



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA - RENORBIO

Chirles Araújo de França

**TOLERÂNCIA E PERSISTÊNCIA À ENROFLOXACINA EM *Staphylococcus* spp. DE
MASTITE CAPRINA: CARACTERIZAÇÃO, DETERMINAÇÃO DE FATORES DE
VIRULÊNCIA E GENÔMICA COMPARATIVA**

RECIFE – PE

2021

CHIRLES ARAÚJO DE FRANÇA

TOLERÂNCIA E PERSISTÊNCIA À ENROFLOXACINA EM *Staphylococcus* spp. DE MASTITE CAPRINA: CARACTERIZAÇÃO, DETERMINAÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA E GENÔMICA COMPARATIVA

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia – RENORBIO, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa

Coorientadora: Dra. Renata de Faria Silva Souza

RECIFE – PE

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C541t França, Chirles Araújo de
Tolerância e persistência à enrofloxacina em *Staphylococcus* spp. de mastite caprina: caracterização, determinação de fatores de virulência e genômica comparativa / Chirles Araújo de França. - 2021.
136 f. : il.
- Orientador: Mateus Matiuzzi da Costa.
Coorientador: Renata de Faria Silva .
Inclui referências e anexo(s).
- Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Doutorado em Biotecnologia – Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Recife, 2021.
1. Cabras leiteiras. 2. Dormência. 3. Genoma. 4. Infecções persistentes. I. Costa, Mateus Matiuzzi da, orient. II. , Renata de Faria Silva, coorient. III. Título

CDD 620.8

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

TERMO DE APROVAÇÃO

CHIRLES ARAÚJO DE FRANÇA

TOLERÂNCIA E PERSISTÊNCIA À ENROFLOXACINA EM *Staphylococcus* spp. DE MASTITE CAPRINA: CARACTERIZAÇÃO, DETERMINAÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA E GENÔMICA COMPARATIVA

Tese defendida e aprovada em 26 de Fevereiro de 2021

BANCA EXAMINADORA

Orientador:

Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa
Universidade Federal do Vale do São Francisco

Examinadores:

Prof. Dr. Helinando Pequeno de Oliveira
Universidade Federal do Vale do São Francisco

Prof^a. Dr^a. Xirley Pereira Nunes
Universidade Federal do Vale do São Francisco

Prof. Dr. Ulisses de Pádua Pereira
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Rodolfo de Moraes Peixoto
Instituto Federal Sertão Pernambucano

DEDICATÓRIA

*A meus pais, minhas irmãs e a meus sobrinhos Benjamim e Gael por todo o amor, dedicação e
compreensão, que tornaram esse sonho em realidade.*

Dedica

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me concedido a vida e por todas as bênçãos alcançadas até aqui.

Gratidão infinita, aos meus pais, Manuel e Aciône, luz na minha vida, que sempre fizeram todo o esforço para a realização desse momento, e por serem meu exemplo de amor, vida e dignidade.

Agradeço às minhas irmãs, Sheila e Sheilane pela compreensão e apoio contínuo.

A Fabiano, pelo companheirismo.

Sou grata às minhas primas irmãs, Erivânia e Erioneide pela constante preocupação e torcida para o fechamento desse ciclo em minha vida.

Às minhas amigas Valdenice, Emanuele e Aldenir pela amizade sem medida.

Ao professor Mateus, pela oportunidade e parceria.

Agradeço a TODOS do laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal que me ajudaram direta e indiretamente na realização deste trabalho, especialmente Renata e Danilo, por serem parte fundamental na execução deste estudo, além de se tornarem verdadeiros amigos. Assim como sou grata a Isabelle, Wilton, Isabelly e Gutiele pela ajuda e força que cada um me deu em momentos importantes. Igualmente, agradeço a pessoas especiais como Ruan e Renilde.

Gratidão a um amigo querido, Aldrin (*in memoriam*), pelo exemplo de perseverança e pela luz e paz que sempre me transmitiu.

A todos os funcionários da UNIVASF – Campus Ciências Agrárias, que contribuíram de alguma forma na realização desse estudo.

Aos professores Vasco, Maria Aparecida e a seus grupos de trabalhos pela colaboração significativa na realização desse projeto.

À FACEPE pela concessão da bolsa, bem como ao CNPq e CAPES pelo financiamento.

Que nada nos limite, que nada nos defina, que nada nos sujeite. Que a liberdade seja nossa própria substância, já que viver é ser livre. Porque alguém disse e eu concordo que o tempo cura, que a mágoa passa, que decepção não mata. E que a vida sempre, sempre continua.

Simone de Beauvoir

RESUMO

O leite caprino constitui uma importante fonte de alimentação para a nutrição humana e a contaminação por bactérias provenientes de infecções intramamárias, especialmente *Staphylococcus* spp., representa um risco de saúde pública. Apesar da antibioticoterapia ser o método de escolha, os micro-organismos podem sobreviver, se forem resistentes, tolerantes ou persistentes. Portanto, a identificação de isolados com esses perfis pode auxiliar no controle das complicações causadas pela mastite. O objetivo deste estudo foi caracterizar isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de mastite caprina, quanto ao perfil de tolerância/persistência e fatores de virulência associados, assim como identificar possíveis fatores genéticos relacionados a persistência. A identificação taxonômica de doze isolados de *Staphylococcus* spp. foi realizada por meio do MALDI-TOF. Aplicou-se o TDTTest para triagem da tolerância/persistência, e através da microdiluição em caldo, obteve-se as concentrações inibitória mínima (CIM) e bactericida (CBM) para enrofloxaxina. Curvas de morte foram realizadas utilizando 2xCIM do antimicrobiano, analisando a população bacteriana sobrevivente em função da duração mínima de morte, assim como se é dependente de dose ou tempo. Realizou-se a quantificação do biofilme, através do ensaio de aderência em microplaca. Foram sequenciados os genomas dos oitos isolados de *Staphylococcus warneri* antes (4) e após (4) tratamento com enrofloxaxina. A relação filogenômica e plasticidade genética foram avaliadas. Adicionalmente, houve a busca por genes de resistência e virulência, assim como a presença de polimorfismos. Os isolados foram identificados como *Staphylococcus aureus* (n=4) e *S. warneri* (n=8). As bactérias apresentaram CIM e CBM variando entre 0,12 e 1,95 µg / mL, concentração abaixo do *breakpoint* (4µg / mL). Na curva de morte, os isolados de *S. aureus* mostraram-se tolerantes e *S. warneri* foram classificados como persistentes. Verificou-se que em isolados selecionados, a persistência foi tempo dependente do tipo I. Todos os isolados foram produtores de biofilme. No sequenciamento dos isolados de *S. warneri*, foram determinadas as sequências completas de três genomas e cinco em formato incompleto. Os isolados foram considerados clonais e na análise pangenômica, foram encontrados 2017 genes centrais, e entre 176 a 336 genes acessórios. Contudo, não foram encontrados genes únicos. Conforme as análises do COG, os genes estão envolvidos em processos de funções gerais, transcrição, replicação e reparo de recombinação. Três profagos e seis ilhas genômicas foram preditos e totalmente compartilhados por todos os genomas de *S. warneri*. Similarmente, sete genes de resistência e seis genes de virulência foram compartilhados. A análise de polimorfismos detectou 13 variantes. Conclui-se que a tolerância e persistência nos isolados de *Staphylococcus* spp. foi fator determinante na sobrevivência à enrofloxaxina. A tolerância foi confirmada para *S. aureus*, enquanto a persistência em *S. warneri*. A produção de biofilme pelas espécies pode ter favorecido significativamente a tolerância ao antibiótico. As análises de genômica comparativa demonstraram similaridade entre os isolados de *S. warneri* persistentes, indicando o potencial de disseminação entre animais e conseqüentemente um risco à saúde pública. Esse estudo permitiu traçar o perfil genético de isolados de *S. warneri* persistentes e a presença de genes que podem estar relacionados a processos importantes para a persistência bacteriana.

Palavras-chave: Cabras leiteiras, Dormência, Genoma, Infecções persistentes.

ABSTRACT

Goat milk is an important source of food for human nutrition and contamination by bacteria from intramammary infections, especially *Staphylococcus* spp., poses a public health risk. Although antibiotic therapy is the therapy of choice, microorganisms can survive if they are resistant, tolerant or persistent. The identification of isolates with these profiles can help control complications caused by mastitis. The aim of this study was to characterize isolates of *Staphylococcus* spp. goat mastitis, as to the tolerance/persistence profile and associated virulence factors and identify possible genetic factors related to persistence. The taxonomic identification of twelve isolates of *Staphylococcus* spp. was carried out through the MALDI-TOF. TDTTest was applied for tolerance/persistence screening, and through broth microdilution, minimal inhibitory (MIC) and bactericidal (CBM) concentrations were obtained for enrofloxacin. Death curves were performed using 2xCIM of the antimicrobial, analyzing the surviving bacterial population according to the minimum duration of death, as well as if it is dose or time dependent. Quantification of the biofilm was carried out through the microplate adherence test. The genomes of the eight Isolates of *Staphylococcus warneri* before (4) and after (4) enrofloxacin treatment were sequenced. The phylogenomic relationship and genetic plasticity were determined. Additionally, there was the search for genes of resistance and virulence, as well as the presence polymorphisms. Bacterial isolates have been identified as *Staphylococcus aureus* (n=4) and *Staphylococcus warneri* (n=8). The bacteria showed MIC and CBM varying between 0.12 and 1.95 $\mu\text{g} / \text{mL}$, concentration below the breakpoint (4 $\mu\text{g} / \text{mL}$). On the death curve, *S. aureus* isolates were tolerant and *S. warneri* were classified as persistent. It was found that in selected isolates, persistence was time dependent on type I. All isolates were biofilm producers. In the sequencing of *S. warneri* isolates, the complete sequences of three genomes and five in incomplete format were determined. The isolates were considered clonal and in the pangenomic analysis, 2017 central genes were found, and between 176 to 336 accessory genes. However, no single genes were found. According to COG analyzes, genes are involved in processes of general functions, transcription, replication and recombination repair. Three phages and six genomic islands were predicted and fully shared by all *S. warneri* genomes. Similarly, seven resistance genes and six virulence genes were also shared. Similarly, seven resistance genes and six virulence genes were shared. The polymorphism analysis detected 13 variants. It is concluded that tolerance and persistence in *Staphylococcus* spp. was a determining factor in the survival of enrofloxacin. Tolerance was confirmed for *S. aureus*, while persistence in *S. warneri*. This indicates that it may be a species-specific phenomenon in this case. Biofilm production by species may have significantly favored antibiotic tolerance. Comparative genomics analyzes showed similarity between persistent *S. warneri* isolates, indicating the potential for dissemination among animals and consequently a risk to public health. This study allowed to trace the genetic profile of persistent *S. warneri* isolates and the presence of genes that may be related to important processes for bacterial persistence.

Keywords: Dairy goats, Numbness, Genome, Persistent infections.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de Literatura		Pág.
Figura 1	Caracterização fenotípica de tolerância e persistência.....	31
Figura 2	Diferentes gerações de sequenciamento de genomas.....	39
Capítulo 1		
Figura 1	TDtest em ágar Müeller-Hinton com isolados Cap 9.1 e 9.2.....	67
Figura 2	Curva de morte de <i>Staphylococcus</i> spp isolados de mastite caprina desafiadas com enrofloxacina.....	69
Figura 3	Teste de persistência dose-dependente em <i>Staphylococcus warneri</i> isolados de mastite caprina.....	70
Figura 4	Teste de persistência tempo-dependente em <i>Staphylococcus warneri</i> isolados de mastite caprina.....	71
Figura 5	Produção de biofilme de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de mastite caprina.....	72
Capítulo 2		
Figura 1	Árvore filogenômica baseada no alinhamento de 2017 genes conservados entre todos os isolados de <i>Staphylococcus warneri</i> depositados no NCBI.....	96
Figura 2	Perfil funcional dos genes avaliados na análise comparativa de BPGA dos genomas dos isolados de <i>Staphylococcus warneri</i> depositados no NCBI.....	98
Figura 3	Mapas circulares comparativos do genoma representam o software BRIG com genomas de <i>Staphylococcus warneri</i> isolados de mastite clínica em cabras.....	99
Figura 4	Polimorfismos de nucleotídeo único de <i>Staphylococcus warneri</i> persistentes oriundos de mastite clínica em cabras.....	100
Figura 5	Genes de resistência de <i>Staphylococcus warneri</i> persistentes de mastite clínica em cabras.....	101
Figura 6	Genes de virulência de <i>Staphylococcus warneri</i> persistentes de mastite clínica em cabras.....	103

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1		Pág.
Tabela 1	Identificação de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de mastite caprina por MALDI-TOF.....	65
Tabela 2	Padrão de persistência / tolerância de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de mastite caprina de acordo com o TDTest.....	66
Tabela 3	Concentração bactericida mínima e concentração inibitória mínima de enrofloxacin contra <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de mastite caprina.....	68
Capítulo 2		
Tabela 1	Cepas de <i>Staphylococcus warneri</i> isoladas de diferentes hospedeiros usados neste estudo (conjunto de dados).....	92
Tabela 2	Características genômicas de <i>Staphylococcus warneri</i> persistentes oriundos de mastite clínica em cabras.....	95
Tabela 3	Genes de resistência de <i>Staphylococcus warneri</i> persistentes de mastite clínica em cabras.....	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	<i>Adenosine-Triphosphate (ATP)-Binding Cassette</i>
Agr	Regulador de gene acessório agr
ALS	<i>α-acetolactate synthase</i>
BPGA	<i>Bacterial Pan Genome Tool</i>
BRIG	<i>BLAST ring image generator</i>
CARD	<i>Comprehensive Antibiotic Resistance Database</i>
CBM	Concentração bactericida mínima
CBI	Concentração bactericida ideal
CCD	Contagem de Células Diferenciais
CCS	Contagem de células somáticas
CIM	Concentração inibitória mínima
CMT	<i>California Mastitis Test</i>
Coa	Coagulase
COG	<i>Orthologous Group of protein</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
D.O.	Densidade óptica
Eap	<i>Extracellular adhesion protein</i>
Efb	<i>Extracellular fibrinogen-binding protein</i>
ENO	Enrofloxacina
EPS	<i>Exopolysaccharides</i>
ETs	<i>Exfoliative toxins</i>
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
IBGE	Censo Agropecuário de Geografia e Estatística
ICD	Inibição do crescimento dependente de contato
KEEG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
MATE	<i>Multidrug and Toxic Compound Extrusion</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry</i>
MDK	<i>Minimum duration for killing</i>
MDR	<i>Multi-Drug Resistance</i>
MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
MH	<i>Mueller Hinton</i>

MRSA	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFTs	<i>Pore-forming toxins</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PNAG	Poli-N-acetil-glucosamina
ppGpp	<i>Tetrafosfato de guanosina</i>
pppGpp	<i>Pentafosfato de guanosina</i>
PTS	<i>Phosphotransferase system</i>
QS	<i>Quorum sensing</i>
RefSeq	Sequência de referência
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RND	<i>Resistance-Nodulation-Cell Division</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SAGs	<i>Superantigens</i>
SCCmec	<i>Staphylococcal cassette cromossomo mec</i>
SCN	<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>
SCP	<i>Staphylococcus coagulase positiva</i>
SCVs	<i>Small colony variants</i>
SMR	<i>Small Multidrug Resistance</i>
SMRT	<i>Single-molecule real-time sequencing</i>
SNPs	<i>Single-nucleotide polymorphism</i>
SOS	<i>System of systems</i>
TA	Sistema toxina-antitoxina
TCA	<i>Activation of the tricarboxylic cycle</i>
TTC	2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride
UFC	Unidade formadora de colônia
VFDB	<i>Virulence Factor Database</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	Menor
>	Maior
≤	Menor ou igual
≥	Maior ou igual
° C	Graus Celsius
μg	Micrograma
g	Giro
M	Molar
μg	Micrograma
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Millimetro
nm	Nanometro
X	Multiplicação
μL	Microlitro
kb	Quilobase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 CAPRINOCULTURA LEITEIRA.....	17
2.2 MASTITE.....	18
2.2.1 Aspectos epidemiológicos e etiologia.....	19
2.2.2 Diagnóstico	21
2.2.3 Ferramentas de controle e tratamento	23
2.3 <i>Staphylococcus</i> spp.....	24
2.3.1 Características gerais: aspectos microbiológicos e bioquímicos	24
2.3.2 Fatores de virulência.....	24
2.4 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA	26
2.5 TOLERÂNCIA E PERSISTÊNCIA	28
2.5.1 Principais eventos que promovem a persistência	32
2.5.1.1 Sistema toxina – antitoxina e outros tipos de toxinas.....	32
2.5.1.2 Bombas de efluxo	34
2.5.1.3 Sinalização extracelular	34
2.5.1.4 Resposta ao estresse pela falta de nutrientes	35
2.5.2 Estratégias antipersistência	36
2.6 OUTROS MECANISMOS DE SOBREVIVÊNCIA BACTERIANA	37
2.7 METODOLOGIAS DE SEQUENCIAMENTO, GENÔMICA COMPARATIVA E FERRAMENTAS DE PREDIÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA...	38
3 OBJETIVOS	42
3.1 OBJETIVO GERAL.....	42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
REFERÊNCIAS	43
CAPÍTULO 1	58
CAPÍTULO 2	87
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	131
5 PERSPECTIVAS.....	132
ANEXO.....	133

1 INTRODUÇÃO

A caprinocultura leiteira é uma atividade em crescimento exponencial e desempenha um papel significativo nas exigências socioeconômicas e nutricionais da maioria dos países (DANMALLAM; PIMENOV, 2019). A nível nacional, ela tem um papel representativo econômico e social para os pequenos e grandes produtores (DOS SANTOS SOUZA et al., 2019), especialmente no Nordeste, região detentora de 92,8% do rebanho nacional (IBGE, 2018).

Embora essa atividade apresente um número expressivo, alguns problemas podem impedir seu maior desenvolvimento na cadeia produtiva. Nesse sentido, destaca-se a mastite, inflamação da glândula mamária, incluindo não apenas tecidos intramamários, mas também estruturas anatômicas relacionadas, como mamilos, aréolas mamárias e dutos de leite (CONTRERAS; RODRÍGUEZ, 2011). Em cabras leiteiras, as inflamações intramamárias acarretam perdas econômicas devido à diminuição da produção de leite, bem como risco à saúde pública, uma vez que o leite e seus derivados são importantes fontes de alimentação humana (CONTRERAS et al., 2003; MORONI et al., 2005). Com relação a etiologia, as bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus* spp. são os agentes causadores de mastite mais prevalentes e estão envolvidos em todas as suas formas de manifestação (CONTRERAS et al., 2007).

A terapia das mastites baseia-se principalmente na antibioticoterapia (MAHLANGU; MAINA; KAGIRA, 2018). Contudo, o uso inadequado de antibióticos ao longo do tempo contribuiu (KRÖMKER; LEIMBACH, 2017; KUMAR; GUPTA, 2018) para a crescente resistência a antibióticos, sendo um dos principais problemas do século XXI. A rápida disseminação de patógenos multirresistentes (MDR) tem sido considerada como uma crise global que pode levar a uma era sem antibióticos eficazes (MCKEEGAN; BORGES-WALMSLEY; WALMSLEY, 2002; GOLLAN et al., 2019), além de representar o principal desafio aos esforços no controle de doenças infecciosas (BOUCHER et al., 2009). Adicionalmente, essa conjuntura predispõe à ameaça de resíduos de antibióticos no leite, constituindo um problema de saúde pública (OLIVER; MURINDA, 2012; PREETHIRANI et al., 2015).

Além da resistência, foi observado que muitos micro-organismos podem ser geneticamente suscetíveis e expressar um fenótipo tolerante ao tratamento com antimicrobianos, o que é descrito como tolerância e persistência. Bactérias tolerantes possuem a capacidade de sobreviver à exposição transitória de altas concentrações de um antibiótico e

podem exibir essa característica quando presentes em ambientes pobres (BRAUNER *et al.*, 2016). Enquanto, a persistência é caracterizada quando uma subpopulação bacteriana de uma população clonal é capaz de sobreviver a altas concentrações da droga (BALABAN *et al.*, 2004). Esses eventos propiciam a ocorrência de infecções recorrentes e intensifica a problemática quanto ao tratamento para esse tipo de infecção, tanto na medicina clínica humana como na veterinária (RENBARGER *et al.*, 2017).

Assim, é de fundamental importância conhecer esses fenômenos e os fatores de virulência associados, bem como a sua ocorrência nos diferentes cenários humano e animal. Até o momento, não foi descrito na literatura a ocorrência de tolerância e persistência em micro-organismos causadores de mastite. Nessa perspectiva, hipotetiza-se que isolados oriundos de mastite em cabras, apresentem perfis de tolerância e persistência em função da falha no tratamento causada pelo uso indiscriminado de antimicrobianos e a caracterização fenotípica e genômica comparativa podem ser aplicadas como ferramentas precursoras de respostas. Portanto, esse fato ressalta ainda mais a importância e o ineditismo do estudo desses fenômenos em isolados de *Staphylococcus* spp. oriundos de mastite caprina, além de fornecer informações e subsidiar futuramente pesquisas no intuito de estabelecer estratégias para eliminá-los. Desse modo, o presente estudo teve como objetivo caracterizar isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de mastite caprina quanto à tolerância/persistência, fatores de virulência associados e perfil genético.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CAPRINOCULTURA LEITEIRA

A caprinocultura no Brasil é uma atividade progressiva de grande importância econômica e social, tanto para os pequenos como para os grandes produtores (DOS SANTOS SOUZA *et al.*, 2019). De acordo com o Censo Agropecuário de Geografia e Estatística (IBGE), o Brasil produziu 8,26 milhões de cabeças caprinas no ano de 2017, representando um crescimento de 16% quando comparado ao ano de 2006. A região Nordeste se destaca por concentrar a maior parte desse rebanho, sendo responsável por 92,8% do quantitativo nacional, e o estado de Pernambuco é considerado o segundo maior produtor de caprinos (IBGE, 2018).

De todo o rebanho de ovinos e caprinos no mundo, 20,8% são destinados à produção de laticínios (PULINA *et al.*, 2018). O Brasil possui uma produção leiteira de 25,3 milhões de L/ano, sendo o maior fornecedor de leite de cabra do continente americano (IBGE, 2018). As regiões Nordeste e Sudeste detêm cerca de 95% da produção nacional, sendo o Nordeste responsável por 70% dessa produtividade (EMBRAPA, 2019).

O leite de cabra e derivados representam uma excelente fonte alimentar com alto valor nutritivo e proporciona uma boa fonte de renda para os pequenos produtores (CLARK; GARCÍA, 2017). Fato que favorece o desenvolvimento de uma grande variedade de produtos inovadores para a promoção da saúde e alimentos funcionais para os consumidores (VERRUCK; DANTAS; PRUDENCIO, 2019). Segundo as estatísticas da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), o leite de cabra é a terceira variedade de leite mais produzida no mundo, atrás dos leites de vaca e búfala, representando cerca de 2,3% (FAO, 2018).

A progressão do consumo de leite caprino tem sido relacionada à presença de compostos benéficos para saúde, como ingredientes funcionais com atividades: anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante, imunomoduladora, entre outras (VERRUCK; DANTAS; PRUDENCIO, 2019). Portanto, com esse aumento das demandas do mercado consumidor, os pequenos produtores têm investido na atividade da caprinocultura leiteira, presumindo uma maior potencialidade econômica (CRUZ *et al.*, 2019).

Em comparação ao leite bovino, o produto caprino possui um menor potencial alergênico e uma melhor digestibilidade, devido a sua diferente composição de aminoácidos e estrutura secundária (DOS SANTOS SOUZA *et al.*, 2019). Além disso, alguns compostos

promotores de saúde como peptídeos bioativos, ácidos graxos essenciais e oligossacarídeos estão presentes (MUKDSI *et al.*, 2013; VERRUCK; DANTAS; PRUDENCIO, 2019). Entretanto, a composição do leite pode variar entre os animais, principalmente, em relação aos cuidados nutricionais e sanitários (DA COSTA *et al.*, 2014). Sendo assim, um manejo adequado é imprescindível para a eficiência dos sistemas de produção e seleção do plantel (CRUZ *et al.*, 2019).

A produção de leite caprino é regulamentada pelo Ministério da Agricultura, que publicou uma Instrução Normativa DAS – 37 de 31 de outubro de 2000, a qual aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite de Cabra. Entretanto, pesquisas com o intuito de verificar a qualidade do leite produzido demonstram que muitos produtores não atendem às exigências sanitárias, demonstrando a importância da implantação de programas para o controle da mastite nas propriedades que exploram a caprinocultura leiteira (DUTRA *et al.*, 2014).

Algumas doenças infectocontagiosas, a exemplo da mastite, podem alterar a composição do produto final e diminuir a produtividade desses animais, ocasionando grandes perdas financeiras (LI *et al.*, 2016a). Além disso, a rusticidade da caprinocultura aliada à sua rápida expansão tem gerado déficits sanitários na cadeia produtiva devido a essas doenças (FARIAS *et al.*, 2018). Portanto, a garantia da alta produtividade leiteira depende, principalmente, da saúde animal e dos cuidados com o úbere (RUEGG, 2012). Um manejo inadequado pode acarretar em um tecido mamário infectado por micro-organismos patogênicos, ocasionando, por exemplo, a mastite (GELASAKIS *et al.*, 2018).

2.2 MASTITE

A mastite está entre as enfermidades com maior importância para os pequenos ruminantes, capaz de causar graves danos ao úbere e consequente prejuízo econômico, devido aos custos com tratamento e descarte do leite e de animais (GELASAKIS *et al.*, 2018; RUPP *et al.*, 2019).

Essa enfermidade afeta negativamente a quantidade e a qualidade do leite e é caracterizada por alterações físicas, químicas, microbiológicas e patológicas no úbere e no leite. É caracterizada como uma inflamação da glândula mamária e pode ser classificada como clínica, subclínica ou crônica, categorização diretamente relacionada à presença e a duração do conjunto dos sinais clínicos, assim como, ao aspecto macroscópico do leite. A

gravidade da enfermidade ainda pode estar relacionada ao estado imune, idade, raça e ao estágio da lactação da fêmea (LI *et al.*, 2016a; PIRZADA, 2016).

Características como aumento do tamanho e densidade da glândula mamária, dor, hiperemia, assim como, febre e depressão são evidências da mastite clínica. A forma subclínica da enfermidade é descrita pela ausência de alterações perceptíveis no leite, exceto pela redução de sua produção, sendo definida pela quantificação de células somáticas presentes no leite (QIAO *et al.*, 2015). A mastite subclínica é mais frequente em cabras, sendo de 15 a 40 vezes mais prevalente que a forma clínica, constituindo-se um reservatório de micro-organismos que atuam como fonte infecciosa para os animais saudáveis (THOMPSON-CRISPI *et al.*, 2014).

Fatores como decréscimo na produção do leite e seus subprodutos, alterações organolépticas e microbiológicas do leite, gastos com medicamentos e honorários profissionais, além de substituições de matrizes tornam a mastite uma das doenças mais importantes que influenciam diretamente a caprinocultura leiteira (PIRZADA, 2016).

Adicionalmente, a enfermidade tem grande importância em termos de saúde pública, devido à influência direta sob os derivados do leite, visto que os micro-organismos causadores da mastite, principalmente aqueles que produzem enterotoxinas, oferecem riscos aos consumidores (MAHLANGU; MAINA; KAGIRA, 2018).

