

DANIELLE MENDES SILVA

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E GENÔMICA COMPARATIVA  
DE PATÓGENOS DE MASTITE BOVINA**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2016

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

T

S586i  
2016  
Silva, Danielle Mendes, 1986-  
Isolamento, caracterização e genômica comparativa de  
patógenos de mastite bovina / Danielle Mendes Silva. – Viçosa,  
MG, 2016.  
xiv, 89f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Andréa de Oliveira Barros Ribon.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Bovino - Doenças. 2. Mastite bovina. 3. Bactérias  
patogênicas. 4. *Streptococcus agalactiae*. 5. *Staphylococcus  
aureus*. 6. Genômica. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de  
Pós-graduação em Bioquímica Aplicada. II. Título.

CDD 22. ed. 636.2089819

DANIELLE MENDES SILVA

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E GENÔMICA COMPARATIVA  
DE PATÓGENOS DE MASTITE BOVINA**

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

APROVADA: 29 de fevereiro de 2016.

---

Cynthia Cãnedo Silva

---

Humberto Josué de Oliveira Ramos

---

Luciano Gomes Fietto

---

Daniela Arruda Costa

---

Andréa de Oliveira Barros Ribon  
(Orientadora)

Aos meu amados pais, Diomedes e Maria Izabel

Ao amado Igor

Dedico

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida;

à Universidade Federal de Viçosa e ao departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, todos os seus funcionários e professores;

à Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais pela bolsa concedida;

à professora e orientadora Andréa de Oliveira Barros Ribon pelos 10 anos orientação, convívio e ensinamentos, por partilhar comigo seus conhecimentos, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho;

ao Programa de Desenvolvimento da Pecuária Leiteira (PDPL), seus veterinários e estudantes, por fornecerem as amostras de leite;

ao Núcleo de Biomoléculas (NuBioMol), da Universidade Federal de Viçosa, pelo suporte no sequenciamento e análises dos genomas;

ao bioinformata Pedro Marcus Pereira Vidigal, por todas as valiosas instruções nas análises *in silico*;

ao pesquisador Guilherme Nunes de Souza, da Embrapa Gado de Leite, por toda contribuição desde o projeto, nas análises estatísticas e pelas sugestões;

à professora Denise Mara Soares Bazzoli e à Monalessa Pereira, do Departamento de Microbiologia, por cederem as larvas de *Galleria mellonella*

ao professor Gustavo Ferreira Martins e a Nadja Marriel, do Departamento de Biologia Geral, pela recepção no seu laboratório, por todas informações e auxílio nas análises histopatológicas;

à professora Maria Aparecida Scatamburlo Moreira, do Departamento de Veterinária, e à Mary Hellen Fabres-Klein que tornaram possível a realização dos experimentos com MAC-T;

à professora Sabrina Azevedo e ao seu aluno de IC Samuel, do Departamento de Informática por seu tempo e conhecimento, nas análises estruturais;

aos professores Cynthia Cânedo, Luciano Fietto, Humberto Ramos e a doutora Daniela Arruda pelas sugestões e participação na banca examinadora;

aos meus pais Diomedes e Maria Izabel pelo amor incondicional, pela presença constante apesar da distância, por todo apoio, força e orações;

ao Igor Henrique por todo amor e companheirismo;

aos colegas do LBM Ananda, Ana Maria, Amanda, Ayla, Carlos, Daniela, Fernanda, Géssica, Gilza, Mary Hellen, Lílian, Lucas, Mônica, Patrícia F., Raphael, Murilo, Silvana, Valquíria, Vanessa e Wesley pela convivência, por tornarem a rotina de trabalho algo tão prazeroso. Em especial, àqueles que se tornaram amigos na vida, quero tê-los para sempre por perto.

ao Eduardo Pereira Monteiro, secretário do Programa de Pós-graduação em Bioquímica Aplicada pela competência indiscutível e pela amizade;

ao Ciro e Roberta, meus irmãos de alma, pela amizade sincera ao longo de todos esses anos, e por tornarem Viçosa um Lar;

aos meus familiares pela torcida, especialmente minhas avós Ana, Rita e Tereza pelas orações.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS E TABELAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	ix
<b>RESUMO</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xiii
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	9
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	15
RESUMO .....	17
INTRODUÇÃO .....	18
METODOLOGIA .....	20
Coleta de amostras de leite de vacas individuais .....	20
Isolamento e identificação dos micro-organismos .....	20
Tipagem molecular .....	21
Produção de biofilme .....	22
Infecção de larvas de <i>Galleria mellonella</i> .....	22
Histopatologia de <i>G. mellonella</i> infectada com <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	23
Ensaio MAC-T .....	24
Análises estatísticas .....	25
<b>RESULTADOS</b> .....	25
Frequência de <i>Streptococcus agalactiae</i> em vacas com mastite subclínica .....	25
Diversidade genética de <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	27
Dinâmica das infecções causadas por <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	28
Caracterização fenotípica dos isolados bacterianos .....	30
Os isolados bovinos apresentam diferentes graus de virulência <i>in vivo</i> .....	31
Resposta de <i>G. mellonella</i> à infecção com os isolados bovinos .....	32
<b>DISCUSSÃO</b> .....	33
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	36
<b>ANEXO</b> .....	44
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	47
RESUMO .....	48
INTRODUÇÃO .....	49
METODOLOGIA .....	51
Seleção dos isolados e extração do DNA .....	51

Sequenciamento e montagem do genoma e predição de genes.....	51
Categorização funcional e análises comparativas .....	51
Avaliação dos SNPs e relações filogenéticas entre os isolados .....	52
Análise de SNPs não sinônimos em <i>agrC</i> .....	52
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>53</b>
Sequenciamento e montagem dos genomas .....	53
Categorização funcional e análises comparativas .....	54
Avaliação dos SNPs e relações filogenéticas .....	57
Análise de SNPs não sinônimos em <i>agrC</i> .....	64
<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>68</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>73</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>80</b>
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>83</b>
<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b> .....	<b>88</b>

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

### Capítulo 1

<b>Figura 1.</b> Frequência de <i>Streptococcus agalactiae</i> no rebanho analisado.....	27
<b>Figura 2.</b> Perfis MLVA de <i>Streptococcus agalactiae</i> observados ao longo dos meses de coleta.....	29
<b>Figura 3.</b> Produção de biofilme por <i>Streptococcus agalactiae</i> isolados de mastite bovina subclínica. ....	31
<b>Figura 4.</b> Isolados de <i>Streptococcus agalactiae</i> apresentam diferentes graus de virulência em <i>Galleria mellonella</i> .....	33
<b>Figura A1.</b> Resposta imune de <i>Galleria mellonella</i> infectada com <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	45
<b>Figura A2.</b> <i>Streptococcus agalactiae</i> T1 e T3 não se multiplicam dentro das larvas de <i>Galleria mellonella</i> .....	46
<b>Tabela 1.</b> Oligonucleotídeos iniciadores usados neste estudo.....	22
<b>Tabela 2.</b> Isolamento e identificação dos patógenos isolados de amostras de leite de animais com mastite subclínica. ....	26
<b>Tabela 3.</b> Distribuição de frequência (n) do tipo de <i>Streptococcus agalactiae</i> e a dinâmica da infecção. ....	30

### Capítulo 2

<b>Figura 1.</b> Montagem dos genomas de <i>Staphylococcus aureus</i> sequenciados.....	54
<b>Figura 2.</b> Categorização funcional das CDSs dos genomas de <i>Staphylococcus aureus</i> sequenciados pelo banco de dados SEED. ....	56
<b>Figura 3.</b> Alinhamento entre genes e proteínas dos isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> sequenciados contra referência construída com os genomas de <i>Staphylococcus aureus</i> RF122 e <i>Staphylococcus aureus</i> LGA251. ....	57
<b>Figura 4.</b> Distribuição de polimorfismos de nucleotídeo único nos genomas sequenciados de <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	58
<b>Figura 5.</b> Análise de polimorfismo de nucleotídeo único em genes de virulência de <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	59
<b>Figura 6.</b> Análise de polimorfismo de nucleotídeo único em genes de reguladores globais de <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	61
<b>Figura 7.</b> Análise de polimorfismo de nucleotídeo único em genes de metabolismo de <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	63
<b>Figura 8.</b> Relação evolutiva entre as cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> baseada nas proteínas associadas ao metabolismo, regulação e fatores de virulência. ....	64
<b>Figura 9.</b> Alinhamento das sequências gênica e proteica do regulador AgrC.....	65

<b>Figura 10.</b> Representação visual do alinhamento estrutural par a par da estrutura do domínio de ligação à ATP da proteína AgrC de <i>Staphylococcus aureus</i> (4BXI) com 82 proteínas do PDB com 40% de similaridade.....	66
<b>Figura 11.</b> Proteína 4BXI modelada como grafo.....	67
<b>Figura A1.</b> Alinhamento entre sequências de aminoácidos hipotéticas para exemplificar polimorfismos de nucleotídeo único não sinônimos. ....	81
<b>Tabela 1.</b> Número de SNPs, que resultam em troca de aminoácidos, comuns entre os isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> para os genes de fatores de virulência analisados..	60
<b>Tabela 2.</b> Número de SNPs, que resultam em troca de aminoácidos, comuns entre os isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> para os genes de reguladores analisados.....	62
<b>Tabela 3.</b> Número de SNPs, que resultam em troca de aminoácidos, comuns entre os isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> para os genes de metabolismo analisados.....	63
<b>Tabela 4.</b> Frequências e medidas de centralidade dos resíduos variantes em AgrC.....	67
<b>Tabela A1.</b> Polimorfismos de nucleotídeo único em sequências codificadoras de fatores de virulência, reguladores e proteínas metabolismo primário exclusivos de isolados persistentes ou não persistentes. ....	81
<b>Tabela A2.</b> Polimorfismos de nucleotídeo único em sequências codificadoras de fatores de virulência, reguladores e proteínas metabolismo primário comuns a todos os isolados, entre isolados persistentes ou não persistentes.....	82

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ATCC – *American Type Culture Collection*
- BHI – Infusão de cérebro e coração
- BLAST – Ferramenta de busca de alinhamento local
- CCS - Contagem de células somáticas
- CDS – Sequência de DNA codificante
- CMT – *California Mastitis Test*
- CNS - *Staphylococcus* coagulase negativo
- COG - *Cluster of Orthologous Group*
- D.O. – densidade ótica
- DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- dNTP - Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
- E. coli* – *Escherichia coli*
- Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- GBS - *Streptococcus* do grupo B
- GOLD – *Genome Online Database*
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- Kb – Kilo bases
- LBM - Laboratório de Biotecnologia Molecular
- MAC-T – Linhagem celular epitelial de glândula mamária bovina
- Mb – Mega bases
- MLST – Tipagem por sequenciamento de multilocus
- MLVA - Repetições em tandem de número variável
- MOI - Multiplicidade de infecção
- MRSA - *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente

MTT - Methylthiazolyldiphenyltetrazolium bromide

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

ORF - Janela aberta de leitura

pb – Par de bases

PBS - Tampão fosfato salino

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PDPL - Programa Desenvolvimento da Pecuária Leiteira

PFGE - Eletroforese em gel de campo pulsado

RAST - Rapid Annotation using Subsystem Technology

*S. agalactiae* – *Streptococcus agalactiae*

*S. aureus* – *Staphylococcus aureus*

SAPIs - Ilhas de patogenicidade de *Staphylococcus aureus*

SCC - Cassetes de cromossomos estafilocócicos

SFB - soro fetal bovino

SNP - polimorfismos de nucleotídeo único

ST – Tipo de sequência – *sequence type*

STCN - *Staphylococcus* coagulase-negativos

TSA – Ágar triptona de soja

UFC – Unidades formadoras de cultura

UPGMA – Agrupamento pelas médias assimétricas não ponderadas

WGS - Sequenciamento de genomas completos

## RESUMO

SILVA, Danielle Mendes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2016. **Isolamento, caracterização e genômica comparativa de patógenos de mastite bovina.** Orientadora: Andréa de Oliveira Barros Ribon.

A mastite bovina é considerada por muitos autores a principal doença do rebanho leiteiro. *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* são patógenos contagiosos comumente associados à forma subclínica e persistente da doença. A caracterização de estirpes em circulação nos rebanhos é de extrema importância na definição de estratégias de manejo para o controle da doença e de marcadores de prognóstico da mastite. No capítulo 1, 175 amostras positivas para o teste *California Mastitis* (CMT) foram coletadas de vacas holandesas e análises microbiológicas revelaram a presença de *S. agalactiae* em 34,2% das amostras. Em 36% das amostras foi observado o crescimento de bactérias pertencentes a outros grupos, em especial com *S. aureus*. A tipagem de *S. agalactiae* pela metodologia multilocus de repetições em tandem de número variável (MLVA) revelou seis genótipos (SagT1-T6), sendo SagT1 o mais prevalente no rebanho e também o mais frequentemente isolado de infecções mistas com *S. aureus*. Os isolados de *S. agalactiae* foram fortes produtores de biofilme *in vitro* e produziram hemólise do tipo beta. A análise de virulência dos isolados em larvas de *Galleria mellonella* definiu os tipos SagT3 e SagT1 como os mais e menos virulentos, respectivamente. Porém, dois isolados pertencentes a esses tipos não invadiram nem apresentaram efeito citotóxico em células epiteliais bovinas MAC-T. No capítulo 2, genomas de quatro estirpes de *S. aureus* causadoras de mastite subclínica, sendo SAU302 e SAU1364 isoladas de infecções persistentes e SAU170 e SAU1269 de infecções não persistentes, foram sequenciados. Uma grande conservação foi encontrada entre os genomas, como tamanho médio de 2,6 Mb, 32,8% de conteúdo GC e 2589 CDS. A tipagem por MLST classificou SAU170, SAU302, e SAU1364 como ST126, um tipo frequentemente encontrado em rebanhos brasileiros, e SAU1269, como ST1, associado a infecções humanas e bovinas. A comparação entre os genomas sequenciados e uma referência construída com genomas de dois isolados de mastite bovina, revelou uma identidade maior que 90% para a maioria dos genes anotados. A análise filogenética dos isolados sequenciados agrupou em ramos separados isolados de diferentes manifestações, sugerindo que algumas das particularidades compartilhadas

entre isolados podem estar relacionados à persistência das infecções causadas por eles. A análise de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) mostrou SNPs em genes relacionados à adesão das células bacterianas ao hospedeiro e na sequência de *agrC*, proteína receptora do sinal de *quorum-sensing* em *S. aureus*, alguns deles importantes para estrutura da proteína.

## ABSTRACT

SILVA, Danielle Mendes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2016. **Isolation, characterization, and comparative genomics of bovine mastitis pathogens.** Adviser: Andréa de Oliveira Barros Ribon.

Bovine mastitis is considered the main disease of the dairy herd. *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* are contagious pathogens commonly associated with subclinical and persistent form of the disease. The characterization of circulating strains in herds is of utmost importance to define management strategies to the control of the disease and to identify mastitis prognostic markers. In the first chapter, 175 milk samples positive for the California Mastitis Test (CMT) were collected from Holstein cows and microbiological analyzes revealed the presence of *S. agalactiae* in 34.2% of samples. The growth of bacteria belonging to other groups, in particular *S. aureus*, was seen in 36% of the milk samples. Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) revealed the presence of six genotypes (SagT1-T6) of *S. agalactiae* in the herd with SagT1 being the most prevalent and also the most frequently isolated from mixed infections with *S. aureus*. *S. agalactiae* isolates were beta-hemolytic and strong in vitro biofilm producers. Virulence analysis in *Galleria mellonella* larvae defined the SagT3 and SagT1 types as the most and the less virulent, respectively. However, invasion and cytotoxicity in MAC-T cells did not reveal any difference between them. In Chapter 2, the genomes of four strains of *Staphylococcus aureus* causing subclinical mastitis, SAU302 and SAU1364 isolated from persistent infections and SAU170 and SAU1269 from non-persistent infections, were sequenced. A major conservation was found among them like the average size (2.6 Mb), the GC content (32.8%), and the CDS (2589). Multilocus Sequencing typing classified SAU170, SAU302 and SAU1364 as ST126, a type often found in Brazilian herds, while SAU1269 was classified as ST1, commonly associated with human and bovine infections. Comparative analyses with the genome of *S. aureus* RF122, a strain that causes severe mastitis, showed more than 90% of identity with annotated genes. Phylogenetic analysis grouped the sequenced genomes into separate branches suggesting that some of the characteristics shared between the isolates can be related to the persistence of infections. Single nucleotide polymorphisms (SNP) were found in genes related to bacterial adhesion and in *agrC* that codes for a

receptor protein involved in quorum-sensing signaling in *S. aureus*, some of them important for protein structure.

## INTRODUÇÃO GERAL

A incontestável importância da atividade leiteira no País justifica-se pelas divisas geradas e pelo número de empregos permanentes gerados. Segundo o IBGE/Censo Agropecuário (2011), estima-se que cerca de 1,35 milhões de propriedades rurais estejam envolvidas na produção leiteira (Plano mais pecuária, 2014). Em 2015, o valor bruto da produção de leite foi estimado em, aproximadamente, 40 bilhões de reais obtidos da comercialização de 36 bilhões de litros, um aumento de quase 3% em relação às estimativas de 2014 (Sociedade Nacional da Agricultura). As estatísticas oficiais mostram que no Brasil, 8,5% dos estabelecimentos, o que equivale a aproximadamente 115.000 produtores, são responsáveis por 53,1% do leite produzido. Isso significa que a grande maioria dos produtores de leite responde apenas por 46,9% do leite brasileiro (IBGE, 2011).

Apesar da produção de leite do país ser alta (32,3 bilhões de litros/ano), a produtividade do rebanho nacional é baixa (Plano mais pecuária, 2014). Um dos fatores que contribuem para isso são as doenças do rebanho, como a mastite bovina, caracterizada pela inflamação da glândula mamária que promove redução nos componentes do leite, bem como modificações patológicas no tecido glandular (Burton e Erskine, 2003). A mastite constitui uma fonte importante de perdas econômicas para o agronegócio não somente pelo impacto negativo sobre a produtividade e qualidade do leite, mas também pelos custos dos tratamentos e dos serviços veterinários envolvidos em programas de controle (Duarte, 2004). O prejuízo devido à mastite bovina é de, aproximadamente, US\$ 35 bilhões em todo o mundo (Ruegg, 2005). Nos Estados Unidos, os custos anuais chegam a US\$ 2 bilhões (Rainard, 2005). Estima-se que o prejuízo brasileiro seja ainda maior que o alcançado nos EUA e na União Européia (Costa, 2009), onde a redução na produção pode chegar a 15%, equivalendo a uma perda de 2,4 bilhões de litros de leite/ano (Dias, 2007).

A mastite é classificada, quanto à forma de apresentação, em clínica ou subclínica. A forma clínica é diagnosticada pelos sinais evidentes de inflamação, como edema, aumento de temperatura, endurecimento e dor na glândula mamária, e/ou aparecimento de grumos, pus ou qualquer alteração das características visíveis do leite (Bradley, 2002). As mastites clínicas podem apresentar as formas catarral, apostematosa e flegmonosa. As catarrais são infecções mais leves, que não atingem as estruturas

secretoras e se caracterizam pela presença de pequenos grumos no leite. A apostematosa é um processo inflamatório mais grave do que a catarral, porque todas as estruturas glandulares são afetadas pela infecção (Oliveira, 2006). A forma flegmonosa é considerada a mais grave de todas as formas de mastite, porque em algumas situações pode evoluir para gangrena e o animal pode ter seu estado geral comprometido. Na forma subclínica não ocorrem mudanças visíveis no aspecto do leite ou do úbere, mas sim uma de infecção silenciosa caracterizada principalmente por mudanças na composição do leite que podem ser detectadas, dentre outras metodologias, pelo *California Mastitis Test* (CMT). A ausência de sintomas relaciona-se diretamente com a alta prevalência dessa doença nos rebanhos leiteiros (Whelehan *et al.*, 2011; Awale *et al.*, 2012).

As mastites podem ser de natureza infecciosa (provocada por micro-organismos) ou não infecciosa (provocada por agentes físicos, produtos químicos, etc.). As mastites de natureza infecciosa são as mais problemáticas para a produtividade do rebanho, principalmente em razão de serem transmissíveis (Oliveira, 2006). Os micro-organismos mais associados às infecções são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* coagulase negativo (CNS) e outras espécies de *Streptococcus* (Holtenius *et al.*, 2004).

A ocorrência da mastite é influenciada por uma variedade de fatores não inter-relacionados, tais como a conformação do úbere, o estado imunitário dos animais, as condições dos esfíncteres das tetas, as condições gerais de higiene, os procedimentos de ordenha, as condições de manutenção da ordenhadeira mecânica, entre outros. As tetas constituem a primeira barreira contra a invasão bacteriana e muitas de suas características anatômicas e fisiológicas são responsáveis pela inibição da penetração de micro-organismos (Oliveira, 2006). Normalmente, o canal do teto é bem fechado por um esfíncter formado por músculos em sua extremidade, que impedem a entrada das bactérias. No entanto, após o parto, o acúmulo de líquido dentro da glândula resulta em um aumento de pressão intramamária, promovendo dilatação do canal do teto. Também durante a ordenha, a camada de queratina que recobre o teto é removida e há distensão do esfíncter que leva cerca de 2 horas para retornar a posição contraída, aspectos que tornam o animal mais susceptível à invasão de micro-organismos (Viguiet *et al.*, 2009). Uma vez dentro da glândula, estes organismos encontram condições ideais para se

multiplicar e, causar danos ao revestimento dos tecidos da glândula mamária. Como resultado, a resposta imune da vaca é disparada, e glóbulos brancos migram para o úbere com o objetivo de combater a infecção, o que resulta no aumento da contagem de células somáticas (CCS) no leite.

Os micro-organismos responsáveis pela mastite podem ser classificados em dois grupos: contagiosos e ambientais (Nickerson, 2011). Bactérias ambientais, como o nome indica, estão presentes no ambiente de criação da vaca (cama, solo, estrume, etc.), e por serem endêmicas onde os animais vivem, é impossível eliminá-las completamente. O controle das infecções depende, portanto, de medidas de higiene durante o manejo do rebanho. As bactérias ambientais mais comuns são coliformes (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, e *Enterobacter*), cujas origens principais são o estrume e o solo, e os *Streptococcus* ambientais (*Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae*), que podem ser provenientes tanto do ambiente, quanto de tetos infectados. O fato de este último grupo também estar presente no úbere permite classificá-lo também como contagioso (Garcia, 2004).

Os patógenos contagiosos de mastite mais importantes são *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*. Os principais reservatórios dos micro-organismos contagiosos são as glândulas mamárias de animais infectados e a transmissão para quartos e animais sadios ocorre, principalmente, durante a ordenha. O fato de esses agentes patogênicos estarem adaptados para sobreviver e se multiplicar dentro do úbere permite o estabelecimento de infecções subclínicas de longa duração, chamadas de infecções crônicas (Nickerson, 2011). Os três princípios básicos para o controle da mastite contagiosa, causada dentre outros micro-organismos por *S. agalactiae*, baseiam-se na diminuição da exposição dos tetos aos patógenos, com medidas de higiene antes e após a ordenha, no aumento da resistência imunológica da vaca, com a nutrição adequada do animal e antibioticoterapia (Coser *et al.*, 2012).

*Streptococcus* do grupo B (GBS), também conhecidos como *S. agalactiae* segundo a classificação de Lancefield (1933), foram descritos pela primeira vez como patógenos de mastite em 1887 (Corrêa *et al.*, 2010) e foi considerado o principal agente causador de mastite na era pré-antibiótica. É um patógeno obrigatório da glândula mamária e, geralmente, não sobrevive por longos períodos em ambiente extracelular (Keefe *et al.*, 1997). Embora o único reservatório importante de *S. agalactiae* em uma fazenda sejam os quartos mamários infectados, essa bactéria pode ser encontrada em

superfícies que tiveram contato recente com o leite contaminado, incluindo o equipamento de ordenha e as mãos dos ordenhadores (Nickerson, 2011).

A mastite causada por *S. agalactiae* pode se manifestar nas formas clínica ou subclínica e sua lenta progressão pode levar à fibrose e atrofia do quarto mamário afetado (Awale *et al.*, 2012). O micro-organismo persiste nas cisternas do teto e da glândula mamária, com ondas periódicas de multiplicação, aumento de virulência e invasão tecidual. A resposta inicial à invasão de estreptococos é a formação de edema intersticial e o influxo de neutrófilos para interstício dos alvéolos (Perez Neto e Zappa, 2011). O aspecto macroscópico do quarto depende do estágio da doença. No estágio agudo, alguma hiperemia da mucosa dos tetos pode ser vista. A qualidade do leite é alterada, e filamentos e flocos de exsudato são observados o deixando com aspecto de coalhada, ou mesmo, o leite é transformado em pus (Perez Neto e Zappa, 2011). Em estágios tardios da infecção, os ácinos (unidade funcional da glândula) são cobertos por tecido cicatricial que conectam o sistema ducto-glandular resultando em uma infecção latente e crônica que diminui a produção de leite e aumenta a contagem de células somáticas do quarto mamário (Awale *et al.*, 2012).

Infecções por *S. agalactiae* podem ser tratadas com sucesso por antibióticos durante a lactação (Awale *et al.*, 2012). Cerca de 80-90% das vacas infectadas com *S. agalactiae* são, na maioria das vezes, curadas por tratamento intramamário com drogas do tipo penicilina (Ruegg, 2003). Para erradicação do patógeno, todos os quartos de todas as vacas com culturas *S. agalactiae* positivas devem ser tratados com um antibiótico intramamário apropriado (Erskine, 2001).

*Staphylococcus aureus* é outro importante patógeno contagioso, está distribuído em rebanhos do mundo inteiro e causa infecções que variam de aguda a gangrenosa (Bradley, 2002; Nickerson, 2011). Porém, é associado com mais frequência a infecções subclínicas que podem evoluir para manifestações crônicas, difíceis de serem detectadas e curadas (Barkema *et al.*, 2009). Após invasão do teto, *S. aureus* adere ao tecido da glândula utilizando uma série de proteínas componentes da superfície microbiana. Adesinas são fundamentais na disseminação de *S. aureus* dentro e entre rebanhos, mas são apenas alguns dos vários fatores de virulência envolvidos na patogênese bacteriana. (Zecconi, 2010). *S. aureus* produz também uma variedade de exoproteínas que contribuem para a sua capacidade de colonizar e causar a doença como hemolisinas, nucleases, proteases, lipases, hialuronidase e colagenase. A função principal dessas

proteínas pode ser a de converter os tecidos do hospedeiro em nutrientes necessários para o crescimento bacteriano (Zhao e Lacasse, 2008).

O conhecimento epidemiológico dos isolados presentes nos rebanhos contribui para a elucidação da origem da infecção e das vias de disseminação do patógeno e para o desenvolvimento de estratégias preventivas e novas medidas de tratamento que permitam o controle da doença (Merl *et al.*, 2003). Tradicionalmente, a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) é considerada o padrão ouro para tipagem bacteriana, mas outras técnicas têm sido usadas graças ao seu bom poder discriminatório, como a tipagem por sequenciamento de multilocus (MLST) e análise de multilocus variáveis (MLVA) (Tenover *et al.*, 1994; Radtke *et al.*, 2010; Haguenoer *et al.*, 2011; Chua *et al.*, 2014). Pela tipagem por MLVA foi possível mostrar que grupos de *S. agalactiae* distintos são reponsáveis por infecções humanas e animais, além da grande heterogeneidade genética entre as estirpes isoladas em bovinos (Haguenoer *et al.*, 2011). No caso de *S. aureus*, sabe-se que uma variedade de estirpes é causadora de infecções embora existam genótipos restritos a determinados hospedeiros, como os clones CC97 e CC151, que estão globalmente distribuídos e comumente estão associados à mastite em ruminantes (Smith *et al.*, 2005; Smyth *et al.*, 2009; Sakwinska *et al.*, 2011).

