica pode superar em até dez vezes a da forma clínica (de Oliveira et al., 2012; Krewer et al., 2013).

Staphylococcus aureus é o agente etiológico mais comumente associado à mastite nos rebanhos leiteiros. Embora possa causar mastite clínica, o patógeno desencadeia principalmente a mastite subclínica que dificilmente responde a antibióticos (Patnaik et al., 2013) e evolui com frequência para uma forma crônica. Entender os mecanismos de persistência é importante na definição de alvos para drogas ou marcadores para a identificação de estirpes relevantes nos rebanhos leiteiros.

Os genes *sed* e *sej*, que codificam superantígenos, e *blaZ*, que confere resistência a penicilina, foram predominantes em isolados obtidos de infecções intramamárias persistentes (Haveri et al., 2007). Isolados bovinos de *S. aureus* pertencentes ao grupo *agr I* e que não expressam nenhum tipo de antígeno capsular (CP5 e CP8) mas que apresentam alta taxa de invasão em células mamárias bovinas MAC-T podem ser melhores adaptados ao nicho intracelular e com isso desencadear infecções recorrentes (Bardiau et al., 2014). Veh et al. (2015) mostraram que isolados de *S. aureus* que persistem após o tratamento da vaca seca produzem mais biofilme *in vitro* enquanto que a presença do gene *seg* e *sen*, além do aumento da expressão de *hld* são mais provavelmente associados às estirpes não-persistentes.

Uma abordagem proteômica foi usada no estudo de estirpes de *Escherichia coli* causadoras de mastite persistente e não-persistentes

(Lippolis et al., 2014). Os resultados mostraram a expressão diferencial de proteínas flagelares e ensaios fenotípicos confirmaram a maior motilidade das estirpes persistentes, o que foi sugerido ser um importante mecanismo no estabelecimento das infecções crônicas por essa espécie. Abordagem similar foi empregada para comparar estirpes de *S. aureus* associadas às mastites ovina severa e branda (Le Maréchal et al., 2011). As estirpes causadoras de mastite mais severa apresentaram alta expressão de toxinas e proteases, fatores conhecidos como importantes na virulência bacteriana, além de alterações na expressão de proteínas responsáveis pelo metabolismo e aquisição de ferro (Le Maréchal et al., 2011). Outro estudo realizou análise genética e proteômica de *S. aureus* para identificar fatores de virulência característicos para o desenvolvimento da mastite bovina. Foram encontradas variações genéticas e uma grande variação na expressão de proteínas extracelulares que podem contribuir para a diversidade de isolados de *S. aureus* de origem bovina (Wolf et al., 2011).

Este trabalho contrastou pela primeira vez estirpes de *S. aureus* causadoras de mastite bovina persistente (SAU 302 e SAU 469) e não-persistente (SAU 322 e SAU 366) a fim de entender os mecanismos moleculares que levam ao quadro de persistência. Além da detecção de vários *spots* com abundância diferencial entre elas, três foram identificados como sendo exclusivos de SAU 302.

MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismos e condições de cultivo

Estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas previamente no Laboratório de Biotecnologia Molecular a partir de leite de animais com manifestação de mastite subclínica persistente (SAU 302 e SAU 469) e não-persistente (SAU 322 e SAU 366) foram utilizadas neste estudo (da Silva, 2015). Mastite foi considerada persistente se a infecção foi recuperada a partir da mesma vaca por mais que três meses consecutivos. As amostras foram coletadas por veterinários do Programa de Desenvolvimento da Pecuária Leiteira (PDPL) em um rebanho do município de Cajuri, Minas Gerais. As culturas bacterianas foram estriadas em placas contendo ágar infusão-cérebro-coração (BHI; Himedia) mantidas por 18 h a 37 °C. Para a extração de proteínas totais, as culturas foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma) contendo 0,15 mM deferoxamina (Sigma), com limitação de oxigênio e, incubadas a 37 °C sem agitação, para simular as condições encontradas no úbere bovino, baixa disponibilidade de ferro e limitação de oxigênio (Le Maréchal et al., 2009). Para preparo de estoques, as bactérias foram estriadas em placas de BHI ágar (Himedia), incubadas por 16 h a 37 °C e armazenadas em BHI (Himedia) com 20 % de glicerol a - 20 °C.

Eletroforese em campo pulsado (PFGE)

O padrão de macrorrestrição do DNA das estirpes de *S. aureus* foi conduzida conforme Chung et. al. (2000). A digestão do DNA foi realizada com 30 U da enzima de restrição Smal (Promega) e os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,0 %. A corrida foi realizada a 14 °C, utilizando o sistema CHEF-DRIII (Bio-Rad), com tempos de pulso de 5-15 s por 7 h, 12-60 s por 19 h e 1-60 s por 2 h, a 14 °C com ângulo de 120 ° e 6 V/cm. Após a eletroforese, o gel foi corado durante 30 minutos com GelRed™ (Biotium), descorado em água por 2 min e fotografado pelo transiluminador. O perfil das bandas foi analisado visualmente como sugerido por Tenover et al. (1995).

Curvas de crescimento

As curvas de crescimento foram realizadas em meio RPMI 1640 (Sigma) contendo deferoxamina (RPMIdef) com limitação de oxigênio. Inicialmente, cada bactéria foi cultivada em meio BHI por aproximadamente 7 h. A partir dessas culturas, foi inoculado o equivalente a DO_{600nm} inicial de 0,05 para as estirpes 302 e 322 e DO_{600nm} inicial de 0,15 para a estirpe 469 e 366 em meio RPMIdef por 16 h. Após esse tempo, 50 μ L (302 e 322) ou 100 μ L (469 e 366) de cada cultura foram adicionados a cada frasco completamente preenchido com 9 mL de meio RPMIdef. Os frascos foram incubados a 37 °C sem agitação e a cada hora alíquotas foram removidas e, diluições seriadas foram plaqueadas pelo método de microgotas em meio BHI ágar. Depois de 14 h, o número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mL foi determinado para cada amostra e a velocidade de crescimento calculado de acordo a fórmula $\mu = (\ln X - \ln X_0) / t$. Os experimentos foram realizados em triplicata biológica.

Preparo de extratos proteicos

O preparo dos extratos proteicos foi realizado como descrito anteriormente por Le Maréchal et al. (2009) com algumas modificações. Após o crescimento até a fase exponencial (10^7 UFC/mL), as células foram centrifugadas por 5 min a 10000 x g, 4 °C. O *pellet* bacteriano foi lavado duas vezes em PBS gelado pH 7,4 (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4) e uma vez em tampão de digestão (10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 1 mM EDTA, 5 mM $MgCl_2$), com centrifugações a 10000 x g por 10 min a 4 °C. Em seguida, as células foram ressuspensas no tampão de digestão adicionado de 20 μ L de PMSF (100 mM), 20 μ L de pepstatina (2 mg/mL) e 20 μ L lisostafina (50 mg/mL). Após 40 min de incubação a 37 °C, as células foram sonicadas em banho sonicador (Unique, USC-1880) (5 pulsos de 1 min) e centrifugadas a 10000 x g por 10 min. O sobrenadante foi estocado a - 20 °C. A concentração proteica foi determinada pelo método de Bradford (1976).

Eletofórese bidimensional

Os extratos proteicos obtidos como descrito acima foram precipitados com acetona na proporção de 1:6 a 4 °C, por 16 h. As amostras foram

centrifugadas a 14000 x g, 4 °C por 30 min. O *pellet* resultante foi então ressuspenso em tampão de solubilização (7 M de uréia, 2 M de tiouréia, 2 % de CHAPS) e as proteínas foram estocadas a - 20 °C até a utilização. A focalização isoeétrica (IEF) foi realizada em fitas de 13 cm (*Immobiline™ DryStrip* pH 4-7, GE Healthcare) com gradiente de anfólitos entre o pH 4-7 (GE Healthcare). Inicialmente as fitas foram reidratadas por 14-20 h com 200 µg da amostra proteica em 3 % de tampão IPG e 0,3 % DTT. A IEF foi realizada no sistema de IPGphor III (GE Healthcare) a 20 °C seguindo programação de 4 h a 200 V e 4 h a 500 V, gradiente de 1000 V por 4 h, gradiente 8000 V por 4 h e voltagem fixa de 8000 V por 4 h e 500 V por 6 h. A segunda dimensão foi realizada em gel de poliacrilamida 12,5 % utilizando o aparato da cuba Rubi (GE Healthcare), com a primeira etapa de amperagem fixa de 20 mA/gel, potência máxima de 50 W por 30 min seguido de 40 mA/gel, 50 W, 150 V por 5-6 h. O marcador pré-corado (*Page Ruler Prestained Protein Ladder 26616* - Thermo Scientific) foi utilizado com padrão de peso molecular. Os géis foram corados com Coomassie Blue G-250 (Sigma) e as imagens digitalizadas em *scanner ImageScanner III* (GE Healthcare). Os géis provenientes das estirpes causadoras de mastite persistente ou não-persistente foram comparados utilizando o software *Image Master 2D Platinum 7* (GE Healthcare). Os *spots* com valores de ANOVA menor que 0,05 (p-valor) e que estavam presentes nas três repetições biológicas foram considerados diferenciais. Para os *spots* diferenciais foi calculada a média da porcentagem de volume e a abundância relativa (razão entre a média da porcentagem de volume do *spot* referente à estirpe persistente pela média de porcentagem de volume do *spot* referente à estirpe não-persistente).

RESULTADOS

PFGE e Crescimento Bacteriano

O padrão de bandas do PFGE mostrou-se semelhante para as estirpes avaliadas, exceto por bandas diferentes presentes em SAU 366 e SAU 302 (Fig. 1a), o que caracteriza as estirpes como geneticamente relacionadas. Os quatro isolados foram crescidos em meio RPMI com deferoxamina, para simular as condições de baixa disponibilidade de ferro e limitação de oxigênio encontradas no úbere bovino (Le Maréchal et al., 2009). O perfil de crescimento foi similar para todas, com velocidade de crescimento de $0,67 \text{ h}^{-1}$ e $0,76 \text{ h}^{-1}$ para as estirpes persistentes (302 e 469) e, $0,77 \text{ h}^{-1}$ e $0,67 \text{ h}^{-1}$ para as estirpes não-persistentes (322 e 366), respectivamente. Ao atingirem o meio da fase exponencial (aproximadamente 10^7 UFC/mL), as bactérias foram recuperadas para extração de proteínas intracelulares (Fig. 1b).

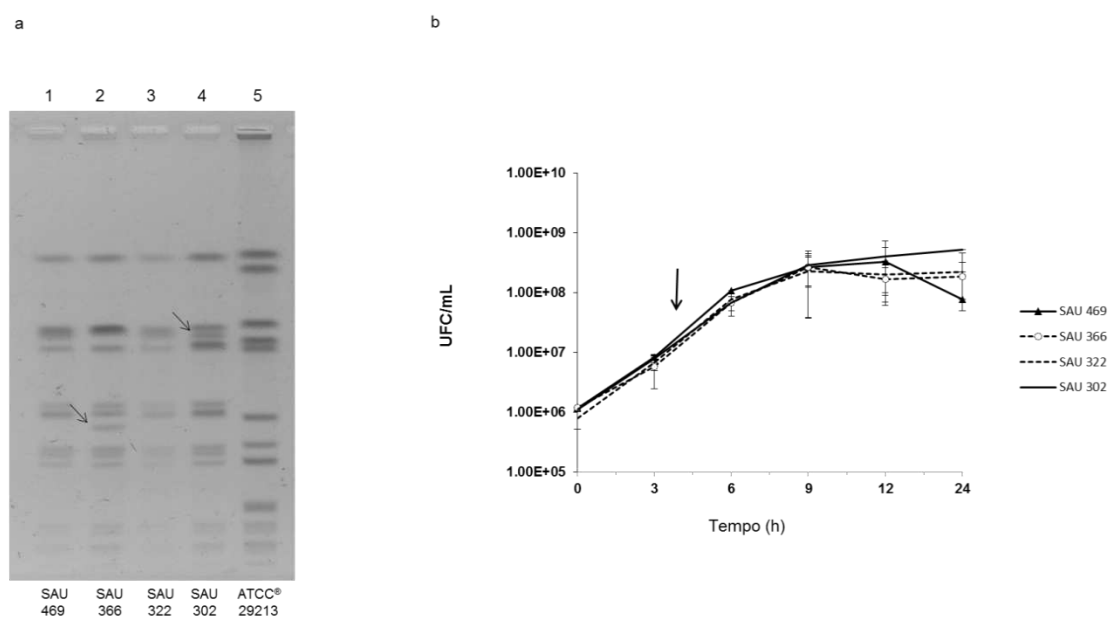


Fig. 1. PFGE e crescimento de estirpes de *Staphylococcus aureus* causadoras de mastite persistente ou não-persistente. Padrões de banda obtidos por eletroforese em campo pulsado para SAU 469, SAU 366, SAU 322, SAU 302 e *S. aureus* ATCC[®] 29213 (a). Curva de crescimento das bactérias em meio RPMI acrescido de 0,15 mM de deferoxamina (b). As linhas contínuas representam o crescimento das estirpes que causam mastite persistente e as pontilhadas, o crescimento daquelas que causam mastite não-persistente.

