

**‘UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA  
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**USO DE GENÔMICA COMPARATIVA E ENSAIOS  
FILOGENÉTICOS PARA ANÁLISE DE LINHAGENS DE  
*Staphylococcus aureus* EM BOVINOS E HUMANOS EM  
BUSCA DE PADRÕES DE VIRULÊNCIA ESPECÍFICOS E  
MARCADORES DA MASTITE**

**Romário Alves Rodrigues**

Médico Veterinário

2022

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA  
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**USO DE GENÔMICA COMPARATIVA E ENSAIOS  
FILOGENÉTICOS PARA ANÁLISE DE LINHAGENS DE  
*Staphylococcus aureus* EM BOVINOS E HUMANOS EM  
BUSCA DE PADRÕES DE VIRULÊNCIA ESPECÍFICOS E  
MARCADORES DA MASTITE**

**Romário Alves Rodrigues**

**Orientador: Prof. Dr. Fernando Antônio de Ávila**

**Coorientador: Dr. Lucas José Luduverio Pizauro**

**Coorientador: Prof. Dr. Alessandro de Mello Varani**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

Rodrigues, Romário Alves

R696u      Uso de genômica comparativa e ensaios filogenéticos para análise de linhagens de *Staphylococcus aureus* em bovinos e humanos em busca de padrões de virulência específicos e marcadores da mastite / Romário Alves Rodrigues. --Jaboticabal, 2022

95 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Fernando Antônio de Ávila

Coorientador: Lucas José Luduverio Pizauro

1. Adesinas. 2. Filogenia. 3. Formação de Biofilme. 4. Genes de Virulência. 5. Saúde Única. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: USO DE GENÔMICA COMPARATIVA E ENSAIOS FILOGENÉTICOS PARA ANÁLISE DE LINHAGENS DE *Staphylococcus aureus* EM BOVINOS E HUMANOS EM BUSCA DE PADRÕES DE VIRULÊNCIA ESPECÍFICOS E MARCADORES DA MASTITE

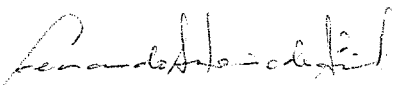
**AUTOR: ROMÁRIO ALVES RODRIGUES**

**ORIENTADOR: FERNANDO ANTONIO DE ÁVILA**


**COORIENTADOR: LUCAS JOSÉ LUDUVÉRIO PIZAURO**

**COORIENTADOR: ALESSANDRO DE MELLO VARANI**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. FERNANDO ANTONIO DE ÁVILA (Participação Virtual)  
Departamento de Patologia Reproducao e Saude Unica / FCAV UNESP Jaboticabal

φ/   
Prof. Dr. ARIEL EURIDES STÉLLA (Participação Virtual)  
Universidade Federal de Goiás/Campus de Jataí / Jataí/GO

φ/   
Prof. Dr. LUÍS ANTONIO MATHIAS (Participação Virtual)  
Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 03 de março de 2022

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**ROMÁRIO ALVES RODRIGUES** - Nascido em Lassance, MG, em 21 de junho de 1994, filho de Valdemar Alves dos Santos Filho e Vera Lúcia Rodrigues de França Alves. Médico Veterinário, graduado em Bacharel em janeiro de 2018 pelo Instituto Federal do Norte de Minas Gerais – *Campus* Salinas, e pós-graduado em Medicina Veterinária Preventiva pela Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Jaboticabal. De março de 2009 a fevereiro de 2011, cursou Mestrado pelo Programa de Microbiologia Agropecuária, com bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

***“A maior herança que um homem pode deixar aos seus descendentes é o seu exemplo.”***

*(Autor Desconhecido)*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me guiar nos momentos de angústias e amparar nas horas mais difíceis, no ímpeto do saber de acreditar que sempre haverá esperança.

Ao Prof. Dr. Fernando Antônio de Ávila, pela oportunidade, pelo conhecimento e pelos ensinamentos disponibilizados a mim e a todos que passaram pela FCAV – Unesp, Campus de Jaboticabal.

Às amigadas antigas, atuais e que virão, incluindo aqui meus colegas da comunidade do Brejo, do IFNMG – *Campus* Salinas -MG e àqueles que me aproximem na FCAV – Unesp, Câmpus de Jaboticabal.

Aos meus pais e familiares. A vocês, muito obrigado pelo carinho e amor incondicional sempre!

Aos meus professores da comunidade do Brejo (Lassance/MG), que sempre acreditaram e apoiaram os meus estudos.

A todos do Laboratório de Microbiologia, que de maneira direta ou indireta, auxiliaram na realização deste trabalho.

Aos Pós-doutorandos Camila Chioda de Almeida, Marita Vedovelli Cardozo e, em especial, Lucas José Luduverio Pizauro por terem me proporcionado conhecimento e ensinamentos essenciais à conclusão do mestrado.

A todos os profissionais da Pós-Graduação, em especial a Márcia e a Branca, que não mediram esforços para resolver os problemas frente aos novos desafios. Muito obrigado pelo carinho e compreensão.

Aos pesquisadores de todo o Brasil, pela insistência, seriedade, trabalho e paciência frente a tantas dificuldades, questionamentos e notícias falsas propagadas.

Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP, Brasil.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), pela bolsa e pelo apoio prestado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
Lista de tabelas.....	v
Lista de figuras.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	02
2.1 Genômica comparativa: <i>Staphylococcus aureus</i> .....	02
2.2 Infecções intramamárias em bovinos .....	04
2.3 Saúde pública: infecções em humanos.....	06
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	06
3.1 Sequenciamento bacteriano e origem dos isolados .....	06
3.2 Anotação gênica e determinação de pangenoma.....	07
3.3 Anotação genômica: identificação dos genes relacionados a adesão, formação de biofilme, resistência a antimicrobianos e toxinas.....	07
3.4 Análise Filogenética .....	08
3.5 Determinação <i>in silico</i> do Multilocus Sequence Typing (MLST) e spa.	08
3.6 Análise Estatística.....	08
4. RESULTADOS.....	09
4.1 Avaliação do Pangenoma .....	09
4.2 Distribuição de genes de adesinas, biofilmes, resistência e toxinas nos isolados de <i>S. aureus</i> .....	11



4.3 Análise Filogenética.....	14
4.4 Tipos de Multilocus Sequence Typing e spa.....	16
4.5 Associação entre a presença dos genes de virulência e a origem do isolado.....	18
4.6 Correlação entre os genes de adesão.....	19
5. DISCUSSÃO.....	22
5.1 Relevância dos genes de Adesinas e Biofilmes.....	22
5.2 Prevalência das toxinas .....	27
5.3 Prevalência dos genes de resistência a antimicrobianos.....	29
5.4 Multilocus sequence typing e Spa – typing.....	30
6. CONCLUSÕES .....	32
7. RODAPÉ.....	33
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
APÊNCICES .....	52
APÊNCICE A - MATERIAL SUPLEMENTAR 1 – ANOTAÇÃO GENÔMICA DA ANÁLISE DE MLST E DO SPA-TYPING, E DOS GENES DE ADESÃO, FORMAÇÃO DE BIOFILME, RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E TOXINAS .....	55
APÊNCICE B - MATERIAL SUPLEMENTAR 2 – IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS GENES ANOTADOS, QUANTO AO PRODUTO A SER SINTETIZADO, MECANISMO DE AÇÃO E FUNÇÃO .....	70
APÊNDICE C – MATERIAL SUPLEMENTAR 3 – VALORES ABSOLUTOS E RELATIVOS DOS GENES ANOTADOS DE ADESÃO, FORMAÇÃO DE BIOFILME, RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E TOXINAS.....	86
APÊNDICE D – MATERIAL SUPLEMENTAR 4 – MAPAS DE CALOR DA CORRELAÇÃO, PELO TESTE SPEARMAN, DA PRESENÇA DOS GENES DE ADESÃO, BIOFILME, TOXINA E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE <i>Staphylococcus aureus</i> EM CEPAS ISOLADAS DE BOVINOS (MASTITE CLÍNICA, MASTITE SUBCLÍNICA E LEITE CRU) E DE HUMANOS (ABSCESSO, INFECÇÃO DE PELE E PUS).....	88

**USO DE GENÔMICA COMPARATIVA E ENSAIOS FILOGENÉTICOS PARA ANÁLISE DE LINHAGENS DE *Staphylococcus aureus* EM BOVINOS E HUMANOS EM BUSCA DE PADRÕES DE VIRULÊNCIA ESPECÍFICOS E MARCADORES DA MASTITE**

**RESUMO** - O *Staphylococcus aureus* é responsável por uma série de infecções nosocomiais e intramamárias, comuns em humanos e bovinos, respectivamente. Soma-se também um grande aparato de virulência, o que o torna um relevante problema à saúde pública e à economia no setor agropecuário. Nesse contexto, a genômica comparativa tem sido usada para compreender as relações epidemiológicas e filogenéticas da espécie. Aqui, investigamos a presença de genes de adesão, de biofilmes, de resistência antimicrobiana e de toxina, a filogenia e a tipagem genética de genomas de *S. aureus* isolados de bovinos (mastite clínica, mastite subclínica e leite cru/leite a granel) e de humanos (abscessos, infecções de pele e pus) em busca de marcadores genéticos de mastite clínica e subclínica na espécie bovina. Observamos que os genes implicados na adesão *cflA*, *fnbA*, *ebpS*, *spa*, *sdrC*, *coa*, *emp*, *vWF*, *atl*, *sasH*, *sasA* e *sasF* e os genes de toxinas *aur*, *hglA*, *hglB* e *hglC* estão associados em cepas de mastite clínica. Os resultados também reforçam a importância das proteínas superficiais *sasG* e *fnbB* na formação de biofilme, o impacto do uso irracional de antimicrobianos em cepas isoladas de humanos, o potencial zoonótico e a prevalência de diversas origens genéticas de cepas de *S. aureus* (48 tipos de sequências e 72 tipificações da proteína A, sendo frequentes o ST97, ST8 e ST152 em isolados de mastite clínica, abscesso e infecção de pele, respectivamente). Nossos resultados ilustram possíveis marcadores genéticos que podem ser utilizados no desenvolvimento de vacinas e identificação de estirpes em mastite clínica, bem como compreender as relações entre os processos de adesão, formação de biofilme, resistência antimicrobiana e toxinas.

**Palavras-chave:** Adesinas, Filogenia, Formação de Biofilme, Genes de Virulência, Saúde Única, Resistência Antimicrobiana

**USE OF COMPARATIVE GENOMICS AND PHYLOGENETICS ASSAYS FOR  
ANALYSIS OF *Staphylococcus aureus* LINES IN CATTLE AND HUMANS IN  
SEARCH OF SPECIFIC VIRULENCE PATTERNS AND MASTITIS DISEASE  
MARKERS**

**ABSTRACT** - *Staphylococcus aureus* is responsible for a series of nosocomial and intramammary infections, common in humans and cattle, respectively. There is also a large virulence apparatus, which makes it a relevant problem for public health and the economy of the agricultural sector. In this context, comparative genomics has been used to understand the epidemiological and phylogenetic relationships of the species. Here, we investigated the presence of adhesins genes, biofilms, antimicrobial resistance, and toxins, the phylogeny, and genetic typing of *S. aureus* genomes isolated from cattle (clinical mastitis, subclinical mastitis, and raw milk/bulk milk) and of humans (abscesses, skin infections, and pus) in search of genetic markers of clinical and subclinical mastitis of bovines. We observed that the genes involved in adhesion *cfIA*, *fnbA*, *ebpS*, *spa*, *sdrC*, *coa*, *emp*, *vWF*, *atl*, *sasH*, *sasA*, and *sasF*, and the toxin genes *aur*, *hglA*, *hglB*, and *hglC* are associated in clinical mastitis strains. The results also reinforce the importance of surface proteins *sasG* and *fnbB* in biofilm formation, the impact of the irrational use of antimicrobials in strains isolated from humans, the zoonotic potential, and the prevalence of diverse genetic origins of *S. aureus* strains (48 types of sequences and 72 typifications of protein A, with ST97, ST8 and ST152 being frequent in isolates from clinical mastitis, abscess and skin infection, respectively). Our results illustrate possible genetic markers that can be used in vaccine development and strain identification in clinical mastitis, as well as understanding the relationships between adhesion processes, biofilm formation, antimicrobial resistance, and toxins.

**Keywords:** Adhesins, Phylogeny, Biofilm Formation, Virulence Genes, One Health, Antimicrobial Resistance

## Lista de Tabelas

	<b>Página</b>
1. Tabela 1 - Classificação do Tipo de Sequência e da Tipagem da Proteína A(spa), em ordem decrescente, de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de humanos (abscessos, infecções de pele e pus) e de bovinos (mastite clínica, mastite subclínica e leite cru).....	16
2. Tabela 2 - Perfil gênico significativo pelo teste exato de Fisher e pela regressão logística multinomial de acordo com a origem do <i>Staphylococcus aureus</i> , isolados de humanos (abscessos, infecções de pele e pus) e de bovinos (mastite clínica, mastite subclínica), e o principal Sequence Type.....	18

## Lista de Figuras

	<b>Página</b>
<p>1. Figura 1 - Função da categoria COG (<i>Clusters of Orthologous Groups</i>) de genes centrais nos genomas de 248 <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de humanos (abscessos, infecções de pele e pus) e de bovinos (mastite clínica, mastite subclínica e leite cru).....</p>	10
<p>2. Figura 2 - Perfil do pangenoma de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de humanos (abscessos, infecções de pele e pus) e de bovinos (mastite clínica, mastite subclínica e leite cru). (A) O número de genes em função do número de genomas. As linhas sólidas representam genes conservados no genoma central; uma linha tracejada representa o total de genes. (B) O número de novos genes do pangenoma em função do número de genomas analisados. Uma linha sólida representa novos genes; uma linha tracejada representa genes únicos.....</p>	11
<p>3. Figura 3 - Perfil de genes de adesão, biofilme, resistência a antimicrobianos e produção de toxinas de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de humanos (abscessos, infecções de pele e pus) e de bovinos (mastite clínica, mastite subclínica e leite cru).....</p>	13
<p>4. Figura 4 - Árvore filogenética do 16S RRNA de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de humanos (abscessos, infecções de pele e pus) e de bovinos (mastite clínica, mastite subclínica e leite cru).....</p>	15
<p>5. Figura 5 – Mapa de calor da correlação, pelo teste Sperman, da presença dos genes de adesão, biofilme, toxina e resistência antimicrobiana de <i>Staphylococcus aureus</i> em isolados de mastite clínica.....</p>	21

## 1. INTRODUÇÃO

O *Staphylococcus aureus* é um microrganismo comensal responsável por diversos agravos à saúde humana e animal (Todd, 2014), e considerado um patógeno intracelular facultativo e responsável por infecções nosocomiais recorrentes (Watkins and Unnikrishnan, 2020). As principais portas de entrada incluem pele e mucosa danificada (Murata *et al.*, 2021) e, em humanos, é a principal causa de infecções cutâneas, septicemia, endocardite e abscessos (Lalaouna *et al.*, 2018). Em animais destacam-se as infecções intramamárias em bovinos (mastite clínica e subclínica) e a transmissão ocorre, principalmente, através das máquinas de ordenha, mãos de ordenhadores e moscas; sendo, portanto, considerado o patógeno contagioso mais prevalente no rebanho leiteiro (Zadoks *et al.*, 2011).

Os fatores de virulência possuem papéis cruciais no estabelecimento, na persistência e na gravidade dessas enfermidades, proporcionando ao agente etiológico habilidades de evasão do sistema imune bem como mecanismos que dificultam a terapia antimicrobiana. Neste sentido, as adesinas atuam na invasão das células e auxiliam na formação de biofilmes pelo *S. aureus* (Kerro Dego, 2021). Este, por sua vez, proporciona a persistência no hospedeiro, provoca danos diretos aos processos tecnológicos e possui funções protetoras contra interferências externas e agentes antimicrobianos (Gajewska and Chaj, 2020). A virulência do *S. aureus* pode ser amplificada pela produção de toxinas, as quais causam danos diretos a células hospedeiras por meio da ação de hemolisinas, leucotoxinas, proteases e outras (Otto, 2014). Além disso, esse agente etiológico pode carrear um grande número de genes de resistência, sendo uma grande preocupação para as indústrias leiteiras e para as instituições de saúde pública (Mehndiratta and Bhalla, 2014; Igbinosa *et al.*, 2016).

A transmissão zoonótica do *S. aureus* já foi amplamente documentada (Patel *et al.*, 2021) e acredita-se ser impulsionada pela presença dos fatores de virulência (Watkins and Unnikrishnan, 2020) que se relacionam às células hospedeiras (Bencardino, Amagliani and Brandi, 2021).

Assim, além do risco à saúde pública, infecções por *S. aureus* provocam importantes perdas econômicas no setor agropecuário, ocasionadas principalmente em decorrência das infecções intramamárias de vacas leiteiras. O aumento da taxa de descarte do rebanho e do leite, a redução da produção, os gastos para o tratamento

com antimicrobianos, a contaminação do leite e as mortes de animais são consequências comuns quando o rebanho leiteiro tem mastite clínica (animais com sinais visíveis) e subclínica (animais sem sinais visíveis a olho nu) (Exel *et al.*, 2021).

Estudos de genômica comparativa vêm sendo empregados para entender as relações filogenéticas e evolutivas de cepas de *S. aureus* (Ko *et al.*, 2021; Pizauro *et al.*, 2021). Contudo, ainda faltam estudos que auxiliem na compreensão do perfil destes genes, nas relações entre as cepas e a epidemiologia, na relação doença-hospedeiro e nas interações entre hospedeiro e patógeno. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi investigar genes de adesão, de biofilme, de toxinas e de resistência antimicrobiana de *S. aureus*, isolados de amostras provenientes de humanos e bovinos, em busca de perfis genéticos e marcadores de mastite bovina, por meio de genômica comparativa e filogenia.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Genômica comparativa: *Staphylococcus aureus*

A genômica comparativa é uma das subáreas da bioinformática que permite realizar um estudo comparativo dos genomas, principalmente devido ao fato de que uma espécie bacteriana pode ser efetivamente descrita utilizando seu pangenoma, que pode ser dividido em genoma central (genes compartilhados por genomas de todas as cepas da espécie que provavelmente codificam funções relacionadas à biologia celular básica) e genoma dispensável (genes presentes em alguns, mas não em todos os representantes de uma espécie), os quais incluem funções que conferem vantagens específicas sob condições ambientais particulares, como adaptação a nichos distintos, resistência a antimicrobianos e habilidade de colonizar novos hospedeiros (Bosi *et al.*, 2016).

Como a epidemiologia do *S. aureus* está associada à sua diversidade fenotípica, que é reflexo de seus genótipos, ao analisar múltiplos genomas de *S. aureus* pode-se descobrir fatores preditores de fenótipos de doenças e de virulência. Neste quesito, as metodologias clássicas de genotipagem, como Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) e a “Multilocus Sequence Typing” (MLST), avaliam genes “housekeeping”, que são altamente conservados e não são suficientes para a predição de fenótipos de doenças (Bosi *et al.*, 2016). Assim como as tecnologias moleculares

vêm crescendo exponencialmente e as técnicas de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e de sequenciamento estão cada vez mais sofisticadas, a quantidade de dados processados e a necessidade de interpretá-los cresce e fomenta o interesse pela bioinformática, que é uma ferramenta útil para auxiliar na análise de dados genéticos, tendo como vantagem o baixo custo e a abundância de dados a serem trabalhados (Gauthier et al., 2019).

Um estudo recente evidenciou que algumas linhagens de *S. aureus* têm uma gama de hospedeiros ampla, sendo uma característica que evolui dinamicamente (Sakwinska et al., 2011). Esses autores sugerem que o surgimento de genótipo adaptado aos bovinos foi devido a uma recente mudança do hospedeiro de humanos para vacas, concomitante com a perda da capacidade de colonizar humanos, indicando que a especificidade do hospedeiro é uma característica específica da linhagem, que pode evoluir rapidamente. Estes achados vão ao encontro de estudos de filogenética de genes de resistência em *S. aureus* os quais observaram que a transferência lateral de genes é crucial para a evolução da resistência antimicrobiana nos *S. aureus* (John et al., 2019).

Nesse contexto, a epidemiologia molecular representa a base científica do século XXI para saúde pública, e vem contribuindo no desenvolvimento de diagnósticos moleculares, em intervenções direcionadas aos indivíduos susceptíveis (Dorman, 2000) e nas relações biológicas (filogenéticas) de microrganismos patogênicos e seus elementos acessórios (genes) de virulência (Caldart et al., 2016).

## **2.2 Infecções intramamárias em bovinos**

A mastite bovina é um dos agravos mais onerosos do gado leiteiro, podendo resultar na morte de animais, aumento da taxa de descarte do rebanho, redução da produção, descarte de leite e tratamento com antimicrobianos. A contaminação do leite e a produção de toxinas por microrganismos também é um grande problema, responsáveis pelo aumento dos riscos inerentes à saúde do consumidor (Rocha et al., 2019).

Segundo Simões e Oliveira (2012), um animal com sinais clínicos da mastite apresenta alterações no úbere e no leite bem como anormalidades na secreção láctea, no tamanho do quarto e na temperatura da glândula mamária. A forma clínica



da mastite pode ser classificada quanto à duração e à gravidade. A duração pode ser: de curta duração, clínica recidivante, clínica persistente. Santiago e colaboradores (2009) e Radostits e colaboradores (2010) classificam a gravidade da mastite clínica como:

- Hiperaguda, infecção causada, principalmente, por coliformes que ocasionam inflamações e reações sistêmicas severas, tais como febre e dor;
- Aguda, desenvolve-se de forma lenta, mas com os mesmos sinais da mastite hiperaguda;
- Subaguda, apresenta sinais menos evidentes, e no teste da caneca de fundo preto detecta presença de grumos no leite;
- Crônica, persistente e pode durar dias, meses ou anos;
- Gangrenosa, forma intensa da mastite que apresenta quantidades significativas de soro tingido de sangue.

A mastite bovina pode ser detectada de duas formas diferentes, a clínica (apresenta sinais visíveis) e a subclínica (não apresenta sinais visíveis a olho nu), sendo esta a maior responsável por perdas econômicas, podendo reduzir a produção de leite em até 45% (Muller, 2002). Ambas são observadas nos rebanhos leiteiros sendo o *S. aureus* o principal responsável pela causa primária da infecção; já outros *Staphylococcus* coagulase-negativos (SCN) ou *Staphylococcus* não *aureus* (SNA) são considerados de menor importância ou como patógenos oportunistas (Schukken et al., 2011). Assim, nas infecções intramamárias de bovinos o *S. aureus* é o principal microrganismo responsável pela mastite contagiosa (Radostits et al., 2010).

A mastite contagiosa é aquela que tem como hospedeiro o próprio animal, sendo sua fonte principal de transmissão as glândulas mamárias infectadas de animais doentes no rebanho. As principais vias de transmissão desses agentes são as mãos do ordenhador, toalhas contaminadas, leite residual na teteira e equipamentos de ordenha contaminados. Já a mastite ambiental é causada por dois grupos de patógenos: os coliformes e alguns *Streptococcus*. O principal meio de transmissão é o ambiente das vacas, resultante do manejo inadequado de camas úmidas, de áreas sujas destinadas à permanência dos animais, da ordenha de úberes molhados, da higiene inadequada dos tetos e outros (Radostits et al., 2010).

Nos rebanhos leiteiros, há uma incidência maior da forma subclínica em relação à mastite clínica, que provavelmente é subestimada devido à falta de sinais evidentes, exceto por alterações na qualidade e quantidade do leite que nem sempre são detectadas pelos produtores e somente constatadas por análises laboratoriais (Rocha et al., 2019). Devido a sua forma assintomática, a mastite subclínica frequentemente evolui para mastite clínica e acredita-se que cepas de *S. aureus* envolvidas em infecções agudas e crônicas são diferentes, sendo mais provável que as crônicas persistam e circulem no rebanho devido à falta de sintomatologia (Sakwinska et al., 2011). Esse fato é suportado pela descoberta de que a cepa *S. aureus* Newbould 305 (mastite subclínica) e a cepa *S. aureus* SF122 (mastite clínica) apresentaram diferenças em relação ao seu conteúdo de virulência, que poderia estar associado a severidade da infecção (Peton et al., 2014).

O *S. aureus* possui mecanismos capazes de burlar o sistema imunológico do hospedeiro, como as características de adesão, formação de biofilme e invasão das células epiteliais mamárias (Kerro Dego, 2021). A adesão é dependente de proteínas superficiais que permitem ao microrganismo se ligar às células hospedeiras e está fortemente correlacionada à capacidade de formar biofilmes e à persistência estafilocócica (Chen et al., 2020). Tais mecanismos podem prejudicar os processos industriais, provocar a contaminação dos produtos alimentícios, ampliar a resistência aos antibióticos e promover outras perdas econômicas consideráveis (Gajewska e Chajęcka-Wierzchowska, 2020). Algumas pesquisas indicam que o custo bancado pelos produtores com antibióticos ineficazes é maior do que os investimentos com instrumentos laboratoriais (Freitas et al., 2005; Exel et al., 2021).

### **2.3 Saúde Única: infecções em humanos**

Os motivos para o surgimento das doenças emergentes são diversos, mas a expansão da população humana e a globalização do comércio são as principais causas (Brown, 2004). Desta forma, as interações entre humanos, animais, patógenos e o ambiente em que habitam estão intrinsecamente relacionados ao surgimento de doenças e ao transbordamento zoonótico. Nesse cenário, 61% dos organismos infecciosos conhecidos são zoonóticos e 75% destes são considerados emergentes; as bactérias ou rickettsias representam 31% dos agentes zoonóticos e podem ser,

principalmente, transmitidas pelo contato indireto (Taylor, Latham and Woolhouse, 2001). Outra grande preocupação é a prevalência crescente de patógenos bacterianos multirresistentes, instigada pelo o uso inadequado de antibióticos, o contato próximo de animais de estimação (Miranda et al., 2021), a defasagem de intervenções de higiene e saneamento e outros fatores que evidenciam cada vez mais a relação entre humanos, animais e o ambiente (Booton et al., 2021).

O *S. aureus* é o principal agente isolado de mastite e abscesso mamário em mulheres. As principais complicações para as mulheres e os bebês recém-nascidos surgem nos hospitais, onde esses entram em contato com cepas desconhecidas, virulentas e resistentes a antimicrobianos que podem ocasionar a mastite epidêmica (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000). Causa frequente de abscessos cerebrais (Dey e Bishayi, 2021), o *S. aureus* também é comum em infecções de pele (Stevens et al., 2005), bacteremia (Van Hal et al., 2012) e infecções hospitalares, sendo responsável por infecções recorrentes e cada vez mais resistentes a antibióticos (Watkins e Unnikrishnan, 2020). Portanto, uma abordagem transdisciplinar auxilia na compreensão holística, sendo crucial para prevenir surtos e minimizar o impacto de doenças infecciosas (Sánchez et al., 2021).