Por *S. aureus* ser considerado um importante patógeno humano associado a diferentes enfermidades e um dos principais causadores de infecções hospitalares, esforços vêm sendo feitos para compreender os mecanismos moleculares da patogênese de *S. aureus* (Ben Zakour *et al.*, 2008; Zadoks *et al.*, 2011). Nos últimos anos, vem se intensificando os estudos de genômica e proteômica com isolados bovinos que visam elucidar a plasticidade genômica e os mecanismos que permitiram a adaptação patógeno-hospedeiro. Atenção especial tem sido dada à virulência numa tentativa de explorar e associar diferenças entre estirpes que causem as diversas manifestações clínicas observadas na mastite bovina (Guinane *et al.*, 2010). Essas informações são de destacada importância, pois podem ser usadas para definir marcadores que identifiquem estirpes de relevância epidemiológica.

Até fevereiro de 2016, mais de 47.000 projetos de sequenciamento de genomas bacterianos foram iniciados, e aproximadamente 28.000 foram concluídos (GOLD – Genome Online Database <http://www.genomesonline.org>; Punina *et al.*, 2015). No banco de dados do NCBI, no mesmo período, foram encontrados 5578 genomas de *S. aureus* montados, dos quais 91 estavam completos e anotados. Porém, apenas dois, *S.*

*aureus* RF122 (Herron-Olson *et al.*, 2007) e *S. aureus* LGA251 (García-Alvarez *et al.*, 2011), eram isolados de origem bovina. Em 2012, Bouchard *et al.* anunciaram o sequenciamento da estirpe bovina de *S. aureus* Newbould 305, isolada na década de 1950, em um caso de mastite clínica, e capaz de induzir mastite crônica com sintomas leves em modelos experimentais. Recentemente, foram anunciados os dois primeiros genomas isolados de *S. aureus* associados à mastite subclínica (Kant *et al.*, 2015), mas nenhuma análise comparativa foi apresentada que permitisse entender a manifestação clínica apresentada pelo animal.

A maioria dos isolados *S. aureus* pode ser agrupado num número limitado de complexos clonais principais que possuem um genoma central altamente conservado (Xia e Wolz, 2014). Os genomas de *S. aureus* tem tamanho aproximado de 2,8 Mpb, com 33% de conteúdo CG e arquitetura cromossômica muito semelhante, mostrando sintenia entre eles (Baba *et al.*, 2008; Chua *et al.*, 2013). Lindsay e Holden discutiram pela primeira vez o conceito de genoma central (*core genome*) em *S. aureus*, uma porção que representa aproximadamente 75% do total e está presente em todas as estirpes de *S. aureus*. Seu tamanho é de aproximadamente 2,3 Mbp e contém genes constitutivos necessários para o crescimento e a sobrevivência da bactéria (Lindsay e Holden, 2004; Chua *et al.*, 2013). O genoma central possui também genes de virulência, incluindo o da coagulase, que diferencia *S. aureus* de estafilococos coagulase-negativos, genes de hemolisinas, da superóxido dismutase, da proteína de ligação fibrinogênio e uma série de outros fatores que contribuem para a patogênese bacteriana (Mc Gavin, 2006). O *core genome* não é totalmente estável como o termo sugere, pois algumas regiões são variáveis entre estirpes, sendo caracterizado por um grande número de proteínas de superfície espécie-específicas e proteínas reguladoras de virulência, envolvidas em processos de colonização e infecção de hospedeiros particulares (Lindsay *et al.*, 2006; Ben Zakour *et al.*, 2008).

Acredita-se que os atuais clones específicos de bovinos divergiram de um ancestral comum que se assemelha a clones de *S. aureus* associados a humanos por meio de uma combinação de perda de genes e aquisição DNA (Herron-Olson *et al.*, 2007; Ben Zakour *et al.*, 2008). A análise da sequência do genoma da estirpe bovina RF122 resultou em uma série em pistas de como essa estirpe se adaptou ao hospedeiro. Diversos genes de função desconhecida, ausentes em isolados humanos, foram descobertos, sugerindo um possível papel específico na patogênese de bovinos. Além

disso, foram observadas variações alélicas em genes codificadores de proteínas envolvidas na colonização, na produção de toxinas, no metabolismo do ferro, na resistência aos antibióticos e na regulação. Sequências codificadoras de fatores de virulência bem conhecidos como *spa*, *clfA*, *sdrC* e *ebh*, contem *stop codons* prematuros e são pseudogenes em RF122, sugerindo a redundância dessas proteínas para a sobrevivência do patógeno em vacas (Herron-Olson *et al.*, 2007).

Como observado em outros genomas, a maioria dos genes exclusivos de RF122 são codificados por elementos genéticos móveis (Herron-Olson *et al.*, 2007). Esses elementos (sequências de inserção, plasmídeos, bacteriófagos, transposons integrados e ilhas de genômicas ou de patogenicidade) compõem os outros 25% do genoma e representam o genoma acessório, que é frequentemente trocado dentro e entre linhagens, contribuindo para a patogênese ou a adaptação num ambiente particular (Lindsay *et al.*, 2006; Chua *et al.*, 2013). O genoma acessório, tipicamente, tem um teor de CG diferente do *core genome*, porque muitas vezes são provenientes de outras espécies de bactérias (Malachowa e DeLeo, 2010).

Os bacteriófagos (fagos) ou vírus bacterianos parecem ter o maior impacto sobre a diversidade de estafilococos e evolução. Estão distribuídos em, praticamente, todas as estirpes de *S. aureus*, em número variável de um até quatro, e podem codificar toxinas conhecidas, como a enterotoxina A, leucocidinas Pantón-Valentine, proteína inibitória do complemento, proteína inibidora de quimiotaxia e estafiloquinase (Malachowa e DeLeo, 2010; Lindsay, 2010). Os fagos contribuem para o conteúdo genético único de *S. aureus* RF122.  $\phi$ SaBov codifica 8 genes únicos, e assemelha-se aos fagos  $\phi$ 11 /  $\phi$ ETA e  $\phi$ Mu50 $\beta$  transportados por *S. aureus* MU50, apesar de locais de integração diferente. Outro fago, presente em isolados bovinos é  $\phi$ 12Bov, que assemelha-se ao bem caracterizado SA  $\phi$ 12, porém codifica vários genes únicos e genes com homólogos em outros organismos Gram-positivos (Herron-Olson *et al.*, 2007).

Ilhas de patogenicidade (SAPIs) são relacionadas com bacteriófagos, porém não possuem os genes necessários para a construção do capsídeo, e por isso contam com fagos auxiliares que lhes permite transferir horizontalmente (Lindsay, 2010). Estudos recentes revelaram que SAPIs são inseridos em locais cromossômicos específicos, possuem sequências de 14-17kb e codificam genes de integrase e virulência incluindo superantígenos, toxinas esfoliativa, genes transportadores de ferro e responsáveis pela resistência a drogas e adaptação ao hospedeiro (Sato'o *et al.*, 2013). São conhecidas 16

ilhas de patogenicidade caracterizadas em genomas de *S. aureus* sendo que SaPIbov1, SaPIbov2 e SaPIbov3 foram identificadas inicialmente em genomas de isolados bovinos (Novick *et al.*, 2010).

Cassetes de cromossomos estafilocócicos (SCCs) são grandes pedaços de DNA que estão inseridos no gene *orfX* em *S. aureus*. Tendo em vista que muitos SCCs codificam o gene de resistência à meticilina (*mecA*), SCCs podem ser classificados em SCCmec ou não-SCCmec. Estirpes *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) podem carregar SCCmec II, III, IV, V, VI, VII e VIII ou elementos que podem codificar determinantes de resistência, além de *mecA*. Estes determinantes de resistência adicionais são frequentemente codificados por plasmídeos, transposons, sequências de inserção incorporadas nas regiões de SCCmec (Malachowa e DeLeo, 2010). Transposons e sequências de inserção podem integrar-se em qualquer região do genoma e acredita-se que contribuam amplamente para a adaptação de *S. aureus* a ambientes adversos (Shittu *et al.*, 2007).

Os dados obtidos por sequenciamentos de nova geração podem ser mapeados em um genoma referência para identificar polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs). Os SNPs são a base para diferenciar indivíduos em um conjunto de organismos que possuem sequências quase idênticas (Faison *et al.*, 2014). A identificação dessas mutações é um método comparativo importante para genômica bacteriana pois elas permitem a identificação de estirpes causadoras de surtos, estudos de filogeografia e auxiliam na compreensão da patogênese, permitindo o desenvolvimento de tratamento personalizados e mais eficientes (Faison *et al.*, 2014; Olson *et al.*, 2015). Em *S. aureus*, foram identificados SNPs no promotor do gene *hla* que foram associados à hiperprodução da toxina alfa (Liang *et al.*, 2011). Essas variações permitiram genotipar isolados bovinos, identificando bactérias mais prováveis de causarem mastite severa (Hall e Ji, 2012).

Neste trabalho objetivou-se isolar e caracterizar molecularmente estirpes de *S. agalactiae*, causadoras de mastite bovina, circulantes em um rebanho da região de Viçosa-MG e realizar estudos de genômica comparativa entre estirpes de *S. aureus* isoladas de infecções subclínicas de mastite.

## BIBLIOGRAFIA

- Awale MM, Dudhatra GB, Kumar A, Chauhan BN, Kamani DR. 2012. Bovine Mastitis: A threat to economy. Open Access Scientific Reports, 1:1-10.
- Baba T, Bae T, Schneewind O, Takeuchi F, Hiramatsu K. 2008. Genome sequence of *Staphylococcus aureus* strain Newman and comparative analysis of staphylococcal genomes: polymorphism and evolution of two major pathogenicity islands. Journal of Bacteriology, 190:300-310.
- Barkema HW, Green MJ, Bradley AJ, Zadoks RN. 2009. Invited review: The role of contagious disease in udder health. Journal of Dairy Science, 92:4717-4729.
- Ben Zakour NL, Guinane CM, Fitzgerald JR. 2008. Pathogenomics of the staphylococci: insights into niche adaptation and the emergence of new virulent strains. FEMS Microbiology Letters, 289:1–12.
- Bradley AJ. 2002. Bovine mastitis: an evolving disease. The Veterinary Journal, 164: 116-128.
- Burton JL, Erskine RJ. 2003. Immunity and mastitis: Some new ideas for an old disease. Veterinary Clinics Food Animal Practice, 19:1–45.
- Bouchard D, Peton V, Almeida S, Le Maréchal C, Miyoshi A, Azevedo V, Even S. 2012. Genome sequence of *Staphylococcus aureus* Newbould 305, a strain associated with mild bovine mastitis. Journal of Bacteriology, 194:6292-6293.
- Corrêa ABA, Américo MA, Oliveira ICM, Silva LG, de Mattos MC, Ferreira AMM, Benchetrit LC. 2010. Virulence characteristics of genetically related isolates of group B streptococci from bovines and humans. Veterinary Microbiology, 143:429-433.
- Coser SM, Lopes MA, Costa GM. 2012. Mastite Bovina: Controle e Prevenção. Boletim técnico da Universidade Federal de Lavras, Lavras, 93:1-30.
- Costa E. 2009. Mastite: os seus prejuízos em números. Revista Balde Branco. <http://www.bichoonline.com.br/artigo>.

- Chua KY, Stinear TP, Howden BP. 2013. Functional genomics of *Staphylococcus aureus*. Briefings in Functional Genomics, 12:305-315.
- Chua KY, Howden BP, Jiang JH, Stinear T, Peleg AY. 2014. Population genetics and the evolution of virulence in *Staphylococcus aureus*. Infection, Genetics and Evolution, 21:554-562.
- Dias RDC. 2007. Principais métodos de diagnóstico e controle da mastite bovina. Acta Veterinária Brasília, 1:23-27.
- Duarte RS, Miranda OP, Bellei BC, Brito MAV, Teixeira LM. 2004. Phenotypic and molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* isolates recovered from milk of dairy cows in Brazil. Journal of Clinical Microbiology, 42:4214-4222.
- Erskine RJ. 2001. Mastitis control in dairy herds. Herd Health: Food Animal Production Medicine. 3rd ed. Radostits editor. WB Saunders, Philadelphia.
- Faison WJ, Rostovtsev A, Castro-Nallar E, Crandall K A, Chumakov K, Simonyan V, Mazumder R. 2014. Whole genome single-nucleotide variation profile-based phylogenetic tree building methods for analysis of viral, bacterial and human genomes. Genomics, 104:1-7.
- Garcia A. 2004. Contagious vs. environmental mastitis. College of Agriculture & Biological Sciences, South Dakota State University. Disponível em <http://extensionespanol.net/pubs/exex4028.pdf>.
- García-Álvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, Curran MD, Parkhill J. 2011. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. The Lancet Infectious Diseases, 11:595-603.
- Guinane CM, Ben Zakour NL, Tormo-Mas MA, Weinert LA, Lowder BV, Cartwright RA, Smyth DS, Smyth CJ, Lindsay JA, Gould KA, Witney A, Hinds J, Bollback JP, Rambaut A, Penadés JR, Fitzgerald JR. 2010. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus* reveals insights into the origin and molecular basis of ruminant host adaptation. Genome Biology and Evolution, 2:454-466.

- Haguenoer E, Baty G, Pourcel C, Lartigue MF, Domelier AS, Rosenau A. 2011. A multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) scheme for *Streptococcus agalactiae* genotyping. *BMC Microbiology*, 11:171-184.
- Herron-Olson L, Fitzgerald JR, Musser JM, Kapur, V. 2007. Molecular correlates of host specialization in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*, 2:e1120.
- Holtenius K, Waller KP, Essen-Gustavsson B, Holtenius P, Sandgren CH. 2004. Metabolic parameters and blood leukocyte profiles in cows from herds with high or low mastitis incidence. *The Veterinary Journal*, 168:65-73.
- IBGE. 2011. *Tabulações especiais do censo Agropecuário 2006*. Rio de Janeiro: IBGE.
- Kant R, Taponen S, Koort J, Paulin L, Åvall-Jääskeläinen S, Palva A. 2015. Genome sequences of four *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. *Genome Announcements*, 3:e00334-15.
- Keefe, G. 1997. *Streptococcus agalactiae* mastitis: A review. *Canadian Veterinary*, 38: 429-437.
- Lindsay JA, Holden MT. 2004. *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? *Trends in Microbiology*, 12:378-385.
- Lindsay JA, Moore CE, Day NP, Peacock SJ, Witney AA, Stabler RA, Husain SE, Butcher PD, Hinds J. 2006. Microarrays reveal that each of the ten dominant lineages of *Staphylococcus aureus* has a unique combination of surface-associated and regulatory genes. *Journal of Bacteriology*, 188:669–676.
- Lindsay JA. 2010. Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 300:98-103.
- Malachowa N, DeLeo FR. 2010. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67:3057-3071.
- McGavin MJ. 2006. Genome Comparisons of Diverse *Staphylococcus aureus* Strains. In *Bacterial Genomes and Infectious Diseases* (pp. 191-212). Humana Press.

- Merl K, Abdulmawjood A, Lämmler C, Zschöck M. 2003. Determination of epidemiological relationships of *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis. FEMS Microbiology Letters, 226:87-92.
- Nickerson. 2011. Mastitis Pathogens. Enciclopedia of Diaries Sciences, 408-414.
- Novick RP, Christie GE, Penadés JR. 2010. The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria. Nature Reviews Microbiology, 8:541-551.
- Olson ND, Lund SP, Colman RE, Foster JT, Sahl JW, Schupp JM, Zook JM. 2015. Best practices for evaluating single nucleotide variant calling methods for microbial genomics. Frontiers in Genetics, 6:235
- Oliveira MCS. 2006. Doenças infecciosas em sistemas intensivos de produção de leite. Embrapa Pecuária Sudeste.
- Peres Neto F, Zappa V. 2011. Mastite em vacas leiteiras - revisão de literatura. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, 16:1-28.
- Persson-Waller, K, Colditz IG, Lun S, Östensson K. 2003. Cytokines in mammary lymph and milk during endotoxin-induced bovine mastitis. Research in Veterinary Science, 74:31-36.
- Plano mais pecuária. 2014. Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assessoria de Gestão Estratégica. – Brasília : MAPA/ACS.
- Punina NV, Makridakis NM, Remnev MA, Topunov AF. 2015. Whole-genome sequencing targets drug-resistant bacterial infections. Human Genomics, 9:1-20.
- Radtke A, Lindstedt BA, Afset JE, Bergh K. 2010. Rapid multiple-locus variant-repeat assay (MLVA) for genotyping of *Streptococcus agalactiae*. Journal of Clinical Microbiology, 48:2502-2508.
- Rainard P. 2005. Tackling mastitis in dairy cows. Nature Biotechnology, 23:430-432.
- Ruegg PL. 2003. Practical strategies for treating mastitis. University of Wisconsin, Madison.

- Ruegg PL. 2005. Premiums, production and pails of discarded milk how much money does mastitis cost you. *Resources Milk Money*, 3:50-56.
- Sakwinska O, Giddey M, Moreillon M, Morisset D, Waldvogel A, Moreillon P. 2011. *Staphylococcus aureus* host range and human-bovine host shift. *Applied and Environmental Microbiology*, 77:5908–5915.
- Sato'o Y, Omoe K, Ono HK, Nakane A, Hu DL. 2013. A novel comprehensive analysis method for *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. *Microbiology and Immunology*, 57:91-99.
- Shittu AO, Udo EE, Lin J. 2007. Insights on virulence and antibiotic resistance: a review of the accessory genome of *Staphylococcus aureus*. *Wounds*, 19:237-244.
- Smith EM, Green LE, Medley GF, Bird HE, Fox LK, Schukken YH, Dowson CG. 2005. Multilocus sequence typing of intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 43:4737–4743.
- Smyth DS, Feil EJ, Meaney WJ, Hartigan PJ, Tollersrud T, Fitzgerald JR, Smyth CJ. 2009. Molecular genetic typing reveals further insights into the diversity of animal-associated *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology*, 58:1343-1353.
- Sociedade Nacional da Agricultura. Disponível em: <http://sna.agr.br/valor-bruto-da-producao-pecuaria-brasileira-atingira-r-195-bilhoes-em-2015/> - Acesso em 09 de dezembro de 2015.
- Tenover FC, Arbeit R, Archer G, Biddle J, Byrne S, Goering R, Hancock G, Hebert GA, Hill B, Hollis R. 1994. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 32:407–415.
- Viguier C, Arora S, Gilmartin N, Welbeck K, O’Kennedy R. 2009. Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends in Biotechnology*, 27:486-493.
- Whelehan CJ, Meade KG, Eckersall PD, Young FJ, O’Farrelly C. 2011. Experimental *Staphylococcus aureus* infection of the mammary gland induces region-specific

changes in innate immune gene expression. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 140:181-189.

Xia G, Wolz C. 2014. Phages of *Staphylococcus aureus* and their impact on host evolution. *Infection, Genetics and Evolution*, 21:593-601.

Zadoks RN, Middleton JR, McDougall S, Katholm J, Schukken YH. 2011. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 16:357–372.

Zhao X, Lacasse P. 2008. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *Journal of Animal Science*, 86:57-65.

Zecconi A. 2010. *Staphylococcus aureus* mastitis: what we need to know to control them. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 65:93-99.

## **CAPÍTULO 1**

Caracterização e epidemiologia molecular de estirpes de *Streptococcus agalactiae* de origem bovina

**Caracterização e epidemiologia molecular de estirpes de *Streptococcus agalactiae*  
de origem bovina**

Danielle Mendes Silva<sup>1</sup>, Mônica Pacheco da Silva<sup>1</sup>, Mary Hellen Fabres-Klein<sup>2</sup>,  
Gustavo Ferreira Martins<sup>3</sup>, Guilherme Nunes de Souza<sup>4</sup>, Andréa de Oliveira Barros  
Ribon<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biotecnologia Molecular, Departamento de Bioquímica e Biologia  
Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil

<sup>2</sup> Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Veterinária, Universidade Federal  
de Viçosa, Viçosa, Brazil

<sup>3</sup> Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, Departamento de Biologia Geral,  
Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil

<sup>4</sup>Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Brazil

\*Corresponding author: Andrea de Oliveira Barros Ribon

E-mail addresses: [abribon@ufv.br](mailto:abribon@ufv.br) ; Tel: 55 31 3899 2837; Fax: 55 31 38992373

## RESUMO

*Streptococcus agalactiae* é um patógeno frequentemente associado à mastite subclínica, uma manifestação que pode persistir por anos no rebanho reduzindo os lucros da pecuária leiteira. A caracterização das estirpes é importante para definir isolados de importância epidemiológica visando o monitoramento e controle da mastite no rebanho. Neste trabalho, 175 amostras positivas para o teste California Mastitis (CMT) foram coletadas de vacas holandesas. Análises microbiológicas revelaram a presença de *S. agalactiae* em 34,2% das amostras, sendo que em 16,6% do leite amostrado foi observada infecção mista por *S. agalactiae* e *S. aureus*. Em 36% das amostras foi observado o crescimento de bactérias de outros grupos e 4,57% foram consideradas contaminadas. Uma infecção persistente, definida por três ou mais episódios consecutivos da doença em um mesmo animal, foi causada por *S. agalactiae* em nove animais. Análise molecular dos isolados de *S. agalactiae* por multilocus de repetições em tandem de número variável (MLVA) revelou seis genótipos circulantes no rebanho, sendo SagT1 o perfil mais frequente. Análises estatísticas permitiram relacionar SagT1, SagT2 e SagT4 com a cronicidade da infecção e associá-los com animais que tiveram 2 ou mais partos. Os isolados de *S. agalactiae* foram fortes produtores de biofilme *in vitro* e produziram hemólise do tipo beta. Para analisar a virulência dos isolados, larvas de *Galleria mellonella* foram infectadas com um isolado de cada perfil MLVA, o que definiu os tipos SagT3 e SagT1 como os mais e menos virulentos, respectivamente. Esses dois isolados não invadiram nem apresentaram efeito citotóxico em células MAC-T. Conclui-se que foi possível associar o perfil SagT1, menos virulento e mais frequente no rebanho, com infecções crônicas.

## INTRODUÇÃO

*Streptococcus agalactiae*, também conhecido como *Streptococcus* do grupo B (GBS) segundo a classificação de Lancefield (1933), foi descrito pela primeira vez como patógeno da mastite bovina em 1887 (Corrêa *et al.*, 2010), sendo considerado o principal agente causador de mastite na era pré-antibiótica. O patógeno é hospedeiro obrigatório da glândula mamária e, geralmente, não sobrevive por longos períodos em ambiente extracelular (Keefe, 1997; Keefe, 2012). A mastite causada por *S. agalactiae* pode se manifestar nas formas clínica ou subclínica, sendo de progressão lenta, podendo levar à fibrose e atrofia do quarto afetado resultando em uma doença crônica que diminui a produção leiteira e aumenta a contagem de células somáticas (CCS) do leite (Awale *et al.*, 2012).

A prevalência de *S. agalactiae* em países que adotaram extensos programas de controle da doença diminuiu drasticamente, ao contrário do que se observa em países com indústrias de laticínios ainda em desenvolvimento (Keefe *et al.*, 2012). No Vietnã, *S. agalactiae* é o principal patógeno causador de mastite bovina com prevalência de 35,7% (Östensson *et al.*, 2013). Na América do Sul, a prevalência chega a 42% em rebanhos colombianos e 11% nos uruguaios (Giannechini *et al.*, 2002; Keefe *et al.*, 2011). Alta prevalência (60%) de *S. agalactiae* já foi relatada nos rebanhos do Brasil (Brito *et al.*, 1999). Mais recentemente, observou-se uma redução desses percentuais dentro de alguns rebanhos, o que pode ser reflexo da adoção de medidas de higiene ou da eliminação das infecções por antibióticos (Oliveira *et al.*, 2011; Chagas *et al.*, 2012; Castelani *et al.*, 2013).

A sorotipagem com base em diferenças antigênicas capsulares foi inicialmente usada como método de tipagem de *S. agalactiae* tendo sido descritos dez sorotipos distintos (Ia, Ib, e II até IX). Estudos conduzidos com isolados bovinos identificaram os sorotipos Ia, II, V e III em circulação em rebanhos de diferentes países (Dogan *et al.*, 2005; Pinto *et al.*, 2013; Rato *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013). Destaca-se porém, a grande quantidade de isolados não tipados, que chegou a 77% no estudo conduzido por Rato *et al.*, (2013). Atentos a essa limitação foi desenvolvida a tipagem baseada na amplificação de genes codificadores da cápsula (Kong *et al.* 2002; Manning *et al.* 2005; Poyart *et al.* 2007; Afshar *et al.*, 2011), embora ainda sem poder discriminatório suficiente para permitir a distinção entre isolados (Haguenoer *et al.*, 2011).

A análise do genoma de *S. agalactiae* revelou a presença de regiões repetidas de número variável que permitiram o desenvolvimento de um método de análise de multilocus variáveis (MLVA) (Radtke *et al.*, 2010; Haguenoer *et al.*, 2011). Além de ser mais rápido e barato que técnicas como a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) e tipagem por sequenciamento de multilocus (MLST), MLVA apresenta um bom poder discriminatório, muitas vezes superior ao MLST e adequado a estudos de epidemiologia molecular (Haguenoer *et al.*, 2011).

Análises de virulência de *S. agalactiae* de origem bovina geralmente são conduzidas com base na detecção de genes que codificam fatores de virulência envolvidos na aderência da bactéria, produção de hemolisinas ou evasão do sistema imune do hospedeiro (Duarte *et al.*, 2005; Jain *et al.*, 2012). Porém, pouco se sabe do comportamento *in vivo* dos isolados. Recentemente, foi avaliado um modelo de infecção alternativo utilizando larvas de *Galleria mellonella*, que se mostrou adequado para estudos da interação patógeno-hospedeiro e para avaliação da atividade e resistência a antimicrobianos em bactérias do gênero *Streptococcus* (Olsen *et al.*, 2011; Evans e Rosen, 2012). Olsen *et al.*, (2011) comparando 10 isolados humanos de *S. agalactiae*, conseguiu distingui-los com base na virulência e mostrou que o isolado que causava lesões necróticas em humanos foi também o mais virulento em *Galleria*. A alta correlação entre a virulência em *Galleria mellonella* e em modelo murino comprovou que *Galleria* é um modelo de estudo de patogênese *in vivo* rápido, barato e tecnicamente simples.

A formação de biofilme é uma importante estratégia de sobrevivência adotada por bactérias, pois garante proteção contra o sistema imune do hospedeiro e uma maior resistência a agentes antimicrobianos (Götz, 2002; Ebrahimi *et al.*, 2013; Speziale e Geoghegan, 2015). Sabe-se que muitas espécies de *Streptococcus* possuem habilidade de formar biofilme, no entanto, sua relação com a patogênese bacteriana tem sido melhor estabelecida em infecções humanas, mais especificamente, infecções orais (Cvitkovitch *et al.*, 2003). Poucos estudos avaliaram o potencial de formação de biofilme de isolados bovinos de *S. agalactiae* e sua importância no estabelecimento e desenvolvimento da mastite bovina (Ebrahimi *et al.*, 2013).

Este trabalho acompanhou por seis meses animais com mastite subclínica persistente e não-persistente pertencentes a um rebanho de vacas holandesas. Determinaram-se a frequência, a distribuição de *S. agalactiae* bem como o potencial

hemolítico e de formação de biofilme dos isolados. A genotipagem pela análise em multilocus de repetições em tandem de número variável (MLVA) mostrou a presença de seis genótipos de *S. agalactiae* no rebanho, dos quais três foram mais associados a infecções persistentes e apresentaram diferentes graus de virulência *in vivo*.

## **METODOLOGIA**

### **Coleta de amostras de leite de vacas individuais**

As amostras de leite foram coletadas por veterinários do Programa Desenvolvimento da Pecuária Leiteira (PDPL), Viçosa – MG, durante o período de maio a outubro de 2013, em um rebanho de 170 vacas holandesas em lactação, no município de Cajuri, região Sudeste de Minas Gerais. O *California Mastitis Test* (CMT) foi realizado para diagnosticar animais com mastite subclínica, considerando os procedimentos indicados por Quinn *et al.*, (1994). Os animais não foram tratados com antibiótico durante o período do experimento. Amostras compostas, provenientes dos quatro quartos mamários e obtidas apenas de vacas com resultado CMT positivos, foram coletadas após descarte dos primeiros jatos de leite e assepsia das extremidades dos tetos com álcool 70%. Após a coleta, as amostras foram armazenadas em caixas isotérmicas contendo gelo e conduzidas ao Laboratório de Biotecnologia Molecular, LBM, da Universidade Federal de Viçosa, para análise microbiológica.