Análise proteômica

Os extratos de proteínas intracelulares (200 µg) obtidas a partir de cada estirpe bacteriana foram separadas por eletroforese bidimensional, o que revelou entre 152 e 299 *spots* (Tabela 1). Em seguida, análises comparativas foram realizadas para identificar *spots* exclusivos das estirpes persistentes e das não-persistentes. Contrastando o proteoma da estirpe 302 com a estirpe 322 detectamos um total de 663 *spots*, presentes nos seis géis referentes às três repetições biológicas de cada amostra, onde nove mostraram abundância diferencial, sendo quatro exclusivos da bactéria SAU 302 (148, 151, 162, 173) e um de SAU 322 (55) (Tabela 2, Fig. 2). Quatro *spots* (6, 54, 83, 92) foram mais abundantes na estirpe SAU 302 em relação a SAU 322 (Fig. 2c).

Tabela 1. Números de *spots* e *match* obtidos após eletroforese bidimensional de proteínas intracelulares de estirpes de *Staphylococcus aureus*.

Nº Spots					
	Repetição	SAU 302	SAU 469	SAU 322	SAU366
	A	299	266	291	229
	B	179	245	256	217
	C	259	245	249	152
Match					
	663	SAU 302 X SAU 322			
	584	SAU 302 X SAU 366			
	743	SAU 469 X SAU 322			
	734	SAU 469 X SAU 366			

Tabela 2. Características das proteínas com abundância diferencial entre as estirpes de *Staphylococcus aureus* persistentes e não-persistentes.

Spots	pI	MM (kDa)	%Vol persistente*	%Vol não- persistente*	Abundância relativa
SAU 302 X SAU 322					
83	5,279	39	0,142±0,013	0,008 ±0,004	17,750
151	5,300	35	0,145±0,024	0,000±0,000	
92	4,397	44	0,461±0,060	0,130±0,016	3,546
173	4,906	57	0,071±0,022	0,000±0,000	
162	4,956	39	0,175±0,056	0,000±0,000	
6	5,865	15	0,175±0,058	0,030±0,031	5,833
55	4,431	35	0,000±0,000	0,131±0,012	
148	4,721	31	0,327±0,140	0,000±0,000	
54	5,603	35	1,230±0,191	0,440±0,415	2,795
SAU 302 X SAU 366					
181	5,299	35	0,145±0,020	0,000±0,000	
182	5,812	36	0,073±0,005	0,000±0,000	
27	5,420	25	0,685±0,112	1,548±0,046	0,443
55	5,350	37	0,153±0,018	0,284±0,019	0,539
12	5,245	18	0,430±0,038	0,210±0,026	2,048
14	5,030	19	0,208±0,077	0,653±0,055	0,319
25	5,211	24	0,000±0,000	0,102±0,012	
196	4,905	57	0,071±0,018	0,000±0,000	
172	5,865	15	0,175±0,047	0,000±0,000	

Spots	pl	MM (kDa)	%Vol persistente*	%Vol não- persistente*	Abundância relativa
64	5,296	42	0,227±0,032	0,104±0,018	2,183
63	5,148	40	0,182±0,028	0,466±0,088	0,391
42	4,531	35	0,000±0,000	0,188±0,047	
7	5,010	17	0,103±0,034	0,332±0,076	0,310
0	4,835	14	0,683±0,135	0,240±0,108	2,846
18	4,922	20	0,865±0,111	2,326±0,566	0,372
126	4,528	53	0,807±0,246	0,354±0,183	2,280
6	4,915	17	1,246±0,554	4,082±1,104	0,305
52	5,424	37	0,560±0,174	1,102±0,176	0,508
37	4,885	33	6,263±0,096	3,463±1,303	1,809

SAU 469 X SAU 322

20	5,677	19	0,083±0,0022	0,018±0,009	4,611
54	5,175	37	0,766±0,152	0,402±0,094	1,905
131	5,316	38	0,406±0,145	0,154±0,027	2,636

SAU 469 X SAU 366

42	5,083	32	0,199±0,028	0,354±0,050	0,562
43	4,973	32	0,222±0,050	0,412±0,073	0,539
113	4,673	49	2,887±0,056	5,713±1,221	0,505
38	5,422	27	0,213±0,036	0,291±0,014	0,732

*Os valores representam a média ± desvio padrão da porcentagem de volume de três repetições biológicas.

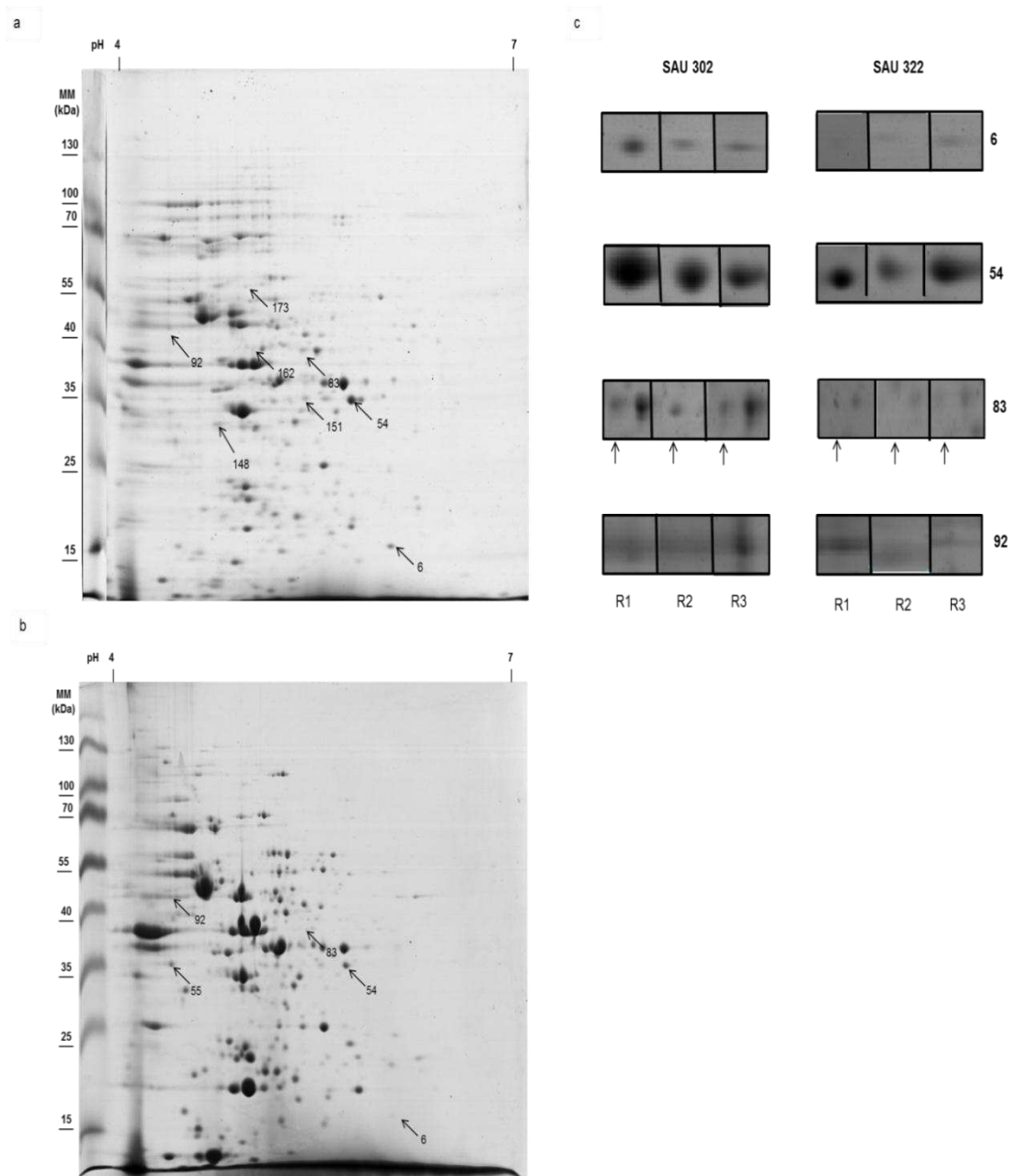


Fig. 2. Comparação proteômica das estirpes *Staphylococcus aureus* 302 e *S. aureus* 322. Gel 2D representativo das proteínas totais de *S. aureus* 302 (a). Gel 2D representativo das proteínas totais de *S. aureus* 322 (b). As setas indicam os spots exclusivos de SAU 302 (148, 151, 162, 173) ou de SAU 322 (55) e aqueles mais abundantes em SAU 302 (6, 54, 83, 92). Repetições biológicas dos spots considerados diferenciais entre as estirpes (c). Análise feita pelo software *Image Master 2D Platinum 7*. MM: Marcador Molecular *Page Ruler Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific).

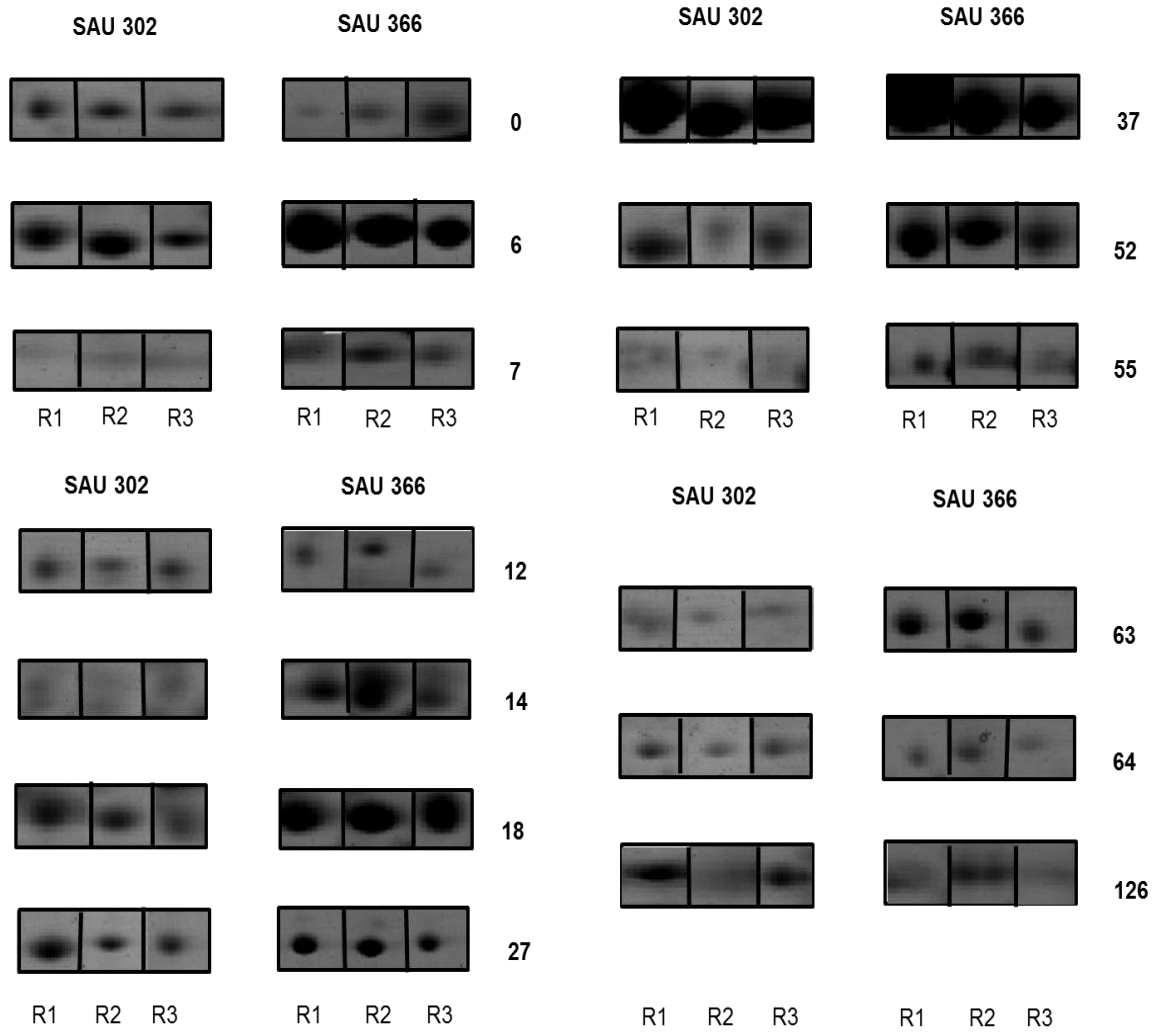
A comparação entre os perfis proteicos das estirpes SAU 302 e SAU 366 revelou 584 *spots*, presentes nos seis géis referentes às três repetições biológicas de cada amostra. Quatro foram exclusivos de SAU 302 (172, 181, 182, 196), dois de SAU 366 (25, 42), cinco mais abundantes em SAU 302 (0, 12, 37, 64, 126) e oito, na estirpe 366 (6, 7, 14, 18, 27, 52, 55, 63) (Tabela 2, Fig. 3).

Avaliando o perfil da estirpe SAU 469 com a SAU 322 foram identificados 743 *spots* e, três *spots* tiveram uma abundância aumentada para a estirpe 469 quando comparada a 322 (20, 54, 131). Não foram detectados *spots* exclusivos nesta comparação (Tabela 2, Fig. 4).

Um total de 734 *spots*, presentes nos seis géis referentes às três repetições biológicas de cada amostra, foi detectado da comparação dos proteomas das estirpes SAU 469 e SAU 366, dos quais quatro (38, 42, 43, 113) tiveram a abundância aumentada para estirpe 366. Não foram detectados *spots* exclusivos para estirpe 469 (Tabela 2, Fig. 5).