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1 Sequenciamento bacteriano e origem dos isolados**

Foram selecionadas, no banco de dados Genbank do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (Clark et al., 2016), genomas completos de *S. aureus* isolados de amostras de bovinos (*Bos taurus*) e seres humanos (*Homo sapiens*). Para melhor caracterização da capacidade zoonótica e de infecção em tecidos, foram utilizadas cepas de bovinos provenientes de leite de animais com mastite clínica e subclínica e de leite cru ou leite a granel, e os isolados provenientes de humanos foram de abscessos, infecções de pele e pus.

Inicialmente, selecionou-se o item “organism” no tópico “Available Facets” da plataforma online Sequence Set Browser do NCBI<sup>1</sup>, posteriormente o microrganismo “*Staphylococcus aureus*” no tópico “Top Organisms”. Os termos utilizados para as pesquisas foram mastitis, clinical mastitis, subclinical mastitis, raw milk, bulk milk,

abscess, skin infection e pus. Após essa etapa inicial, foram avaliados os genomas isolados de *Bos taurus*, cuja descrição do agravo (mastite clínica, mastite subclínica e leite cru/leite a granel) constava como estágio da doença na descrição do *BioSample* ou em publicações acadêmicas. A seguir, foram selecionados os genomas isolados de *Homo sapiens* cuja afecção envolvida (abcesso, infecção de pele e pus) constava como fonte de isolamento na descrição do *BioSample* ou em publicações acadêmicas; além disso, outras fontes de isolamento como sítio cirúrgico, pele e secreção de ferida foram aceitas para o grupo de infecções de pele, excluindo outras denominações; os dados foram coletados até 2020.

### **3.2 Anotação gênica e determinação de pangenoma**

Para obtenção do pangenoma dos isolados avaliados foi utilizada a ferramenta computacional Roary 3.13.0 (Page *et al.*, 2015). Essa ferramenta também foi usada para calcular o tamanho do pangenoma e revelar genes ortólogos. Para normalizar as análises, todos os genomas selecionados foram agrupados e posteriormente anotados pelo Prokka 1.14.6 (Seemann, 2014).

### **3.3 Anotação genômica: identificação dos genes relacionados a adesão, formação de biofilme, resistência a antimicrobianos e toxinas**

Os genomas de *S. aureus* foram anotados pelo *Rapid Annotation using Subsystem Technology* (RAST)<sup>2</sup> (Aziz *et al.*, 2008) para identificação dos genes relacionados à adesão e a formação de biofilme. A classificação destes baseou-se nos resultados fornecidos pela plataforma RAST e no banco de dados de referência *Virulence Factor of Pathogenic Bacteria* (VFDB)<sup>3</sup> (Chen *et al.*, 2004). Dessa forma foram avaliados 35 genes, sendo 26 de adesão e nove de biofilme, dos quais quatro são reguladores. Os genes de resistência a antimicrobianos foram anotados pelo ResFinder 4.1 e os genes de toxina pelo VirulenceFinder 2.0, ambos do *Center of Genomic Epidemiology*<sup>4</sup> (Bortolaia *et al.*, 2020; Clausen, Aarestrup and Lund, 2018; Zankari *et al.*, 2017).

### 3.4 Análise Filogenética

As sequências do gene 16S rRNA foram obtidas a partir de genomas completos usando o Basic Rapid Ribosomal RNA Predictor (Barrnap) v 0.9<sup>5</sup>. A correlação filogenética do gene de 16S RNA foi determinada e a árvore filogenética foi gerada com abordagem de máxima verossimilhança usando IQ-TREE2 (Minh *et al.*, 2020) após realização de alinhamento múltiplo dos genes encontrados pelo MAFFT v7 (Kato and Standley, 2013) usando os parâmetros padrões. Para suporte ao clado, foram realizadas análises de *ultrafast bootstrap* com 1000 pseudorréplicas. A visualização da árvore foi feita com o iTOL v5 (Letunic and Bork, 2016). A fim de criar uma árvore enraizada, cepas de *Escherichia coli* (BioSample: SAMN08638904, SAMN15423745, SAMN10604454, SAMD00129668 e SAMN04482320, e seus respectivos acessos no GenBank: GCA\_003018455, GCA\_014058445.2, GCA\_004358405.1, GCA\_003966465.1, GCA\_003018035.1) foram utilizadas como um grupo externo.

### 3.5 Determinação *in silico* do Multilocus Sequence Typing (MLST) e spa

Os MLSTs foram determinados *in silico* com base em dados de Sequenciamento de Genoma Completo (WGS), por meio da plataforma online MLST 2.0 (Larsen *et al.*, 2012), e a tipagem de spa obtida por meio do spaTyper versão 1.0 (Bartels *et al.*, 2014), ambos do *Center of Genomic Epidemiology*<sup>4</sup>.

### 3.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa R versão 4.1.2 (Wilson and Norden, 2015). O teste exato de Fisher foi utilizado para analisar as possíveis associações entre a presença de cada um dos genes de virulência e o tipo de enfermidade, por meio de uma tabela de contingência considerando “1” como presença e “0” como ausência; o  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. A regressão logística multinomial foi utilizada em todos os genes que apresentaram valor significativo no teste de Fisher para avaliar a associação significativa entre os tipos de afecções, considerando as amostras de leite cru como referência; de modo que a origem dos isolados foi considerada como variável resposta e os genes como

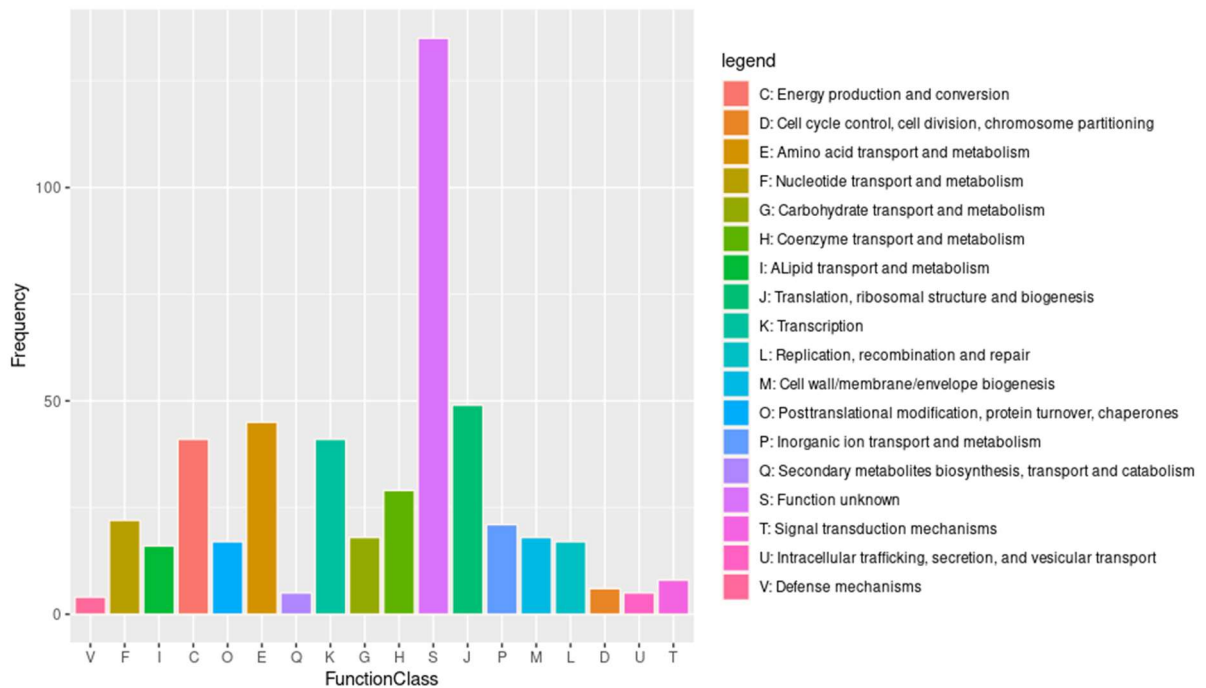
variável explicativa, a partir de modelos múltiplos. Posteriormente, analisados pelo teste Z de Wald e os valores de p foram obtidos pela função `pnorm()` do pacote `nnet`. Os genes com  $p < 0,05$  foram considerados significativos para a determinação do modelo em cada enfermidade (Dalgaard, 2008).

A avaliação entre a associação da presença dos genes de adesão, biofilme, resistência a antimicrobianos e toxinas dos isolados por origem de isolamento foi obtida pelo teste de correlação de Spearman, no qual um coeficiente próximo de 1,00 indica alta correlação positiva, próximo de -1 indica alta correlação negativa e o valor próximo de 0 indica ausência de correlação (Dalgaard, 2008). Os coeficientes foram apresentados em mapas de calor.

## 4 RESULTADOS

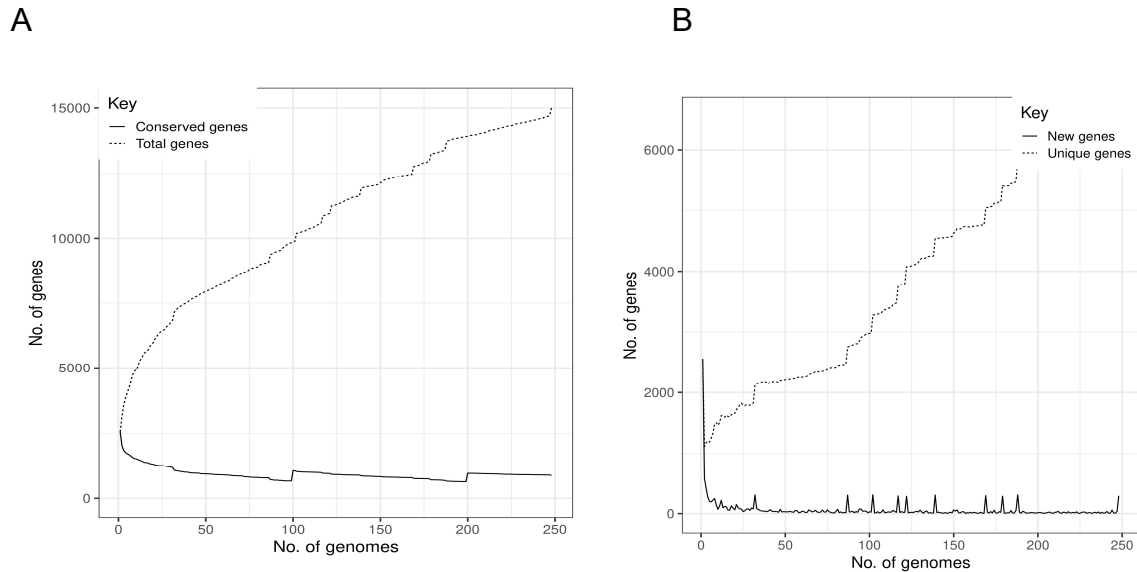
### 4.1 Avaliação do Pangenoma

Dos 248 genomas de *S. aureus* avaliados, a análise do pangenoma evidenciou 15.011 genes acessórios e 873 genes pertencentes ao genoma central. Desses, 594 foram classificados como genes *softcore*, compartilhados entre 95% e 98% dos genomas identificados; 1.842 como genes *shell*, moderadamente conservados e compartilhados entre 15% e 95% dos genomas, e 11.702 como genes *cloud*, raramente identificados compartilhado por menos de 15% dos isolados analisados. Do genoma central, os genes foram associados a tradução, estrutura ribossomal e biogênese (9,86%), transporte de aminoácidos e metabolismo (9,05%), transcrição (8,25%), produção e conversão de energia (8,25%) e muitos com função desconhecida (27,16%); demonstrando uma grande variedade genética entre os isolados (Figura 1).



**Figura 1.** Função da categoria COG (*Clusters of Orthologous Groups*) de genes centrais nos genomas de 248 *Staphylococcus aureus* isolados de humanos (abscessos, infecções de pele e pus) e de bovinos (mastite clínica, mastite subclínica e leite cru)

A Figura 2 demonstra que ainda há um crescimento de genes únicos inversamente relacionado ao número de novos genes a serem revelados para essa espécie, ou seja, à medida que novas linhagens continuam sendo sequenciadas e estudadas, ainda é benéfico e importante que ocorra o sequenciamento de cepas oriundas de humanos e bovinos relacionadas à mastite clínica, subclínica, abscessos, infecções de pele e pus.



**Figura 2:** Perfil do pangenoma de *Staphylococcus aureus* isolados de humanos (abscessos, infecções de pele e pus) e de bovinos (mastite clínica, mastite subclínica e leite cru). (A) O número de genes em função do número de genomas. As linhas sólidas representam genes conservados no genoma central; uma linha tracejada representa o total de genes. (B) O número de novos genes do pangenoma em função do número de genomas analisados. Uma linha sólida representa novos genes; uma linha tracejada representa genes únicos

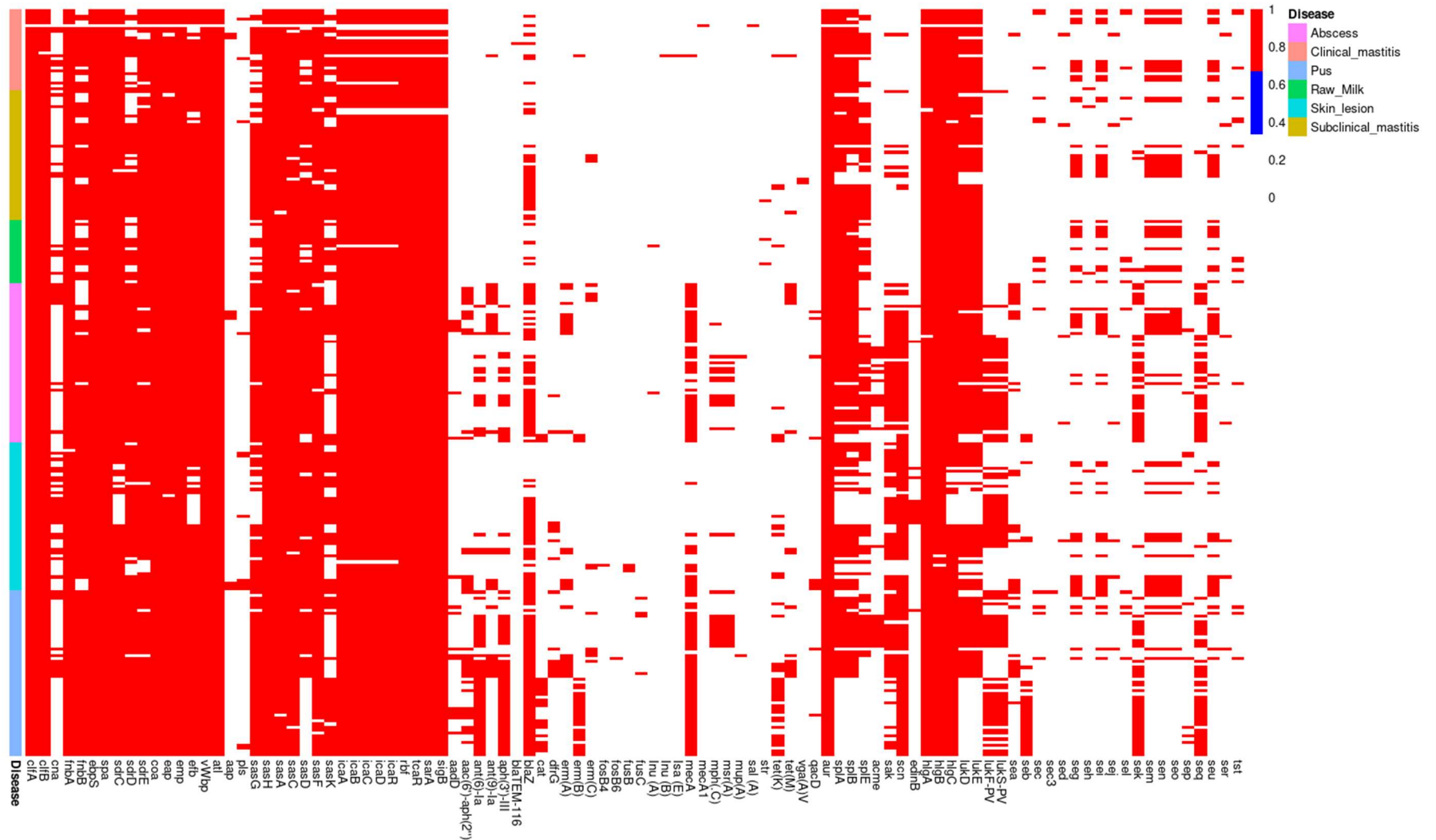
#### 4.2 Distribuição dos genes de adesinas, biofilmes, resistência e toxina nos isolados de *S. aureus*

Após a etapa de seleção de genomas dos *S. aureus*, foram obtidos 248 genomas sequenciados advindos de bovinos e humanos. Dos 91 isolados bovinos, 27 foram de mastite clínica, 43 de mastite subclínica e 21 de leite cru/leite a granel. Dos 157 de isolados de humanos, 53 foram de abscessos, 49 de infecções de pele e 55 de pus. A etapa de anotação pelo RAST identificou 26 genes que foram classificados como adesinas (*clfA*, *clfB*, *cna*, *fnbA*, *fnbB*, *ebpS*, *spa*, *sdrC*, *sdrD*, *sdrE*, *coa*, *eap*, *emp*, *efb*, *vWbp*, *atl*, *aap*, *pls*, *sasG*, *sasH*, *sasA*, *sasC*, *sasD*, *sasF*, *sasI*, *sasK*) e nove genes relacionados à formação de biofilmes (*icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD*, *icaR*, *rbf*, *tcaR*, *sarA* e *sigB*). O ResFinder identificou 30 genes relacionados a resistência antimicrobiana (*aadD*, *aac(6')-aph(2'')*, *aadE*, *ant(9)-Ia*, *aph(3')-III*, *blaTEM-116*, *blaZ*,



*cat* (pC233), *dfrG*, *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *fosB4*, *fosB6*, *fusB*, *fusC*, *Inu (A)*, *Inu (B)*, *Isa (E)*, *mecA*, *mecA1*, *mph(C)*, *msr(A)*, *mup(A)*, *sal (A)*, *str*, *tet(K)*, *tet(M)*, *vga(A)<sub>v</sub>*, *qacD*) e o VirulenceFinder 43 genes de toxinas (*aur*, *splA*, *splB*, *splE*, ACME, *sak*, *scn*, *edinB*, *hlgA*, *hlgB*, *hlgC*, *lukD*, *lukE*, *lukF-PV*, *lukS-PV*, *sea*, *seb*, *sec*, *sec3*, *sed*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sel*, *sek*, *sem*, *se n*, *seo*, *sep*, *seq*, *seu*, *ser*, *tst*) (Material Suplementar 1). Todos foram identificados e caracterizados quanto a função, mecanismo de ação e expressão de seus produtos (Material Suplementar 2).

Os genes *clfA*, *clfB*, *fnbA*, *ebpS*, *spa*, *coa*, *eap*, *emp*, *vWbp*, *atl*, *sasH*, *sasA*, *sasC*, e *sasF* foram observados em frequências elevadas nos isolados de todos os grupos analisados. Os genes *cna*, *aap* e *pls* foram observados com uma frequência menor do que 20% em todos os grupos analisados. Grandes disparidades nas frequências entre os grupos foram observadas para os genes *cna*, *fnbB*, *sdrC*, *sdrD*, *sdrE*, *efb*, *aap*, *pls*, *sasG*, *sasD*, *sasK*, operon *icaADBC*, *icaR*, *rbf*, *tcaR*, *saA* e *sigB*. Os genomas de mastite clínica apresentaram menor frequência dos genes de biofilme (*icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD*) e seus reguladores (*rbf*, *tcaR*, *sarA* e *sigB*), porém nos outros grupos avaliados estes apresentaram frequência superior a 90%. O gene *fnbB* se destacou em infecção de pele e pus, o gene *sdrD*, por sua vez, se destacou nos isolados de bovinos, infecção de pele e pus. Comportamento semelhante foi observado com o gene *sasG*. Os genes *sdrE* e *efb* apresentaram maior frequência em isolados de mastite clínica e infecção de pele, enquanto o gene *sdrC* em infecção de pele e o *sasD* em mastite clínica, leite cru e pus (Figura 3, Material Suplementar 3).



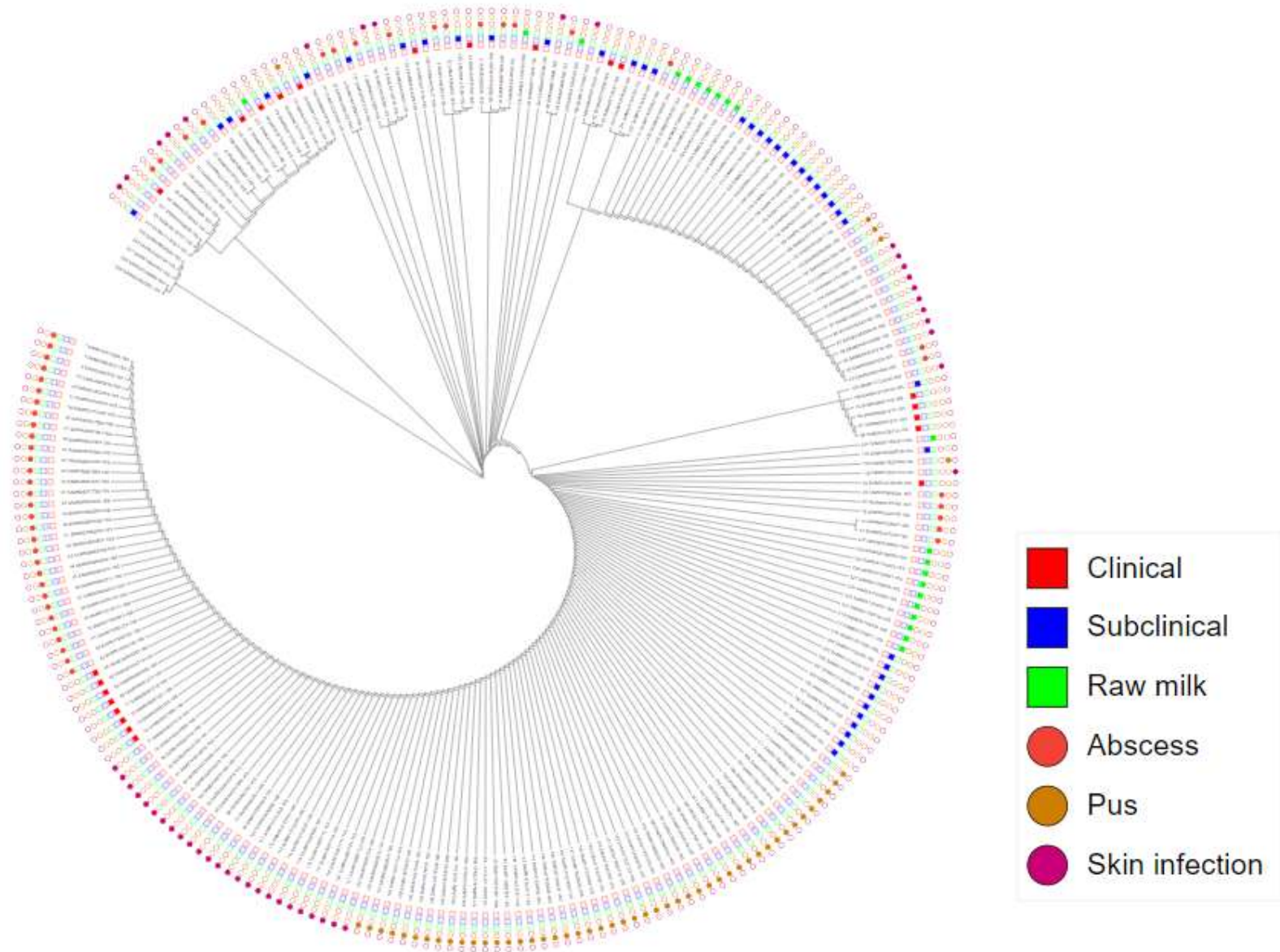
**Figura 3.** Perfil de genes de adesão, biofilme, resistência a antimicrobianos e produção de toxinas de *Staphylococcus aureus* isolados de humanos (abscessos, infecções de pele e pus) e de bovinos (mastite clínica, mastite subclínica e leite cru)

A distribuição dos genes *aadD*, *aac(6')/aph(2'')*, *aadE*, *ant(9)-Ia*, *aph(3')-III*, *cat(pC233)*, *dfrG*, *erm(A)*, *erm(B)*, *mecA*, *mph(C)*, *msr(A)*, *tet(K)* e *tet(M)*, pertencentes a resistência antimicrobiana, prevaleceu nos isolados humanos, sendo esporádicas suas aparições nos isolados de bovinos. Já os genes *blaTEM-116*, *erm(C)*, *fosB4*, *fosB6*, *fusB*, *fusC*, *Inu(A)*, *Inu(B)*, *Isa(E)*, *mecA1*, *mup(A)*, *sal(A)*, *str*, *vga(A)<sub>v</sub>* e *qacD* se comportaram esporadicamente em todos os grupos. Assim, o *blaZ* foi o único gene que apresentou frequência considerável em todos os grupos avaliados, porém, assim como o *mecA*, foi elevada somente em isolados de pus (Figura 3).

Somente os genes *aur*, *hlgA*, *hlgB* e *hlgC*, classificados como toxinas, apresentaram frequência elevada em todos os grupos avaliados, ao passo que outros genes como *spIA*, *spIB* e *edinB* apresentaram frequência alta em isolados de mastite clínica e leite cru, leite cru e pus, respectivamente; já os genes *lukD* e *lukE* foram frequentes em isolados de leite cru e abscesso (Figura 3).

### **4.3 Análise Filogenética**

Foi observado que as cepas de leite cru e mastite subclínica apresentaram pequena relação filogenética pela avaliação do 16S. Além disso, os resultados obtidos ressaltam o caráter zoonótico do *S. aureus*, pois isolados de fontes diferentes (bovinos e humanos) apresentaram associação filogenética muito próxima (Figura 4).