### **Isolamento e identificação dos micro-organismos**

O isolamento e identificação das bactérias foi realizado seguindo metodologia proposta por Brito *et al.*, (1999), com modificações. Uma alíquota de 10 µL da amostra de leite foi semeada com alça descartável em placas contendo ágar TSA (Tryptic Soy Agar, HiMedia, Mumbai, Índia), enriquecido com 5% de sangue de carneiro desfibrinado. As placas foram mantidas a 37 °C e os registros foram feitos após 24 e 48 h de incubação. As amostras foram consideradas culturas positivas quando detectado o crescimento de  $\geq 2$  colônias morfológicamente idênticas por placa, sendo que as amostras com predominância de três ou mais espécies morfológicamente distintas foram consideradas contaminadas. As colônias crescidas em ágar-sangue foram analisadas considerando morfologia, tamanho, pigmentação e presença de hemólise. Colônias isoladas com suspeitas de serem *S agalactiae* foram transferidas para placas contendo

ágar BHI (Brain Heart Infusion, BHI HiMedia, Mumbai, India) e incubadas a 37 °C por 24 h. Após a incubação, as bactérias foram identificadas de acordo com a coloração diferencial de Gram e teste da catalase. *S. agalactiae* foi identificado com base na produção de hemólise do tipo beta, fator CAMP e hidrólise de hipurato de sódio; ausência de hidrólise de esculina e de crescimento em presença de bile-esculina (dos Santos *et al.*, 2007). Os demais isolados foram identificados pelas características descritas por Brito *et al.*, (1999). Depois de identificados, os isolados de *S. agalactiae* foram mantidos em estoques de glicerol 25% a -80 °C.

### **Tipagem molecular**

A extração do DNA total foi realizada como descrito previamente (Pospiech e Neumann, 1995). A diversidade genética dos isolados de *S. agalactiae* foi acessada avaliando o polimorfismo de repetições em tandem de regiões do genoma da bactéria (MLVA), conforme Haguenoer *et al.*, (2011) com modificações. Reações de PCR individuais foram realizadas num volume final de 25 µL contendo 10 ng de DNA, 1X tampão de reação, 2 mM MgCl<sub>2</sub> e 1,25 U de Taq DNA polimerase (Kappa Biosystems, MA, EUA), 200 µM de cada dNTP e 0,5 pM de cada iniciador (Tabela 1). A amplificação foi realizada em termociclador nas seguintes condições: desnaturação inicial de 5 min a 94 °C, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C durante 30 seg, anelamento durante 30 seg à temperatura específica para cada par de iniciador (Tabela 1) e extensão a 72 °C durante 60 seg, mais um passo final de alongamento por 7 min a 72 °C. A comparação entre os perfis de bandas resultantes foi feito por eletroforese em gel de agarose 2% contendo brometo de etídio (1 µg/mL), usando como marcador de peso molecular o 100 pb DNA ladder (New England BioLabs, MA, EUA).

**Tabela 1.** Oligonucleotídeos iniciadores usados neste estudo.

Par de Oligonucleotídeos	Sequência F (5'-3')	Sequência R (5'-3')	Tm (°C)	Amplicon
SAG2	TCTTCCAAGTGGTGT CAACG	CAACGTTTGGAGTTGC TTCA	55	212 – 276
SAG3	CAAAAACGTGCTGCC TATGA	CATCCCTCCTCCACCAA AA	55	126 – 150
SAG4	GGTCAGTTTTTATTTA TCGTAAGC	AGTCTTGCGAAGGCAG ACAC	67	114 – 414
SAG21	TGAAAGAAGTGGATT TTCCCTA	AAAATAGGTTTTAGAA CTTGGAATCA	62	117 - ~2000
SAG22	TGTAACACTAGCTCC AATTGTTTT	TCGGTCTTGTCTCAGCA ATG	68	292 - 1246

### Produção de biofilme

As estirpes bacterianas foram caracterizadas de acordo com a formação de biofilme, conforme descrito por Klein *et al.*, (2015). Uma suspensão de células ajustada para 0,5 na escala McFarland foi preparada e 100 µL foram adicionados em poços de uma microplaca de 96 poços contendo 100 µL de BHI. Após 22 h, o meio foi descartado e os poços foram lavados suavemente três vezes com 200 µL de solução tampão fosfato estéril (PBS), pH 7,4, seguido por coloração com 200 µL de cristal violeta 0,1% durante 30 minutos. Após três lavagens seguidas com 200 µL de água destilada estéril, 200 µL de etanol 95% foram adicionados e a densidade óptica foi checada a 560 nm. A estirpe-referência *Staphylococcus epidermidis* NRS 101 que possui alta produção de biofilme foi utilizada como controle positivo. Cada uma das amostras foi testada em triplicata, e o ensaio foi repetido três vezes. Como controle nos ensaios de biofilme, foram utilizadas as estirpes *S. epidermidis* NRS101 (ATCC 35983) e *Staphylococcus aureus* NRS155 (RN 9120), ambas fortes produtoras de biofilme.

### Infecção de larvas de *Galleria mellonella*

Os insetos foram fornecidos pelo Laboratório de Genética de Micro-organismos da Universidade Federal de Viçosa e crescidos a 25 °C em dieta artificial composta por 400 g de farelo de trigo, 200 g de gérmen de trigo, 120 g de levedo de cerveja, 200 g de leite em pó, 80 mL de glicerina e um volume de mel de aproximadamente 300 ml,

sendo este o suficiente para dar liga a ração, deixando-a com aspecto de uma farofa úmida. Os experimentos foram conduzidos de acordo Ramarao *et al.*, (2012). Larvas no último ínstar, cada uma pesando entre 250-300 mg, foram inoculadas com culturas de *S. agalactiae* sendo  $10^5$  a  $10^8$  UFC por larva. Foram usados os isolados 170/2 (SagT1), 182/1 (SagT2), 220/3 (SagT3), 322/3 (SagT4), 443/3 (SagT5) e 443/4 (SagT6). Culturas de *S. agalactiae* foram crescidas até a fase exponencial e diluídas em PBS estéril pH 7,4. Alíquotas de 10  $\mu$ L de cada diluição foram injetadas a direita da primeira pro-perna, dentro da hemocele, utilizando seringas de insulina Ultra-Fine 100 U (Becton Dickinson). Larvas injetadas com PBS e as larvas não inoculadas foram usadas como controles negativos. A incubação foi feita a 37 °C, no escuro. As larvas foram examinadas individualmente para pigmentação e a hora da morte foi monitorada durante 96 h. Larvas que não se moviam em resposta ao toque foram consideradas mortas. Todos os testes foram realizados em triplicata e 30 larvas foram utilizadas para cada condição.

Para avaliação do crescimento bacteriano *in vivo*, culturas de *S. agalactiae* foram injetadas dentro da hemocele das larvas de *G. mellonella* ( $10^6$  UFC por larva), e o crescimento bacteriano foi monitorado em 0, 6, 10 e 24 h pós-injeção. A superfície das larvas foi desinfetada com etanol 70% e água destilada estéril e o sangramento foi provocado por cortes próximos às pró-pernas utilizando uma microtesoura Westcott 17. Um volume de 10  $\mu$ L de hemolinfa foi coletado de 8 larvas individuais, a hemolinfa de cada uma das larvas foi diluída serialmente ( $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ ) e alíquotas de cada amostra foram semeadas em ágar BHI (Himedia, Mumbai, India) e incubadas a 37 °C. A concentração de UFC da hemolinfa foi calculada como a média, das 8 repetições, do número de colônias contadas (25-250) em cada diluição específica.

### **Histopatologia de *G. mellonella* infectada com *S. agalactiae***

Para análises histopatológicas, foram utilizados no mínimo 10 indivíduos injetados com SagT1 e SagT3. As larvas foram colocadas em PBS 0,1M, pH 7,4 e dissecadas sob um estereoscópio. A cavidade abdominal foi aberta lateralmente usando micro tesoura e os órgãos viscerais foram removidos. O abdômen dorsal (incluindo o corpo de gordura e vaso dorsal) foi separado do resto do corpo larval e as amostras foram transferidas para tubos de microcentrífuga contendo paraformaldeído a 4% em PBS 0,1 M, pH 7,2 e armazenado a 4 °C. As amostras fixadas foram lavadas com PBS,

desidratadas numa série crescente de etanol (70-100%) e incorporadas com historresina (Leica). As amostras foram seccionadas (5-7  $\mu\text{m}$ ) em micrótomo Leica RM2255 e montadas em lâminas de vidro. Os cortes foram corados com azul de toluidina, montados com Eukit meio de montagem (Fluka) e fotografados sob microscópio óptico.

### **Ensaio MAC-T**

Células epiteliais da glândula mamária bovina (MAC-T) foram usadas nos estudos em invasão e citotoxicidade da bactéria. Células MAC-T foram cultivadas em garrafas de cultura (75  $\text{cm}^2$ ) utilizando meio MAC-T: DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino estéril (SFB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). As células foram incubadas a 37 °C com 5% de  $\text{CO}_2$ . Após atingirem a confluência, as células foram tratadas com 0,05% de tripsina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e ressuspendidas em meio MAC-T até uma concentração de  $2 \times 10^6$  células. Para o ensaio de invasão, as células foram semeadas em placas de 12 poços ( $2 \times 10^5$  células/poço), e para o ensaio de citotoxicidade, foram distribuídas em placas de 96 poços ( $1 \times 10^5$  células/poço) e incubadas *overnight* a 37 °C com 5%  $\text{CO}_2$  para obtenção de monocamadas confluentes.

Os efeitos citotóxicos do sobrenadante de culturas de *S. agalactiae* foram avaliados após 24h de incubação com MAC-T, como descrito por Bouchard *et al.*, 2013, utilizando methylthiazolyldiphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) com algumas modificações. As bactérias foram crescidas em BHI com agitação, 37 °C 180 rpm, e depois de 14 h de incubação, as culturas foram centrifugadas, os sobrenadantes filtrados em filtros 0,22  $\mu\text{m}$  (GVS Filter Technology, USA) e diluídos em DMEM 1:1. Os sobrenadantes diluídos foram adicionados às placas de 96 poços com células aderidas ( $1 \times 10^5$  células/poço) e incubadas a 37 °C e 5%  $\text{CO}_2$  por 24 h. Os poços foram lavados duas vezes com PBS estéril e então incubados com MTT ( $0,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) por 4 h. O meio foi removido e adicionou-se uma solução de revelação (isopropanol/0.4 M HCl) 30 min antes da leitura de absorvância 570nm. Células incubadas com meio BHI ou 0,01% Triton-X100 diluídos 1:1 em DMEN foram usados como controle negativo (100% viabilidade) e positivo (0% viabilidade), respectivamente. A viabilidade relativa foi calculada baseada nas células não infectadas.

Ensaio de invasão foram conduzidos de acordo com Brouillette *et al.* (2004), com alguns ajustes. Monocamadas confluentes de células ( $2 \times 10^5$  células/poço) foram

lavadas duas vezes com PBS estéril e então incubadas com suspensões bacterianas que tiveram seu UFC/mL previamente determinada, e diluído em meio de invasão (DMEM / 1% FBS) para obter uma multiplicidade de infecção (MOI) de 10. Depois de 3 h de incubação a 37 °C, as células foram lavadas com PBS e foi adicionado 1ml do meio de invasão (DMEM/1% SFB) suplementado com gentamicina (50 µg.ml<sup>-1</sup>) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Os sobrenadantes foram descartados e as monocamadas de células foram lavadas com PBS estéril e tratadas por 5 minutos com água destilada estéril para liberar os micro-organismos intracelulares. A contagem das bactérias liberadas foi determinada por plaqueamento em BHI ágar.

### **Análises estatísticas**

Para os testes *in vitro*, o teste t de Student foi utilizado para avaliar as diferenças entre os isolados de *S. agalactiae*. As curvas de sobrevivência foram plotadas utilizando o método Kaplan-Meier e as diferenças entre elas foram calculadas pelo teste log-rank. Para identificar o grupo, ou os grupos, que diferiam dos outros o método de comparações múltiplas Holm-Sidak foi utilizado. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo para o teste t e Holm Sidak, e  $p < 0,001$  para o log-rank.

## **RESULTADOS**

### **Frequência de *Streptococcus agalactiae* em vacas com mastite subclínica**

Ao todo, 175 amostras de leite CMT positivas foram coletadas de animais com mastite subclínica, dos quais 60 (34,3%) foram positivas para *S. agalactiae*, 22 (12,6%) foram positivas para outros grupos de *Streptococcus* e *Enterococcus* e 12 (6,8%) foram positivas para patógenos diversos como bacilos ou cocos Gram positivos, leveduras e *Staphylococcus* coagulase negativos (STCN) (Tabela 2). Ressalta-se que *Staphylococcus aureus* foi isolado de 70 (40%) amostras. Das amostras analisadas, 4,57% foram consideradas contaminadas.

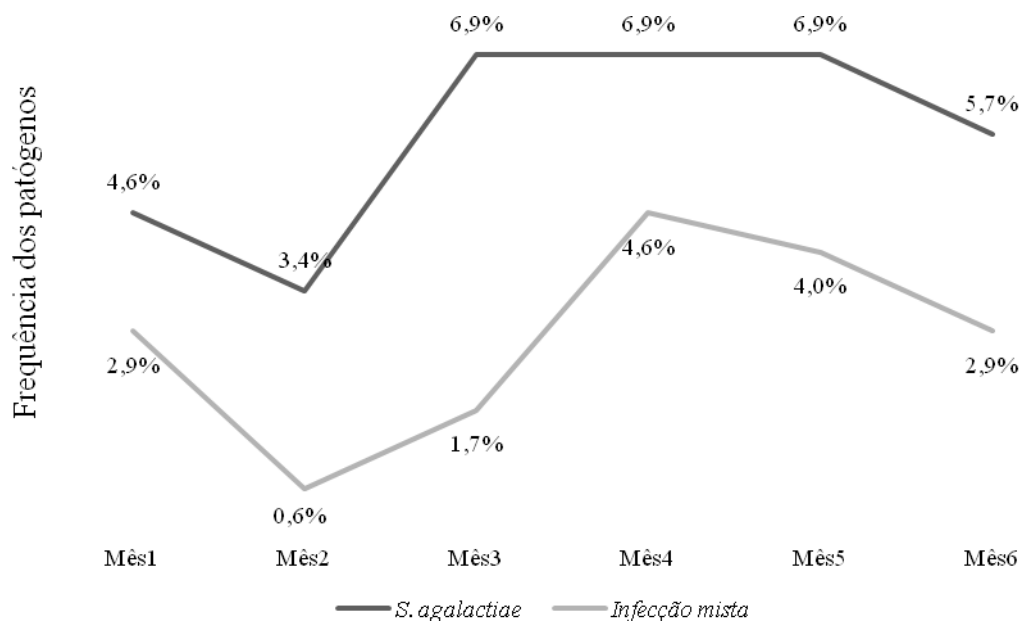
A frequência de *S. agalactiae* dobrou a partir do mês 3, em relação ao segundo mês de coleta e manteve-se elevada até o último mês de estudo (Figura 1). Nove animais (182, 220, 340, 357, 369, 406, 443, 469 e 485) apresentaram infecção causada por *S. agalactiae* por três ou mais coletas consecutivas, o que foi caracterizado como mastite persistente. Dos animais que fizeram parte do estudo, 15 (42%) apresentaram casos de infecção mista, onde duas bactérias diferentes foram isoladas da mesma

amostra, o que representou uma frequência de 16,6% no rebanho. *S. aureus* foi o patógeno mais comumente isolado de amostras de leite com *S. agalactiae*, que foi mais elevada nos meses 4 e 5.

**Tabela 2.** Isolamento e identificação dos patógenos isolados de amostras de leite de animais com mastite subclínica.

Grupo de patógeno	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6	Total
<i>Streptococcus agalactiae</i>	8 (4,6%)	6 (3,4%)	12 (6,9%)	12 (6,9%)	12 (6,9%)	10 (5,7%)	60 (34,3%)
<b>Outros</b> <i>Streptococcus</i> / <i>Enterococcus</i> spp.	4 (2,3%)	-	3 (1,7%)	3 (1,7%)	-	12 (6,9%)	22 (12,6%)
<b>Bacilos Gram – positivos</b>	-	-	3 (1,7%)	-	1 (0,6%)	-	4 (2,3%)
<b>Cocos Gram – positivos</b>	-	-	3 (1,7%)	2 (1,2%)	-	-	5 (2,8%)
<b>Levedura</b>	-	-	1 (0,6%)	-	-	-	1 (0,6%)
<b>STCN</b>	1 (0,6%)	1 (0,6%)	-	-	-	-	2 (1,1%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	17 (9,7%)	11 (6,3%)	8 (4,6%)	12 (6,9%)	11 (6,3%)	11 (6,3%)	70 (40,0%)
<b>Número total de isolados</b>	30 (17,1%)	18 (10,3%)	30 (17,1%)	29 (16,6%)	24 (13,7%)	33 (18,9%)	164 (93,7%)

STCN – *Staphylococcus* coagulase negativo; ( ) – entre parênteses são apresentadas as porcentagens em relação ao número total de amostras, 175.



**Figura 1.** Frequência de *Streptococcus agalactiae* no rebanho analisado. A linha superior indica a frequência de *S. agalactiae* isolado a partir de 175 amostras de leite mastítico subclínico. A linha clara mostra a frequência de infecção mista causada por *S. agalactiae* e *Staphylococcus aureus*.

### Diversidade genética de *Streptococcus agalactiae*

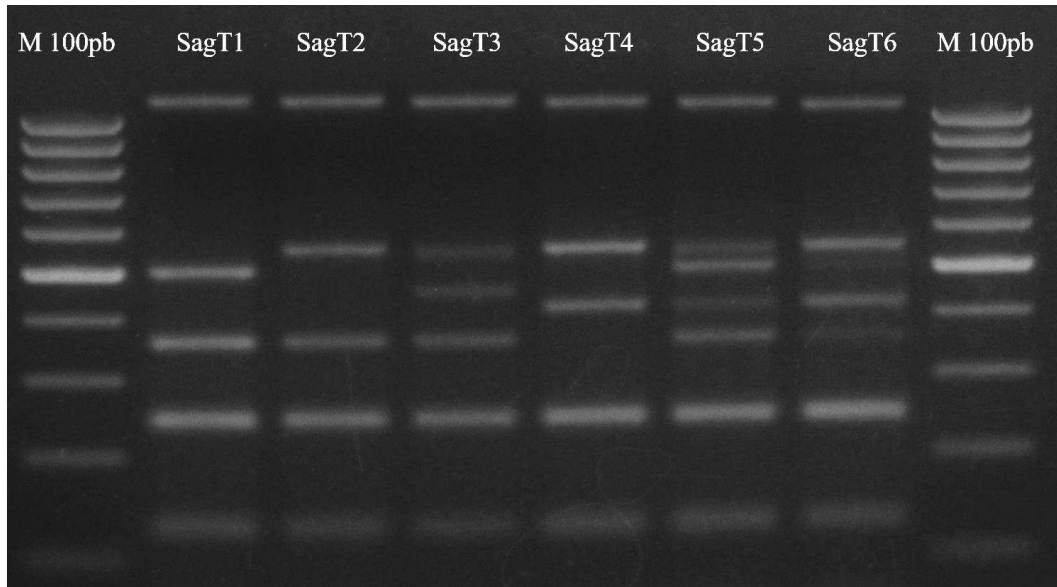
Definiram-se seis perfis de bandas a partir da análise por MLVA do DNA dos 60 isolados de *S. agalactiae*, dos quais 27 (45%) apresentaram o perfil 1 (SagT1), 12 (20%) o perfil 2 (SagT2), 1 (1,6%) o perfil 3 (SagT3), 16 (26,6%) o perfil 4 (SagT4), 1 (1,6%) o perfil 5 (SagT5) e 3 (5%) o perfil 6 (SagT6) (Figura 2a). Analisando-se a distribuição dos genótipos ao longo dos meses de coleta observa-se que SagT1 foi o único perfil isolado em todos os meses, enquanto SagT2 e SagT4 foram isolados em 5 meses de coleta. O mês que apresentou maior diversidade de perfis foi o mês 3, quando SagT1, T2, T3 e T4 causaram infecção. Com relação a infecções mistas com *S. aureus* foi possível observar que em 31% dos episódios, foi encontrado o perfil de SagT1, em 17%, SagT2 e em 31%, SagT4. Os perfis SagT3, SagT5 e SagT6 foram os menos isolados, com 3%, 3% e 7%, respectivamente.

### **Dinâmica das infecções causadas por *Streptococcus agalactiae***

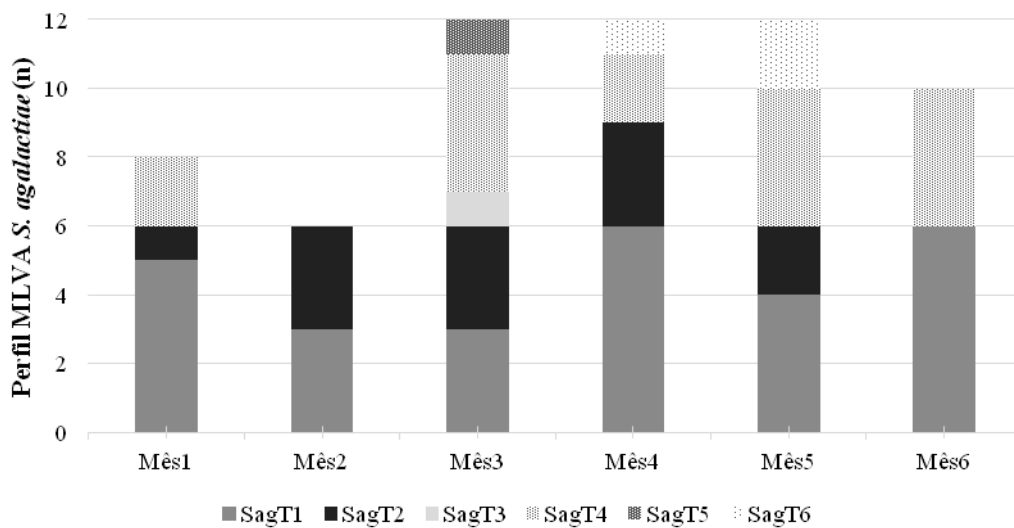
Com base na dinâmica da infecção, elas foram classificadas como nova quando observada a partir do segundo mês, cura, quando o animal apresentou infecção no primeiro mês e não no segundo e, finalmente, em infecção crônica quando a infecção foi observada nos dois meses. Um animal foi considerado sadio quando não apresentou infecção em nenhum dos dois meses.

Uma associação altamente significativa ( $p < 0,001$ ) foi encontrada entre genótipo de *S. agalactiae* e a dinâmica das infecções subclínicas, onde SagT1 e SagT4 associaram-se a novas infecções enquanto SagT2 esteve mais associado a infecções crônicas. SagT3 e SagT5 não causaram infecção crônica. SagT6 relacionou-se em apenas uma situação cuja infecção foi crônica. Acredita-se, portanto que os tipos T3, T5 e T6 causem infecções flutuantes enquanto os tipos T1, T2 e T4 sejam responsáveis pela cronicidade de infecções (Tabela 3). As análises realizadas não identificaram associação entre as variáveis analisadas e infecções mistas de *S. agalactiae* com *S. aureus* ou com os outros patógenos ambientais.

(A)



(B)



**Figura 2.** Perfis MLVA de *Streptococcus agalactiae* observados ao longo dos meses de coleta. (A) A tipagem por MLVA definiu seis perfis de bandas diferentes SagT1, SagT2, SagT3, SagT4, SagT5 e SagT6 em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. M 100pb – marcador 100 pb DNA ladder New England Biolabs (B) Distribuição dos perfis foi variável durante os meses de coleta. n – número de isolados.

Também foi possível associar a ordem de parto aos genótipos SagT1, SagT2 e SagT4, os mais isolados no estudo. SagT2 foi isolado de animais que tiveram 1 parto ( $p < 0,05$ ), enquanto que SagT1 foi mais associado a 2 partos ( $p < 0,05$ ). Com uma

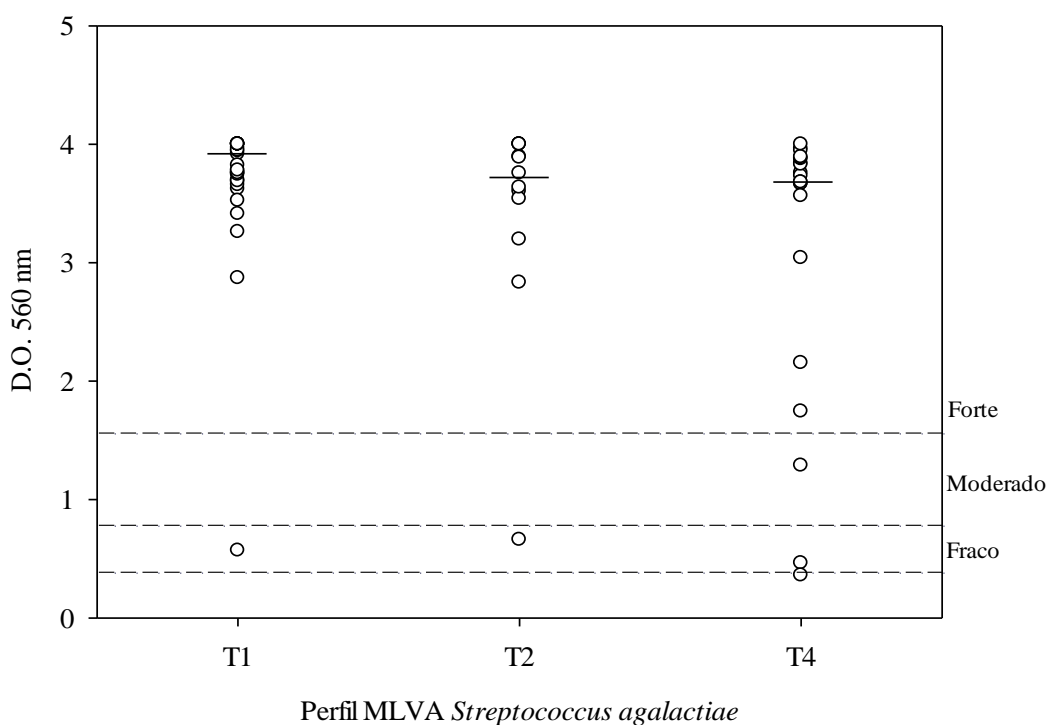
associação mais fraca, tem-se o SagT4 associado a animais que tiveram 3 ou mais partos.

**Tabela 3.** Distribuição de frequência (n) do tipo de *Streptococcus agalactiae* e a dinâmica da infecção.

<b>Genótipo</b>	<b>Nova</b>	<b>Cura</b>	<b>Persistente</b>
<b>SagT1</b>	13	9	10
<b>SagT2</b>	4	4	7
<b>SagT3</b>	1	0	0
<b>SagT4</b>	9	6	5
<b>SagT5</b>	1	0	0
<b>SagT6</b>	2	1	1
<b>Total</b>	30	20	23

### **Caracterização fenotípica dos isolados bacterianos**

Os isolados estudados produziram biofilme *in vitro*, com exceção apenas do isolado *S. agalactiae* 322. A produção foi classificada como forte, moderada ou fraca, de acordo com os critérios estabelecidos por Stepanović *et al.*, (2007). Dos 60 isolados de *S. agalactiae*, 55 (93%) foram classificadas como forte produtores de biofilme, representados por SagT1 (26), SagT2 (11), SagT3 (1), SagT4 (13), SagT5 (1) e SagT6 (3). Um (1) representante de SagT4 apresentou produção moderada, enquanto 3 foram fracos produtores (SagT1, SagT2 e SagT4) e, um isolado foi não produtor, segundo a classificação adotada. Determinando a mediana das leituras que correspondem a produção de biofilme para cada tipo de *S. agalactiae* foi observado que os perfis mais encontrados no rebanho são fortes produtores (Figura 3). Não pode ser estabelecida uma relação entre produção de biofilme e o perfil MLVA dos isolados ou sua persistência no rebanho.