Continuação Figura 3

c



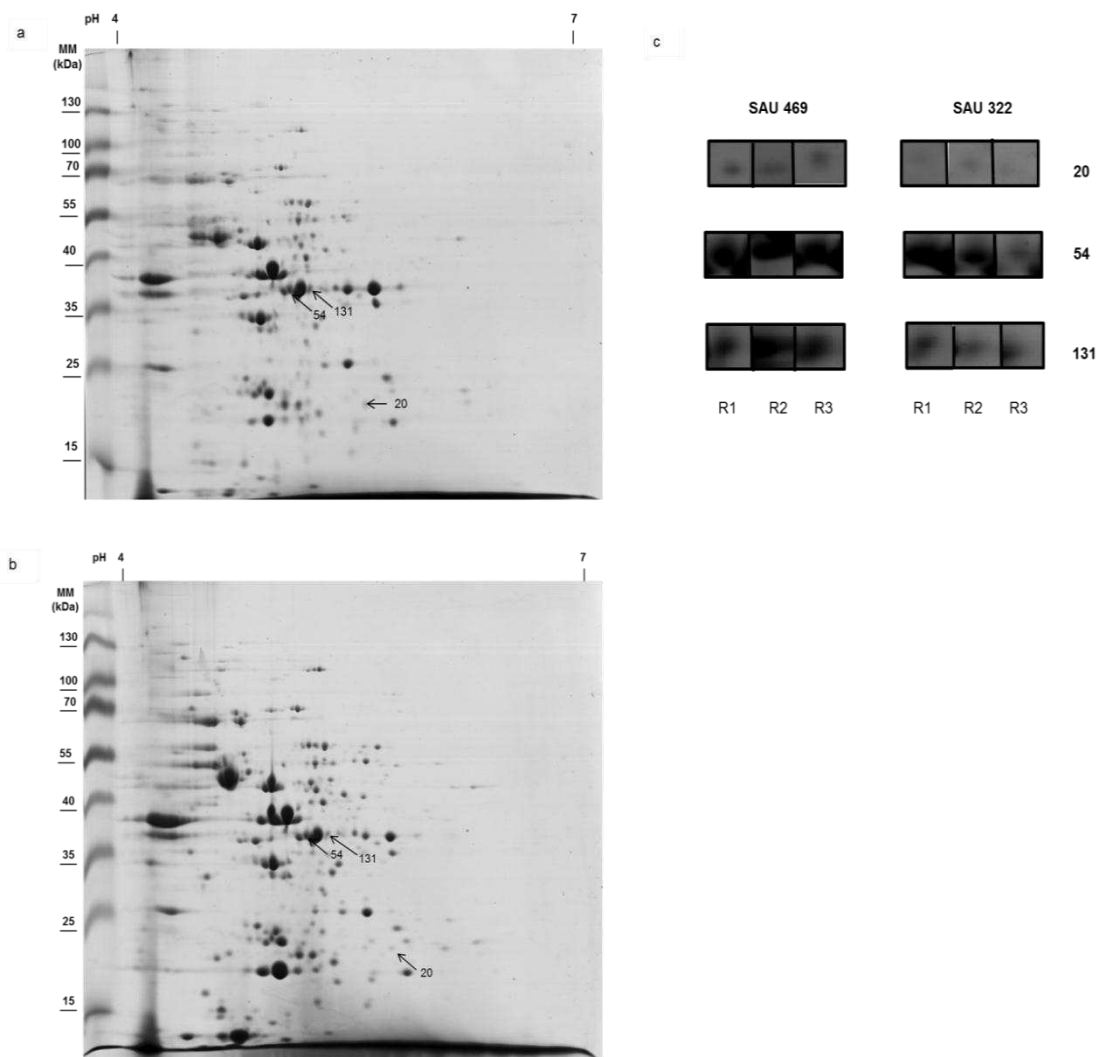


Fig. 4. Comparação proteômica das estirpes de *Staphylococcus aureus* 469 e *S. aureus* 322. Gel 2D representativo das proteínas totais de *S. aureus* 469 (a). Gel 2D representativo das proteínas totais de *S. aureus* 322 (b). As setas indicam os *spots* mais abundantes em SAU 469 (20, 54, 131). Repetições biológicas dos *spots* considerados diferenciais entre as estirpes (c). Análise feita pelo software *Image Master 2D Platinum 7*. MM: Marcador Molecular *Page Ruler Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific).

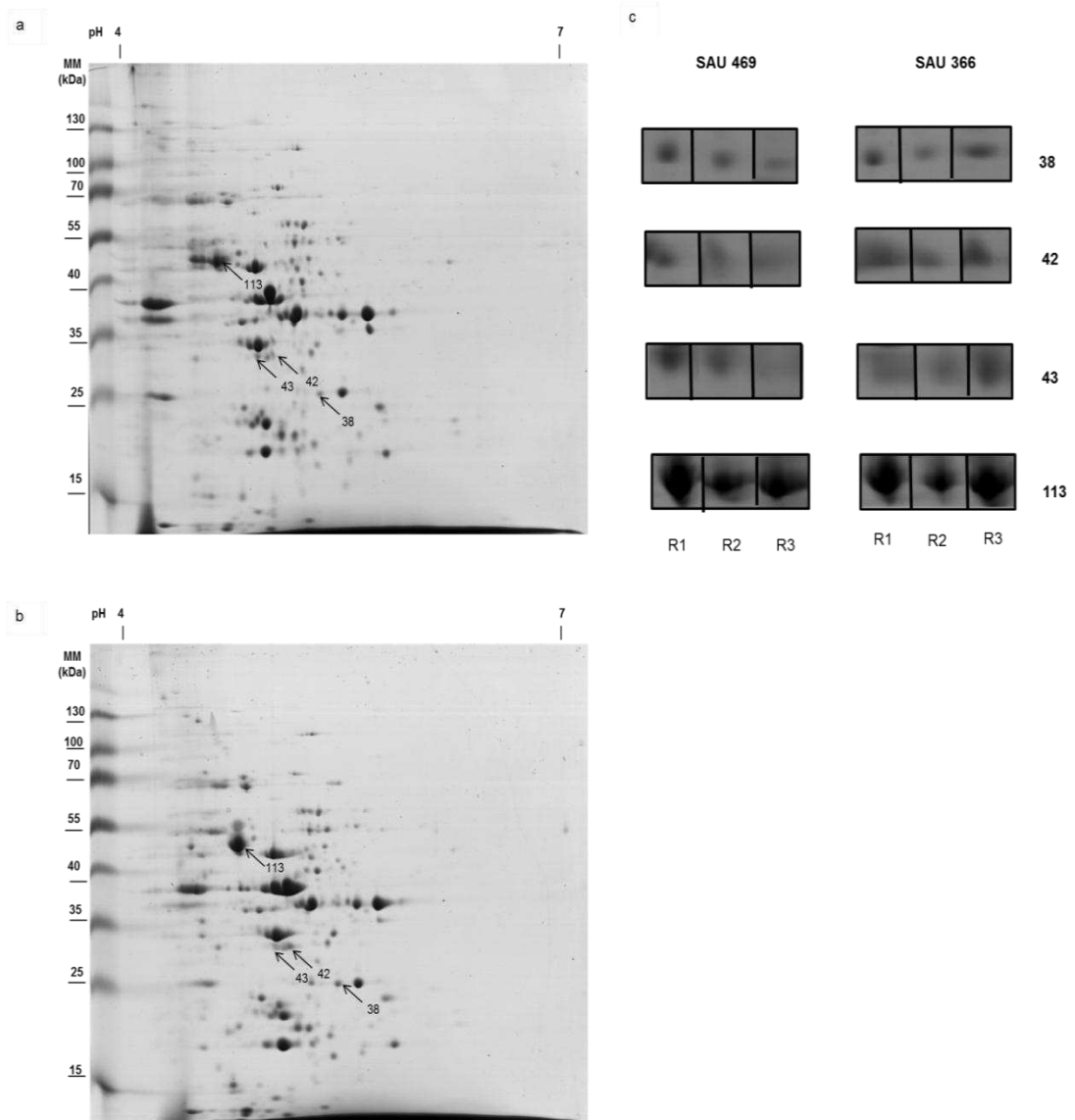


Fig. 5. Comparação proteômica das estirpes de *Staphylococcus aureus* 469 e *S. aureus* 366. Gel 2D representativo das proteínas totais de *S. aureus* 469 (a) Gel 2D representativo das proteínas totais de *S. aureus* 366 (b). As setas indicam os *spots* mais abundantes em SAU 366 (38, 42, 43, 113). Repetições biológicas dos *spots* considerados diferenciais entre as estirpes (c). Análise feita pelo software *Image Master 2D Platinum 7*. MM: Marcador Molecular *Page Ruler Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific).

DISCUSSÃO

S. aureus é um patógeno que produz uma gama de proteínas de adesão e toxinas que contribui para a grande variabilidade genética observada entre as estirpes e permite a bactéria estabelecer infecção em diferentes hospedeiros. Muitas das informações existentes sobre a bactéria são provenientes de estudos realizados com estirpes de origem humana. Porém, nos últimos anos, vem se intensificando os estudos ômicos com isolados bovinos de *S. aureus* numa tentativa de identificar e elucidar os mecanismos que permitiram a adaptação patógeno-hospedeiro e associar genes a manifestações clínicas observadas nos animais.

Neste estudo foi possível detectar algumas diferenças no perfil de proteínas produzidas por quatro estirpes de *S. aureus*, como abundância diferencial de *spots* e alguns *spots* exclusivos a uma estirpe. Uma vez que foram preparados extratos de proteínas totais, acredita-se que a maioria desses *spots* seja relativa ao metabolismo bacteriano já que alguns trabalhos de análises proteômicas identificaram as proteínas totais como pertencentes a essa categoria funcional (Le Maréchal et al., 2011; Peton et al., 2014). Assim, esses *spots* diferenciais podem sugerir a existência de uma ligação entre o metabolismo e a persistência do isolado na infecção.

A relação entre o metabolismo e a virulência de *S. aureus* foi relatada por alguns autores (Somerville et al., 2003; Somerville e Proctor, 2009; Ding et al., 2014). Sabe-se que a inibição do ciclo do ácido cítrico (TCA), inibe a produção dos precursores de biossíntese dos polissacarídeos capsulares (Cap 5 e Cap 8) (Sadykov et al., 2010), e propicia a produção de polissacarídeo de adesão intercelular (PIA), o que desencadeia a formação de biofilme (Zhu et al., 2009). Recentemente, foi relatado que o citrato é responsável pela ativação da proteína regulatória CcpE, que regula a expressão de genes associados a virulência (Ding et al., 2014). Porém, o conhecimento de como o *status* metabólico pode afetar a resposta da bactéria ao ambiente e estabelecimento da infecção ainda é muito limitado.

A comparação do proteoma intracelular e secretoma de estirpes de *S. aureus* causadoras de mastite branda (O46) com mastite severa (O11) em ovelhas revelou uma maior produção de exoproteínas, como toxinas e proteases pela segunda (Le Maréchal et al., 2011), além de diferenças no

metabolismo de ferro, o que pode, segundo os autores, ajudar a explicar a hipervirulência de O11. A grande maioria das proteínas intracelulares foi similar entre as estirpes, porém catorze envolvidas no metabolismo celular foram mais expressas em O11, enquanto oito tiveram maior expressão em O46. O secretoma se revelou bem distinto; de 35 proteínas diferentes, 28 estavam super-expressas em O11 sendo muitas identificadas como fatores de virulência. Na estirpe O46, os autores observaram uma maior expressão de proteínas de superfície.

Outro estudo caracterizou por análises genômicas, proteômicas e fenotípicas *S. aureus* N305, que causa mastite crônica e branda, e *S. aureus* RF122, uma estirpe altamente virulenta (Peton et al., 2014). *S. aureus* N305 apresentou poucos genes de toxinas e mais fatores de invasão e colonização comparadas a RF122. Proteínas super-expressas no secretoma de N305 faz parte da categoria de proteínas do metabolismo e transporte de carboidrato, que tem sido relatadas estarem envolvidas na adesão e colonização do tecido hospedeiro. Assim, os autores sugerem que o aumento de abundância dessas proteínas pode explicar a capacidade dessas estirpes de aderir, internalizar e causar infecções crônicas.