2.2.1 Aspectos epidemiológicos e etiologia

A mastite se apresenta como uma doença de etiologia multifatorial, contudo, a maioria dos casos está associada a agentes infecciosos. Dentre eles, pode se destacar aqueles de origem contagiosa, como o gênero *Staphylococcus* spp., principalmente *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase negativa* (SCN), que habitam a própria glândula mamária dos animais, sendo transmitidos durante a ordenha e/ou por meio das mãos não higienizadas dos ordenhadores (MAHLANGU; MAINA; KAGIRA, 2018).

O ambiente onde os animais vivem também é um reservatório de patógenos causadores da enfermidade do tipo ambiental, como as enterobactérias *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Pseudomonas* spp., *Trueperella pyogenes* e espécies de leveduras e algas, como as do gênero *Prototheca* (CONTRERAS; RODRÍGUEZ, 2011).

S. aureus é relacionado como o patógeno bacteriano mais comum associado à mastite clínica em cabras leiteiras, seguido por *Streptococcus* spp., enquanto, SCN são relatados

como os mais prevalentes em casos de mastite subclínica (MISHRA *et al.*, 2014). De forma semelhante, Mishra *et al.* (2018) ratificaram a prevalência desses agentes infecciosos na maioria dos casos de mastite subclínica em cabras Barbari e Jamunapari, demonstrando ainda o impacto negativo na quantidade e qualidade do leite.

Aspectos como prevalência e fatores de riscos devem ser enfatizados quando relacionados as perspectivas epidemiológicas. A aplicação de estudos voltados a essas condições leva a uma caracterização concisa, viabilizando a implementação de medidas preventivas. No entanto, esse tipo de pesquisa ainda é pouco explorado, a nível nacional para cadeia leiteira (GOUVEIA *et al.*, 2015).

Em um trabalho realizado por Lima *et al.* (2018) na região de Minas Gerais, avaliando perfis de prevalência e fatores de risco, o gênero encontrado como mais prevalente foi *Staphylococcus*, onde dentre os animais amostrados, 62% (166/268) foram positivos para mastite. Destes, apenas 9% (15/166) eram de mastite clínica. A frequência de limpeza dos bebedouros, o tipo de piso, o intervalo entre partos, o percentual de lactantes e a ordenha manual tiveram efeitos significativos na prevalência de mastite.

Em um estudo similar, Machado *et al.* (2018), no estado de São Paulo, encontraram 173 patógenos em 28,9% de amostras de leite, 28,1% em úberes e 70% em tanques a granel, com a frequência para *S. aureus* de 30,9% e 60% em meios-úberes e tanques, respectivamente. Onde, a prevalência de *S. aureus* variou de 0 a 24,3%, em relação a demais patógenos encontrados nas propriedades leiteiras avaliadas.

Ainda nesse cenário, Oliveira *et al.* (2011), no Nordeste paraibano, constataram a presença de *Staphylococcus* spp. em amostras de leite com contagens variando de 500 a 30.900.000 UFC / mL, com contagem média de 1.971.206 UFC/mL, estimando uma contaminação média por *S. aureus* de $1,2 \times 10^4$ UFC/ mL). Relacionando este achado à existência de problemáticas vinculadas as práticas de higiene da ordenha, transporte e retenção do leite.

Uma proporção significativa de mastite subclínica causada por *S. aureus* foi relatada por Mahlangu; Maina; Kagira (2018), que verificaram ainda que além de reduzir a produção leiteira, as bactérias são responsáveis pela evolução da doença para a forma clínica. Elas podem desenvolver uma barreira tecidual que impede a penetração dos antibióticos no local da infecção, com estimativa que apenas 70% dessas infecções estafilocócicas respondem à terapia instituída (MAHLANGU; MAINA; KAGIRA, 2018).

As espécies de SCN podem apresentar diferenças em sua patogenicidade, mas sabe-se pouco sobre seus fatores de virulência ou sua resposta imune específica em infecções

intramamárias, sendo escassos estudos experimentais que demonstrem sua patogênese em cabras em lactação (SUPRÉ *et al.*, 2011). Lasagno (2018), em um estudo com mastite induzida por *Staphylococcus chromogenes* (SCN) em cabras em lactação, verificaram que o micro-organismo é capaz de provocar uma resposta inflamatória e alterações patológicas nas primeiras horas após inoculação, demonstrando grande importância do agente patogênico na etiologia da mastite em cabras.

Um fator importante para a instalação do processo infeccioso na glândula mamária é o biofilme. Os biofilmes são arranjos bacterianos complexos, envolvidos por uma matriz polimérica extracelular, que conferem proteção e resistência aos micro-organismos (STEPANOVIC *et al.*, 2007). Agentes patogênicos como *S. aureus* e *S. epidermidis*, isolados de tetos com mastite, possuem alta eficiência para adesão em superfícies bióticas e abióticas, produzindo biofilmes com alto grau de organização (KHORAMIAN *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2016b).

O biofilme representa um dos principais mecanismos de sobrevivência das bactérias perante os tratamentos instituídos, persistindo no hospedeiro por longos períodos sem causar sintomatologia aparente (YUAN; PENG; GURUNATHAN, 2017) e sua produção pode estar relacionada a falhas do sistema imune do hospedeiro e decréscimo da ação dos agentes antimicrobianos (ZHANG *et al.*, 2016).

2.2.2 Diagnóstico

Devido aos altos custos financeiros da mastite, seu diagnóstico precoce é de extrema importância e métodos para essa finalidade têm sido desenvolvidos, sendo capazes de detectar a inflamação do úbere, assim como, os agentes etiológicos (VIGUIER *et al.*, 2009; SHAHEEN; TANTARY; NABI, 2016).

O teste da caneca de fundo preto/telado associado ao exame clínico do animal configura o principal mecanismo para o diagnóstico da mastite clínica. Enquanto, o *California Mastitis Test* (CMT) e a técnica da Contagem de Células Somáticas (CCS) são os principais testes utilizados para identificar a mastite subclínica (CHINNAPPAN *et al.*, 2017).

Peixoto *et al.*, (2016), em um estudo que avaliou os testes indiretos CMT e CCS na detecção da mastite subclínica em cabras leiteiras, verificaram índices de sensibilidade e especificidade satisfatórios, com pontos de corte próximos aos recomendados por outras pesquisas, devendo, dessa forma, continuar a serem considerados como ferramentas para o diagnóstico da mastite em cabras.

Apesar de o CMT possuir boa concordância com a CCS, amostras que apresentam elevados escores devem ser interpretadas com maior cautela, visto que elas podem apresentar reações falso-positivas, devido a causas não infecciosas (TOLOSA *et al.*, 2013).

A Contagem de Células Diferenciais (CCD) é uma técnica que demonstra alterações nas proporções relativas das células e possui a capacidade de diferenciar a glândula saudável daquelas infectadas, sendo uma ferramenta de uso nos casos em que a CCS esteja baixa (PILLA *et al.*, 2012). Sua metodologia pode ser baseada em um método microscópico, que apresenta baixo custo e mínima dificuldade de execução. Contudo, a maioria dos estudos utiliza a citometria de fluxo, pois é um método mais preciso, visto que permite a avaliação de um número maior de células por amostra (ABDEL-SALAM *et al.*, 2015).

O ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) possui alta sensibilidade e especificidade, sendo capaz de detectar a catelicidina no leite, um marcador inflamatório, demonstrando que ela pode se tornar uma ferramenta potencial para a classificação da doença (ADDIS *et al.*, 2017). Ming *et al.* (2020) exploraram o efeito da mastite na α s1-caseína em amostras de leite de cabras saudáveis, com mastite subclínica e mastite clínica por meio do ELISA competitivo indireto, verificando que a secreção da caseína está diretamente relacionada ao grau de infecção da glândula mamária.

A cultura microbiológica do leite é a ferramenta padrão para o diagnóstico e identificação do agente etiológico da mastite, e utiliza critérios estabelecidos pelo *National Mastitis Council* (MIDDLETON *et al.*, 2014). Contudo, alternativas que possam identificar o DNA dos micro-organismos no leite têm sido aplicadas, facilitando assim a identificação de amostras não cultiváveis (OULTRAM *et al.*, 2017).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase chain reaction*) é uma técnica que apresenta elevada sensibilidade, sendo adequada e altamente eficiente para o monitoramento da enfermidade no rebanho, assim como sua evolução (SYRING *et al.*, 2012). Ashraf *et al.* (2017) utilizaram PCR para detecção de diferentes patógenos mastíticos, e a técnica pareceu ser suficientemente específica e sensível para o diagnóstico da doença. Contudo, devido à alta sensibilidade do método, ele pode detectar o DNA de micro-organismos que não estejam mais viáveis, e assim, revelar resultados falsos positivos (KOSKINEN *et al.*, 2010).

Rainard *et al.* (2018), por meio da PCR em tempo real, demonstraram alguns fatores explicativos para a evolução da infecção por *S. aureus* em direção à forma gangrenosa, sendo a concentração de bactérias no leite uma condição determinante. No entanto, o custo do

equipamento e a velocidade de execução mostram-se fatores limitantes ao uso do método (AGRIMONTI *et al.*, 2019).

2.2.3 Ferramentas de controle e tratamento

No intuito de reduzir os casos de mastite em rebanhos leiteiros, a higiene representa um fator crucial, e a utilização do *pré* e *pós-dipping* mostra-se uma estratégia eficaz na prevenção de novas infecções na glândula mamária por diferentes patógenos (MAHLANGU; MAINA; KAGIRA, 2018). A desinfecção do teto após a ordenha tem sido aplicada em pequenos ruminantes, especialmente, em rebanhos com alta incidência da infecção (BERGONIER; BERTHELOT, 2003; CONTRERAS *et al.*, 2003).

Outra opção que pode ser útil e viável economicamente é o uso de vacinas, tendo em vista a redução de custos e por apresentar efeitos positivos sobre a qualidade do leite e a saúde pública, uma vez que minimiza a necessidade do uso de antimicrobianos. Em contrapartida, os diferentes relatos sobre a efetividade dessas vacinas para vacas leiteiras e ovelhas, bem como sua inabilidade na prevenção de novas infecções, sugere que sejam usadas em rebanhos leiteiros com alta prevalência de *S. aureus* na tentativa de reduzir os sinais clínicos (CONTRERAS *et al.*, 2007). Apesar da evidência da efetividade dos programas de vacinação contra mastite causada por *S. aureus* para ovelhas, para cabras não é possível visualizar tal eficiência sendo isto considerado como um fator limitante (TOLLERSRUD *et al.*, 2002). De forma geral, mais pesquisas sobre imunização são necessárias para melhorar essa estratégia, visto que estudos com vacinação não têm apresentado resultados suficientes para utilização dessa ferramenta como única forma de controle da mastite (CONTRERAS *et al.*, 2007; KAUTZ; NICKERSON; ELY, 2014).

O uso de antimicrobianos tem sido a ferramenta mais comumente utilizada para o controle e tratamento da mastite caprina, entre os quais: aminoglicosídeos, β – lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), tetraciclina e fluoroquinolonas. Contudo, além do alto custo, o emprego abusivo desses fármacos tem permitido a seleção de bactérias multirresistentes (KOOP *et al.*, 2016; MAHLANGU; MAINA; KAGIRA, 2018). Os resíduos de antibióticos no leite e seus derivados representam uma grave problemática para a saúde pública, apresentando-se como um fator limitante para o crescimento da indústria de laticínios, e isso tem estimulado pesquisas referentes as alternativas de novos tratamentos com menores riscos à saúde humana, como a utilização de extratos de plantas medicinais (MOREIRA *et al.*, 2014).

Além disso, alguns agentes etiológicos da mastite, como *S. aureus*, são capazes de permanecer ativos intracelularmente, o que diminui a ação do antimicrobiano, que pode apresentar uma taxa de sucesso variando entre 10-30% (SANTANA *et al.*, 2016).

2.3 *Staphylococcus* spp.

2.3.1 Características gerais: aspectos microbiológicos e bioquímicos

Staphylococcus spp. é classificado como coco gram-positivo de aproximadamente 0,5-1 µm de tamanho, com crescimento em condições aeróbicas e anaeróbicas (CHUKWUNONSO *et al.*, 2018). Esses micro-organismos crescem bem em meio ágar sangue como colônias brancas e pequenas. Além disso, são halo-tolerantes, ou seja, crescem bem em meio salino (7,5% de NaCl). Os principais testes bioquímicos para identificação incluem catalase, coagulase e desoxirribonuclease (FOSTER, 1996). Cerca de 30 espécies do gênero já foram catalogadas a partir de análises bioquímicas e por hibridização de DNA, a exemplo de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. cohnii*, *S. warneri* e *S. lugdunensis* (PARTE *et al.*, 2021).

De forma geral, são divididos em dois grupos em função da coagulase positiva ou negativa. O teste de coagulase se baseia na capacidade de coagular o plasma, convertendo fibrinogênio em fibrina. Isso é possível devido ao gênero *Staphylococcus* spp. secretar alguns fatores que favorecem o processo, como o Coa (coagulase), Efb (Proteína Extracelular de ligação ao Fibrinogênio) e o Eap (proteína de aderência extracelular) (DOS SANTOS *et al.*, 2016).

2.3.2 Fatores de virulência

Staphylococcus spp. são patógenos que podem causar infecções tanto em humanos como em animais, gerando, portanto, um grande impacto na saúde. Uma característica interessante é que esses micro-organismos são especialistas em adquirir genes de resistência e virulência, o que aumenta seu potencial patogênico (KIVANÇ, 2018; PUMIPUNTU *et al.*, 2019).

Diversos fatores de virulência podem ser expressos por esses patógenos, entre os quais: polissacarídeos de superfície, cápsula, biofilme, bomba de efluxo e toxinas. A ausência da expressão de alguns genes envolvidos nesses fatores de virulência, como a síntese capsular, pode aumentar a adesão e a invasão em células eucariontes pelo micro-organismo, o que sugere que a não expressão da cápsula esteja relacionada com a persistência destas bactérias nas glândulas mamárias, além de predizerem infecções agudas ou crônicas (BARDIAU *et al.*,

2016). A cápsula de polissacarídeo extracelular, nesse caso, é relevante principalmente para a mastite bovina, porque 94 a 100% de cepas de *S. aureus* isoladas de mastite bovina são encapsuladas (BARDIAU *et al.*, 2016).

Staphylococcus spp. possui proteínas de superfície que permitem a fixação nas células ou matriz extracelular do hospedeiro. Isso permite aos micro-organismos formarem uma estrutura que confere proteção à colônia, denominada biofilme. Esse processo ocorre através de mecanismos de aderência, formação de uma matriz de exopolissacarídeo (EPS), desestabilização e consequente disseminação das bactérias (COIMBRA SOUZA *et al.*, 2019). Os estudos sobre esse mecanismo estão voltados para as moléculas sinalizadoras (*Quorum-sensing*), compostos químicos e indicadores físicos, como nutrientes, pH e temperatura que permitem a colonização inicial (FERACO *et al.*, 2016).

De acordo com o Da Silva Trentin; Giordano; Macedo (2013), os biofilmes são responsáveis por, aproximadamente, 80% das infecções bacterianas. Essas estruturas são formadas a partir da adaptação dos micro-organismos a condições de estresse, como nutricional, hídrico, imunológico ou antimicrobiano. Enquanto as células planquitônicas conferem rapidez na proliferação em novos ambientes, as sésseis caracterizam a cronicidade. Conforme a quantidade de bactérias aumenta, ocorre o aumento da transcrição de genes que estão envolvidos na motilidade, produção de EPS e formação de biofilme.

Em espécies estafilocócicas, a formação de biofilme deve-se a fatores como o lócus de adesão intracelular (*icaABCD*), que codifica as proteínas responsáveis pela síntese de poli-N-acetil-glucosamina (PNAG), além da proteína *Bap* associada ao biofilme e a proteína associada à acumulação *Aap* (TREMBLAY *et al.*, 2013).

Outro importante mecanismo abrange proteínas de membrana que estão relacionadas à extrusão de compostos, como antibióticos, as chamadas bombas de efluxo. Os genes envolvidos na expressão dessas estruturas estão em cromossomo bacteriano e plasmídeos (ZIMMERMANN *et al.*, 2017). Cinco superfamílias estão associadas com o MDR (*Multi-Drug Resistance*), que utilizam energia de transporte ativo secundário a partir de uma bomba de sódio/potássio sendo elas: MFS (*Major Facilitator Superfamily*), SMR (*Small Multidrug Resistance*), MATE (*Multidrug and Toxic Compound Extrusion*), RND (*Resistance-Nodulation-Cell Division*) e ABC (*Adenosine-Triphosphate (ATP)-Binding Cassette*).

O sistema de efluxo multidrogas é um fenômeno relatado de forma crescente e está relacionado aos mecanismos de resistência. Muitos desses sistemas são capazes de extrusar várias classes antimicrobianas, promovendo fenótipos de resistência a múltiplos fármacos (COSTA *et al.*, 2013). Em *S. aureus* foram identificados, aproximadamente, 21 sistemas de

efluxo multidrogas, codificados no cromossomo ou em plasmídeos (JANG, 2016). A família MFS tem sido amplamente estudada entre os sistemas de efluxo de multidrogas estafilocócicas, que inclui cinco sistemas de efluxo, *norA*, *norB* e *norC* responsáveis pela exportação de fluorquinolonas (ZIMMERMANN *et al.*, 2017; ALAV; SUTTON; RAHMAN, 2018) e *lmrS* e *tet38* descritos como os principais mecanismos de resistência para lincomicina e tetraciclina, respectivamente (KAATZ; SEO, 1997; KAATZ; MCALEESE; SEO, 2005; FLOYD *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2013).

Outro mecanismo de virulência é a produção de toxinas intrínsecas ou extrínsecas ao micro-organismo que geram danos às células do hospedeiro, alteram a resposta imune inata e adaptativa, contribuindo para a sobrevivência da bactéria. As toxinas podem ser divididas em três grupos: formadoras de poros (PFTs), como a α e β -hemolisina e leucotoxinas; esfoliativas (ETs) e superantígenos (SAGs) (OLIVEIRA; BORGES; SIMÕES, 2018). As toxinas pertencentes ao grupo superantígenos incluem as enterotoxinas estafilocócicas (OLIVEIRA; BORGES; SIMÕES, 2018). Estudos em rebanhos leiteiros mostram que vacas com mastite causada por *Staphylococcus* spp. são considerados reservatórios de enterotoxinas que podem causar riscos à saúde humana (CONTRERAS *et al.*, 2007; PODKOWIK *et al.*, 2013). De forma semelhante, Salaberry *et al.* (2015) evidenciaram que todos os genes que codificam enterotoxinas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*) foram detectados em SCP e SCN isolados de mastite caprina.

2.4 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

A resistência antimicrobiana é considerada um problema global. É definida como a capacidade que o micro-organismo possui de sobrevivência na presença de altas concentrações de antibióticos, sendo mediada por diversos mecanismos moleculares (MCKEEGAN; BORGES-WALMSLEY; WALMSLEY, 2002). Trata-se de um fenômeno natural, ou seja, por meio da seleção natural de cepas que já são resistentes em uma população sensível (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

A resistência aos antimicrobianos envolve desde alteração do sítio alvo do fármaco, inativação enzimática, bomba de efluxo ou, até mesmo, captura do agente antimicrobiano (VON WINTERSDORFF *et al.*, 2016). Diante disso, a grande perspectiva no tratamento de infecções é a seleção de agentes terapêuticos adequados, a fim de evitar a transferência de genes que possam conferir resistência. Acredita-se que SCN é um reservatório dos genes a serem transferidos entre os micro-organismos. Isso tem se tornado um fator limitante para o

desenvolvimento de novos antibióticos, aumentando o impacto da resistência e os custos na saúde (BITRUS *et al.*, 2018).

S. aureus é considerado um micro-organismo dinâmico e versátil, pois possui uma grande capacidade de adaptação a condições desfavoráveis a sua sobrevivência. A primeira notificação de resistência se deu por volta de 1940, quando descobriram que algumas cepas de *S. aureus* produziam uma hidrolase chamada de penicilinase (BASSET *et al.*, 2011). No início, as infecções eram tratadas com penicilina, todavia, a bactéria começou a apresentar mecanismos de resistência a esse fármaco. A criação da meticilina, uma penicilina semissintética resistente às penicilinas, conseguiu amenizar os casos de infecções com *S. aureus* resistentes à penicilina, mas logo cepas resistentes a meticilina foram selecionadas, hoje conhecidas como *S. aureus* meticilina resistente (MRSA, do inglês *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) (CHUKWUNONSO *et al.*, 2018). O gene *mecA* é o responsável pela resistência desses micro-organismos, o qual expressa uma proteína que confere ação pela produção de uma proteína de ligação à penicilina (PBP2A) frente à presença do antibiótico em questão (MOON *et al.*, 2007). A aquisição deste perfil está associada a elementos transmissíveis (*staphylococcal cassette cromossomo mec* – SCCmec) (CHUKWUNONSO *et al.*, 2018).

Alguns trabalhos investigaram que o uso de cefalosporinas, penicilinas e combinações têm aumentado a probabilidade de encontrar cepas resistentes, bem como a patogenicidade nesses micro-organismos. Em consonância, a formação do biofilme contribuiu para o aumento da resistência aos antibióticos, por meio da função protetora que essa estrutura oferece contra concentrações bactericidas de drogas ou outros agentes antibacterianos. Isso gera um grande impacto na terapia antimicrobiana, prejudicando o quadro clínico. No entanto, pode-se considerar a administração de múltiplas drogas como estratégia para tratamento, todavia, a dose deve ser cuidadosamente ajustada para evitar novos casos de resistência (TREMBLAY *et al.*, 2014).

Nesse contexto, ao avaliar o perfil de resistência antimicrobiana em diferentes isolados causadores de mastite em espécies distintas, Ceniti *et al.* (2017) revelaram uma ampla difusão da resistência a antibióticos para a maioria dos antimicrobianos testados. O estudo mostrou que os isolados de estreptococos apresentaram alta resistência à tetraciclina e clindamicina, enquanto os estafilococos se mostraram resistentes a sulfisoxazol. De forma geral, 25% dos isolados de bovinos e 17% dos isolados de ovinos foram multirresistentes. Além disso, foi igualmente relatada a múltipla resistência em *S. aureus* (resistentes à penicilina G, tetraciclina

e norfloxacin) e em outras espécies gram-negativas obtidas a partir de leite de cabra com mastite subclínica (MAHLANGU; MAINA; KAGIRA, 2018).

2.5 TOLERÂNCIA E PERSISTÊNCIA

A resistência bacteriana a antibióticos, sem dúvida, representa um dos mais importantes desafios que a saúde pública enfrentará nas próximas décadas (GOLLAN *et al.*, 2019). Além disso, estudo desenvolvido por Wang *et al.* (2020) já demonstra que compostos não antibióticos, a exemplo de anti-inflamatórios não esteróides, ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco, são capazes de promover o aumento na transmissão de genes exógenos de resistência aos antimicrobianos por meio da transformação bacteriana. Nessa perspectiva, deve-se dar mais atenção a estudos com compostos farmacêuticos não antibióticos e seus efeitos tanto na seleção de cepas bacterianas tolerantes quanto resistentes, posto que Windels *et al.*, (2019) relacionam a persistência como caminho evolutivo para a resistência bacteriana.

Embora a tolerância e persistência tenha pouco destaque na prática clínica em relação a resistência, desde 1942 (HOBBY; MEYER; CHAFFEE, 1942) foi possível observar que as infecções por estreptococos se repetiam mesmo após tratamentos extensos com altas doses de penicilina, devido à sobrevivência de uma fração da população bacteriana. Dois anos depois, Bigger (1944) observou que as bactérias eram capazes de sobreviver a extensos tratamentos com antibióticos, sem necessariamente adquirir mutações de resistência.

Somente nos anos 80, houve avanços nas pesquisas relativas aos mecanismos de persistência a antibióticos, quando Moyed e Bertrand (1983) realizaram uma triagem genética selecionando mutantes com o nível elevado de sobrevivência à ampicilina, que exibiam um fenótipo altamente persistente (hip), com duas mutações encontradas em um gene que nomearam de *hipA*. Desde então, esse gene é referência em estudos sobre persistência. Anos depois, Balaban *et al.* (2004) desenvolveram o derivado do *hipA*, o alelo *hipA7*, que pela primeira vez foi capaz de interromper o crescimento de células persistentes.

Dentro dessa perspectiva, surgem os fenômenos classificados como tolerância e persistência, eventos que evidenciam a plasticidade dos micro-organismos em driblar o sistema imunológico e a ação de medicamentos, tornando-os protagonistas em infecções recorrentes, através de fatores de virulência como biofilme, sistema de efluxos, etc (BRAUNER *et al.*, 2016; FISHER; GOLLAN; HELAINE, 2017; GOLLAN *et al.*, 2019). Várias são as espécies bacterianas que desenvolvem esses mecanismos de sobrevivência, dentre elas: *E. coli* (WANG; MEOUCHE; DUNLOP, 2017), *Acinetobacter baumannii*

(BARTH JR. *et al.*, 2013), *Pseudomonas aeruginosa* (MULCAHY *et al.*, 2010; NARTEN *et al.*, 2012), *Mycobacterium tuberculosis* (NANDAKUMAR; NATHAN; RHEE, 2014), *S. aureus* (SIERADZKI; TOMASZ, 2006; HAABER *et al.*, 2015), *Streptococcus pneumoniae* (NOVAK *et al.*, 1999; NORMARK; NORMARK, 2002) e *Burkholderia cepacia* (CABRAL; WURSTER; BELENKY, 2018).

A tolerância refere-se à capacidade de uma população bacteriana inteira de sobreviver à exposição transitória a antibióticos bactericidas, sem alteração da concentração inibitória mínima (CIM) (HANDWERGER; TOMASZ, 1985). Este fenômeno, geralmente, é alcançado quando as bactérias alteram seu metabolismo, entrando no estado de dormência, ou seja, redução da atividade celular mensurável até a interrupção do crescimento (BALABAN *et al.*, 2004; AMATO; ORMAN; BRYNILDSEN, 2013; GOLLAN *et al.*, 2019). A tolerância pode ser adquirida por meio de mutações genéticas ou por condições ambientais (MC DERMOTT, 1958).

Já a persistência é observada quando a maioria da população bacteriana é rapidamente morta, enquanto uma subpopulação persiste por um período muito maior, apesar da população ser clonal (BRAUNER *et al.*, 2016). Diferentemente da tolerância, a persistência não é herdável. Quando células persistentes são isoladas, renovadas e reexpostas ao mesmo tratamento com antibióticos, a mesma resposta heterogênea à droga será obtida como observada na população original, com a divisão da população em subpopulações persistentes e não persistentes (BIGGER, 1944).

Essa capacidade de persistir está diretamente associada à cessação da atividade celular (dormência), ausência de crescimento ou alteração na densidade populacional na presença de drogas, e à capacidade de as células modificarem rapidamente para crescimento do tipo selvagem, quando a pressão do antimicrobiano é eliminada e os nutrientes são administrados (BALABAN *et al.*, 2004; KIM; WOOD, 2017). Acredita-se que o fenótipo persistente possa ser uma primeira linha importante de defesa contra antibióticos, antes que a resistência seja adquirida (FISHER; GOLLAN; HELAINE, 2017).

No intuito de diferenciar esses fenótipos, Brauner *et al.* (2016) propuseram uma métrica padronizada e mensurável que se apoia na CIM e na duração mínima de morte (MDK, do inglês *minimum duration for killing*) para caracterização *in vitro* da sensibilidade aos antibióticos.