**Figura 3.** Produção de biofilme por *Streptococcus agalactiae* isolados de mastite bovina subclínica. Os resultados representam a média de três experimentos independentes, e os valores de mediana apresentados no gráfico pelo traço sobre as distribuições mostra que a alta produção de biofilme pode ser observada para todos os perfis analisados.

### Os isolados bovinos apresentam diferentes graus de virulência *in vivo*

A virulência *in vivo* de isolados de *S. agalactiae* foi contrastada em larvas de *Galleria mellonella*. Nesse ensaio, um isolado de cada perfil, todos fortes produtores de biofilme, foi aleatoriamente escolhido e inoculado em larvas de quarto ínstar. Inicialmente, determinou-se a concentração bacteriana a ser usada nos ensaios usando diferentes concentrações da estirpe referência *S. agalactiae* ATCC 13813 como inóculo. Observou-se que a morte das larvas e o tempo de sobrevivência foi dependente da concentração do inóculo utilizada. A infecção com  $10^8$  UFC resultou em 100% de mortalidade de *G. mellonella* após 12 h de infecção. Larvas mortas mostraram-se escuras e não responsivas ao toque. Larvas infectadas com  $10^5$  UFC mostraram sobrevivência maior que 95% após 96 h. Dessa forma, a concentração bacteriana ( $10^6$  UFC) que levou uma porcentagem intermediária de mortalidade foi selecionada para avaliar a virulência de alguns isolados bovinos.

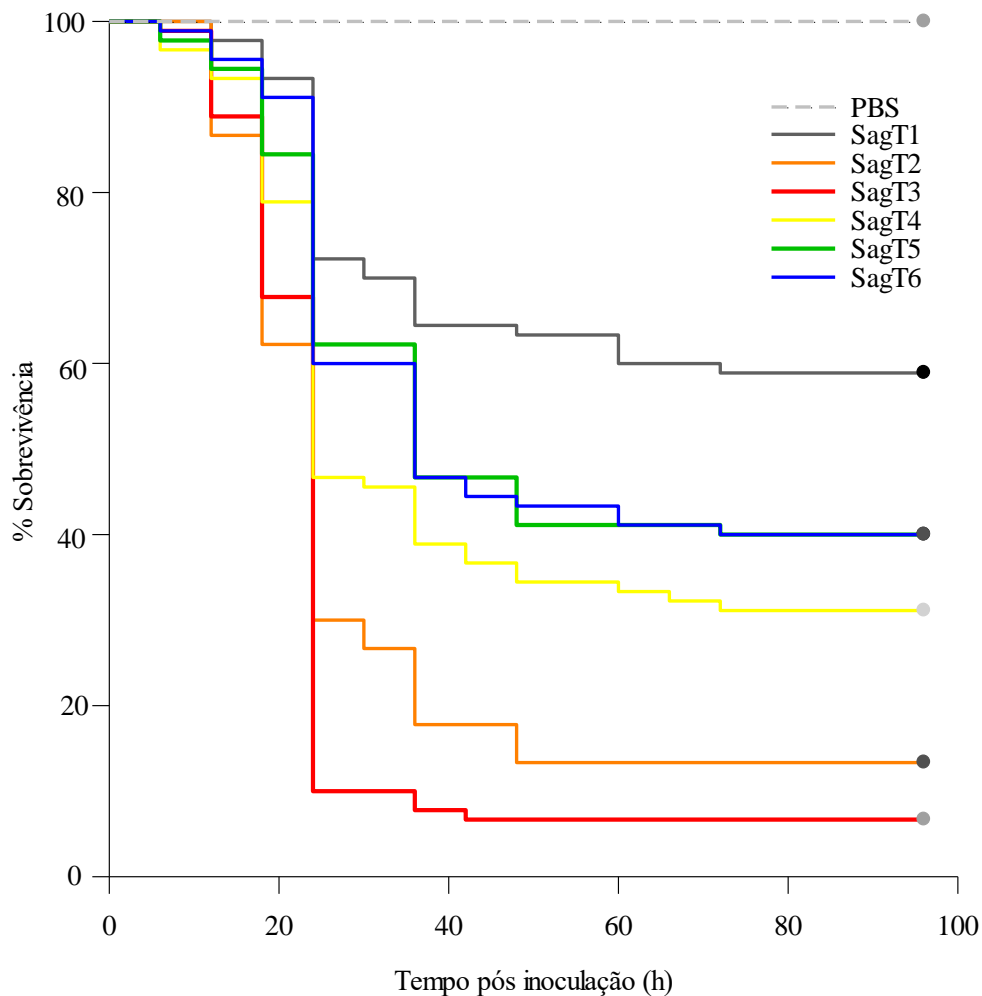
Dos isolados de *S. agalactiae* selecionados para o ensaio, aquele com perfil T1 mostrou-se o menos virulento, com uma mortalidade de aproximadamente 40% das larvas após 96 h de ensaio, ao contrário do perfil T3, que foi mais virulento ( $p < 0,0001$ ) levando a uma mortalidade de 90% das larvas após 24 h. Os demais perfis apresentaram mortalidades intermediárias, sendo que os perfis SagT4, SagT5 e SagT6 tiveram aproximadamente, 38%, 40% e 40% de sobrevivência após 96 h e não diferiram estatisticamente do perfil SagT1 ( $p < 0,05$ ). SagT2 foi o segundo perfil mais virulento com, aproximadamente, 16% de sobrevivência após o ensaio, sem diferença estatística com relação ao SagT3 ( $p < 0,05$ ) (Figura 4).

### **Resposta de *G. mellonella* à infecção com os isolados bovinos**

Os isolados considerados mais virulento (220 - SagT3) e o menos virulento (170 - SagT1) foram selecionados para realização de análises histopatológicas. Ambos isolados provocaram vigorosas respostas imunes celular e humoral próximo à região dorsal de *G. mellonella*. A análise histopatológica revelou regiões de melanização e nodulação nos tecidos pericárdio e nos corpos gordurosos (Figura A1). Estas estruturas não foram observadas no controle injetado com PBS. Além disso, pode-se observar aumento de nodulação, proliferação bacteriana, e pontos de melanização nos cortes de 6h pós-infecção quando comparados com os cortes de 1h pós infecção. Para avaliar o crescimento bacteriano no hospedeiro, a hemolinfa das larvas foi coletada em diferentes tempos após inoculação de  $10^6$  UFC das estirpes. Houve uma redução da carga bacteriana a cada ponto avaliado, tanto para SagT1 quanto para SagT3 atingindo um valor final da ordem de  $10^3$  UFC por larva (Figura A2).

### **Invasão e citotoxicidade em células MAC-T**

Para investigar como os perfis mais e menos virulento de *S. agalactiae* se comportavam frente a células de tecido bovino, a capacidade de invasão das bactérias em células bovinas MAC-T foi avaliada. Foi observado que ambos perfis de *S. agalactiae* não tiveram capacidade de invasão das células (dados não mostrados). O sobrenadante das culturas em fase pós-exponencial não teve efeito citotóxico sobre células MAC-T (dados não mostrados).



**Figura 4.** Isolados de *Streptococcus agalactiae* apresentam diferentes graus de virulência em *Galleria mellonella*. As curvas descrevem a porcentagem de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* ao longo de 96 h pós-inoculação com um exemplar de *S. agalactiae* de cada perfil MLVA encontrado durante o estudo. Observou-se que a sobrevivência das larvas variou de acordo com o isolado injetado. SagT3 provocou maior mortalidade após 96 h de injeção e SagT1 a menor mortalidade ( $p < 0,001$ ). Os demais perfis mostraram mortalidades intermediárias sendo que SagT2 não diferiu estatisticamente de SagT3 ( $p < 0,05$ ) e SagT4, enquanto SagT5 e SagT6 não foram mostraram diferença estatística em relação a SagT1 ( $p < 0,05$ ). Larvas foram injetadas com PBS para controle positivo de sobrevivência.

## DISCUSSÃO

O leite está entre os principais produtos da agropecuária brasileira e tem um papel relevante no suprimento de alimentos, na geração de emprego e na renda da população. A mastite bovina é a principal doença da pecuária leiteira. Identificar e caracterizar os patógenos em circulação permite traçar estratégias de controle da

doença, para aumento da quantidade e melhoria da qualidade do leite produzido. Isso reflete positivamente na indústria de leite e na renda dos produtores que ganham segundo a qualidade físico-química e bacteriológica do leite que vendem (Roma Júnior *et al.*, 2009).

Neste estudo foi encontrada uma alta frequência (34,2%) de *S. agalactiae* no rebanho amostrado. Prevalência semelhante (34,9%) foi observada quando 247 amostras de leite provenientes de 247 rebanhos mineiros foram analisadas (Elias *et al.*, 2012). Estudos anteriores, também conduzidos em propriedades leiteiras da Zona da Mata e Campo das Vertentes relataram o isolamento *S. agalactiae* em aproximadamente 60% delas (Brito *et al.*, 1999; dos Santos *et al.*, 2007). Alguns autores atribuem valores elevados de prevalência do patógeno à falta de higiene durante a ordenha e a falhas no controle da mastite contagiosa (Alemu *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2015), uma vez que *S. agalactiae* responde bem ao tratamento com antibióticos (Edmondson, 2011). Também foi observada uma alta frequência (16,6%) de infecções mistas causadas por *S. agalactiae* e *S. aureus* durante todo o estudo. Valores bem inferiores (5%) foram relatados em outro estudo no Brasil (Ferreira *et al.*, 2007). Em outros países, infecções mistas entre *S. agalactiae* e *S. aureus* ocorreram em 9,3% das amostras provenientes de fazendas de manejo tradicional, enquanto que em fazendas com manejo industrial, onde as medidas de higiene são mais rígidas, não houve co-isolamento desses patógenos e a frequência deles separados, foi inferior às primeiramente citadas (Goli *et al.*, 2011).

A tipagem de *S. agalactiae* por MLVA revelou seis genótipos com diferentes frequências. Análises estatísticas permitiram associar três deles (SagT1, T2 e T4) a infecções crônicas, o que pode justificar sua maior frequência no rebanho. Apesar de vários trabalhos caracterizarem molecularmente *S. agalactiae* isolados de mastite, não foram encontrados relatos que associassem um genótipo à dinâmica da infecção, o que foi possível com a metodologia utilizada. Os genótipos SagT1, T2 e T4 também foram os mais relacionados a episódios de infecção mista com *S. aureus*. No entanto, não foi possível estabelecer relação entre o isolamento desses dois patógenos e a dinâmica da infecção, sendo necessários mais estudos para inferir a existência ou não de sinergismo entre eles. Houve associação entre os genótipos relacionados com infecções crônicas, com animais que tiveram 2 ou mais partos. De forma similar, Cardozo *et al.* (2015) observaram que o número de casos de mastites subclínicas crônicas nos rebanhos aumentava com o número de partos dos animais. Animais com um maior número de

partos tendem a ter mais lesões permanentes na glândula mamária devido a infecções prévias e a apresentar infecções mais prolongadas (Bartlett *et al.*, 1990; Cardozo *et al.*, 2015).

A grande maioria dos isolados de *S. agalactiae* foi forte produtora de biofilme *in vitro*, diferentemente de relato anterior que descreve os isolados como produtores moderados (Ebrahimi *et al.*, 2013). Recentemente, Rosini e Margarit (2015) mostraram que, assim como outras bactérias Gram positivas, *S. agalactiae* é capaz de formar comunidades multicelulares que possivelmente agem como facilitadoras da persistência bacteriana frente a estresses encontrados pela bactéria. Os perfis mais frequentes no rebanho SagT1, T2 e T4 foram fortes produtores de biofilme, corroborando a ideia de que a capacidade de produzir biofilme favorece o estabelecimento de infecções bacterianas crônicas ou persistentes, proposta por Melchior *et al.* (2006) em estudos realizados com *S. aureus*. Porém, SagT3, T5 e T6, isolados que não foram relacionados com infecções persistentes também foram fortes produtores de biofilme. Para esses isolados, a produção de biofilme não teve relação com a sobrevivência do patógeno. Como a terapia com antibióticos é geralmente eficaz no controle da mastite causada por essa bactéria, mais estudos são necessários para esclarecer o mecanismo de formação de biofilme por *S. agalactiae* e sua relevância *in vivo*.

A inoculação dos diferentes perfis de *S. agalactiae* isolados do rebanho em larvas de *Galleria mellonella* mostrou virulência distinta entre eles. Não há relatos conhecidos na literatura do uso deste modelo para isolados bovinos, no entanto, o modelo foi validado e permitiu investigação da virulência em isolados humanos (Olsen *et al.*, 2011). Observou-se que o perfil mais presente no rebanho foi o menos virulento *in vivo*, enquanto o mais virulento foi um perfil isolado apenas uma vez, durante os seis meses de estudo. A comparação entre estirpes *S. aureus* causadoras diferentes manifestações de mastite revelou que no genoma de Newbold 305, responsável por uma manifestação crônica e branda, há menos genes de toxina, porém mais fatores de colonização e invasão do que RF122, o que pode explicar o fato de a estirpe Newbold 305 ter sido isolada de uma infecção mais difícil de detectar e curar. Em contraste, RF122, causador de um quadro severo, possui mais genes de toxinas, sendo portanto, mais propenso a induzir uma resposta inflamatória grave (Peton *et al.*, 2014). Supõe-se que os perfis mais e menos presentes possuam repertórios gênicos distintos que resultam na virulência distinta em larvas de *Galleria mellonella*.

Os cortes histológicos das larvas injetadas com os isolados que produziram maior (SagT3) e menor mortalidade (SagT1) permitiram observar lesão nos tecidos, caracterizadas por extensiva melanização nos corpos gordurosos e no tecido pericardial, semelhantes as observadas por Olsen. A melanização em *G. mellonella* é parte fundamental da defesa da larva contra uma variedade de patógenos (Kavannagh e Reeves, 2004). Os isolados mais (SagT3) e menos (SagT1) virulento foram recuperados da hemolinfa em contagens semelhantes ao longo do tempo pós infecção, foi observada a redução da carga bacteriana para ambos os isolados. Esta redução provavelmente é devido ao reconhecimento do patógeno por receptores celulares que se ligam a padrões moleculares associados a patógenos bacterianos (PAMPs), tais como peptidoglicano, que conduz à ativação do sistema imune inato e a eliminação da bactéria (Mukherjee *et al.*, 2010).

SagT1 e SagT3 não foram capazes de invadir células MAC-T. Foi descrito que a adesão não é importante para *S. agalactiae*, ou que o patógeno não expressa fatores de adesão *in vitro* ou ainda que células do úbere não expressam receptores de ligação à *S. agalactiae* (Lammers *et al.*, 2001). Porém a internalização de isolados bovinos em linhagens celulares humanas como células tumorais cervicais (HeLa) e epiteliais de pulmão (16Hbe) já foi descrita (Sukhnanand *et al.*, 2005; Corrêa *et al.*, 2010 Não foi observado efeito citotóxico do sobrenadante de *S. agalactiae* sobre células MAC-T. Este resultado pode ser devido aos fatores de virulência mais importantes de *S. agalactiae* serem a cápsula e outras proteínas ligadas a membrana (Nobbs *et al.*, 2009) ou ainda por que a principal toxina produzida por *S. agalactiae* -  $\beta$  hemolisina, se encontra normalmente associada à superfície do patógeno e não é secretada em abundância (Liu e Nizet, 2004).

Neste estudo foi possível encontrar associação entre frequência de isolamento e a virulência dos isolados. Foi observado que o perfil menos virulento, SagT1, foi o mais frequentemente isolado e associado a infecções persistentes. Enquanto o perfil mais virulento, SagT3, foi isolado somente uma vez durante os meses de coleta, relacionando-se a infecções flutuantes.

## **BIBLIOGRAFIA**

Afshar B, Broughton K, Creti R, Decheva A, Hufnagel M, Kriz P, Lambertsen L,

- Lovgren M, Melin P, Orefici G, Poyart C, Radtke A, Rodriguez-Granger J, Sørensen UB, Telford J, Valinsky L, Zachariadou L., Members of the DEVANI Study Group, Efstratiou A. 2011. International external quality assurance for laboratory identification and typing of *Streptococcus agalactiae* (Group B streptococci). *Journal of Clinical Microbiology*, 49:1475–1482.
- Alemu G, Almaw G, Abera M. 2014. Incidence rate of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* in subclinical mastitis at smallholder dairy cattle farms in Hawassa, Ethiopia. *African Journal of Microbiology Research*, 8:252-256.
- Awale MM, Dudhatra GB, Kumar A, Chauhan BN, Kamani DR. 2012. Bovine Mastitis: A threat to economy. *Open Access Scientific Reports*, 1:1-10.
- Bartlett PC, Miller GY, Anderson CR, Kirk JH. 1990. Milk production and somatic cell count in Michigan dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 73:2794–2800.
- Bouchard DS, 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*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79:877–885.
- Brito MAVP, Brito JRF, Ribeiro MT, Veiga VMO. 1999. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros:exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia*, 51:129-135.
- Brouillette E, Martinez A, Boyll BJ, Allen NE, Malouin F. 2004. Persistence of a *Staphylococcus aureus* small-colony variant under antibiotic pressure *in vivo*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 41:35-41.
- Cardozo LL, Neto AT, Souza GN, Picinin LCA, Felipus NC, Reche NLM, Simon EE. 2015. Risk factors for the occurrence of new and chronic cases of subclinical mastitis in dairy herds in southern Brazil. *Journal of Dairy Science*, 98:7675-7685.
- Castelani L, Martins T, Frizzarin A, Monção ACR, Azevedo HS, de Miranda MS, de Arcaro JRP, Pozzi CR. 2012. Evaluation of the prevalence and aetiology of bovine mastitis in eight dairy farms from São Paulo state. *Veterinária e Zootecnia*,

20:370-371.

Chagas LG, Melo PDC, Barbosa NG, Guimarães EC, de Brito DVD. 2012. Ocorrência de mastite bovina causada por *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp. E *Candida* sp. em uma propriedade rural no município de Indianópolis–Minas Gerais. Bioscience Journal, 28:1007-1014.

Corrêa ABA, Américo MA, Oliveira ICM, Silva LG, de Mattos MC, Ferreira AMM, Benchetrit LC. 2010. Virulence characteristics of genetically related isolates of group B streptococci from bovines and humans. Veterinary Microbiology, 143:429-433.

Cvitkovitch DG, Li YH, Ellen RP. 2003. Quorum sensing and biofilm formation in Streptococcal infections. Journal of Clinical Investigation, 112:1626–1632.

Dogan B, Schukken YH, Santisteban C, Boor KJ. 2005. Distribution of serotypes and antimicrobial resistance genes among *Streptococcus agalactiae* isolates from bovine and human hosts. Journal of Clinical Microbiology, 43:5899-5906.

Dos Santos EMP, Brito MAVP, Lange C, Brito JRF, Cerqueira MMOP. 2007. *Streptococcus* e gêneros relacionados como agentes etiológicos de mastite bovina. Acta Scientiae Veterinariae, 35:17-27.

Duarte RS, Bellei BC, Miranda OP, Brito MAV, Teixeira LM. 2005. Distribution of antimicrobial resistance and virulence-related genes among brazilian group b streptococci recovered from bovine and human sources. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49:97–103.

Ebrahimi A, Moatamedi A, Lotfalian S, Mirshokraei P. 2013. Biofilm formation, hemolysin production and antimicrobial susceptibilities of *Streptococcus agalactiae* isolated from the mastitis milk of dairy cows in Shahrekord district, Iran. Veterinary Research Forum, 4:269–72.

Edmondson P. 2011. Blitz therapy for the eradication of *Streptococcus agalactiae* infections in dairy cattle. In Practice (0263841X), 33.

- Elias AO, Cortez A, Brandão PE, da Silva RC, Langoni H. 2012. Molecular detection of *Streptococcus agalactiae* in bovine raw milk samples obtained directly from bulk tanks. *Research in Veterinary Science*, 93:34-38.
- Evans BA, Rozen DE (2012) A *Streptococcus pneumoniae* infection model in larvae of the wax moth *Galleria mellonella*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 31:2653–2660. doi:10.1007/s10096-012-1609-7.
- Ferreira JL, Lins JLFHA, Cavalcante TV, Macedo NA, Borjas ALR. 2007. Prevalência e etiologia da mastite bovina no município de Teresina, Piauí. *Ciência Animal Brasileira*, 8:261-266.
- Giannechini R, Concha C, Rivero R, Delucci I, Moreno López J. 2002. Occurrence of clinical and sub-clinical mastitis in dairy herds in the West Littoral Region in Uruguay. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 43:221-230.
- Götz F. 2002. *Staphylococcus* and biofilms. *Molecular Microbiology*, 43:1367-1378.
- Goli M, Ezzatpanah H, Ghavami M, Chamani M, Doosti A. 2012. Prevalence assessment of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* by multiplex polymerase chain reaction (M-PCR) in bovine sub-clinical mastitis and their effect on somatic cell count (SCC) in Iranian dairy cows. *African Journal of Microbiology Research*, 6:3005-3010.
- Haguenoer E, Baty G, Pourcel C, Lartigue MF, Domelier AS, Rosenau A. 2011. A multi locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) scheme for *Streptococcus agalactiae* genotyping. *BMC Microbiology*, 11:171-184.
- Indicadores IBGE 2012. Estatística da Produção Pecuária, Junho 2012.
- IBGE, 2006. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística / Pesquisa da Pecuária Municipal e Censo Agropecuário. SIDRA. Disponível em [www.sidra.ibge.gov.br](http://www.sidra.ibge.gov.br). Acesso em dezembro de 2015.
- Jain B, Tewari A, Bhandari BB, Jhala MK. 2012. Antibiotic resistance and virulence genes *Streptococcus agalactiae* isolated from cases of bovine subclinical mastitis. *Veterinarski Arhives*, 82:423-432.

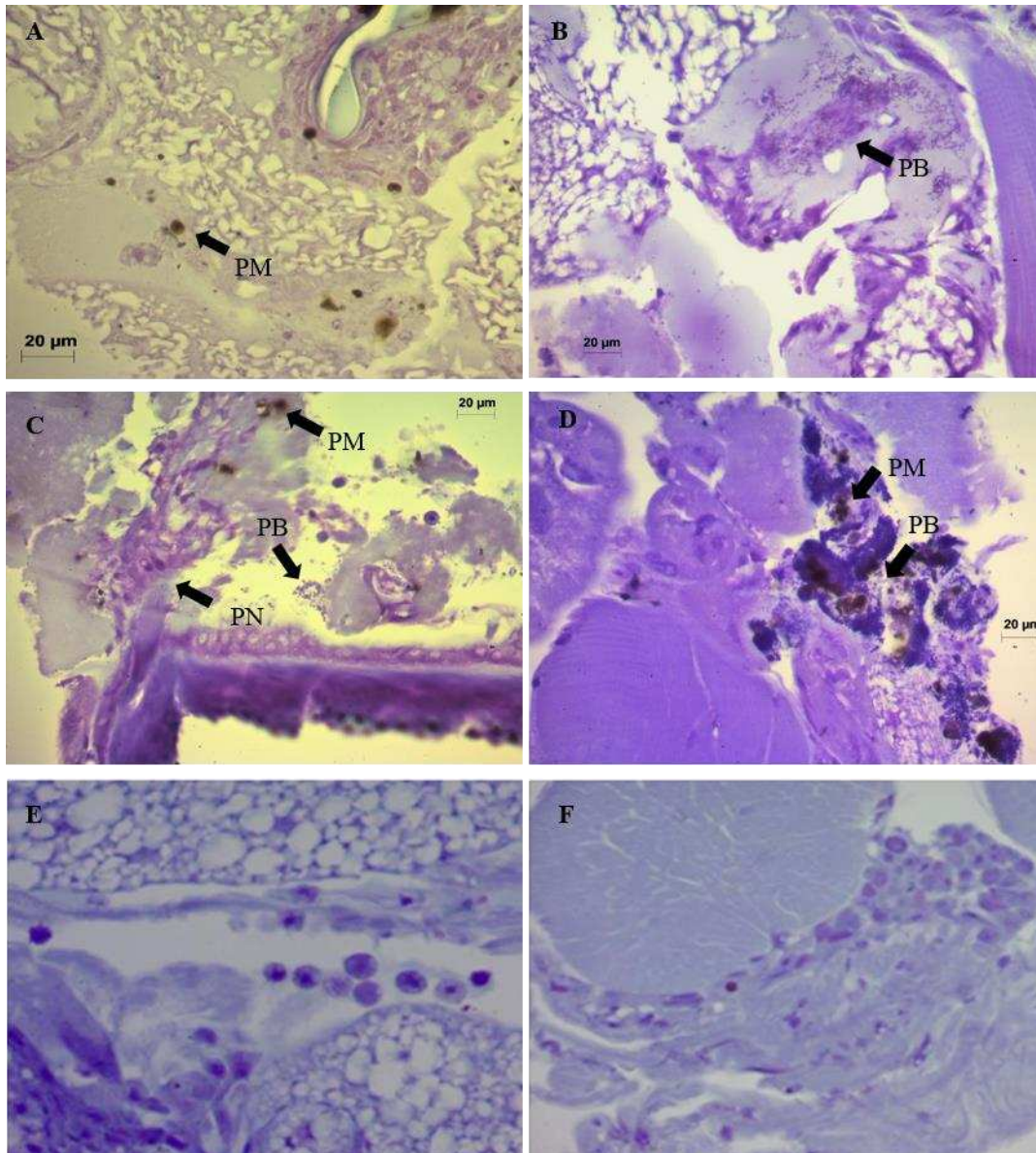
- Kavannagh K, Reeves EP. 2004. Exploiting the potential of insects for *in vivo* pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 28:101-112.
- Keefe G, Chaffer M, Ceballos A. 2011. Effects of *Streptococcus agalactiae* on the Colombian dairy industry. Third International Symposium on Mastitis and Milk Quality, St. Louis (MO). National Mastitis Council Inc, Verona (WI); American Association of Bovine Practitioners, Auburn (AL). 3:155.
- Keefe, G. 1997. *Streptococcus agalactiae* mastitis: A review. *Canadian Veterinary*, 38:429-437.
- Klein RC, Fabres-Klein MH, Oliveira LL, Feio RN, Malouin F, Ribon AOB. 2015. A C-Type lectin from *Bothrops jararacussu* venom disrupts Staphylococcal biofilms. *PLoS ONE*, doi: 10.1371.
- Kong F, Gowan S, Martin D, James G, Gilbert GL. 2002. Serotype identification of group B streptococci by PCR and sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 40:216–226.
- Lammers A, van Vorstenbosch CJ, Erkens JH, Smith HE. 2001. The major bovine mastitis pathogens have different cell tropisms in cultures of bovine mammary gland cells. *Veterinary Microbiology*, 80:255-265.
- Liu, G, Nizet, V. 2004. Extracellular virulence factors of group B streptococci. *Frontiers in Bioscience*, 9:1794-1802.
- Manning SD, Lacher DW, Davies HD, Foxman B, Whittam TS. 2005. DNA polymorphism and molecular subtyping of the capsular gene cluster of group B *streptococcus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43:6113–6116.
- Mukherjee K, Altincicek B, Hain T, Domann E, Vilcinskis A, Chakraborty T. 2010. *Galleria mellonella* as a model system for studying *Listeria pathogenesis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76:310-317.
- Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF. 2009. *Streptococcus* adherence and colonization. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73:407-450.