**Figura 4** - Árvore filogenética do 16S RRNA de *Staphylococcus aureus* isolados de humanos (abscessos, infecções de pele e pus) e de bovinos (mastite clínica, mastite subclínica e leite cru)

#### 4.4 Tipos de *Multilocus Sequence Typing* e spa

As análises de MLST revelaram 48 tipos de sequência (ST). Os principais e mais frequentes foram ST8 (15,73%), ST97 (12,10%), ST59 (11,69%), ST239 (6,85%) e ST152 (5,24%); além disso, 11 isolados não foram identificados. A tipagem de spa identificou 72 tipificações de proteína A (t), sendo os mais prevalentes a t008 (n = 32), t437 (n = 26), t355 (n = 11) e t267 (n = 8); todos foram classificados de acordo com a fonte de isolamento, o hospedeiro e o ST (Tabela 1).

**Tabela 1** - Classificação do Tipo de Sequência e da Tipagem da Proteína A(spa), em ordem decrescente, de *Staphylococcus aureus* isolados de humanos (abscessos, infecções de pele e pus) e de bovinos (mastite clínica, mastite subclínica e leite cru)

MLST	Spa typing (Number of isolates)						
	<i>Bos taurus</i>			<i>Homo sapiens</i>			
Sequence type (Number of isolates)	Clinical masitis	Subclinical mastitis	Raw milk	Abscess	Skin infection	Pus	
8 (39)	t2953(1)	-	-	t008(23) t024(1) t121(1) unknown (1)	t024(1) t008 (1)	t008(8) t024(2) t622(1)	
97 (30)	t359(1) t2734(3) unknown(1)	t267(8) t380(1) t527(1) t2421(1) t2734(1) unknown(1)	t224(4) t3380(1)	-	t1182 (1)	t044 (1)	t437(23) t1212(1) t3523(1) t3736(1)
59 (29)	-	-	-	t437 (3)	-		
239 (17)	-	-	-	t030(5) t037(1) t632(1) unknown (1)	t037 (2)	t037(7)	
152 (13)	-	-	-		t355(11) t4256(1) unknown (1)	-	
5 (10)	-	-	-	t002(1) t062(1) unknown(1)	t002(1) unknown(3)	t002(2) t9405(1)	
151 (10)	t529(4)	t529(1)	t529(5)	-	-	-	
228 (7)	-	-	-	t041(2) unknown (1)	t041(4)	-	
15 (6)		t368 (2)	-	-	t084(2) t085(1) t346 (1)	-	
126 (6)	t605 (2)	t605 (4)	-	-	-	-	
1 (5)	t127 (1)	t127(1)	t7589 (1)	-	t127(1)	t127(1)	
479 (5)	t543 (4)	t2873 (1)	-	-	-	-	

630 (5)	-	-	-	-	t377(2) t4549 (2)	t377 (1)
20 (4)	t1987 (1)	t164(3) t650 (1)			-	-
30 (3)	-	-	-	t021 (1)	t2132 (1)	unknown (1)
71 (3)	t524 (2)	-	t524 (1)	-	-	-
80 (3)	-	-	-	t044 t131 (1)	(1) t1849 (1)	-
133 (3)	t1403 (1)	-	t6367 (1) unknown (1)	-	-	-
504 (3)	t529 (1)	t529 (2)	-	-	-	-
45 (2)	-	-	-	-	t1081 (1)	t1081 (1)
88 (2)	-	-	-	t1376 (1)	-	t690 (1)
115 (2)	t267 (1)	t359 (1)	-	-	-	-
398 (2)	unknown (1)	-	-	-	t011 (1)	-
425 (2)	-	-	t10021 (1) unknown (1)	-	-	-
737 (2)	-	t005 (2)	-	-	-	-
3183 (2)	-	-	t1028 (2)	-	-	-
6 (1)	-	-	-	t304 (1)	-	-
7 (1)					t091(1)	
10 (1)	-	-	-	t352 (1)	-	-
22 (1)	-	t3243 (1)	-	-	-	-
72 (1)	-	-	-	-	t3169 (1)	-
101 (1)	-	-	-	-	t7170 (1)	
105 (1)	-	-	-	t002 (1)	-	-
121 (1)	-	-	-	-	t272 (1)	-
291 (1)	-	-	-	-	-	t1149 (1)
351 (1)	t529 (1)	-	-	-	-	-
352 (1)	t267 (1)	-	-	-	-	-
464 (1)	-	t3297 (1)	-	-	-	-
701 (1)	-	-	t429 (1)	-	-	-
705 (1)	-	-	t529 (1)	-	-	-
772 (1)	-	-	-	-	-	t657 (1)
1074 (1)	-	-	t529 (1)	-	-	-
1633 (1)	-	-	-	-	t355 (1)	-
2219 (1)	-	t18728 (1)	-	-	-	-
3099 (1)	-	-	t529 (1)	-	-	-
3140 (1)	-	t529 (1)	-	-	-	-
3249 (1)	-	-	-	-	unknown (1)	-
5476 (1)	-	t458 (1)	-	-	-	-
Unknown (11)	unknown (1)	t121 (1) t164 (1) t380 (1)	-	t002 (2) t1029 (1)	t111 (1) t4549 (1) unknown (2)	-

#### 4.5 Associação entre a presença dos genes de virulência e a origem do isolado

O teste de Fisher, utilizado como triagem de genes, demonstrou que ocorreu associação significativa ( $p < 0,05$ ) entre nove genes de adesinas, nove de biofilme, 18 de resistência e 25 de toxinas. Além disso, o *Sequence Type* também apresentou associação significativa com a origem do isolado.

O teste da regressão logística multinomial demonstrou que a maioria dos genes apresentou relação significativa com a origem de todos os isolados. Contudo, o gene *blaZ* não demonstrou ser significativo nos isolados de mastite clínica, assim como os genes *blaZ*, *str*, *spIB* e *sek* em mastite subclínica, os genes *fusB*, *fusC*, *tet* (M) e *tst* em abscesso, os genes *aadE* e *tet*(M) em infecções de pele e os genes *aac(6')-aph(2'')*, *drfG* e *tet*(M) em isolados de pus. A avaliação do MLST foi significativa apenas para isolados de mastite clínica, abscesso e infecção de pele, sendo os mais preponderantes o ST97, ST8 e ST152, respectivamente (Tabela 1, Tabela 2).

**Tabela 2.** Perfil gênico significativo pelo teste exato de Fisher e pela regressão logística multinomial de acordo com a origem do *Staphylococcus aureus*, isolados de humanos (abscessos, infecções de pele e pus) e de bovinos (mastite clínica, mastite subclínica), e o principal Sequence Type

Origem	Perfil gênico significativo	MLSTs
Mastite clínica	<b>Adesinas:</b> <i>clfB, cna, fnbB, sdrC, sdrD, efb, sasG, sasD, sasK</i> , <b>Biofilme:</b> <i>icaADBC, icaR, rbf, tcaR, sarA, sigB</i> , <b>Resistência:</b> <i>aadD, aac(6')-aph(2'')</i> , <i>aadE, ant(9)-Ia, aph(3')-III, cat (pC233),</i> <i>drfG, erm(A), erm(B), fusB, fusC, mecA, mph(C), msr(A), str,</i> <i>tet(K), tet(M)</i> , <b>Toxina:</b> <i>spIA, spIB, spIE, ACME, sak, scn, edinB,</i> <i>hlgC, lukD, lukE, lukF-PV, lukS-PV, sea, seb, sec, seg, sei, sel,</i> <i>sek, sem, sen, seo, seq, seu, tst</i>	ST97
Mastite subclínica	<b>Adesinas:</b> <i>clfB, cna, fnbB, sdrC, sdrD, efb, sasG, sasD, sasK</i> , <b>biofilme:</b> <i>icaADBC, icaR, rbf, tcaR, sarA, sigB</i> <b>Resistência:</b> <i>aadD, aac(6')-aph(2'')</i> , <i>aadE, ant(9)-Ia, aph(3')-III, cat (pC233),</i> <i>drfG, erm(A), erm(B), fusB, fusC, mecA, mph(C), msr(A), tet(K),</i> <i>tet(M)</i> , <b>Toxina:</b> <i>spIA, spIE, acme, sak, scn, edinB, hlgC, lukD,</i> <i>lukE, lukF-PV, lukS-PV, sea, seb, sec, seg, sei, sel, sem, sen,</i> <i>seo, seq, seu, tst</i>	-

Abcesso		<b>Adesinas:</b> <i>clfB, cna, fnbB, sdrC, sdrD, efb, sasG, sasD, sasK</i> , ST8 <b>biofilme:</b> <i>icaADBC, icaR, rbf, tcaR, sarA, sigB</i> , <b>Resistência:</b> <i>aadD, aac(6')-aph(2''), aadE, ant(9)-Ia, aph(3')-III, blaZ, cat (pC233), dfrG, erm(A), erm(B), mecA, mph(C), msr(A), str, tet(K)</i> , <b>Toxina:</b> <i>splA, splB, splE, acme, sak, scn, edinB, hlgC, lukD, lukE, lukF-PV, lukS-PV, sea, seb, sec, seg, sei, sel, sek, sem, sen, seo, seq, seu</i>
Infecção de pele	de	<b>Adesinas:</b> <i>clfB, cna, fnbB, sdrC, sdrD, efb, sasG, sasD, sasK</i> , ST152 <b>biofilme:</b> <i>icaADBC, icaR, rbf, tcaR, sarA e sigB</i> , <b>Resistência:</b> <i>aadD, aac(6')-aph(2''), ant(9)-Ia, aph(3')-III, blaZ, cat (pC233), dfrG, erm(A), erm(B), fusB, fusC, mecA, mph(C), msr(A), str, tet(K)</i> , <b>Toxina:</b> <i>splA, splB, splE, acme, sak, scn, edinB, hlgC, lukD, lukE, lukF-PV, lukS-PV, sea, seb, sec, seg, sei, sel, sek, sem, sen, seo, seq, seu, tst</i>
Pus		<b>Adesinas:</b> <i>clfB, cna, fnbB, sdrC, sdrD, efb, sasG, sasD, sasK</i> , - <b>biofilme:</b> <i>icaADBC, icaR, rbf, tcaR, sarA, sigB</i> , <b>Resistência:</b> <i>aadD, aadE, ant(9)-Ia, aph(3')-III, blaZ, cat (pC233), erm(A), erm(B), fusB, fusC, mecA, mph(C), msr(A), str, tet(K)</i> , <b>Toxina:</b> <i>splA, splB, splE, acme, sak, scn, edinB, hlgC, lukD, lukE, lukF-PV, lukS-PV, sea, seb, sec, seg, sei, sel, sek, sem, sen, seo, seq, seu, tst</i>

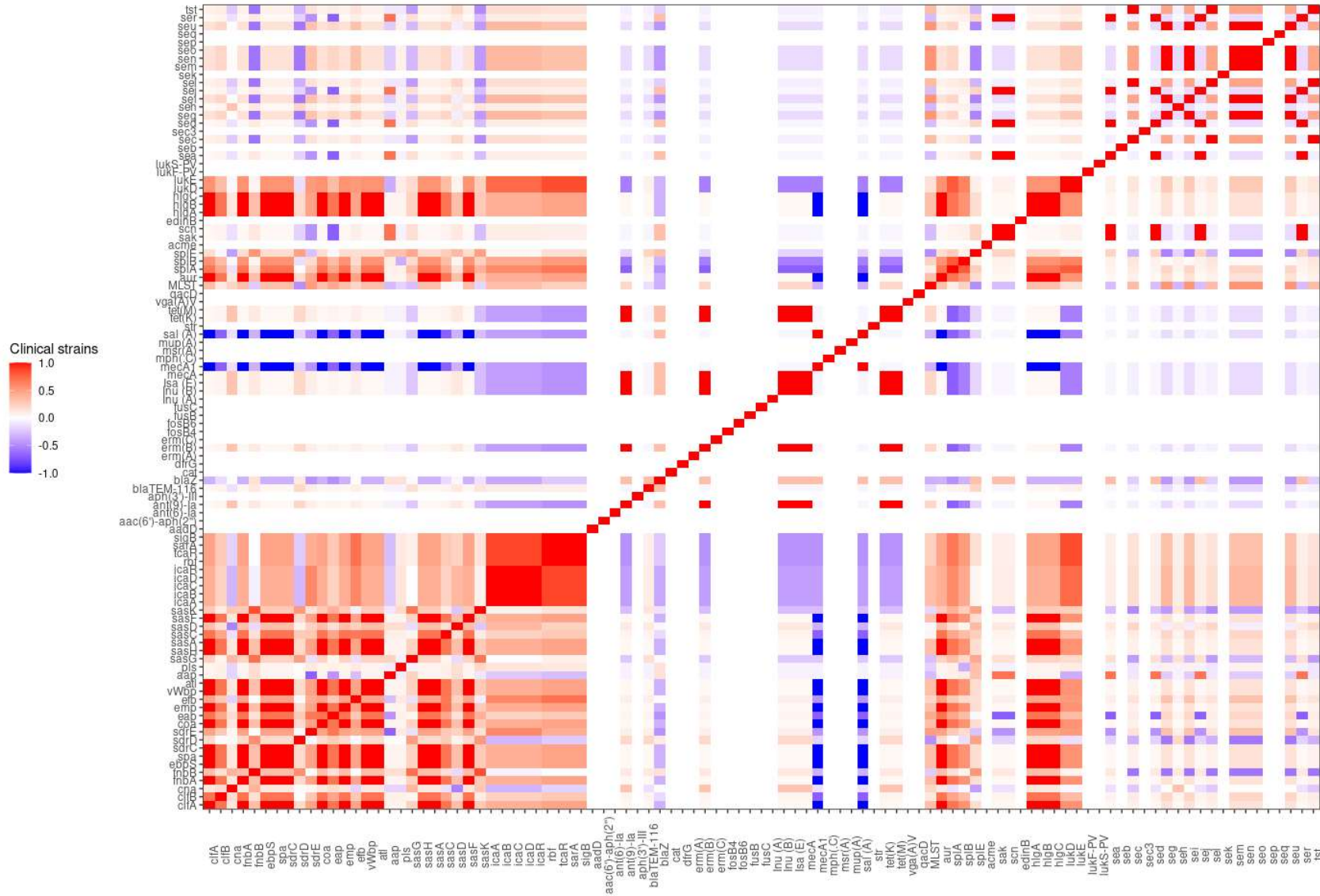
#### 4.6 Correlação entre os genes

Foi observada considerável divergência na associação entre os genes de adesão e biofilme nos grupos avaliados. Os resultados do teste de correlação de Spearman apresentados nos mapas de calor (Figura 5) demonstram que o padrão dos genes nos isolados de *S. aureus* de mastite clínica teve maior correlação entre os genes de adesão, sendo que *clfA*, *fnbA*, *ebpS*, *spa*, *sdrC*, *coa*, *emp*, *vWbP*, *atl*, *sasH*, *sasA* e *sasF* tiveram alta correlação (próximo ou igual a 1), aliado também aos genes de toxina *aur*, *hlgA*, *hlgB* e *hlgC*. A correlação também foi elevada entre os genes *fnbB*, *sasK* e o *sasG* neste grupo. Nos isolados de leite cru foi observada alta correlação entre os genes *sdrD*, o gene *sasK* e *fnbA*. Nos isolados de humanos, a correlação foi alta nos genes de adesão *efb*, *sdrC* e *sasG* em infecções de pele e *sasG* e *sdrE* em abscessos. Na formação de biofilme, todos os genes avaliados apresentaram correlação elevada nas cepas sequenciadas de mastite clínica e



subclínica. Ainda, o operon *icaADBC* e o regulador *icaR* foram altamente correlacionados em isolados de leite cru e infecções de pele (Figura 5, Material Suplementar 4).

Outras associações foram observadas no grupo de mastite clínica, entre os genes pertencentes a resistência antimicrobiana *ant(9)-Ia*, *erm(B)*, *mecA*, *Isa(E)*, *inu(B)*, *tet(M)* e *tet(K)*, assim como os genes de toxinas *sak*, *scn*, *sea*, *sed*, *sej* e *ser*. Em todos os grupos, ocorreu a associação dos genes *seu*, *seg*, *sei*, *sen*, *sem* e *seo*, nos isolados de bovinos houve a associação dos genes *sel*, *sec* e *tst*. Além disso, os genes *sej*, *sed* e *ser* estiveram associados em mastite subclínica e abscesso; os genes *seq* e *sek* em infecções de pele; *lukF-PV* e *lukS-PV* em mastite subclínica, infecções de pele e pus; *lukD* e *lukE* em isolados de abscessos e infecções de pele; *splA* e *splB* em abscessos e os genes *lukD*, *lukE*, *splA* e *splB* em isolados de pus (Material Suplementar 4).



**Figura 5** - Mapa de calor da correlação, pelo teste Spermán, da presença dos genes de adesão, biofilme, toxina e resistência antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* em isolados de mastite clínica

## 5 DISCUSSÃO

O *S. aureus* é considerado um importante agente etiológico, tanto para humanos como para animais (Sergelidis and Angelidis, 2017). Dos genomas completos obtidos neste estudo, 63,3% correspondem a cepas de origem humana e 36,7% a cepas de animais. As pesquisas confirmam que a adesão é uma etapa essencial durante a colonização bacteriana pelo *S. aureus* nesses hospedeiros, pois antecede a invasão celular, a internalização e a infecção crônica (Josse, Laurent and Diot, 2017). Além disso, a capacidade de formar biofilmes auxilia na evasão imunológica, contribuindo para ineficácia de antimicrobianos, troca de material genético e adaptação do agente etiológico (Idrees *et al.*, 2021). Tal como na literatura, as evidências aqui observadas reforçam a importância da adesão e da formação de biofilme, uma vez que os genes classificados como toxina e resistência antimicrobiana foram pouco frequentes e apresentaram poucas associações relevantes. Assim, o fato de que os genes *clfA*, *clfB*, *fnbA*, *ebpS*, *spa*, *coa*, *eap*, *emp*, *vWbp*, *atl*, *sasH*, *sasA*, *sasC*, *sasF*, operon *icaADBC*, *icaR*, *rbf*, *tcaR*, *sarA* e *sigB* foram observados em frequências elevadas vai ao encontro da habilidade do *S. aureus* de aderir aos tecidos (Roche *et al.*, 2004; Petrie *et al.*, 2020), provocar a internalização (Hagggar *et al.*, 2003), persistir nos hospedeiros (Cheng *et al.*, 2009) e formar biofilmes (Gajewska e Chaj, 2020).

### 5.1 Relevância dos genes de Adesinas e Biofilmes

Os genes *clfA* e, especialmente, *clfB* geralmente são pertinentes em infecções de pele (Petrie *et al.*, 2020), na promoção da internalização do *S. aureus* em mastite bovina (Ying *et al.*, 2021) e na formação de abscesso em infecções cutâneas (Lacey *et al.*, 2019). As proteínas que eles expressam relacionam-se à fase inicial de disseminação estafilocócica na formação de abscessos (Cheng *et al.*, 2009), o fato que ambos os genes estavam presentes em quase todas as cepas sugere que essa observação deve ser válida para qualquer local de infecção.

Outra relação importante é que a proteína expressa pelo gene *ebpS* possui capacidade de se ligar a peptídeos da elastina (Downer *et al.*, 2002), presente em pele, vasos sanguíneos, pulmões, ligamentos e tendões. Assim como os produtos do

gene *fnbA* e *fnbB* que codifica proteínas de ligação à fibronectina, as quais possuem a capacidade em aderir à elastina imobilizada (Roche *et al.*, 2004). Essa última observação parece ser relevante em infecções de pele e pus, pois elevadas frequências do gene *fnbB* foram assim encontradas. Outra consideração importante é que a capacidade de internalização do *S. aureus* em células epiteliais mamárias bovinas, em casos de mastite clínica e subclínica, está associada a superexpressão deste gene (Pereyra *et al.*, 2016); e em humanos, a infecções recorrentes na promoção da evasão imunológica (Al Kindi *et al.*, 2019). Adicionalmente, o gene *sasC* e o *sasG* exercem função na agregação celular e na formação de biofilme (Schroeder *et al.*, 2009), e o *sasK* não possui função conhecida (Material Suplementar 2). Estes achados reforçam a recente observação de que o gene *fnbB* é um dos principais marcadores de biofilme em *S. aureus* (Kadkhoda *et al.*, 2020) e sugerem que o gene *sasK* exerce função na agregação celular e na formação de biofilme.

Vale destacar que o *sasK* apresentou frequência inferior (< 90%) em todos os isolados, porém mostrou-se significativo no teste de Fisher e na regressão logística multinomial. Da mesma maneira que o *sasK*, a função exercida pela proteína expressa pelo *sasD* é desconhecida (Foster *et al.*, 2014); sabe-se que *sdrC* e o *sasD* compartilham de uma rede regulatória semelhante (Brignoli *et al.*, 2019), contudo nenhuma relação foi visualizada. Por fim, o gene *sasD* apresentou frequência superior a 90% nos isolados de mastite subclínica, abscesso e infecções de pele, e significativo em todos os isolados (Tabela 2).

O contato inicial com as células hospedeiras inclui três *Sdr*. O *sdrC* está envolvido na adesão intercelular bacteriana e na formação de biofilme (Barbu *et al.*, 2014), o *sdrD* desempenha papel no sistema imunológico (Sitkiewicz, Babiak and Hryniewicz, 2011) e o gene *sdrE* está envolvido na evasão complementar (Zhang *et al.*, 2017). Semelhantemente, a frequência do *sdrC*, *sdrD* e *sdrE* foi inferior nos isolados de pele, evidenciando um perfil diferente de outros grupos avaliados, e o *sdrD* apresentou-se menos frequente em amostras obtidas de bovinos. No teste de Fisher e na regressão logística multinomial o *sdrC* e o *sdrD* foram significativos. Desse modo, sugere-se que a importância desses *Sdr* é reduzida para os tecidos epiteliais, em especial nas infecções cutâneas, e o perfil encontrado para o gene *sdrD* parece ser irrelevante para adesão ao tecido glandular mamário no estabelecimento de mastite bovina e na

formação de biofilme. Entretanto, estudos *in vivo* são necessários para comprovar essas relações.

Igualmente, o *sasC*, o *sasA*, o *sasF* e o *sasH* tiveram frequência acima de 90% nos isolados de todos os grupos avaliados. O gene *sasA* já foi descrito em isolados de mastite gangrenosa (Vautor *et al.*, 2009) e o *sasF*, modulado pelo *tcaR* (McCallum *et al.*, 2004), foi descrito como prevalente em isolados de mastite bovina (Pizauro *et al.*, 2021). Até o presente momento, pouco se sabe sobre o *sasH*, que ainda não foi funcionalmente caracterizado (Ythier *et al.*, 2012). Assim, neste trabalho foi realçada a importância da associação desses genes em isolados de mastite clínica (Figura 5), principalmente considerando os genes implicados na adesão (*cflA*, *fnbA*, *sdrC*, *spa* e *ebpS*), na evasão de resposta imune (*coa*, *emp* e *vWbp*) e na formação de biofilme (*atl*). Neste quesito, os produtos do gene *atl* são importantes nos estágios iniciais da formação de biofilme (Bose *et al.*, 2012) por estarem relacionados aos processos de autólise (Biswas *et al.*, 2006) e divisão celular (Sugai *et al.*, 1995).

Os genes *vWbp* e *coa* promovem a infecção através da ativação da protrombina (Thomer, Schneewind and Missiakas, 2013), e foi recentemente revelado que o gene *vWF* é o determinante arquetípico da coagulação estafilocócica (Pickering *et al.*, 2021). Outro fato interessante é a capacidade que a proteína de ligação *vWF* (*vWbp*) tem de ativar a interação entre o *vWF* e o *CflA* (Viljoen *et al.*, 2021). Essa relação foi observada nos isolados de mastite clínica, uma vez que todos esses genes se demonstraram fortemente associados (Figura 5). Apesar de apresentarem frequência acima de 90%, os genes *spa*, *coa*, *vWbp* e *CflA*, assim como o gene *fnbA*, não foram significativos no teste de Fisher (Tabela 2). Dessa forma, este estudo ressalta o fato de que provavelmente a patogenicidade do *S. aureus* na mastite bovina deve estar relacionada à presença simultânea ou a associação entre eles, principalmente em relação aos fatores de coagulação e à internalização.

As menores frequências observadas (inferior a 50%) dos genes *cna*, *p/s* e *aap* podem estar associadas ao fato de que o gene *cna* expressa uma proteína ligadora ao colágeno que é mais associada a infecções musculares esqueléticas (Smeltzer and Gillaspay, 2000) do que tecidos epiteliais. O gene *p/s* está intimamente associado ao gene *mecA*, sendo portanto evidente em cepas resistentes a meticilina (Savolainen *et al.*, 2001); provavelmente devido a poucos isolados (< 45%) que apresentaram o gene

*mecA*. Além disso, foi relatado que a falta de *emp* e a presença de *pls* está correlacionada com a redução de virulência (Kurlenda, Grinholc and Węgrzyn, 2008), o que foi inversamente observado nos isolados (baixa frequência de *pls* e alta de *emp*) (Material suplementar 3).

É importante ressaltar que os genes *eap* e *emp* apresentaram frequências elevadas e são relevantes para a formação de abscessos e persistência estafilocócica (Cheng *et al.*, 2009). A literatura também demonstrou que a formação de biofilme *in vivo* envolve as proteínas Emp e Eap, e a expressão dos seus genes é dependente do operon *icaADBC* (Johnson, Cockayne and Morrissey, 2008). O processo para a formação de biofilme ocorre em diferentes etapas, Idrees e colaboradores, 2021, fizeram uma revisão detalhada. Os resultados evidenciam que o gene *aap* teve uma frequência inferior a 10%, sendo pouco importante para os isolados, já o *ica locus* e os genes *rbf*, *tcaR*, *saA* e *sigB* apresentaram frequência acima de 90%, com exceção dos isolados de mastite clínica (material suplementar 3).

Essas diferenças podem estar relacionadas ao fato de que o PIA é o principal exopolissacarídeo sintetizado pelo operon *icaADBC* e que a formação de biofilme não seja tão necessária na ocorrência de mastite clínica, mas sim na manutenção das cepas no hospedeiro (Arciola *et al.*, 2015). O *ica locus* mostrou-se significativo no teste de Fisher e na regressão logística multinomial; esse resultado é pertinente com a persistência estafilocócica e a cronicidade dos agravos, podendo ter relação com infecções recidivas (Oogai *et al.*, 2011). A associação entre *icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD* e *icaR* ocorreu em cepas oriundas de leite cru e infecções de pele (Material Suplementar 4). Apesar desses mecanismos serem complexos, os resultados refletem o efeito imparcial do *icaR* em relação ao operon *icaADBC*.