Este trabalho foi o primeiro a comparar o proteoma de estirpes de *S. aureus* causadoras de mastite subclínica. Esperava-se que o perfil de proteínas fosse muito semelhante uma vez que as bactérias foram isoladas de animais com a mesma manifestação (subclínica), apresentaram perfis similares por PFGE e que a comparação foi realizada com proteínas totais. Mesmo assim, diferenças em abundância e na presença de *spots* foram verificadas. A análise do secretoma das bactérias está em andamento e pelo conhecimento científico existente, acredita-se que maiores diferenças entre elas sejam detectadas. Os *spots* serão identificados por espectrometria de massa e sua expressão e presença em bactérias associadas às mastites com manifestações conhecidas serão validadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arif, A., Rehman, M.U., Bhat, S.A., Mir, B.A., Bhat, R.R., Mir, M.R., Bilal, S., Hussain, I., 2015. Scenario of genetic selection and its impact on bovine mastitis. *Int. J. Agro Vet. Med. Sci.* 9, 242-252.
- Bardiau, M., Detilleux, J., Farnir, F., Mainil, J.G., Ote, I., 2014. Associations between properties linked with persistence in a collection of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 169, 74-79.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Chung, M., de Lencastre, H., Matthews, P., Tomasz, A., Adamsson, I., de Sousa, M.A., Camou, T., Cocuzza, C., Corso, A., Couto, I., Dominguez, A., Gniadkowski, M., Goering, R., Gomes, A., Kikuchi, K., Marchese, A., Mato, R., Melter, O., Oliveira, D., Palacio, R., Sá-leão, R., Sanches, I.S., Song, J.H., Tassios, P.T., Villari, P., 2000. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb. Drug. Resist.* 6, 189-198.
- da Silva, M.P., 2015. Identificação e caracterização de estirpes de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* associadas às mastites bovinas persistente e não persistente. Tese (Doutorado em Bioquímica Aplicada) – Programa de Pós-graduação em Bioquímica Aplicada, Universidade Federal de Viçosa.
- de Oliveira, A.J., de Moraes, G.F., Ferreira, I.C., Monteiro, C.P., de Carvalho, A.D.F., 2012. Mastite clínica e subclínica em pequenas propriedades leiteiras no município de Araguari-MG. *Vet. Not.* 19, 7-13.
- Ding, Y., Liu, X., Chen, F., Di, H., Xu, B., Zhou, L., Deng, X., Wu, M., Yang, C-G., Lan, L., 2014. Metabolic sensor governing bacterial virulence in *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, E4981-E4990.
- Haque, M.E., 2015. Rapid detection of subclinical mastitis in dairy cow. *J. Fisheries Livest. Prod.* 3, 1.

- Haveri, M., Roslöf, A., Rantala, L., Pyörälä, S., 2007. Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. *J. Appl. Microb.* 103, 993-1000.
- Krewer, C.C., Lacerda, I.P.D.S., Amanso, E.S., Cavalcante, N.B., Peixoto, R.D.M., Pinheiro Júnior, J.W., Costa, M.M.D., Mota, R.A., 2013. Etiology, antimicrobial susceptibility profile of *Staphylococcus* spp. and risk factors associated with bovine mastitis in the states of Bahia and Pernambuco. *Pesq. Vet. Bras.* 33, 601-606.
- Kulkarni, A.G., Kaliwal, B.B., 2013. Bovine mastitis: a review. *Int. J. Recent Sci. Res.* 4, 543-548.
- 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., Vautor, E., Le Loir, Y., 2011. Molecular basis of virulence in *Staphylococcus aureus* mastitis. *PLoS One* 6, e27354.
- Le Maréchal, C., Jan, G., Even, S., McCulloch, J.A., Azevedo, V., Thiéry, R., Vautor, E., Le Loir, Y., 2009. Development of serological proteome analysis of mastitis by *Staphylococcus aureus* in ewes. *J. Microbiol. Methods* 79, 131-136.
- Lippolis, J.D., Brunelle, B.W., Reinhardt, T.A., Sacco, R.E., Nonnecke, B.J., Dogan, B., Simpson, K., Schukken, Y.H., 2014. Proteomic analysis reveals protein expression differences in *Escherichia coli* strains associated with persistent versus transient mastitis. *J. Proteomics* 108, 373-381.
- Litwińczuk, Z., Król, J., Brodziak, A., 2015. Factors determining the susceptibility of cows to mastitis and losses incurred by producers due to the disease - a review. *Ann. Anim. Sci.* 15, 819-831.
- Padhy, A., Sahu, A.R., Shekhar, S., Sahoo, S., Sahoo, A., Dalai, N., 2015. *Staphylococcus aureus*: an emergent cause of bovine mastitis in India - a review. *Int. J. Livest. Res.* 5, 1-7.
- Patnaik, S., Prasad, A., Ganguly, S., 2013. Mastitis, an infection of cattle udder: a review. *J. Chem. Bio. Phy. Sci.* 3, 2676-2678.

- 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., 2014. Fine-tuned characterization of *Staphylococcus aureus* Newbould 305, a strain associated with mild and chronic mastitis in bovines. *Vet. Res.* 45, 1-15.
- Sadykov, M.R., Mattes, T.A., Luong, T.T., Zhu, Y., Day, S.R., Sifri, C.D., Lee, C.Y., Somerville, G.A., 2010. Tricarboxylic acid cycle-dependent synthesis of *Staphylococcus aureus* type 5 and 8 capsular polysaccharides. *J. Bacteriol.* 192, 1459-1462.
- Sharma, N., Rho, G.J., Hong, Y.H., Kang, T.Y., Lee, H.K., Hur, T-Y., Jeong, D.K., 2012. Bovine mastitis: an Asian perspective. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* 7, 454-476.
- Somerville, G.A., Cockayne, A., Dürr, M., Peschel, A., Otto, M., Musser, J.M., 2003. Synthesis and deformylation of *Staphylococcus aureus* δ -toxin are linked to tricarboxylic acid cycle activity. *J. Bacteriol.* 185, 6686–6694.
- Somerville, G.A., Proctor, R.A., 2009. At the crossroads of bacterial metabolism and virulence factor synthesis in staphylococci. *Microbiol. Mol. Biol.* 73, 233-248.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B., 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2233-2239.
- 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., 2015. Genotypic and phenotypic characterization of *Staphylococcus aureus* causing persistent and nonpersistent subclinical bovine intramammary infections during lactation or the dry period. *J. Dairy Sci.* 98, 1-14.
- Wolf, C., Kusch, H., Monecke, S., Albrecht, D., Holtfreter, S., von Eiff, C., Petzl, W., Rainard, P., Broker, B.M., Engelmann, S., 2011. Genomic and proteomic characterization of *Staphylococcus aureus* mastitis isolates of bovine origin. *Proteomics* 11, 2491-2502.
- Zhu, Y., Xiong, Y.Q., Sadykov, M.R., Fey, P.D., Lei, M.G., Lee, C.Y., Bayer, A.S., Somerville, G.A., 2009. Tricarboxylic acid cycle-dependent attenuation of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 77, 4256–4264.

Capítulo III

Dispersão de biofilmes de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* por uma lectina tipo C isolada de *Bothrops jararacussu*

RESUMO

Tendo em vista o crescente aumento da resistência das bactérias a antimicrobianos, torna-se necessário buscar alternativas ao combate de patógenos. Estratégias antivirulência têm sido apontadas como um novo paradigma, na qual fatores de virulência tornam-se alvos preferidos, uma vez que são essenciais no estabelecimento do processo infeccioso. Este estudo avaliou a ação antibiofilme da lectina BjcuL obtida do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* sobre o biofilme de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, visando determinar a eficácia dessa abordagem no controle bacteriano. Os resultados mostraram que BjcuL não atuou sobre a fase inicial de formação de biofilme, e que microplacas de 96 poços pré-revestimento com a lectina reduziu em 69,8 % a formação do biofilme bacteriano. Observou-se uma porcentagem de redução de 85 % do biofilme pré-formado de *S. aureus* após 10 h de exposição à BjcuL, o que não foi observado sobre o biofilme de *S. epidermidis*. Lectinas comerciais obtidas de *Triticum vulgare*, *Bandeiraea simplicifolia* BSII e *Maclura pomifera* não atuaram sobre o biofilme pré-formado, mas a lectina de *T. vulgare* teve ação antibiofilme pois reduziu em 85 % a formação do biofilme das bactérias estudadas. Sugere-se que a atividade de BjcuL não esteja associada ao sítio de ligação de carboidratos, uma vez que a pré-incubação da lectina com açúcares como galactose, manose e glicose não alteraram sua ação. Na presença da lectina houve uma maior expressão dos genes *icaR* e *sarA*, envolvidos na regulação do operon *ica* responsável pela produção de PIA, principal polissacarídeo de adesão de *S. aureus*. Biofilme pré-formado exposto à combinação lectina BjcuL-antibióticos, aumentou a susceptibilidade das células bacterianas, revelando que uma ação antibiofilme é uma estratégia promissora no combate a infecções causadas por *S. aureus*.

INTRODUÇÃO

A terapia de tratamento contra infecções bacterianas é baseada no uso de antimicrobianos que agem inibindo o crescimento bacteriano ou provocando a morte da bactéria. Embora sejam muitas vezes efetivos, os antimicrobianos exercem uma pressão seletiva sobre a célula selecionando bactérias resistentes (Clatworthy et al., 2007). Com um maior conhecimento dos mecanismos de patogenicidade bacteriana, passou-se a considerar uma nova estratégia antivirulência de combate às infecções que não tivessem efeito sobre o crescimento e sim sobre a virulência microbiana ou a interação patógeno-hospedeiro (Gill et al., 2015; Hauser et al., 2016), o que possivelmente minimizaria o surgimento de resistência e preservaria a microbiota humana (Defoirdt, 2016; Maura et al., 2016).

A terapia antivirulência tem como princípio desarmar o patógeno através da inibição dos fatores de virulência que causam danos ao tecido hospedeiro (Vale et al., 2016). Como alvos citam-se toxinas e sistemas de secreção, reguladores dos genes de virulência e adesinas (Rasko e Sperandio, 2010; Maura et al., 2016). Alguns inibidores têm se mostrado eficientes em combater infecções causadas por *Escherichia coli* e *Vibrio cholerae* em modelo murino (Hung et al., 2005; López et al., 2010). Óleos essenciais de pimenta preta e mirra e o composto cis-nerolidol diminuíram a atividade hemolítica, atenuando a virulência de *S. aureus* sobre o nematódeo *Caenorhabditis elegans* sem alterar o crescimento bacteriano (Lee et al., 2014). Um anticorpo monoclonal previniu a lise celular provocada por α -hemolisina e leucocidinas *in vitro* e teve um alto efeito de proteção em modelos murinos infectados com *S. aureus* (Rouha et al., 2015). Acredita-se que essas futuras drogas possam ser utilizadas em combinação com os antibióticos para aumentar a eficácia desses agentes no tratamento das doenças infecciosas (Rasko e Sperandio, 2010).

Outro alvo da terapia antivirulência são os fatores que propiciam à resistência às defesas do hospedeiro e a antibióticos, como o biofilme, uma comunidade de células bacterianas envolta por uma matriz polimérica composta de polissacarídeos, DNA e proteína (Boles e Horswill, 2011; Speziale e Geoghegan, 2015). De acordo com estudos *in vitro* as bactérias associadas ao biofilme são de 10 a 1000 vezes mais resistentes aos agentes

antimicrobianos (Olson et al., 2002). Essa resistência se deve a vários fatores tais como a presença da camada de exopolissacarídeos, enzimas de degradação de antibiótico, moléculas do *quorum sensing*, alta expressão de bombas de efluxo e alta taxa de transferência lateral de genes (Venkatesan et al., 2015). Assim, a descoberta de agentes que previnam a formação do biofilme ou removam biofilme já estabelecido é de grande interesse na terapia de doenças (Chung e Toh, 2014).

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas que possuem pelo menos um domínio não catalítico de ligação reversível e específica a monossacarídeo, oligossacarídeo ou glicoconjugados (Dias et al., 2015; lordache, 2015). Lectinas extraídas de plantas inibiram a aderência inicial e a formação de biofilme de *Streptococcus mutans* de maneira dependente da concentração (Islam et al., 2009). Glicoproteínas presentes na superfície bacteriana estão envolvidas na interação entre a bactéria e a saliva e sua interação com a lectina poderia ajudar a explicar a menor aderência bacteriana. Lectinas obtidas da leguminosa *Diocleinae subtribe* foram também capazes de inibir a formação de biofilme de *S. mutans*, porém sem efeito sob o biofilme de *Streptococcus oralis* (Cavalcante et al., 2011). Já uma lectina obtida de sementes de *Canavalia maritima* (ConM) reduziu a expressão de genes relacionados a adesão, formação e regulação de biofilme (*spaP*, *gbpB*, *gtfB* e *brpA*) (Cavalcante et al., 2013).

Klein et al. (2015) identificaram uma lectina (BjcuL) isolada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* com capacidade de inibir a formação de biofilme de *Staphylococcus* spp. de maneira dose dependente, sem contudo afetar o crescimento bacteriano. Outro resultado interessante foi a capacidade dessa lectina em desfazer biofilmes pré-estabelecidos de *S. aureus* e *S. epidermidis*, dois importantes patógenos associados a infecções hospitalares.

Desta forma, o atual estudo avaliou a ação antibiofilme da lectina BjcuL sobre o biofilme de *Staphylococcus* spp. Essa proteína desfez o biofilme pré-estabelecido e inibiu a formação inicial de biofilme em microplacas recobertas com lectina. Os resultados mostraram que a ação dessa lectina sobre o biofilme pode não estar relacionada ao domínio de ligação a carboidratos (CBD). A combinação de BjcuL com antibióticos mostrou-se

efetiva sobre biofilmes pré-formados, sugerindo que esta é uma estratégia promissora no combate a infecções causadas por *S. aureus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismos, condições de cultivo e obtenção do veneno

As estirpes *Staphylococcus epidermidis* NRS101 (ATCC® 35983) e *S. aureus* NRS155 (RN 9120), fortes produtoras de biofilme, foram doadas pela NARSA (*Network on Antimicrobial Resistance in Staphylococcus aureus*) e utilizadas nos experimentos. Para os ensaios de biofilme, utilizaram-se células crescidas em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) suplementado com 0,25 % glicose (BHIg) a 37 °C. Todos os isolados utilizados foram estocados a - 20 °C em meio BHI contendo 20 % de glicerol.