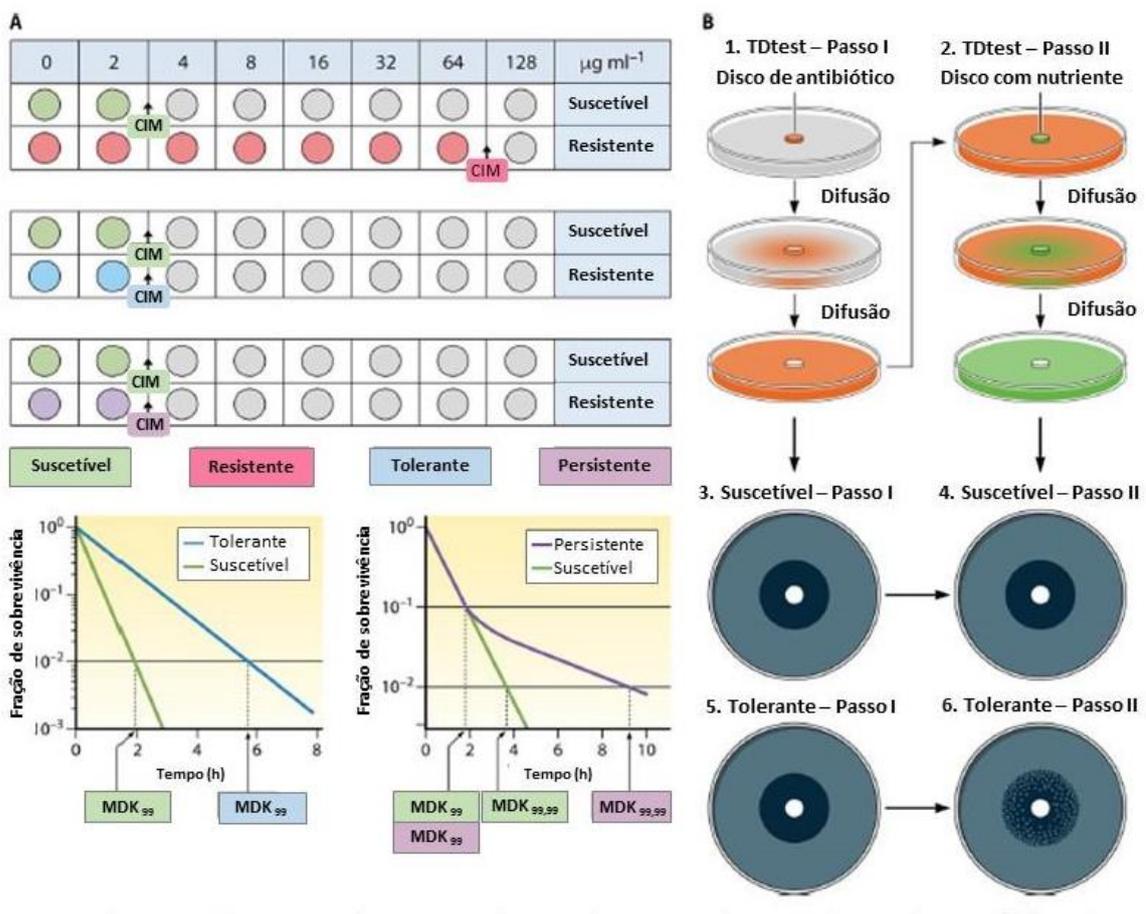
A CIM é o teste padrão para identificação de resistência (SCHOLAR; PRATT, 2000) e de forma isolada não pode caracterizar tolerância e persistência, uma vez que, em ambas o comportamento é igual a cepas sensíveis (BRAUNER *et al.*, 2016). Já a MDK é uma medida

quantitativa de tolerância que pode ser obtida a partir das curvas de morte, baseando-se na noção de que uma cepa bacteriana tolerante requer mais tempo de exposição para ser efetivamente morta do que uma cepa suscetível. Seu conceito é definido como a duração típica do tratamento antibiótico necessário para matar uma determinada proporção da população bacteriana (FRIDMAN *et al.*, 2014), em concentrações que ultrapassam substancialmente a CIM, isto é, quando a taxa de morte celular independe da concentração do antibiótico. Dessa forma, foi preconizado que um MDK 99 (tempo para matar 99% das células da cultura) é geralmente mais alto para isolados tolerantes do que para isolados suscetíveis. Por outro lado, a CIM e MDK 99 para células persistentes em populações bacterianas também são semelhantes aos observados para bactérias suscetíveis. Já o MDK 99,99 (tempo para matar 99,99% das células da cultura) é consideravelmente mais alto para células persistentes do que para células suscetíveis (BRAUNER *et al.*, 2016) (**Figura 1**).

Existem dois tipos principais de tolerância denominadas: tolerância de crescimento lento e tolerância por atraso. Em ambas as formas, a MDK é aumentada quando comparado com as células bacterianas sensíveis e diferem pelo fato da tolerância de crescimento lento acontecer em fase estacionária, enquanto a tolerância por atraso é um estado transitório induzido pela restrição e falta de nutrientes ou estresse (BRAUNER *et al.*, 2016).

Há muito tempo, estudos mostraram que condições que diminuem a taxa de crescimento aumentam a tolerância a diversos antibióticos (JOHANSEN *et al.*, 2000; MASCIIO; ALDER; SILVERMAN, 2007; DE STEENWINKEL *et al.*, 2010), em virtude de os mecanismos de ação dessas drogas dependerem diretamente do crescimento ativo das células. Nesse sentido, um caso especial de tolerância por crescimento lento é a tolerância induzida por drogas, que ocorre quando as células bacterianas respondem à exposição a antibióticos, diminuindo ou interrompendo seu crescimento. Esse efeito foi observado em várias bactérias gram-negativas e gram-positivas quando expostas a antibióticos, incluindo um antibiótico que inibe a síntese da parede celular (HANDWERGER; TOMASZ, 1985), em que a parada do crescimento foi mediada pela indução defeituosa das autolisinas (HANDWERGER; TOMASZ, 1985; DÖRR; DAVIS; WALDOR, 2015) e a ciprofloxacina (fluoroquinolona), pela qual a suspensão do crescimento foi mediada pela indução de uma resposta ao estresse (DÖRR; VULIĆ; LEWIS, 2010).

Figura 1 - Caracterização fenotípica de tolerância e persistência. (A) Fenótipos característicos de resistência, tolerância e persistência em resposta à droga. O valor da CIM é empregado para verificar populações bacterianas suscetíveis e resistentes a antibióticos, enquanto a MDK é uma medida quantitativa adequada para o estudo de células bacterianas tolerantes e persistentes. Entre as células bacterianas suscetíveis, a MDK 99 (para matar 99% das células de cultura) é maior para células bacterianas tolerantes, enquanto a MDK 99,99 (tempo para matar 99,99% das células de cultura) é maior para células bacterianas persistentes. (B) Análise da tolerância e persistência bacteriana em cepas clínicas pelo uso de um teste de difusão em disco modificado (TDtest). (1) Disco com droga é adicionado ao ágar em placa. (2) O disco com infusão de drogas é substituído por um disco com infusão de glicose. A droga difunde no disco. (3 e 4) Bactérias suscetíveis mostram inibição do crescimento ao redor do disco embebido com drogas e glicose. (5 e 6) Bactérias tolerantes mostram inibição do crescimento em torno do disco embebido com fármaco (5), e colônias dentro da zona de inibição após a adição de glicose mostram bactérias de crescimento tardio deste isolado (6).



Fonte: Adaptado de BRAUNER *et al.* (2016) e GEFEN *et al.* (2017).

Assim como a tolerância, a persistência também se divide em persistência dependente do tempo e persistência dependente de dose. Persistência dependente do tempo é caracterizada pela presença de uma subpopulação de bactérias, que normalmente tem um tempo de atraso mais longo ou taxa de crescimento mais lenta do que a maioria da população (BALABAN *et al.*, 2004). As características atribuídas a uma população bacteriana tolerante também podem ser aplicadas a uma subpopulação com persistência dependente do tempo, diferindo apenas

pelo fato de que parte da população bacteriana é responsável pela morte mais lenta observada na persistência (BRAUNER *et al.*, 2016).

Embora, a maioria dos estudos de persistência esteja relacionada à persistência dependente do tempo, também foram relatadas subpopulações de persistentes que, em vez disso, apresentam uma diminuição transitória na sensibilidade aos antibióticos, chamada de persistência dependente de dose. Isso pode ocorrer quando fatores de resistência, como uma bomba de efluxo (ADAMS *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2012), catalase-peroxidase (*katG*) (WAKAMOTO *et al.*, 2013), ou *operon* de resistência múltipla a antibióticos (*marRAB*) (EL MEOUCHE; SIU; DUNLOP, 2016) são superexpressados transitoriamente em uma subpopulação de células bacterianas (EL MEOUCHE; SIU; DUNLOP, 2016; ADAMS *et al.*, 2011). Dessa forma, a diferença entre resistência e persistência dependente da dose está na superexpressão do fator de resistência a ser herdado transitoriamente (BRAUNER *et al.*, 2016). Vale ressaltar, que a persistência dependente da dose, quando herdada por um número suficiente de gerações para as colônias se tornarem visíveis em placas tratadas com antibióticos, é associada a heterorresistência (KAYSER; BENNER; HOEPRICH, 1970; HARTMAN; TOMASZ, 1986).

De fato, a característica definidora da persistência dependente da dose é que doses mais altas do antibiótico diminuem a sobrevivência mais efetivamente do que uma maior duração da exposição, em contraste com a maior duração do tratamento necessária para diminuir a sobrevivência em populações com persistência dependente do tempo, como aquelas com uma subpopulação de persistentes adormecidos. Além disso, tal como a resistência, a persistência dependente da dose geralmente aumenta a sobrevivência para uma classe específica de antibiótico e no mais, geralmente é independente da taxa de crescimento celular (BRAUNER *et al.*, 2016). Por outro lado, a persistência dependente do tempo fornece uma proteção mais geral contra várias classes de antibióticos que visam mecanismos associados ao crescimento celular, como β -lactâmicos e quinolonas (WOLFSON *et al.*, 1990; LEWIS, 2007).

2.5.1 Principais eventos que promovem a persistência

2.5.1.1 Sistema toxina – antitoxina e outros tipos de toxinas

O sistema toxina-antitoxina (TA) é um dos mecanismos mais estudados no que se refere à formação de células persistentes. O sistema TA é descrito como pequenos sistemas genéticos que codificam uma proteína de toxina que afeta o crescimento bacteriano e uma antitoxina (RNA, tipo I; ou proteína, tipo II), que neutraliza a toxina em condições favoráveis

de crescimento (HALL; GOLLAN; HELAINE, 2017). Esse sistema é ligado à manutenção do plasmídeo e à resistência a fagos (HARMS *et al.*, 2018), e ocorre em resposta ao estresse ocasionando uma parada reversível de crescimento bacteriano, fato que os classificam como indutores ideais de persistência. Mesmo assim, o papel do sistema TA ainda é uma questão muito discutida (GOLLAN *et al.*, 2019).

A primeira relação entre o módulo TA e a persistência foi estabelecida quando Moyed e Bertrand (1983) identificaram uma mutação de alta persistência no *HipAB* em isolados de *E. coli*. Acredita-se que as mutações selecionadas no mutante *hipA7*, produzido anos depois (BALABAN *et al.*, 2004), induzam a persistência por superexpressão e neutralização imperfeita da toxina (SCHUMACHER *et al.*, 2015), reforçando a hipótese de que a superexpressão de outros genes de toxinas nos módulos TA também favorece altos níveis de persistência (RONNEAU; HELAINE, 2019), o que torna o processo mais complexo.

Apesar de inúmeros estudos relatarem a persistência em mutantes com alteração no sistema TA, tanto em bactérias gram-positivas como em gram-negativas (CONLON *et al.*, 2016; HARMS *et al.*, 2017; SHAN *et al.*, 2017; GOORMAGHTIGH *et al.*, 2018), não quer dizer que o módulo TA seja responsável em absoluto pela formação da persistência, uma vez que faltam evidências que corroborem o envolvimento do sistema TA tanto na regulação fisiológica bacteriana quanto na formação de persistência (FRAIKIN; GOORMAGHTIGH, VAN MELDEREN, 2020), pois Pontes e Groisman (2019) demonstraram que *Salmonella* spp. exibiu o fenótipo de persistência mesmo com ausência de módulos toxina-antitoxina. Vale ressaltar, que esse sistema é acionado em resposta ao estresse e sua ativação ou regulação ocorre, em condições específicas (fome, baixo pH e interação com o hospedeiro), para desencadear a persistência (RONNEAU; HELAINE, 2019).

Relatos mostraram que toxinas de outra natureza têm participação efetiva na formação de células persistentes. Ghosh *et al.* (2018) revelaram que as toxinas *CdiA*, da inibição do crescimento dependente de contato (ICD), afetaram a frequência de persistência em *E. coli*. O modo de ação da ICD é via competição interbacteriana, na qual as bactérias paralisam o crescimento das células vizinhas, por meio da liberação de uma toxina por contato direto (WILLETT *et al.*, 2015).

Como a alta densidade populacional permite a ocorrência da ICD, as células que não apresentavam níveis suficientes da antitoxina *CdiI* para neutralizar a toxina *CdiA*, recebida em contato com outras bactérias, apresentavam níveis mais altos de (p) ppGpp. Esse aumento do (p) ppGpp aliado à intoxicação adicional resultaram na formação de células persistentes (GHOSH *et al.*, 2018). A persistência baseada em *quorum sensing* e ICD podem ser uma

estratégia eficaz, permitindo que certas células em altas densidades celulares tornem-se persistentes, sobrevivendo a qualquer início repentino de um fator de estresse (GOLLAN *et al.*, 2019).

2.5.1.2 Bombas de efluxo

As bombas de efluxo desempenham papel fundamental para eliminar elementos tóxicos ou para manter o equilíbrio de compostos vitais à sobrevivência bacteriana (BLANCO *et al.*, 2016). Estudos evidenciaram que o aumento da expressão de sistemas de efluxo é vital para a manutenção da baixa concentração de antibióticos intracelulares e especificamente no estado de persistência, em células de *E. coli* na fase estacionária (PU *et al.*, 2016; DU TOIT, 2017).

Foi relatado que em bactérias como *S. aureus*, a expressão das bombas de efluxo *Qac* tem sido associada a maior tolerância a biocidas (SMITH; GEMMELL; HUNTER, 2008). Nesse sentido, Johnson; Levin (2013) apontaram que o pré-tratamento com concentrações sub-inibitórias de vários antibióticos aumentou significativamente os níveis de persistentes, evidenciando a relação dos mecanismos de efluxo com o fenômeno da persistência.

Frimodt-Møller e Løbner-Olesen (2019) mostraram que a alta expressão do sistema de efluxo *AcrAB-TolC*, além de aumentar a tolerância a antibióticos, reduz o reparo da incompatibilidade de DNA em *E. coli* promovendo mutações espontâneas. Essas mutações são um caminho ascendente à resistência de alto nível e destaca como as células transitoriamente tolerantes podem desenvolver resistência em resposta ao tratamento com antibióticos.

2.5.1.3 Sinalização extracelular

Outro importante mecanismo que contribui para a persistência é o *quorum sensing* (QS), definido como uma rede de comunicação bacteriana que permite às células modificarem seu comportamento coletivo por meio de moléculas sinalizadoras, de acordo com as mudanças no ambiente (HARMS; MAISONNEUVE; GERDES, 2016; PAPENFORT; BASSLER, 2016; ALI *et al.*, 2017). Esse sistema influencia comunidades bacterianas e caracteriza-se pela expressão de genes que regulam a virulência, produção de toxinas, motilidade, quimiotaxia, produção de biofilme e a competição bacteriana, que podem contribuir para a adaptação e colonização (GOLZ *et al.*, 2012).

Ensaio *in vivo* mostraram a participação direta do sistema QS em *S. aureus* (*SarA* e *Agr*) no desenvolvimento de células persistentes em vários tipos de infecções (CASTILLO-JUAREZ *et al.*, 2015). Xu *et al.* (2017) mostraram que o mecanismo *Agr* está associado à formação do fenótipo de persistência em *S. aureus*, assim como, evidenciaram mutações apenas em *agrCA* ou *agrD*, mostrando um aumento na formação de células persistentes em culturas de fase estacionária.

Estudos revisados por Tuchscher, Löffler e Proctor (2020) ao analisarem a persistência bacteriana em variantes de pequenas colônias (SCVs), responsáveis por prolongar a sobrevivência de *S. aureus* quando são expostos aos antimicrobianos, demonstraram que existem múltiplas vias metabólicas que são encarregadas pelo fenótipo de persistência, dentre elas, a via que regula negativamente o regulador de gene acessório *Agr* (*agr*) porque aumenta a expressão de genes de adesinas e biofilme. Concomitantemente, passado o período de ação do antibiótico, mutações que resultam na superregulação do operon *srrAB* restauram o rápido crescimento desse micro-organismo como tipo selvagem, exibindo várias características SCVs. E a via que altera o potencial de membrana dos micro-organismos através de mutações que reduzam a expressão da proteína *ClpC* que afeta a atividade do ciclo de Krebs, o que consequentemente acarreta a diminuição do transporte de elétrons entre as membranas celulares. Outros estudos observaram uma conexão entre a modulação da AI-2 e diferentes fenótipos que exibem formação de cápsulas, produção de biofilme, resistência a antibióticos e virulência em *S. aureus* (ZHAO *et al.*, 2010; XUE; ZHAO; SUN, 2013).

Esses achados corroboram com experimentos de laboratório e em modelos de animais infectados com *S. aureus*, nos quais o *luxS* controlava a formação de biofilme através da regulação do locus *icaR*. Esse regulador, por sua vez, é um repressor do operon *ica*, fundamental para a formação de biofilme (YU *et al.*, 2012). Contudo, a função do *luxS* em regular o QS em *Staphylococcus* spp. permanece controverso (TRASTOY *et al.*, 2018). Esse tipo de sinalização parece ocorrer tanto intraespécies como interespécies, contribuindo assim, para a formação de persistência (GOLLAN *et al.*, 2019).

2.5.1.4 Resposta ao estresse pela falta de nutrientes

As bactérias desenvolvem uma gama de respostas que lhes permitem sobreviver às condições de estresse (HARMS; MAISONNEUVE; GERDES, 2016). Nesse sentido, o sistema SOS, desencadeado por danos no DNA, pode ser considerado um importante mecanismo de sobrevivência bacteriana sob condições de estresse (HARMS;

MAISONNEUVE; GERDES, 2016; VAN DEN BERGH; FAUVART; MICHIELS, 2017), envolvendo respostas gênicas que não apenas afetam os processos celulares, como recombinação e reparo de DNA, mas também afetam a patogênese, a resistência antimicrobiana e a produção de biofilme (IRAZOKI *et al.*, 2016).

Quando o sistema SOS é acionado, uma proteína chamada *RecA* ativa a atividade proteolítica do repressor *LexA*, levando a rearranjos transcricionais globais na célula. A remoção de qualquer um desses reguladores principais resulta em uma perda substancial de células persistentes (DÖRR; LEWIS; VULIĆ, 2009; VÖLZING; BRYNILDSEN, 2015). Porém, outras proteínas podem estar envolvidas (TRASTOY, *et al.*, 2018).

Outra resposta que ocorre em função da pressão ambiental, desta vez, mediada pela falta de aminoácidos, é a produção das enzimas tetrafosfato de guanósina (ppGpp) e pentafosfato de guanósina (pppGpp) (HAURYLIUK *et al.*, 2015). A propósito, foi descrito que bactérias deficientes na produção de (p) ppGpp, geralmente, apresentam defeitos significativos na formação e sobrevivência de células persistentes (HARMS; MAISONNEUVE; GERDES, 2016).

As infecções causadas por *S. aureus*, com fenótipo de persistência, são reações em resposta à restrição de nutrientes que dependem diretamente do mecanismo (p) ppGpp, assim como foi descrita a relação direta da sinalização de (p) ppGpp não só no desenvolvimento de células persistentes, mas também na aquisição de tolerância a antibióticos pelas células (GAO *et al.*, 2010). Da mesma forma, foi observado que *S. aureus* possui GTPases putativas que são capazes de reconhecer o ppGpp e pppGpp com alta afinidade, enfatizando que as bactérias possuem um mecanismo pelo qual o crescimento celular pode ser interrompido sob condições de estresse pela ativação de (p) ppGpp, bloqueando a formação correta dos ribossomos 70S (CORRIGAN *et al.*, 2016).

De maneira geral, muitos estresses abióticos levam ao aumento da formação da persistência, o que é bem apoiado por numerosos estudos revelando que as principais respostas bacterianas ao estresse são os desencadeadores cruciais desse fenótipo (GOLLAN *et al.*, 2019).

2.5.2 Estratégias antipersistência

Mecanismos para eliminar a persistência estão relacionados entre outros com a bicamada ou proteínas integrais da membrana bacteriana. A propósito, Hu e Coates (2012) comprovaram que a fluoroquinolona HT61 é um composto que destrói especificamente a

parede celular de *S. aureus*, aumentando a atividade de diversos antibióticos e permitindo a morte de células persistentes e não-persistentes. Da mesma maneira, a lise celular por meio de lisinas derivadas de fagos, bem como através da degradação do peptidoglicano de células em crescimento são abordagens utilizadas em combate as células persistentes (GUTIÉRREZ *et al.*, 2014; SCHUCH *et al.*, 2014).

Peptídeos antimicrobianos também exercem a função de combater células persistentes, afetando a membrana bacteriana e aumentando a atividade antibiótica (BAHAR *et al.*, 2015). Um exemplo claro, é ADEP4, um acildepsipeptídeo, que demonstrou ativar a protease *ClpP* em *S. aureus*, causando atividade inespecífica de protease e eliminando células persistentes em condições planctônicas e de biofilme (CONLON *et al.*, 2013). Foi demonstrado que medicamentos anticâncer (mitomicina C) também desempenham o papel antipersistência, no entanto, muitos são inespecíficos e tóxicos para o organismo o que inviabiliza sua utilização. Assim, um estudo recente avaliou a capacidade antipersistente de um glicopolímero (poliglicosamina) com resultados satisfatórios promissores, no que diz respeito à eliminação, especificidade a *P. aeruginosa* e sem toxicidade (NARAYANASWAMY *et al.*, 2018).

Ressensibilizar células persistentes à ação antibiótica, por meio da estimulação do influxo de antibióticos, foi outra maneira encontrada para banir estes micro-organismos. Isso pode ser conduzido pela utilização de pequenos metabólitos indutores de forças motivadoras de prótons, que aumentam a captação de aminoglicosídeos e assim sensibilizam células persistentes de diversos micro-organismos. Dado o efeito sinérgico que os antibióticos podem apresentar, tratamentos combinados podem ser eficientes em combater células persistentes (BROCHADO *et al.*, 2018). Outra alternativa que se mostrou promissora é produzir um conjugado anticorpo-antibiótico específico que vise aumentar a eficácia da droga contra bactérias intracelulares e persistentes (MARIATHASAN; TAN, 2017). Nesse sentido, ensaios realizados com bacteremia por *S. aureus* já mostraram resultados positivos (ZHOU *et al.*, 2016).

2.6 OUTROS MECANISMOS DE SOBREVIVÊNCIA BACTERIANA

Outro fenômeno que também pode ser observado e que permite a sobrevivência dos micro-organismos, sem a característica genética de resistência, chama-se efeito águia. Eagle *et al.* (1948) descobriu esse fenômeno estudando a atividade bactericida da penicilina através do ensaio de sobrevivência, e definiu esse evento como uma redução paradoxal da morte de micro-organismos por antibióticos, em concentrações superiores à sua concentração

bactericida ideal (CBI). Foi observado que, para algumas cepas de bactérias, à medida que a concentração de antibióticos aumentava acima de uma CBI, mais bactérias paradoxalmente sobreviviam. Ele determinou que a taxa de morte celular, em resposta aos níveis de penicilina superiores a concentração bactericida mínima (CBM) e a atividade bactericida da penicilina, era reduzida em comparação às concentrações mais baixas próximas a CBM (EAGLE *et al.*, 1948; EAGLE; MUSSELMAN, 1948).

O efeito águia está intimamente relacionado à persistência e tolerância bacteriana e foi descrito para diversas bactérias gram-positivas, gram-negativas e micobactérias expostas a diferentes classes de antibióticos, com diversas estruturas químicas, alvos celulares e locais de ação. A exemplo, o efeito águia foi observado com inibidores da síntese da parede celular (β -lactâmicos e glicopeptídeos), síntese de DNA (quinolonas), síntese de RNA (policetídeo de ansamicina) e síntese de proteínas (aminoglicosídeos) e também com agentes que permeabilizam a membrana celular (polimixina) (PRASETYOPUTRI *et al.*, 2019).

Um fator que favorece à ocorrência do efeito águia é a ação das autolisinas, enzimas que hidrolisam os componentes da parede celular e contribuem para a morte bacteriana por β -lactâmicos (TOMASZ; WAKS, 1975; BRAVETTI *et al.*, 2009). Igualmente, as enzimas β -lactamases também foram associadas ao crescimento paradoxal (IKEDA *et al.*, 1988). Premissas apontam que o crescimento paradoxal induzido por quinolonas está relacionado à inibição da síntese proteica, embora, essa classe seja conhecida principalmente por sua ação antimicrobiana através da inibição da síntese de DNA (LUAN *et al.*, 2018).

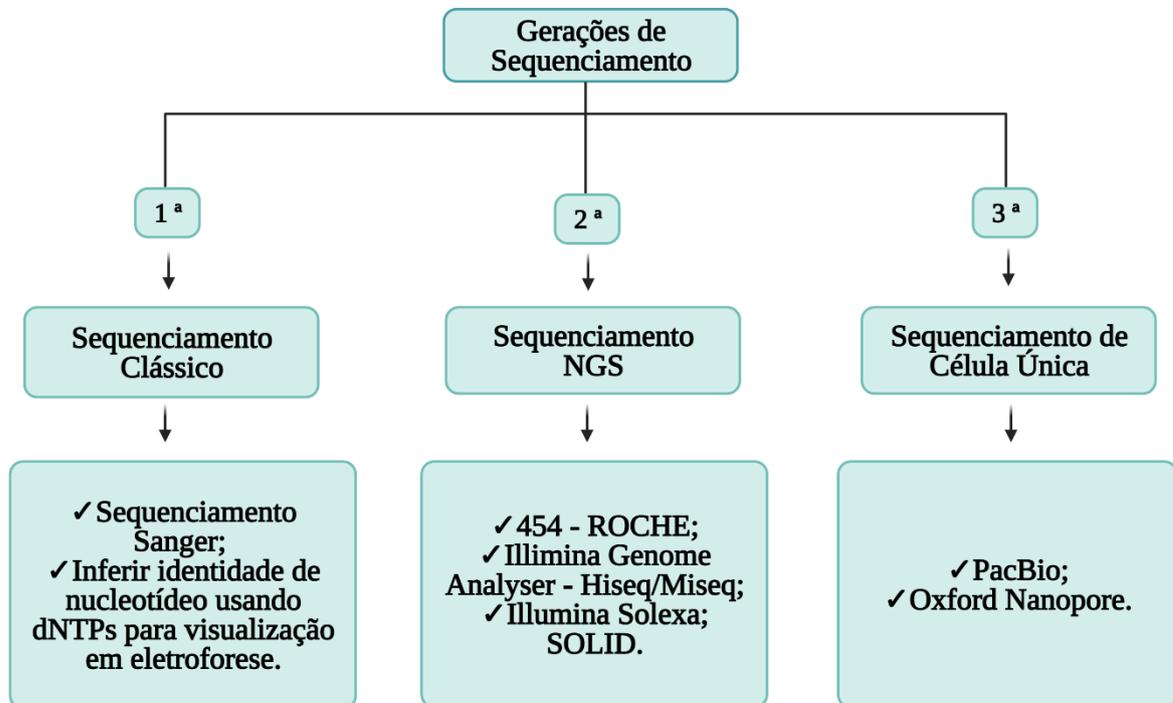
A característica crucial que distingue o efeito águia da persistência é capacidade de sobrevivência de um número maior de células bacterianas, quando expostas a concentrações mais altas de antibióticos do que a CBI. Isto ocorre devido à taxa de morte celular depender da concentração do antibiótico e ser reduzida em concentrações de antibióticos superiores a CBI (PRASETYOPUTRI *et al.*, 2019).