Os genes *sarA*, *rbf*, *tcaR* e *sigB* foram significativos no teste de Fisher e na regressão logística multinomial (Tabela 2) em todas as fontes de isolamento e também foram associados ao *ica locus* em isolados de mastite clínica e subclínica (Figura 5, Material Suplementar 4). Este evento pode estar relacionado com o efeito dos reguladores *sarA*, *sigB* e *rbf* (Jenul and Horswill, 2019; Valle, Echeverz and Lasa, 2019) na expressão do gene *icaR* e ao fato de que o *rbf* é um ativador da formação de biofilme em diferentes cepas de *S. aureus* (Luong, Lei and Lee, 2009).

Estudos têm apontado para a importância das proteínas superficiais na formação de biofilme (Cucarella, Solano and Valle, 2001; Vergara-Irigaray *et al.*, 2009; Geoghegan *et al.*, 2010). Aqui, identificamos que o *sasG* e o *fnbB* foram significativos em todos os grupos avaliados (Tabela 2), o primeiro com frequência superior a 90% em isolados de abscessos e pus; ambos foram associados em isolados de mastite clínica e leite cru. Ainda, o *sasG* e *rbf*, *tcaR*, *saA* e *sigB* e *icaR* não se apresentaram correlacionados (Material Suplementar 4). Tanto o *sasG* como o *fnbB* já foram associados a doenças invasivas (Rasmussen *et al.*, 2013).

A discrepância observada no gene *efb* baseia-se na frequência, inferior a 90% em isolados de mastite clínica e em infecções de pele, e na associação entre os genes *sdrC* e *sasG* em infecções de pele. Na presença desse gene, cepas tornam-se mais virulentas, a cicatrização de feridas é prejudicada (Palma *et al.*, 1996) e a imunidade é reduzida (Posner *et al.*, 2016). Levando em consideração as funções do *sdrC*, as evidências sinalizam a relevância do gene *efb* na evasão imune, visto que sua presença foi significativa para todos os isolados; e quando associado aos genes *sdrC* e *sasG* pode contribuir na patogenicidade em tecidos epiteliais (Tabela 2, Material Suplementar 4).

Muitos genes de adesinas e biofilmes têm sido testados como alvos de vacinas, especialmente em vacinas destinadas a gerar títulos elevados de anticorpos opsonizantes contra antígenos de superfície de *S. aureus* (Miller *et al.*, 2019). Assim, os achados deste estudo sugerem que as associações dos genes *cflA*, *fnbA*, *ebpS*, *spa*, *sdrC*, *coa*, *emp*, *vWF*, *atl*, *sasH*, *sasA* e *sasF* são as que possuem maior relação com a manifestação da mastite clínica, sendo portanto, fatores importantes para o uso em desenvolvimento futuro de vacinas e, possivelmente, marcadores de cepas que provocam a doença quando da presença simultânea desses genes.

## 5.2 Prevalência das toxinas

Os genes de toxinas *aur*, *hglA*, *hglB* e *hglC* foram os únicos que apresentaram frequência superior a 90% em todos os grupos avaliados. Ademais, estiveram associados aos genes de *cflA*, *fnbA*, *ebpS*, *spa*, *sdrC*, *coa*, *emp*, *vWF*, *atl*, *sasH*, *sasA* e *sasF* em isolados de mastite clínica (Figura 5). A aureolisina (expressa pelo gene *aur*) modifica o fator de adesão CflB e ativa outras proteases, potencializando a

virulência do *S. aureus* (Sabat et al., 2000; McAleese et al., 2001). Já as proteínas expressas pelos genes *hglA*, *hglB* e *hglC* são leucotoxinas bicomponentes que possuem a capacidade de formar poros na membrana celular e, conseqüentemente, lise celular (Staal and Colin, 2021). Se considerarmos que elas exercem funções semelhantes às do gene *atl*, estas toxinas podem ser importantes nos estágios iniciais da colonização bacteriana e formação de biofilme na mastite clínica. Além disso, um estudo recente notou que vacinas podem ter sucesso quando utilizadas em associação a toxinas e outros antígenos (Zhang et al., 2017). Logo, a associação dos genes supracitados ou de seus produtos na mastite clínica podem ser alvos importantes para o desenvolvimento de imunizantes (Ahmad-Mansour et al., 2021).

Acredita-se que as enterotoxinas possuem papel no desenvolvimento de mastite (Kerro Dego, 2021), porém a única relação observada foi a associação dos genes *sak*, *scn*, *sea*, *sed*, *sej* e *ser* (Figura 5) na mastite clínica, sendo estes pertencentes ao mesmo isolado que pode ter se adaptado a viver nesse ambiente hostil (Bardiau et al., 2016). Outra associação observada foi do cluster genético de enterotoxinas (cge) *seg*, *sei*, *sem*, *sem*, *seo* e *seu* em todos os grupos avaliados; igualmente foram suas frequências, as quais vêm sendo observada por outros estudos (Blaiotta et al., 2004; Bania et al., 2006; Indrawattana et al., 2013). Geralmente associadas a intoxicações alimentares, cepas de *S. aureus* que expressam enterotoxinas podem causar danos diretos e indiretos aos hospedeiros, como vômitos, diarreias, hemólises e ativação de citocinas (Schwan, 2019; Ren et al., 2020). Os genes *sea*, *seb*, *sec*, *seg*, *sei*, *sel*, *sek*, *sem*, *sem*, *seo*, *seq*, *seu* e *tst* foram significativos (Tabela 2), e devem estar relacionados à virulência dessas cepas, independente da origem da infecção, bem como à adaptação a ambientes hostis; além de representar risco elevado à saúde pública (Günaydin, Aslantaş and Demir, 2011).

Estudos também evidenciam que o cge e os genótipos *sec*, *sel* e *tst-1* foram frequentes em cepas de MRSA (Hu et al., 2011), mas essa relação provou não ser direta com o gene *mecA*. Nossos dados demonstram a associação entre os genes *sec*, *sel* e *tst* somente nos isolados de bovinos, em que a frequência do gene *mecA* foi baixa. A literatura também evidencia a importância desses genes na virulência da mastite bovina (TOLLERSRUD et al., 2000; Franck et al., 2017; Fang et al., 2019). Assim, tais resultados ampliam os indícios sugerindo que esses elementos genéticos,



em harmonia, são importantes a quaisquer amostras obtidas de rebanhos bovinos leiteiros, contribuindo, portanto, com a hipótese de que os reservatórios de *S. aureus*, advindos de bovinos e humanos, constituem duas subpopulações diferentes (Larsen *et al.*, 2000) o que foi suportado pela avaliação filogenética.

Os genes *lukD* e *lukE* foram associados em isolados de abscessos, em infecções de pele e, junto aos genes *spIA* e *spIB*, em pus; eles também foram considerados significativos para todos os grupos, porém tiveram frequências superiores em isolados de bovinos, com exceção dos isolados de abscessos (Figura 3, Tabela 2). Ainda faltam estudos que determinem as funções das proteínas expressas por esses genes, mas sabe-se que uma variante demonstrou elevada citotoxicidade em neutrófilos humanos (Morinaga, Kaihou and Noda, 2003) e a ausência desses genes minimizou a virulência (Alonzo *et al.*, 2012). Alguns trabalhos evidenciaram prevalência alta desses genes (Rasmussen *et al.*, 2013; Patel *et al.*, 2021), bem como a elevada conservação de suas proteínas (Vandenesch, Lina and Henry, 2012). Logo, acreditamos que as consequências provocadas por eles sejam comuns em ambas as espécies.

Assim como *lukD* e *lukE*, os genes *spIA* e *spIB* foram associados a doenças invasivas (Rasmussen *et al.*, 2013; Snel *et al.*, 2015). No presente trabalho, estes apresentaram perfis semelhantes aos daqueles, sendo significativos na maioria dos grupos avaliados, bem como associados entre si em isolados de abscessos. Já os genes *lukF-PV* e o *lukS-PV* apresentaram-se associados em todos os grupos que estiveram presentes, o que condiz com a bibliografia uma vez que seus produtos são secretados antes de se unirem para formar a toxina PVL (Panton-Valentine leukocidin) (Kaneko and Kamio, 2004).

### 5.3 Prevalência dos genes de resistência a antimicrobianos

Entre as principais relações observadas notaram-se maiores frequências em isolados de humanos, sendo prevalentes e significativos os genes de resistência a aminoglicosídeos (*aadD*, *aac(6')/aph(2'')*, *aadE*, *ant(9)-Ia*, *aph(3')-III*), ao cloranfenicol [*cat(pC233)*], às tetraciclinas [*tet(K)*, *tet(M)*], aos macrolídeos e lincosaminas [*erm(A)*, *erm(B)*, *mph(C)*, *msr(A)*], ao trimetropin (*dfrG*) e aos  $\beta$ -Lactâmicos (*mecA*). Esses resultados coincidem com os achados em humanos, uma vez que a alta prevalência dos genes de *aadD*, *aac(6')/aph(2'')*, *tet(M)*, *msr(A)*, *aph(3')-III*, *erm(A)* e *erm(B)* já foi

relacionada a pacientes internados em UTIs (Abiri *et al.*, 2017); assim como a presença dos genes *tet(K)*, *tet(M)*, *mph(C)*, *msr(A)* e outros em hospitais (Lozano *et al.*, 2012).). Estas relações também foram observadas no presente estudo, sendo que o genes *tet(M)* apresentou alta correlação com os genes *erm(A)*, *dfrG* e *ant(9)-Ia* em isolados de pus, pele e em abcesso com a adição do gene [*cat(pC233)*]. A resistência conferida ao trimetopim, em humanos, é globalmente ocasionada pelo gene *dfrG* e foi associada a co-resistências a tetraciclinas (Nurjadi *et al.*, 2015), sendo que em mastites foram poucos os relatos (Haubert *et al.*, 2017). Em síntese, os resultados reforçam a crescente presença de genes de resistência observada em cepas de humanos enquanto que apontam para uma relativa baixa resistência em cepas de origem bovina (Sweileh, 2021).

Nas amostras de leite isoladas de bovinos apenas uma apresentou o gene *mecA*, provando ser poucas cepas de *Staphylococcus aureus* Resistentes a Meticilina (MRSA) presentes em vacas leiteiras e leite cru. Existe uma preocupação sobre o surgimento dessas cepas no rebanho bovino leiteiro, mas a prevalência ainda é baixa (Patel *et al.*, 2021). Ainda, a presença do gene *blaZ*, que configura resistência à penicilina, foi baixa nos isolados de bovinos; fato semelhante observado em isolados de mastite clínica na Suécia (Leijon *et al.*, 2021). Contudo, outros trabalhos vêm apontando a presença do *blaZ* e sua expressão fenotípica em bovinos, como nas províncias da Ruanda (Ndahetuye *et al.*, 2021), no norte de Xinjiang, na China (Kou *et al.*, 2021), e no Kenya (Mbindyo *et al.*, 2021).

Em humanos, cepas de MRSA e cepas resistentes à penicilina (*mecA* e o *blaZ*) demonstraram ser importantes para a persistência das infecções e, conseqüentemente, representam maior risco para a saúde pública. Ambos os genes exibiram frequências maiores nos isolados de humanos, em especial em amostras de pus (Figura 3). Em Portugal, isolados de infecções de pele e tecidos moles foram 44,1% e 97,1% resistentes à metilina e à penicilina, respectivamente (Ferreira *et al.*, 2021); valores semelhantes foram observados em amostras de diferentes hospitais (Ahmed, Tolba and El-Zawahry, 2019). Outrossim, a frequência do *mecA* e do *blaZ* aumentou, em ordem crescente, nas infecções de pele, em abscessos e em pus (Material Suplementar); se levarmos em consideração o caráter crônico dessas enfermidades, as cepas MRSA podem ser mais prevalentes nas infecções crônicas,

uma vez que a farmacocinética dos antibióticos em infecções contendo pus se comporta de formas diferentes (Bryant *et al.*, 1980).

Houve a associação dos genes *ant(9)-Ia*, *mecA*, *tet(M)* e *tet(K)*, *erm(B)*, *Isa(E)* e *Inu(B)* no grupo de mastite clínica (Figura 5), os quais conferem resistência aos aminoglicosídeos, aos  $\beta$ -Lactâmicos, às tetraciclinas e aos macrolídeos e lincosamidas. Essa associação é justificada pelo fato de que ambos os genes pertencem ao mesmo MRSA (Ronco, Stegger and Pedersen, 2017), contudo, os dados não permitem dizer se essa associação será corriqueira a outros MRSA isolados de animais com mastite clínica, visto que sua prevalência é baixa.

Semelhatamente, aconteceu com os genes ACME, *msr(A)* e *mph(C)* em isolados de pus que apresentaram frequências baixas. No entanto, evidências indicam que o gene *msr(A)* pode exercer papel na virulência (Reynolds, Ross and Cove, 2003) e que sua presença é necessária para a expressão do *mph(C)* (Matsuoka *et al.*, 2003). Observamos que o gene *mph(C)* foi um pouco mais frequente que o *msr(A)*, e talvez a relação com a expressão seja inversa, mas as diferenças foram mínimas e é preciso sequenciar mais genomas (Figura 2). Recentemente, demonstrou-se que o ACME sozinho não contribuiu para a virulência bacteriana do *S. aureus* (Wu *et al.*, 2020); sendo assim, a associação com o *msr(A)* parece ser pertinente, visto seu provável papel na virulência.

#### 5.4 Multi-locus sequence typing e Spa – typing

Os estudos epidemiológicos de Tipagem de Sequência de Locus Múltiplo (MLST) e da tipagem da proteína estafilocócica A (*spa*) permitem compreender as relações entre as cepas e a epidemiologia do *S. aureus*, uma vez que é possível observar linhagens comuns em isolados de humanos, de animais, de ambientes hospitalares e associados à comunidade (McCarthy e Lindsay, 2010). Nossos resultados demonstram relações epidemiológicas importantes entre os STs que tiveram frequências elevadas, porém a maioria apresentou frequência baixa e é preciso identificar e sequenciar mais genomas (Figura 1, Figura 2).

De fato, o *S. aureus* é um importante agente zoonótico, uma vez que cepas de diferentes origens apresentam-se na mesma ramificação (Figura 4). A regressão logística multinomial demonstrou como significativo apenas os STs isolados de

mastite clínica, de abscessos e de infecções de pele, sendo os mais frequentes ST97, ST8 e ST152, respectivamente. O primeiro (ST97) pertence a linhagem bovina, já o segundo e o terceiro a linhagem humana, no entanto, todos foram descritos em ambos os hospedeiros e podem ser indicativos de transmissão zoonótica (Ndahetuye *et al.*, 2021). Além disso, os resultados encontrados também mostraram a diversidade de STs e spa-typing identificados.

Outras linhagens que demonstraram características zoonóticas foram ST15, ST1, ambas relatadas em alimentos (Lv *et al.*, 2021), e ST398. Recentemente foi proposta a adaptação do ST1 a ambiente hospitalar (Côrtes *et al.*, 2021), e o ST15 esteve identificado em amostras de surto hospitalar relacionado a problemas com desinfecção de superfícies (Donkor *et al.*, 2018). O ST398 inicialmente era frequente em animais, mas provou ser uma preocupação para os humanos (Kashif *et al.*, 2019).

Os ST59, ST239, ST5, ST228, ST630, ST30, ST80, ST45 e ST88 foram comuns nos isolados humanos. O ST59 é frequentemente observado em isolados de comunidade e até o momento é mais frequente em amostras de alimentos (Pang *et al.*, 2020). A linhagem ST239 é globalmente disseminada e resistente a antimicrobianos em hospitais (Wang *et al.*, 2014), assim como o ST228, que possui alta transmissibilidade (Abdelbary *et al.*, 2020), o ST630 com alta patogenicidade (Zong *et al.*, 2020) e o ST45 responsável por doenças invasivas graves (Effelsberg *et al.*, 2020). O ST5, por sua vez, representa ameaça clínica, capacidade de aderir a células epiteliais e provocar hemólise (Jian *et al.*, 2021); já o ST30, responsável por epidemias mundiais, vem demonstrando aumento na virulência (Di Gregorio *et al.*, 2021). Por fim, o ST80 e o ST88 parecem estar principalmente associados à comunidade (Stam-Bolink *et al.*, 2007), pois cepas estão sendo encontradas em animais, alimentos e pecuaristas (Otalú *et al.*, 2018).

Os ST151, ST126, ST479, ST20, ST71, ST133, ST504, ST115, ST425, ST737 e ST3183 foram identificados somente nos isolados bovinos, e nesses isolados notou-se maior diversidade de ausência de genes, sem notar algum padrão estabelecido. Fato interessante é que os genes associados a adesão em mastite clínica (Figura 5) mantiveram-se inalterados em todos os STs observados. Vale destacar o ST504, conhecido também por ocasionar mastite bovina, uma vez que se mostrou como fraco produtor de biofilme (Grunert *et al.*, 2018); essa informação pode ser relevante devido

à ausência das proteínas superficiais nesses isolados, pois os genes *cna*, *fnbB*, *sdrD*, *aap*, *pls*, *sasG* e *sasK* não estão presentes (Material Suplementar 1); essa observação reforça a hipótese vista anteriormente de que o *sasG* e *fnbB* possam estar envolvidos na regulação e formação de biofilme (Cucarella, Solano and Valle, 2001; Vergara-Irigaray *et al.*, 2009; Geoghegan *et al.*, 2010).

O ST151 tem sido relatado como linhagem bovina comum em casos de mastite, passível a aquisição de genes de resistência à vancomicina (Guinane *et al.*, 2008), semelhante ao que acontece com a distribuição ST126, sendo associado ao leite bovino em âmbito mundial (Silva *et al.*, 2016). Descrito principalmente em cepas de mastite clínica e subclínica, o ST71 pertence à mesma linhagem do ST97, com cada vez mais isolados, demonstrando serem MRSA (Cormican and Keane, 2018), sendo que no presente trabalho foram caracterizados em isolados de leite cru. O ST479 foi retratado somente em amostras de leite (Chenouf *et al.*, 2021), o ST115 mostrou-se condizente com isolados bovinos (Smith *et al.*, 2005) e o ST3183 foi identificado recentemente em amostras de leite cru (McMillan *et al.*, 2016). Cepas da linhagem ST20 foram relatadas ocasionalmente em bovinos, humanos (Aung *et al.*, 2019) e alimentos (Bystroń *et al.*, 2010). Da mesma maneira ocorreu com o ST133, citado em diversos hospedeiros e amostras ambientais, apresentando porcentagem elevada de MRSA (Roberts, Soge and No, 2013). O ST425 atualmente é caracterizado como linhagem associada a humanos e animais (Paterson, Harrison and Holmes, 2014), encontrado inclusive em animais silvestres (Porrero *et al.*, 2014). Por fim, o ST737 foi reportado associado à comunidade, ao ambiente hospitalar (Karbuz *et al.*, 2017) e a bovinos (Erdem and Türkyilmaz, 2013).

## 6 CONCLUSÕES

Nossos resultados ilustram um perfil de genes que pode ser utilizado como marcador genético para a identificação de estirpes com potencial para causar mastite clínica e novos alvos gênicos que podem ser utilizados no desenvolvimento de vacinas. Além disso, contribuem na elucidação de funções e relações entre os genes de adesão, de biofilmes, de resistência e de toxinas, na compreensão dos perfis epidemiológicos do *S. aureus* e na relação entre a severidade do agente etiológico frente aos agravos de humanos e de bovinos.

## 7 Rodapé

- 1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/wgs/>
- 2 <https://rast.nmpdr.org/>
- 3 <http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/genus.cgi?Genus=Staphylococcus>
- 4 <https://cge.cbs.dtu.dk/services/>
- 5 <https://github.com/tseemann/barrnap>

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdelbary MMH, Feil EJ, Senn L, Petignat C, Prod'hom G, Schrenzel J, et al (2020) 'Phylogeographical Analysis Reveals the Historic Origin, Emergence, and Evolutionary Dynamics of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST228', **Frontiers in Microbiology**, 11, pp. 1–10. doi: 10.3389/fmicb.2020.02063.

Abiri P, Akhavan Sepahi A, Goudarzi H, Goudarzi M. (2017) 'Distribution of genes encoding toxin, adhesion, and antibacterial resistance among various SCCmec types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from intensive care unit, Tehran, Iran', **Jundishapur Journal of Microbiology**, 10(12). doi: 10.5812/jjm.14477.

Ahmad-Mansour N, Loubet P, Pouget C, Dunyach-Remy C, Sotto A, Lavigne JP, et al. (2021) '*Staphylococcus aureus* toxins: An update on their pathogenic properties and potential treatments', **Toxins**, 13(10), pp. 1–22. doi: 10.3390/toxins13100677.

Ahmed SH, Tolba STM, El-Zawahry YA (2019) 'Evaluation of the role of bla genes in beta lactam and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ', **Egyptian Journal of Botany**, 59(1), pp. 29–38. doi: 10.21608/ejbo.2018.4221.1187.

Al Kindi, A. et al. (2019) '*Staphylococcus aureus* internalized by skin keratinocytes evade antibiotic killing', **Frontiers in Microbiology**, 10(SEP), pp. 1–10. doi: 10.3389/fmicb.2019.02242.

Alonzo F, Benson MA, Chen J, Novick RP, Shopsin B, Torres VJ. (2012) '*Staphylococcus aureus* leucocidin ED contributes to systemic infection by targeting neutrophils and promoting bacterial growth in vivo', **Molecular Microbiology**, 83(2), pp. 423–435. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07942.x.

Arciola CR, Campoccia D, Ravaioli S, Montanaro L. (2015) 'Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: Structural and regulatory aspects', **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 5(FEB), pp. 1–10. doi: 10.3389/fcimb.2015.00007.

Aung MS, Urushibara N, Kawaguchiya M, Sumi A, Shinagawa M, Takahashi S, et al. (2019) 'Clonal diversity and genetic characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a tertiary care hospital in Japan', **Microbial Drug Resistance**, 25(8), pp. 1164–1175. doi: 10.1089/mdr.2018.0468.

Aziz RK, Bartels D, Best A, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, et al. (2008) 'The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology', **BMC Genomics**, 9, pp. 1–15. doi: 10.1186/1471-2164-9-75.

Bania J, Dabrowska A, Korzekwa K, Zarczynska A, Bystron J, Chrzanowska J, et al. (2006) 'The profiles of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from nasal carriers', **Letters in Applied Microbiology**, 42(4), pp. 315–320. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.01862.x.

Barbu EM, Mackenzie C, Foster TJ, Höök M. (2014) '<sc>SdrC</sc> induces staphylococcal biofilm formation through a homophilic interaction', **Molecular Microbiology**, 94(1), pp. 172–185. doi: 10.1111/mmi.12750.

Bardiau M, Caplin J, Detilleux J, Graber H, Moroni P, Taminiou B, et al. (2016) 'Existence of two groups of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis based on biofilm formation, intracellular survival, capsular profile and agr-typing', **Veterinary Microbiology**, 185, pp. 1–6. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.01.003.

Bartels MD, Petersen A, Worning P, Nielsen JB, Larner-Svensson H, Johansen HK, et al. (2014) 'Comparing whole-genome sequencing with sanger sequencing for spa

typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ', **Journal of Clinical Microbiology**, 52(12), pp. 4305–4308. doi: 10.1128/JCM.01979-14.

Bencardino D, Amagliani G, Brandi G. (2021) 'Carriage of *Staphylococcus aureus* among food handlers: An ongoing challenge in public health', **Food Control**, 130(February), p. 108362. doi: 10.1016/j.foodcont.2021.108362.

Biswas R, Voggu L, Simon UK, Hentschel P, Thumm G, Götz F. (2006) 'Activity of the major staphylococcal autolysin Atl', **FEMS Microbiology Letters**, 259(2), pp. 260–268. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00281.x.

Blaiotta G, Ercolini D, Pennacchia C, Fusco V, Casaburi A, Pepe O, et al. (2004) 'PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and sel in *S. aureus* AB-8802', **Journal of Applied Microbiology**, 97(4), pp. 719–730. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02349.x.

Boaton RD, Meeyai A, Alhusein N, Buller H, Feil E, Lambert H, et al. (2021) 'One Health drivers of antibacterial resistance: Quantifying the relative impacts of human, animal and environmental use and transmission', **One Health**, 12(January). doi: 10.1016/j.onehlt.2021.100220.

Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, et al. (2020) 'ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes', **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 75(12), pp. 3491–3500. doi: 10.1093/jac/dkaa345.

Bose JL, Lehman MK, Fey PD, Bayles KW. (2012) 'Contribution of the *Staphylococcus aureus* Atl AM and GL Murein hydrolase activities in cell division, autolysis, and biofilm formation', **PLoS ONE**, 7(7). doi: 10.1371/journal.pone.0042244.

Bosi E, Monk JM, Aziz RK, Fondi M, Nizet V, Palsson B. (2016) 'Comparative genome-scale modelling of *Staphylococcus aureus* strains identifies strain-specific metabolic capabilities linked to pathogenicity', **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 113(26), pp. E3801–E3809. doi: 10.1073/pnas.1523199113.



Brignoli T, Manetti AGO, Rosini R, Haag AF, Scarlato V, Bagnoli F, et al. (2019) 'Absence of protein a expression is associated with higher capsule production in staphylococcal isolates', **Frontiers in Microbiology**, 10(MAY), pp. 1–15. doi: 10.3389/fmicb.2019.00863.

BROWN, C. (2004) 'Emerging zoonoses and pathogens of public health significance – an overview', **Revue Scientifique et Technique de l'OIE**, 23(2), pp. 435–442. doi: 10.20506/rst.23.2.1495.

Bryant RE, Rashad AL, Mazza JA, Hammond D. (1980) 'B-Lactamase Activity in Human Pus', **Journal of Infectious Diseases**, 142(4), pp. 594–601. doi: 10.1093/infdis/142.4.594.

Bystroń J, Podkowik M, Korzekwa K, Lis E, Molenda J, Bania J. (2010) 'Characterization of borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from food of animal origin', **Journal of Food Protection**, 73(7), pp. 1325–1327. doi: 10.4315/0362-028X-73.7.1325.

Caldart ET, Mata H, Canal CW, Ravazzolo AP (2016) 'Análise filogenética: conceitos básicos e suas utilizações como ferramenta para virologia e epidemiologia molecular', **Acta Scientiae Veterinariae**, 44(0), pp. 01–20.

Chen, L., et al (2004) 'VFDB: a reference database for bacterial virulence factors', **Nucleic Acids Research**, 33(Database issue), pp. D325–D328. doi: 10.1093/nar/gki008.

Chen L, Tang ZY, Cui SY, Ma ZB, Deng H, Kong WL, et al. (2020) 'Biofilm production ability, virulence and antimicrobial resistance genes in *Staphylococcus aureus* from various veterinary hospitals', **Pathogens**, 9(4). doi: 10.3390/pathogens9040264.