O veneno de *Bothrops jararacussu* foi extraído manualmente de cobras da Mata do Paraíso (20°45'S, 42°52'W), pertencente à Universidade Federal de Viçosa, e estocado a - 20 °C até o uso. As licenças para acesso ao patrimônio genético e para coleta do veneno foram concedidas pelo CNPq (010548/2013-0) e SISBio (39126-1).

Purificação da lectina

A purificação da lectina tipo C (BjcuL) a partir do veneno de serpente foi realizada como descrito por Klein et al. (2015). Em resumo, o veneno foi centrifugado a 10000 x g por 10 minutos para remover material insolúvel, ressuspendido em PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄) e aplicado em coluna agarose-D-galactose (Vector Laboratories) conectada ao sistema FPLC (GE Healthcare). A coluna foi lavada com o mesmo tampão na taxa de fluxo de 0,5 mL/min até a absorvância a 280 nm retornar a linha basal. A lectina ligada à coluna foi eluída com PBS contendo 300 mM D-galactose e o perfil de eluição monitorado pela leitura da absorvância a 280 nm. A lectina purificada foi dialisada contra PBS, utilizando uma membrana de 3,5 K (Thermo Scientific) realizando a troca do tampão a cada 24 h ou utilizando o filtro de centrifugação Amicon Ultra 0,5 mL, membrana 3 KDa (Merck Millipore), e estocada a - 20 °C para posterior uso.

Lectinas comerciais

Estoques de lectinas comerciais obtidas de *Triticum vulgare* (WGA) (Sigma - L0636), *Bandeiraea simplicifolia* BS-II (Sigma – L7508), *Maclura*

pomifera (Sigma - L6141) foram preparados a uma concentração de 1 mg/mL e armazenados a - 20 °C até o momento de uso.

Efeito das lectinas sobre o biofilme

A ação das lectinas sobre o biofilme em formação foi avaliada em microplaca de 96 poços TPP (92096). Uma suspensão de células (100 µL) ajustada para 0,5 McFarland foi adicionada a cada poço, que em seguida foi preenchido com BHIg adicionado ou não de lectina (50 ou 100 µg/mL) para um volume final de 200 µL. Após 24 h de incubação à 37 °C, o crescimento foi averiguado por leitura da densidade ótica a 600nm em leitor de microplaca (VersaMax Molecular Devices). O sobrenadante foi retirado, as placas foram gentilmente lavadas três vezes com PBS (pH 7,8), seguido de coloração com cristal violeta 0,1 % por 30 min (Klein et al., 2015).

Para o biofilme pré-formado, uma suspensão de células (100 µL) ajustada para 0,5 McFarland foi adicionada a cada poço contendo 100 µL de BHIg. Após 24 h, as células planctônicas foram removidas e às células do biofilme adicionou-se BHIg com ou sem lectina (50 ou 100 µg/mL). Após 6 h ou 10 h as placas foram coradas com cristal violeta 0,1 % por 30 min. Biofilme pré-formado incubado somente com BHIg foi utilizado como controle.

A porcentagem de crescimento bacteriano foi calculada usando a fórmula $(OD\ 600\ nm\ das\ células\ de\ biofilme\ tratada\ com\ lectina / OD\ 600\ nm\ das\ células\ de\ biofilme\ não\ tratadas) \times 100$. A porcentagem de produção do biofilme foi calculada usando a fórmula $(OD\ 560\ nm\ das\ células\ de\ biofilme\ tratadas\ com\ lectina / OD\ 560\ nm\ das\ células\ de\ biofilme\ não\ tratadas) \times 100$. A porcentagem de redução do biofilme foi calculada utilizando a fórmula $100 - (OD\ 560\ nm\ das\ células\ de\ biofilme\ tratadas\ com\ lectina / OD\ 560\ nm\ das\ células\ de\ biofilme\ não\ tratadas) \times 100$. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata biológica.

O efeito da lectina sobre o número de células viáveis do sobrenadante e do biofilme também foi avaliado. Para isso, a formação do biofilme foi realizada como descrita acima e após 4 h (adesão inicial) ou 24 h (biofilme estabelecido) o sobrenadante foi recolhido e armazenado. As células do biofilme foram lavadas três vezes com PBS e desfeitas manualmente com

auxílio de micropipeta. As suspensões obtidas foram sonicadas (30' amplitude 30 %, 40' amplitude 40 %) e diluídas para determinação da quantidade de células viáveis pelo método do plaqueamento em microgotas em BHI ágar.

Inibição da formação de biofilme em superfícies

Placas de 96 poços foram recobertas com 100 µg/mL lectina ou BSA (Soro Albumina Bovina) e incubadas *overnight* a 4 °C. Os poços foram preenchidos com uma suspensão de células ajustada em 0,5 McFarland juntamente com o meio de cultura BHlg para um volume final de 200 µL. Após 24 h, o ensaio de biofilme foi realizado como descrito no item anterior. Poços não recobertos com lectina ou recobertos com BSA foram utilizados como controle.

Inibição da atividade de lectina por açúcares

A lectina B_{ju}cL foi pré-incubada com 100 mM dos carboidratos (galactose, manose e glicose) por 1 h a temperatura ambiente. Uma suspensão bacteriana ajustada para 0,5 McFarland foi adicionada a poços contendo os carboidratos pré-incubados ou não com lectina e meio BHlg para volume final de 200 µL. As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C, seguido de coloração com cristal violeta. A porcentagem de redução do biofilme foi calculada em relação ao controle de cada monossacarídeo utilizado, utilizando a fórmula $100 - (\text{OD } 560 \text{ nm do biofilme com lectina mais o açúcar}) / \text{OD } 560 \text{ nm do biofilme na presença do açúcar}) \times 100$.

Efeito de antibióticos sobre o biofilme bacteriano

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012), com algumas modificações. Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados meio BHlg e antibióticos (gentamicina, ampicilina e rifampicina) cujas concentrações finais variaram de 128,0 µg/mL a 0,002 µg/mL. Em seguida, uma suspensão bacteriana em concentração final de 10⁵ UFC/mL foi adicionada em cada poço. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 h e a CIM foi definida pela

menor concentração do antibiótico no qual visualmente não observou-se turbidez do meio.

A ação dos antibióticos sobre células do sobrenadante do biofilme pré-formado exposto ou não à lectina foi avaliada. Após 24 h de formação do biofilme, esse foi exposto a lectina B_{jcuL} por 6 h e, o sobrenadante foi diluído 1/3 com PBS e tratado com 50xCIM dos antibióticos por 6 horas. Após o tratamento com cada antibiótico, as células foram diluídas para determinação da quantidade de células viáveis pelo método de plaqueamento em microgotas em BHI ágar. O sobrenadante não tratado com antibiótico foi utilizado como controle e os experimentos foram feitos em triplicata biológica.

A ação dos antibióticos sobre células do biofilme pré-formado exposto ou não à lectina foi avaliada como descrito por Shukla e Rao (2013), com algumas modificações. Após 24 h de formação do biofilme, esse foi tratado com 50xCIM dos antibióticos em combinação ou não com a lectina B_{jcuL} por 6 h. Após o tratamento, as células do biofilme foram coradas com cristal violeta como descrito anteriormente. Os experimentos foram realizados em triplicata biológica.

HPLC

O perfil cromatográfico do sobrenadante das células do biofilme exposto ou não à lectina foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando a coluna Aminex HPX-87H, mantida a 45 °C. Foram avaliados os sobrenadantes do biofilme em formação e do biofilme pré-formado. Como eluente para separação foi utilizado ácido sulfúrico 5 mM, aplicada a uma taxa de eluição de 0,7 mL/min, a coluna foi acoplada ao detector de índice de refração SPD-20A.

qRT-PCR

Células bacterianas crescidas em microplacas preenchidas com meio BHlg contendo ou não lectina foram coletadas após cultivo de 24 h a 37 °C. Os poços foram lavados três vezes com PBS (pH 7,4) e o biofilme foi ressuspenso nesse mesmo tampão e submetido a extração de RNA total utilizando o reagente Trizol (Life Technologies). As amostras extraídas foram tratadas com DNase (Promega). A síntese do cDNA foi realizada utilizando o

kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante, a partir de amostras contendo 2 µg de RNA total. A expressão dos genes *icaR* (Korem et al., 2009) e *sarA* (Ster et al., 2005) foram avaliadas por qRT-PCR utilizando o aparelho *ABI Prism 7500 Sequence Detection System* (Applied Biosystems). A detecção foi realizada pelo sistema SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) e o gene *16S rRNA* (Ster et al., 2005) foi utilizado como controle endógeno. Como controle do tratamento foi utilizado RNA extraído do biofilme formado pela bactéria não exposta à lectina. A quantificação relativa foi realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrito por Livak e Schmittgen (2001).

As amostras foram analisadas com duas repetições biológicas, quantificadas em corridas independentes, sendo cada amostra analisada em duplicata em cada placa de reação. Inicialmente, foram realizados ensaios para a determinação da concentração ótima de *primer* e da eficiência da reação. Os componentes para cada reação foram 1µL de cDNA (240ng), 6,0 µL de 2X *SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystem) e *primers* nas concentrações de 200, 400, 600 e 1000 nM. O teste de eficiência foi realizado em diluições seriadas de 10^2 (240ng/µL), 10^1 (24ng/µL), 10^0 (2,4ng/µL), 10^{-1} (0,24ng/µL) e 10^{-2} (0,024 ng/µL) do cDNA. Para o cálculo do valor do coeficiente angular da reta (*slope*) foi utilizada a fórmula Eficiência PCR= $(10^{(1/-slope)} - 1) \times 100$.

A condição de amplificação para todos os sistemas foi 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 30 seg e anelamento e extensão a 60 °C durante 30 seg. Após 40 ciclos de amplificação todas as amostras foram submetidas à desnaturação gradual para obtenção da curva de dissociação. As amostras foram aquecidas com incremento de 1 °C durante 30 seg, partindo de 60 °C até atingir o limite de 94 °C.

RESULTADOS

No trabalho de Klein et al. (2015) demonstrou que a lectina BjuL reduziu em até 80 % a formação de biofilme por *S. aureus* e *S. epidermidis* após 22 h de cultivo. Esse efeito não foi devido a diferenças na adesão inicial das células, uma vez que o biofilme formado depois de 4 h na presença ou ausência da lectina foi o mesmo (Fig. 1a). Porém, houve uma redução de 69,8 % na formação de biofilme quando os poços de microplacas foram pré-revestidos com a proteína (Fig. 1b), o que não aconteceu quando os poços foram revestidos com a mesma concentração de BSA. Neste trabalho, observou-se que a lectina foi ativa mesmo depois de 10 h, porém apenas sobre biofilme de *S. aureus* NRS 155, quando o rompimento do biofilme chegou a 85 % (Fig. 2a). Porém essa lectina não foi capaz de desfazer o biofilme de *S. epidermidis* NRS 101 (Fig. 2b).

A atividade de lectinas comerciais de *Triticum vulgaris* (WGA), *Bandeiraea simplicifolia* BSII e *Maclura pomifera* foi avaliada sobre o crescimento bacteriano e a formação de biofilme de *S. aureus* NRS 155 e *S. epidermidis* NRS101. Nenhuma delas teve efeito sobre o crescimento bacteriano, porém uma concentração de 100 µg/mL da lectina WGA foi capaz de reduzir em 85 % o biofilme de *S. aureus* NRS 155 e *S. epidermidis* NRS 101 (Fig. 3). Ao contrário da BjuL, nenhuma das três lectinas comerciais foram capazes de desfazer o biofilme pré-formado (dados não apresentados).

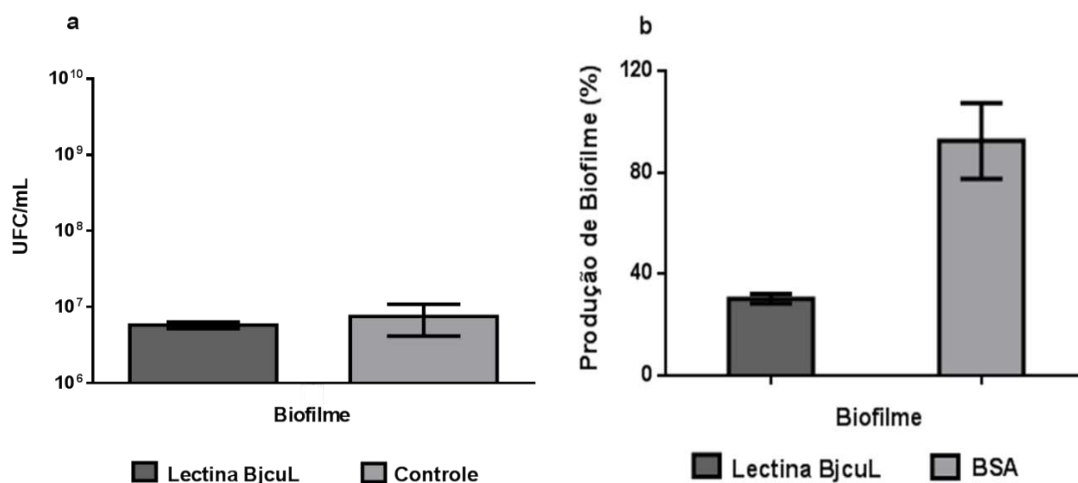


Fig. 1. Efeito da lectina BjcUL sobre biofilmes em formação de *Staphylococcus aureus* NRS 155. Efeito da BjcUL sobre a adesão inicial (4 h) de células bacterianas à superfície inerte (a). Porcentagem de produção de biofilme de *S. aureus* NRS 155 sobre microplacas pré-revestidas com BjcUL (b). A porcentagem de produção do biofilme foi calculada relativa ao observado ao controle ao qual foi definido como 100 %. Os resultados apresentados são as médias de três experimentos independentes \pm desvio padrão.