2.7 METODOLOGIAS DE SEQUENCIAMENTO, GENÔMICA COMPARATIVA E FERRAMENTAS DE PREDIÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA

O sequenciamento de genomas, tanto de micro-organismos quanto de animais e plantas, revolucionou os conhecimentos genéticos. Essa tecnologia ocorreu por meio de três grandes revoluções tecnológicas, sendo eles: o sequenciamento de primeira geração (*whole-genome shotgun sequencing*), sequenciamento de segunda geração (*high-throughput*

sequencing or next-generation sequencing (NGS)) e o sequenciamento de terceira geração (*single-molecule long-read sequencing*) (LOMAN; PALLEN, 2015) (**Figura 2**).

Figura 2: Diferentes gerações de sequenciamento de genomas.



Fonte: <https://app.biorender.com>

Nessa perspectiva, o sequenciamento de próxima geração (NGS) é uma tecnologia responsável pelo sequenciamento de 82% dos genomas bacterianos depositados no banco de dados de sequência de referência (RefSeq) do NCBI, com acesso aberto e com anotação e curadoria das sequências de nucleotídeos (RNA ou DNA) e de proteínas disponíveis ao público (PRUITT; TATUSOVA; MAGLOTT, 2007; SEGERMAN, 2020).

Essa tecnologia é responsável pelo rápido sequenciamento do ácido desoxirribonucleico (DNA) e/ou ácido ribonucleico (RNA) e é capaz de gerar milhões de pares de bases em uma única corrida para analisar as variações genéticas (METZKER *et al.*, 2010; BEHJATI; TARPEY, 2013). As principais vantagens dessa tecnologia de segunda geração comparada ao sequenciamento Sanger estão na construção *in vitro* da biblioteca de sequenciamento, amplificação clonal *in vitro* de fragmentos de DNA, sequenciamento baseado em *array* permitindo que fragmentos de DNA sejam multiplexados e a imobilização de DNA em fase sólida (CAO *et al.*, 2017). Atualmente, esse sequenciamento das amostras é feito de forma predominante pela plataforma Illumina solexa, seja de forma única ou

combinada com outras plataformas e técnicas, como Roche/454, ABI/SOLID e sequenciamento Sanger (HODZIC *et al.*, 2017).

Enquanto, para as tecnologias de sequenciamento de terceira geração estão disponíveis comercialmente duas tecnologias de sequenciamento, sendo a tecnologia de sequenciamento SMRT (*single-molecule real-time sequencing*), comercializada pela empresa *Pacific Biosciences* (PacBio) e a plataforma de sequenciamento *Oxford Nanopore Technologies* (VAN DIJK *et al.*, 2018). Essas tecnologias são capazes de sequenciar diretamente uma única molécula de DNA e produzir leituras longas com média entre 5.000 pb a 15.000 pb, com algumas leituras excedendo 100.000 pb. Isso é importante porque as sequências longas contêm mais informação do que as sequências de leituras curtas que são produzidas no sequenciamento de segunda geração (LEE *et al.*, 2016).

Com o uso dessas tecnologias, o genoma dos organismos sequenciados pode ser analisado mais detalhadamente, e assim surgiu a área da genômica comparativa, que compara o alinhamento das sequências de nucleotídeos ou de proteínas de diferentes espécies, com o intuito de identificar e caracterizar regiões conservadas e não conservadas durante o processo evolutivo ao longo do tempo (HARDISON, 2003).

Desse modo, a genômica comparativa é uma ferramenta que pode ser utilizada para compreensão dos fenômenos da tolerância e persistência bacteriana por meio da caracterização e identificação de mutações através de estudos de polimorfismos de nucleotídeo de base única (SNPs), além de realizar predição de genes de resistência e virulência que possivelmente estão envolvidos no processo de infecção (BAI *et al.*, 2019; ROCHA *et al.*, 2019) utilizando ferramentas como ARG-ANNOT (GUPTA *et al.*, 2014), CARD (ALCOCK *et al.*, 2020), SRST2 (INOUYE *et al.*, 2014), MEGARes (LAKIN *et al.*, 2017), Genefinder (KORF, 2004), ARIBA (HUNT *et al.*, 2017), KmerResistance (CLAUSEN *et al.*, 2016), AMRFinder (FELDGARDEN *et al.*, 2019) e ResFinder (ZANKARI *et al.*, 2012).

No que diz respeito ao sequenciamento de genomas de estafilocos depositados no banco de dados *National Center for Biotechnology Information* - NCBI, nota-se um maior número de genomas depositados referente a espécie *S. aureus* quando comparado com *S. warneri* (NCBI, 2021).

Nesse sentido, Karki; Neyaz; Fakhr (2020) demonstraram em um estudo de genômica comparativa de dez cepas de *S. aureus* isolados de carnes, que os genomas da espécie bacteriana estudada apresentavam cromossomos com tamanhos que variavam entre 2,6 e 2,8 milhões de pares de bases, um conteúdo guanosina-citosina entre 32,26 e 33,07 pb, 25

plasmídeos com tamanho de 1,4 a 1,118 kb e o conteúdo G + C que apresentaram variação entre 26,46 a 36,19.

Já um estudo com *S. warneri* publicado por Liu *et al.* (2020) demonstrou que o genoma dessa cepa multirresistente isolada de suíno apresentou como características gerais, um cromossomo circular completo com tamanho de 2.473.911 pares de bases que codifica 2.349 sequências codificadoras de proteínas, 62 genes de tRNA, 19 genes de rRNA e oito plasmídeos com medidas de ANI de aproximadamente de 99,84%. O conteúdo geral de guanina-citosina (GC%) do genoma foi de 32,8%.

Igualmente, Bai *et al.* (2019) isolaram uma cepa de *S. warneri* com o objetivo de entender os mecanismos subjacentes de tolerância bacteriana em ambientes extremos. As análises de genômica comparativa deste estudo demonstraram que o genoma apresentou conteúdo G + C (GC%) de 32,5% e o cromossomo com tamanho de 2.524.548 de pares de bases.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de mastite caprina quanto à tolerância/persistência, fatores de virulência associados e perfil genético.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer a presença de tolerância/persistência em isolados de *Staphylococcus* spp. frente à enrofloxacina;
- Verificar a sensibilidade dos isolados de *Staphylococcus* spp. frente à enrofloxacina;
- Diferenciar a tolerância/persistência em isolados de *Staphylococcus* spp. baseada na duração mínima de morte;
- Determinar se a persistência de *Staphylococcus* spp. a enrofloxacina é dependente de dose ou tempo;
- Verificar a capacidade de produção de biofilme pelos isolados *Staphylococcus* spp.;
- Realizar a busca por genes associados à persistência nos genomas dos isolados de *S. warneri*;

REFERÊNCIAS

- ABDEL-SALAM, Z. *et al.* Monitoring of somatic cells in milk via laser analytical techniques for the early detection of mastitis. **Dairy science & technology**, v. 95, n. 3, p. 331-340, 2015.
- ADAMS, K. N. *et al.* Drug tolerance in replicating mycobacteria mediated by a macrophage-induced efflux mechanism. **Cell**, v. 145, n. 1, p. 39-53, 2011.
- ADDIS, M. F. *et al.* Relationship between milk cathelicidin abundance and microbiologic culture in clinical mastitis. **Journal of dairy science**, v. 100, n. 4, p. 2944-2953, 2017.
- AGRIMONTI, C *et al.* Application of real-time PCR (qPCR) for characterization of microbial populations and type of milk in dairy food products. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 59, n. 3, p. 423-442, 2019.
- ALAV, I.; SUTTON, J. M.; RAHMAN, K. M. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 8, p. 2003-2020, 2018.
- ALCOCK, B. P. *et al.* CARD 2020: antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. **Nucleic acids research**, v. 48, n. D1, p. D517-D525, 2020.
- ALI, L. *et al.* Molecular mechanism of quorum-sensing in *Enterococcus faecalis*: its role in virulence and therapeutic approaches. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 5, p. 960, 2017.
- AMATO, S. M.; ORMAN, M. A.; BRYNILDSEN, M. P. Metabolic control of persister formation in *Escherichia coli*. **Molecular cell**, v. 50, n. 4, p. 475-487, 2013.
- ASHRAF, A. *et al.* A novel multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically significant bacterial pathogens associated with bovine mastitis. **Molecular and cellular probes**, v. 33, p. 57-64, 2017.
- BAHAR, A. A. *et al.* Synthetic dendrimeric peptide active against biofilm and persister cells of *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 19, p. 8125-8135, 2015.
- BAI, P. *et al.* Decreased metabolism and increased tolerance to extreme environments in *Staphylococcus warneri* during long-term spaceflight. **MicrobiologyOpen**, v. 8, n. 12, p. e917, 2019.
- BALABAN, N. Q. *et al.* Bacterial persistence as a phenotypic switch. **Science**, v. 305, n. 5690, p. 1622-1625, 2004.
- BARDIAU, M. *et al.* 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**, v. 185, p. 1-6, 2016.
- BARTH JR, V. C. *et al.* Heterogeneous persister cells formation in *Acinetobacter baumannii*. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e84361, 2013.
- BASSET, P. *et al.* The Evolution and Dynamics of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. In: **Genetics and Evolution of Infectious Disease**. Elsevier, p. 669-688, 2011.

- BEHJATI, S.; TARPEY, P.S. What is next generation sequencing?. **Archives of Disease in Childhood-Education and Practice**, v. 98, n. 6, p. 236-238, 2013.
- BERGONIER, D.; BERTHELOT, X. New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. **Livestock Production Science**, v. 79, n. 1, p. 1-16, 2003.
- BIGGER, J. W *et al.* Treatment of Staphylococcal Infections with Penicillin by Intermittent Sterilisation. **Lancet**, p. 497-500, 1944.
- BITRUS, A. A. *et al.* Staphylococcus aureus: A Review of Antimicrobial Resistance Mechanisms. **Veterinary Sciences: Research and Reviews**, v. 4, n. 2, p. 43-54, 2018.
- BLANCO, P. *et al.* Bacterial multidrug efflux pumps: much more than antibiotic resistance determinants. **Microorganisms**, v. 4, n. 1, p. 14, 2016.
- BOUCHER, H. W. *et al.* Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical infectious diseases**, v. 48, n. 1, p. 1-12, 2009.
- BRAUNER, A. *et al.* Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 320, 2016.
- BRAVETTI, A.-L. *et al.* Contribution of the autolysin AtlA to the bactericidal activity of amoxicillin against Enterococcus faecalis JH2-2. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 4, p. 1667-1669, 2009.
- BROCHADO, A. R. *et al.* Species-specific activity of antibacterial drug combinations. **Nature**, v. 559, n. 7713, p. 259, 2018.
- CABRAL, D.; WURSTER, J.; BELENKY, P. Antibiotic persistence as a metabolic adaptation: stress, metabolism, the host, and new directions. **Pharmaceuticals**, v. 11, n. 1, p. 14, 2018.
- CAO, Y. *et al.* A review on the applications of next generation sequencing technologies as applied to food-related microbiome studies. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1829, 2017.
- CASTILLO-JUÁREZ, I. *et al.* Role of quorum sensing in bacterial infections. **World Journal of Clinical Cases: WJCC**, v. 3, n. 7, p. 575, 2015.
- CENITI, C. *et al.* Phenotypic antimicrobial resistance profile of isolates causing clinical mastitis in dairy animals. **Italian journal of food safety**, v. 6, n. 2, 2017.
- CHINNAPPAN, R. *et al.* Development of magnetic nanoparticle based calorimetric assay for the detection of bovine mastitis in cow milk. **Analytical biochemistry**, v. 523, p. 58-64, 2017.
- CHUKWUNONSO, E. *et al.* Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus: A Mini Review. **International Journal of Medical Research & Health Sciences**, v. 7, n. 1, p. 122-127, 2018.
- CLARK, S.; GARCÍA, M. B. M. A 100-year review: Advances in goat milk research. **Journal of dairy science**, v. 100, n. 12, p. 10026-10044, 2017.

- CLAUSEN, P. T. L. C. *et al.* Benchmarking of methods for identification of antimicrobial resistance genes in bacterial whole genome data. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 9, p. 2484-2488, 2016.
- COIMBRA-E-SOUZA, V. *et al.* Diversity of species and transmission of antimicrobial resistance among *Staphylococcus* spp. isolated from goat milk. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 6, p. 5518-5524, 2019.
- CONLON, B. P. *et al.* Activated ClpP kills persisters and eradicates a chronic biofilm infection. **Nature**, v. 503, n. 7476, p. 365, 2013.
- CONLON, B. P. *et al.* Persister formation in *Staphylococcus aureus* is associated with ATP depletion. **Nature microbiology**, v. 1, n. 5, p. 16051, 2016.
- CONTRERAS, A. *et al.* Mastitis in small ruminants. **Small Ruminant Research**, v. 68, n. 1-2, p. 145-153, 2007.
- CONTRERAS, A. *et al.* The role of intramammary pathogens in dairy goats. **Livestock Production Science**, v. 79, n. 2-3, p. 273-283, 2003.
- CONTRERAS, G. A.; RODRÍGUEZ, J. M. Mastitis: comparative etiology and epidemiology. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 16, n. 4, p. 339-356, 2011.
- CORRIGAN, R. M. *et al.* ppGpp negatively impacts ribosome assembly affecting growth and antimicrobial tolerance in Gram-positive bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 12, p. E1710-E1719, 2016.
- COSTA, S. S. *et al.* Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: an update, **Open Microbiol. J**, v. 7, p. 59-71, 2013.
- CRUZ, G. R. B. *et al.* Estimativas de parâmetros genéticos e de ambiente para medidas repetidas de produção leiteira em caprinos. **Ciência Animal Brasileira**, v.20, p.1-13, 2019.
- DA COSTA, W. K. A. *et al.* Comparative protein composition analysis of goat milk produced by the Alpine and Saanen breeds in northeastern Brazil and related antibacterial activities. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e93361, 2014.
- DA SILVA TRENTIN, D.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J.. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 213-236, 2013.
- DANMALLAM, F. A.; PIMENOV, N. V. Study on prevalence, clinical presentation, and associated bacterial pathogens of goat mastitis in Bauchi, Plateau, and Edo states, Nigeria. **Veterinary world**, v. 12, n. 5, p. 638, 2019.
- DE STEENWINKEL, J. E. M. *et al.* Time-kill kinetics of anti-tuberculosis drugs, and emergence of resistance, in relation to metabolic activity of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 65, n. 12, p. 2582-2589, 2010.
- DÖRR, T.; DAVIS, B. M.; WALDOR, M. K. Endopeptidase-mediated beta lactam tolerance. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 4, p. e1004850, 2015.

DÖRR, T.; LEWIS, K.; VULIĆ, M.. SOS response induces persistence to fluoroquinolones in *Escherichia coli*. **PLoS genetics**, v. 5, n. 12, p. e1000760, 2009.

DÖRR, T.; VULIĆ, M.; LEWIS, K. Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. **PLoS biology**, v. 8, n. 2, p. e1000317, 2010.

DOS SANTOS SOUZA, M. F. *et al.* Characterisation of goat product consumers and goat farming systems in the Brazilian Northeast region. **Small Ruminant Research**, v. 179, p. 7-13, 2019.

DOS SANTOS, D. C. *et al.* *Staphylococcus chromogenes*, a coagulase-negative *Staphylococcus* species that can clot plasma. **Journal of clinical microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1372-1375, 2016.

DU TOIT, A. Bacterial physiology: efflux pumps, fitness and virulence. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 9, p. 512, 2017.

DUTRA, C. M. C. *et al.* Parâmetros de qualidade do leite de cabra armazenado sob frio. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo. Vol. 81, n. 1, p. 36-42, 2014.

EAGLE, H. *et al.* A Paradoxical Zone Phenomenon in the Bactericidal Action of Penicillin in Vitro. **Science (Washington)**, p. 44-5, 1948.

EAGLE, H.; MUSSELMAN, A. D. The rate of bactericidal action of penicillin in vitro as a function of its concentration, and its paradoxically reduced activity at high concentrations against certain organisms. **Journal of Experimental Medicine**, v. 88, n. 1, p. 99-131, 1948.

EL MEOUCHE, I.; SIU, Y.; DUNLOP, M. J. Stochastic expression of a multiple antibiotic resistance activator confers transient resistance in single cells. **Scientific reports**, v. 6, p. 19538, 2016.

EMBRAPA. Caprinocultura de leite no Brasil: perfil, estrutura de produção e clusters. Produção de Caprinos na Região da Mata Atlântica - **Embrapa Caprinos e Ovinos**, p.30-45, 2019.

FAO. FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics database. Online, 2018. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#home>, acesso em 03/06/2019.

FARIAS, A. M. *et al.* Serological study on *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in goats in the Brazilian Northeast using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA-indirect). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 7, p. 1344-1350, 2018.

FELDGARDEN, M. *et al.* Validating the AMRFinder tool and resistance gene database by using antimicrobial resistance genotype-phenotype correlations in a collection of isolates. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 63, n. 11, 2019.

FERACO, D. *et al.* Host environmental signals and effects on biofilm formation. **Microbial pathogenesis**, v. 99, p. 253-263, 2016.

FISHER, R. A.; GOLLAN, B.; HELAINE, S. Persistent bacterial infections and persister cells. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 8, p. 453, 2017.

FLOYD, J. L. *et al.* LmrS is a multidrug efflux pump of the major facilitator superfamily from *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.** V.54, p. 5406–5412, 2010.

FOSTER, T. *Staphylococcus*. In: **Medical Microbiology. 4th edition.** University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.

FRAIKIN, N.; GOORMAGHTIGH, F.; VAN MELDEREN, L. Type II toxin-antitoxin systems: evolution and revolutions. **Journal of bacteriology**, v. 202, n. 7, 2020.

FRIDMAN, O. *et al.* Optimization of lag time underlies antibiotic tolerance in evolved bacterial populations. **Nature**, v. 513, n. 7518, p. 418, 2014.

FRIMODT-MØLLER, J.; LØBNER-OLESEN, A. Efflux-Pump Upregulation: From Tolerance to High-level Antibiotic Resistance?. **Trends in microbiology**, v. 27, n. 4, p. 291-293, 2019.

GAO, W. *et al.* Two novel point mutations in clinical *Staphylococcus aureus* reduce linezolid susceptibility and switch on the stringent response to promote persistent infection. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 6, p. e1000944, 2010.

GEFEN, O. *et al.* TDtest: easy detection of bacterial tolerance and persistence in clinical isolates by a modified disk-diffusion assay. **Scientific reports**, v. 7, p. 41284, 2017.

GELASAKIS, A. I. *et al.* Bacterial subclinical mastitis and its effect on milk quality traits in low-input dairy goat herds. **Veterinary Record**, v. 183, n. 14, p. 449-449, 2018.

GHOSH, A. *et al.* Contact-dependent growth inhibition induces high levels of antibiotic-tolerant persister cells in clonal bacterial populations. **The EMBO journal**, v. 37, n. 9, 2018.

GOLLAN, B. *et al.* Bacterial persisters and infection: past, present, and progressing. **Annual review of microbiology**, v. 73, p. 359-385, 2019.

GÖLZ, G. *et al.* Quorum sensing dependent phenotypes and their molecular mechanisms in Campylobacterales. **European Journal of Microbiology and Immunology**, v. 2, n. 1, p. 50-60, 2012.

GOORMAGHTIGH, F. *et al.* Reassessing the role of type II toxin-antitoxin systems in formation of *Escherichia coli* type II persister cells. **MBio**, v. 9, n. 3, p. e00640-18, 2018.

GOUVEIA, A. M. G. *et al.* Zoo-sanitary aspects of goat husbandry in Southeastern Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 1, p. 277-284, 2015. GUAN, Yan-Fang *et al.* Application of next-generation sequencing in clinical oncology to advance personalized treatment of cancer. **Chinese journal of cancer**, v. 31, n. 10, p. 463, 2012.

GUPTA, S. K. *et al.* ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 212-220, 2014.

GUTIERREZ, D. *et al.* Effective removal of staphylococcal biofilms by the endolysin LysH5. **PloS one**, v. 9, n. 9, p. e107307, 2014.

- HAABER, J. *et al.* Reversible antibiotic tolerance induced in *Staphylococcus aureus* by concurrent drug exposure. **MBio**, v. 6, n. 1, p. e02268-14, 2015.
- HALL, A. M. J.; GOLLAN, B.; HELAINE, S. Toxin–antitoxin systems: reversible toxicity. **Current opinion in microbiology**, v. 36, p. 102-110, 2017.
- HANDWERGER, S.; TOMASZ, A. Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 25, n. 1, p. 349-380, 1985.
- HARDISON, R. C. Comparative genomics. **PLoS Biol**, v. 1, n. 2, p. e58, 2003.
- HARMS, A. *et al.* Prophages and growth dynamics confound experimental results with antibiotic-tolerant persister cells. **MBio**, v. 8, n. 6, p. e01964-17, 2017.
- HARMS, A. *et al.* Toxins, targets, and triggers: an overview of toxin-antitoxin biology. **Molecular cell**, v. 70, n. 5, p. 768-784, 2018.
- HARMS, A.; MAISONNEUVE, E.; GERDES, K. Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. **Science**, v. 354, n. 6318, p. aaf4268, 2016.
- HARTMAN, B. J.; TOMASZ, A. Expression of methicillin resistance in heterogeneous strains of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 29, n. 1, p. 85-92, 1986.
- HAURYLIUK, V. *et al.* Recent functional insights into the role of (p) ppGpp in bacterial physiology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 298, 2015.
- HOBBY, G. L.; MEYER, K.; CHAFFEE, E. Observations on the Mechanism of Action of Penicillin. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 50, n. 2, p. 281-285, 1942.
- HODZIC, Jasin *et al.* Overview of next-generation sequencing platforms used in published draft plant genomes in light of genotypization of immortal plant (*Helichrysum arenarium*). **Medical Archives**, v. 71, n. 4, p. 288, 2017.
- HOLST-JENSEN, A. *et al.* Application of whole genome shotgun sequencing for detection and characterization of genetically modified organisms and derived products. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 408, n. 17, p. 4595-4614, 2016.
- HU, Y.; COATES, A. R. M. Enhancement by novel anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* compound HT61 of the activity of neomycin, gentamicin, mupirocin and chlorhexidine: in vitro and in vivo studies. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 2, p. 374-384, 2012.
- HUNT, M. *et al.* ARIBA: rapid antimicrobial resistance genotyping directly from sequencing reads. **Microbial genomics**, v. 3, n. 10, 2017.
- IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática SIDRA. Censo agropecuário 2017: Resultados preliminares. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, Rio de Janeiro. Online, 2017. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6719>, Acesso em: 10 dez 2019.

IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática SIDRA. Censo Agropecuário 2017: Número de estabelecimentos agropecuários com caprinos, efetivos, venda e produção de leite, por direção dos trabalhos do estabelecimento agropecuário, origem da orientação técnica recebida e grupos de área total – resultados preliminares 2017. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, Rio de Janeiro. Online, 2018. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>, acesso em 01 dez 2019.

IKEDA, Y.; NISHINO, T. Paradoxical antibacterial activities of beta-lactams against *Proteus vulgaris*: mechanism of the paradoxical effect. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 32, n. 7, p. 1073-1077, 1988.

INOUYE, M. *et al.* SRST2: rapid genomic surveillance for public health and hospital microbiology labs. **Genome medicine**, v. 6, n. 11, p. 1-16, 2014.

IRAZOKI, O. *et al.* SOS system induction inhibits the assembly of chemoreceptor signaling clusters in *Salmonella enterica*. **PLoS one**, v. 11, n. 1, p. e0146685, 2016.

JAGADEESAN, B. *et al.* The use of next generation sequencing for improving food safety: translation into practice. **Food microbiology**, n° 79, p. 96-115, 2019.

JANG, S. Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus* and their clinical implications. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 1-8, 2016.

JOHANSEN, H. K. *et al.* Antagonism between penicillin and erythromycin against *Streptococcus pneumoniae* in vitro and in vivo. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 973-980, 2000.

JOHNSON, P. J. T; LEVIN, B. R. Pharmacodynamics, population dynamics, and the evolution of persistence in *Staphylococcus aureus*. **PLoS genetics**, v. 9, n. 1, p. e1003123, 2013.

KAATZ, G. W.; MCALEESE, F.; SEO, S. M. Multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* due to overexpression of a novel multidrug and toxin extrusion (MATE) transport protein. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 1857-1864, 2005.

KAATZ, G. W.; SEO, S. M. Mechanisms of fluoroquinolone resistance in genetically related strains of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 12, p. 2733-2737, 1997.

KARKI, A. B.; NEYAZ, L.; FAKHR, M. K. Comparative genomics of plasmid-bearing *Staphylococcus aureus* strains isolated from various retail meats. **Frontiers in microbiology**, v. 11, 2020.

KAUTZ, F. M.; NICKERSON, S. C.; ELY, L. O. Use of a staphylococcal vaccine to reduce prevalence of mastitis and lower somatic cell counts in a registered Saanen dairy goat herd. **Research in veterinary science**, v. 97, n. 1, p. 18-19, 2014.

KAYSER, F. H.; BENNER, E. J.; HOEPRICH, P. D. Acquired and native resistance of *Staphylococcus aureus* to cephalosporins and other β -lactam antibiotics. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 20, n. 1, p. 1-5, 1970.

- KHORAMIAN, B. *et al.* Comparison of virulence factors and biofilm formation among *Staphylococcus aureus* strains isolated from human and bovine infections. **Microbial pathogenesis**, v. 88, p. 73-77, 2015.
- KIM, J.-S.b; WOOD, T. K. Tolerant, growing cells from nutrient shifts are not persister cells. **MBio**, v. 8, n. 2, p. e00354-17, 2017.
- KIVANÇ, S. A. Biofilm forming capacity and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus* spp. with the *icaA/icaD/bap* genotype isolated from ocular surface of patients with diabetes. **Malawi Medical Journal**, v. 30, n. 4, p. 243-249, 2018.
- KOOP, G. *et al.* Risk factors and therapy for goat mastitis in a hospital-based case-control study in Bangladesh. **Preventive veterinary medicine**, v. 124, p. 52-57, 2016.
- KORF, I. Gene finding in novel genomes. **BMC bioinformatics**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2004.
- KOSKINEN, M. T. *et al.* Field comparison of real-time polymerase chain reaction and bacterial culture for identification of bovine mastitis bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 12, p. 5707-5715, 2010.
- KRÖMKER, V.; LEIMBACH, S. Mastitis treatment—Reduction in antibiotic usage in dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, p. 21-29, 2017.
- KUMAR, V.; GUPTA, J. Prevailing practices in the use of antibiotics by dairy farmers in Eastern Haryana region of India. **Veterinary world**, v. 11, n. 3, p. 274, 2018.
- LAKIN, S. M. *et al.* MEGARes: an antimicrobial resistance database for high throughput sequencing. **Nucleic acids research**, v. 45, n. D1, p. D574-D580, 2017.
- LASAGNO, M. Pathogenesis and inflammatory response in experimental caprine mastitis due to *Staphylococcus chromogenes*. **Microbial Pathogenesis**, v. 116, n. May 2017, p. 146–152, 2018.
- LEE, H. *et al.* Third-generation sequencing and the future of genomics. **BioRxiv**, p. 048603, 2016.
- LEWIS, K. Persister cells, dormancy and infectious disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 48, 2007.
- LI, H *et al.* The effects of matrix metalloproteinase-9 on dairy goat mastitis and cell survival of goat mammary epithelial cells. **PloS one**, v. 11, n. 8, p. e0160989, 2016a.
- LI, X. *et al.* Effects of total alkaloids of *Sophora alopecuroides* on biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. **BioMed research international**, v. 2016, 2016b.
- LIMA, M. C. *et al.* Mastitis in dairy goats from the state of Minas Gerais, Brazil: profiles of farms, risk factors and characterization of bacteria. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 9, p. 1742-1751, Sept. 2018.
- LIU, C. *et al.* Whole genome sequence and comparative genome analyses of multi-resistant *Staphylococcus warneri* GD01 isolated from a diseased pig in China. **PloS one**, v. 15, n. 5, p. e0233363, 2020.