Cheng, A. G. et al. (2009) 'Genetic requirements for *Staphylococcus aureus* abscess formation and persistence in host tissues', **FASEB Journal**, 23(10), pp. 3393–3404. doi: 10.1096/fj.09-135467.

Chenouf NS, Mama OM, Messai CR, Ruiz-Ripa L, Fernández-Fernández R, Carvalho

I, et al. (2021) 'Detection of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci and PVL/mecA genes in cefoxitin-susceptible *Staphylococcus aureus* (t044/ST80) from unpasteurized milk sold in stores in Djelfa, Algeria', **Journal of Dairy Science**, 104(3), pp. 2684–2692. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19270>.

Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. (2016) 'GenBank', **Nucleic Acids Research**, 44(D1), pp. D67–D72. doi: 10.1093/nar/gkv1276.

Clausen PTLC, Aarestrup FM, Lund O. (2018) 'Rapid and precise alignment of raw reads against redundant databases with KMA', **BMC Bioinformatics**, 19(1), pp. 1–8. doi: 10.1186/s12859-018-2336-6.

Cormican P, Keane OM. (2018) 'Complete Genome Sequences of Sequence Type 71 (ST71) and ST97 *Staphylococcus aureus* Isolates from Bovine Milk', **Microbiology Resource Announcements**. Edited by D. A. Baltrus, 7(5), pp. 71–72. doi: 10.1128/MRA.00954-18.

Côrtés MF, Botelho AMN, Bandeira PT, Mouton W, Badiou C, Bes M, et al. (2021) 'Reductive evolution of virulence repertoire to drive the divergence between community- and hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of the ST1 lineage', **Virulence**, 12(1), pp. 951–967. doi: 10.1080/21505594.2021.1899616.

Cucarella C, Solano C, Valle J. (2001) 'Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation', **Journal of bacteriology**, 183(9), pp. 2888–2896. doi: 10.1128/JB.183.9.2888.

Dalgaard, P. (2008) *Introductory Statistics with R*. 2nd edn. Edited by J. C. D. H. W. H"ardle. New York, NY: **Springer New York** (Statistics and Computing). doi: 10.1007/978-0-387-79054-1.

Dey R, Bishayi B. (2021) 'Ciprofloxacin and dexamethasone in combination attenuate *S. aureus* induced brain abscess via neuroendocrine-immune interaction of TLR-2 and glucocorticoid receptor leading to behavioral improvement', **International Immunopharmacology**, 97(May), p. 107695. doi: 10.1016/j.intimp.2021.107695.

Donkor ES, Jamrozy D, Mills RO, Dankwah T, Amoo P, Egyir B, et al. (2018) 'A genomic infection control study for *Staphylococcus aureus* in two Ghanaian hospitals', **Infection and Drug Resistance**, Volume 11, pp. 1757–1765. doi: 10.2147/IDR.S167639.

Dorman JS. (2000) 'Molecular epidemiology: The impact of molecular biology in epidemiology research', **Revista médica de Chile**, 128(11), pp. 1–8. doi: 10.4067/S0034-98872000001100012.

Downer R, Roche F, Park PW, Mecham RP, Foster TJ. (2002) 'The elastin-binding protein of *Staphylococcus aureus* (EbpS) is expressed at the cell surface as an integral membrane protein and not as a cell wall-associated protein', **Journal of Biological Chemistry**, 277(1), pp. 243–250. doi: 10.1074/jbc.M107621200.

Effelsberg N, Stegger M, Peitzmann L, Altinok O, Coombs GW, Pichon B, et al. (2020) 'Global Epidemiology and Evolutionary History of *Staphylococcus aureus* ST45', **Journal of Clinical Microbiology**. Edited by D. J. Diekema, 59(1), pp. 1–13. doi: 10.1128/JCM.02198-20.

Erdem Z, Türkyilmaz S. (2013) 'Siğirdçilerden ve sektör çalışmalarından izole edilen metisilin dirençli Stafilocokleri'nin moleküler tiplendirmesi', **Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, 19(6), pp. 963–968. doi: 10.9775/kvfd.2013.9177.

Exel CE, Halasa T, Koop G, Steeneveld W, Lam TJGM, Benedictus L, et al. (2021) 'A stochastic modelling approach to determine the effect of diverse *Staphylococcus aureus* strains on the economic and epidemiological outcomes of mastitis intervention strategies in dairy cattle', **Preventive Veterinary Medicine**, 199(April 2021), p. 105566. doi: 10.1016/j.prevetmed.2021.105566.

Fang, R. *et al.* (2019) 'Staphylococcal enterotoxin C is an important virulence factor for mastitis', **Toxins**, 11(3), pp. 1–13. doi: 10.3390/toxins11030141.

Ferreira C, Costa SS, Serrano M, Oliveira K, Trigueiro G, Pomba C, et al. Clonal lineages, antimicrobial resistance, and pvl carriage of *staphylococcus aureus*

associated to skin and soft-tissue infections from ambulatory patients in Portugal. **Antibiotics**. 2021;10(4).

Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Höök M. (2014) 'Adhesion, invasion and evasion: The many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus* ', **Nature Reviews Microbiology**, 12(1), pp. 49–62. doi: 10.1038/nrmicro3161.

Franck KT, Gumpert H, Olesen B, Larsen AR, Petersen A, Bangsbo J, et al. (2017) 'Staphylococcal aureus Enterotoxin C and enterotoxin-like L associated with post-partum mastitis', **Frontiers in Microbiology**, 8(FEB), pp. 1–5. doi: 10.3389/fmicb.2017.00173.

Freitas MFL, Pinheiro Júnior JW, Stamford TLM, de A. Rabelo SS, da Silva DR, da Silveira Filho VM, et al. (2005) 'Perfil De Sensibilidade Antimicrobiana in Vitro De *Staphylococcus*', **Arq. Inst. Biol.**, 72, pp. 171–177.

Gajewska J, Chajęcka-Wierzchowska W. (2020) 'Biofilm formation ability and presence of adhesion genes among coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolates from raw cow's milk', **Pathogens**, 9(8), pp. 1–12. doi: 10.3390/pathogens9080654.

Gauthier J, Vincent AT, Charette SJ, Derome N. (2019) 'A brief history of bioinformatics', **Briefings in Bioinformatics**, 20(6), pp. 1981–1996. doi: 10.1093/bib/bby063.

Geoghegan JA, Corrigan RM, Gruszka DT, Speziale P, O'Gara JP, Potts JR, et al. (2010) 'Role of surface protein SasG in biofilm formation by *Staphylococcus aureus* ', **Journal of Bacteriology**, 192(21), pp. 5663–5673. doi: 10.1128/JB.00628-10.

Di Gregorio S, Haim MS, Vielma Vallenilla J, Cohen V, Rago L, Gulone L, et al. (2021) 'Genomic Epidemiology of CC30 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains from Argentina Reveals Four Major Clades with Distinctive Genetic Features', **mSphere**, 6(2), pp. 1–17. doi: 10.1128/msphere.01297-20.

Grunert T, Stessl B, Wolf F, Sordelli DO, Buzzola FR, Ehling-Schulz M. (2018) 'Distinct

phenotypic traits of *Staphylococcus aureus* are associated with persistent, contagious bovine intramammary infections', **Scientific Reports**, 8(1), pp. 1–10. doi: 10.1038/s41598-018-34371-1.

Guinane CM, Sturdevant DE, Herron-Olson L, Otto M, Smyth DS, Villaruz AE, et al. (2008) 'Pathogenomic analysis of the common bovine *Staphylococcus aureus* clone (ET3): Emergence of a virulent subtype with potential risk to public health', **Journal of Infectious Diseases**, 197(2), pp. 205–213. doi: 10.1086/524689.

Günaydın B, Aslantaş Ö, Demir C. (2011) 'Detection of superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* strains from subclinical bovine mastitis', **Tropical Animal Health and Production**, 43(8), pp. 1633–1637. doi: 10.1007/s11250-011-9882-5.

Haggar A, Hussain M, Lönnies H, Herrmann M, Norrby-Teglund A, Flock JI. (2003) 'Extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* enhances internalization into eukaryotic cells', **Infection and Immunity**, 71(5), pp. 2310–2317. doi: 10.1128/IAI.71.5.2310-2317.2003.

Haubert L, Kroning IS, Iglesias MA, da Silva WP. (2017) 'First report of the *Staphylococcus aureus* isolate from subclinical bovine mastitis in the South of Brazil harboring resistance gene *dfgG* and transposon family Tn916-1545', **Microbial Pathogenesis**, 113(June), pp. 242–247. doi: 10.1016/j.micpath.2017.10.022.

Hu DL, Maina EK, Omoe K, Inoue F, Yasujima M, Nakane A. (2011) 'Superantigenic toxin genes coexist with specific staphylococcal cassette chromosome *mec* genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ', **Tohoku Journal of Experimental Medicine**, 225(3), pp. 161–164. doi: 10.1620/tjem.225.161.

Idrees M, Sawant S, Karodia N, Rahman A. (2021) '*S. aureus* forms a complex structure of extracellular polymeric biofilm that provides a fully secured and functional environment for the formation of microcolonies, their sustenance and recolonization of sessile cells after its dispersal. The purpose of th', **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 18(14).

Igbinosa EO, Beshiru A, Akporehe LU, Ogofure AG. (2016) 'Detection of methicillin-

resistant staphylococci isolated from food producing animals: A public health implication', **Veterinary Sciences**, 3(3). doi: 10.3390/vetsci3030014.

Indrawattana N, Sungkhachat O, Sookrung N, Chongsa-Nguan M, Tungtrongchitr A, Voravuthikunchai SP, et al. (2013) 'Staphylococcus aureus clinical isolates: Antibiotic susceptibility, molecular characteristics, and ability to form biofilm', **BioMed Research International**, 2013. doi: 10.1155/2013/314654.

Jenul C, Horswill AR. (2019) 'Regulation of *Staphylococcus aureus* virulence', **Gram-Positive Pathogens**, pp. 669–686. doi: 10.1128/9781683670131.ch41.

Jian Y, Zhao L, Zhao N, Lv HY, Liu Y, He L, et al. (2021) 'Increasing prevalence of hypervirulent ST5 methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* subtype poses a serious clinical threat', **Emerging Microbes and Infections**, 10(1), pp. 109–122. doi: 10.1080/22221751.2020.1868950.

John J, George S, Nori SRC, Nelson-Sathi S, Pisani D. (2019) 'Phylogenomic Analysis Reveals the Evolutionary Route of Resistant Genes in *Staphylococcus aureus* ', **Genome Biology and Evolution**, 11(10), pp. 2917–2926. doi: 10.1093/gbe/evz213.

Johnson M, Cockayne A, Morrissey JA. (2008) 'Iron-regulated biofilm formation in *Staphylococcus aureus* newman requires ica and the secreted protein Emp', **Infection and Immunity**, 76(4), pp. 1756–1765. doi: 10.1128/IAI.01635-07.

Josse J, Laurent F, Diot A. (2017) 'Staphylococcal adhesion and host cell invasion: Fibronectin-binding and other mechanisms', **Frontiers in Microbiology**, 8(DEC), pp. 1–8. doi: 10.3389/fmicb.2017.02433.

Kadkhoda H, Ghalavand Z, Nikmanesh B, Kodori M, Hourri H, Maleki DT, et al. (2020) 'Characterization of biofilm formation and virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolates from paediatric patients in Tehran, Iran', **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, 23(5), pp. 691–698. doi: 10.22038/ijbms.2020.36299.8644.

Kaneko J, Kamio Y. (2004) 'Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: Structures, pore-forming mechanism, and organization of the

genes', **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 68(5), pp. 981–1003. doi: 10.1271/bbb.68.981.

Karbuş A, Karahan ZC, Aldemir-Kocabaş B, Tekeli A, Özdemir H, Güriz H, et al. (2017) 'Evaluation of antimicrobial susceptibilities and virulence factors of *Staphylococcus aureus* strains isolated from community-acquired and health-care associated pediatric infections', **Turkish Journal of Pediatrics**, 59(4), pp. 395–403. doi: 10.24953/turkjped.2017.04.005.

Kashif A, McClure JA, Lakhundi S, Pham M, Chen S, Conly JM, et al. (2019) '*Staphylococcus aureus* ST398 Virulence Is Associated With Factors Carried on Prophage  $\phi$ Sa3', **Frontiers in Microbiology**, 10(September). doi: 10.3389/fmicb.2019.02219.

Katoh K, Standley DM. (2013) 'MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability', **Molecular Biology and Evolution**, 30(4), pp. 772–780. doi: 10.1093/molbev/mst010.

Kerro Dego O. (2021) 'Bovine Mastitis: Part I', in **Animal Reproduction in Veterinary Medicine**. IntechOpen, p. 13. doi: 10.5772/intechopen.93483.

Ko D, Kim N, Kim E, Ha E, Ro Y, Kim D, et al. (2021) 'Research in Veterinary Science Comparative genomics of bovine mastitis-origin *Staphylococcus aureus* strains classified into prevalent human genotypes', **Research in Veterinary Science**, 139(June), pp. 67–77. doi: 10.1016/j.rvsc.2021.07.008.

Kou X, Cai H, Huang S, Ni Y, Luo B, Qian H, et al. (2021) 'Prevalence and Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolated From Retail Raw Milk in Northern Xinjiang, China', **Frontiers in Microbiology**, 12(August), pp. 1–13. doi: 10.3389/fmicb.2021.705947.

Kurlenda J, Grinholc M, Węgrzyn G. (2008) 'Presence of *cna*, *emp* and *pls* genes and pathogenicity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains', **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 24(4), pp. 591–594. doi: 10.1007/s11274-007-9511-7.

Lacey KA, Mulcahy ME, Towell AM, Geoghegan JA, McLoughlin RM. (2019) 'Clumping factor B is an important virulence factor during *Staphylococcus aureus* skin infection and a promising vaccine target', **PLoS Pathogens**, 15(4), pp. 1–20. doi: 10.1371/journal.ppat.1007713.

Lalaouna D, Desgranges E, Caldelari I, Marzi S. (2018) *MS2-Affinity Purification Coupled With RNA Sequencing Approach in the Human Pathogen Staphylococcus aureus*. 1st edn, **Methods in Enzymology**. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/bs.mie.2018.08.022.

Larsen HD, Huda A, Eriksen NHR, Jensen NE. (2000) 'Differences between Danish bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates in possession of superantigens', **Veterinary Microbiology**, 76(2), pp. 153–162. doi: 10.1016/S0378-1135(00)00232-7.

Larsen M V, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Lykke R, et al. (2012) 'Multilocus Sequence Typing of Total-Genome-Sequenced Bacteria'. doi: 10.1128/JCM.06094-11.

Leijon M, Atkins E, Persson Waller K, Artursson K. (2021) 'Longitudinal study of *Staphylococcus aureus* genotypes isolated from bovine clinical mastitis', **Journal of Dairy Science**, 104(11), pp. 11945–11954. doi: 10.3168/jds.2021-20562.

Letunic I, Bork P. (2016) 'Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees', **Nucleic acids research**, 44(W1), pp. W242–W245. doi: 10.1093/nar/gkw290.

Liu B, Li Q, Gong Z, Zhao J, Gu B, Feng S. (2021) '*Staphylococcus aureus* lipoproteins play crucial roles in inducing inflammatory responses and bacterial internalization into bovine mammary epithelial cells', **Microbial Pathogenesis**, 162(December 2021), p. 105364. doi: 10.1016/j.micpath.2021.105364.

Lozano C, Rezusta A, Gómez P, Gómez-sanz E, Báez N, Martín-saco G, et al. (2012) 'High prevalence of spa types associated with the clonal lineage CC398 among tetracycline-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in a Spanish hospital', **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 67(2), pp. 330–334. doi:



10.1093/jac/dkr497.

Luong TT, Lei MG, Lee CY. (2009) '*Staphylococcus aureus* Rbf activates biofilm formation in vitro and promotes virulence in a murine foreign body infection model', **Infection and Immunity**, 77(1), pp. 335–340. doi: 10.1128/IAI.00872-08.

Lv G, Jiang R, Zhang H, Wang L, Li L, Gao W, et al. (2021) 'Molecular Characteristics of *Staphylococcus aureus* From Food Samples and Food Poisoning Outbreaks in Shijiazhuang, China', **Frontiers in Microbiology**, 12(June), pp. 1–7. doi: 10.3389/fmicb.2021.652276.

Matsuoka M, Inoue M, Endo Y, Nakajima Y. (2003) 'Characteristic expression of three genes, msr(A), mph(C) and erm(Y), that confer resistance to macrolide antibiotics on *Staphylococcus aureus* ', **FEMS Microbiology Letters**, 220(2), pp. 287–293. doi: 10.1016/S0378-1097(03)00134-4.

Mbindyo CM, Gitao GC, Plummer PJ, Kulohoma BW, Mulei CM, Bett R. (2021) 'Antimicrobial resistance profiles and genes of staphylococci isolated from mastitic cow's milk in Kenya', **Antibiotics**, 10(7), pp. 1–14. doi: 10.3390/antibiotics10070772.

McAleese FM, Walsh EJ, Sieprawska M, Potempa J, Foster TJ. (2001) 'Loss of Clumping Factor B Fibrinogen Binding Activity by *Staphylococcus aureus* Involves Cessation of Transcription, Shedding and Cleavage by Metalloprotease', **Journal of Biological Chemistry**, 276(32), pp. 29969–29978. doi: 10.1074/jbc.M102389200.

McCallum N, Bischoff M, Maki H, Wada A, Berger-Bächi B. (2004) 'TcaR, a Putative MarR-Like Regulator of sarS Expression', **Journal of Bacteriology**, 186(10), pp. 2966–2972. doi: 10.1128/JB.186.10.2966-2972.2004.

McCarthy AJ, Lindsay JA. Genetic variation in *staphylococcus aureus* surface and immune evasion genes is lineage associated: Implications for vaccine design and host-pathogen interactions. **BMC Microbiology**. 2010;10.

McMillan K, Moore SC, McAuley CM, Fegan N, Fox EM. (2016) 'Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from raw milk sources in Victoria, Australia', **BMC**

*Microbiology*, 16(1), pp. 1–12. doi: 10.1186/s12866-016-0789-1.

Mehndiratta PL, Bhalla P. (2014) 'Use of antibiotics in animal agriculture & emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones: Need to assess the impact on public health', **Indian Journal of Medical Research**, 140(September), pp. 339–344.

Miller LS, Fowler VG, Shukla SK, Rose WE, Proctor RA. (2019) Development of a vaccine against *Staphylococcus aureus* invasive infections: Evidence based on human immunity, genetics and bacterial evasion mechanisms, **FEMS Microbiology Reviews**. doi: 10.1093/femsre/fuz030.

Minh BQ, Schmidt HA, Chernomor O, Schrempf D, Woodhams MD, Von Haeseler A, et al. (2020) 'IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era', **Molecular Biology and Evolution**, 37(5), pp. 1530–1534. doi: 10.1093/molbev/msaa015.

Miranda C, Silva V, Igrejas G, Poeta P. (2021) 'Impact of European pet antibiotic use on enterococci and staphylococci antimicrobial resistance and human health', **Future Microbiology**, 16(3), pp. 183–201. doi: 10.2217/fmb-2020-0119.

MULLER, E. E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. **Simpósio sobre sustentabilidade da pecuária de leite na região sul do Brasil**, Toledo-PR, p. 206-217, 2002. Disponível em: <<http://people.ufpr.br/~freitasjaf/artigos/qualidadeleitem.pdf>>

Morinaga N, Kaihou Y, Noda M. (2003) 'Purification, cloning and characterization of variant LukE-LukD with strong leukocidal activity of Staphylococcal Bi-component leukotoxin family', **Microbiology and Immunology**, 47(1), pp. 81–90. doi: 10.1111/j.1348-0421.2003.tb02789.x.

Murata T, Endo Y, Furukawa S, Ono A, Kiko Y, Soeda S, et al. (2021) 'Successful laparoscopic resection of ovarian abscess caused by *Staphylococcus aureus* in a 13-year-old girl: a case report and review of literature', **BMC Women's Health**, 21(1), pp. 1–6. doi: 10.1186/s12905-021-01335-z.

Ndahetuye JB, Leijon M, Båge R, Artursson K, Persson Y. (2021) 'Genetic Characterization of *Staphylococcus aureus* From Subclinical Mastitis Cases in Dairy Cows in Rwanda', **Frontiers in Veterinary Science**, 8(November), pp. 1–8. doi: 10.3389/fvets.2021.751229.

Nurjadi D, Schäfer J, Friedrich-Jänicke B, Mueller A, Neumayr A, Calvo-Cano A, et al. (2015) 'Predominance of *dfgG* as determinant of trimethoprim resistance in imported *Staphylococcus aureus* ', *Clinical Microbiology and Infection*, 21(12), pp. 1095.e5-1095.e9. doi: 10.1016/j.cmi.2015.08.021.

Oogai Y, Matsuo M, Hashimoto M, Kato F, Sugai M, Komatsuzawa H. (2011) 'Expression of virulence factors by *Staphylococcus aureus* grown in Serum', **Applied and Environmental Microbiology**, 77(22), pp. 8097–8105. doi: 10.1128/AEM.05316-11.

Otalu OJ, Kwaga JKP, Okolocha EC, Islam MZ, Moodley A. High Genetic Similarity of MRSA ST88 Isolated From Pigs and Humans in Kogi State, Nigeria. **Frontiers in Microbiology**. 2018;9(December):1–8.

Otto M. (2014) '*Staphylococcus aureus* toxins', **Current Opinion in Microbiology**, 17(1), pp. 32–37. doi: 10.1016/j.mib.2013.11.004.

Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MTG, et al. (2015) 'Roary: Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis', **Bioinformatics**, 31(22), pp. 3691–3693. doi: 10.1093/bioinformatics/btv421.

Palma M, Nozohoor S, Schennings T, Heimdahl A, Flock JI. (1996) 'Lack of the extracellular 19-kilodalton fibrinogen-binding protein from *Staphylococcus aureus* decreases virulence in experimental wound infection', **Infection and Immunity**, 64(12), pp. 5284–5289. doi: 10.1128/iai.64.12.5284-5289.1996.

Pang R, Wu S, Zhang F, Huang J, Wu H, Zhang J, et al. (2020) 'The Genomic Context for the Evolution and Transmission of Community-Associated *Staphylococcus aureus* ST59 Through the Food Chain', *Frontiers in Microbiology*, 11(March), pp. 1–12. doi: 10.3389/fmicb.2020.00422.

Patel K, Godden SM, Royster EE, Crooker BA, Johnson TJ, Smith EA. (2021) 'Prevalence , antibiotic resistance , virulence and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from bulk tank milk samples of U . S . dairy herds', pp. 1–13.

Paterson GK, Harrison EM, Holmes MA. (2014) 'The emergence of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ', **Trends in Microbiology**, 22(1), pp. 42–47. doi: 10.1016/j.tim.2013.11.003.

Pereyra EAL, Picech F, Renna MS, Baravalle C, Andreotti CS, Russi R, et al. (2016) 'Detection of *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm-producing genes and their expression during internalization in bovine mammary epithelial cells', **Veterinary Microbiology**, 183, pp. 69–77. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.12.002.

Peton V, Bouchard DS, Almeida S, Rault L, Falentin H, Jardin J, et al. (2014) 'Fine-tuned characterization of *Staphylococcus aureus* Newbould 305, a strain associated with mild and chronic mastitis in bovines', **Veterinary Research**, 45(1), pp. 1–15. doi: 10.1186/s13567-014-0106-7.

Petrie LE, Leonard AC, Murphy J, Cox G. (2020) 'Development and validation of a high-throughput whole cell assay to investigate *Staphylococcus aureus* adhesion to host ligands', **Journal of Biological Chemistry**, 295(49), pp. 16700–16712. doi: 10.1074/jbc.RA120.015360.

Pickering AC, Yebra G, Gong X, Goncheva MI, Wee BA, MacFadyen AC, et al. (2021) 'Evolutionary and Functional Analysis of Coagulase Positivity among the Staphylococci', **mSphere**, 6(4). doi: 10.1128/msphere.00381-21.

Pizauro LJJ, de Almeida CC, Silva SR, MacInnes JI, Kropinski AM, Zafalon LF, et al. (2021) 'Genomic comparisons and phylogenetic analysis of mastitis-related staphylococci with a focus on adhesion, biofilm, and related regulatory genes', **Scientific Reports**, 11(1), pp. 1–10. doi: 10.1038/s41598-021-96842-2.

Porrero MC, Mentaberre G, Sánchez S, Fernández-Llario P, Casas-Díaz E, Mateos A, et al. (2014) 'Carriage of *Staphylococcus aureus* by free-living wild animals in Spain', **Applied and Environmental Microbiology**, 80(16), pp. 4865–4870. doi:

10.1128/AEM.00647-14.

Posner MG, Upadhyay A, Abubaker AA, Fortunato TM, Vara D, Canobbio I, et al. (2016) 'Extracellular fibrinogen-binding protein (Efb) from *Staphylococcus aureus* inhibits the formation of platelet-leukocyte complexes', **Journal of Biological Chemistry**, 291(6), pp. 2764–2776. doi: 10.1074/jbc.M115.678359.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9ª edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1337 p. 2010

Rasmussen G, Monecke S, Ehricht R, Söderquist B. (2013) 'Prevalence of Clonal Complexes and Virulence Genes among Commensal and Invasive *Staphylococcus aureus* Isolates in Sweden', **PLoS ONE**, 8(10), pp. 1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0077477.

Ren Q, Liao G, Wu Z, Lv J, Chen W. (2020) 'Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from subclinical bovine mastitis in southern Xinjiang, China', **Journal of Dairy Science**, 103(4), pp. 3368–3380. doi: 10.3168/jds.2019-17420.

Reynolds E, Ross JI, Cove JH (2003) 'Msr(A) and related macrolide/streptogramin resistance determinants: Incomplete transporters?', **International Journal of Antimicrobial Agents**, 22(3), pp. 228–236. doi: 10.1016/S0924-8579(03)00218-8.

Roberts MC, Soge OO, No D. (2013) 'Comparison of multi-drug resistant environmental methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from recreational beaches and high touch surfaces in built environments', **Frontiers in Microbiology**, 4(APR), pp. 1–8. doi: 10.3389/fmicb.2013.00074.

Rocha LS, Silva DM, Silva MP, Vidigal PMP, Silva JCF, Guerra ST, et al. (2019) 'Comparative genomics of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical and clinical bovine mastitis', **PLoS ONE**, 14(8), pp. 1–19. doi: 10.1371/journal.pone.0220804.