- Oliveira CMC, Sousa MGS, Silva NS, Mendonça CL, Silveira JAS, Oaigen RP, Andrade SJT, Barbosa JD. 2011. Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 31:104-110.
- Olsen RJ, Watkins ME, Cantu CC, Beres SB, Musser JM. 2011. Virulence of serotype M3 Group A *Streptococcus* strains in wax worms (*Galleria mellonella* larvae). *Virulence*, 1:111-119.
- Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR. 2002. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 66:86-92.
- Östensson K, Lam V, Sjögren N, Wredle E. 2013. Prevalence of subclinical mastitis and isolated udder pathogens in dairy cows in Southern Vietnam. *Tropical Animal Health and Production*, 45:979-986.
- Peton V, Bouchard DS, Almeida S, Rault L, Falentin H, Jardin J, Azevedo V. 2014. Fine-tuned characterization of *Staphylococcus aureus* Newbould 305, a strain associated with mild and chronic mastitis in bovines. *Veterinary Research*, 45:106-121.
- Pinto TCA, Costa NS, Souza ARV, Silva LGD, Corrêa ABDA, Fernandes FG, Benchetrit LC. 2013. Distribution of serotypes and evaluation of antimicrobial susceptibility among human and bovine *Streptococcus agalactiae* strains isolated in Brazil between 1980 and 2006. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 17:131-136.
- Pospiech A, Neumann B. 2005. A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. *Trends in Genetics*, 11:217-218.
- Poyart C, Tazi A, Réglie-Poupet H, Billoët A, Tavares N, Raymond J, Trieu-Cuot P. 2007. Multiplex PCR assay for rapid and accurate capsular typing of group B streptococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 45:1985–1988.

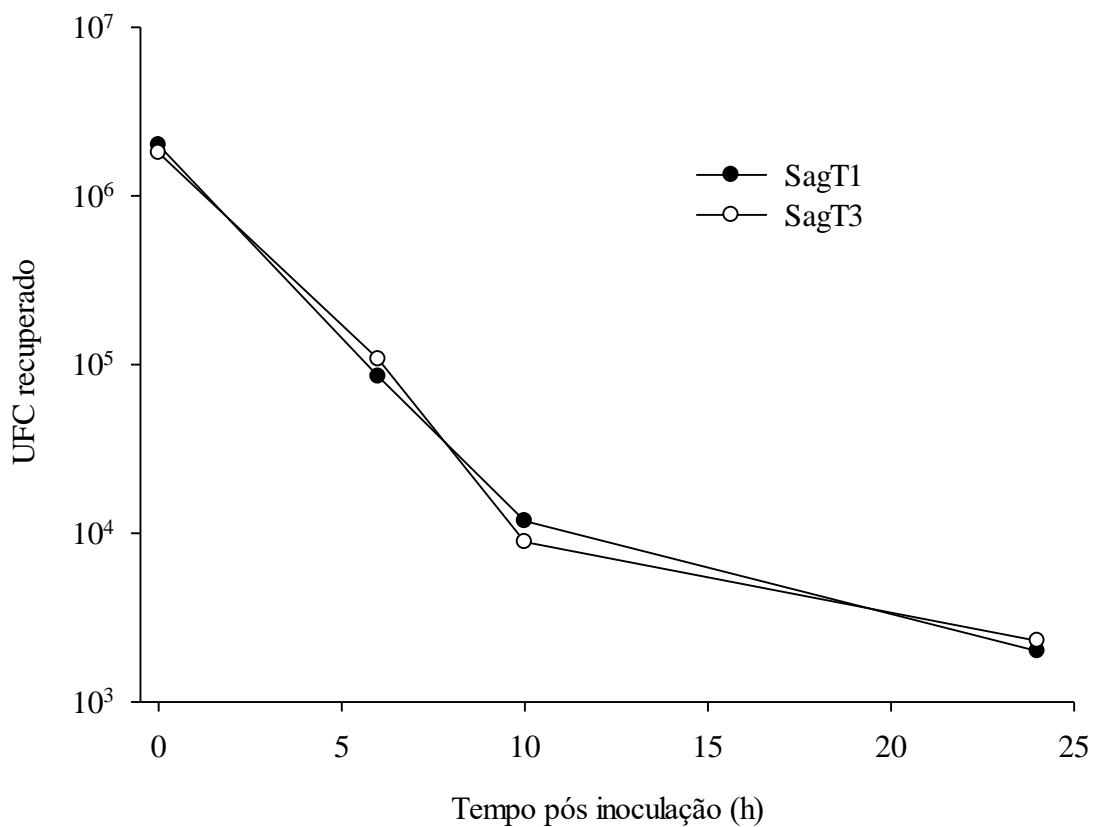
- Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR. 1994. Mastitis, p. 327-344. In:Quinn P. J., Carter M. E., Markey B. K. & Carter G. R. (ed.) Clinical Veterinary Microbiology. Wolfe Publishing, London.
- Radtke A, Lindstedt BA, Afset JE, Bergh K. 2010. Rapid multiple-locus variant-repeat assay (MLVA) for genotyping of *Streptococcus agalactiae*. Journal of Clinical Microbiology, 48:2502-2508.
- Ramarao N, Nielsen-Leroux C, Lereclus, D. 2012. The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. Journal of Visualized Experiments, 70:e4392.
- Rato MG, Bexiga R, Florindo C, Cavaco LM, Vilela CL, Santos-Sanches I. 2013. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of streptococci from bovine mastitis. Veterinary Microbiology, 161:286-294.
- Roma Júnior LC, Montoya JF, Martins TT, Cassoli LD, Machado PF. 2009. Sazonalidade do teor de proteína e outros componentes do leite e sua relação com programa de pagamento por qualidade. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 61:1411-1418.
- Rosini R, Margarit I. 2015. Biofilm formation by *Streptococcus agalactiae*: influence of environmental conditions and implicated virulence factors. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 5:6.
- Sears PM., McCarthy KK. 2003. Management and treatment of staphylococcal mastitis. Veterinary Clinical of North American Food Animal Practice, 19:171-185.
- Speziale P, Geoghegan JA. 2015. Biofilm formation by staphylococci and streptococci: structural, functional, and regulatory aspects and implications for pathogenesis. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 5:31.
- Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Čirković I, Ruzicka, F. 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by Staphylococci. APMIS, 115:891-9.

- Sukhnanand S, Dogan B, Ayodele MO, Zadoks RN, Craver MPJ, Dumas NB, Wiedmann M. 2005. Molecular subtyping and characterization of bovine and human *Streptococcus agalactiae* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 43:1177-1186.
- Yang Y, Liu Y, Ding Y, Yi L, Ma Z, Fan H, Lu C. 2013. Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis in Eastern China. *PloS One*, 8:e67755.
- Zachary JF, McGavin MD. 2013. *Pathologic basis of veterinary disease*. Elsevier Health Sciences, 5th edition, 4:198.
- Zhao Y, Liu H, Zhao X, Gao Y, Zhang M, Chen D. 2015. Prevalence and pathogens of subclinical mastitis in dairy goats in China. *Tropical Animal Health Production*, 47:429-435.

## **ANEXO**



**Figura A1.** Resposta imune de *Galleria mellonella* infectada com *Streptococcus agalactiae*. Cortes histológicos de *G. mellonella* inoculadas com  $10^6$  UFC de bactéria e coradas com hematoxilina e eosina, em tempos de 1h (Figura 6A-6B) e 6h (Figura 6C-6D) pós infecção com SagT1 (Figura 6A-6C) e SagT3 (Figura 6B-6D). As setas indicam pontos de melanização (PM), pontos de nodulação (PN) e proliferação bacteriana (PB). Controle negativo com injeção de PBS 1h (Figura 6E) e 6h (Figura 6F).



**Figura A2.** *Streptococcus agalactiae* T1 e T3 não se multiplicam dentro das larvas de *Galleria mellonella*.  $10^6$  UFC de *Streptococcus agalactiae* T1 (isolado 170/2) e T3 (isolado 220/3) foram injetados na hemocele da larva e a hemolinfa foi coletada e plaqueada nos tempos de 0, 5, 10 e 24 h pós-inoculação. Uma redução na contagem de bactérias a cada tempo avaliado foi observada. A UFC recuperada foi obtida pelo cálculo da média da contagem na hemolinfa de oito larvas, plaqueadas separadamente, por tempo de amostragem.

## **CAPÍTULO 2**

Gênomica Comparativa de Estirpes de *Staphylococcus aureus* Isoladas de Mastite Bovina Subclínica

## RESUMO

*Staphylococcus aureus* é um dos principais patógenos da mastite bovina. Pesquisas voltadas para a compreensão dos mecanismos moleculares da patogênese de *S. aureus* são fundamentais para definir características bacterianas relacionadas com as diferentes manifestações clínicas observadas na doença. Neste trabalho, foram sequenciados os genomas de quatro estirpes de *S. aureus* causadoras de mastite subclínica, sendo SAU302 e SAU 1364 isoladas de infecções persistentes e SAU170 e SAU1269 de infecções não persistentes. Uma grande conservação entre os genomas sequenciados foi encontrada como valores médios de 2,6 Mb, 32,8% de conteúdo GC e 2589 CDS. A tipagem por MLST classificou SAU170, SAU302, e SAU1364 como ST126, um tipo frequentemente encontrado em rebanhos brasileiros, e SAU1269, como ST1, associado a infecções humanas e bovinas. Aproximadamente 77% de proteínas de cada isolado foram distribuídas em famílias Cluster of Orthologous group (COG) e na anotação feita pelo SEED, foram categorizadas, em média 55% das CDSs. Análises comparativas entre os genomas sequenciados e uma referência construída com os genomas de *S. aureus* RF122 e *S. aureus* LGA251, duas estirpes isoladas de mastite bovina, revelaram uma identidade maior que 90% para a maioria dos genes anotados. A análise filogenética dos isolados sequenciados agrupou em ramos separados isolados de diferentes manifestações, sugerindo que algumas das particularidades compartilhadas entre isolados podem estar relacionados à persistência ou não das infecções causadas por eles. Analisaram-se também os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) presentes em genes de virulência, metabolismo e genes reguladores. Muitos SNPs foram encontrados em genes de adesinas, importantes por promover a adesão das células bacterianas ao hospedeiro. Um grande número de SNPs não-sinônimos foi observado na sequência de *agrC*, proteína de membrana que funciona como receptora do sinal de *quorum-sensing* em *S. aureus*. Estudos de modelagem e conceitos de redes complexas por medidas de centralidade sugeriram que algumas posições variantes eram importantes para a estrutura da proteína.

## INTRODUÇÃO

*Staphylococcus aureus* é um dos principais patógenos da mastite bovina (Castelani *et al.*, 2005), uma importante doença da pecuária leiteira que tem distribuição mundial. A mastite causada por *S. aureus* se manifesta na maioria das vezes de forma silenciosa, mas promove mudanças na composição do leite que são detectadas com testes específicos (Awale *et al.*, 2012). A ausência de sintomas relaciona-se diretamente com a alta prevalência dessa doença nos rebanhos leiteiros (Whelehan *et al.*, 2011; Sakwinska *et al.*, 2011). A infecção torna-se frequentemente persistente, não responde ao tratamento com antibióticos, sendo a segregação ou eliminação do animal, a única forma de evitar que ela se dissemine pelo rebanho. Acredita-se que as estirpes de *S. aureus* que causam infecções crônicas sejam diferentes das que causam infecções não-persistentes, sendo responsáveis por um quadro clínico persistente e menos severo, com maior possibilidade de transmissão da estirpe dominante no rebanho (Schukken *et al.*, 2011).

Esforços têm sido feitos para compreender os mecanismos moleculares da patogênese de *S. aureus* (Ben Zakour *et al.*, 2008; Zadoks *et al.*, 2011) e para associar características bacterianas com as diferentes manifestações clínicas observadas na mastite bovina (Guinane *et al.*, 2010). A comparação entre estirpes causadoras de dois tipos de manifestação subclínica mostrou que aquelas que foram isoladas de infecções persistentes produziram significativamente mais biofilme *in vitro* do que não persistentes (Veh *et al.*, 2015). Além disso, às cepas não persistentes foi associada a presença do gene codificador da enterotoxina SEG e uma maior expressão de RNAlII, relacionado com a diminuição da produção de proteínas de colonização e o aumento das secretadas.

Estudos de genômica bacteriana avançaram rapidamente nas últimas duas décadas graças à evolução das tecnologias de sequenciamento de genomas completos (WGS) (Punina *et al.*, 2015), o que aumentou o conhecimento sobre as diversidades genética e fisiológica de bactérias. *S. aureus* RF122 causador de mastite clínica severa foi a primeira estirpe de origem bovina a ter seu genoma sequenciado (Herron-Olson *et al.*, 2007). Análises genômicas comparativas revelaram um conjunto de características genéticas e moleculares específicas de clones associados com infecções bovinas, como a presença de vários elementos genômicos que não haviam sido previamente identificados em *S. aureus*, incluindo fatores de virulência homólogos a outros patógenos Gram-

positivos. Outra diferença foi a grande variação alélica obtida entre genes de virulência quando comparado a *S. aureus* isolado de infecções humanas (Herron-Olson *et al.*, 2007). Em outro estudo, a comparação entre isolados bovinos e isolados humanos encontrou 16 ORFs exclusivas da estirpe RF122, embora nenhuma delas estivesse presente em todas as 51 estirpes bovinas analisadas (Kozytska *et al.*, 2010).

A comparação entre as estirpes *S. aureus* RF122 e *S. aureus* Newbould 305, isolada de mastite clínica com manifestação crônica e branda, revelou que no genoma de Newbold 305 há menos genes de toxina, porém mais fatores de colonização e invasão do que RF122, o que pode explicar o fato de a estirpe Newbold 305 ter sido isolada de uma infecção mais difícil de detectar e curar. Em contraste, RF122 possui mais genes de toxinas, sendo portanto, mais propenso a induzir uma resposta inflamatória grave (Peton *et al.*, 2014). Recentemente, foram anunciados os genomas dos dois primeiros isolados de *S. aureus* associados à mastite subclínica (Kant *et al.*, 2015), mas nenhuma análise comparativa foi apresentada que permitisse entender a manifestação clínica apresentada pelo animal.

Os estudos citados acima expandiram o conhecimento sobre a virulência de *S. aureus*, mas também demonstraram que a presença ou ausência de um único gene não é suficiente para prever a virulência de uma estirpe. Poucos estudos exploraram até o momento o papel de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) que podem ter efeito biológico na virulência bacteriana. A genômica comparativa de 90 isolados de *S. aureus* de origem humana revelou que a variação de um único nucleotídeo na sequência do regulador *agrC*, receptor de sinal do sistema quorum sensing, atrasava a ativação do sistema reduzindo a virulência da bactéria e tornando-a mais propensa a causar infecções persistentes (Laabei *et al.*, 2014). Em *S. aureus* também já foram identificados SNPs no promotor do gene que *hla* que foram associados à hiperprodução da toxina alfa (Liang *et al.*, 2011). Essas variações permitiram a genotipagem de isolados bovinos o que identificou as bactérias mais prováveis de causarem mastite severa (Hall e Ji, 2012).

Neste trabalho, foram realizados o sequenciamento e a comparação do genoma de quatro estirpes de *S. aureus* causadoras de mastite subclínica, sendo duas (SAU302 e SAU1364) de infecções persistentes e duas (SAU170 e SAU1269) de infecções não persistentes. Definiram-se SNPs em genes de virulência e reguladores globais que podem ter relação com a persistência da doença.

## **METODOLOGIA**

### **Seleção dos isolados e extração do DNA**

Quatro isolados de *S. aureus* isolados de diferentes animais com mastite subclínica em rebanhos da Zona da Mata mineira foram selecionados para sequenciamento de seus genomas. SAU302 e SAU 1369 foram isolados de duas vacas apresentando mastite subclínica persistente, enquanto SAU170 e SAU1269 foram isolados de outros dois animais com mastite subclínica não persistente. A infecção foi considerada persistente caso fosse observada em três ou mais meses consecutivos no mesmo animal. Culturas dessas bactérias foram inoculadas em caldo infusão de coração e cérebro (Brain Heart Infusion, BHI HiMedia), crescidas a 37 °C por 16 h com agitação (180 rpm), e o DNA genômico foi extraído utilizando PureLink® Genomic DNA kit (Invitrogen), com adição de lisozima (20 µg.ml<sup>-1</sup>) (Sigma-Aldrich) no passo inicial.

### **Sequenciamento e montagem do genoma e predição de genes**

Quatro bibliotecas genômicas de 200 pb foram construídas, amplificadas usando recomendações do fabricante e sequenciadas no Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM). As *reads* resultantes do sequenciamento foram trimadas por tamanho (100 pb) e qualidade (Q20 score) e montadas *de novo* em *contigs* usando o CLC Genomics Workbench v6.5.1 (CLC bio). A partir dos *contigs* gerados, genes e proteínas foram preditos utilizando o Prodigal versão 2.50 (Hyatt *et al.*, 2010).

### **Categorização funcional e análises comparativas**

Os conjuntos de proteínas foram anotados funcionalmente usando buscas no BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) que permitiram agrupar as proteínas de cada isolado em famílias do COG (Cluster of Orthologous Groups) (Tatusov *et al.*, 2001). Os *contigs* também foram submetidos para anotação automática no servidor RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology), através de buscas por homologia no banco de dados SEED (Overbeek *et al.*, 2005). Perfis de tipagem por sequência multilocus (MLST) dos isolados de *Staphylococcus aureus* foram determinados usando o banco de dados PubMLST (<http://pubmlst.org/saureus/>) com as sequências obtidas através da anotação dos genes.

Os genomas das estirpes *S. aureus* RF122 (AJ938182) e LGA251 (FR821779)

provenientes de infecções de mastite bovina, e que estão completos e anotados foram utilizados para análises comparativas com os genomas sequenciados. Para isso, foi construída uma referência agrupando os genes e as proteínas das estirpes RF122 e LGA251. As sequências redundantes foram eliminadas utilizando o programa CD-hit (Li e Godzik, 2006), o que resultou em um conjunto de 2787 CDSs. O mesmo foi feito com as proteínas, totalizando um conjunto de 2787 sequências. Análises comparativas utilizando BLASTn e BLASTp, respectivamente, entre genes e proteínas dos isolados sequenciados versus a referência foram também conduzidas. Os resultados dos níveis de conservação dos isolados em relação à referência foram apresentados por *heat maps* construídos com usando o pacote gplots v.2.17.0 no programa R v.3.0.2.

### **Avaliação dos SNPs e relações filogenéticas entre os isolados**

Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) foram detectados utilizando CLC Genomics Workbench por mapeamento das *reads* dos isolados sequenciados no genoma da estirpe referência *S. aureus* RF122 aplicando limites de qualidade de base e cobertura mínima de 20x. Para os isolados SAU170, SAU302, SAU1269 e SAU1364 foram analisados o número de SNPs que resultam em troca de aminoácido em relação ao RF122, registrando-se também as variações conservadas e exclusivas entre os quatro genomas sequenciados. Sequências de aminoácidos de fatores de virulência, reguladores e de proteínas do metabolismo primário de *S. aureus* foram utilizadas para análise filogenética. A árvore filogenética foi calculada por Inferência Bayesiana usando o MrBayes v3.1.2 (Huelsenbeck e Ronquist, 2001). Para isso, as sequências foram alinhadas utilizando o MAFFT v7 (Kato e Standley, 2013), os alinhamentos foram manualmente inspecionados e concatenados. A árvore filogenética foi então calculada usando o método bayesiano Markov Chain Monte Carlo (MCMC), em duas corridas com 1.000.000 de gerações e usando a configuração mixed models, que testa todos os possíveis modelos de substituição de aminoácidos. A convergência dos parâmetros foi analisada ao final das corridas e 1% das árvores geradas foram descartadas no cálculo da árvore filogenética consenso. As imagens foram geradas com a ferramenta FigTree v1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

### **Análise de SNPs não sinônimos em AgrC**

A análise de mutações com possível impacto na função de AgrC foi

desenvolvida com base na estratégia VERMONT: *Visualizing mutations and their effects on protein physicochemical and topological property conservation* (Silveira *et al.*, 2014). A partir da sequência da proteína foi realizada uma busca no Protein Data Bank (PDB) (Berman *et al.*, 2000) e encontrou-se a estrutura 4BXI (Crystal structure of ATP binding domain of AgrC from *Staphylococcus aureus*), que compreende apenas parte da sequência da proteína, com 153 resíduos de aminoácidos (278-430). Para construção do conjunto de dados, foi realizada uma nova busca no PDB por estruturas semelhantes (40% similaridade) a 4BXI, que foram alinhadas estruturalmente par a par, com 4BXI, utilizando-se o MultiProt (Shatsky *et al.*, 2004). Uma representação visual para esse alinhamento foi gerada, de modo que cada sequência foi mostrada como uma linha e as posições no alinhamento, como colunas. O algoritmo Expectation Maximisation (EM) foi utilizado para aproximar as sequências semelhantes (Dempster *et al.*, 1977).

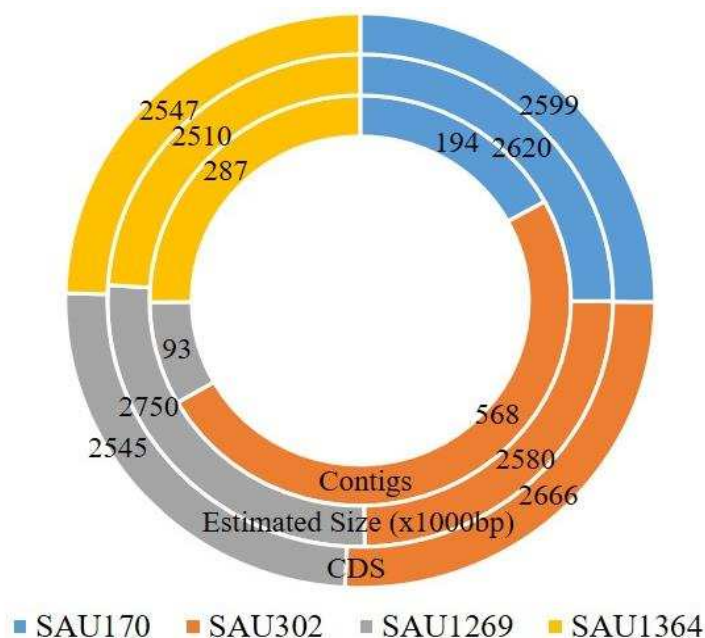
As interações entre resíduos proteicos foram analisadas por meio das modelagens de grafos. Para calcular as interações foi gerado o diagrama de Voroni seguido da triangulação de Delaunay (Poupon, 2004; Okabe *et al.*, 2009), uma abordagem geométrica independente de limiar, o que evita a oclusão. Em seguida os nós foram rotulados como carregados positivamente ou negativamente, aromático, hidrofóbico doador ou aceitor de base (Sobolev *et al.*, 1999). As arestas foram rotuladas de acordo com critério de distância e os tipos dos nós como ligação de hidrogênio, empilhamento aromático, hidrofóbica, repulsiva e ponte salina. As interações para os resíduos foram calculadas a partir dos átomos, de modo que os nós representassem os resíduos de aminoácidos e as arestas as interações, sendo o grafo não direcionado. Foram gerados grafos desse tipo para todas as estruturas do conjunto de dados. Além disso, as interações que cada resíduo estabelece com seus vizinhos estruturais foram analisadas calculando-se algumas métricas de centralidade de redes complexas utilizando o pacote iGraph do software R (Csardi e Nepus, 2006) para apontar variações de sequências potencialmente impactantes para a função.

## **RESULTADOS**

### **Sequenciamento, montagem dos genomas e análise MLST**

Quatro conjuntos de *reads* foram gerados contendo 1.422.030 para SAU170, 1.250.612 para SAU302, 2.572.399 para SAU1264 e 634.729 para SAU1369. As montagens *de novo* produziram 194 *contigs* com conteúdo CG de 32,8% para SAU170,

568 *contigs* e 32,9% CG para SAU302, 93 *contigs* e 32,7% CG para SAU1264 e 287 *contigs* e 32,7% CG para SAU1369. O tamanho dos genomas estimado pela combinação dos *contigs* variou entre 2.509.504 pb até 2.750.648 pb. A predição dos genes resultou em conjuntos contendo 2599 CDS para SAU170, 2666 CDS para SAU302, 2545 CDS para SAU1269 e 2547 CDS para SAU1364 (Figura 1). Pode-se observar uma distribuição homogênea entre os quadrantes para os tamanhos estimados dos genomas e CDS preditas o que presume uma semelhança entre os genomas sequenciados. A análise das sequências dos genes *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* e *yqil*, permitiu classificar os isolados SAU170, SAU302 e SAU1364 como pertencentes ao tipo ST126, enquanto SAU1269 foi classificado como ST1.



**Figura 1.** Montagem dos genomas de *Staphylococcus aureus* sequenciados. Na circunferência interna estão descritos os números de contigs resultantes após a montagem com o CLC Genomics Workbench, sendo cada isolado bacteriano representado por um quadrante. As circunferências central e externa representam o tamanho estimado do genoma e o número de CDSs preditas pelo Prodigal.

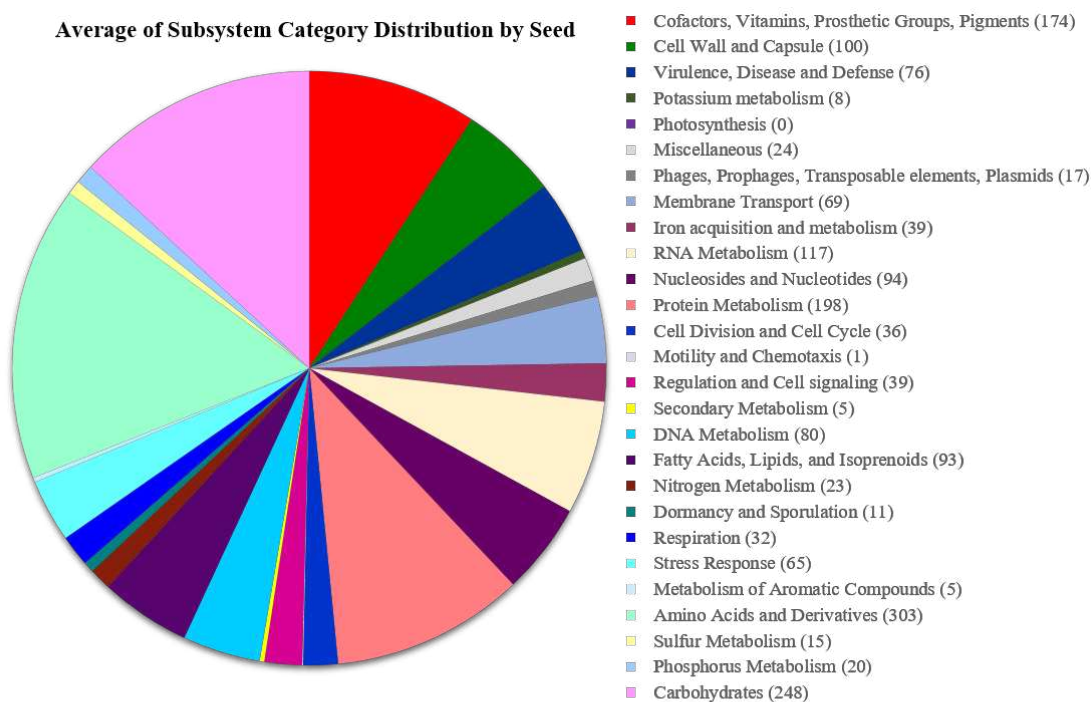
### Categorização funcional e análises comparativas

Aproximadamente 77% das proteínas foram classificadas em famílias pelo COG (Cluster of Orthologous Groups), observa-se uma distribuição similar do número de

proteínas dentro das categorias quando os quatro genomas são comparados. Uma média de 10% das proteínas dos genomas sequenciados possui função desconhecida. As categorias que agrupam proteínas relacionadas a transporte e metabolismo de aminoácido, tradução de proteínas e metabolismo de carboidratos foram as que tiveram o maior número de representantes nos quatro genomas com médias de 11%, 7% e 7%, respectivamente (dados não mostrados). Na distribuição em subsistemas pelo SEED, 55% das CDS puderam ser classificadas. Desta porcentagem, aproximadamente 95% foram classificadas como não hipotéticas e 5% como hipotéticas. As categorias que mais agruparam CDSs também foram aquelas de metabolismo de aminoácidos e derivados (16%), metabolismo de proteínas (10%) e carboidratos (13%). No subsistema de virulência, doença e defesa estavam presentes 68 CDS para SAU170, 83 para SAU302 e SAU1269, e 76 para 1364 (Figura 2).