LOMAN, N. J.; PALLEN, M. J. Twenty years of bacterial genome sequencing. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 12, p. 787-794, 2015.

LUAN, G. *et al.* Suppression of reactive oxygen species accumulation accounts for paradoxical bacterial survival at high quinolone concentration. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 62, n. 3, p. e01622-17, 2018.

MACHADO, G. P. *et al.* . Detection of Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae and Escherichia coli in Brazilian mastitic milk goats by multiplex-PCR. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro , v. 38, n. 7, p. 1358-1364, July 2018 .

MAHLANGU, P.; MAINA, N.; KAGIRA, J. Prevalence, Risk Factors, and Antibigram of Bacteria Isolated from Milk of Goats with Subclinical Mastitis in Thika East Subcounty, Kenya. **Journal of veterinary medicine**, v. 2018, 2018.

MARIATHASAN, S.; TAN, M.W. Antibody–antibiotic conjugates: a novel therapeutic platform against bacterial infections. **Trends in molecular medicine**, v. 23, n. 2, p. 135-149, 2017.

MASCIO, C. T.M; ALDER, J. D.; SILVERMAN, J. A. Bactericidal action of daptomycin against stationary-phase and nondividing Staphylococcus aureus cells. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 12, p. 4255-4260, 2007.

MC DERMOTT, W. Microbial persistence. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 30, n. 4, p. 257, 1958.

MCKEEGAN, K. S.; BORGES-WALMSLEY, M. I.; WALMSLEY, A. R. Microbial and viral drug resistance mechanisms. **Trends in microbiology**, v. 10, n. 10, p. s8-s14, 2002.

METZKER, M. L. Sequencing technologies—the next generation. **Nature reviews genetics**, v. 11, n. 1, p. 31-46, 2010.

MIDDLETON, J. R. *et al.* The National Mastitis Council: a global organization for mastitis control and milk quality, 50 years and beyond. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 19, n. 3, p. 241-251, 2014.

MING, P. *et al.* Development of a monoclonal antibody to detect α s1-casein in the milk of healthy and mastitis-affected goats. **Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi**, v. 26, n. 1, p. 71–74, 2020.

MISHRA, A. K. *et al.* Prevalence and bacterial etiology of subclinical mastitis in goats reared in organized farms. **Veterinary world**, v. 11, n. 1, p. 20, 2018.

MISHRA, A. K. *et al.* Prevalence of subclinical mastitis in different breeds of goats. **Veterinary Practitioner**, v. 15, n. 1, p. 140-141, 2014.

MOON, J.-S. *et al.* Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant staphylococci isolated from bovine mastitis in Korea. **Journal of dairy science**, v. 90, n. 3, p. 1176-1185, 2007.

MOORCRAFT, S.Y.; GONZALEZ, D.; WALKER, B. A. Understanding next generation sequencing in oncology: A guide for oncologists. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 96, n. 3, p. 463-474, 2015.

MOREIRA, G. *et al.* Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de *Punica granatum* Linn. sobre *Staphylococcus* spp. isolados de leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, p. 626-632, 2014.

MORONI, P. *et al.* Subclinical mastitis and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus caprae* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from two Italian goat herds. **Journal of dairy science**, v. 88, n. 5, p. 1694-1704, 2005.

MOYED, H. S.; BERTRAND, K. P. *hipA*, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. **Journal of bacteriology**, v. 155, n. 2, p. 768-775, 1983.

MUKDSI, M. C. A. *et al.* Functional goat milk cheese with feruloyl esterase activity. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 2, p. 801-809, 2013.

MULCAHY, L. R. *et al.* Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis. **Journal of bacteriology**, v. 192, n. 23, p. 6191-6199, 2010.

NANDAKUMAR, M.; NATHAN, C.; RHEE, K. Y. Isocitrate lyase mediates broad antibiotic tolerance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature communications**, v. 5, p. 4306, 2014.

NARAYANASWAMY, V. P. *et al.* Novel glycopolymer eradicates antibiotic-and CCCP-induced persister cells in *Pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1724, 2018.

NARTEN, M. *et al.* Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* urinary tract isolates and influence of urinary tract conditions on antibiotic tolerance. **Current microbiology**, v. 64, n. 1, p. 7-16, 2012.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. Genome assembly. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike Bethesda, MD 20894. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/search/all/?term=Staphylococcus++aureus>. Acesso em: 12 abr. 2021.

NORMARK, B. H.; NORMARK, S. Antibiotic tolerance in pneumococci. **Clinical microbiology and infection**, v. 8, n. 10, p. 613-622, 2002.

NOVAK, R. *et al.* Emergence of vancomycin tolerance in *Streptococcus pneumoniae*. **Nature**, v. 399, n. 6736, p. 590, 1999.

OLIVEIRA, C. J. B. *et al.* On farm risk factors associated with goat milk quality in Northeast Brazil. **Small Ruminant Research**, v. 98, n. 1-3, p. 64-69, 2011.

OLIVEIRA, D.; BORGES, A.; SIMÕES, M. *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infectious diseases. **Toxins**, v. 10, n. 6, p. 252, 2018.

OLIVEIRA, F. B. M. *et al.* Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma reflexão no tratamento das infecções hospitalares. **Revista Interdisciplinar NOVAFAPI**, v. 4, n. 4, p. 72-77, 2011.

OLIVER, S. P.; MURINDA, S. E. Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**. v.28, n. 2, p. 165-185, 2012.

OULTRAM, J. W. H. *et al.* A metataxonomic approach could be considered for cattle clinical mastitis diagnostics. **Frontiers in veterinary science**, v. 4, p. 36, 2017.

PAPENFORT, K.; BASSLER, B. L. Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 576, 2016.

PARTE, A. C. *et al.* List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 70, 5607-5612. 2020. DOI: 10.1099/ijsem.0.004332. Disponível em: <<https://lpsn.dsmz.de/genus/staphylococcus>>. Acesso em: Março. 2021.

PEIXOTO, R. de M. *et al.* Indirect diagnostic tests for the detection of subclinical mastitis in dairy goats experimentally infected with *Staphylococcus aureus*. **Ciência Rural**, v. 46, n. 7, p. 1217-1222, 2016.

PILLA, R. *et al.* Microscopic differential cell counting to identify inflammatory reactions in dairy cow quarter milk samples. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 8, p. 4410-4420, 2012.

PIRZADA, M. *et al.* Prevalence of subclinical mastitis in dairy goats caused by bacterial species. **J. Anim. Health Prod**, v. 4, n. 2, p. 55-59, 2016.

PODKOWIK, M. *et al.* Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci. **International journal of food microbiology**, v. 163, n. 1, p. 34-40, 2013.

PONTES, M. H.; GROISMAN, E. A. Slow growth determines nonheritable antibiotic resistance in *Salmonella enterica*. **Science signaling**, v. 12, n. 592, 2019.

PRASETYOPUTRI, A. *et al.* The eagle effect and antibiotic-induced persistence: two sides of the same coin?. **Trends in microbiology**, v. 27, n. 4, p. 339-354, 2019.

PREETHIRANI, P. L. *et al.* Isolation, biochemical and molecular identification, and in-vitro antimicrobial resistance patterns of bacteria isolated from bubaline subclinical mastitis in South India. **PLoS One**, v. 10, n. 11, 2015.

PRUITT, K. D.; TATUSOVA, T.; MAGLOTT, D. R. NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. **Nucleic acids research**, v. 35, n. suppl_1, p. D61-D65, 2007.

PU, Y. *et al.* Enhanced efflux activity facilitates drug tolerance in dormant bacterial cells. **Molecular cell**, v. 62, n. 2, p. 284-294, 2016.

PULINA, G. *et al.* Invited review: Current production trends, farm structures, and economics of the dairy sheep and goat sectors. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 8, p. 6715-6729, 2018.

PUMIPUNTU, N. *et al.* Staphylococcus spp. associated with subclinical bovine mastitis in central and northeast provinces of Thailand. **PeerJ**, v. 7, p. e6587, 2019.

QIAO, J. *et al.* Reduction of Lactobacillus in the milks of cows with subclinical mastitis. **Beneficial microbes**, v. 6, n. 4, p. 485-490, 2015.

RAINARD, P. *et al.* Host factors determine the evolution of infection with Staphylococcus aureus to gangrenous mastitis in goats. **Veterinary research**, v. 49, n. 1, p. 72, 2018.

RENBARGER, T. L.; BAKER, J. M.; SATTLEY, W. M. Slow and steady wins the race: an examination of bacterial persistence. **AIMS microbiology**, v. 3, n. 2, p. 171, 2017.

REUTER, J. A.; DAMEK V. S.; MICHAEL P. S. High-throughput sequencing technologies. *Molecular cell* 58, n. 4. 586-597. 2015.

ROCHA, L. S. *et al.* Comparative genomics of Staphylococcus aureus associated with subclinical and clinical bovine mastitis. **PLoS one**, v. 14, n. 8, p. e0220804, 2019.

RONNEAU, S.; HELAINE, S. Clarifying the Link between Toxin-Antitoxin Modules and Bacterial Persistence. **Journal of molecular biology**, 2019.

RUEGG, P. L. New perspectives in udder health management. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 28, n. 2, p. 149-163, 2012.

RUPP, R. *et al.* Divergent selection on milk somatic cell count in goats improves udder health and milk quality with no effect on nematode resistance. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 6, p. 5242-5253, 2019.

SALABERRY, S. R. S. *et al.* Virulence factors genes of Staphylococcus spp. isolated from caprine subclinical mastitis. **Microbial pathogenesis**, v. 85, p. 35-39, 2015.

SANTANA, R. C. M. *et al.* Uso de antimicrobiano nanoparticulado para o tratamento da mastite subclínica de ovelhas de corte no período seco. 2016.

SCHOLAR, E. M.; SCHOLAR, E. M.; PRATT, W. B. **The antimicrobial drugs**. Oxford University Press, USA, 2000.

SCHUCH, R. *et al.* Combination therapy with lysin CF-301 and antibiotic is superior to antibiotic alone for treating methicillin-resistant Staphylococcus aureus-induced murine bacteremia. **The Journal of infectious diseases**, v. 209, n. 9, p. 1469-1478, 2014.

SCHUMACHER, M. A. *et al.* HipBA-promoter structures reveal the basis of heritable multidrug tolerance. **Nature**, v. 524, n. 7563, p. 59, 2015.

SEGERMAN, Bo. The most frequently used sequencing technologies and assembly methods in different time segments of the bacterial surveillance and RefSeq genome databases. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 2020.

SHAHEEN, M.; TANTARY, H. A.; NABI, S. U. A treatise on bovine mastitis: disease and disease economics, etiological basis, risk factors, impact on human health, therapeutic management, prevention and control strategy. **Advances in Dairy Research**, p. 1-10, 2016.

SHAN, Y. *et al.* ATP-dependent persister formation in *Escherichia coli*. **MBio**, v. 8, n. 1, p. e02267-16, 2017.

SIERADZKI, K.; TOMASZ, A. Inhibition of the autolytic system by vancomycin causes mimicry of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*-type resistance, cell concentration dependence of the MIC, and antibiotic tolerance in vancomycin-susceptible *S. aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 2, p. 527-533, 2006.

SMITH, K.; GEMMELL, C. G.; HUNTER, I. S. The association between biocide tolerance and the presence or absence of *qac* genes among hospital-acquired and community-acquired MRSA isolates. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 61, n. 1, p. 78-84, 2008.

SOUZA, M. *et al.* Characterisation of goat product consumers and goat farming systems in the Brazilian Northeast region. **Small Ruminant Research**, v.179, p.7–13, 2019.

STEPANOVIĆ, S. *et al.* Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Apmis**, v. 115, n. 8, p. 891-899, 2007.

SUPRÉ, K. *et al.* Some coagulase-negative *Staphylococcus* species affect udder health more than others. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 5, p. 2329-2340, 2011.

SYRING, C. *et al.* Bovine mastitis: The diagnostic properties of a PCR-based assay to monitor the *Staphylococcus aureus* genotype B status of a herd, using bulk tank milk. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 7, p. 3674-3682, 2012.

THOMPSON-CRISPI, K. *et al.* Bovine mastitis: frontiers in immunogenetics. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 493, 2014.

TOLLERSRUD, T. *et al.* Antibody responses in sheep vaccinated against *Staphylococcus aureus* mastitis: a comparison of two experimental vaccines containing different adjuvants. **Veterinary research communications**, v. 26, n. 8, p. 587-600, 2002.

TOLOSA, T. *et al.* Risk factors associated with subclinical mastitis as detected by California Mastitis Test in smallholder dairy farms in Jimma, Ethiopia using multilevel modelling. **Preventive veterinary medicine**, v. 112, n. 1-2, p. 68-75, 2013.

TOMASZ, A.; WAKS, S. Mechanism of action of penicillin: triggering of the pneumococcal autolytic enzyme by inhibitors of cell wall synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 72, n. 10, p. 4162-4166, 1975.

TRASTOY, R. *et al.* Mechanisms of bacterial tolerance and persistence in the gastrointestinal and respiratory environments. **Clinical microbiology reviews**, v. 31, n. 4, p. e00023-18, 2018.

TREMBLAY, Y. D. N *et al.* Biofilm formation by coagulase-negative staphylococci: impact on the efficacy of antimicrobials and disinfectants commonly used on dairy farms. **Veterinary microbiology**, v. 172, n. 3-4, p. 511-518, 2014.

TREMBLAY, Y. D. N *et al.* Characterization of the ability of coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms. **Journal of dairy science**, v. 96, n. 1, p. 234-246, 2013.

TUCHSCHERR, L.; LÖFFLER, B.; PROCTOR, R. A. Persistence of *Staphylococcus aureus*: Multiple Metabolic Pathways Impact the Expression of Virulence Factors in Small-Colony Variants (SCVs). **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1028, 2020.

VAN DEN BERGH, B.; FAUVART, M.; MICHIELS, J. Formation, physiology, ecology, evolution and clinical importance of bacterial persisters. **FEMS microbiology reviews**, v. 41, n. 3, p. 219-251, 2017.

VAN DIJK, E. L. *et al.* The third revolution in sequencing technology. **Trends in Genetics**, v. 34, n. 9, p. 666-681, 2018.

VERRUCK, S.; DANTAS, A.; PRUDENCIO, E. S. Functionality of the components from goat's milk, recent advances for functional dairy products development and its implications on human health. **Journal of functional foods**, v. 52, p. 243-257, 2019.

VIGUIER, C. *et al.* Mastitis detection: current trends and future perspectives. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 8, p. 486-493, 2009.

VÖLZING, K. G.; BRYNILDSEN, M. P. Stationary-phase persisters to ofloxacin sustain DNA damage and require repair systems only during recovery. **MBio**, v. 6, n. 5, p. e00731-15, 2015.

VON WINTERSDORFF, C. J. H. *et al.* Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 173, 2016.

WAKAMOTO, Y. *et al.* Dynamic persistence of antibiotic-stressed mycobacteria. **Science**, v. 339, n. 6115, p. 91-95, 2013.

WANG, T.; EL MEOUCHE, I.; DUNLOP, M. J. Bacterial persistence induced by salicylate via reactive oxygen species. **Scientific reports**, v. 7, p. 43839, 2017.

WANG, Y. *et al.* Non-antibiotic pharmaceuticals enhance the transmission of exogenous antibiotic resistance genes through bacterial transformation. **The ISME Journal**, v. 14, n. 8, p. 2179-2196, 2020.

WILLETT, J. L.E. *et al.* Contact-dependent growth inhibition (CDI) and CdiB/CdiA two-partner secretion proteins. **Journal of molecular biology**, v. 427, n. 23, p. 3754-3765, 2015.

WINDELS, E. M. *et al.* Bacterial persistence promotes the evolution of antibiotic resistance by increasing survival and mutation rates. **The ISME journal**, v. 13, n. 5, p. 1239-1251, 2019.

WOLFSON, J. S. *et al.* Mutants of *Escherichia coli* K-12 exhibiting reduced killing by both quinolone and beta-lactam antimicrobial agents. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 34, n. 10, p. 1938-1943, 1990.

WU, Y. *et al.* Role of oxidative stress in persister tolerance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 9, p. 4922-4926, 2012.

XU, T. et al. The agr quorum sensing system represses persister formation through regulation of phenol soluble modulins in *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 2189, 2017.

XUE, T.; ZHAO, L.; SUN, B. LuxS/AI-2 system is involved in antibiotic susceptibility and autolysis in *Staphylococcus aureus* NCTC 8325. **International journal of antimicrobial agents**, v. 41, n. 1, p. 85-89, 2013.

YU, D. *et al.* *Staphylococcus aureus* autoinducer-2 quorum sensing decreases biofilm formation in an icaR-dependent manner. **BMC microbiology**, v. 12, n. 1, p. 288, 2012.

YUAN, Y- G.; PENG, Qio-Ling; GURUNATHAN, S. Effects of silver nanoparticles on multiple drug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from mastitis-infected goats: An alternative approach for antimicrobial therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 3, 2017.

ZANKARI, E. *et al.* Identification of acquired antimicrobial resistance genes. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2640-2644, 2012.

ZHANG, L. *et al.* Population structure and antimicrobial profile of *Staphylococcus aureus* strains associated with bovine mastitis in China. **Microbial Pathogenesis**, v. 97, p. 103–109, 2016.

ZHAO, L. *et al.* *Staphylococcus aureus* AI-2 quorum sensing associates with the KdpDE two-component system to regulate capsular polysaccharide synthesis and virulence. **Infection and immunity**, v. 78, n. 8, p. 3506-3515, 2010.

ZHOU, C. *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of DSTA4637A: a novel THIOMAB™ antibody antibiotic conjugate against *Staphylococcus aureus* in mice. In: **MABs**. Taylor & Francis, p. 1612-1619. 2016.

ZIMMERMANN, S. *et al.* Optimized efflux assay for the nora multidrug efflux pump in *Staphylococcus aureus*. **Journal of microbiological methods**, v. 142, p. 39-40, 2017.

CAPÍTULO 1 - *Staphylococcus* spp. isolados de mastite de cabra têm um perfil de tolerância ou persistência

Artigo submetido à Revista *Frontiers in Microbiology*

(Fator de impacto 4.235; Qualis A1)

Staphylococcus spp. isolados de mastite de cabra têm um perfil de tolerância ou persistência

1 Chirles A. França¹, Danilo S. Rosa¹, Renata F. S. Souza¹, Gutiele do N. do É, Hugo¹, C.
2 Bonfá², Jackson R. G. S. Almeida³, Magna C. Lima⁴, Maria A. S. Moreira⁴, Henrique C.
3 P. Figueiredo⁵, Vasco A. C. Azevedo⁶, Mateus M. Costa^{1*}

4 ¹ Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal, Campus Ciências Agrárias,
5 Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Petrolina, PE, Brasil

6 ² Campus Ciências Agrárias, Colegiado de Zootecnia, Universidade Federal do Vale do São
7 Francisco (UNIVASF), Petrolina, PE, Brasil

8 ³ Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Mediciniais (NEPLAME), Universidade Federal
9 do Vale do São Francisco, 56304-205 Petrolina, PE, Brasil

10 ⁴ Laboratório de Doenças Bacterianas (LDBAC), Setor de Medicina Veterinária Preventiva,
11 Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil

12 ⁵ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Minas Gerais,
13 Belo Horizonte, MG, Brasil

14 ⁶ Laboratório de Genética Celular e Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade
15 Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

16 * **Correspondence:**

17 Corresponding Author

18 mateus.costa@univasf.edu.br

19 **Resumo**

20 O leite de cabra é um importante componente da alimentação humana e a contaminação por
21 bactérias oriundas de infecções intramamárias representa um risco à saúde. Tem-se observado
22 que os micro-organismos desenvolveram maneiras alternativas de sobrevivência ao
23 tratamento com antibióticos que diferem da resistência, denominadas tolerância e persistência.
24 A ocorrência destes fenômenos traz grande impacto para o controle da mastite. Portanto, o
25 objetivo deste estudo foi caracterizar isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de mastite
26 caprina, quanto ao perfil de tolerância/persistência e fatores de virulência associados. Doze
27 isolados de mastite caprina clínica foram obtidos, sendo seis antes do tratamento com
28 enrofloxacina e mais seis após o tratamento. A identificação taxonômica foi realizada por
29 MALDI-TOF. Na sequência, aplicou-se o TDTest para triagem prévia de
30 tolerância/persistência nos isolados. Em seguida, através do teste de microdiluição em caldo,
31 foram avaliadas as concentrações inibitória mínima (CIM) e bactericida (CBM). Curvas de
32 morte foram realizadas utilizando a concentração que corresponde a 2xCIM do
33 antimicrobiano, analisando a população bacteriana sobrevivente em função da duração
34 mínima de morte (MDK). Em seguida, avaliou-se qual o tipo de persistência (dose ou tempo
35 dependente) foi desenvolvida pelos isolados. Finalmente, realizou-se a caracterização
36 fenotípica para formação de biofilme, através do ensaio de aderência em microplaca. Os
37 isolados bacterianos foram identificados com *Staphylococcus aureus* (n=4) e *Staphylococcus*
38 *warneri* (n=8). As bactérias apresentaram sensibilidade com CIM e CBM variando entre 0,12
39 e 1,95 µg / mL, em ambas, abaixo do breakpoint estabelecido (4µg / mL). Na curva de morte,
40 os isolados de *S. aureus* mostraram-se tolerantes e *S. warneri* foram persistentes. Verificou-se
41 que os isolados apresentavam persistência tempo dependente do tipo I. Em todos os isolados
42 foi observada forte produção de biofilme, principalmente para *S. aureus*. Conclui-se que a

43 tolerância e persistência nos isolados foi fator determinante para a sobrevivência ao
44 tratamento com enrofloxacin. A tolerância foi confirmada para *S. aureus*, enquanto a
45 persistência tempo dependente do tipo I em *S. warneri*. Neste caso, o ocorrido permite inferir
46 que os eventos podem ser espécie-específicos. Ademais, a produção de biofilme por ambas as
47 espécies pode ter favorecido de maneira significativa para a tolerância ao antibiótico.

48 **Palavras chave: mastite, cabras leiteiras, tolerância, persistência, infecções crônicas.**

49 **1 Introdução**

50 O leite caprino é um importante produto para a nutrição humana (Haenlein, 2004). Ele
51 possui mais de 200 nutrientes e componentes bioativos, como proteínas, lactose, minerais e
52 vitaminas, com potenciais benefícios à saúde (Liu *et al.*, 2019), a exemplo, de
53 oligossacarídeos com efeitos anti-inflamatórios em ratos com colite induzida por hapteno
54 (Daddaoua *et al.*, 2006).

55 Apesar de sua importância, entraves como as infecções intramamárias ainda impedem o
56 avanço na cadeia produtiva da caprinocultura (Contreras *et al.*, 2007; Peter *et al.*, 2015). Entre
57 as principais e mais recorrentes enfermidades que afetam diretamente a produtividade de
58 cabras leiteiras, pode-se destacar a mastite (Gebrewahid *et al.*, 2012; Merz *et al.*, 2016).

59 *Staphylococcus aureus* é o mais prevalente agente patogênico causador da mastite em
60 espécies ruminantes, sobretudo, do tipo clínica. Por outro lado, *Staphylococcus* coagulase-
61 negativa (SCN), entre eles *Staphylococcus warneri* (Mørk *et al.*, 2012; Koop *et al.*, 2012;
62 Ceni *et al.*, 2017), podem causar mastite nas diferentes formas, e são conhecidos como
63 reservatórios de genes de resistência (Bitrus *et al.*, 2018). A abordagem terapêutica baseada
64 no uso de antibióticos continua sendo considerada um importante componente para o controle
65 da mastite (Barlow *et al.*, 2011).

66 Do ponto de vista evolucionário, as bactérias possuem duas estratégias principais de
67 adaptação à ação dos antibióticos: a primeira baseada em mutações em genes, frequentemente
68 associados ao mecanismo de ação do composto, ou pela aquisição de genes de resistência
69 através da transferência horizontal de elementos genéticos móveis (Munita & Arias 2016). No
70 entanto, tem sido descoberto que muitos micro-organismos podem ser geneticamente
71 suscetíveis e expressar um fenótipo capaz de sobreviver às ações combinadas de resposta
72 imune do hospedeiro e tratamento com antibiótico (Fauvart *et al.*, 2011; Grant & Hung 2013;
73 Gollan *et al.*, 2019), como os fenômenos de tolerância e persistência, caminhos que
74 contribuem na disseminação para a resistência (Fisher *et al.*, 2017).

75 Bactérias com perfis de tolerância possuem a capacidade de sobreviver a exposições
76 transitórias de antibióticos com concentrações, que em condições normais, seriam letais.
77 Enquanto na persistência, uma subpopulação de uma população bacteriana clonal sobrevive a
78 antibióticos em altas concentrações (Handwerger & Tomasz 1985; Balaban *et al.*, 2004;
79 Gefen & Balaban 2009).

80 Embora a ocorrência desses fenômenos tenha sido observada em diferentes espécies
81 bacterianas, incluindo importantes patógenos de humanos como *S. aureus*, *Pseudomonas*
82 *aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* e *Mycobacterium tuberculosis* (Cabral
83 *et al.*, 2018; Trastoy *et al.*, 2018), apenas dois estudos com isolados animais persistentes
84 foram descritos na literatura (Willenborg *et al.*, 2014; de Oliveira *et al.*, 2018). Desse modo, o
85 propósito deste estudo foi avaliar a ocorrência de *Staphylococcus* spp., com perfis de
86 tolerância ou persistência, oriundos de mastite clínica caprina.

87

88 2 Materiais e métodos

89 2.1. Isolados bacterianos

90 Os isolados de *Staphylococcus* spp., foram obtidas a partir de animais que apresentaram
91 mastite clínica, com uso recorrente de enrofloxacin (ENO) e que compunham o rebanho da
92 Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão em Caprinocultura, da Universidade Federal de
93 Viçosa (UFV) localizada no município de Viçosa-Brasil (20.7467991 S 43.0193046 W -
94 SisGen AEB34A6). As bactérias foram isoladas antes (código identificador.1) e após o
95 tratamento (código identificador.2) com ENO (Lima *et al.* 2020). Os isolados foram
96 denominados nesse estudo Cap 6.1, Cap 6.2, Cap 7.1, Cap 7.2, Cap 9.1, Cap 9.2, Cap 10.1,
97 Cap 10.2, Cap 100.1, Cap 100.2, Cap 101.1 e Cap 101.2.

98 Foi realizada a padronização de crescimento para a determinação da correlação entre
99 densidade óptica (DO) e Unidades Formadoras de colônia (UFC/mL). Cada isolado foi
100 incubado em caldo *Müller-Hinton* (MH, Kasvi®, São José dos Pinhais, Brasil) a 37 °C, sob
101 agitação a 180 rpm por 24 horas, e de uma alíquota foi medida a DO em um
102 espectrofotômetro em 620 nm GENESYS 10S UV-VIS (Thermo Fisher SCIENTIFIC,
103 Madison, Estados Unidos). Em seguida, 100 µL das diluições foram plaqueados em ágar MH
104 (Kasvi®) com o auxílio de pérolas de vidro, com posterior incubação a 37 °C por 24 horas,
105 conforme metodologia proposta por Baron *et al.* (2006) com modificação, utilizando placas
106 de Petri. O experimento foi realizado em três dias independentes.