Roche FM, Downer R, Keane F, Speziale P, Woo P, Foster TJ. (2004) 'The N-terminal

A Domain of Fibronectin-binding Proteins A and B Promotes Adhesion of *Staphylococcus aureus* to Elastin \*, **Journal of Biological Chemistry**, 279(37), pp. 38433–38440. doi: 10.1074/jbc.M402122200.

Roche FM, Meehan M, Foster TJ. (2003) 'The *Staphylococcus aureus* surface protein SasG and its homologues promote bacterial adherence to human desquamated nasal epithelial cells', **Microbiology**, 149(10), pp. 2759–2767. doi: 10.1099/mic.0.26412-0.

Ronco T, Stegger M, Pedersen K. (2017) 'Draft genome sequence of a sequence type 398 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a Danish dairy cow with mastitis', **Genome Announcements**, 5(23), pp. 12–13. doi: 10.1128/genomeA.00492-17.

Rudenko P, Sachivkina N, Vatnikov Y, Shabunin S, Engashev S, Kontsevaya S, et al. (2021) 'Role of microorganisms isolated from cows with mastitis in Moscow region in biofilm formation', **Veterinary World**, 14(1), pp. 40–48. doi: 10.14202/VETWORLD.2021.40-48.

Sabat A, Kosowska K, Poulsen K, Kasprowicz A, Sekowska A, Van Den Burg B, et al. (2000) 'Two allelic forms of the aureolysin gene (aur) within *Staphylococcus aureus*', **Infection and Immunity**, 68(2), pp. 973–976. doi: 10.1128/IAI.68.2.973-976.2000.

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(17), pp. 5908–5915. doi: 10.1128/AEM.00238-11.

Sánchez CA, Venkatachalam-Vaz J, Drake JM. (2021) 'Spillover of zoonotic pathogens: A review of reviews', **Zoonoses and Public Health**, (November 2020), pp. 1–15. doi: 10.1111/zph.12846.

Santiago LB, Pinheiro RR, Alves FSF, Chapaval L. (2009) 'Documentos 87', **Embrapa Caprinos e Ovinos**.

Savolainen K, Paulin L, Westerlund-Wikström B, Foster TJ, Korhonen TK, Kuusela P. (2001) 'Expression of pls, a gene closely associated with the mecA gene of methicillin-

resistant *Staphylococcus aureus* , prevents bacterial adhesion in vitro', **Infection and Immunity**, 69(5), pp. 3013–3020. doi: 10.1128/IAI.69.5.3013-3020.2001.

Schroeder K, Jularic M, Horsburgh SM, Hirschhausen N, Neumann C, Bertling A, et al. (2009) 'Molecular characterization of a novel *Staphylococcus aureus* surface protein (SasC) involved in cell aggregation and biofilm accumulation', **PLoS ONE**, 4(10). doi: 10.1371/journal.pone.0007567.

Schukken YH, Günther J, Fitzpatrick J, Fontaine MC, Goetze L, Holst O, et al. (2011) 'Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows', **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 144(3–4), pp. 270–289. doi: 10.1016/j.vetimm.2011.08.022.

Schwan, WR. (2019) '*Staphylococcus aureus* toxins: Armaments for a significant pathogen', **Toxins**, 11(8), pp. 13–15. doi: 10.3390/toxins11080457.

Seemann T. (2014) 'Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation', **Bioinformatics**, 30(14), pp. 2068–2069. doi: 10.1093/bioinformatics/btu153.

Sergelidis D, Angelidis AS. (2017) 'Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* : a controversial food-borne pathogen', **Letters in Applied Microbiology**, 64(6), pp. 409–418. doi: 10.1111/lam.12735.

Silva DM, da Silva MP, Vidigal PMP, Barcelos RM, Klein RC, Aguiar AP, et al. (2016) 'Draft genome sequences of *Staphylococcus aureus* strains isolated from subclinical bovine mastitis in Brazil', **Genome Announcements**, 4(1), pp. 15–16. doi: 10.1128/genomeA.01594-15.

Simões TVMD, de Oliveira AA. (2012) 'Considerações e Impactos Econômicos', **Embrapa**, 170, pp. 1–27. Available at: [http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes\\_2012/doc\\_170.pdf](http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2012/doc_170.pdf).

Sitkiewicz I, Babiak I, Hryniewicz W. (2011) 'Characterization of transcription within sdr region of *Staphylococcus aureus* ', **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, 99(2), pp. 409–416. doi:

10.1007/s10482-010-9476-7.

Smeltzer MS, Gillaspay AF. Molecular pathogenesis of *staphylococcal osteomyelitis*. **Poultry Science**. 2000;79(7):1042–9.

Smith, E. M. *et al.* (2005) 'Multilocus sequence typing of intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* isolates', *Journal of Clinical Microbiology*, 43(9), pp. 4737–4743. doi: 10.1128/JCM.43.9.4737-4743.2005.

Snel GG, Monecke S, Ehricht R, Piccinini R (2015) 'Molecular characteristics of bap-positive *Staphylococcus aureus* strains from dairy cow mastitis', **Journal of Dairy Research**, 82(3), pp. 312–316. doi: 10.1017/S0022029915000199.

Staal L, Colin DA. (2021) 'Bi-component HlgC/HlgB and HlgA/HlgB  $\gamma$ -hemolysins from *S. aureus*: Modulation of Ca<sup>2+</sup> channels activity through a differential mechanism', **Toxicon**, 201(May), pp. 74–85. doi: 10.1016/j.toxicon.2021.08.007.

Stam-Bolink EM, Mithoe D, Baas WH, Arends JP, Möller AVM. (2007) 'Spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST80 strain in the community of the northern Netherlands', **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, 26(10), pp. 723–727. doi: 10.1007/s10096-007-0352-y.

Stevens DL, Bisno AL, Chambers HF, Everett ED, Dellinger P, Goldstein EJC, *et al.* (2005) 'Practice guidelines for the diagnosis and management of skin and soft-tissue infections', **Clinical Infectious Diseases**, 41(10), pp. 1373–1406. doi: 10.1086/497143.

Sugai M, Komatsuzawa H, Akiyama T, Hong YM, Oshida T, Miyake Y, *et al.* (1995) 'Identification of endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase and N-acetylmuramyl-L-alanine amidase as cluster-dispersing enzymes in *Staphylococcus aureus*', **Journal of Bacteriology**, 177(6), pp. 1491–1496. doi: 10.1128/jb.177.6.1491-1496.1995.

Sweileh WM. (2021) 'Global research publications on irrational use of antimicrobials: call for more research to contain antimicrobial resistance', **Globalization and Health**, 17(1), pp. 1–12. doi: 10.1186/s12992-021-00754-9.



Taylor LH, Latham SM, Woolhouse MEJ. (2001) 'Risk factors for human disease emergence', **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, 356(1411), pp. 983–989. doi: 10.1098/rstb.2001.0888.

Thomer L, Schneewind O, Missiakas D. (2013) 'Multiple ligands of von willebrand factor-binding protein (vWbp) promote *Staphylococcus aureus* clot formation in human plasma', **Journal of Biological Chemistry**, 288(39), pp. 28283–28292. doi: 10.1074/jbc.M113.493122.

Todd ECD. (2014) 'Bacteria: *Staphylococcus aureus*', in Encyclopedia of Food Safety. **Elsevier**, pp. 530–534. doi: 10.1016/B978-0-12-378612-8.00115-3.

TOLLERSRUD T, KENNY K, CAUGANT DA, LUND A. (2000) 'Characterisation of isolates of *Staphylococcus aureus* from acute, chronic and subclinical mastitis in cows in NorwayNote', **APMIS**, 108(9), pp. 565–572. doi: 10.1034/j.1600-0463.2000.d01-98.x.

Valle J, Echeverez M, Lasa I. (2019) ' $\sigma$  B Inhibits Poly- N -Acetylglucosamine Exopolysaccharide Synthesis and Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus*', **Journal of Bacteriology**. Edited by Y. V. Brun, 201(11). doi: 10.1128/JB.00098-19.

Van Hal SJ, Jensen SO, Vaska VL, Espedido BA, Paterson DL, Gosbell IB. (2012) 'Predictors of mortality in *Staphylococcus aureus* bacteremia', **Clinical Microbiology Reviews**, 25(2), pp. 362–386. doi: 10.1128/CMR.05022-11.

Vandenesch F, Lina G, Henry T. (2012) '*Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors?', **Frontiers in cellular and infection microbiology**, 2(February), p. 12. doi: 10.3389/fcimb.2012.00012.

Vautor E, Cockfield J, Marechal C Le, Loir Y Le, Chevalier M, Ashley Robinson D, et al. (2009) 'Difference in virulence between *Staphylococcus aureus* isolates causing gangrenous mastitis versus subclinical mastitis in a dairy sheep flock', **Veterinary Research**, 40(6). doi: 10.1051/vetres/2009039.

Vergara-Irigaray M, Valle J, Merino N, Latasa C, García B, De Los Mozos IR, et al. (2009) 'Relevant role of fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus* biofilm-associated foreign-body infections', **Infection and Immunity**, 77(9), pp. 3978–3991. doi: 10.1128/IAI.00616-09.

Viljoen A, Viela F, Mathelié-Guinlet M, Missiakas D, Pietrocola G, Speziale P, et al. (2021) '*Staphylococcus aureus* vWF-binding protein triggers a strong interaction between clumping factor A and host vWF', **Communications Biology**, 4(1), pp. 1–10. doi: 10.1038/s42003-021-01986-6.

Wang Z, Zhou H, Wang H, Chen H, Leung KK, Tsui S, et al. (2014) 'Comparative genomics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST239: Distinct geographical variants in Beijing and Hong Kong', **BMC Genomics**, 15(1), pp. 1–10. doi: 10.1186/1471-2164-15-529.

Watkins KE, Unnikrishnan M. (2020) *Evasion of host defenses by intracellular Staphylococcus aureus*. 1st edn, **Advances in Applied Microbiology**. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/bs.aambs.2020.05.001.

WHO. Mastitis - Causes and Management. **World Health Organization**, p. 1–44, 2000.

Wilson A, Norden N. (2015) *The R Project for Statistical Computing*, URL: <http://www.r-project.org/254>.

Wu K, Conly J, McClure JA, Kurwa HA, Zhang K. (2020) 'Arginine catabolic mobile element in evolution and pathogenicity of the community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300', **Microorganisms**, 8(2). doi: 10.3390/microorganisms8020275.

Ying YT, Ren WJ, Tan X, Yang J, Liu R, Du AF. (2021) 'Annexin a2-mediated internalization of *Staphylococcus aureus* into bovine mammary epithelial cells requires its interaction with clumping factor b', **Microorganisms**, 9(10). doi: 10.3390/microorganisms9102090.

Ythier M, Resch G, Waridel P, Panchaud A, Gfeller A, Majcherczyk P, et al. (2012)

'Proteomic and transcriptomic profiling of *Staphylococcus aureus* surface LPXTG-proteins: Correlation with agr genotypes and adherence phenotypes', **Molecular and Cellular Proteomics**, 11(11), pp. 1123–1139. doi: 10.1074/mcp.M111.014191.

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), pp. 357–372. doi: 10.1007/s10911-011-9236-y.

Zankari E, Allesøe R, Joensen KG, Cavaco LM, Lund O, Aarestrup FM. (2017) 'PointFinder: A novel web tool for WGS-based detection of antimicrobial resistance associated with chromosomal point mutations in bacterial pathogens', **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 72(10), pp. 2764–2768. doi: 10.1093/jac/dkx217.

Zhang Y, Wu M, Hang T, Wang C, Yang Y, Pan W, et al. (2017) '*Staphylococcus aureus* SdrE captures complement factor H's C-terminus via a novel "close, dock, lock and latch" mechanism for complement evasion', **Biochemical Journal**, 474(10), pp. 1619–1631. doi: 10.1042/BCJ20170085.

Zong X, Liu D, Li M, Sun B. (2020) 'Complete Genome Sequence of Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain RJ1267, Isolated in Shanghai, China', **Microbiology Resource Announcements**. Edited by S. R. Gill, 9(18), pp. 4–5. doi: 10.1128/MRA.00244-20.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A – Material Suplementar 1: Anotação genômica da análise de MLST e do Spa-Typing, e dos genes de adesão, formação de biofilme, resistência a antimicrobianos e toxinas

1A - Mastite clínica																															
Organism	Strain	BioSample	Host	Disease stage	MLST*		spa**	Adhesins***																							
					Sequence Type	Nearest ST		<i>clfA</i>	<i>clfB</i>	<i>cna</i>	<i>fnbA</i>	<i>fnbB</i>	<i>ebpS</i>	<i>spa</i>	<i>sdrC</i>	<i>sdrD</i>	<i>sdrE</i>	<i>coa</i>	<i>eap</i>	<i>emp</i>	<i>efb</i>	<i>rWbp</i>	<i>atl*</i>	<i>aap*</i>	<i>pls*</i>	<i>sasG</i>	<i>sasH</i>	<i>sasA</i>	<i>sasC</i>	<i>sasD</i>	<i>sasF</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	RF122	SAMEA3138186	Bos taurus	Clinical mastitis	151	529	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	
<i>Staphylococcus aureus</i>	NCTC7485	SAMEA3500267	Bos taurus	Clinical mastitis	351	529	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Newbould 305	SAMN02471776	Bos taurus	Clinical mastitis	115	267	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	
<i>Staphylococcus aureus</i>	9	SAMN03376161	Bos taurus	Clinical mastitis	20	1987	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
<i>Staphylococcus aureus</i>	75	SAMN03376162	Bos taurus	Clinical mastitis	151	529	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	
<i>Staphylococcus aureus</i>	BMSA 1	SAMN03835273	Bos taurus	Clinical mastitis	Unknown	Unknown	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Staphylococcus aureus</i>	682	SAMN04435211	Bos taurus	Clinical mastitis	71	524	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	
<i>Staphylococcus aureus</i>	685	SAMN04435212	Bos taurus	Clinical mastitis	479	1543	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	
<i>Staphylococcus aureus</i>	663	SAMN04435213	Bos taurus	Clinical mastitis	8	2953	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	
<i>Staphylococcus aureus</i>	674	SAMN04435214	Bos taurus	Clinical mastitis	97	359	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
<i>Staphylococcus aureus</i>	AL-699	SAMN05773537	Bos taurus	Clinical mastitis	97	2734	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	
<i>Staphylococcus aureus</i>	AL-492	SAMN05773538	Bos taurus	Clinical mastitis	97	Unknown	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	
<i>Staphylococcus aureus</i>	AL-704	SAMN05773540	Bos taurus	Clinical mastitis	97	2734	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	
<i>Staphylococcus aureus</i>	MT-0363	SAMN05773543	Bos taurus	Clinical mastitis	97	2734	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	
<i>Staphylococcus aureus</i>	1608	SAMN05892870	Bos taurus	Clinical mastitis	352	267	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Sa52	SAMN06650965	Bos taurus	Clinical mastitis	398	Unknown	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	
<i>Staphylococcus aureus</i>	4185	SAMN07556253	Bos taurus	Clinical mastitis	126	605	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	
<i>Staphylococcus aureus</i>	15	SAMN09081213	Bos taurus	Clinical mastitis	479	543	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	
<i>Staphylococcus aureus</i>	28	SAMN09081215	Bos taurus	Clinical mastitis	479	543	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	31	SAMN09081217	Bos taurus	Clinical mastitis	504	529	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	
<i>Staphylococcus aureus</i>	58	SAMN09081218	Bos taurus	Clinical mastitis	479	543	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	139	SAMN09081219	Bos taurus	Clinical mastitis	133	1403	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	483	SAMN09081221	Bos taurus	Clinical mastitis	151	529	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	909	SAMN09081223	Bos taurus	Clinical mastitis	151	529	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	MOK042	SAMN09253995	Bos taurus	Clinical mastitis	71	524	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	3059	SAMN11415706	Bos taurus	Clinical mastitis	126	605	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ani_OS001	SAMN12735218	Bos taurus	Clinical mastitis	1	127	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1



































**APÊNDICE B – Material Suplementar 2: Identificação e caracterização dos genes anotados, quanto ao produto a ser sintetizado, mecanismo de ação e função**

<b>1B - Genes de Adesinas</b>					
Gene	Identity/Protein group	Accession no.	Ligand and binding mechanism	Function	References
<i>clfA</i>	Clump factor A	AB245457.1	Fibrinogen. Fibrinogen $\gamma$ -chain carboxyl terminus (dock, lock and latch, DLL), and and binding site on $\gamma$ -globular domain of the D region	Adhesion to soluble or immobilized fibrinogen, immune evasion by binding soluble fibrinogen, platelet aggregation mediator	Chen et al. 2005; Ganesh et al., 2008; Foster et al., 2014
<i>clfB</i>	Clump factor B	AJ224764.1	Fibrinogen $\alpha$ -chain repeat 5, keratin 10 and loricrin (dock, lock and latch, DLL)	Adhesion to desquamated epithelial cells, and to fibrinogen	Foster et al., 2014
<i>cna</i>	Collagen adhesion	M81736.1	Collagen. IgG-folded subdomains N1 and N2; ability to bind to multiple ligands	Mediates bacterial adherence to collagen substrate	Zong et al., 2005; Chen et al. 2005; Valotteau et al., 2017
<i>fnbA</i>	Fibronectin-binding protein A	DQ498894.1	fibrinogen, elastin and fibronectin; distinct domains como N-terminais (N1, N2 e N3), and C-terminal LPETG motif	Multifunctional protein which promotes bacterial attachment to fibrinogen, elastin and fibronectin; Promotes also the accumulation phase and the primary attachment phase of biofilm formation.	Mccourt et al., 2014;Pietrocola et al., 2016; Burke et al., 2011; Roche et al., 2004;

<b><i>fnbB</i></b>	Fibronectin-binding protein B	X62992.1	fibrinogen, elastin and fibronectin; distinct domains como N-terminais (N1, N2 e N3), and C-terminal LPETG motif	Multifunctional protein which promotes bacterial attachment to fibrinogen, elastin and fibronectin; Promotes also the accumulation phase and the primary attachment phase of biofilm formation and protects against the antimicrobial activity of histones.	Pietrocola et al., 2018; Pietrocola et al., 2016; Mccourt et al., 2014; Burke et al., 2011; Roche et al., 2004;
<b><i>ebpS</i></b>	Ser-Asp rich fibrinogen-binding protein C	AJ005645.1	$\beta$ -neurexina 1, N-terminal da proteína de mamífero e domínio N2N3 do MSCRAMM	Intercellular adhesion, aids in adhesion to hydrophobic surfaces and biofilm formation. Binds to bone sialoprotein and fibrinogen.	BARBU et al. 2010; Feuillie et al. 2017,
<b><i>spa</i></b>	Ser-Asp rich fibrinogen-binding protein D	AJ005646.1		Binds to bone sialoprotein and fibrinogen.	Chen et al. 2005
<b><i>sdrC</i></b>	Ser-Asp rich fibrinogen-binding protein E	MN166599.1		Binds to bone sialoprotein and fibrinogen. Adhesion to extracellular matrix.	Foster et al., 2014; Chen et al. 2005
<b><i>sdrD</i></b>	Elastin binding protein	AF400161.1	Elastin, N-terminal 30-kDa region of elastin	promotes bacterial colonization	Downer et al., 2002

<i>sdrE</i>	Staphylococcal protein A	JQ066313.1	Bind to the Fc domain of IgG and inhibit opsonophagocytosis.	Propitiates <i>S. aureus</i> binding to von Willebrand factor, immune evasion and disrupting opsonization and phagocytosis	Chen et al. 2005
<i>coa</i>	Staphylocoagulase/Canonical coagulase (exoenzyme)	AB436982.1	Prothrombin, N-terminal peptide into the activation pocket of prethrombin 2, changing it allosterically to the active form	Plasma coagulation by converting fibrinogen into fibrin. Consequently, the <i>S. aureus</i> -platelet interaction is facilitated by fibrinogen, fibronectin, thrombospondin and MSCRAMMs.	Watanabe et. al 2005; Maddur et al., 2020
<i>eap</i>	Extracellular adherence protein Eap/Map	LC388386.1		High affinity for extracellular-matrix proteins: fibronectin, fibrinogen, vitronectin, bone sialoprotein and thrombospondin, promoting bacterial attachment.	Chen et al. 2005
<i>emp</i>	Extracellular matrix protein-binding protein	WP_000728056.1	The binding domain is located in the C-terminal part of the protein.		Geraci et al., 2017

<i>efb</i>	Fibrinogen binding protein	AJ306909.1	N-terminal region of Efb promotes platelet binding of fibrinogen, and binds to platelets proceeds via P-selectin e multimerina-1	inhibits platelet activation and impairs to wound healing	Posner et al., 2016
<i>vWbp</i>	Secreted von Willebrand factor-binding protein	AY032850.1	Binds specifically to the N-terminal segment of the Fg $\beta$ -chain	Promotes plasma coagulation, and activates a direct, ultra-strong interaction between ClfA and vWF	Tomer et al., 2016. Pickering et al.; 2021; Viljoen et al., 2021
<i>atl</i>	Bifunctional autolysin	AF537210.1			
<i>aap</i>	Accumulation associated protein	KJ920749.1			
<i>pls</i>	Surface protein	AF115379.2			
<i>sasG</i>	Surface protein G	LC388387.1		Adhesion to desquamated epithelial cells, Biofilm formation	Geoghegan et al., 2010
<i>sasH</i>	Surface protein H	NZ_KK001067.1:31130-33448			
<i>sasA</i>	Surface protein A	CP012119.2:c1970077-1963262			
<i>sasC</i>	Surface protein C	FM202067.1		Promotes primary attachment and accumulation phases of biofilm formation	
<i>sasD</i>	Surface protein D	NC_002953.3:125189-125914			
<i>sasF</i>	Surface protein F	NZ_JAHKBS010000001.1:c499523-497616			

<i>sasK</i>	Surface protein K	CP038460.1:c2631095-2630460		
-------------	-------------------	-----------------------------	--	--

### 2B - Genes de Biofilme

Gene	Identity/Protein group	Accession no.	Ligand and binding mechanism	Function	References
<i>icaA</i>	Biofilm operon protein A	JF930147.1	synthesize a polysaccharide, poly-n-succinyl- $\beta$ -1,6 glucosamine (PNSG) during infection.	elaboration of biofilm, cell-cell adhesion and ECM components.	
<i>icaB</i>	Biofilm operon protein B	JF930147.1	synthesize a polysaccharide, poly-n-succinyl- $\beta$ -1,6 glucosamine (PNSG) during infection.	elaboration of biofilm, cell-cell adhesion and ECM components.	
<i>icaC</i>	Biofilm operon protein C	JF930147.1	synthesize a polysaccharide, poly-n-succinyl- $\beta$ -1,6 glucosamine (PNSG) during infection.	elaboration of biofilm, cell-cell adhesion and ECM components.	
<i>icaD</i>	Biofilm operon protein D	JF930147.1	synthesize a polysaccharide, poly-n-succinyl- $\beta$ -1,6 glucosamine (PNSG) during infection.	elaboration of biofilm, cell-cell adhesion and ECM components.	
<i>icaR</i>	Biofilm negative transcriptional regulator	JF930147.1			
<i>rbf</i>	regulation of biofilm formation	AP021848.1:c746180-744075			



<b><i>tcaR</i></b>	Transcriptional regulator involved in teicoplanin susceptibility	AM237209.1			
<b><i>sarA</i></b>	Transcriptional regulator involved in biofilm formation process	U46541.1			
<b><i>sigB</i></b>	RNA polymerase sigma factor B	Y07645.1			

3B - Genes de Resistência						
Gene	Alternative name	Identity/Protein group	Accession no.	Resistance mechanisms	Function/Resistance Profile	References
<b>Resistance to Aminoglycosides</b>						
<i>aadD</i>	ant(4')-Ia	Adenylyltransferase	<a href="#">M19465</a>	Plasmid pUB110. The plasmid is integrated within the SCCmecII cassette that occurs in some MRSA strains.	Produce cytoplasmic aminoglycoside-modifying enzymes that modify the drug, preventing binding to the ribosome and causing neomycin resistance	Foster, 2017
<i>aac(6')-aph(2'')</i>	<i>aac(6')-bifunctional</i> , <i>aac(6')-Ie</i> , <i>aacA-aphD</i> , <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	Aminoglycoside acetyltransferase(6')-Ie/aminoglycoside phosphotransferase(2'')-Ia	<a href="#">M13771</a>	N-terminal AAC(6') domain and a C-terminal APH(2'') domain, it inactivates aminoglycoside antibiotics through phosphorylation and/or acetylation	Inactivate a wide range of aminoglycosides such as gentamicin, tobramycin, kanamycin, netilmicin and amikacin	Azucena et al., 1997; Rouch et al., 1987; Daigle et al., 1999; Frase et al., 2012;
<i>aadE</i>	ant(6)-Ia, ant6	6' adenylyltransferase [AAD(6')]	<a href="#">AF330699</a>	It mediates inactivation of aminoglycosides by catalyzing the transfer of an AMP group from the donor substrate ATP to and hydroxyl group in the aminoglycoside molecule	Confer resistance to streptomycin	Werner et al., 2001; Ramirez and Tolmasky, 2010
<i>ant(9)-Ia</i>	<i>aad(9)</i> , <i>spc</i>	ANT (9)-Ia - Spectinomycin adenylyltransferase	<a href="#">X02588</a>	It mediates inactivation of aminoglycosides by catalyzing the transfer of an AMP group from the donor substrate ATP to and hydroxyl group in the aminoglycoside molecule	Confer resistance to spectinomycin	Werner et al., 2001; Murphy, 1985a; Ramirez and Tolmasky, 2010
<i>aph(3')-III</i>		APH(3')-III - 3' phosphotransferase	<a href="#">M26832</a>	APHs catalyze the transfer of a phosphate group to the aminoglycoside molecule	Produce resistance to kanamycin, neomycin, lividomycin, paromomycin, butirosin, and ribostamycin.	Werner et al., 2001; Wright and Thompson, 1999; Vakulenko and Mobashery, 2003;
<i>str</i>		Aminoglycoside 6-adenylyltransferase	<a href="#">FN435330</a>		Confer resistance to streptomycin	Projan et al., 1988; Ramirez and Tolmasky, 2010
<b>Resistance to Beta-lactam</b>						
<i>mecA</i>		MecA	<a href="#">NC_007168</a>	The <i>mecA</i> gene encodes a PBP 2a (low-affinity PBP), which results in methicillin resistance	Confer resistance to broad-spectrum $\beta$ -lactam	Poole, 2004
<i>mecA1</i>			<a href="#">Y13094</a>	Encodes penicillin binding protein D (PbpD)	Confer resistance to methicillin and other $\beta$ -lactam antibiotics	Miragaia, 2018
<i>blaZ</i>		BlaZ- Staphylococcal $\beta$ -lactamase (A, B, C, and D)	<a href="#">NZ_JVWM01000127</a>	Enzymes that inactivate the antibiotic by breaking the amide bond of the beta-lactam ring	Confer resistance to $\beta$ -lactams such as penicillin, ampicillin, nitrocefin, cefazolin, and cephapirin.	Zygmunt et al., 1992; Poole, 2004
<i>bla TEM-116</i>			<a href="#">AY425988</a>		$\beta$ -lactamases-codifying genes	