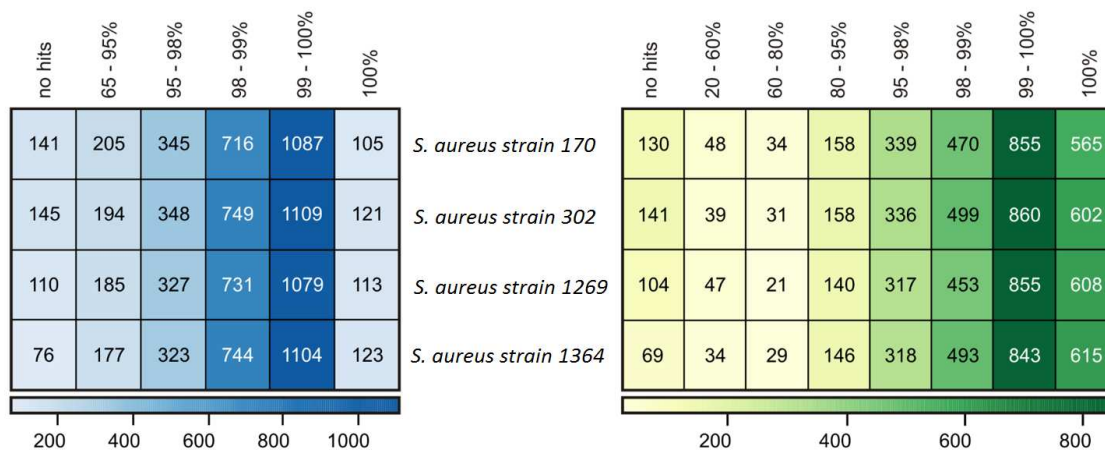
Análises comparativas entre os genomas foram realizadas de forma indireta, comparando os quatro genomas com a referência construída (genomas de *S. aureus* RF122 e *S. aureus* LGA251). Quando alinhados genes e proteínas preditos dos genomas sequenciados contra os da referência, pode-se observar que distribuições semelhantes nas faixas de identidade consideradas (Figura 3). Um total de 87% dos genes de SAU170 e SAU302 possui mais de 95% de identidade com os genes da referência, valores próximos aos encontrados para SAU1269 e SAU1364, que foram de 88% e 90%. Para os genomas de SAU170, SAU302, SAU1269 e SAU1364, 5%, 5%, 4% e 3% dos genes não mostraram alinhamento com a referência, respectivamente. Resultados semelhantes foram observados na análise das proteínas, as quais 86%, 86%, 88% e 89%, para os genomas SAU170, SAU302, SAU1269 e 1364 apresentaram identidade maior que 95% com as proteínas da referência (Figura 3).

Average of Subsystem Category Distribution by Seed



Subsystem Features Counts	SAU170	SAU302	SAU1269	SAU1364
Cofactors, Vitamins, Prosthetic Groups, Pigments	178	178	181	158
Cell Wall and Capsule	105	95	104	97
Virulence, Disease and Defense	75	68	83	76
Potassium metabolism	9	6	9	9
Photosynthesis	0	0	0	0
Miscellaneous	26	14	29	27
Phages, Prophages, Transposable elements, Plasmids	21	19	25	1
Membrane Transport	63	69	77	65
Iron acquisition and metabolism	40	40	38	38
RNA Metabolism	115	116	120	116
Nucleosides and Nucleotides	99	83	99	95
Protein Metabolism	196	196	195	204
Cell Division and Cell Cycle	38	28	39	37
Motility and Chemotaxis	1	1	1	1
Regulation and Cell signaling	36	40	43	35
Secondary Metabolism	4	4	7	4
DNA Metabolism	79	82	77	82
Fatty Acids, Lipids, and Isoprenoids	97	97	99	79
Nitrogen Metabolism	22	23	23	22
Dormancy and Sporulation	11	11	11	11
Respiration	31	31	33	33
Stress Response	50	69	72	67
Metabolism of Aromatic Compounds	4	5	5	5
Amino Acids and Derivatives	311	292	316	292
Sulfur Metabolism	14	13	17	14
Phosphorus Metabolism	23	23	23	10
Carbohydrates	252	248	249	244

**Figura 2.** Categorização funcional das CDSs dos genomas de *Staphylococcus aureus* sequenciados pelo banco de dados SEED. O gráfico representa uma média das distribuições das CDSs para os quatro genomas. A distribuição das CDSs nas categorias está apresentada individualmente na tabela localizada na parte inferior da figura.

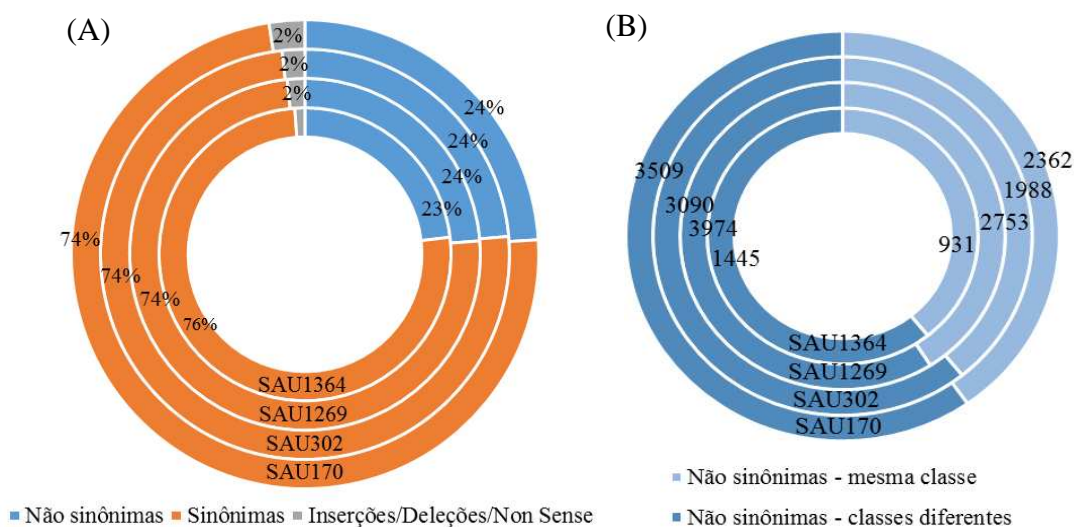


**Figura 3.** Alinhamento entre genes e proteínas dos isolados de *Staphylococcus aureus* sequenciados contra referência construída com os genomas de *Staphylococcus aureus* RF122 e *Staphylococcus aureus* LGA251. O *heat map* foi construído com a distribuição do número de genes (azul) e proteínas (verde) de cada isolado que apresentavam as faixas de identidade avaliadas.

### Avaliação dos SNPs e relações filogenéticas

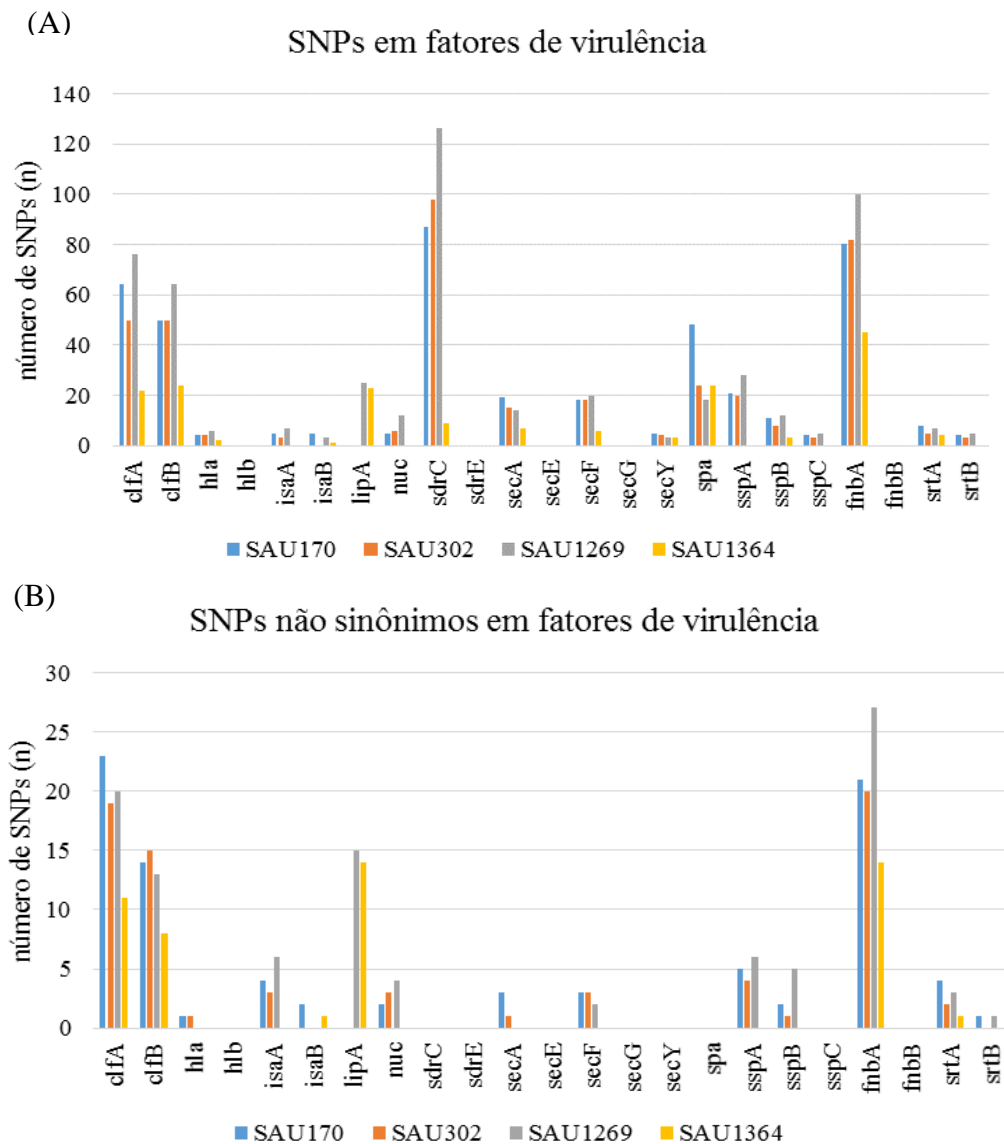
Foram identificados 24.686 SNPs nas regiões codificadoras do genoma de SAU170, 21.509 em SAU302, 28.015 em SAU1269 e 10.268 em SAU1364 com relação ao genoma referência *S. aureus* RF122. Deste total, entre 74% e 76% foram alterações silenciosas que não resultaram em mudanças de aminoácidos (Figura 4A). Apesar de o número total de SNPs ser diferente, observa-se que a distribuição dos tipos de SNPs é semelhante entre os quatro isolados de *S. aureus*, onde a maioria é não sinônima e a minoria representa inserções, deleções e trocas sem sentido. 6273 SNPs em SAU170, 5481 em SAU302, 7420 em SAU1264, 2491 em SAU1369 implicam em trocas de aminoácidos, podendo ser elas entre aminoácidos da mesma classe ou aminoácidos de classes diferentes (Figura 4B). Inserções, deleções e nonsense também foram consideradas como trocas de aminoácidos (dados não mostrados). A maior parte das trocas não sinônimas ocorreu entre aminoácidos de mesma classe.

A distribuição dos SNPs foi bastante similar entre os isolados, não permitindo diferenciar entre isolados de manifestações diferentes. A fim de investigar, mais minuciosamente, se isolados de manifestações persistentes e não-persistentes apresentavam diferenças em relação aos SNPs, genes codificadores de fatores de virulência, reguladores e proteínas do metabolismo primário foram contrastados (Figura A1).



**Figura 4.** Distribuição de polimorfismos de nucleotídeo único nos genomas sequenciados de *Staphylococcus aureus*. (A) A percentagem de SNPs está representada por isolado e por tipo. (B) Número de SNPs que resultam em trocas de aminoácidos de mesma classe ou de classes diferentes.

Dos 23 genes de virulência estudados, vários SNPs foram detectados em SAU170 (438), SAU302 (393), SAU1269 (535) e SAU1364 (173). Quatro genes relacionados com adesão, a saber, *clfA*, *clfB*, *sdrC* e *fnbA*, foram os que apresentaram maior número de SNPs, com mais 60 variações de nucleotídeos em suas sequências (Figura 5A). Não foram observados SNPs nos genes *hly*, *sdrE*, *secE*, *secG* e *fnbB*. Quando analisados os SNPs não sinônimos, os genes com maiores variações mais uma vez foram os de adesão como *clfA*, *clfB* e *fnbA*, e o gene *lipA*. Embora SNPs tenham sido observados nos genes *sdrC* e *spa*, não houve SNPs não sinônimos em suas sequências (Figura 5B).



**Figura 5.** Análise de polimorfismo de nucleotídeo único em genes de virulência de *Staphylococcus aureus*. (A) Número total de SNPs em relação aos quatro genomas sequenciados. (B) Número de SNPs não sinônimos encontrados nos genes de virulência dos isolados estudados.

As comparações entre o número de SNPs encontrados da análise dos genes de virulência nos quatro genomas sequenciados estão apresentadas na Tabela 1. No total, 85 SNPs não sinônimos estão presentes em SAU170, 77 em SAU302, 87 em SAU1269 e 35 em SAU1364, sendo 18 comuns aos quatro isolados. Nove SNPs são exclusivos para SAU170, 6 para SAU302, 48 para SAU1269 e nenhum para SAU1364. Também foram encontrados SNPs comuns entre SAU170 e SAU1269 (mastite não persistente) e

SAU302 e SAU1364 (mastite persistente), num total de 48 e 31, respectivamente. Porém, quando avaliados SNPs que são exclusivos a SAU170 e SAU1269 esse número cai para 8, enquanto nenhum foi encontrado nos isolados persistentes (Tabela A1 e A2).

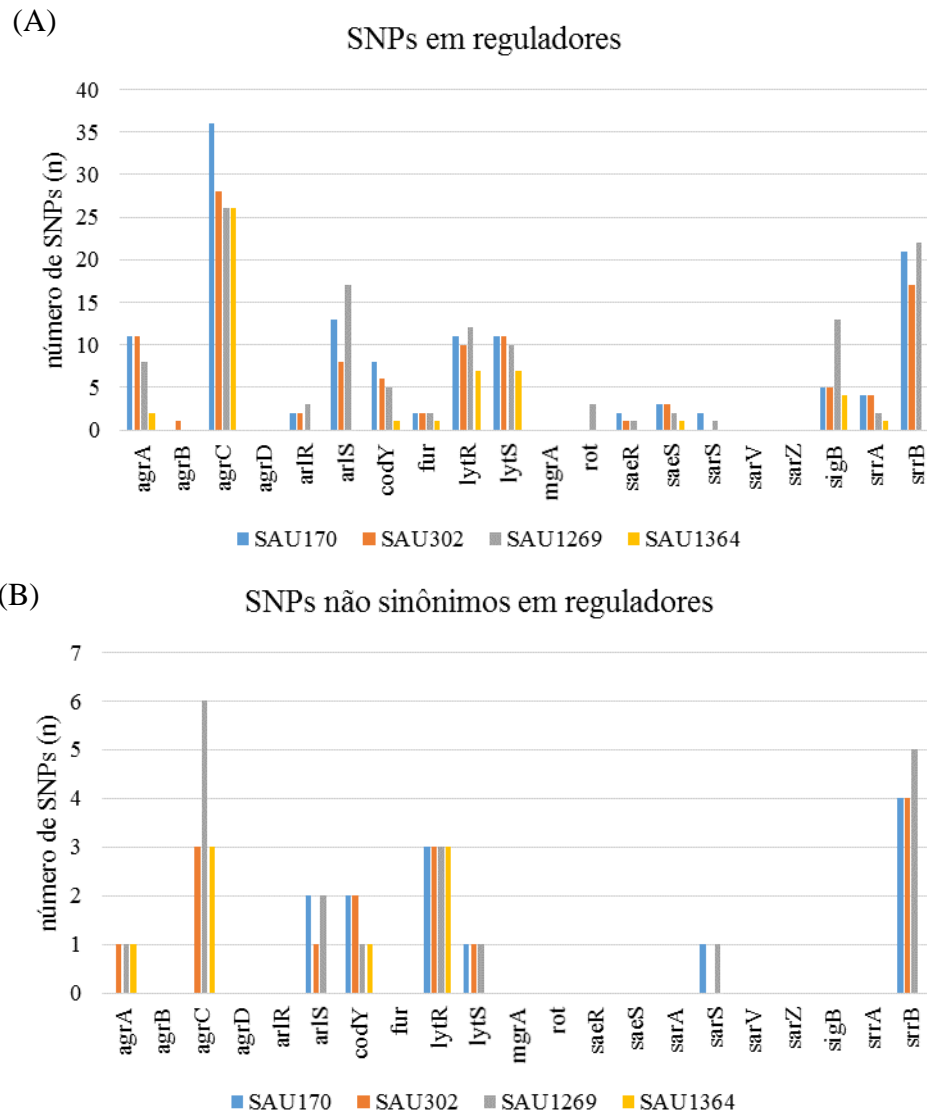
**Tabela 1.** Número de SNPs, que resultam em troca de aminoácidos, comuns entre os isolados de *Staphylococcus aureus* para os genes de fatores de virulência analisados.

	<b>SAU170</b>	<b>SAU302</b>	<b>SAU1269</b>	<b>SAU1364</b>	<b>EXCLUSIVOS</b>
<b>SAU170</b>	85 <sup>a</sup>	65	48	35	9 <sup>b</sup>
<b>SAU302</b>	65	77 <sup>a</sup>	40	31	6 <sup>b</sup>
<b>SAU1269</b>	48	40	87 <sup>a</sup>	20	48 <sup>b</sup>
<b>SAU1364</b>	35	31	20	35 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Número total de SNPs.

<sup>b</sup> Número de SNPs exclusivos.

Os 20 genes reguladores analisados mostraram números consideravelmente menores de SNPs quando comparado ao isolado *S. aureus* RF 122, sendo no total 131 para SAU170, 109 para SAU302, 127 para SAU1269 e 50 para SAU1364. Se considerarmos apenas os SNPs não sinônimos, esse número cai para 12, 15, 20 e 8, respectivamente, com 2 SNPs sendo comuns a todos os isolados presentes na sequência de *lytR* (Figura 6). *agrD*, *mgrA*, *sarV* e *sarZ* não possuem variações em sua sequência com relação a RF122. Os genes de reguladores que mais apresentaram SNPs não sinônimos foram *agrC* e *srrB*. O isolado SAU1364 foi o único que possui variações exclusivas (Tabela 2). A comparação entre os isolados mostrou que 10 SNPs são comuns entre aqueles de mastite não persistente, sendo 2 exclusivos. Entre os isolados persistentes, 8 SNPs são comuns e 3 exclusivos, sendo que estes últimos estão presentes na sequência de *agrC* (Tabela A1 e A2).



**Figura 6.** Análise de polimorfismo de nucleotídeo único em genes de reguladores globais de *Staphylococcus aureus*. (A) Número total de SNPs em relação aos quatro genomas sequenciados. (B) Número de SNPs não sinônimos encontrados nos genes reguladores dos isolados estudados.

**Tabela 2.** Número de SNPs, que resultam em troca de aminoácidos, comuns entre os isolados de *Staphylococcus aureus* para os genes de reguladores analisados.

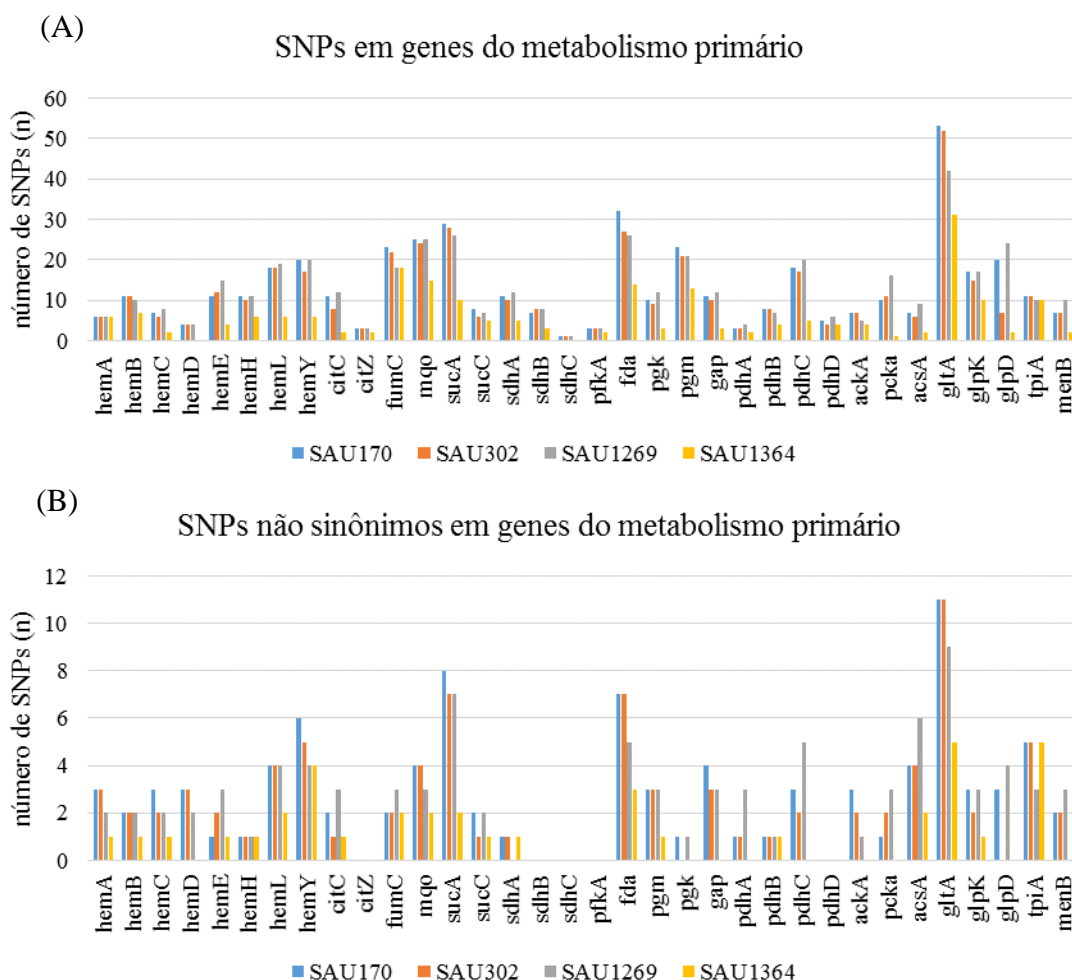
	SAU170	SAU302	SAU1269	SAU1364	EXCLUSIVOS
SAU170	12 <sup>a</sup>	11	10	4	0 <sup>b</sup>
SAU302	11	15 <sup>a</sup>	9	8	0 <sup>b</sup>
SAU1269	10	9	20 <sup>a</sup>	3	9 <sup>b</sup>
SAU1364	4	8	3	8 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Número total de SNPs.

<sup>b</sup> Número de SNPs exclusivos.

SNPs na sequência de 34 genes codificadores de enzimas do metabolismo primário foram analisados. Todos os genes apresentaram SNPs em sua sequência, sendo exceção somente os genes *hemD* e *sdhC* do isolado SAU1364. Foram encontrados no total 451 SNPs em SAU170, 412 em SAU302, 449 em SAU1269 e 209 em SAU1364. No entanto, foi possível observar que a maior parte dos SNPs encontrados eram sinônimos, sendo que apenas o gene *gltA*, codificador da enzima citrato sintase, possuía mais que 10 variações não sinônimas em sua sequência (Figura 7).

Apenas isolados não persistentes possuíam SNPs exclusivos em sua sequência, sendo 4 em SAU170 e 24 em SAU1269. 65 SNPs foram observados como comuns entre os isolados não persistentes e 38 entre os persistentes (Tabela 3). Encontraram-se oito SNPs exclusivos entre SAU170 e SAU1269 (não persistentes) enquanto não foram observados SNPs exclusivos entre os persistentes (Tabela A1 e A2).



**Figura 7.** Análise de polimorfismo de nucleotídeo único em genes de metabolismo de *Staphylococcus aureus*. (A) Número total de SNPs em relação aos quatro genomas sequenciados. (B) Número de SNPs não sinônimos encontrados nos genes dos isolados estudados.

**Tabela 3.** Número de SNPs, que resultam em troca de aminoácidos, comuns entre os isolados de *Staphylococcus aureus* para os genes de metabolismo analisados.

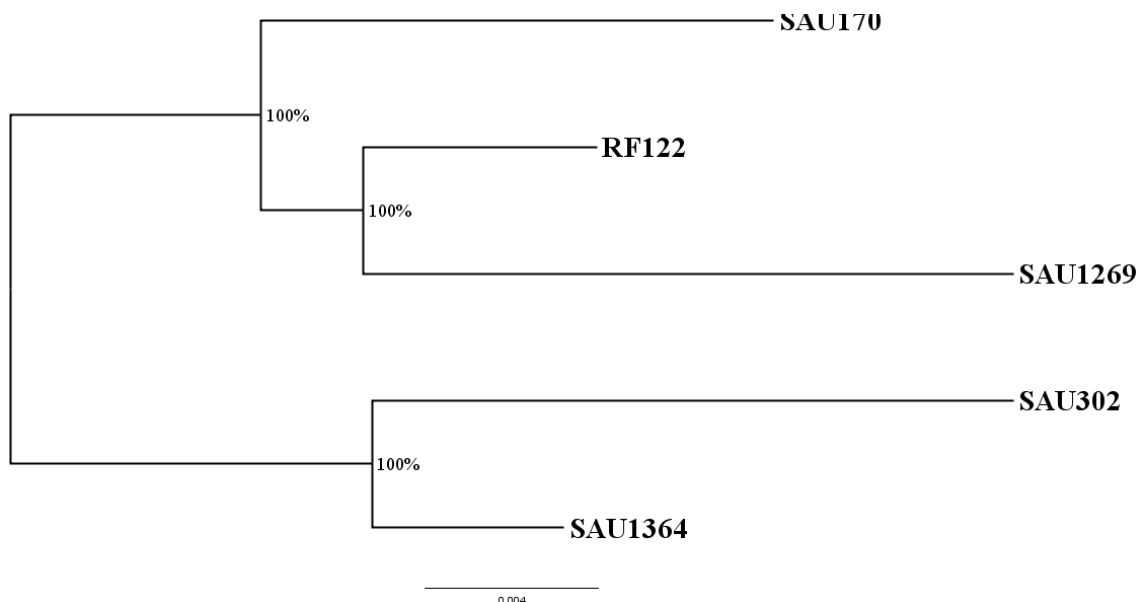
	SAU170	SAU302	SAU1269	SAU1364	EXCLUSIVOS
SAU170	93 <sup>a</sup>	81	65	38	4 <sup>b</sup>
SAU302	81	83 <sup>a</sup>	59	38	0 <sup>b</sup>
SAU1269	65	59	91 <sup>a</sup>	24	24 <sup>b</sup>
SAU1364	38	38	24	38 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Número total de SNPs.

<sup>b</sup> Número de SNPs exclusivos.