107 2.2. Identificação dos isolados por MALDI-TOF MS

108 Os isolados bacterianos foram semeados em ágar *Brain Heart Infusion* (BHI, Acumedia®,
109 Lansing, USA) e cultivados a 37 °C por 24 horas. Em seguida, uma colônia de cada isolado
110 foi transferida, usando um palito de dente, para uma placa de aço. Nas colônias, foram
111 aplicados 1 µL de ácido fórmico (70%) e 1µL da matriz MALDI-TOF MS, consistindo em
112 uma solução saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA, Bruker Daltonics,
113 Bremen, Alemanha), e submetida a secagem ao ar. Os espectros foram adquiridos usando o
114 espectrômetro de massa *FlexControl MicroFlex LT* (Bruker Daltonics), conforme
115 metodologia descrita por Assis *et al.* (2017). A calibração foi precedida com um padrão de
116 teste bacteriano de *E. coli* DH5 alfa (Bruker Daltonics). Foram utilizados os critérios de
117 pontuação de identificação em tempo real (TR), recomendados pelo fabricante: a pontuação \geq
118 2.000 indicou uma identificação em nível de espécie, a pontuação ≥ 1.700 e < 2.000 uma
119 identificação em nível de gênero, e uma pontuação < 1.700 não possui uma identificação
120 confiável.

121 2.3. TDtest

122 Discos circulares, com diâmetro de 6 mm em papel filtro (Unifil – ϕ 12,5 cm, Alemanha),
123 foram preparados, esterilizados em autoclave e submetidos a secagem em estufa.
124 Posteriormente, eles foram embebidos com 5µL de solução antibiótica de ENO a 0,5 µg/mL
125 (concentração teste) e 5µg/mL (concentração referência) (Biovét, Vargem Grande Paulista,
126 Brasil) separadamente, com posterior secagem em temperatura ambiente. A técnica de TDtest
127 foi empregada com base no método de difusão em disco *Kirby-Bauer*, com as seguintes
128 modificações: bactérias na concentração de $5,5 \times 10^6$ UFC/mL foram plaqueadas, com o auxílio
129 de pérolas de vidro, em placas contendo ágar MH (Kasvi®). Em seguida foi adicionado o
130 disco de antibiótico no centro da placa com incubação por 18 horas a 37 °C. Posteriormente
131 foi realizada a medição em mm dos halos de inibição para verificar a sensibilidade dos
132 isolados. Na sequência, novos discos foram embebidos com 5 µL de solução de glicose estéril
133 a 40 % (Isifar, Duque de Caxias, Brasil) e após secos, foi realizada a substituição do disco de
134 antibiótico pelo disco contendo glicose. As placas foram incubadas por 12 horas a 37 °C

135 (Gefen *et al.*, 2017). O resultado foi baseado na presença ou ausência de colônias dentro do
136 halo de inibição. A quantidade de colônias tolerantes/persistentes dentro da zona de inibição
137 foi classificada em três categorias: (1) baixa - 1 a 10 colônias, (2) média - 10 a 100 colônias,
138 (3) alta - mais de 100 colônias (Gefen *et al.*, 2017).

139 **2.4. Teste de microdiluição em caldo**

140 As determinações da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida
141 Mínima (CBM) foram realizadas de acordo com o protocolo M7-A9 (CLSI, 2014).
142 Distribuiu-se 100µL de caldo MH (Kasvi®) em microplaca de 96 poços (OLEN, São José dos
143 Pinhais, Brasil), seguida da adição de 100µL de ENO a 125 µg/mL (Biovet) nos três
144 primeiros poços, com posterior diluição seriada do antibiótico. As concentrações finais
145 testadas de ENO foram: 15,6; 7,8; 3,9; 1,95; 0,97; 0,48; 0,24; 0,12; 0,06; 0,03; 0,015 e 0,0075
146 µg/mL. A partir do pré-inóculo em BHI (Acumedia®), foi preparada uma solução bacteriana
147 ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) e uma alíquota de 0,01mL foi inoculada nos poços. Como controle
148 negativo, foi utilizado o caldo MH (Kasvi®) estéril e como controle de viabilidade bacteriana
149 para cada isolado, foi utilizado caldo MH (Kasvi®) acrescido de 10 % do inóculo bacteriano
150 testado. O diluente utilizado para ENO foi uma solução hidroalcolica (12,5 % - Neon, São
151 Paulo, Brasil). Um controle de atividade inibitória/bactericida do diluente sobre a bactéria
152 também foi avaliado. A microplaca foi incubada a 37 °C por 24 horas. Com auxílio de um
153 replicador, transferiu-se uma alíquota de cada poço para uma placa de ágar MH (Kasvi®). A
154 CBM foi determinada a partir da leitura visual de crescimento bacteriano, após incubação a 37
155 °C por 24 horas. Para a determinação da CIM, foram adicionados 30 µL de Cloreto de 2,3,5-
156 trifeniltetrazólio (CTT, Neon), previamente diluído em água destilada na concentração de 1%,
157 em cada poço da microplaca e incubada a 37 °C por 1 hora. A mudança de coloração para a
158 tonalidade avermelhada foi considerada como indicativa de viabilidade bacteriana.

159 **2.5. Curva de morte**

160 Para o preparo do pré-inóculo, isolados de *Staphylococcus* spp. foram incubados em caldo
161 MH (Kasvi®) a 37 °C, sob agitação a 180 rpm por 24 horas. Posteriormente foi retirada uma
162 alíquota de cada isolado a fim de medir a DO em espectrofotômetro (Thermo Fisher
163 SCIENTIFIC), usando o comprimento de onda de 620 nm. A partir da DO de cada pré-
164 inóculo, foram preparados inóculos na concentração inicial de $5,5 \times 10^6$ UFC/mL. Os inóculos
165 foram submetidos a dois tratamentos: caldo MH (Kasvi®) com adição de ENO (Biovet), na
166 concentração correspondente a 2xCIM de cada isolado, e caldo MH sem adição de antibiótico,
167 como controle. Em sequência, esses cultivos foram mantidos a 37 °C, sob agitação a 180 rpm
168 durante 10 horas. Nesse período, uma alíquota de 20 µL foi retirada, a cada duas horas, para a
169 diluição seriada em 180 µL de solução salina 0,85 % (Cinética, São Paulo, Brasil) até 10^{-6}
170 para CIM e 10^{-12} para as amostras controles. Em seguida, 50 µL de cada diluição foram
171 adicionados às microplacas de 24 poços (Kasvi®) e plaqueados pelo método *pour-plate* com
172 400 µL de ágar MH (Kasvi®) (Baron *et al.*, 2006). O teste foi realizado em triplicata
173 biológica em dias independentes. Os parâmetros para classificar os isolados foram baseados
174 na *minimum duration for killing* (MDK), MDK 99 e MDK 99,99, ou seja, tempo necessário
175 para a eliminação da população em 99% ou 99,99%, respectivamente. Os tolerantes foram
176 caracterizados por apresentarem um alto MDK 99 e os persistentes um baixo MDK 99 e um
177 alto MDK 99,99 (Brauner *et al.*, 2016).

178 **2.6. Ensaio de persistência dose dependente**

179 A escolha dos isolados Cap 9.1 e 9.2 para a execução dos experimentos da classificação
180 quanto ao tipo de persistência, deu-se em razão de resultados prévios do sequenciamento do
181 genoma (dados não mostrados). Para o preparo do pré-inóculo, Cap 9.1 e 9.2 foram incubados

182 em caldo MH (Kasvi®) a 37 °C, sob agitação a 180 rpm por 24 horas. Posteriormente, foi
183 retirada uma alíquota de cada isolado com intuito de medir a DO em espectrofotômetro
184 (Thermo Fisher SCIENTIFIC), usando o comprimento de onda de 620 nm. A partir da DO,
185 foram preparados os inóculos na concentração inicial de $5,5 \times 10^6$ UFC/mL. Os isolados foram
186 cultivados em caldo MH (Kasvi®) com adição de ENO (Biovet), com 2xCIM como
187 concentração referência da curva de morte, e em concentrações crescentes de 16, 32, 64, 128 e
188 256xCIM para avaliação da dependência da dose, assim como caldo MH sem adição de
189 antibiótico, como controle. Em sequência, esses cultivos foram mantidos a 37 °C, sob
190 agitação a 180 rpm durante 3 horas e 30 minutos. Uma alíquota de 20 µL foi retirada para a
191 diluição seriada em 180 µL de solução salina 0,85% (Cinética) e a diluição foi realizada até
192 10^{-3} para CIM, nos tempos de 0h e 3h30. Para os controles, a diluição foi realizada até 10^{-5} no
193 tempo 0h e até 10^{-8} no tempo 3h30min. Em seguida, 100 µL de cada diluição foram
194 adicionados às placas de petri contendo ágar MH (Kasvi®) e plaqueados pelo método *spread-*
195 *plate* com o auxílio de pérolas de vidro e incubadas a 37 °C por 24 horas. O teste foi realizado
196 em triplicata biológica em dias independentes.

197 **2.7. Ensaio de persistência tempo dependente (eliminação de persistentes)**

198 Inicialmente, foram preparados pré-inóculos de Cap 9.1 e 9.2 em caldo MH (Kasvi®) a
199 37 °C, sob agitação a 180 rpm por 24 horas. Em seguida, o inóculo foi preparado ajustado
200 para uma DO 0,02 (620 nm) em caldo MH e incubado a 37 °C, sob agitação a 180 rpm até
201 alcançar a DO 0,2, etapa denominada como partida. Posteriormente, uma alíquota de cada
202 partida foi usada para novos inóculos em erlenmeyes contendo 20 mL de caldo MH, com DO
203 inicial de 0,02 (620 nm) e desafio de 2xCIM com ENO (desafio ciclo I). O período de
204 incubação do ciclo I foi de 2 horas a 37 °C, sob agitação a 180 rpm. Uma alíquota do ciclo I
205 foi usada para iniciar o ciclo II, com condições idênticas. Para o plaqueamento, uma alíquota
206 de 20 µL foi retirada do início e fim de cada etapa (partida, ciclo I e ciclo II) para a diluição
207 seriada em 180 µL de solução salina 0,85 % (Cinética) até 10^{-6} . Logo após, foi realizado o
208 plaqueamento em microplacas de 24 poços (Kasvi®) com ágar MH (Kasvi®), como descrito
209 no ensaio de curva de morte. O ensaio foi realizado em três dias independentes e os dados
210 foram apresentados como a proporção de bactérias sobreviventes em relação à população
211 inicial nos ciclos I e II (Willenborg *et al.*, 2014).

212 **2.8. Quantificação de biofilme**

213 Para cada isolado foi preparado um pré-inóculo em caldo MH (Kasvi®) com incubação a
214 37 °C, sob agitação a 180 rpm por 24 horas. Após a leitura da DO em espectrofotômetro em
215 620 nm (Thermo Fisher SCIENTIFIC), foram preparados inóculos na concentração inicial de
216 6×10^6 UFC/mL. Posteriormente, 195 µL de caldo Triptona Soja (TSB, Acumedia®) com 0,50
217 % de glicose (Isofar®) foram adicionados em microplacas de 96 poços (OLEN) estéril,
218 juntamente com 5 µL da suspensão bacteriana, com incubação a 37 °C por 24 horas. Após
219 este período, a microplaca foi lavada três vezes com 200 µL de água destilada estéril e
220 colocada para secar invertida em papel durante 5 minutos, a temperatura ambiente. Na
221 sequência foram acrescidos, a cada poço, 150 µL de metanol (Isofar®) para fixação por 20
222 minutos, o material foi descartado e a placa foi submetida a secagem durante a noite,
223 igualmente, a temperatura ambiente. Os poços foram corados com 100 µL de violeta de
224 genciana 0,25 % (Proquímios, Rio de Janeiro, Brasil) por 5 minutos. Todos os poços foram
225 novamente lavados três vezes com 200 µL de água destilada e a microplaca foi posta para
226 secar invertida em papel por 5 minutos. Por fim, utilizou-se 200 µL de álcool-acetona (80:20)
227 (Neon/Proquímios) para fazer a análise da absorbância em leitor de microplaca modelo
228 EXPERT PLUS-UV (ASYS, Cambridge, Reino Unido) em 620 nm. Como controle negativo
229 foi utilizado o meio TSB glicosado (Acumedia®) estéril. Os ensaios foram realizados em
230 triplicata biológica em dias independentes (Stepanović *et al.*, 2007; Merino *et al.*, 2009).

231 **2.9. Análise estatística**

232 Os dados de biofilme foram analisados por meio da ANOVA considerando o delineamento
233 inteiramente casualizados em esquema fatorial, onde foi avaliada a produção de biofilme e
234 estas, quando significativas ($p < 0,05$), tiveram suas médias comparadas pelo teste de Tukey
235 ($p < 0,05$). A variável de curva de morte foi analisada via Modelos Lineares Generalizados
236 (GLM), considerando a distribuição de Quasipoisson. Quanto aos dados do ensaio de dose e
237 tempo dependente estes, foram submetidos a *two-way analysis of variance* (ANOVA) com
238 pós-teste de Tukey. As análises estatísticas foram sumarizadas com o auxílio dos softwares R
239 e GraphPad Prism 7[®]. Em todos os testes foi considerado probabilidade de 5% para o erro do
240 tipo I.

241 **3 Resultados**

242 **3.1. Identificação dos isolados**

243 A caracterização realizada pelo MALDI-TOF (Tabela 1) permitiu identificar quatro
244 isolados como *S. aureus* com *scores* acima de 2.000, o que garante a confiabilidade a nível de
245 espécie. Os demais isolados foram identificados como *S. warneri* apesar dos *scores* terem
246 alcançado valores entre 1.700 e 2.000 para a maioria, o que aponta para uma identificação
247 confiável somente em nível de gênero. Contudo, resultados prévios do sequenciamento do
248 genoma (dados não mostrados) confirmam a identificação de *S. warneri* para os isolados Cap
249 9.1, Cap 9.2, Cap 10.1, Cap 10.2, Cap 100.1, Cap 100.2, Cap 101.1 e Cap 101.2.

250 **Tabela 1- Identificação de *Staphylococcus* spp. isolados de mastite caprina por MALDI-**
 251 **TOF.**

Isolados	(melhor alinhamento)	Score	(segundo melhor alinhamento)	Score
Cap 6.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.235	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.234
Cap 6.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.253	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.241
Cap 7.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.289	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.281
Cap 7.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.430	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.405
Cap 9.1	<i>Staphylococcus warneri</i>	1.973	<i>Staphylococcus warneri</i>	1.788
Cap 9.2	<i>Staphylococcus warneri</i>	1.868	<i>Staphylococcus warneri</i>	1.824
Cap 10.1	<i>Staphylococcus warneri</i>	2.005	<i>Staphylococcus warneri</i>	1.891
Cap 10.2	<i>Staphylococcus warneri</i>	1.848	<i>Staphylococcus warneri</i>	1.830
Cap 100.1	<i>Staphylococcus warneri</i>	1.947	<i>Staphylococcus warneri</i>	1.931
Cap 100.2	<i>Staphylococcus warneri</i>	2.206	<i>Staphylococcus warneri</i>	1.871
Cap 101.1	<i>Staphylococcus warneri</i>	1.719	<i>Staphylococcus warneri</i>	1.711
Cap 101.2	<i>Staphylococcus warneri</i>	1.808	<i>Staphylococcus warneri</i>	1.797

252 Cap 6.1, 7.1, 8.1, 9.1, 10.1, 100.1, 101.1 representam os isolados antes do tratamento com enrofloxacina e Cap
 253 6.2, 7.2, 9.2, 10.2, 100.2 e 101.2 após tratamento com enrofloxacina. O score ≥ 2.000 indica uma identificação
 254 em nível de espécie, ≥ 1.700 e < 2.000 uma identificação em nível de gênero, e < 1.700 não possui uma
 255 identificação confiável.

256 3.2. TDtest

257 Inicialmente, foi realizado o ensaio padrão de difusão em disco, com a concentração
 258 comercialmente utilizada de 5 μg , a fim de confirmar o perfil de sensibilidade dos isolados a
 259 ENO. Foi verificado que todos isolados apresentaram halos de inibição com tamanho mínimo
 260 de 21 mm, diâmetro de referência necessário para classificar um micro-organismo como
 261 sensível. Na triagem de tolerância/persistência com concentração de 0,5 μg , eles obtiveram a
 262 classificação de média a alta tolerância/persistência, em função da quantidade de colônias
 263 contadas no halo (Tabela 2). O par de isolados Cap 9.1 e 9.2 ilustra a presença de células
 264 tolerantes/persistentes, após a adição do disco com glicose (Figura 1 C e D). O mesmo
 265 resultado foi observado para os demais isolados (material suplementar). É importante
 266 ressaltar, que este teste não diferencia isolados tolerantes de persistentes, apenas confirma a
 267 ocorrência destes fenômenos nos isolados.

268 **Tabela 2- Padrão de persistência / tolerância de *Staphylococcus* spp. isolados de mastite**
 269 **caprina de acordo com o TDTest.**

Isolados	Enrofloxacina (5 mcg) mm	Enrofloxacina (0,5 mcg) mm	Tipo de tolerância/persistência
Cap 6.1	21	21	Média
Cap 6.2	22	20	Média
Cap 7.1	22	21	Média
Cap 7.2	22	20	Média
Cap 9.1	28	22	Alta
Cap 9.2	28	20	Alta
Cap 10.1	28	21	Alta
Cap 10.2	27	20	Alta
Cap 100.1	27	20	Alta
Cap 100.2	28	20	Alta
Cap 101.1	28	20	Alta
Cap 101.2	27	20	Alta

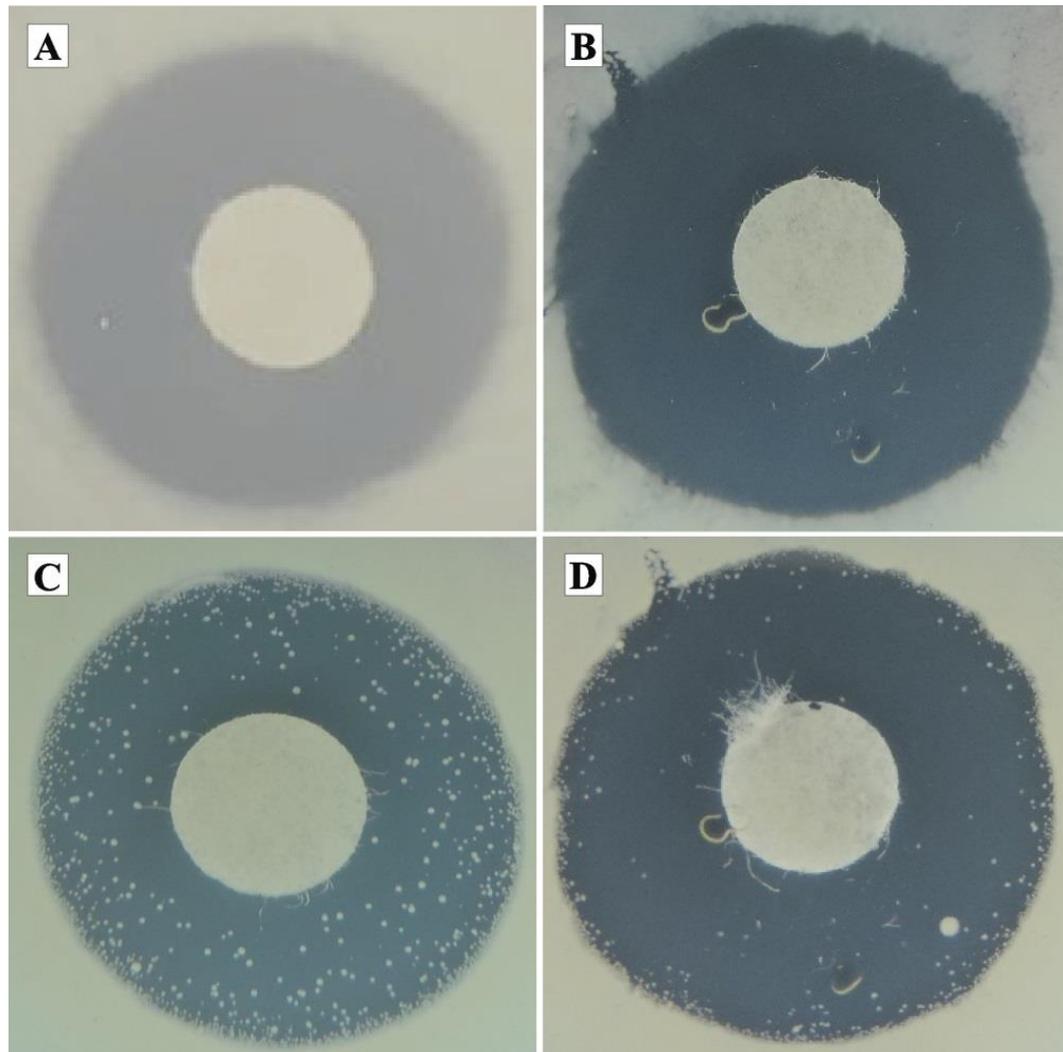
270 Cap 6.1, 7.1, 8.1, 9.1, 10.1, 100.1, 101.1 representam os isolados antes do tratamento com enrofloxacina e Cap
 271 6.2, 7.2, 9.2, 10.2, 100.2 e 101.2 após tratamento com enrofloxacina. Baixa tolerância/persistência – 1 a 10
 272 colônias; média – 10 a 100 colônias; Alta – mais de 100 colônias.

273

274

CAP 9.1

CAP 9.2



275

276

277 **Figura 1. TDtest em ágar MH dos isolados Cap 9.1 e 9.2. (A e B) – MH e o disco de**
 278 **enrofloxacina 0,5 µg; (C e D) – MH e as células reativadas após a incubação com glicose**
 279 **40%.**

280 3.3. Sensibilidade dos isolados de *Staphylococcus* spp. à enrofloxacina

281 A microdiluição em caldo foi realizada com a finalidade de confirmar a sensibilidade dos
 282 isolados, através de um teste mais preciso. Adicionalmente, os valores de CIM, encontrados
 283 para cada isolado, serviram de parâmetros para a curva de morte, ensaio de persistência dose
 284 depende e ensaio de persistência tempo dependente. Todos os isolados testados foram
 285 suscetíveis a ENO (Tabela 3). Apesar desse antibiótico ser amplamente utilizado nas
 286 propriedades das quais os micro-organismos foram adquiridos, a CBM e CIM ficaram abaixo
 287 do *breakpoint* de 4 µg/mL, variando entre 0,12 a 1,95 µg/mL.

288

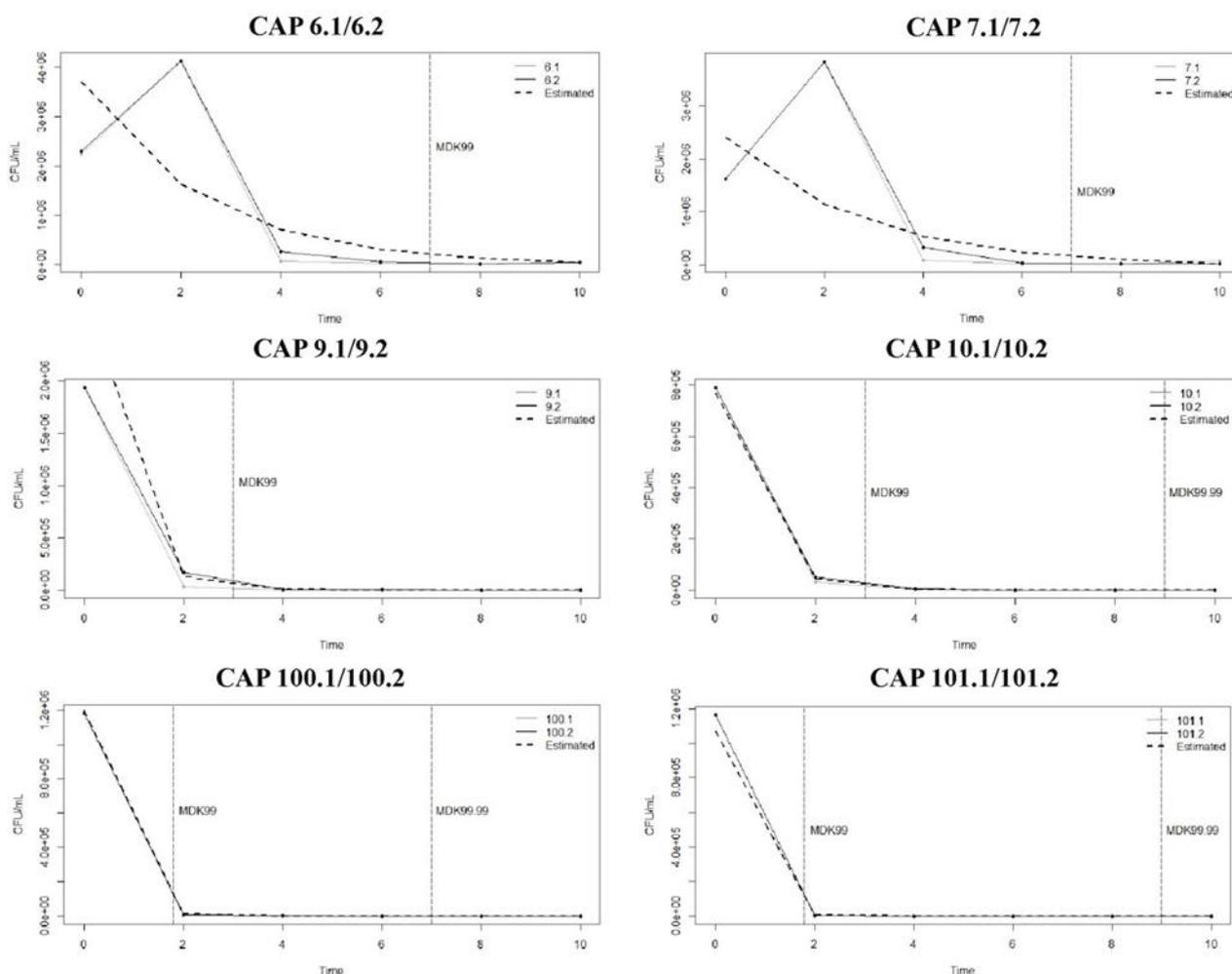
289 **Tabela 3- Concentração Bactericida Mínima e Concentração Inibitória Mínima da**
 290 **enrofloxacina sobre *Staphylococcus* spp. isolados de mastite caprina.**

Isolados	Enrofloxacina	
	CBM	CIM
Cap 6.1	0,12 µg/mL	0,12 µg/mL
Cap 6.2	0,12 µg/mL	0,12 µg/mL
Cap 7.1	0,12 µg/mL	0,12 µg/mL
Cap 7.2	0,12 µg/mL	0,12 µg/mL
Cap 9.1	0,24 µg/mL	0,97 µg/mL
Cap 9.2	0,24 µg/mL	0,48 µg/mL
Cap 10.1	0,24 µg/mL	0,48 µg/mL
Cap 10.2	0,24 µg/mL	0,48 µg/mL
Cap 100.1	1,95 µg/mL	1,95 µg/mL
Cap 100.2	0,48 µg/mL	1,95 µg/mL
Cap 101.1	1,95 µg/mL	1,95 µg/mL
Cap 101.2	0,48 µg/mL	1,95 µg/mL

291 Cap 6.1, 7.1, 8.1, 9.1, 10.1, 100.1, 101.1 representam os isolados antes do tratamento com enrofloxacina e Cap
 292 6.2, 7.2, 9.2, 10.2, 100.2 e 101.2 após tratamento com enrofloxacina. CBM: concentração Bactericida Mínima.
 293 CIM: concentração Inibitória Mínima. Breakpoint para enrofloxacina: 4 µg / mL.