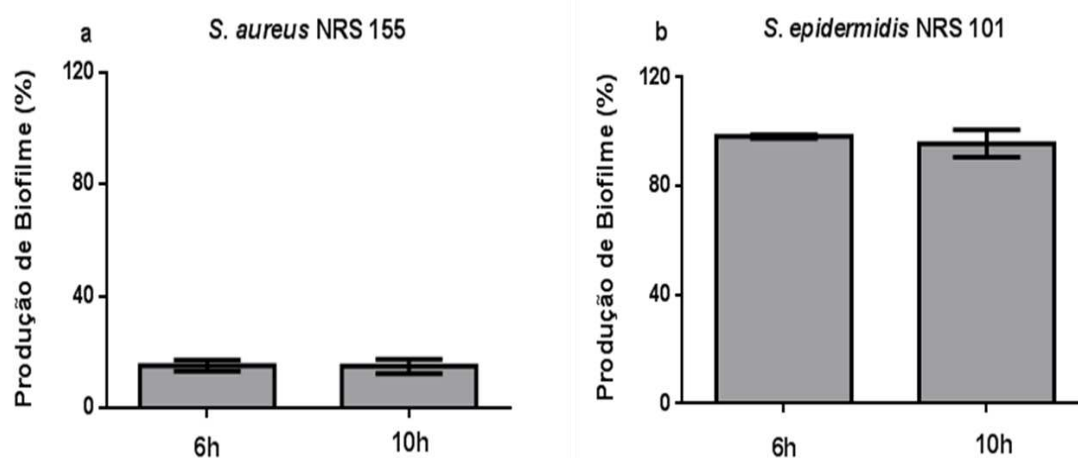


Fig. 2. A lectina BjcUL desfaz biofilme pré-formado de *Staphylococcus aureus* (a). Porém não teve ação sobre o biofilme de *Staphylococcus epidermidis* (b). A bactéria foi cultivada em microplacas por 24 h a 37 °C. Sobre o biofilme estabelecido foi adicionada a lectina (50 μ g/mL) por 6 h e 10 h. A porcentagem produção de biofilme foi calculada relativa ao observado ao controle ao qual foi definido como 100 %. Os valores expostos são as médias \pm desvio-padrão a partir de três experimentos independentes.

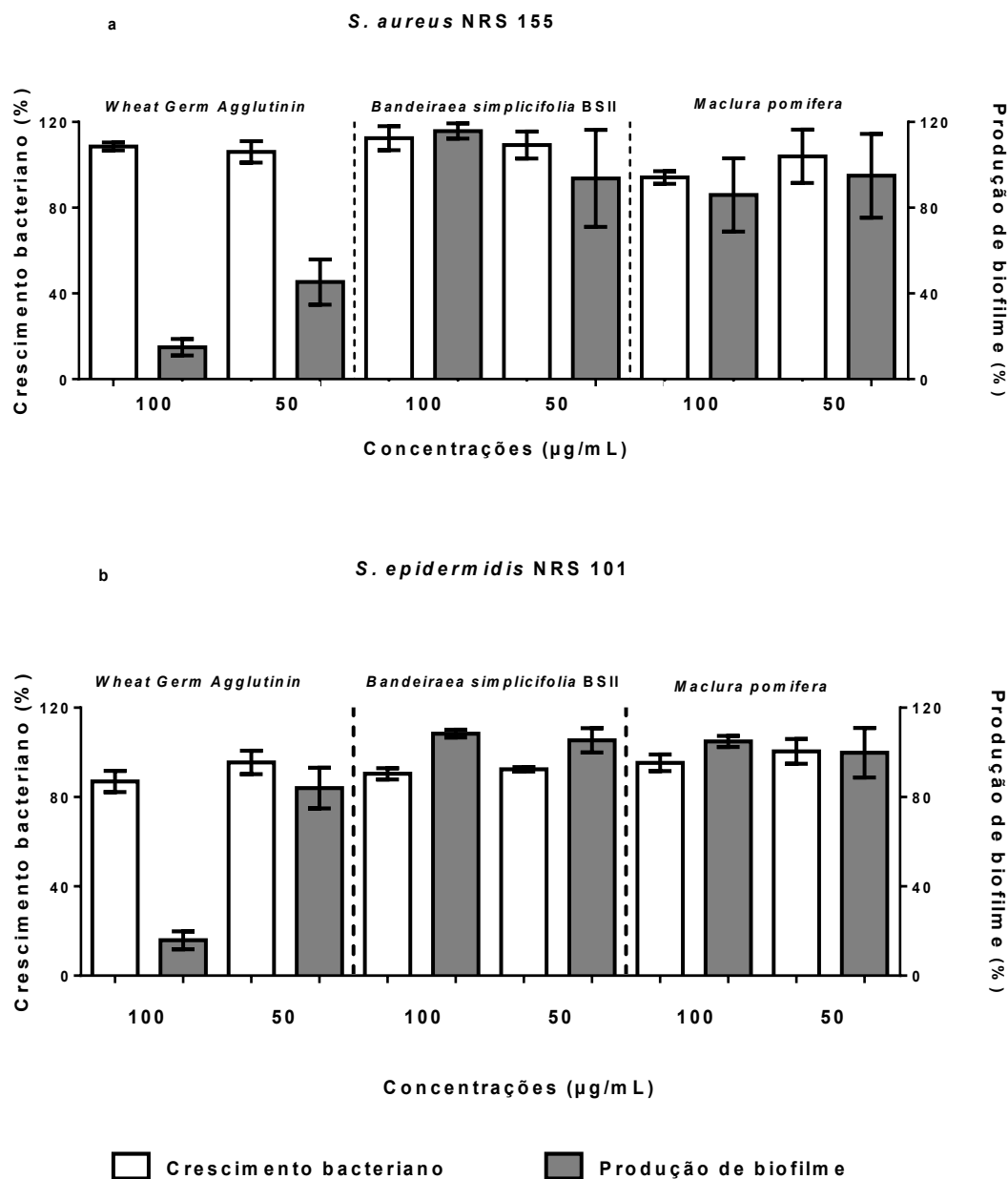


Fig. 3. Lectina WGA (*Wheat Germ Agglutinin*) impede a formação do biofilme de *Staphylococcus aureus* NRS 155 e *Staphylococcus epidermidis* NRS101. As lectinas comerciais *Wheat Germ Agglutinin*, *Bandeiraea simplicifolia* BSII e *Maclura pomifera* foram testadas nas concentrações de 50 e 100 µg/mL sobre o crescimento bacteriano e a produção de biofilme de *S. aureus* NRS 155 (a) e *S. epidermidis* NRS 101 (b). A porcentagem de crescimento bacteriano e a produção de biofilme foram calculadas relativas ao controle. Os resultados apresentados são as médias de três experimentos independentes ± desvio padrão.

Pela especificidade da lectina BjcuL à galactose supôs-se que a capacidade de ligação a carboidratos poderia ser responsável pela atividade antibiofilme. Porém, 100 mM de galactose, manose ou glicose não foram capazes de impedir a atividade da lectina BjcuL sobre o biofilme em formação, o que sugere um outro sítio que determina a ação sobre o biofilme (Fig. 4a). A porcentagem de redução (80 %) do biofilme de *S. aureus* NRS 155 e *S. epidermidis* NRS 101 quando culturas foram expostas à lectina purificada não dialisada foi semelhante à lectina dialisada, sugerindo novamente que o efeito antibiofilme não ocorre pelo domínio de ligação a carboidratos (Fig. 4b).

Análises por HPLC foram realizadas para avaliar a presença de açúcares no sobrenadante de células expostas à lectina, tanto daquelas vindas do ensaio de biofilme em formação quanto nos ensaios do biofilme pré-formado. Porém não houve alteração do perfil cromatográfico comparando as células expostas à lectina com o controle (Fig. 5).

A presença da lectina ativou a expressão de dois genes reguladores *icaR* e *sarA*, promovendo o aumento de uma vez na expressão de *icaR* e de cinco vezes na expressão de *sarA* (Fig. 6). O biofilme pré-formado de *S. aureus* NRS 155 foi incubado com BjcuL por 6 h e o sobrenadante foi recolhido e exposto a diferentes antibióticos. Não houve diferença entre o tratamento (lectina) e controle (sem lectina), o que leva a supor que não há liberação de células do biofilme para o sobrenadante (Fig. 7a). Células do biofilme pré-formado foram expostas aos mesmos antibióticos em combinação com a lectina. A combinação lectina BjcuL-antibióticos (gentamicina e ampicilina) propiciou uma redução do biofilme pré-formado quando comparada as células expostas somente a antibióticos (Fig. 7b).

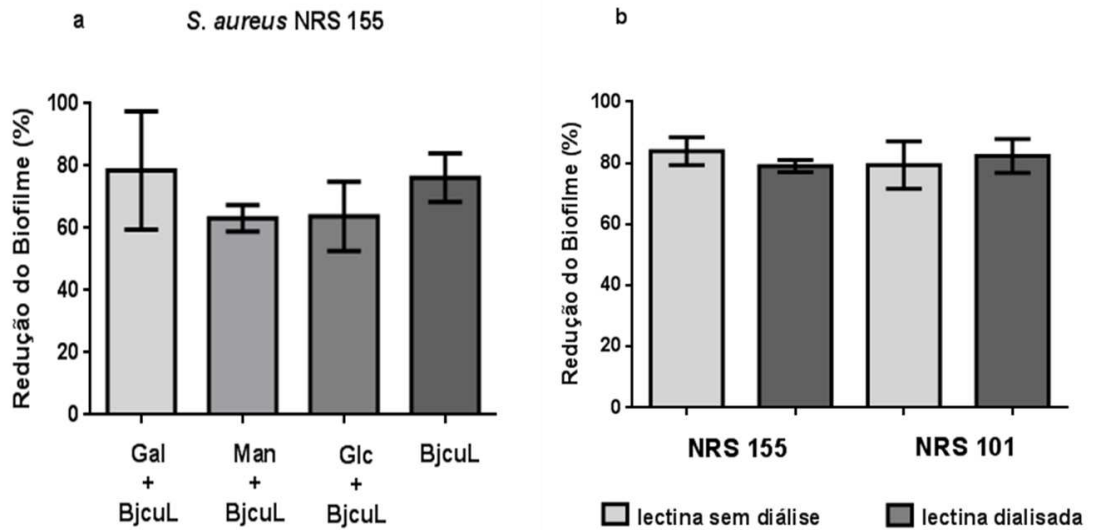


Fig. 4. Açúcares não inibiram a atividade antibiofilme da lectina BjcuL. Galactose, manose e glicose foram testadas nas concentrações de 100 mM e a lectina na concentração de 100 µg/mL. A porcentagem de redução do biofilme foi calculada em relação ao controle de cada monossacarídeo utilizado e a porcentagem de redução do biofilme utilizando os açúcares = $100 - (\text{OD } 560 \text{ nm do biofilme com lectina mais o açúcar}) / \text{OD } 560 \text{ nm do biofilme na presença do açúcar} \times 100$ (a). Lectina sem diálise foi capaz de impedir a formação do biofilme de *S. aureus* NRS 155 e *S. epidermidis* NRS 101. A porcentagem de redução do biofilme foi calculada relativa ao controle (b). Os valores expostos são as médias \pm desvio padrão a partir de três experimentos independentes.

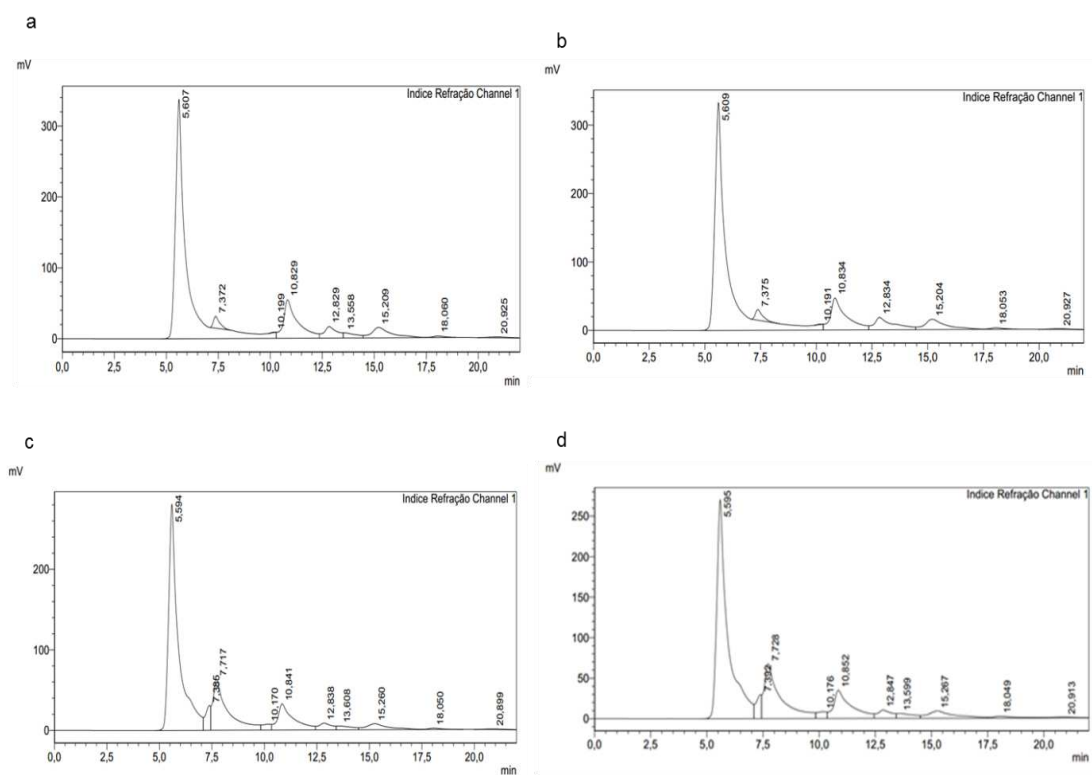


Fig. 5. Perfil cromatográfico do sobrenadante coletado do ensaio de biofilme de *Staphylococcus aureus* NRS 155 quando exposto à lectina BjuL. Sobrenadante do biofilme em formação na presença de lectina (a). Sobrenadante do biofilme em formação não exposto à lectina (b). Sobrenadante do biofilme pré-formado exposto à lectina (c). Sobrenadante do biofilme pré-formado não exposto à lectina (d).