As seqüências das 77 proteínas estudadas foram concatenadas para construção

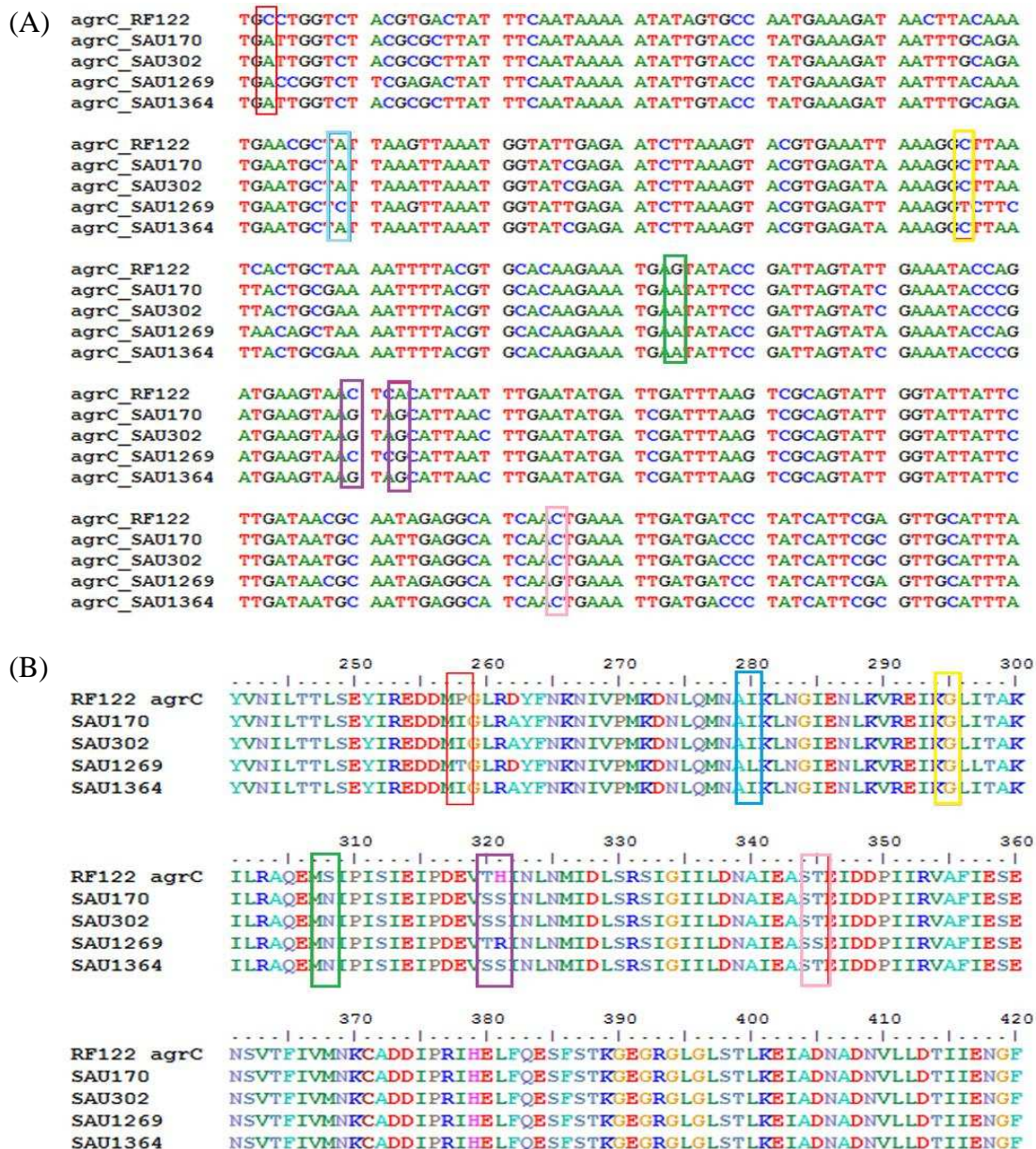
de uma árvore filogenética por inferência Baeynsiana, que separou em ramos diferentes os isolados persistentes (SAU302 e SAU1364) e os não persistentes (SAU170 e SAU1269). *S. aureus* RF122 foi agrupado com os isolados não persistentes, ficando mais próximo a SAU1269 (Figura 8).



**Figura 8.** Relação evolutiva entre as estirpes de *Staphylococcus aureus* baseada nas proteínas associadas ao metabolismo, regulação e fatores de virulência. A árvore consenso majoritária foi obtida por Inferência Bayesiana a partir de 77 proteínas. Os valores de probabilidade posterior calculados pelo MrBayes estão apresentados ao lado de cada nó da árvore filogenética. 0.004 - substituições esperadas por sítio do alinhamento.

### **Análise de SNPs não sinônimos em AgrC**

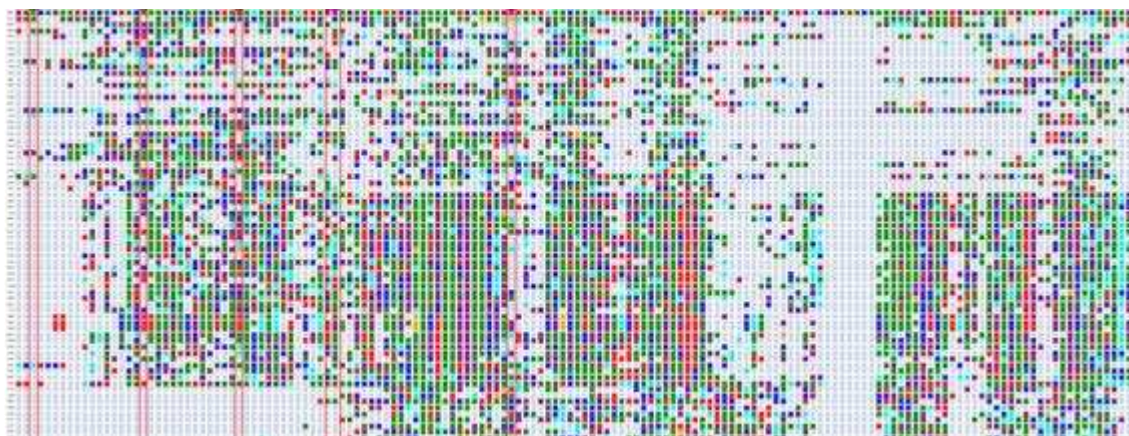
Nove SNPs não sinônimos foram encontrados nas sequências de *agrC* dos quatro genomas estudados, três deles em SAU302 e SAU1364, seis em 1269, sendo que SAU170 não apresentou variação em relação à estirpe RF122 com a cobertura mínima de 20X (Figura 9).



**Figura 9.** Alinhamento das sequências gênica e proteica do regulador AgrC. (A) Alinhamento das sequências de nucleotídeos de agrC dos isolados sequenciados. (B) Alinhamento das sequências de aminoácidos de agrC. As caixas de mesma cor identificam os SNPs não sinônimos e as trocas de aminoácido resultantes nas sequências proteicas.

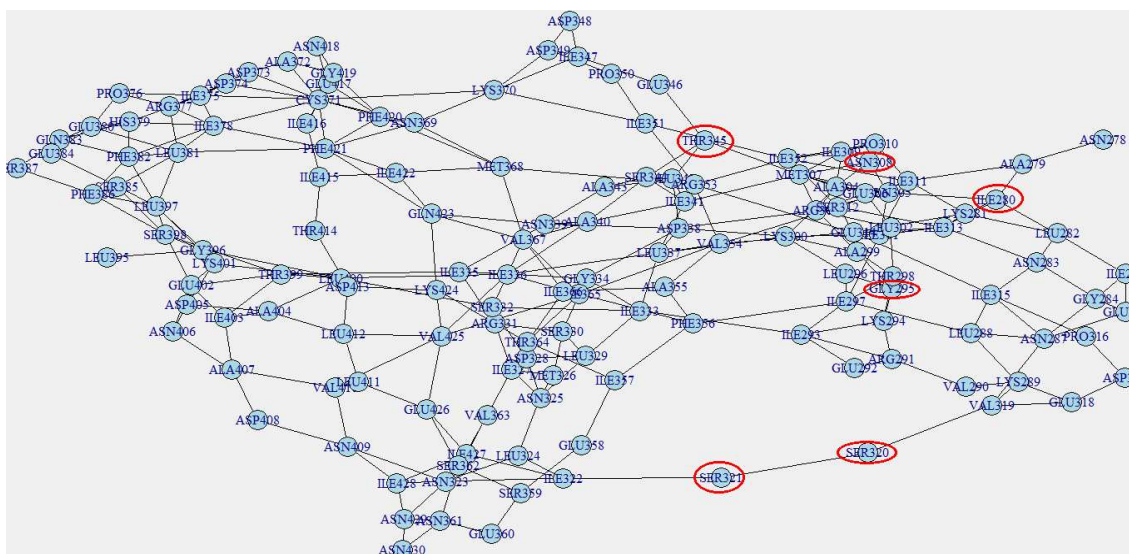
A importância desses aminoácidos variáveis na estrutura de AgrC foi avaliada, utilizando a estrutura parcial desta proteína depositada do banco de dados de proteínas, designada 4BXI. Foram encontradas 82 estruturas semelhantes à 4BXI, por meio de busca por similaridade de estrutura, com pelo menos 40%, que permitiu a construção do banco de dados. A partir do alinhamento das estruturas par a par foi construída a representação do banco de dados no qual são destacadas as colunas que representam

seis posições variantes (Figura 10). Analisando o padrão de cores da imagem é possível distinguir regiões mais e menos conservadas entre as proteínas do conjunto de dados. Pode-se observar que há baixa conservação nas posições variantes entre os genomas sequenciados e RF122.



**Figura 10.** Representação visual do alinhamento estrutural par a par da estrutura do domínio de ligação à ATP da proteína AgrC de *Staphylococcus aureus* (4BXI) com 82 proteínas do PDB com 40% de similaridade. As seis posições de aminoácidos variantes (258, 280, 295, 308, 321, 345- Figura 9B) estão identificadas por caixas vermelhas.

As inferências com relação a um possível efeito biológico produzido pelas variações encontradas nos genomas foram feitas a partir do conjunto de proteínas modeladas como grafo, utilizando conceitos de redes complexas para análise (Figura 11). Para cada resíduo foram calculadas medidas de centralidade sendo elas o grau, que é o número de ligações incidentes sobre um nó; a proximidade, representa a média da distância a partir de um nó até todos os outros nós e a intermediação, mede o quanto um nó está presente em caminhos que conectam outros vértices. Nas trocas de aminoácidos Ile280Leu, Gly295fs, Ser280Asn, Thr320Ser, His321Ser, His321Arg, Thr354Ser foram analisadas as medidas de centralidade para definir o papel local e global da troca de um aminoácido em relação à estrutura proteica (Tabela 4).



**Figura 11.** Proteína 4BXI modelada como grafo. Estão destacadas as posições onde polimorfismos de nucleotídeo único presentes nos genomas dos isolados de *Staphylococcus aureus* sequenciados promoveram trocas de aminoácidos na proteína AgrC em relação à *S. aureus* RF122.

**Tabela 4.** Frequências e medidas de centralidade dos resíduos variantes em AgrC.

Troca de aa	Freq.Origem (%)	Freq. Destino (%)	Intermediação *	Proximidade*	Grau*
Ile280Leu	44	44	870	9,2E-4	5,0
Gly295fs	29	fs**	497	1,2E-3	4,6
Ser308Asn	25	25	103	7,8E-4	3,2
Thr320Ser	20	20	334	9,2E-4	3,3
His321Ser	6	15	369	9,5E-4	3,7
His321Arg	6	6	369	9,5E-4	3,7
Thr345Ser	20	20	258	1,3E-3	4,1

\* Média dos valores calculados para o resíduo.\*\*

As trocas Ile280Leu, Ser308Asn, Thr320Ser e Thr345Ser além de apresentarem frequências iguais dos resíduos de origem e destino dentro do banco de dados, aconteceram entre resíduos pertencentes a mesma classe de aminoácidos, com características físico-químicas semelhantes, o que leva a crer que essas mudanças sejam bem toleradas entre as bactérias. Já a mudança no resíduo 295 que implica em alteração de fase de leitura da proteína, ocorreu graças a uma inserção de uma timina na sequência de SAU1269, porém quando observamos o alinhamento, uma glicina conservada entre todos os isolados é mantida nesta posição. A troca His321Ser ocorreu entre aminoácidos de classes diferentes e finalmente His321Arg são resíduos observados em baixa frequência, nesta posição, no banco de dados. Na imagem do grafo

ainda pode ser observado que o resíduo 321 posiciona-se ligando duas grandes porções da molécula. Todas essas características tornam essas posições alvos interessantes para estudos posteriores que avaliem se elas implicam em efeitos biológicos entre os isolados bacterianos.

## DISCUSSÃO

Estudos em genomas bacterianos têm fornecido informações sobre potenciais determinantes de virulência, permitindo aumentar o conhecimento sobre os mecanismos de patogenicidade, o que auxilia na identificação de alvos para o desenvolvimento de antimicrobianos, vacinas e metodologias de diagnósticos (Punina *et al.*, 2015). Até fevereiro de 2016, mais de 47.000 projetos de sequenciamento de genoma bacterianos foram iniciados, e aproximadamente 28.000 foram concluídos (GOLD – Genome Online Database <http://www.genomesonline.org>; Punina *et al.*, 2015). No banco de dados do NCBI, no mesmo período, foram encontrados 5578 genomas de *S. aureus* montados, dos quais 91 estavam completos e anotados. Porém, apenas dois, *S. aureus* RF122 (ST151) (Herron-Olson *et al.*, 2007) e *S. aureus* LGA251 (ST425) (García-Alvarez *et al.*, 2011), eram de isolados de origem bovina.

Os genomas sequenciados de *S. aureus* disponíveis no NCBI possuem em média 2,8 Mb, com 32,8% de conteúdo GC e 2810 CDS. A montagem das *reads* sequenciadas neste trabalho resultou em genomas com valores muito próximos ao citado acima. Quando comparados aos isolados bovinos *S. aureus* RF122 e *S. aureus* LGA251 observa-se maior semelhança, pois esses possuem tamanhos ligeiramente menores que a média, em torno de 2,7 Mb.

Estirpes de *S. aureus* podem ser genotipadas por diferentes técnicas, sendo a tipagem por sequenciamento multilocus (MSLT) uma das mais empregadas, onde sete genes conservados do metabolismo são sequenciados e analisados em um banco de dados para a definição do tipo da sequência (ST). Isso permite aos pesquisadores obter dados sobre a disseminação mundial do patógeno e determinar a prevalência e os STs mais comuns em rebanhos. Os isolados SAU170, SAU302 e SAU1364 foram classificados como ST126, enquanto SAU1269 foi definido como ST1. A predominância desses STs em rebanhos brasileiros já havia sido demonstrada por Rabello *et al.*, (2007) e Silva *et al.*, (2013). Sabe-se que clones pertencentes ao ST1

podem ser isolados tanto de infecções bovinas quanto infecções humanas, enquanto ST126 está fortemente associado a infecções bovinas, sendo mais frequentemente detectados em amostras de leite de animais com mastite (Smith *et al.*, 2005).

Mais de 70% dos genes puderam ser agrupados em categorias específicas do COG, resultado semelhante ao descrito para os genomas de *S. aureus* bovinos RF122 e Newould 305 (Peton *et al.*, 2014). As categorias nas quais os genes foram agrupados mais abundantemente foram funções gerais preditas, função desconhecida, transporte e metabolismo de aminoácidos e proteínas, e carboidratos. Na anotação feita pelo SEED, em média 55% das CDSs foram categorizadas para os genomas sequenciados, enquanto que para o genoma de RF122 isso aconteceu em 61% delas (SeedViewer; <http://www.phantome.org/PhageSeed/seedviewer.cgi?page=Organism&organism=273036.3>). A distribuição entre eles foi semelhante e ocorreu principalmente em subsistemas relacionados ao metabolismo de carboidratos e aminoácidos.

Estudos de genômica comparativa, geralmente analisam o conteúdo gênico observando a presença e ausência de genes dentro das sequências contrastadas (Baba *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 2012). No entanto, quando essa comparação é feita entre genomas montados em *contigs* isso pode ser imprudente. Um gene identificado como ausente em uma das sequências pode ter sido evolutivamente eliminado daquele isolado, como observado por Herron-Olsen *et al.*, (2007), ou pode simplesmente não ter sido coberto durante o sequenciamento. Por isso, optou-se por não fazer nesse trabalho uma comparação direta entre os genomas sequenciados. Assim, foi construída uma referência agrupando o conteúdo gênico e proteico dos dois isolados *S. aureus* bovinos completos e anotados disponíveis no NCBI.

A comparação dos isolados sequenciados com a referência construída mostrou uma conservação superior a 80% do conteúdo de genes e proteínas, além de uma distribuição semelhante entre os quatro isolados. Espera-se grande semelhança entre isolados vindos do mesmo rebanho. Isso é consistente com o que já foi descrito para o genoma de *S. aureus*, onde se observa a presença de uma porção conservada em mais de 95% das estirpes, que compreende aproximadamente 75% do total dos genes. Esta porção do genoma está associada principalmente, com genes constitutivos responsáveis pelo crescimento e sobrevivência da bactéria (Lyndsay *et al.*, 2006; Wolf *et al.*, 2011).

Na porção variável do genoma central estão os genes envolvidos na patogênese como os fatores de virulência e elementos reguladores, e que embora mostrem variação

no conteúdo entre diferentes estirpes de *S. aureus*, são tipicamente estáveis (Lyndsay *et al.*, 2006; Wolf *et al.*, 2011). Esses 25% restantes do genoma são compostos também por genes variáveis, ou acessórios, transportados por elementos genéticos móveis. Estes elementos - bacteriófagos, ilhas de patogenicidade, cassete cromossômico estafilocócico (SCC), plasmídeos, e transposons - são transferidos horizontalmente e contribuem para a heterogeneidade genética de *S. aureus* e, conseqüentemente, relacionam-se a adaptação a nichos e a virulência (Lyndsay *et al.*, 2004; Wolf *et al.*, 2011). A anotação com o SEED mostrou a presença de CDS no subsistema fagos, profagos, elementos tranponíveis e plasmídeos, sendo 21, 19, 25 e 1 CDS em SAU170, 302, 1269 e 1364, respectivamente. No genoma de RF122, que causa mastite clínica severa, foram encontrados vários elementos genéticos móveis onde estavam genes de virulência (Herron-Olson *et al.*, 2007) o mesmo foi observado para o genoma de Newbold305, causador uma manifestação branda e silenciosa (Peton *et al.*, 2014).

A patogênese de *S. aureus* é muito complexa e a sua virulência depende da produção de uma série de fatores de virulência cujas expressões são coordenadamente controladas por diversos reguladores globais (Oscarsson *et al.*, 2015). Ainda não é conhecido como ocorre a regulação desses fatores nas diferentes manifestações clínicas observadas nos animais, porém alguns estudos já conseguiram associar a presença de genes de virulência com os sintomas. A comparação entre genomas de estirpes de *S. aureus* isoladas de mastite gangrenosa ou subclínica em ovelhas mostrou que o isolado de mastite gangrenosa possuía versões variantes de uma série de genes entre eles fatores de virulência, distinguíveis por MLVA, além de não apresentar o gene codificador da proteína de ligação ao fibrinogênio proteína B (*fnbB*) (Vautor *et al.*, 2009). Em outro trabalho onde isolados causadores dos mesmos tipos de mastite foram comparados, os resultados indicaram que o conteúdo de elementos genéticos móveis, genes de vias de metabolismo do ferro, de reguladores e de produção exoproteína variavam entre os isolados das diferentes manifestações. Em particular, o isolado de mastite gangrenosa produziu níveis relativamente elevados de exoproteínas, incluindo toxinas e proteases conhecidas como sendo importantes para virulência (Le Maréchal *et al.*, 2011). Embora o fator hospedeiro não pudesse ser descartado, os dados obtidos pelos pesquisadores suportaram a hipótese que diferentes estirpes de *S. aureus*, com diferentes conteúdos gênicos, podem ter potenciais de virulência diferentes em mastite de ruminantes.

A análise filogenética dos isolados sequenciados agrupou em ramos separados

isolados de diferentes manifestações, levando a acreditar que algumas das particularidades compartilhadas entre isolados podem estar relacionados a persistência ou não das infecções causadas por eles. Apesar disso, o depósito das sequências no NCBI, informou que os três isolados ST126 compartilhavam 94% de identidade de sequência, sendo reunidos em um mesmo grupo genômico. No dendrograma gerado pelo banco de dados esse grupo, chamando 170, localiza-se em ramificação próxima ao isolado Newman305, também causador de mastite subclínica (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=staphylococcus+aureus>).

Devido a grande semelhança dos genomas analisados hipotetizou-se que diferenças sutis, a nível de variações de sequência dentro de genes, pudessem estar relacionadas às diferentes manifestações de mastite subclínicas causadas pelos *S. aureus* estudados. A análise das variações de sequências dos genes codificadores de fatores de virulência mostrou que a maioria dos SNPs estava presentes nos genes de adesinas (*clfA*, *clfB* e *fnbA* e *sdrC*), importantes por promover adesão das células bacterianas a uma variedade de moléculas e superfícies (Tsompanidou *et al.*, 2012). Grande variabilidade na sequência desses genes já foi observada entre 58 estirpes de *S. aureus* (McCarthy e Lindsay, 2010). Em particular, o gene *fnbpA* envolvido em uma série de eventos de recombinação e mutações pontuais que podem ser observadas entre os isolados. Alterações nessas sequências podem interferir na virulência do isolado uma vez que essas proteínas estão relacionadas à formação de biofilme e a mecanismos de adesão célula-célula da bactéria (Tsompanidou *et al.*, 2012).

Um número menor de SNPs foi encontrado quando os genes reguladores foram analisados, provavelmente devido à função central desses genes na adaptação da bactéria ao ambiente e no seu potencial patogênico. Resultado semelhante foi observado por Priest *et al.*, (2012) quando compararam as sequências de 20 genes reguladores entre dez genomas de *S. aureus*. Entre os genomas sequenciados, o maior número de variações que implicam em mudança de aminoácido foi observado na sequência de *agrC*, cuja variabilidade gene também foi elevada no estudo de Priest *et al.* (2012). Reguladores globais formam numerosas redes complexas que direcionam interações específicas promovendo ou inibindo a expressão de genes alvos (Bronner *et al.*, 2004). Esses sistemas reguladores são muitas vezes sensíveis a sinais ambientais sendo compostos por duas proteínas, uma cinase e uma proteína reguladora da resposta, embora proteínas de ligação ao DNA estejam também presentes. O operon que codifica

o sistema *agr* (genes reguladores acessórios), um dos mais estudados em *S. aureus*, no entanto, apresenta regiões hipervariáveis conhecidas, que foram agrupadas em quatro grupos *agr* em *S. aureus*. Como *agr* influencia a expressão de muitos genes de virulência, pequenas diferenças observadas dentro de alelos *agr* podem significar grandes diferenças evolutivas. Assim, é razoável supor que alterações na sequência destes reguladores poderia ocasionalmente resultar em vantagens no padrão de expressão de genes de virulência pela bactéria (Robinson *et al.*, 2005).

A análise das estruturas proteicas permite observar que diversas interações são estabelecidas entre resíduos vizinhos e que são importantes para o enovelamento e estabilidade da proteína. Padrões de interação estabelecidos por resíduos são bastante conservados num mesmo dobramento e podem ser utilizados para ajudar na compreensão da função da proteína e sua interação com outras moléculas (Melo *et al.*, 2006; Melo *et al.*, 2007). Foi possível encontrar dois resíduos variáveis entre *S. aureus* RF122 e os isolados sequenciados, que se acredita que possam ter efeito sobre a estrutura de AgrC. No entanto, mais estudos são necessários para determinar a prevalência dessa variação entre um maior número de isolados e seu efeito sobre a virulência bacteriana. Sabe-se que uma substituição não conservativa de um resíduo muito conectado, por exemplo, pode perturbar as interações que eram estabelecidas previamente e desestabilizar a estrutura da proteína, impactando sua função. Redes complexas já foram utilizadas para estudar os papéis local e global de um aminoácido em relação à estrutura proteica, bem como determinar como mutações associadas a doenças diferem por variações de aminoácidos únicos com relação à sua interação com outros resíduos (Li *et al.*, 2011). Os autores mostraram que mutações estão possivelmente relacionadas a doenças quando ocorrem num ponto com alta centralidade e/ou alto grau na rede.

Foram encontrados SNPs não sinônimos em 85% dos genes do metabolismo primário, porém em 80% deles ocorreram apenas quatro ou menos variações na sequência das enzimas da glicólise e do ciclo de Krebs e de transportadores de elétrons na cadeia respiratória. Alterações nessas vias centrais do metabolismo podem levar a mudanças globais de expressão pela bactéria como as que são provocadas, por exemplo, por mutações pontuais nas sequências codificadoras da menadiona (G762A *menE*, A594G *menF*) ou pela interrupção do gene da hemina ou menadiona. A ausência ou deficiência desses componentes do citocromo e da menaquinona levam a interrupção do

transporte de elétrons e diminuição da síntese de ATP, resultando em subpopulações bacterianas de crescimento lento, pigmentação diminuída, e resistente a aminoglicosídeos que estão relacionadas a infecções persistentes (Kohler *et al.*, 2008; Dean *et al.*, 2014).

O sequenciamento e a comparação do genoma de *S. aureus* causadores de mastite subclínicas persistentes e não persistentes, mostrou a grande conservação entre genomas isolados de um mesmo hospedeiro e responsáveis por uma mesma infecção, tanto em características gerais como tamanho e %CG, quanto no número de genes e proteínas que eles contêm. Apesar disso, definiram-se polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genes de virulência, reguladores globais e genes do metabolismo primário que foram conservados entre isolados persistentes e não persistentes. Estudos de modelagem, utilizando conceitos de redes complexas e medidas de centralidade permitiram identificar posições variantes na sequência de AgrC que são importantes para a estrutura da proteína.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Awale MM, Dudhatra GB, Kumar A, Chauhan BN, Kamani DR. 2012. Bovine Mastitis: A threat to economy. *Open Access Scientific Reports*, 1:1-10.
- Baba T, Bae T, Schneewind O, Takeuchi F, Hiramatsu K. 2008. Genome sequence of *Staphylococcus aureus* strain Newman and comparative analysis of staphylococcal genomes: polymorphism and evolution of two major pathogenicity islands. *Journal of Bacteriology*, 190:300-310.
- Ben Zakour NL, Guinane CM, Fitzgerald JR. 2008. Pathogenomics of the staphylococci: insights into niche adaptation and the emergence of new virulent strains. *FEMS Microbiology Letters*, 289:1–12.
- Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Bourne PE. 2000. The protein data bank. *Nucleic Acids Research*, 28:235-242.
- Bouchard D, Peton V, Almeida S, Le Maréchal C, Miyoshi A, Azevedo V, Even S. 2012. Genome sequence of *Staphylococcus aureus* Newbould 305, a strain associated with mild bovine mastitis. *Journal of Bacteriology*, 194:6292-6293.

- Bronner S, Monteil H, Prévost G. 2004. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. *FEMS Microbiology Reviews*, 28:183-200.
- Castelani L, Santos AFS, Miranda M. dos S, Zafalon LF, Pozzi CR, Arcaro JRP. 2013. Molecular typing of mastitis causing *Staphylococcus aureus* isolated from heifers and cows. *International Journal of Molecular Sciences*, 14:4326–4333.
- Csardi G, Nepusz T. 2006. The igraph software package for complex network research. *International Journal of Complex Systems*, 1695:1-9.
- Dean MA, Olsen RJ, Long SW, Rosato AE, Musser JM. 2014. Identification of point mutations in clinical *Staphylococcus aureus* strains that produce small-colony variants auxotrophic for menadione. *Infection and Immunity*, 82:1600–1605.
- Dempster AP, Laird NM, Rubin DB. 1977. Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 39:1-38.
- García-Álvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, Curran MD, Parkhill J. 2011. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *The Lancet Infectious Diseases*, 11:595-603.
- Guinane CM, Ben Zakour NL, Tormo-Mas MA, Weinert LA, Lowder BV, Cartwright RA, Smyth DS, Smyth CJ, Lindsay JA, Gould KA, Witney A, Hinds J, Bollback JP, Rambaut A, Penadés JR, Fitzgerald JR. 2010. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus* reveals insights into the origin and molecular basis of ruminant host adaptation. *Genome Biology and Evolution*, 2:454-466.
- Hall J, Ji Y. 2012. Identification of predominant SNPs as a novel method for genotyping bovine *Staphylococcus aureus* isolates. *Virulence*, 3:98-102.
- Herron-Olson L, Fitzgerald JR, Musser JM, Kapur, V. 2007. Molecular correlates of host specialization in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*, 2:e1120.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17:754–755.