294 3.4. Curva de morte

295 A seleção potencial de células tolerantes ou persistentes de *Staphylococcus* spp. foi
 296 investigada através da curva de morte com ENO. É uma determinação quantitativa e
 297 diferenciação de células tolerantes de persistentes. Na curva de morte, os 12 isolados
 298 mostraram bactérias que sobreviveram ao período máximo de 10 horas do teste (Figura 2).
 299 Com base no MDK, os isolados de *S. aureus* testados mostraram tolerância, enquanto *S.*
 300 *warneri* mostrou persistência para ENO. Para os isolados Cap 6.1 e 7.2, a população alcançou
 301 o MDK 99 no intervalo entre 6 e 8 horas. No entanto, os isolados Cap 6.2 e 7.1 não
 302 alcançaram o referido MDK, nem mesmo, no último período avaliado de 10 horas. Todos *S.*
 303 *warneri* foram classificados como persistentes, uma vez que foi observado um MDK 99 no
 304 intervalo entre 2 e 4 horas para os isolados Cap 9.1, 9.2, 10.1 e 10.2, e no intervalo entre 0 e 2
 305 horas para Cap 100.1, 100.2, 101.1 e 101.2, enquanto, o MDK 99,99 levou maior tempo para
 306 ser alcançado. O isolado Cap 100.1 atingiu o MDK 99,99 no intervalo entre 6 e 8 horas,
 307 enquanto, os isolados Cap 10.1 e 101.1 alcançaram o mesmo MDK no intervalo entre 8 e 10
 308 horas. Os demais isolados (Cap 9.1, 9.2, 10.2, 100.2 e 101.2) não alcançaram o MDK 99,99,
 309 nem mesmo, no período máximo de avaliação. Não foi observada diferença significativa entre
 310 os pares durante o ensaio.



311

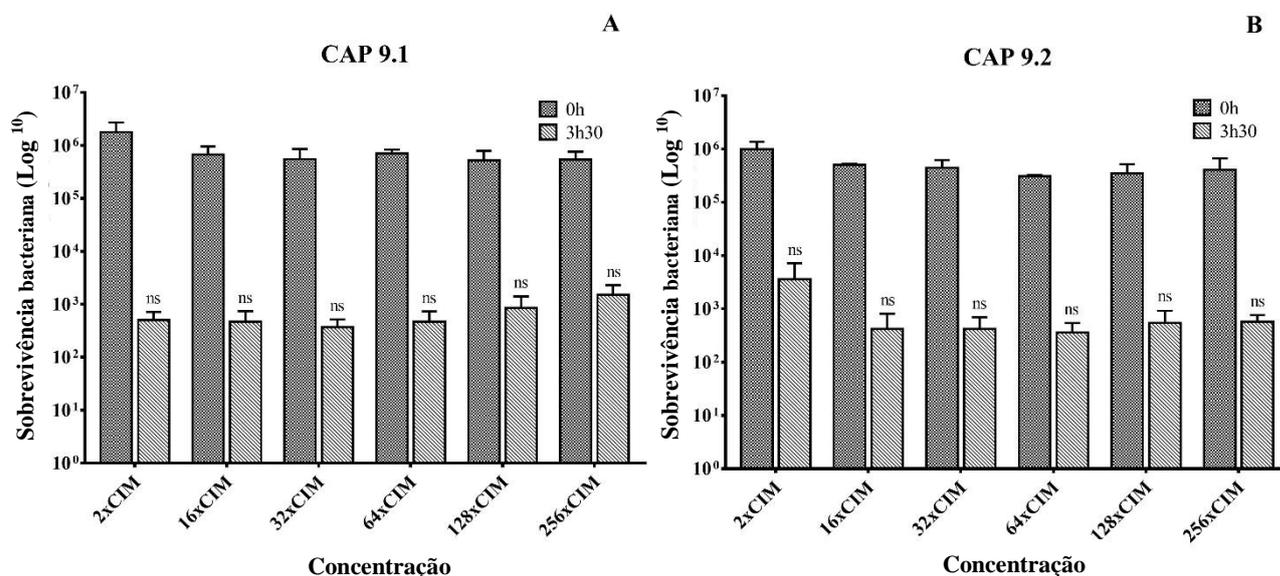
312 **Figura 2. Curva de morte de *Staphylococcus* spp. isolados de mastite caprina desafiados**
 313 **com enrofloxacina.** Isolados Cap 6.1, 7.1, 8.1, 9.1, 10.1, 100.1, 101.1 representam os
 314 isolados antes do tratamento com enrofloxacina e Cap 6.2, 7.2, 9.2, 10.2, 100.2 e 101.2 após
 315 tratamento com enrofloxacina. A concentração do antibiótico utilizada correspondia a 2xCIM
 316 de cada isolado. O *minimum duration for killing* (MDK 99) representa a eliminação de 99%
 317 da população bacteriana e o MDK 99,99 corresponde a morte de 99,99% da população. Os
 318 valores obtidos na curva de morte foram sujeitos ao teste Quasipoisson com pós-teste Tukey
 319 ($p < 0,05$).

320 3.5. Ensaio de persistência dose depende

321 Nesta análise, não foi utilizado o MDK 99,99, uma vez que na curva de morte os isolados
 322 Cap 9.1 e 9.2 não alcançaram este índice até o último tempo testado (10 horas). Portanto, foi
 323 adotado o MDK 99 como referência, o qual foi identificado na curva de morte no intervalo
 324 entre 2 e 4 horas. Testes prévios (não mostrados) demonstraram que 3h30min foi o tempo
 325 exato para alcançar o MDK 99. Esse ensaio permitiu identificar que os isolados Cap 9.1 e 9.2
 326 não apresentaram persistência do tipo dose dependente, uma vez que foi possível observar
 327 sobrevivência bacteriana mesmo na maior concentração de antibiótico testada – 256xCIM. Ao
 328 comparar as diferentes concentrações, no T3h30m, foi verificado que a população bacteriana
 329 dos isolados apresentou comportamento semelhante com relação à sobrevivência, mesmo nas
 330 concentrações crescentes de antibiótico (Figura 3A e B). Desta forma, os resultados
 331 apresentados mostraram que não houve diferença significativa entre as concentrações testadas

332 no último período avaliado para ambos isolados. É importante ressaltar, que os isolados
 333 testados alcançaram o MDK 99 em todas as concentrações testadas, confirmando os
 334 resultados obtidos a partir de curva de morte que identificaram a persistência destes isolados
 335 de *S. warneri*.

336

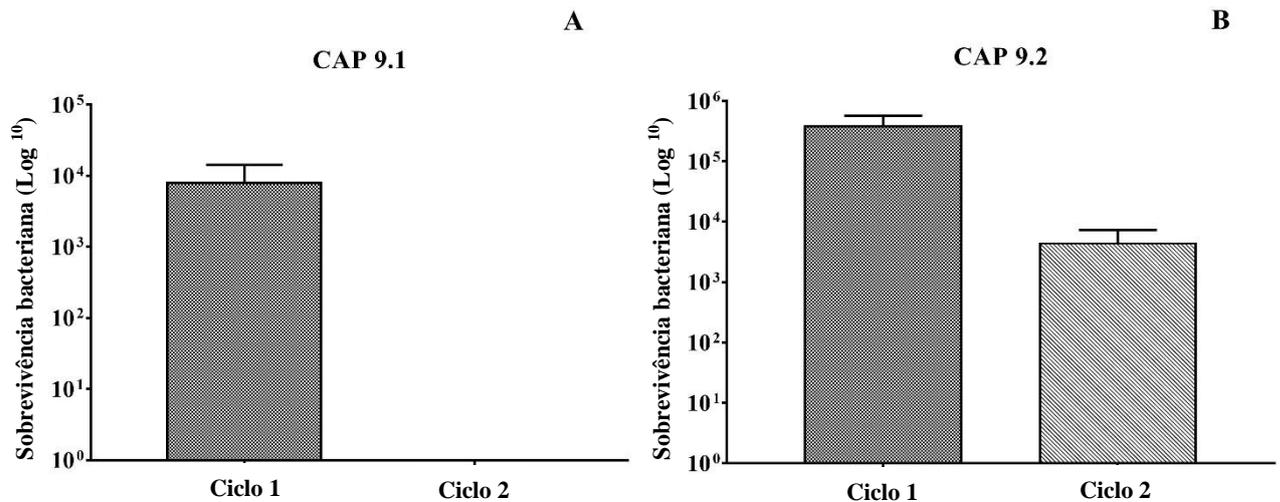


337

338 **Figura 3. (A) Ensaio de persistência dose dependente em *Staphylococcus warneri* isolados**
 339 **de mastite caprina. (A)** Desafio com diferentes concentrações de ENO (2, 16, 32, 64, 128 e
 340 256xCIM) para o isolado antes do tratamento (Cap 9.1). **(B)** Desafio com diferentes
 341 concentrações de ENO (2, 16, 32, 64, 128 e 256xCIM) para o isolado após o tratamento com
 342 ENO (Cap 9.2). Os dados foram apresentados através dos valores médios \pm desvio padrão
 343 para as diferentes condições, utilizando *two-way analysis of variance* (ANOVA) com *pos-hoc*
 344 Tukey a nível de significância 5% no software GraphPad Prism7[®].

345 3.6. Ensaio de persistência tempo dependente (eliminação de persistentes)

346 Tendo em vista que os isolados Cap 9.1 e 9.2 não foram classificados como persistente
 347 dose dependente, foi realizado o ensaio de eliminação de células persistentes a fim de
 348 identificar qual é o tipo de persistência dependente de tempo (tipo I ou II). De acordo com a
 349 figura 5, em ambos isolados (Cap 9.1 e 9.2), a proporção de células persistentes diminuiu
 350 após o desafio de 2xCIM com ENO. Essa exposição ocorreu com uma população bacteriana
 351 em fase exponencial de crescimento. A mesma situação foi observada no ciclo II para a cepa
 352 9.2, contudo, o isolado 9.1 foi completamente eliminado. Os dados apontam que a
 353 persistência desenvolvida por esses isolados à ENO é do tipo I, ou seja, ocorre na fase de
 354 latência, período do ciclo de crescimento bacteriano durante o qual as células podem ser
 355 protegidas temporariamente da morte por antibióticos, uma vez que, os isolados bacterianos
 356 não crescem e precisam adaptar-se metabolicamente ao aumento de nutriente para a
 357 ocorrência da fase exponencial (Brauner *et al.*, 2016).

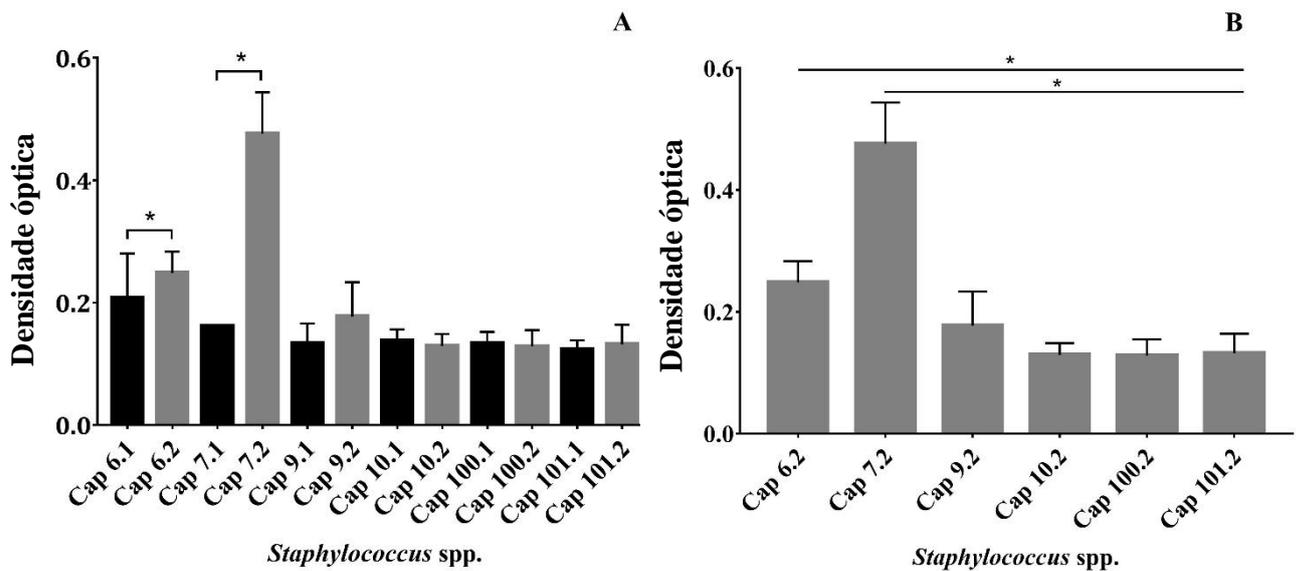


358

359 **Figura 4. (A) Ensaio de persistência tempo dependente em *Staphylococcus warneri***
 360 **isolados de mastite caprina. (A)** Representação da fase inicial de crescimento exponencial
 361 no primeiro e segundo ciclo com o isolado adquirido de mastite antes do tratamento com
 362 ENO (Cap 9.1). **(B)** Representação da fase inicial de crescimento exponencial no primeiro e
 363 segundo ciclo com o isolado adquirido de mastite depois do tratamento com ENO (Cap 9.2).
 364 Dados descritos para cada ciclo com a proporção de bactérias sobreviventes relativos ao
 365 inóculo inicial. Os dados foram apresentados através dos valores médios \pm desvio padrão para
 366 as diferentes condições, utilizando *two-way analysis of variance* (ANOVA) com *pos-hoc*
 367 Tukey a nível de significância 5% no software GraphPad Prism7[®].

368 3.7. Quantificação de biofilme

369 Neste teste foi possível observar que todos os isolados apresentaram formação de biofilme,
 370 ainda que em diferentes níveis. Ao avaliar as bactérias antes e após o tratamento com ENO, os
 371 pares de isolados de *S. aureus*, Cap 6.1/6.2 e 7.1/7.2, apresentaram diferença significativa,
 372 mostrando que eles produziram mais biofilme após o tratamento com ENO. Para *S. warneri*
 373 não houve diferença entre os pares (Figura 5A). Quando, apenas os isolados de 21 dias após o
 374 tratamento com ENO foram comparados entre si, a produção de biofilme entre os isolados
 375 Cap 6.2 e 7.2, e deles contra os demais apresentou diferença significativa, sendo Cap 7.2 o
 376 maior produtor de biofilme (Figura 5B).



377

378 **Figura 5. (A) Produção de biofilme por *Staphylococcus* spp. isolados de mastite caprina.**
 379 (A) Comparação entre os isolados antes do tratamento (Cap 6.1, 7.1, 8.1, 9.1, 10.1, 100.1,
 380 101.1) e pós tratamento com ENO (Cap 6.2, 7.2, 9.2, 10.2, 100.2 e 101.2). (B) A produção de
 381 biofilme apenas dos isolados após o tratamento com ENO. Os dados são apresentados com
 382 média ± desvio padrão, e as diferenças entre os grupos foram comparadas usando teste F com
 383 *pos-hoc* Tukey ($p < 0,05$).

384 4 Discussão

385 As fluoroquinolonas possuem atividade bactericida contra uma gama de bactérias gram-
 386 positivas, entre elas, *Staphylococcus* spp. (Mavrogianni *et al.*, 2011). Nesta classe, tem-se a
 387 enrofloxacin, um antibiótico amplamente utilizado no tratamento da mastite, tanto em
 388 pequenos como em grandes ruminantes, e parece ter um importante papel na incidência de
 389 patógenos zoonóticos resistentes às drogas (Serrano-Rodríguez *et al.*, 2017). Além disso, a
 390 enrofloxacin é amplamente utilizada na medicina veterinária na terapia de diversas
 391 enfermidades. Além da mastite, inclui-se a colite granulomatosa, pneumonia e infecções
 392 bacterianas que afetam a aquicultura (Makielski *et al.*, 2019; Dudek *et al.*, 2019; Martinez *et*
 393 *al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2017). A resistência às fluoroquinolonas pode ocorrer, tipicamente,
 394 como resultado de alterações nas enzimas alvo, DNA girase e topoisomerase IV, ou sistemas
 395 de efluxo multidrogas (Jacoby, 2005).

396 Os animais, a partir dos quais os isolados foram obtidos, eram criados em regime intensivo
 397 em uma propriedade destinada à produção e comercialização de leite caprino. Eles
 398 apresentavam mastite clínica e foram tratados com ENO (fluoroquinolona), sendo
 399 administrada dose diária de 5 mg/kg durante sete dias. Após 21 dias de tratamento, os animais
 400 foram reexaminados e assim foi constatada a ocorrência da mastite persistente (Lima *et al.*,
 401 2020). O histórico da fazenda indica o uso prévio e contínuo de ENO para tratamento de
 402 animais, o que reforça os fenômenos de tolerância e persistência observados.

403 Tratamentos prolongados com antibiótico associado ao uso indiscriminado podem não só
 404 selecionar isolados resistentes, como também, representam fatores indutores de fenômenos
 405 como a tolerância e persistência (Cohen *et al.*, 2013; Fisher *et al.*, 2017; Gollan *et al.*, 2019).
 406 Experimentos de seleção *in vitro* usando tratamentos diários com antibióticos que resultaram
 407 em níveis de tolerância aumentados, tanto em *E. coli* quanto em *S. aureus* (Fridman *et al.*,
 408 2014; Mechler *et al.*, 2016), destacam que a seleção natural, imposta pela frequência de

409 tratamentos com antibióticos, atua de maneira significativa sobre a capacidade de gerar
410 persistência de risco (Van Den Berg *et al.*, 2017).

411 Bactérias persistentes e tolerantes podem ser mais prontamente induzidas por antibióticos a
412 tornarem-se resistentes (Frimodt-Møller & Løbner-olesen, 2019), sugerindo o benefício de
413 uma seleção evolutiva positiva para a persistência. Barret *et al.* (2019), usando microscopia de
414 lapso de tempo para monitorar populações de *E. coli* expostas a ofloxacina, descobriram que a
415 persistência desenvolvida induziu uma resposta SOS rigorosa, antes de retornar à fenótipo
416 normal. As populações persistentes após exposição a fluoroquinolonas continham quantidades
417 substancialmente maiores de mutantes resistentes a antibióticos do que aquelas não tratadas,
418 sugerindo que estes antimicrobianos podem acelerar o desenvolvimento de resistência em
419 uma faixa ampla de concentrações e em classes de antibióticos não relacionadas. Levin-
420 Reisman *et al.* (2019) afirmam que um possível mecanismo que poderia favorecer esse efeito
421 de interação entre os eventos, é que os fatores de resistência se mostram mais eficazes quando
422 a célula está inativa ou em estado de crescimento lento. Isso pode ser justificado pela
423 superexpressão transitória de fatores de virulência, por exemplo, pela maior expressão de
424 bombas de efluxos em células persistentes (Pu *et al.*, 2016).

425 Nesse estudo, foi detectado que todos isolados apresentavam de média a alta
426 tolerância/persistência, utilizando uma técnica de triagem, o TDtest. Esse método, apesar de
427 ser apenas semi-quantitativo e não ter a capacidade de diferenciar os fenômenos de tolerância
428 e persistência, mostrou ser uma ferramenta útil e prática para a identificação desses
429 fenômenos em isolados de *Staphylococcus* spp.. Fato que facilitaria muito o processo de
430 diagnóstico em casos de muitos isolados a serem testados, principalmente no contexto de
431 hospitais humanos e veterinários. A implementação de experimentos de curva de morte,
432 apesar de ser um método quantitativo e bastante eficaz (Gefen *et al.*, 2017; Kotková *et al.*,
433 2019), tornaria o diagnóstico mais oneroso e demorado na rotina de laboratórios de
434 microbiologia clínica. Portanto, recomendado para ser utilizado apenas na pesquisa.

435 O ensaio de curva de morte evidenciou que os isolados de *S. warneri* são persistentes,
436 enquanto, *S. aureus* apresenta o perfil tolerante. Isso demonstra que não houve diferença a
437 nível fenotípico entre os pares (antes e após o tratamento) sugerindo que este fator pode
438 ser apresentado em função do uso sucessivo de ENO no rebanho. Contudo, estudos
439 genômicos são capazes de verificar a existência de diferenças genéticas entre eles. Esses
440 fenômenos são temas muitos novos e ainda pouco explorados. Logo, neste estudo, adotou-se a
441 curva de morte associada ao MDK, modelo proposto por Brauner *et al.* (2016), para
442 diferenciação entre isolados tolerantes e persistentes. Os estudos descritos na literatura estão
443 voltados diretamente para os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo e sua
444 ocorrência em bactérias de origem humana (Dörr *et al.*, 2009; Pu *et al.*, 2016; Barret *et al.*,
445 2019). Portanto, é importante enfatizar que este estudo é pioneiro em relatar a incidência dos
446 eventos de tolerância e persistência, bem como sua disseminação em isolados clínicos de
447 animais. A presença desses perfis em rebanhos caprinos pode favorecer o aumento de doenças
448 crônicas (Fisher *et al.*, 2017; Gollan *et al.* 2019) e a transmissão desses isolados para outros
449 animais, ambiente e humanos é muito importante, considerando os conceitos de saúde
450 (Baquero *et al.*, 2019).

451 Vários estudos evidenciaram que as fluoroquinolonas são agentes pertinentes em
452 desencadear persistência em bactérias (Dörr *et al.*, 2010; Serrano-Rodríguez *et al.*, 2017;
453 Barret *et al.*, 2019). Em *E. coli*, a persistência foi formada após exposição à ciprofloxacina, de
454 uma maneira dependente da resposta SOS. Ficou demonstrado que em todas as células
455 submetidas a ciprofloxacina a resposta SOS foi induzida, mas nem todas se tornaram
456 persistentes. Nesse caso, a indução funcional da resposta SOS foi mais importante para formar
457 as células persistentes, do que um alto nível de expressão (Dörr *et al.*, 2009).

458 Os fenótipos de tolerância e persistência são estimulados por fatores externos, como a
459 restrição de nutrientes, o antibiótico, o ambiente do hospedeiro etc. (Brauner *et al.*, 2016).
460 Esses aspectos se correlacionam com os altos níveis celulares observados em biofilmes
461 (Cabral *et al.*, 2018), como foi demonstrado em estudo realizado por Harms *et al.* (2016), no
462 qual os biofilmes apresentavam limitação de nutrientes e oxigênio, além de conter proporções
463 muito altas de células persistentes, estimulando uma resposta rigorosa. Esses achados
464 permitem inferir que a produção de biofilme pelos isolados de *Staphylococcus* spp., objeto do
465 estudo em questão, viabilizam a ocorrência da persistência bacteriana.

466 O sistema *Agr* é relevante no controle da expressão de proteínas e toxinas da superfície, e
467 essencial na capacidade de *S. aureus* formar biofilmes, invadir e persistir nas células
468 hospedeiras (Xue *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2017). Todo esse arsenal pode favorecer a
469 sobrevivência nas diferentes espécies de *Staphylococcus* spp. a condições adversas, geradas
470 pelo hospedeiro ou pela intervenção da terapia antibiótica (Yan & Bassler, 2019). É notório
471 que as células que compõem o biofilme são substancialmente (4 X) mais tolerantes que as
472 células em estado livre a vários antibióticos, pois os fármacos são menos capazes de se
473 infiltrar nas partes mais profundas da estrutura. Além disso, as baixas concentrações de
474 oxigênio e a pouca disponibilidade de nutrientes para as bactérias, nesses locais, as tornam
475 metabolicamente inativas (Wood *et al.*, 2013), uma das características da tolerância e
476 persistência.

477 Outro mecanismo associado a ocorrência destes eventos são os sistemas de efluxo (Pu *et*
478 *al.*, 2016). Em um ensaio preliminar com brometo de etídio (dados não mostrados), os
479 isolados não apresentaram bomba de efluxo ativa. Esse fenótipo é condizente com a
480 persistência do tipo I identificada nesse estudo, uma vez que a super-expressão desses
481 sistemas é característica da persistência do tipo II (Brauner *et al.*, 2016).

482 A constatação da persistência dependente de tempo *by lag* (tipo I) nos experimentos
483 realizados, indica que possivelmente fatores externos de estresse como a restrição de
484 nutrientes (Wiuff & Andersosn, 2007; Willerborg *et al.*, 2014), fatores do hospedeiro (Manina
485 *et al.*, 2015) e mesmo o próprio antibiótico (Wiuff & Andersosn 2007; Johnson & Levin
486 2013, Peyrusson *et al.*, 2020) estimularam a ocorrência desse evento nos isolados avaliados.
487 Todos esses elementos podem ser acionados como reflexo da resposta rigorosa ao estresse, o
488 que induz o micro-organismo a um estado fisiológico reduzido na fase de latência (Brauner *et*
489 *al.*, 2016), característica intrínseca da persistência dependente de tempo *by lag*.
490 Adicionalmente, a fase de latência confere um amplo efeito protetor à sobrevivência das
491 células bacterianas, possibilitando a tolerância a inúmeros antibióticos (Fridman *et al.*, 2014).
492 Interessantemente, foi relatado que este tipo de persistência decorre quando a
493 antibioticoterapia é aplicada por um período menor que o tempo de duração da fase de
494 latência (Balaban *et al.*, 2004; Jöers *et al.* 2010) contribuindo dessa forma, para o insucesso do
495 tratamento.

496 A confirmação da presença de bactérias tolerantes ou persistentes no rebanho, que
497 sobrevivem mesmo após o tratamento antibiótico, indica um sério risco de disseminação
498 destes micro-organismos para o ambiente e humanos. Os fenômenos de persistência e
499 tolerância são uma forma direta de evolução da multirresistência em bactérias (Fisher *et al.*,
500 2017) e é uma grande preocupação na saúde pública global encontrar isolados de
501 *Staphylococcus* spp. tolerantes e persistentes em leite, especialmente *S. aureus*, uma vez que
502 esta espécie secreta toxinas termoestáveis, o que aumenta o papel zoonótico desses patógenos
503 em causar doenças transmitidas por alimentos (Manser 1986, Vyletřlová *et al.*, 2014; Dore *et*
504 *al.*, 2016).

505 **5 Conclusão**

506 Este estudo mostrou que a tolerância e persistência podem ocorrer em bactérias isoladas de
507 espécies diferentes de humanos. A tolerância encontrada em *S. aureus* e persistência em *S.*
508 *warneri* podem indicar que o tipo de resposta desenvolvida ao antibiótico possa ser espécie-
509 específica, uma vez que eles podem possuir estratégias e fatores de virulência diferentes. A
510 ocorrência deste fenômeno foi associada ao uso da enrofloxacina em animais, destacando a
511 importância do critério e do monitoramento do uso de fluoroquinolona em terapias
512 antimicrobianas. Vale ressaltar que, a produção de biofilme por ambas as espécies pode ter
513 beneficiado significativamente, para a tolerância à enrofloxacina. Além disso, os isolados
514 selecionados apresentaram persistência dependente de tempo do tipo I. Os estudos ômicos,
515 como a genômica e transcriptômica, são ferramentas úteis que permitirão avaliar a
516 plasticidade genômica e os principais mecanismos associados. A partir disso, será possível
517 estabelecer estratégias de diagnóstico e eliminação eficientes de isolados com tolerância ou
518 persistência.