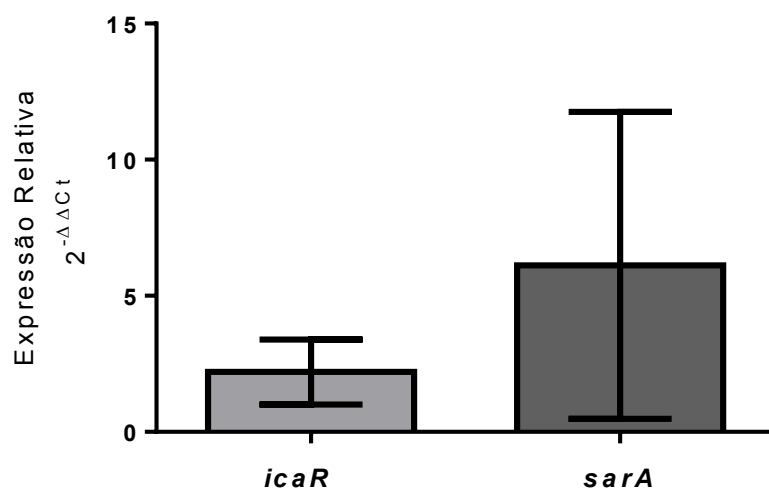


Fig. 6. Exposição à lectina BijuL altera a expressão de genes que regulam biofilme em *Staphylococcus aureus* NRS 155. Células de *S. aureus* NRS 155 foram expostas à lectina e após 22 h RNA total foi extraído e analisado por qRT-PCR. Uma cultura não exposta à lectina foi utilizada como controle, sendo o valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ considerado igual a 1.

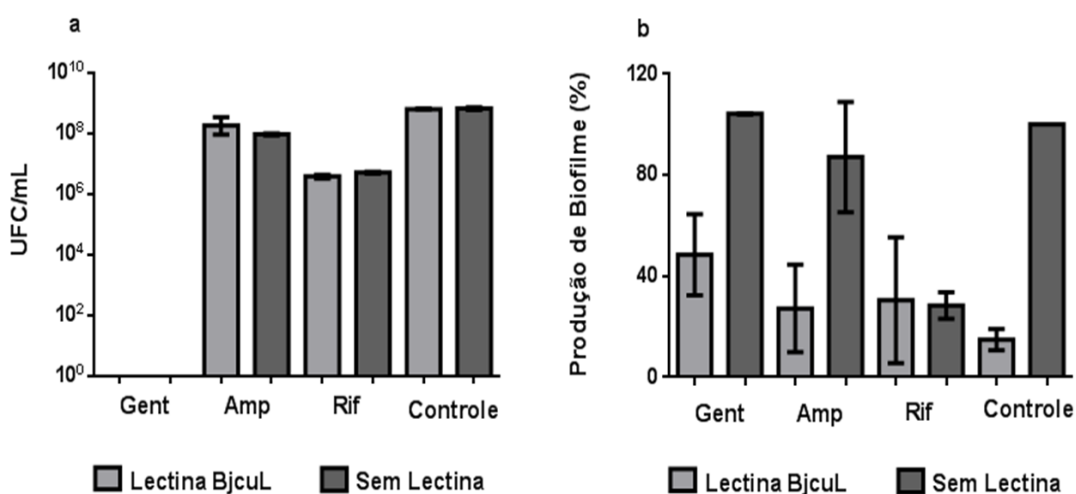


Fig. 7. Tratamento de biofilme pré-formado com lectina BijuL aumenta ação de antibióticos. Efeito de antibióticos sobre células do biofilme pré-formado de *Staphylococcus aureus* NRS 155 expostas à lectina por 6 h. As células planctônicas foram coletadas e incubadas com 50XCIM de gentamicina, ampicilina e rifampicina, serialmente diluídas e plaqueadas (a). As células do biofilme foram incubadas por 6 h com 50XCIM de gentamicina, ampicilina e rifampicina, seguido por lavagem e coloração com cristal violeta (b). Os resultados apresentados são as médias de três experimentos independentes \pm desvio padrão.

DISCUSSÃO

Biofilme é um importante fator de virulência produzido por muitas bactérias e sua formação ocorre basicamente em três fases: (1) adesão das células às superfícies abióticas, por meio de ligações hidrofóbicas e eletrostáticas, ou bióticas, por intermédio de interações específicas das proteínas de adesão bacteriana às proteínas da matriz do hospedeiro; (2) maturação, na qual ocorre a proliferação celular, adesão intercelular e formação da estrutura madura; (3) e dispersão, onde grumos de células se despreendem para colonizar novos sítios (Otto, 2013). As interações iniciais da bactéria a superfícies de materiais na maioria das vezes são inespecíficas, porém algumas moléculas foram identificadas como promotoras da ligação às superfícies abióticas tais como autolisinas e ácidos teicóicos. Em *S. aureus* temos a autolisina AtlA, altamente homóloga a AtlE, presente em *S. epidermidis* (Fey e Olson, 2010; Arciola et al., 2012).

A atividade antibiofilme da lectina BjcUL já havia sido demonstrada anteriormente (Klein et al., 2015). Neste trabalho, observou-se que essa lectina não teve ação sobre a formação inicial do biofilme, o que sugere uma ação nos estágios subsequentes de formação do biofilme. Concentrações na faixa de 0,244 a 500 µg/mL de lectinas obtidas de plantas reduziram a aderência de *Streptococcus mutans* a superfícies cobertas com saliva. Altas concentrações de lectinas (500 µg/mL) com especificidade para manose e glicose inibiram em 60 % a aderência inicial de *Streptococcus mutans*. Essa redução pode ser explicada pela interação da lectina com as glicoproteínas presentes na superfície da bactéria impedindo a adesão (Islam et al., 2009).

Um problema recorrente em hospitais são as infecções associadas à catéter, causadas pela capacidade que diferentes micro-organismos, em especial *S. aureus* e *S. epidermidis*, têm em colonizar superfícies abióticas como dispositivos médicos (von Eiff et al., 1998). BjcUL reduziu significativamente a formação de biofilme em microplacas quando comparado ao controle. Assim, pode-se sugerir a sua utilização em revestimentos da superfície de biomateriais. Alguns trabalhos têm evidenciado a utilização de compostos antibiofilme revestindo a superfície de catéteres a fim de evitar a colonização com bactérias (Hauser et al., 2016). Em modelo murino, catéteres intravenosos revestidos com metilcelulose

(composto semelhante a glicocálix) reduziram a aderência inicial e a formação de biofilme de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (Chauhan et al., 2014). Catéteres revestidos com polímeros de sulfobetaína apresentaram uma redução de 96 % e 97 % na adesão de células bacterianas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, respectivamente. Quando esses dispositivos foram contaminados com *S. aureus* e implantados em coelhos, observou-se uma atenuação de 50 % na resposta inflamatória do hospedeiro e uma diminuição da quantidade de bactérias associadas a eles (Smith et al., 2012).

A lectina BjcUL foi capaz de desfazer em 85 % o biofilme pré-estabelecido de *S. aureus* NRS 155, porém não teve a mesma ação sobre o biofilme de *S. epidermidis*. Exopolissacarídeos isolados da bactéria marinha *Vibrio* sp. QY101 desfizeram o biofilme pré-formado de *Pseudomonas aeruginosa*, porém não tiveram efeito sobre o biofilme de *S. aureus* (Jiang et al., 2011). O ácido hialurônico reduziu em 30 % e 56 % o biofilme pré-formado de *S. aureus* quando incubado com esse composto por 6 h e 18 h, respectivamente. Entretanto foi menos ativo contra o biofilme de *Moraxella catarrhalis* e *Haemophilus influenzae* (Drago et al., 2014).

Até o momento, não foi comprovada se a utilização de um composto antibiofilme é uma estratégia eficaz a ser usada *in vivo* para o combate de infecções bacterianas. Uma vez que uma lectina com essa propriedade foi encontrada em veneno de cobra, avaliou se lectinas comerciais teriam ação similar. Isso evitaria as dificuldades associadas à coleta e purificação da BjcUL e facilitaria a prova de conceito. Apenas a lectina extraída de *Triticum vulgare* (WGA), com especificidade para N-acetil-D-glicosamina, apresentou atividade sobre a formação de biofilme de *S. aureus* e *S. epidermidis*. As outras lectinas avaliadas, *Maclura pomifera*, com especificidade para metil- α -D-manopirosídeo, N-acetil-D-galactosamina e N-acetil-D-glicosamina, e *Bandeiraea simplicifolia* BS-II, específica para glicose, manose e metil- α -D-glicopiranosídeo, não apresentaram atividade sobre o biofilme. Lectinas com alto grau de similaridade apresentaram diferentes atividades sobre o crescimento e formação de biofilme de *Streptococcus mutans*, em decorrência de pequenas diferenças no domínio de ligação aos carboidratos (Cavalcante et al., 2011). Diferentemente de BjcUL, nenhuma das lectinas

comerciais atuaram sobre o biofilme pré-formado, o que evidencia diferenças no mecanismo de ação das proteínas e a superioridade da lectina de veneno de cobra sobre as demais.

O mecanismo de ação da BjcuL sobre o biofilme ainda não foi estabelecido. Acreditava-se que sua atividade fosse devido à sua ligação aos carboidratos. Porém, o ensaio de inibição por açúcares e a atividade da lectina não dialisada sugeriram outras possibilidades, como a presença de um sítio catalítico de degradação de açúcares, à semelhança do que acontece com a ricina. Essa é uma lectina, isolada a partir de sementes da árvore de *Ricinus communis*, possui duas cadeias fusionadas, um domínio de ligação a carboidrato e um domínio catalítico com atividade de glicosidase (Teixeira et al., 2012; Lordache et al., 2015). Acredita-se que se existisse esse sítio catalítico o sobrenadante das células expostas a lectina deveria apresentar uma maior quantidade de açúcares em relação ao controle. Porém, por meio de análises por HPLC realizadas neste estudo, não foi possível identificar diferenças no perfil de carboidratos presentes no sobrenadante das células expostas ou não à lectina. Isso pode ser decorrente da coluna Aminex HPX-87H ser restrita a identificação apenas dos açúcares maltotriose, maltose, glicose e frutose. Entre os perfis cromatográficos obtidos identificou-se apenas o pico da glicose, que não apresentou diferença expressiva de concentração. Por esses resultados, sugere-se que a BjcuL não possui atividade glicosídica. Uma outra possibilidade seria a presença de um outro sítio de ligação a açúcares presentes no biofilme, como N-acetil-glicosamina.

A lectina ativou a expressão de dois genes reguladores do biofilme, *icaR* e *sarA*. Uma expressão diferencial de genes não seria esperada se a ação antibiofilme de BjcuL fosse superficial, ou seja, apenas sobre a estrutura da matriz polimérica. Isso é uma indicação que a presença da lectina está desencadeando uma resposta fisiológica da célula bacteriana. Uma maior expressão de *icaR* reprime o operon *icaADBC*, envolvido na síntese, modificação e transporte do polissacarídeo de adesão intercelular (PIA), principal polissacarídeo do biofilme de *S. aureus* (Archer et al., 2011). Como consequência, haverá uma redução na formação de biofilme, o que poderia explicar a ação antibiofilme da lectina. Entretanto, a expressão de

sarA está relacionada a um aumento na formação de biofilme (Cue et al., 2012), o que contraria os resultados obtidos. Outro estudo demonstrou que SarA pode regular positivamente ambos *icaADBC* e *icaR*, podendo servir como mecanismo para prevenir a superexpressão do polissacarídeo (Cerca et al., 2008). Devido a essa alteração na expressão dos genes reguladores do biofilme pela lectina poderíamos supor que essa proteína esteja desencadeando um sinal que propicia a diminuição dos polissacarídeos de adesão intercelular (PIA), e conseqüentemente a redução do biofilme. Sabe-se que a expressão do operon *ica* sofre influência de vários fatores ambientais tais como glicose, glicosamina, ácido oléico, anaerobiose e limitação de ferro (Yu et al., 2012).