- Hyatt D, Chen GL, Locascio PF, Land ML, Larimer FW, Hauser LJ. 2010. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics*, 11:119-130.
- Kant R, Taponen S, Koort J, Paulin L, Åvall-Jääskeläinen S, Palva A. 2015. Genome sequences of four *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. *Genome Announcements*, 3:e00334-15.
- Katoh K, Standley DM. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30:772-780.
- Kohler C, Von Eiff C, Liebeke M, McNamara PJ, Lalk M, Proctor RA, Engelmann S. 2008. A defect in menadione biosynthesis induces global changes in gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 190:6351-6364.
- Kozytska S, Stauß D, Pawlik MC, Hensen S, Eckart M, Ziebuhr W, Ohlsen K. 2010. Identification of specific genes in *Staphylococcus aureus* strains associated with bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, 145:360-365.
- Laabei M, Recker M, Rudkin JK, Aldeljawi M, Gulay Z, Sloan TJ, Yajjala VK. 2014. Predicting the virulence of MRSA from its genome sequence. *Genome Research*, 24:839-849.
- Le Maréchal C, Seyffert N, Jardin J, Hernandez D, Jan G, Rault L, Even S. 2011. Molecular basis of virulence in *Staphylococcus aureus* mastitis. *PLoS One*, 6:e27354.
- Li W, Godzik A. 2006. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 22:1658-1659.
- Li Y, Wen Z, Xiao J, Yin H, Yu L, Yang L, Li M. 2011. Predicting disease-associated substitution of a single amino acid by analyzing residue interactions. *BMC Bioinformatics*, 12:14-25.
- Liang X, Hall JW, Yang J, Yan M, Doll K, Bey R, Ji Y. 2011. Identification of single nucleotide polymorphisms associated with hyperproduction of alpha-toxin in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*, 6:e18428.

- Lindsay JA, Holden MT. 2004. *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? Trends in Microbiology, 12:378-385.
- Lindsay JA, Moore CE, Day NP, Peacock SJ, Witney AA, Stabler RA, Hinds J. 2006. Microarrays reveal that each of the ten dominant lineages of *Staphylococcus aureus* has a unique combination of surface-associated and regulatory genes. Journal of Bacteriology, 188:669-676.
- McCarthy AJ, Lindsay JA. 2010. Genetic variation in *Staphylococcus aureus* surface and immune evasion genes is lineage associated: implications for vaccine design and host-pathogen interactions. BMC Microbiology, 10:173-188.
- Melo RC, Lopes CE, Fernandes Jr FA, da Silveira CH, Santoro MM, Carceroni RL, Araujo A. 2006. A contact map matching approach to protein structure similarity analysis. Genetic and Molecular Research, 5:284-308.
- Melo RC, Ribeiro C, Murray CS, Veloso CJ, da Silveira CH, Neshich G, Santoro MM. 2007. Finding protein-protein interaction patterns by contact map matching. Genetics and Molecular Research, 6:946-963.
- Okabe A, Boots B, Sugihara K, Chiu SN. 2009. Spatial tessellations: concepts and applications of Voronoi diagrams, Vol. 501. John Wiley & Sons.
- Oscarsson J, Harlos C, Arvidson S. 2005. Regulatory role of proteins binding to the spa (protein A) and sarS (staphylococcal accessory regulator) promoter regions in *Staphylococcus aureus* NTCC 8325-4. International Journal of Medical Microbiology, 295:253-266.
- Overbeek R, Begley T, Butler RM, Choudhuri JV, Chuang HY, Cohoon M, Fonstein M. 2005. The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. Nucleic Acids Research, 33:5691-5702.
- Peton V, Bouchard DS, Almeida S, Rault L, Falentin H, Jardin J, Azevedo V. 2014. Fine-tuned characterization of *Staphylococcus aureus* Newbould 305, a strain associated with mild and chronic mastitis in bovines. Veterinary Research, 45:106-121.
- Poupon A. 2004. Voronoi and voronoi-related tessellations in studies of protein structure and interaction. Current Opinion in Structural Biology, 14:233-241.

- Priest NK, Rudkin JK, Feil EJ, Van Den Elsen JM, Cheung A, Peacock SJ, Massey RC. 2012. From genotype to phenotype: can systems biology be used to predict *Staphylococcus aureus* virulence? *Nature Reviews Microbiology*, 10:791-797.
- Punina NV, Makridakis NM, Remnev MA, Topunov AF. 2015. Whole-genome sequencing targets drug-resistant bacterial infections. *Human Genomics*, 9:19-39.
- Rabello RF, Moreira BM, Lopes RM, Teixeira LM, Riley LW, Castro AC. 2007. Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from cows with mastitis in Brazilian dairy herds. *Journal of Medical Microbiology*, 56:1505-1511.
- Robinson DA, Monk AB, Cooper JE, Feil EJ, Enright MC. 2005. Evolutionary genetics of the accessory gene regulator (*agr*) locus in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 187:8312-8321.
- Sakwinska O, Morisset D, Madec J, Waldvogel A, Moreillon P, Haenni M. 2011. Link between genotype and antimicrobial resistance in bovine mastitis-related *Staphylococcus aureus* strains, determined by comparing swiss and french isolates from the Rhône valley. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 3428-3432.
- Schukken YH, Günther J, Fitzpatrick J, Fontaine MC, Goetze L, Holst O, Smith DGE. 2011. Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 144:270-289.
- Shatsky M, Nussinov R, Wolfson HJ. 2004. A method for simultaneous alignment of multiple protein structures. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 56:143-156.
- Silva NCC, Guimarães FF, Manzi MP, Budri PE, Gomez-Sanz E, Benito D, Langoni H, Torres C. 2013. Molecular characterization and clonal diversity of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in milk of cows with mastitis in Brazil. *Journal of Dairy Science*, 96:6856-6862.
- Silveira SA, Fassio AV, Gonçalves-Almeida VM, de Lima EB, Barcelos YT, Aburjaile FF, Melo-Minardi RC. 2014. VERMONT: Visualizing mutations and their effects on protein physicochemical and topological property conservation. *BMC Proceedings*, 8:1-10.

- Smith EM, Green LE, Medley GF, Bird HE, Fox LK, Schukken YH, Dowson CG. 2005. Multilocus sequence typing of intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 43:4737–4743.
- Sobolev V, Sorokine A, Prilusky J, Abola EE, Edelman M. 1999. Automated analysis of interatomic contacts in proteins. *Bioinformatics*, 15:327-332.
- Suzuki H, Lefébure T, Bitar PP, Stanhope MJ. 2012. Comparative genomic analysis of the genus *Staphylococcus* including *Staphylococcus aureus* and its newly described sister species *Staphylococcus simiae*. *BMC Genomics*, 13:38-46.
- Tatusov RL, Natale DA, Garkavtsev IV, Tatusova TA, Shankavaram UT, Rao BS, Kiryutin B, Galperin MY, Fedorova ND, Koonin EV. 2001. The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. *Nucleic Acids Research*, 29:22–28.
- Tsompanidou E, Denham EL, Sibbald MJ, Yang XM, Seinen J, Friedrich AW, van Dijl JM. 2012. The sortase A substrates FnbpA, FnbpB, ClfA and ClfB antagonize colony spreading of *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*, 7:e44646.
- Vautor E, Cockfield J, Le Marechal C, Le Loir Y, Chevalier M, Robinson DA, Lindsay J. 2009. Difference in virulence between *Staphylococcus aureus* isolates causing gangrenous mastitis versus subclinical mastitis in a dairy sheep flock. *Veterinary Research*, 40:1-11.
- Veh KA, Klein RC, Ster C, Keefe G, Lacasse P, Scholl D, Ribon AOBR, Malouin F. 2015. Genotypic and phenotypic characterization of *Staphylococcus aureus* causing persistent and nonpersistent subclinical bovine intramammary infections during lactation or the dry period. *Journal of Dairy Science*, 98:155-168.
- Whelehan CJ, Meade KG, Eckersall PD, Young FJ, O’Farrelly C. 2011. Experimental *Staphylococcus aureus* infection of the mammary gland induces region-specific changes in innate immune gene expression. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 140:181-189.
- Wolf C, Kusch H, Monecke S, Albrecht D, Holtfreter S, von Eiff C, Engelmann S. 2011. Genomic and proteomic characterization of *Staphylococcus aureus* mastitis isolates of bovine origin. *Proteomics*, 11:2491-2502.

Zadoks RN, Middleton JR, McDougall S, Katholm J, Schukken YH. 2011. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 16(4):357–372.

## **ANEXO**

```

          10      20      30      40      50      60
SAU_RF122      METDNAPTNG EETDNAPTNL EETDNAPTNK EETDNAPTNH EETDNAPTNA EETDNAPTNA
SAU170 N persistente METDNAPTNA EETDNAPTNS EETDNAPTNV EETDNAPTNI EETDNAPTNA EETDNAPTNP
SAU302 Persistente METDNAPTNA EETDNAPTNS EETDNAPTNK EETDNAPTNS EETDNAPTNG EETDNAPTNA
SAU1269 N persistente METDNAPTNA EETDNAPTNS EETDNAPTNV EETDNAPTNS EETDNAPTNA EETDNAPTNA
SAU1364 Persistente METDNAPTNA EETDNAPTNL EETDNAPTNK EETDNAPTNS EETDNAPTNG EETDNAPTNA

```

**Figura A1.** Alinhamento entre sequências de aminoácidos hipotéticas para exemplificar polimorfismos de nucleotídeo único não sinônimos. Na posição 10, exemplifica-se uma troca de aminoácido comum a todos os isolados. Na posição 20, a troca de aminoácido é comum aos não persistentes, mas pode se observar que um dos persistentes possui a mesma modificação. Na posição 30 há uma troca de aminoácido exclusiva em isolados não persistentes assim como na posição 50 essas são exclusivas em isolados persistentes. Na posição 60 o exemplo de um aminoácido exclusivo em apenas um isolado.

**Tabela A1.** Polimorfismos de nucleotídeo único em sequências codificadoras de fatores de virulência, reguladores e proteínas metabolismo primário exclusivos de isolados persistentes ou não persistentes. Na tabela são identificados o gene, o aminoácido na referência *Staphylococcus aureus* RF122, a posição onde houve troca de aminoácidos devido a modificação da sequência do gene e o aminoácido resultante no isolado sequenciado.

Isolados Persistentes		Isolados não Persistentes	
<i>agrA</i>	Lys136Arg	<i>isaA</i>	Ser22Gly
<i>agrC</i>	Thr317Ser	<i>sspA</i>	Asn282His
<i>agrC</i>	His318Ser	<i>sspB</i>	Asp109Gly
		<i>clfA</i>	Val423Ala
		<i>arlS</i>	Asp121Glu
		<i>sarS</i>	Asn221Asp
		<i>hemC</i>	Lys287Thr
		<i>hemY</i>	Gly278_Ile279delinsGlyVal
		<i>citC</i>	Ala200Val
		<i>pgk</i>	Ile17Leu
		<i>pdhC</i>	Asn179Ser
		<i>glpD</i>	Ser532Ala
		<i>glpD</i>	Ile533Val
		<i>glpD</i>	Leu541Phe

**Tabela A2.** Polimorfismos de nucleotídeo único em sequências codificadoras de fatores de virulência, reguladores e proteínas metabolismo primário comuns a todos os isolados, entre isolados persistentes ou não persistentes. Na tabela são identificados o gene, o aminoácido na referência *Staphylococcus aureus* RF122, a posição onde houve troca de aminoácidos devido a modificação da sequência do gene e o aminoácido resultante no isolado sequenciado.

Todos isolados		Isolados Persistentes		Isolados não Persistentes			
<i>clfB</i>	Thr68Met	<i>clfB</i>	Thr230Val	<i>isaA</i>	Ser22Gly	<i>lytS</i>	Cys42Trp
<i>clfB</i>	Ser168Thr	<i>clfB</i>	Asn152Tyr	<i>sspA</i>	Asn282His	<i>hemA</i>	Cys66Arg
<i>clfB</i>	Ile509Val	<i>clfB</i>	Ala199Thr	<i>sspB</i>	Asp109Gly	<i>hemB</i>	Thr66Ala
<i>clfB</i>	Asn495Lys	<i>clfA</i>	Glu99_Thr100insAla	<i>clfA</i>	Val423Ala	<i>hemC</i>	Ile188Arg
<i>clfA</i>	Val47Ala	<i>clfA</i>	Ala85Ser	<i>clfB</i>	Ile339Thr	<i>hemD</i>	Gln85Arg
<i>clfA</i>	Thr62Ser	<i>clfA</i>	Ala103Thr	<i>clfB</i>	Asp697Glu	<i>hemD</i>	Ser122Leu
<i>clfA</i>	Ser40Asn	<i>fnbA</i>	Ala149Thr	<i>isaA</i>	Met32Val	<i>hemL</i>	Gln287His
<i>clfA</i>	Ile37Ser	<i>fnbA</i>	Asn808Ser	<i>isaA</i>	Met32Ile	<i>hemL</i>	Ala318Thr
<i>clfA</i>	Ile35Asn	<i>fnbA</i>	Glu234_Asp235delinsGluAsn	<i>isaA</i>	Glu26Gln	<i>mgo</i>	Val172Ala
<i>clfA</i>	Asn53Asp	<i>fnbA</i>	Glu94Lys	<i>secF</i>	Met730Ile	<i>sucA</i>	Ser56Ala
<i>clfA</i>	Asn46Ser	<i>fnbA</i>	Lys127del	<i>secF</i>	Asn27Ser	<i>sucA</i>	Asn478His
<i>lytR</i>	Val130Ala	<i>fnbA</i>	Ser132Pro	<i>sspA</i>	Thr39Pro	<i>sucA</i>	Glu534Asp
<i>lytR</i>	Asn127Ser	<i>fnbA</i>	Ser952Phe	<i>sspA</i>	Leu221Phe	<i>sucA</i>	Asn645Asp
<i>hemA</i>	Thr254Ser	<i>agrA</i>	Lys136Arg	<i>sspA</i>	Asp45Ser	<i>sucA</i>	Thr857Ala
<i>hemB</i>	Val182Ala	<i>agrC</i>	Thr317Ser	<i>sspB</i>	Thr29Ala	<i>pgm</i>	Asp221Glu
<i>hemE</i>	Phe170Tyr	<i>agrC</i>	Ser305Asn	<i>nuc</i>	Lys180Glu	<i>pgm</i>	Glu226fs
<i>hemH</i>	Arg100His	<i>codY</i>	Asp139Gly	<i>clfA</i>	Phe294Asp	<i>fda</i>	Ala219Pro
<i>hemL</i>	Ile215Val	<i>hemC</i>	Glu222Gly	<i>clfA</i>	Leu835Pro	<i>fda</i>	Asp224Glu
<i>citC</i>	Thr241Ser	<i>hemL</i>	Asp198Asn	<i>clfA</i>	Gly865Asp	<i>fda</i>	Ile234Val
<i>fumC</i>	Ser122Ile	<i>hemY</i>	Leu130Phe	<i>clfA</i>	Gln253Lys	<i>gap</i>	Asp138Asn
<i>fumC</i>	Thr211Ile	<i>hemY</i>	Leu133Phe	<i>clfA</i>	Asp618Ala	<i>gap</i>	Leu288Asn
<i>mgo</i>	Asp193Glu	<i>hemY</i>	Asp141Asn	<i>fnbA</i>	Ala181Val	<i>gap</i>	Leu296Ser
<i>mgo</i>	Cys227Arg	<i>hemY</i>	Thr324_Tyr325delinsThrHis	<i>fnbA</i>	Ala567Val	<i>pdhA</i>	Tyr166Asn
<i>sucA</i>	Gly357Ala	<i>sdhA</i>	Ala556Thr	<i>fnbA</i>	Asn788Thr	<i>pdhC</i>	Gly98Glu
<i>sucA</i>	Lys576Glu	<i>fda</i>	Asn36Asp	<i>fnbA</i>	Gln780His	<i>pdhC</i>	Lys154Thr
<i>sucC</i>	Phe38Leu	<i>fda</i>	Ala254Asp	<i>fnbA</i>	His988Asn	<i>ackA</i>	Glu254fs
<i>pgm</i>	Thr299Ala	<i>acsA</i>	Lys169fs	<i>fnbA</i>	Val167Ala	<i>pckA</i>	Val161Ala
<i>fda</i>	Ile35Val	<i>gltA</i>	Ala107Val	<i>srtA</i>	Thr196Lys	<i>acsA</i>	Ile102Val
<i>pdhB</i>	Ile40Val	<i>gltA</i>	Arg1154Cys	<i>srtA</i>	Val20Ala	<i>acsA</i>	Val528Ala
<i>acsA</i>	Leu282Ser	<i>tpiA</i>	Ala52Val	<i>srtA</i>	Val73Ala	<i>glpK</i>	Tyr444Phe
<i>glpK</i>	Gly158Asp	<i>tpiA</i>	Glu159Lys	<i>arlS</i>	Asp121Glu	<i>gltA</i>	Gly616Ser
<i>gltA</i>	Val100Ile			<i>sarS</i>	Asn221Asp	<i>gltA</i>	Asp618Gly
<i>gltA</i>	Asn176Asp			<i>srrB</i>	Ile434Val	<i>menB</i>	Asn16Lys
<i>gltA</i>	Ala1182Val			<i>srrB</i>	Ile320Met	<i>menB</i>	Asp196Glu
<i>tpiA</i>	Gly41Ala			<i>srrB</i>	Arg470Ser		
<i>tpiA</i>	Glu159Asp			<i>srrB</i>	Ala502Asp		
<i>tpiA</i>	Thr190Ala			<i>codY</i>	Gly209Arg		

## **CAPÍTULO 3**

Draft Genome Sequences of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Subclinical Bovine Mastitis in Brazil

## Draft Genome Sequences of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Subclinical Bovine Mastitis in Brazil

Danielle Mendes Silva,<sup>a</sup> Mônica Pacheco da Silva,<sup>a</sup> Pedro M. Pereira Vidigal,<sup>b</sup> Rafael Mazioli Barcelos,<sup>a</sup> Raphael Contelli Klein,<sup>a</sup> Ananda Pereira Aguiar,<sup>a</sup> Mary Hellen Fabres-Klein,<sup>a</sup> Guilherme Oliveira,<sup>c,d</sup> Andréa Oliveira Barros Ribon<sup>a</sup>

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brazil<sup>a</sup>; Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBioMol), Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brazil<sup>b</sup>; Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR)—FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil<sup>c</sup>; Vale Technology Institute, Belém, Paraná, Brazil<sup>d</sup>

Received 30 November 2015 Accepted 28 December 2015 Published 18 February 2016

Citation Silva DM, da Silva MP, Vidigal PMP, Barcelos RM, Klein RC, Aguiar AP, Fabres-Klein MH, Oliveira G, Ribon AOB. 2016. Draft genome sequences of *Staphylococcus aureus*

**Here, we present the draft genome sequences of four *Staphylococcus aureus* strains isolated from mastitic milk collected from animals with subclinical manifestations. Three of them were typed as sequence type 126 (ST126), a genotype with no genome sequence available. ST126 is found in several herds of southern Brazil and is described as a bovine pathogen strongly associated with milk around the world.**

*Staphylococcus aureus* is one of the main pathogens isolated from bovine mastitis infections (1). Intense efforts have been made to understand the molecular mechanisms of bacterial pathogenesis (2, 3) and to link bacterial characteristics with the specific clinical manifestations of bovine mastitis (4). These strain specific markers could be used to track relevant strains in herds that would positively affect animal health and welfare. We monitored two herds in the State of Minas Gerais, Brazil, for the presence of subclinical mastitis for 6 months. Bacteria identified as *S. aureus* were genotyped by multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Four isolates were selected for genome sequencing. SAU-302 and SAU-1364 were isolated from two cows with a persistent subclinical infection, while SAU-170 and SAU-1269 were isolated from two cows with subclinical infections for a month. The infection was considered persistent if it was detected after three or

more consecutive months from the same animal. Four 200-bp single-end genomic libraries were constructed and sequenced on an Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM). Four data sets were generated, containing 1,422,030 reads (SAU-170), 1,250,612 reads (SAU-302), 2,572,399 reads (SAU-1269), and 634,729 reads (SAU-1364). The sequenced reads were trimmed for length (minimum, 100 bp) and quality (minimum score, Q20) and de novo assembled to contigs using CLC Genomics Workbench version 6.5.1 (CLC bio). This assembly produced 194 contigs and overall G+C content of 32.8% for SAU-170, 568 contigs and 32.9% G+C content for SAU-302, 93 contigs and 32.7% G+C content for SAU-1269, and 287 contigs and 32.7% G+C content for SAU-1364. Genes were predicted from the contigs using Prodigal version 2.50 (5), which revealed the coding sequence (CDS) set of SAU-170 (2,599 CDSs), SAU-302 (2,666 CDSs), SAU-1269 (2,545 CDSs), and SAU-1364 (2,547 CDSs). The protein sets were functionally annotated using BLAST searches (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), and approximately 77% of the proteins of each strain were assigned Clusters of Orthologous Groups (COG) families (6). In genotyping analysis, SAU-170, SAU-302, and SAU-1269 were classified as sequence type 126 (ST126), and SAU-1364 was classified as ST1 by multilocus sequence type (MLST) analysis (<http://saureus.mlst.net/misc/info.asp>). ST1 is a type isolated from bovine and human infections (7). ST126 is a prevalent genotype found in several herds in southern Brazil (8, 9) and was described elsewhere as a bovine pathogen strongly associated with milk (7). We also genotyped the strains against the reference genome of *S. aureus* RF122 (accession no. NC\_007622), a strain representative of the major clone involved in severe bovine mastitis worldwide (10). We identified single-nucleotide polymorphisms (SNPs) that resulted in amino acid changes in the coded protein. A total of 6,273 SNPs were detected in SAU-170, 5,481 in SAU-302, 7,420 in SAU-1269, and 2,491 in SAU-1364 (CLC bio; minimum, 20X coverage [11]). These new genomes add information to the repertoire of genes described for strains associated with subclinical mastitis that will be useful in studies to elucidate molecular mechanisms of pathogenesis. Nucleotide sequence accession numbers. The draft genome sequences of SAU-170, SAU-302, SAU-1269, and SAU-1364 are available in GenBank under the accession numbers LNOQ000000000, LNOR000000000, LNOO000000000, and LNOP000000000, respectively.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBioMol) for support during sequencing and the Programa de Desenvolvimento da Pecuária Leiteira (PDPL) for providing milk samples for bacterial isolation.

## FUNDING INFORMATION

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) provided funding to Andrea Oliveira Barros Ribon under grant number CBB-APQ-01345-14.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) provided funding to Guilherme Corrêa de Oliveira under grant number RED-00014-14. D.M.S, M.P.S., and A.P.A. received scholarships from FAPEMIG and CAPES.

## REFERENCES

1. Castelani L, Santos AFS, Miranda M, dos S, Zafalon LF, Pozzi CR, Arcaro JR. 2013. Molecular typing of mastitis causing *Staphylococcus aureus* isolated from heifers and cows. *Int J Mol Sci* 14:4326 – 4333. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms14024326>.
2. Zadoks RN, Middleton JR, McDougall S, Katholm J, Schukken YH. 2011. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 16: 357–372. <http://dx.doi.org/10.1007/s10911-011-9236-y>.
3. Ben Zakour NL, Guinane CM, Fitzgerald JR. 2008. Pathogenomics of the staphylococci: insights into niche adaptation and the emergence of new virulent strains. *FEMS Microbiol Lett* 289:1–12. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01384.x>.
4. Guinane CM, Ben Zakour NL, Tormo-Mas MA, Weinert LA, Lowder BV, Cartwright RA, Smyth DS, Smyth CJ, Lindsay JA, Gould KA, Witney A, Hinds J, Bollback JP, Rambaut A, Penadés JR, Fitzgerald JR. 2010. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus* reveals insights into the origin and molecular basis of ruminant host adaptation. *Genome Biol Evol* 2:454 – 466. <http://dx.doi.org/10.1093/gbe/evq031>.
5. Hyatt D, Chen GL, Locascio PF, Land ML, Larimer FW, Hauser LJ. 2010. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics* 11:119. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-11-119>.
6. Tatusova TA, Shankavaram UT, Rao BS, Kiryutin B, Galperin MY, Fedorova ND, Koonin EV. 2001. The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. *Nucleic Acids Res* 29:22–28. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/29.1.22>.
7. Smith EM, Green LE, Medley GF, Bird HE, Fox LK, Schukken YH, Bradley AJ, Zadoks RN, Dowson CG. 2005. Multilocus sequence typing of

- intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* isolates. J Clin Microbiol 43:4737– 4743. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.9.4737-4743.2005>.
8. Aires de Sousa M, Parente CESR, Vieira-da-Motta O, Bonna ICF, Silva DA, Lencastre H. 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from buffalo, bovine, ovine, and caprine milk samples collected in Rio de Janeiro State, Brazil. Appl Environ Microbiol 73:3845–3849. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00019-07>.
  9. Silva NCC, Guimarães FF, Manzi MP, Budri PE, Gómez-Sanz E, Benito D, Langoni H, Torres C. 2013. Molecular characterization and clonal diversity of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in milk of cows with mastitis in Brazil. J Dairy Sci 96:6856 – 6862. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-6719>.
  10. Peton V, Bouchard DS, 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. <http://dx.doi.org/10.1186/s13567-014-0106-7>.
  11. Greminger MP, Stölting KN, Nater A, Goossens B, Arora N, Bruggmann R, Patrignani A, Nussberger B, Sharma R, Kraus RH, Ambu LN, Singleton I, Chikhi L, Van Schaik CP, Krützen M. 2014. Generation of SNP datasets for orangutan population genomics using improved reduced-representation sequencing and direct comparisons of SNP calling algorithms. BMC Genomics 15:16. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-15-16>.

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- *Streptococcus agalactiae* possui alta frequência no rebanho estudado, sendo isolado em 34,2% das amostras CMT positivas coletadas, sugerindo falhas na adoção de medidas de higiene que visam aumentar a sanidade do rebanho.
- A análise molecular dos isolados de *S. agalactiae* por multilocus de repetições em tandem de número variável (MLVA) revelou a presença de seis genótipos circulantes, confirmando bom poder discriminatório da técnica.
- SagT1 foi o perfil mais frequente, e análises estatísticas o associaram a infecções crônicas e a animais que tiveram 2 ou mais partos. As mesmas associações foram feitas para os perfis SagT2 e SagT4.
- Estudo de virulência *in vivo* definiu SagT3 e SagT1 como o tipo mais e o menos virulento, respectivamente. *In vitro*, esses dois isolados não invadiram nem apresentaram efeito citotóxico em células MAC-T.
- Sugere-se que o isolamento e a caracterização de *S. agalactiae* sejam estendidos a outros animais e rebanhos da região para confirmar a prevalência dos genótipos encontrados. Essas informações devem ser repassadas aos veterinários para que se definam estratégias práticas de controle das infecções causadas pelo patógeno, a fim de reduzir os prejuízos dos produtores com a mastite bovina.
- O sequenciamento dos genomas de quatro estirpes de *S. aureus* causadoras de mastite subclínica, sendo SAU302 e SAU 1364 isoladas de infecções persistentes e SAU170 e SAU1269 de infecções não persistentes revelou uma grande conservação entre eles, como tamanho médio de 2,6 Mb, 32,8% de conteúdo GC e 2589 CDS. Um total de 77% das CDS foi distribuído em famílias do COG e 55% foram categorizadas pelo SEED.
- A tipagem por MLST classificou SAU170, SAU302, e SAU1364 como ST126, um tipo frequentemente encontrado em rebanhos brasileiros, e SAU1269, como ST1, associado a infecções humanas e bovinas.
- A comparação entre os genomas sequenciados e uma referência construída com os genomas de *S. aureus* RF122 e *S. aureus* LGA251, duas estirpes isoladas de mastite bovina, revelou uma alta identidade para a maioria dos genes anotados.
- A análise filogenética dos isolados sequenciados agrupou em ramos separados isolados de diferentes manifestações, sugerindo que algumas das

particularidades compartilhadas entre isolados podem estar relacionados à persistência ou não das infecções causadas por eles.

- Muitos SNPs foram encontrados em genes de adesinas, importantes por promover a adesão das células bacterianas ao hospedeiro, e na sequência de *agrC*, proteína de membrana que funciona como receptora do sinal de *quorum-sensing* em *S. aureus*.
- Estudos de modelagem, utilizando conceitos de redes complexas e medidas de centralidade mostraram que algumas posições variantes na sequência de AgrC eram importantes para a estrutura da proteína.
- Estudos futuros devem ser realizados para avaliar a distribuição dos SNPs em coleções de isolados bovinos visando decifrar o seu papel na virulência bacteriana. Para reduzir o número de *contigs* ou até mesmo conhecer a sequência completa dos genomas dos isolados, sugere-se o ressequenciamento com a utilização de outras plataformas.