<b>Chloramphenicol resistance</b>						
<i>cat(pC233)</i>		Chloramphenicol acetyltransferase	<a href="#">AY355285</a>		It inactivates chloramphenicol and thiamphenicol	Gleckman et al., 1981; Schwarz et al., 2004
<b>Trimethoprim resistance</b>						
<i>dhfrG</i>		Dihydrofolate reductase	<a href="#">AB205645</a>	Resistance is due to cell wall permeability factors that exclude drug binding to dihydrofolate reductase or the presence of a dihydrofolate reductase that is less susceptible to trimethoprim inhibition.	confer resistance to trimetoprim	Gleckman et al., 1981; Nurjadi et al., 2015
<b>Resistance to macrolides and lincosamides</b>						
<i>erm (A)</i>		Erm(A) - Erythromycin ribosome methylation	<a href="#">X03216</a>	It is mediated by a change in the ribosome, the N6-dimethylation of an adenine residue in the 23S rRNA. This dimethylation leads to a conformational change in the ribosome and is triggered by the encoding of a 23S rRNA methylase.	It prevents drug binding and confers cross-resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramin B	Murphy, 1985b; Saleem et al., 1980; Eady et al., 1993; Sutcliffe et al., 1996; Weisblum, 1985; Martineau et al., 2000
<i>erm (B)</i>		Erm(B) - Erythromycin ribosome methylation	<a href="#">U86375</a>	It is mediated by a change in the ribosome, the N6-dimethylation of an adenine residue in the 23S rRNA. This dimethylation leads to a conformational change in the ribosome and is triggered by the encoding of a 23S rRNA methylase.	It prevents drug binding and confers cross-resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramin B	Saleem et al., 1980; Eady et al., 1993; Weisblum, 1985; Sutcliffe et al., 1996; Martineau et al., 2000
<i>erm (C)</i>		Erm(C) - Erythromycin ribosome methylation	<a href="#">M13761</a>	It is mediated by a change in the ribosome, the N6-dimethylation of an adenine residue in the 23S rRNA. This dimethylation leads to a conformational change in the ribosome and is triggered by the encoding of a 23S rRNA methylase.	Prevent drug binding and confer cross-resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramin B	Murphy, 1985; Saleem et al., 1980; Weisblum, 1985; Eady et al., 1993; Sutcliffe et al., 1996; Martineau et al., 2000
<i>lnu (A)</i>	<i>linA</i>	Lnu(A) - Lincosamide nucleotidyltransferase	<a href="#">M14039</a>	Transferases	Inactivate lincosamides	Feßler et al., 2018
<i>lnu (B)</i>	<i>linB</i>	Lnu(B) - Lincosamide nucleotidyltransferase	<a href="#">JQ861959</a>	Transferases	Inactivate lincosamides	Feßler et al., 2018
<i>lsa (E)</i>		Lsa(E)	<a href="#">JX560992</a>	ABC-F Protein Ribosomal Protection	Lincomycin, Streptogramin A, Pleuromutilin	Feßler et al., 2018
<i>vga (A)V</i>		Vga(A)v	<a href="#">AF186237</a>	ABC-F Protein Ribosomal Protection	Confers resistance to A compounds of virginiamycin-like antibiotics (streptogramin A, pristinamycin II, virginiamycin M), and to synergistic mixtures of the A and B compounds of these antibiotics. Pleuromutilin, Lincosamide	Alligment et al., 1992; Reynolds et al., 2003
<i>sal (A)</i>		Sal(A)	<a href="#">KC693025</a>	ABC-F Protein Ribosomal Protection	Confer resistance to lincosamides, streptogramin A compounds, and pleuromutilins	Hot et al., 2014; Wendlandt et al., 2015
<i>mph (C)</i>		Mph(C) - macrolide phosphotransferases	<a href="#">AF167161</a>	Phosphorylases	Confer to Macrolides	
<i>msr (A)</i>		Msr(A) - macrolide streptogramin resistance	<a href="#">X52085</a>	Encode an ATP-dependent efflux pump	Confer Erythromycin and Streptogramin B	Ross et al., 1995; Reynolds et al., 2003

<b>Resistance to fosfomycin</b>						
<i>fosB4</i>		FosB4	<a href="#">KR870311</a>	The enzyme inactivates the drug, the result of a catalytic conjugation through chemical modification with L-cysteine/bacilitiol	Promote resistance to fosfomycin	Baylan, 2010; Roberts et al., 2013; Fu et al., 2016
<i>fosB6</i>		FosB6	<a href="#">KR870314</a>	The enzyme inactivates the drug, the result of a catalytic conjugation through chemical modification with L-cysteine/bacilitiol	Promote resistance to fosfomycin	Baylan, 2010; Roberts et al., 2013; Fu et al., 2017
<b>Resistance to fusidic acid</b>						
<i>fusB</i>		FusB	<a href="#">JF777505</a>	The protein prevents fusidic acid from interacting with EF-G, thus protecting the translation apparatus from inhibition by the antibiotic	Determinant of resistance to fusidic acid	Neill and Chopra, 2006; Lannergård and Norstro, 2009
<i>fusC</i>		FusC	<a href="#">KF527883</a>	Presumed to perform a similar function to the FusB protein, protecting the drug target	Determinant of resistance to fusidic acid	Neill and Chopra, 2006; Lannergård and Norstro, 2010
<b>Resistance to tetracyclines</b>						
<i>tet (K)</i>		Tet(K)	<a href="#">U38656</a>	Tetracycline-specific efflux pumps expel tetracycline antibiotics from inside cells at the expense of a proton	Confer resistance to tetracycline, minocycline, and doxycycline	Guillaume et al., 2004; Grossman, 2016
<i>tet (M)</i>		Tet(M)	<a href="#">FN433596</a>	Tetracycline's ribosomal protection proteins are believed to dissociate tetracycline from its binding site	Confer resistance to tetracycline, minocycline, and doxycycline	Dönhöfer et al., 2012; Grossman, 2016
<b>Mupirocin resistance</b>						
<i>mup (A)</i>			<a href="#">GU237136</a>	May occur with production of a modified isoleucyl-tRNA synthetase	High-level resistance to mupirocin	Hodgson et al., 1994; Poovelikunnel et al., 2015
<b>Resistance to antiseptics and disinfectants</b>						
<i>qacA</i>			<a href="#">AB566410</a>	Probably acts on the energy-dependent efflux of EdtBr from the cell	Confer resistance to a range of structurally disparate organic cations, including monovalent cations such as ethidium, benzalkonium and cetrime, and divalent cations like chlorhexidine and pentamidine	Littlejohn et al., 1991; Mayer et al., 2001
<i>qacD</i>		QacD transport proteins	<a href="#">M37888</a>	Probably acts on the energy-dependent efflux of EdtBr from the cell	Confer resistance to quaternary ammonium compounds and to ethidium bromide	Littlejohn et al., 1991; Poovelikunnel et al., 2015

4B - Genes de Toxinas					
Gene	Identity/Protein group	Accession no.	Ligand and binding mechanism	Function	References
<i>aur</i>	Aureolysin	<a href="#">AP014942.1</a>	Aureolysin can cleave plasma proteinase inhibitors, $\alpha$ 1-antichymotrypsin and $\alpha$ 1-proteinase inhibitors and, may activate prothrombin in human plasma, affects T and B lymphocyte stimulation by polyclonal activators, exhibits inhibitory activity against immunoglobulin production by lymphocytes, and activates the precursor of glutamyl endopeptidase		Drapeau, 1978; Wegrzynowicz et al., 1980; Potempa et al., 1991; Prokešová et al., 1991
<i>splA</i>	SplA - Serine protease-like proteins	<a href="#">AP014942.1</a>			
<i>splB</i>	SplB - Serine protease-like proteins	<a href="#">AP014942.1</a>	Inhibits all three complement activation pathways	It blocks the opsonophagocytosis of the bacteria by neutrophils	Dasari et al., 2022; Reed et al., 2001
<i>splE</i>	SplE - Serine protease-like proteins	<a href="#">AP014942.1</a>			
		-			
ACME	Arginine catabolic mobile element	<a href="#">KF175393.1</a>	Encodes an arginine deiminase pathway and an oligopeptide permease system	Promotes significant growth, and virulence in the host	Diep et al., 2006; Wu et al., 2020
<i>sak</i>	SaK - Fibrinolytic enzyme staphylokinase	<a href="#">BA000017.4</a>			
<i>scn</i>	Staphylococcal complement inhibitor	<a href="#">LC032460.1</a>			
<i>lukD</i>	Leukocidin D component	<a href="#">AP014942.1</a>	beta-barrel pore-forming toxin		
<i>lukE</i>	Leukocidin E component	<a href="#">AP014942.1</a>	beta-barrel pore-forming toxin		

<i>lukF-PV</i>	LukF	<a href="#">CP012119.1</a>	Together with Luks-PV, they form the leucocidin Panton-Valentine - PVL, which causes the formation of pores in the white blood cell membrane leading to the efflux of vital molecules and metabolites and, consequently, cell lysis.	Promotes the lysis of human neutrophils	Kaneko and Kamio, 2004; Otto, 2014
<i>lukS-PV</i>	LukS	<a href="#">CP012119.1</a>	Together with LukF-PV, they form the leucocidin Panton-Valentine - PVL, which causes the formation of pores in the white blood cell membrane leading to the efflux of vital molecules and metabolites and, consequently, cell lysis.	Promotes the lysis of human neutrophils	Kaneko and Kamio, 2004; Otto, 2015
<i>hlgA</i>	HLgA - Gamma hemolysin chain II precursor	<a href="#">AP014942.1</a>		causes cell lysis	
<i>hlgB</i>	HlgB - Gamma hemolysin component B	<a href="#">AP014942.1</a>		causes cell lysis	
<i>hlgC</i>	HLgC - Gamma hemolysin component C	<a href="#">AP014942.1</a>		causes cell lysis	
<i>edinB</i>	Epidermal cell differentiation inhibitor B	<a href="#">KC609427.1</a>	It compromises the integrity of the endothelium barrier and inhibits the small host protein RhoA	It suppress complement-mediated phagocytosis, playing important role in colonization and bacterial invasion	Boyer et al., 2006; Ahmad-Mansour et al., 2021
<i>sea</i>	SEA - Enterotoxin A	<a href="#">CP010526.1</a>			
<i>seb</i>	SEB - Enterotoxin B	<a href="#">CP007539.1</a>			
<i>sec</i>	Enterotoxin C	<a href="#">AB860417.1</a>			
<i>sec3</i>	Enterotoxin C3	<a href="#">M28364.1</a>			
<i>sed</i>	Enterotoxin D	<a href="#">KF007920.1</a>			
<i>seg</i>	Enterotoxin G	<a href="#">CP001844.2</a>			
<i>seh</i>	Enterotoxin H				
<i>sei</i>	Enterotoxin I	<a href="#">BA000018.3</a>			

<i>sej</i>	Enterotoxin J	<u>GQ900405.1</u>		
<i>sel</i>	Enterotoxin L	<u>AF217235.1</u>		
<i>sek</i>	Enterotoxin K	<u>CP000255.1</u>		
<i>sem</i>	Enterotoxin M	<u>BA000018.3</u>		
<i>se n</i>	Enterotoxin N	<u>BA000018.3</u>		
<i>seo</i>	Enterotoxin O	<u>BA000018.3</u>		
<i>sep</i>	Enterotoxin P			
<i>seq</i>	Enterotoxin Q	<u>CP000255.1</u>		
<i>seu</i>	Enterotoxin U	<u>HE681097.1</u>		
<i>ser</i>	Enterotoxin R	<u>AB075606.1</u>		
<i>tst</i>	Toxic shock syndrome toxin 1			

### 5B - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allignet, J., Loncle, V., and El Solh, N. (1992). Sequence of a staphylococcal plasmid gene, *vga*, encoding a putative ATP-binding protein involved in resistance to virginiamycin A-like antibiotics. *Gene* 117, 45–51. doi:10.1016/0378-1119(92)90488-B.
- Azucena, E., Grapsas, I., and Mobashery, S. (1997). Properties of a bifunctional bacterial antibiotic resistance enzyme that catalyzes ATP-dependent 2''-phosphorylation and acetyl-CoA-dependent 6'-acetylation of aminoglycosides. *Journal of the American Chemical Society* 119, 2317–2318. doi:10.1021/ja964278w.
- Barbu, E. M., Ganesh, V. K., Gurusiddappa, S., Mackenzie, R. C., Foster, T. J., Sudhof, T. C., et al. (2010).  $\beta$ -neurexin is a ligand for the Staphylococcus aureus MSCRAMM SdrC. *PLoS Pathogens* 6. doi:10.1371/journal.ppat.1000726.
- Baylan, O. (2010). Fosfomicin: Past, present and future [Fosfomisin: Dünü, bugünü ve geleceği]. *Mikrobiyoloji Bulteni* 44, 311–321. Available at: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-77952872863&partnerID=40&md5=35b16fd7e7f50e49370c8fa17d77fff1>.
- Burke, F. M., Di Poto, A., Speziale, P., and Foster, T. J. (2011). The A domain of fibronectin-binding protein B of Staphylococcus aureus contains a novel fibronectin binding site. *FEBS Journal* 278, 2359–2371. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08159.x.
- Chen, L., et al (2004). VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Research* 33, D325–D328. doi:10.1093/nar/gki008.

**5B - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, continuação**

- Daigle, D. M., Hughes, D. W., and Wright, G. D. (1999). Prodigious substrate specificity of AAC(6')-APH(2''), an aminoglycoside antibiotic resistance determinant in enterococci and staphylococci. *Chemistry and Biology* 6, 99–110. doi:10.1016/S1074-5521(99)80006-4.
- Dönhöfer, A., Franckenberg, S., Wickles, S., Berninghausen, O., and Beckmann, R. (2012). Structural basis for TetM-mediated tetracycline resistance. 109. doi:10.1073/pnas.1208037109.
- Downer, R., Roche, F., Park, P. W., Mecham, R. P., and Foster, T. J. (2002). The elastin-binding protein of *Staphylococcus aureus* (EbpS) is expressed at the cell surface as an integral membrane protein and not as a cell wall-associated protein. *Journal of Biological Chemistry* 277, 243–250. doi:10.1074/jbc.M107621200.
- Eady, E. A., Ross, J. I., Tipper, J. L., Walters, C. E., Cove, J. H., and Noble, W. C. (1993). Distribution of genes encoding erythromycin ribosomal methylases and an erythromycin efflux pump in epidemiologically distinct groups of staphylococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 31, 211–217. doi:10.1093/jac/31.2.211.
- Feßler, A. T., Wang, Y., Wu, C., and Schwarz, S. (2018). Mobile lincosamide resistance genes in staphylococci. *Plasmid* 99, 22–31. doi:10.1016/j.plasmid.2018.06.002.
- Foster, T. J. (2017). Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS Microbiology Reviews* 41, 430–449. doi:10.1093/femsre/fux007.
- Foster, T. J., Geoghegan, J. A., Ganesh, V. K., and Höök, M. (2014). Adhesion, invasion and evasion: The many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Microbiology* 12, 49–62. doi:10.1038/nrmicro3161.
- Frase, H., Toth, M., and Vakulenko, S. B. (2012). Revisiting the nucleotide and aminoglycoside substrate specificity of the bifunctional aminoglycoside acetyltransferase(6')-Ie/aminoglycoside phosphotransferase(2'')-Ia enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 287, 43262–43269. doi:10.1074/jbc.M112.416453.
- Fu, Z., Liu, Y., Chen, C., Guo, Y., Ma, Y., Yang, Y., et al. (2016). Characterization of Fosfomycin Resistance Gene, fosB, in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates. *PLoS ONE* 11, 4–11. doi:10.1371/journal.pone.0154829.
- Ganesh, V. K., Rivera, J. J., Smeds, E., Ko, Y. P., Bowden, M. G., Wann, E. R., et al. (2008). A structural model of the *Staphylococcus aureus* ClfA-fibrinogen interaction opens new avenues for the design of anti-staphylococcal therapeutics. *PLoS Pathogens* 4. doi:10.1371/journal.ppat.1000226.
- Geoghegan, J. A., Corrigan, R. M., Gruszka, D. T., Speziale, P., O'Gara, J. P., Potts, J. R., et al. (2010). Role of surface protein SasG in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 192, 5663–5673. doi:10.1128/JB.00628-10.



**5B - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, continuação**

- Geraci, J., Neubauer, S., Pöllath, C., Hansen, U., Rizzo, F., Krafft, C., et al. (2017). The *Staphylococcus aureus* extracellular matrix protein (Emp) has a fibrous structure and binds to different extracellular matrices. *Scientific Reports* 7, 1–14. doi:10.1038/s41598-017-14168-4.
- Gleckman, R., Blagg, N., Joubert, D. W., and Pharm, M. S. Trimethoprim : Mechanisms of Action , Antimicrobial Activity , Bacterial Resistance , Pharmacokinetics , Adverse Reactions , and Therapeutic Indications. 14–19.
- Grossman, T. H. (2016). Tetracycline Antibiotics and Resistance. 1–24.
- Guillaume, G., Ledent, V., Moens, W., and Collard, J. (2004). Phylogeny of Efflux-Mediated Tetracycline Resistance Genes and Related Proteins Revisited. 10.
- Hodgson, J. E., Curnock, S. P., Dyke, K. G. H., Morris, R., Sylvester, D. R., and Gross, M. S. (1994). Molecular Characterization of the Gene Encoding High-Level Mupirocin Resistance in *Staphylococcus aureus* J2870. 38, 1205–1208.
- Hot, C., Berthet, N., and Chesneau, O. (2014). Characterization of sal(A), a Novel Gene Responsible for Lincosamide and Streptogramin a resistance in *staphylococcus sciuri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58, 3335–3341. doi:10.1128/AAC.02797-13.
- Khan, S. A., and Novick, R. P. (1980). Terminal nucleotide sequences of Tn551, a transposon specifying erythromycin resistance in *Staphylococcus aureus*: Homology with Tn3. *Topics in Catalysis* 4, 148–154. doi:10.1016/0147-619X(80)90004-9.
- Lannergård, J., and Norstro, T. (2009). Genetic Determinants of Resistance to Fusidic Acid among Clinical Bacteremia Isolates of *Staphylococcus aureus* □. 53, 2059–2065. doi:10.1128/AAC.00871-08.
- Littlejohn, T. G., DiBerardino, D., Messerotti, L. J., Spiers, S. J., and Skurray, R. A. (1991). Structure and evolution of a family of genes encoding antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. *Gene* 101, 59–66. doi:10.1016/0378-1119(91)90224-Y.
- Maddur, A. A., Kroh, H. K., Aschenbrenner, M. E., Gibson, B. H. Y., Panizzi, P., Sheehan, J. H., et al. (2020). Specificity and affinity of the N-terminal residues in staphylocoagulase in binding to prothrombin. *Journal of Biological Chemistry* 295, 5614–5625. doi:10.1074/jbc.RA120.012588.
- Martineau, F., Picard, O. I. S. J., Lansac, N., Me, C., Roy, P. H., Ouellette, M., et al. (2000). Correlation between the Resistance Genotype Determined by Multiplex PCR Assays and the Antibiotic Susceptibility Patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. 44, 231–238.
- Mayer, S., Boos, M., Beyer, A., Fluid, A. C., and Schmitz, F.-J. (2001). Distribution of the antiseptic resistance genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 47, 896–897.

**5B - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, continuação**

- McCourt, J., O'Halloran, D. P., McCarthy, H., O'Gara, J. P., and Geoghegan, J. A. (2014). Fibronectin-binding proteins are required for biofilm formation by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain LAC. *FEMS Microbiology Letters* 353, 157–164. doi:10.1111/1574-6968.12424.
- Miragaia, M. (2018). Factors Contributing to the Evolution of *mecA* -Mediated  $\beta$  -lactam Resistance in *Staphylococci* : Update and New Insights From Whole Genome Sequencing ( WGS ). 9, 1–16. doi:10.3389/fmicb.2018.02723.
- Murphy, E. (1985a). Nucleotide sequence of a spectinomycin adenylyltransferase AAD(9) determinant from *Staphylococcus aureus* and its relationship to AAD(3") (9). *MGG Molecular & General Genetics* 200, 33–39. doi:10.1007/BF00383309.
- Murphy, E. (1985b). Nucleotide sequence of *ermA*, a macrolide-lincosamide-streptogramin B determinant in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 162, 633–640. doi:10.1128/jb.162.2.633-640.1985.
- Neill, A. J. O., and Chopra, I. (2006). Molecular basis of *fusB* -mediated resistance to fusidic acid in *Staphylococcus aureus*. 59, 664–676. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04971.x.
- Nurjadi, D., Schäfer, J., Friedrich-Jänicke, B., Mueller, A., Neumayr, A., Calvo-Cano, A., et al. (2015). Predominance of *dfrG* as determinant of trimethoprim resistance in imported *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection* 21, 1095.e5-1095.e9. doi:10.1016/j.cmi.2015.08.021.
- Pickering, A. C., Yebra, G., Gong, X., Goncheva, M. I., Wee, B. A., MacFadyen, A. C., et al. (2021). Evolutionary and Functional Analysis of Coagulase Positivity among the *Staphylococci*. *mSphere* 6. doi:10.1128/msphere.00381-21.
- Pietrocola, G., Nobile, G., Gianotti, V., Zapotoczna, M., Foster, T. J., Geoghegan, J. A., et al. (2016). Molecular interactions of human plasminogen with fibronectin-binding protein B (FnBPB), a Fibrinogen/Fibronectin-binding Protein from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological Chemistry* 291, 18148–18162. doi:10.1074/jbc.M116.731125.
- Poole, K. (2004). Cellular and Molecular Life Sciences Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. 61, 2200–2223. doi:10.1007/s00018-004-4060-9.
- Poovelikunnel, T., Gethin, G., and Humphreys, H. (2015). Mupirocin resistance : clinical implications and potential alternatives for the eradication of MRSA. 2681–2692. doi:10.1093/jac/dkv169.
- Posner, M. G., Upadhyay, A., Abubaker, A. A., Fortunato, T. M., Vara, D., Canobbio, I., et al. (2016). Extracellular fibrinogen-binding protein (Efb) from *staphylococcus aureus* inhibits the formation of platelet-leukocyte complexes. *Journal of Biological Chemistry* 291, 2764–2776. doi:10.1074/jbc.M115.678359.

**5B - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, continuação**

- Projan, S. J., Moghazeh, S., and Novick, R. P. (1988). Nucleic Acids Research. 16, 2179–2187.
- Ramirez, M. S., and Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates* 13, 151–171. doi:10.1016/j.drug.2010.08.003.
- Reynolds, E., Ross, J. I., and Cove, J. H. (2003). Msr(A) and related macrolide/streptogramin resistance determinants: Incomplete transporters? *International Journal of Antimicrobial Agents* 22, 228–236. doi:10.1016/S0924-8579(03)00218-8.
- Roberts, M. C., Soge, O. O., and No, D. (2013). Comparison of multi-drug resistant environmental methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from recreational beaches and high touch surfaces in built environments. *Frontiers in Microbiology* 4, 1–8. doi:10.3389/fmicb.2013.00074.
- Roche, F. M., Downer, R., Keane, F., Speziale, P., Woo, P., and Foster, T. J. (2004). The N-terminal A Domain of Fibronectin-binding Proteins A and B Promotes Adhesion of *Staphylococcus aureus* to Elastin \*. *Journal of Biological Chemistry* 279, 38433–38440. doi:10.1074/jbc.M402122200.
- Ross, J. I., Eady, E. A., Cove, J. H., and Baumberg, S. (1995). Identification of a chromosomally encoded ABC-transport system with which the staphylococcal erythromycin exporter MsrA may interact. *Gene* 153, 93–98. doi:10.1016/0378-1119(94)00833-E.
- Rouch, D. A., Byrne, M. E., Kong, Y. C., and Skurray, R. A. (1987). The aacA-aphD gentamicin and kanamycin resistance determinant of Tn4001 from *Staphylococcus aureus*: Expression and nucleotide sequence analysis. *Journal of General Microbiology* 133, 3039–3052. doi:10.1099/00221287-133-11-3039.
- Schwarz, S., Kehrenberg, C., Doublet, B., and Cloeckaert, A. (2004). Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiology Reviews* 28, 519–542. doi:10.1016/j.femsre.2004.04.001.
- Sutcliffe, J., Grebe, T., Tait-Kamradt, A., and Wondrack, L. (1996). Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40, 2562–2566. doi:10.1128/aac.40.11.2562.
- Vakulenko, S. B., and Mobashery, S. (2003). Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clinical Microbiology Reviews* 16, 430–450. doi:10.1128/CMR.16.3.430-450.2003.
- Valotteau, C., Prystopiuk, V., Pietrocola, G., Rindi, S., Peterle, D., De Filippis, V., et al. (2017). Single-Cell and Single-Molecule Analysis Unravels the Multifunctionality of the *Staphylococcus aureus* Collagen-Binding Protein Cna. *ACS Nano* 11, 2160–2170. doi:10.1021/acsnano.6b08404.