A limitada difusão de antibióticos pela estrutura do biofilme é um dos fatores responsáveis pela resistência a antimicrobianos (Hall-Stoodley e Stoodley, 2009) e por isso a combinação de lectina e antimicrobianos foi testada neste trabalho. A combinação lectina-antibióticos proporcionou uma maior redução do biofilme pré-formado quando comparada a células expostas somente a antibióticos. A ação desses mesmos antibióticos foi analisada sobre as células dispersadas pela lectina, ou seja, células do sobrenadante do biofilme. Não houve diferença entre o tratamento (lectina) e controle (sem lectina), o que leva a supor que não há liberação de células do biofilme para o sobrenadante.

Alguns estudos têm demonstrado a ação sinérgica de compostos antibiofilme e antibióticos. Os antibióticos ceftazidima, ciprofloxacina, imipeneno e tobramicina utilizados em conjunto com o peptídeo 1018 reduziu de 2 a 64 vezes a concentração de antibiótico necessária para tratar biofilmes formados por *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica* e *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (Reffuveille et al., 2014). Acildepsipeptídeo (ADEP4) em combinação com a rifampicina reduziu completamente as células do biofilme de *S. aureus* causador de osteomielite (Conlon et al., 2013). A proteinase K aumentou a eficácia de antibióticos tais como gentamicina, estreptomicina e ampicilina sobre as células do biofilme de *S. aureus* (Shukla e Rao, 2013). A combinação dessa enzima com os antibióticos gentamicina e estreptomicina reduz em 3 log o número de

células viáveis e em 1,3 log quando em combinação com a ampicilina. Embora, os resultados com todos esses compostos antibiofilme sejam promissores *in vitro*, estudos de sua eficácia *in vivo* ainda são necessários.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Archer, N.K., Mazaitis, M.J., Costerton, J.W., Leid, J.G., Powers, M.E., Shirtliff, M.E., 2011. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence* 2, 445-459.
- Arciola, C.R., Campoccia, D., Speziale, P., Montanaro, L., Costerton, J.W., 2012. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials* 33, 5967-5982.
- Boles, B.R., Horswill, A.R., 2011. Staphylococcal biofilm disassembly. *Trends Microbiol.* 19, 449-455.
- Cavalcante, T.T.A., Carneiro, V.A., Neves, C.C., Duarte, H.S., Martins, Q.M.G., Arruda, F.V.S., de Vasconcelos, M.A., dos Santos, H.S., Cunha, R.M.S., Cavada, B.S., Teixeira, E.H., 2013. A ConA-like lectin isolated from *Canavalia maritima* seeds alters the expression of genes related to virulence and biofilm formation in *Streptococcus mutans*. *Adv. Biosci. Biotechnol.* 4, 1073-1078.
- Cavalcante, T.T.A., da Rocha, B.A.M., Carneiro, V.A., Arruda, F.V.S., Nascimento, A.S.F., Sá, N.C., do Nascimento, K.S., Cavada, B.S., Teixeira, E.H., 2011. Effect of lectins from *Diocleinae subtribe* against oral *Streptococci*. *Molecules* 16, 3530-3543.
- Cerca, N., Brooks, J.L., Jefferson, K.K., 2008. Regulation of the intercellular adhesin locus regulator (*icaR*) by SarA, σ B, and IcaR in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 190, 6530-6533.
- Chauhan, A., Bernardin, A., Mussard, W., Kriegel, I., Estève, M., Ghigo, J.M., Beloin, C., Semetey, V., 2014. Preventing biofilm formation and associated occlusion by biomimetic glycocalyxlike polymer in central venous catheters. *J. Infect. Dis.* 210, 1347-1356.
- Chung, P.Y., Toh, Y.S., 2014. Anti-biofilm agents: recent breakthrough against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. *Pathog. Dis.* 70, 231-239.
- Clatworthy, A.E., Pierson, E., Hung, D.T., 2007. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nat. Chem. Biol.* 3, 541-548.

- Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standards. CLSI Doc. M07-A9. Wayne, PA, 9ed. 2012.
- Conlon, B.P., Nakayasu, E.S., Fleck, L.E., LaFleur, M.D., Isabella, V.M., Coleman, K., Leonard, S.N., Smith, R.D., Adkins, J.N., 2013. Activated ClpP kills persisters and eradicates a chronic biofilm infection. *Nature* 503, 365-370.
- Cue, D., Lei, M.G., Lee, C.Y., 2012. Genetic regulation of the intercellular adhesion locus in staphylococci. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2, 1-13.
- Defoirdt, T., 2016. Specific antivirulence activity, a new concept for reliable screening of virulence inhibitors. *Trends Biotechnol.* 34, 527-529.
- Dias, R.D.O., Machado, L.D.S., Migliolo, L., Franco, O.L., 2015. Insights into animal and plant lectins with antimicrobial activities. *Molecules* 20, 519-541.
- Drago, L., Cappelletti, L., de Vecchi, E., Pignataro, L., Torretta, S., Mattina, R., 2014. Antiadhesive and antibiofilm activity of hyaluronic acid against bacteria responsible for respiratory tract infections. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 122, 1013-1019.
- Fey, P.D., Olson, M.E., 2010. Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Future Microbiol.* 5, 917-933.
- Gill, E.E., Franco, O.L., Hancock, R., 2015. Antibiotic adjuvants: diverse strategies for controlling drug-resistant pathogens. *Chem. Biol. Drug Des.* 85, 56-78.
- Hall-Stoodley, L., Stoodley, P., 2009. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell. Microbiol.* 11, 1034-1043.
- Hauser, A.R., Meccas, J., Moir, D.T., 2016. Beyond antibiotics: new therapeutic approaches for bacterial infections. *Clin. Infect. Dis.* 63, 89-95.
- Hung, D.T., Shakhnovich, E.A., Pierson, E., Mekalanos, J.J., 2005. Small-molecule inhibitor of *Vibrio cholerae* virulence and intestinal colonization. *Science* 310, 670-674.
- Iordache, F., Ionita, M., Mitrea, L.I., Fafaneata, C., Pop, A., 2015. Antimicrobial and antiparasitic activity of lectins. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 16, 152-161.

- Islam, B., Khan, S.N., Naeem, A., Sharma, V., Khan, A.U., 2009. Novel effect of plant lectins on the inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation on saliva-coated surface. *J. Applied Microbiol.* 106, 1682-1689.
- Jiang, P., Li, J., Han, F., Duan, G., Lu, X., Gu, Y., Yu, W., 2011. Antibiofilm activity of an exopolysaccharide from marine bacterium *Vibrio* sp. QY101. *PLoS ONE* 6, e18514.
- Klein, R.C., Fabres-Klein, M.H., de Oliveira, L.L., Feio, R.N., Malouin, F., Ribon, A.O.B., 2015. A C-type lectin from *Bothrops jararacussu* venom disrupts staphylococcal biofilms. *PloS One* 10, e0120514.
- Korem, M., Gov, Y., Rosenberg, M., 2009. Global gene expression in *Staphylococcus aureus* following exposure to alcohol. *Microb. Pathog.* 48, 74-84.
- Lee, K., Lee, J.H., Kim, S.I., Cho, M.H., Lee, J., 2014. Anti-biofilm, anti-hemolysis, and anti-virulence activities of black pepper, cananga, myrrh oils, and nerolidol against *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 9447-9457.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25, 402-408.
- López, E.L., Contrini, M.M., Glatstein, E., Ayala, S.G., Santoro, R., Allende, D., Ezcurra, G., Teplitz, E., Koyama T., Matsumoto, Y., Sato, H., Sakai, K., Hoshida, S., Komoriya, K., Morita, T., Harning, R., Brookman S., 2010. Safety and pharmacokinetics of urtoxazumab, a humanized monoclonal antibody, against Shiga-like toxin 2 in healthy adults and in pediatric patients infected with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 239-243.
- Maura, D., Ballok, A.E., Rahme, L.G., 2016. Considerations and caveats in anti-virulence drug development. *Curr. Opin. Microbiol.* 33, 41-46.
- Olson, M.E., Ceri, H., Morck, D.W., Buret, A.G., Read, R.R., 2002. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can. J. Vet. Res.* 66, 86-92.

- Otto, M., 2013. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu. Rev. Med.* 64, 175-188.
- Rasko, D.A., Sperandio, V., 2010. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 117-128.
- Reffuveille, F., de la Fuente-Núñez, C., Mansour, S., Hancock, R.E.W., 2014. A broad-spectrum antibiofilm peptide enhances antibiotic action against bacterial biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 5363-5371.
- Rouha, H., Badarau, A., Visram, Z.C., Battles, M.B., Prinz, B., Magyarics, Z., Nagy, G., Mirkina, I., Stulik, L., Zerbs, M., Jägerhofer, M., Maierhofer, B., Teubenbacher, A., Dolezilkova, I., Gross, K., Banerjee, S., Zauner, G., Malafa, S., Zmajkovic, J., Maier, S., Mabry, R., Krauland, E., Wittrup, K.D., Gerngross, T.U., Nagy, E., 2015. Five birds, one stone: neutralization of α -hemolysin and 4 bi-component leukocidins of *Staphylococcus aureus* with a single human monoclonal antibody. *mAbs* 7, 243-254.
- Shukla, S.K., Rao, T.S., 2013. Dispersal of Bap-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm by proteinase K. *J. Antibiot.* 66, 55-60.
- Smith, R.S., Zhang, Z., Bouchard, M., Li, J., Lapp, H.S., Brotske, G.R., Lucchino, D.L., Weaver, D., Roth, L.A., Cury, A., Biggerstaff, J., Sukavaneshvar, S., Langer, R., Loose, C., 2012. Vascular catheters with a nonleaching poly-sulfobetaine surface modification reduce thrombus formation and microbial attachment. *Sci. Transl. Med.* 4, 153ra132-153ra132.
- Speziale, P., Geoghegan, J.A. 2015. Biofilm formation by staphylococci and streptococci: structural, functional, and regulatory aspects and implications for pathogenesis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5, 1-2.
- Ster, C., Gilbert, F.B., Cochard, T., Poutrel, B., 2005. Transcriptional profiles of regulatory and virulence factors of *Staphylococcus aureus* of bovine origin: oxygen impact and strain-to-strain variations. *Mol. Cell Probes* 19, 227-235.
- Teixeira, E.H., Arruda, F.V.S., do Nascimento, K.S., Carneiro, V.A., Nagano, C.S., da Silva, B.R., Sampaio, A.H., Cavada, B.S., 2012. Biological

applications of plants and algae lectins: An overview. INTECH Open Access Publisher.

Vale, P.F., McNally, L., Doeschl-Wilson, A., King, K.C., Popat, R., Domingo-Sananes, M.R., Allen, J.E., Soares, M.P., Kümmerli, R., 2016. Beyond killing can we find new ways to manage infection? *Evol. Med. Public Health* 148-157.

Venkatesan, N., Perumal, G., Doble, M., 2015. Bacterial resistance in biofilm-associated bacteria. *Future Microbiol.* 10, 1743-1750.

von Eiff, C., Heilmann, C., Peters, G., 1998. *Staphylococcus epidermidis*: why is it so successful? *Clin. Microbiol. Infect.* 4, 297-300.

Yu, D., Zhao, L., Xue, T., Sun, B., 2012. *Staphylococcus aureus* autoinducer-2 quorum sensing decreases biofilm formation in an *icaR*-dependent manner. *BMC Microbiol.* 12, 1-12.

CONCLUSÕES GERAIS

- Bactérias isoladas de animais com mastite persistente (*Staphylococcus aureus* 302) e não-persistente (*Staphylococcus aureus* 322) apresentaram perfis genéticos semelhantes utilizando as técnicas MLVA, PCR e PFGE;
- *S. aureus* 302 e 322 apresentaram diferenças fenotípicas, em relação a atividade hemolítica, formação de biofilme, invasão e persistência de células MAC-T e virulência *in vivo* utilizando modelo de *Galleria mellonella*;
- Análises proteômicas revelaram 35 *spots* com abundância diferencial entre as estirpes persistentes *S. aureus* 302 e 469 e as não-persistentes *S. aureus* 322 e 366, sendo três exclusivos de *S. aureus* 302. Esses *spots* podem estar relacionados à manifestação recorrente da doença;
- A lectina BjcUL (100 µg/mL) não atuou sobre a fase inicial de formação do biofilme de *Staphylococcus aureus* NRS 155, uma vez que não houve diferença na quantidade de células viáveis do biofilme exposto ou não a lectina no tempo de quatro horas;
- O pré-revestimento de poços de microplacas com a lectina BjcUL (100 µg/mL) foi capaz de reduzir em 69,8 % a formação do biofilme de *S. aureus* NRS 155, além de atuar na redução do biofilme pré-estabelecido, sugerindo que essa proteína pode ser utilizada no revestimento de superfícies de biomateriais;
- Ensaios de inibição utilizando os carboidratos manose, galactose ou glicose (100 mM) pré-incubados com a lectina (100 µg/mL) e os ensaios de biofilme com a lectina não dialisada sugerem que a ação da lectina BjcUL sobre o biofilme não está associada ao seu sítio de ligação de carboidratos;
- A exposição de células de *S. aureus* NRS 155 à lectina promoveu um aumento na expressão de duas proteínas reguladoras (IcaR e SarA) do operon *ica*, responsável pela produção do principal polissacarídeo de adesão do biofilme (PIA), o que sugere que a ação da lectina não se restringe à estrutura da matriz polimérica;
- A ação combinada lectina-antibióticos desencadeou uma redução do biofilme pré-formado quando comparada às células do biofilme expostas apenas os antibióticos gentamicina e ampicilina, sugerindo que uma ação

antibiofilme é uma estratégia promissora no combate as infecções de *S. aureus*.