**5B - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, continuação**

- Viljoen, A., Viela, F., Mathelié-Guinlet, M., Missiakas, D., Pietrocola, G., Speziale, P., et al. (2021). Staphylococcus aureus vWF-binding protein triggers a strong interaction between clumping factor A and host vWF. *Communications Biology* 4, 1–10. doi:10.1038/s42003-021-01986-6.
- Watanabe, S., Ito, T., Takeuchi, F., Endo, M., Okuno, E., and Hiramatsu, K. (2005). Structural comparison of ten serotypes of staphylocoagulases in Staphylococcus aureus. *Journal of Bacteriology* 187, 3698–3707. doi:10.1128/JB.187.11.3698-3707.2005.
- Weisblum, B. (1995). Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39, 577–585. doi:10.1128/AAC.39.3.577.
- Wendlandt, S., Kadlec, K., Feßler, A. T., and Schwarz, S. (2015). Identification of ABC transporter genes conferring combined pleuromutilin-lincosamide-streptogramin A resistance in bovine methicillin-resistant Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci. *Veterinary Microbiology* 177, 353–358. doi:10.1016/j.vetmic.2015.03.027.
- Werner, G., Hildebrandt, B., and Witte, W. (2001). Aminoglycoside-streptothricin resistance gene cluster aadE-sat4-aphA-3 disseminated among multiresistant isolates of enterococcus faecium. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45, 3267–3269. doi:10.1128/AAC.45.11.3267-3269.2001.
- Wright, G. D., and Thompson, P. R. (1999). [Frontiers in Bioscience 4, d9-21, January 1, 1999] AMINOGLYCOSIDE PHOSPHOTRANSFERASES: PROTEINS, STRUCTURE, AND MECHANISM Gerard D. Wright and Paul R. Thompson. 1–17.
- Zong, Y., Xu, Y., Liang, X., Keene, D. R., Höök, A., Gurusiddappa, S., et al. (2005). A “Collagen Hug” Model for Staphylococcus aureus CNA binding to collagen. *EMBO Journal* 24, 4224–4236. doi:10.1038/sj.emboj.7600888.
- Zygmunt, D. J., Stratton, C. W., and Kernodlel, D. S. (1992). Characterization of Four 13-Lactamases Produced by Staphylococcus aureus. 36, 440–445.

### APÊNDICE C – Material Suplementar 3: Valores absolutos e relativos dos genes anotados de adesão, formação de biofilme, resistência a antimicrobianos e toxinas

Disease stage/ Isolation source	Number of isolates %	Adhesins																								Biofilm formation									
		<i>clfA</i>	<i>clfB</i>	<i>cna</i>	<i>fnbA</i>	<i>fnbB</i>	<i>ebpS</i>	<i>spa</i>	<i>sdrC</i>	<i>sdrD</i>	<i>sdrE</i>	<i>coa</i>	<i>eap</i>	<i>emp</i>	<i>efb</i>	<i>vWbp</i>	<i>atl</i>	<i>aap</i>	<i>pls</i>	<i>sasG</i>	<i>sasH</i>	<i>sasA</i>	<i>sasC</i>	<i>sasD</i>	<i>sasF</i>	<i>sasK</i>	<i>icaA</i>	<i>icaB</i>	<i>icaC</i>	<i>icaD</i>	<i>icaR</i>	<i>rhf</i>	<i>tcaR</i>	<i>sarA</i>	<i>sigB</i>
Clinical mastitis	27	26	25	8	26	20	26	26	26	13	23	26	25	26	23	26	26	2	2	16	26	26	25	20	26	18	22	22	22	22	22	23	23	23	23
%		96,30	92,59	29,63	96,30	74,07	96,30	96,30	96,30	48,15	85,19	96,30	92,59	96,30	85,19	96,30	96,30	7,41	7,41	59,26	96,30	96,30	92,59	74,07	96,30	66,67	81,48	81,48	81,48	81,48	81,48	85,19	85,19	85,19	85,19
Subclinical mastitis	43	43	43	6	43	35	43	43	42	29	41	43	42	43	40	43	43	0	1	37	43	42	41	39	41	35	41	41	41	41	41	41	41	41	41
%		100,00	100,00	13,95	100,00	81,40	100,00	100,00	97,67	67,44	95,35	100,00	97,67	100,00	93,02	100,00	100,00	0,00	2,33	86,05	100,00	97,67	95,35	90,70	95,35	81,40	95,35	95,35	95,35	95,35	95,35	95,35	95,35	95,35	95,35
Bulk milk/Raw milk	21	21	21	4	21	12	21	21	21	12	21	21	21	21	21	21	0	0	9	21	21	21	17	21	12	20	20	20	20	20	21	21	21	21	
%		100,00	100,00	19,05	100,00	57,14	100,00	100,00	100,00	57,14	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	0,00	0,00	42,86	100,00	100,00	100,00	80,95	100,00	57,14	95,24	95,24	95,24	95,24	95,24	100,00	100,00	100,00	100,00	
Abscess	53	53	53	10	53	41	53	53	53	53	50	53	53	53	53	53	3	1	51	53	53	52	49	51	17	53	53	53	53	53	53	53	53	53	
%		100,00	100,00	18,87	100,00	77,36	100,00	100,00	100,00	94,34	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	5,66	1,89	96,23	100,00	100,00	98,11	92,45	96,23	32,08	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
Skin infection	49	49	49	23	48	45	49	49	34	42	44	49	48	49	35	49	49	3	7	30	49	48	47	49	30	48	48	48	48	48	49	49	49	49	
%		100,00	100,00	46,94	97,96	91,84	100,00	100,00	69,39	85,71	89,80	100,00	97,96	100,00	71,43	100,00	100,00	6,12	14,29	61,22	100,00	100,00	97,96	95,92	100,00	61,22	97,96	97,96	97,96	97,96	100,00	100,00	100,00	100,00	
Pus	55	55	55	11	55	55	55	55	55	54	53	55	55	55	55	55	0	2	53	55	54	54	27	53	32	55	55	55	55	55	55	55	55	55	
%		100,00	100,00	20,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	98,18	96,36	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	0,00	3,64	96,36	100,00	98,18	98,18	49,09	96,36	58,18	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	

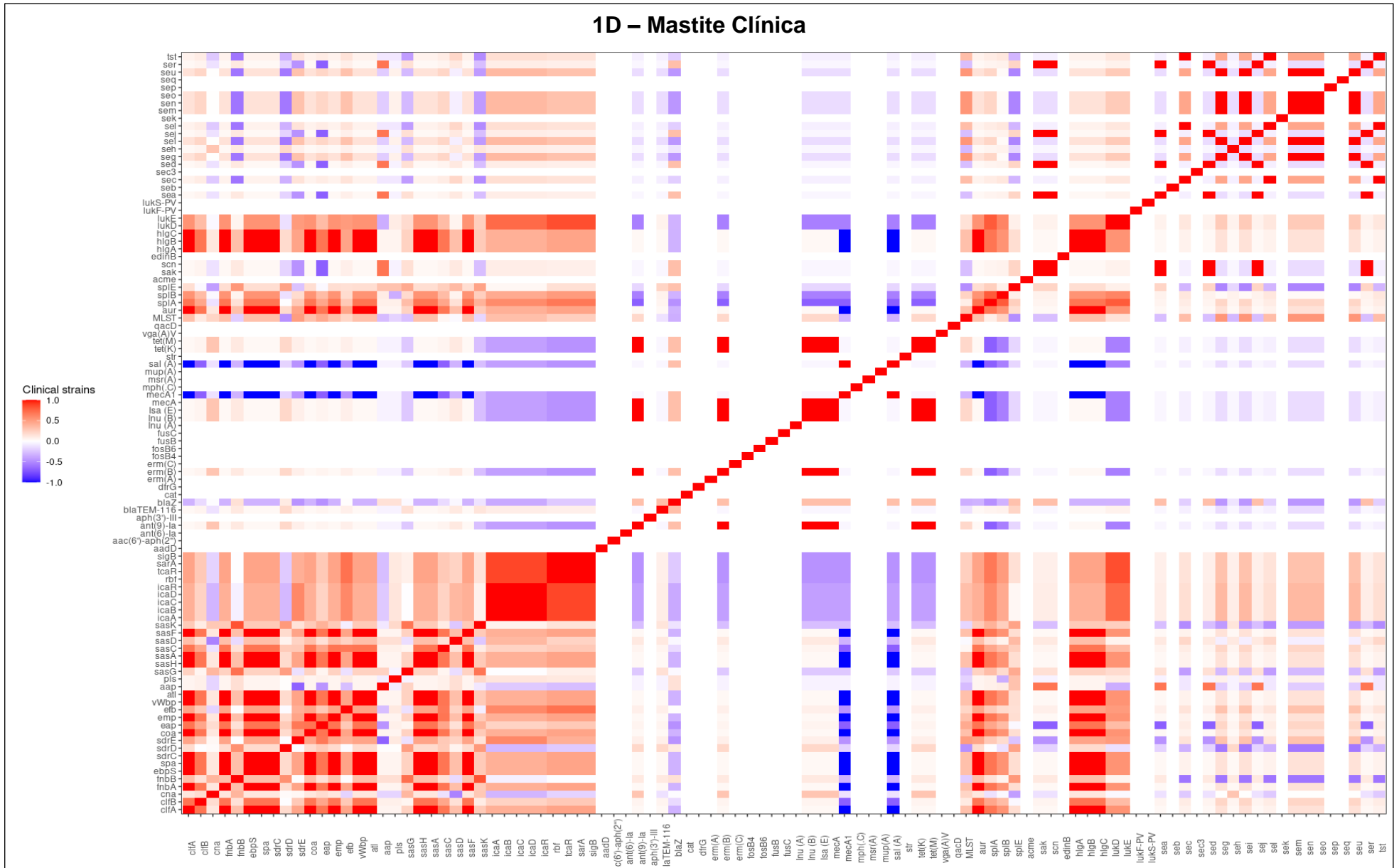
Antimicrobial Resistance	aadD	aac(6)-aph(2'')	ant(6)-Ia [aadE]	ant(9)-Ia	aph(3)-III	blaTEM-116	blaZ	cat (pC233)	dfg	erm(A)	erm(B)	erm(C)	fosB4	fosB6	fosB	fosC	Inu (A){lin (A)}	Inu (B)	Isa (E)	mecA	mecA1	mph(C)	nsr(A)	mup(A)	sal (A)	str	tet(K)	tet(M)	vga(AV)	qacD
0	0	0	1	0	1	7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0
0,00	0,00	0,00	3,70	0,00	3,70	25,93	0,00	0,00	0,00	3,70	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,70	3,70	3,70	3,70	0,00	0,00	0,00	3,70	0,00	3,70	3,70	0,00	0,00
0	0	0	0	0	0	24	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	2	0
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	55,81	0,00	0,00	0,00	0,00	6,98	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,33	4,65	2,33	4,65	0,00	
0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	19,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,76	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	9,52	4,76	0,00	0,00	0,00	
6	13	14	15	17	0	39	3	2	11	3	4	0	0	0	0	0	1	0	0	45	0	12	11	1	0	0	4	8	0	4
11,32	24,53	26,42	28,30	32,08	0,00	73,58	5,66	3,77	20,75	5,66	7,55	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,89	0,00	0,00	84,91	0,00	22,64	20,75	1,89	0,00	0,00	7,55	15,09	0,00	7,55
1	7	3	6	3	0	29	0	6	6	0	2	1	0	3	0	0	0	0	0	13	0	1	1	0	0	0	6	2	0	4
2,04	14,29	6,12	12,24	6,12	0,00	59,18	0,00	12,24	12,24	0,00	4,08	2,04	0,00	6,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	26,53	0,00	2,04	2,04	0,00	0,00	12,24	4,08	0,00	8,16	
10	20	46	9	45	0	53	17	8	9	22	5	0	1	0	4	0	0	0	0	51	0	12	12	1	0	0	25	8	0	2
18,18	36,36	83,64	16,36	81,82	0,00	96,36	30,91	14,55	16,36	40,00	9,09	0,00	1,82	0,00	7,27	0,00	0,00	0,00	92,73	0,00	21,82	21,82	1,82	0,00	0,00	45,45	14,55	0,00	3,64	

## Continuação ...

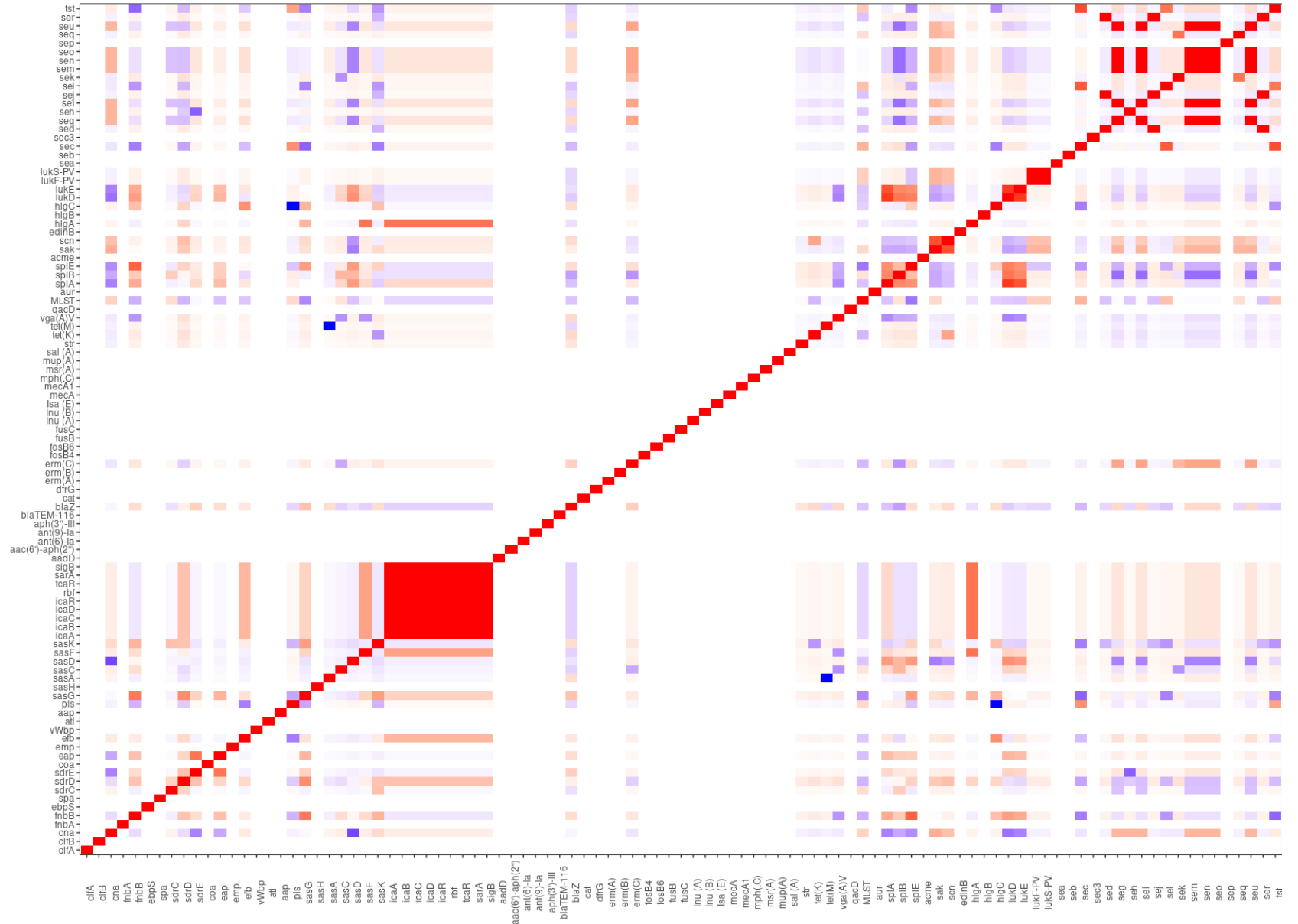
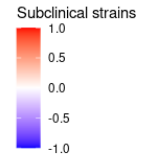
Toxin: Exoenzyme genes				Toxin: Hostinnm genes				Toxin: Toxin genes																													
aur	spIA	spIB	spIE	ACME	sak	scn	edinB	hlgA	hlgB	hlgC	lukD	lukE	lukF-PV	lukS-PV	sea	seb	sec	sec3	sed	seg	seh	sei	sej	sel	sek	sem	se n	seo	sep	seq	seu	ser	tst				
26	25	24	12	0	1	1	0	26	26	26	24	24	0	0	1	0	3	0	1	10	1	10	1	3	0	10	10	10	10	0	0	10	1	3			
96,30	92,59	88,89	44,44	0,00	3,70	3,70	0,00	96,30	96,30	96,30	88,89	88,89	0,00	0,00	3,70	0,00	11,11	0,00	3,70	37,04	3,70	37,04	3,70	11,11	0,00	37,04	37,04	37,04	37,04	0,00	0,00	37,04	3,70	11,11			
43	36	32	31	0	6	8	0	42	43	42	37	36	1	1	0	0	3	0	1	11	1	11	1	2	2	11	11	11	11	0	1	11	1	4			
100,00	83,72	74,42	72,09	0,00	13,95	18,60	0,00	97,67	100,00	97,67	86,05	83,72	2,33	2,33	0,00	0,00	6,98	0,00	2,33	25,58	2,33	25,58	2,33	4,65	4,65	25,58	25,58	25,58	25,58	0,00	2,33	25,58	2,33	9,30			
21	21	20	12	0	0	0	0	21	21	21	21	21	0	0	0	0	4	0	0	9	1	9	0	4	1	9	9	9	9	0	0	9	0	4			
100,00	100,00	95,24	57,14	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	19,05	0,00	0,00	42,86	4,76	42,86	0,00	19,05	4,76	42,86	42,86	42,86	42,86	0,00	0,00	42,86	0,00	19,05			
53	47	47	27	12	42	45	2	52	53	53	48	48	32	31	12	3	1	0	2	9	1	10	2	1	33	10	10	11	2	33	10	2	1				
100,00	88,68	88,68	50,94	22,64	79,25	84,91	3,77	98,11	100,00	100,00	90,57	90,57	60,38	58,49	22,64	5,66	1,89	0,00	3,77	16,98	1,89	18,87	3,77	1,89	62,26	18,87	18,87	20,75	3,77	62,26	18,87	3,77	1,89				
49	29	27	18	1	36	43	10	49	47	34	27	28	22	22	10	3	0	0	1	13	1	13	2	0	2	13	13	13	4	2	13	2	0				
100,00	59,18	55,10	36,73	2,04	73,47	87,76	20,41	100,00	95,92	69,39	55,10	57,14	44,90	44,90	20,41	6,12	0,00	0,00	2,04	26,53	2,04	26,53	4,08	0,00	4,08	26,53	26,53	26,53	8,16	4,08	26,53	4,08	0,00				
55	26	25	17	11	34	53	1	55	55	55	26	26	35	35	11	24	4	1	0	6	1	6	1	4	38	6	6	6	5	37	6	1	3				
100,00	47,27	45,45	30,91	20,00	61,82	96,36	1,82	100,00	100,00	100,00	47,27	47,27	63,64	63,64	20,00	43,64	7,27	1,82	0,00	10,91	1,82	10,91	1,82	7,27	69,09	10,91	10,91	10,91	9,09	67,27	10,91	1,82	5,45				

Legenda	Percent	Frequenc:
	> 90%	High
	80-90%	Moderate
	20-80%	Average
	10-20%	Low
	< 10%	Very baixa

**APÊNDICE D – Material Suplementar 4: Mapas de calor da correlação, pelo teste Sperman, da presença dos genes de adesão, biofilme, toxina e resistência antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* em cepas isoladas de bovinos (mastite clínica, mastite subclínica e leite cru) e de humanos (abscesso, infecção de pele e pus)**

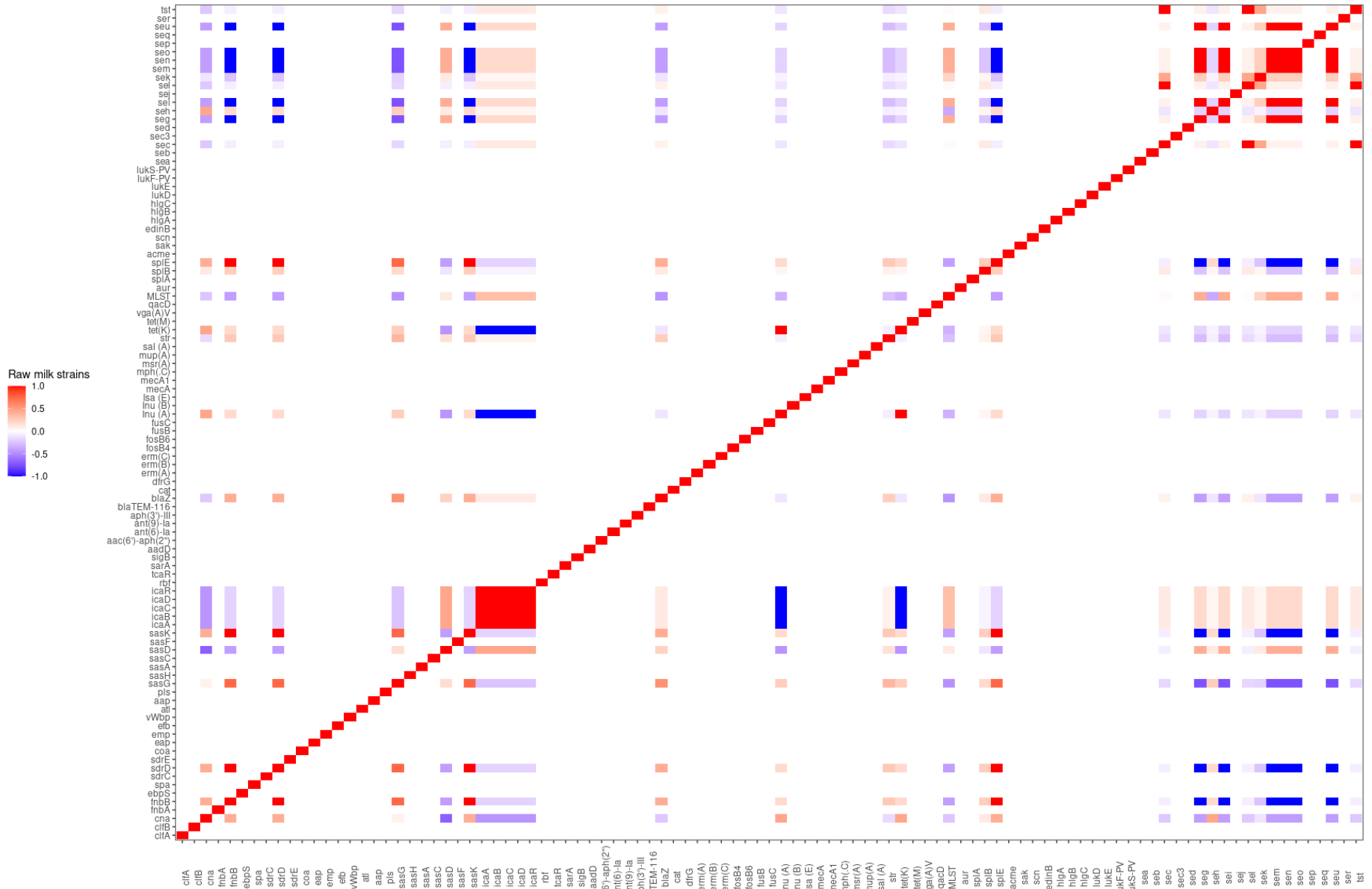


### 2D – Mastite subclínica

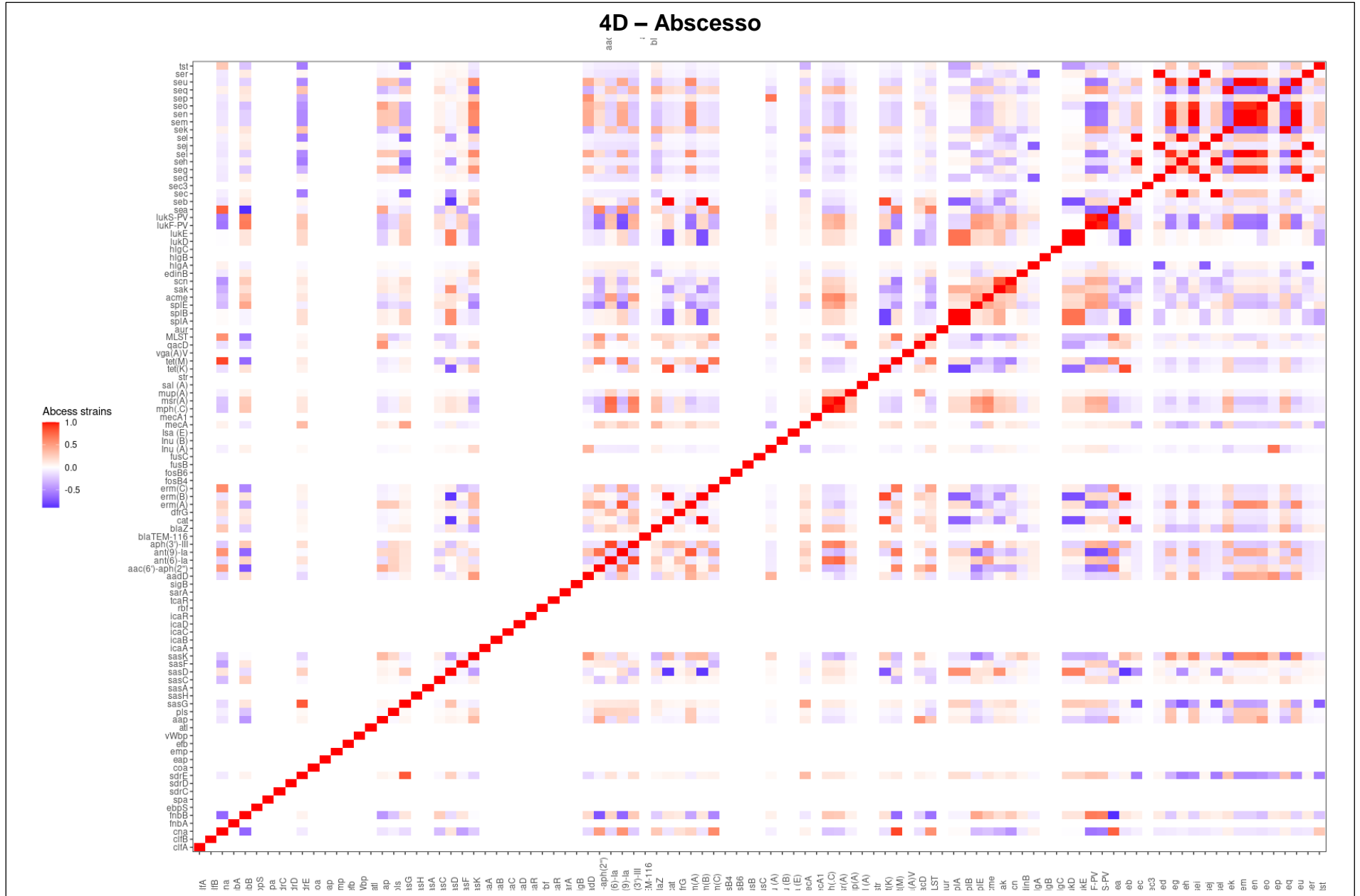




### 3D - Leite Cru



### 4D – Abscesso



# 5D – Infecção de pele