519 **6 Conflito de Interesse**

520 Os autores declaram que a pesquisa foi realizada na ausência de quaisquer relações comerciais
521 ou financeiras que pudessem ser interpretadas como um potencial conflito de interesses.

522 **7 Contribuição dos Autores**

523 Pesquisa projetada por MC, VA, MM, RS, CF, DR, IP e GE realizaram pesquisas. CF, DR,
524 RS, IP, GE, HB, JA, ML, MM, HF, VA, MC analisaram os dados e escreveram o artigo.
525 Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito.

526 **8 Financiamento**

527 Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
528 Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Os autores também
529 agradecem o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de
530 Pernambuco (FACEPE - Processo APQ-0587-5.05/15), ao Conselho Nacional de
531 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Processo 305755/2016-1), e a
532 Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

533 **9 Agradecimentos**

534 Os autores agradecem o apoio do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
535 Tecnológico), da FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de
536 Pernambuco) e da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior,
537 Brasília, Brasil).

538 **10 Referências**

539 Assis, G. B. N., Pereira, F. L., Zegarra, A. U., Tavares, G. C., Leal, C. A., and Figueiredo, H.
540 C. P. (2017). Use of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Fast Identification of
541 Gram-Positive Fish Pathogens. *Front. Microbiol.* 8, 1492.
542 doi:10.3389/fmicb.2017.01492.

- 543 Balaban, N. Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L., and Leibler, S. (2004). Bacterial
544 Persistence as a Phenotypic Switch. *Science* 305, 1622–1625.
545 doi:10.1126/science.1099390.
- 546 Baquero, F., Coque, T. M., Martínez, J.-L., Aracil-Gisbert, S., and Lanza, V. F. (2019). Gene
547 Transmission in the One Health Microbiosphere and the Channels of Antimicrobial
548 Resistance. *Front. Microbiol.* 10, 2892. doi:10.3389/fmicb.2019.02892.
- 549 Barlow, J. (2011). Mastitis Therapy and Antimicrobial Susceptibility: a Multispecies Review
550 with a Focus on Antibiotic Treatment of Mastitis in Dairy Cattle. *J Mammary Gland*
551 *Biol Neoplasia* 16, 383–407. doi:10.1007/s10911-011-9235-z.
- 552 Baron, F., Cochet, M.-F., Ablain, W., Grosset, N., Madec, M.-N., Gonnet, F., et al. (2006).
553 Rapid and cost-effective method for micro-organism enumeration based on
554 miniaturization of the conventional plate-counting technique. *Lait* 86, 251–257.
555 doi:10.1051/lait:2006005.
- 556 Barrett, T. C., Mok, W. W. K., Murawski, A. M., and Brynildsen, M. P. (2019). Enhanced
557 antibiotic resistance development from fluoroquinolone persisters after a single exposure
558 to antibiotic. *Nat Commun* 10, 1177. doi:10.1038/s41467-019-09058-4.
- 559 Bitrus, A. A., Peter, O. M., Abbas, M. A., and Goni, M. D. (2018). Staphylococcus aureus: A
560 Review of Antimicrobial Resistance Mechanisms. *VSRR* 4.
561 doi:10.17582/journal.vsr/2018/4.2.43.54.
- 562 Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O., and Balaban, N. Q. (2016). Distinguishing between
563 resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat Rev Microbiol* 14, 320–
564 330. doi:10.1038/nrmicro.2016.34.
- 565 Cabral, D., Wurster, J., and Belenky, P. (2018). Antibiotic Persistence as a Metabolic
566 Adaptation: Stress, Metabolism, the Host, and New Directions. *Pharmaceuticals* 11, 14.
567 doi:10.3390/ph11010014.
- 568 Ceniti, C., Britti, D., Santoro, A. M. L., Musarella, R., Ciambrone, L., Casalinuovo, F., et al.
569 (2017). Phenotypic antimicrobial resistance profile of isolates causing clinical mastitis in
570 dairy animals. *Ital J Food Safety* 6. doi:10.4081/ijfs.2017.6612.
- 571 CLSI 2014. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow
572 Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA:
573 Clinical and Laboratory Standards Institute.
- 574 Cohen, N. R., Lobritz, M. A., and Collins, J. J. (2013). Microbial Persistence and the Road to
575 Drug Resistance. *Cell Host & Microbe* 13, 632–642. doi:10.1016/j.chom.2013.05.009.
- 576 Contreras, A., Sierra, D., Sánchez, A., Corrales, J. C., Marco, J. C., Paape, M. J., et al. (2007).
577 Mastitis in small ruminants. *Small Ruminant Research* 68, 145–153.
578 doi:10.1016/j.smallrumres.2006.09.011.
- 579 Daddaoua, A., Puerta, V., Requena, P., Martínez-Férez, A., Guadix, E., Sánchez de Medina,
580 F., et al. (2006). Goat Milk Oligosaccharides Are Anti-Inflammatory in Rats with

- 581 Hapten-Induced Colitis. *The Journal of Nutrition* 136, 672–676.
582 doi:10.1093/jn/136.3.672.
- 583 de Oliveira, T. F., Queiroz, G. A., Teixeira, J. P., Figueiredo, H. C. P., and Leal, C. A. G.
584 (2018). Recurrent *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis*
585 *niloticus*) treated with florfenicol. *Aquaculture* 493, 51–60.
586 doi:10.1016/j.aquaculture.2018.04.037.
- 587 Dore, S., Liciardi, M., Amatiste, S., Bergagna, S., Bolzoni, G., Caligiuri, V., et al. (2016).
588 Survey on small ruminant bacterial mastitis in Italy, 2013–2014. *Small Ruminant*
589 *Research* 141, 91–93. doi:10.1016/j.smallrumres.2016.07.010.
- 590 Dörr, T., Lewis, K., and Vulić, M. (2009). SOS Response Induces Persistence to
591 Fluoroquinolones in *Escherichia coli*. *PLoS Genet* 5, e1000760.
592 doi:10.1371/journal.pgen.1000760.
- 593 Dörr, T., Vulić, M., and Lewis, K. (2010). Ciprofloxacin Causes Persister Formation by
594 Inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. *PLoS Biol* 8, e1000317.
595 doi:10.1371/journal.pbio.1000317.
- 596 Dudek, K., Bednarek, D., Ayling, R. D., Kycko, A., & Reichert, M. (2019). Preliminary study
597 on the effects of enrofloxacin, flunixin meglumine and pegbovigrastim on *Mycoplasma*
598 *bovis* pneumonia. *BMC veterinary research*, 15(1), 371. doi:10.1186/s12917-019-2122-
599 3.
- 600 Fauvart, M., De Groote, V. N., and Michiels, J. (2011). Role of persister cells in chronic
601 infections: clinical relevance and perspectives on anti-persister therapies. *Journal of*
602 *Medical Microbiology* 60, 699–709. doi:10.1099/jmm.0.030932-0.
- 603 Fisher, R. A., Gollan, B., and Helaine, S. (2017). Persistent bacterial infections and persister
604 cells. *Nat Rev Microbiol* 15, 453–464. doi:10.1038/nrmicro.2017.42.
- 605 Fridman, O., Goldberg, A., Ronin, I., Shoresh, N., and Balaban, N. Q. (2014). Optimization of
606 lag time underlies antibiotic tolerance in evolved bacterial populations. *Nature* 513, 418–
607 421. doi:10.1038/nature13469.
- 608 Frimodt-Møller, J., and Løbner-Olesen, A. (2019). Efflux-Pump Upregulation: From
609 Tolerance to High-level Antibiotic Resistance? *Trends in Microbiology* 27, 291–293.
610 doi:10.1016/j.tim.2019.01.005.
- 611 Gebrewahid, T., Abera, B., and Menghistu, H. (2012). Prevalence and Etiology of Subclinical
612 Mastitis in Small Ruminants of Tigray Regional State, North Ethiopia. *Vet. World*, 103.
613 doi:10.5455/vetworld.2012.103-109.
- 614 Gefen, O., and Balaban, N. Q. (2009). The importance of being persistent: heterogeneity of
615 bacterial populations under antibiotic stress. *FEMS Microbiol Rev* 33, 704–717.
616 doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00156.x.
- 617 Gefen, O., Chekol, B., Strahilevitz, J., and Balaban, N. Q. (2017). TDtest: easy detection of
618 bacterial tolerance and persistence in clinical isolates by a modified disk-diffusion assay.
619 *Sci Rep* 7, 41284. doi:10.1038/srep41284.

- 620 Gollan, B., Grabe, G., Michaux, C., and Helaine, S. (2019). Bacterial Persisters and Infection:
621 Past, Present, and Progressing. *Annu. Rev. Microbiol.* 73, 359–385.
622 doi:10.1146/annurev-micro-020518-115650.
- 623 Grant, S. S., and Hung, D. T. (2013). Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance, and
624 the oxidative stress response. *Virulence* 4, 273–283. doi:10.4161/viru.23987.
- 625 Haenlein, G. F. W. (2004). Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research* 51, 155–
626 163. doi:10.1016/j.smallrumres.2003.08.010.
- 627 Handwerger, S., and Tomasz, A. (1985). Antibiotic Tolerance Among Clinical Isolates of
628 Bacteria. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 25, 349–380.
629 doi:10.1146/annurev.pa.25.040185.002025.
- 630 Harms, A., Maisonneuve, E., and Gerdes, K. (2016). Mechanisms of bacterial persistence
631 during stress and antibiotic exposure. *Science* 354, aaf4268.
632 doi:10.1126/science.aaf4268.
- 633 Jacoby, G. A. (2005). Mechanisms of Resistance to Quinolones. *Clinical Infectious Diseases*
634 41, S120–S126. doi:10.1086/428052.
- 635 Jöers, A., Kaldalu, N., and Tenson, T. (2010). The Frequency of Persisters in *Escherichia coli*
636 Reflects the Kinetics of Awakening from Dormancy. *JB* 192, 3379–3384.
637 doi:10.1128/JB.00056-10.
- 638 Johnson, P. J. T., and Levin, B. R. (2013). Pharmacodynamics, Population Dynamics, and the
639 Evolution of Persistence in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Genet* 9, e1003123.
640 doi:10.1371/journal.pgen.1003123.
- 641 Koop, G., De Vliegher, S., De Visscher, A., Supré, K., Haesebrouck, F., Nielen, M., et al.
642 (2012). Differences between coagulase-negative *Staphylococcus* species in persistence
643 and in effect on somatic cell count and milk yield in dairy goats. *Journal of Dairy*
644 *Science* 95, 5075–5084. doi:10.3168/jds.2012-5615.
- 645 Kotková, H., Cabrnichová, M., Lichá, I., Tkadlec, J., Fila, L., Bartošová, J., et al. (2019).
646 Evaluation of TD test for analysis of persistence or tolerance in clinical isolates of
647 *Staphylococcus aureus*. *Journal of Microbiological Methods* 167, 105705.
648 doi:10.1016/j.mimet.2019.105705.
- 649 Levin-Reisman, I., Brauner, A., Ronin, I., and Balaban, N. Q. (2019). Epistasis between
650 antibiotic tolerance, persistence, and resistance mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 116,
651 14734–14739. doi:10.1073/pnas.1906169116.
- 652 Lima, M. C., de Barros, M., Scatamburlo, T. M., Polveiro, R. C., de Castro, L. K., Guimarães,
653 S. H. S., et al. (2020). Profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from goat persistent
654 mastitis before and after treatment with enrofloxacin. *BMC Microbiol* 20, 127.
655 doi:10.1186/s12866-020-01793-9.
- 656 Liu, W., Sun, H., Zhou, Y., Li, Y., Qin, Y., Li, R., et al. (2019). Goat Milk Consumption
657 Ameliorates Abnormalities in Glucose Metabolism and Enhances Hepatic and Skeletal

- 658 Muscle AMP-Activated Protein Kinase Activation in Rats Fed with High-Fat Diets. *Mol.*
659 *Nutr. Food Res.* 63, 1900703. doi:10.1002/mnfr.201900703.
- 660 Manina, G., Dhar, N., and McKinney, J. D. (2015). Stress and Host Immunity Amplify
661 Mycobacterium tuberculosis Phenotypic Heterogeneity and Induce Nongrowing
662 Metabolically Active Forms. *Cell Host & Microbe* 17, 32–46.
663 doi:10.1016/j.chom.2014.11.016.
- 664 Manser, P. (1986). Prevalence, causes and laboratory diagnosis of subclinical mastitis in the
665 goat. *Veterinary Record* 118, 552–554. doi:10.1136/vr.118.20.552.
- 666 Makielski, K., Cullen, J., O'Connor, A., and Jergens, A. E. (2019). Narrative review of
667 therapies for chronic enteropathies in dogs and cats. *Journal of veterinary internal*
668 *medicine*, 33(1), 11–22. doi:10.1111/jvim.15345.
- 669 Martinez, M., McDermott, P., & Walker, R. (2006). Pharmacology of the fluoroquinolones: a
670 perspective for the use in domestic animals. *The Veterinary Journal*, 172(1), 10–28. doi:
671 10.1016/j.tvjl.2005.07.010
- 672 Mavrogianni, V. S., Menzies, P. I., Fragkou, I. A., and Fthenakis, G. C. (2011). Principles of
673 Mastitis Treatment in Sheep and Goats. *Veterinary Clinics of North America: Food*
674 *Animal Practice* 27, 115–120. doi:10.1016/j.cvfa.2010.10.010.
- 675 Mechler, L., Bonetti, E.-J., Reichert, S., Flötenmeyer, M., Schrenzel, J., Bertram, R., et al.
676 (2016). Daptomycin Tolerance in the Staphylococcus aureus pitA6 Mutant Is Due to
677 Upregulation of the *dlt* Operon. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 2684–2691.
678 doi:10.1128/AAC.03022-15.
- 679 Merino, N., Toledo-Arana, A., Vergara-Irigaray, M., Valle, J., Solano, C., Calvo, E., et al.
680 (2009). Protein A-Mediated Multicellular Behavior in Staphylococcus aureus. *JB* 191,
681 832–843. doi:10.1128/JB.01222-08.
- 682 Merz, A., Stephan, R., and Johler, S. (2016). Staphylococcus aureus Isolates from Goat and
683 Sheep Milk Seem to Be Closely Related and Differ from Isolates Detected from Bovine
684 Milk. *Front. Microbiol.* 7. doi:10.3389/fmicb.2016.00319.
- 685 Mørk, T., Jørgensen, H. J., Sunde, M., Kvitle, B., Sviland, S., Waage, S., et al. (2012).
686 Persistence of staphylococcal species and genotypes in the bovine udder. *Veterinary*
687 *Microbiology* 159, 171–180. doi:10.1016/j.vetmic.2012.03.034.
- 688 Munita, J. M., and Arias, C. A. (2016). “Mechanisms of Antibiotic Resistance,” in *Virulence*
689 *Mechanisms of Bacterial Pathogens*, eds. I. T. Kudva, N. A. Cornick, P. J. Plummer, Q.
690 Zhang, T. L. Nicholson, J. P. Bannantine, et al. (Washington, DC, USA: ASM Press),
691 481–511. doi:10.1128/9781555819286.ch17.
- 692 Peter, I. D., Dauda, Y., Thlana, P. B., Ndahi, J. J., Madziga, H. A., Stephen, J., et al. (2015).
693 A Retrospective Study of Small Ruminant Diseases Identified at the State Veterinary
694 Hospital Maiduguri, Nigeria. *J. Anim. Health Prod.* 3, 88–93.
695 doi:10.14737/journal.jahp/2015/3.4.88.93.

- 696 Peyrusson, F., Varet, H., Nguyen, T. K., Legendre, R., Sismeiro, O., Coppée, J.-Y., et al.
697 (2020). Intracellular *Staphylococcus aureus* persists upon antibiotic exposure. *Nat*
698 *Commun* 11, 2200. doi:10.1038/s41467-020-15966-7.
- 699 Pu, Y., Zhao, Z., Li, Y., Zou, J., Ma, Q., Zhao, Y., et al. (2016). Enhanced Efflux Activity
700 Facilitates Drug Tolerance in Dormant Bacterial Cells. *Molecular Cell* 62, 284–294.
701 doi:10.1016/j.molcel.2016.03.035.
- 702 Serrano-Rodríguez, J. M., Cárceles-García, C., Cárceles-Rodríguez, C. M., Gabarda, M. L.,
703 Serrano-Caballero, J. M., and Fernández-Varón, E. (2017). Susceptibility and PK/PD
704 relationships of *Staphylococcus aureus* strains isolated from the milk of sheep and goats
705 with clinical mastitis to five veterinary fluoroquinolones. *Veterinary Record* 180, 376–
706 376. doi:10.1136/vr.103964.
- 707 Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G. D., Djukić, S., Ćirković, I., et al.
708 (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and
709 practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci.
710 *Apmis* 115, 891–899. doi:10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x.
- 711 Trastoy, R., Manso, T., Fernández-García, L., Blasco, L., Ambroa, A., Pérez del Molino, M.
712 L., et al. (2018). Mechanisms of Bacterial Tolerance and Persistence in the
713 Gastrointestinal and Respiratory Environments. *Clin Microbiol Reviews* 31, e00023-18,
714 /cmr/31/4/e00023-18.atom. doi:10.1128/CMR.00023-18.
- 715 Van den Bergh, B., Fauvart, M., and Michiels, J. (2017). Formation, physiology, ecology,
716 evolution and clinical importance of bacterial persisters. *FEMS Microbiology Reviews*
717 41, 219–251. doi:10.1093/femsre/fux001.
- 718 Vyletělová, M., Hanuš, O., Karpíšková, R., and Šťásková, Z. (2011). Occurrence and
719 antimicrobial sensitivity in staphylococci isolated from goat, sheep and cow's milk. *Acta*
720 *Univ. Agric. Silvic. Mendelianae Brun.* 59, 209–214.
721 doi:10.11118/actaun201159030209.
- 722 Willenborg, J., Willms, D., Bertram, R., Goethe, R., and Valentin-Weigand, P. (2014).
723 Characterization of multi-drug tolerant persister cells in *Streptococcus suis*. *BMC*
724 *Microbiol* 14, 120. doi:10.1186/1471-2180-14-120.
- 725 Wiuff, C., and Andersson, D. I. (2007). Antibiotic treatment in vitro of phenotypically
726 tolerant bacterial populations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59, 254–263.
727 doi:10.1093/jac/dkl469.
- 728 Wood, T. K., Knabel, S. J., and Kwan, B. W. (2013). Bacterial Persister Cell Formation and
729 Dormancy. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 7116–7121. doi:10.1128/AEM.02636-13.
- 730 Xu, T., Wang, X.-Y., Cui, P., Zhang, Y.-M., Zhang, W.-H., and Zhang, Y. (2017). The Agr
731 Quorum Sensing System Represses Persister Formation through Regulation of Phenol
732 Soluble Modulins in *Staphylococcus aureus*. *Front. Microbiol.* 8, 2189.
733 doi:10.3389/fmicb.2017.02189.

- 734 Xue, T., Zhao, L., and Sun, B. (2013). LuxS/AI-2 system is involved in antibiotic
735 susceptibility and autolysis in *Staphylococcus aureus* NCTC 8325. *International Journal*
736 *of Antimicrobial Agents* 41, 85–89. doi:10.1016/j.ijantimicag.2012.08.016.
- 737 Yan, J., and Bassler, B. L. (2019). Surviving as a Community: Antibiotic Tolerance and
738 Persistence in Bacterial Biofilms. *Cell Host & Microbe* 26, 15–21.
739 doi:10.1016/j.chom.2019.06.002.
- 740 Zhu, F., Yang, Z., Zhang, Y., Hu, K., & Fang, W. (2017). Transcriptome differences between
741 enrofloxacin-resistant and enrofloxacin-susceptible strains of *Aeromonas hydrophila*.
742 PloS one, 12(7), e0179549. doi:10.1371/journal.pone.0179549).

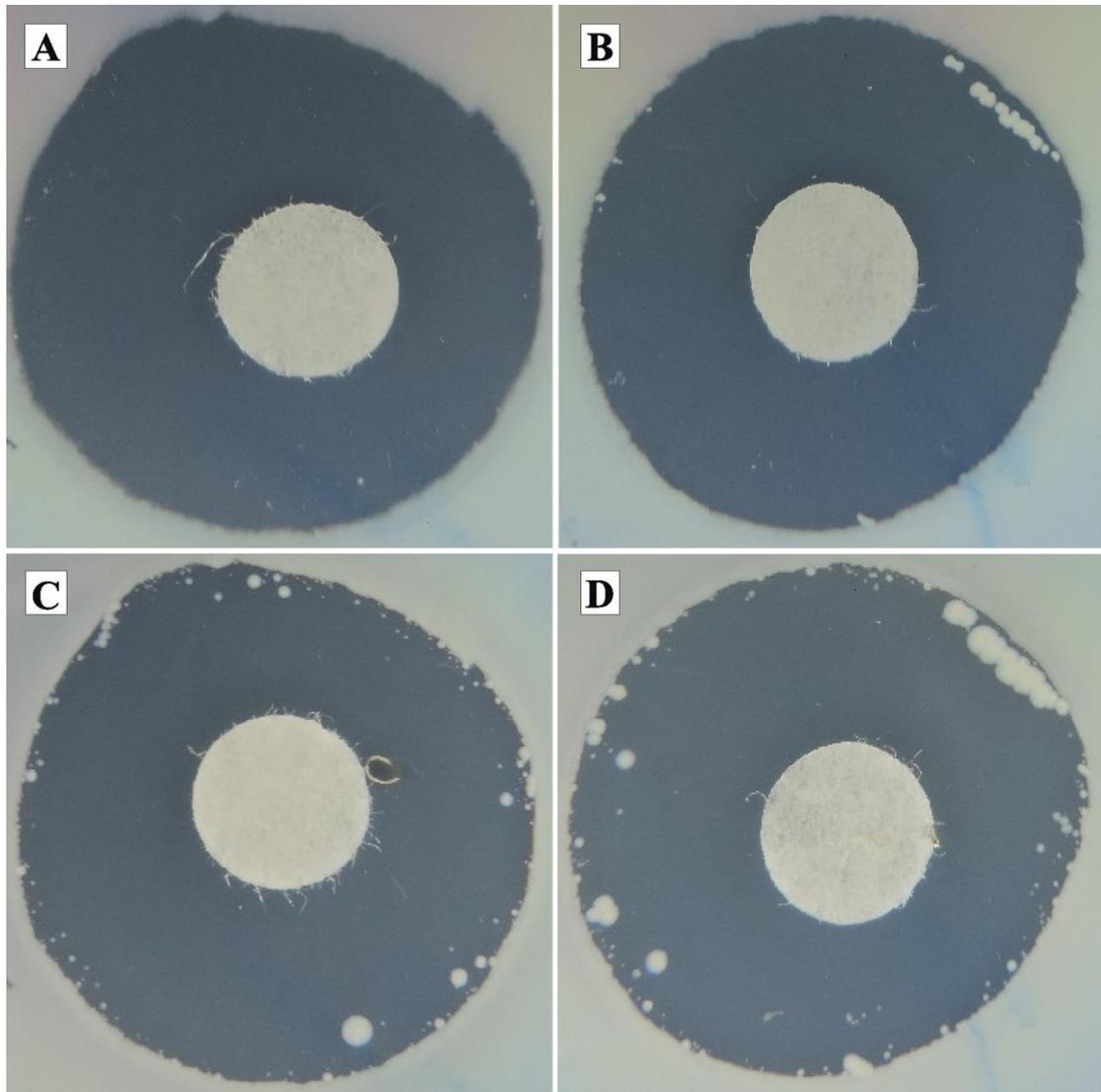
743 **Material Suplementar**

744

745

CAP 6.1

CAP 6.2



746

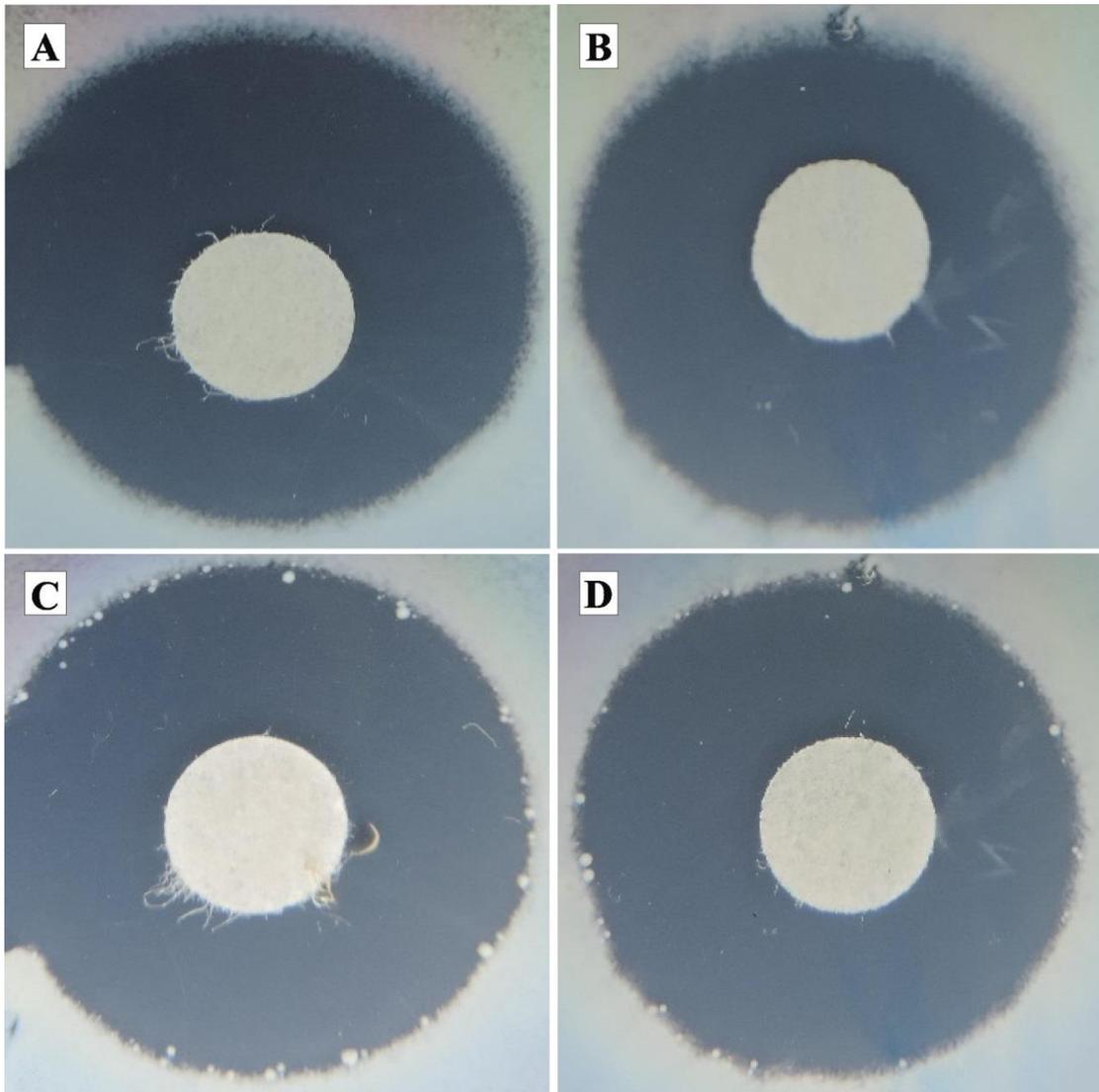
747 **Figura Suplementar 1. TDtest em ágar Mueller-Hinton para os isolados Cap 6.1, Cap**
748 **6.2. (A e B) - MH e disco de enrofloxacina 0,5 µg; (C e D) - MH e as células reativadas após**
749 **incubação com glicose 40%.**

750

751
752

CAP 7.1

CAP 7.2



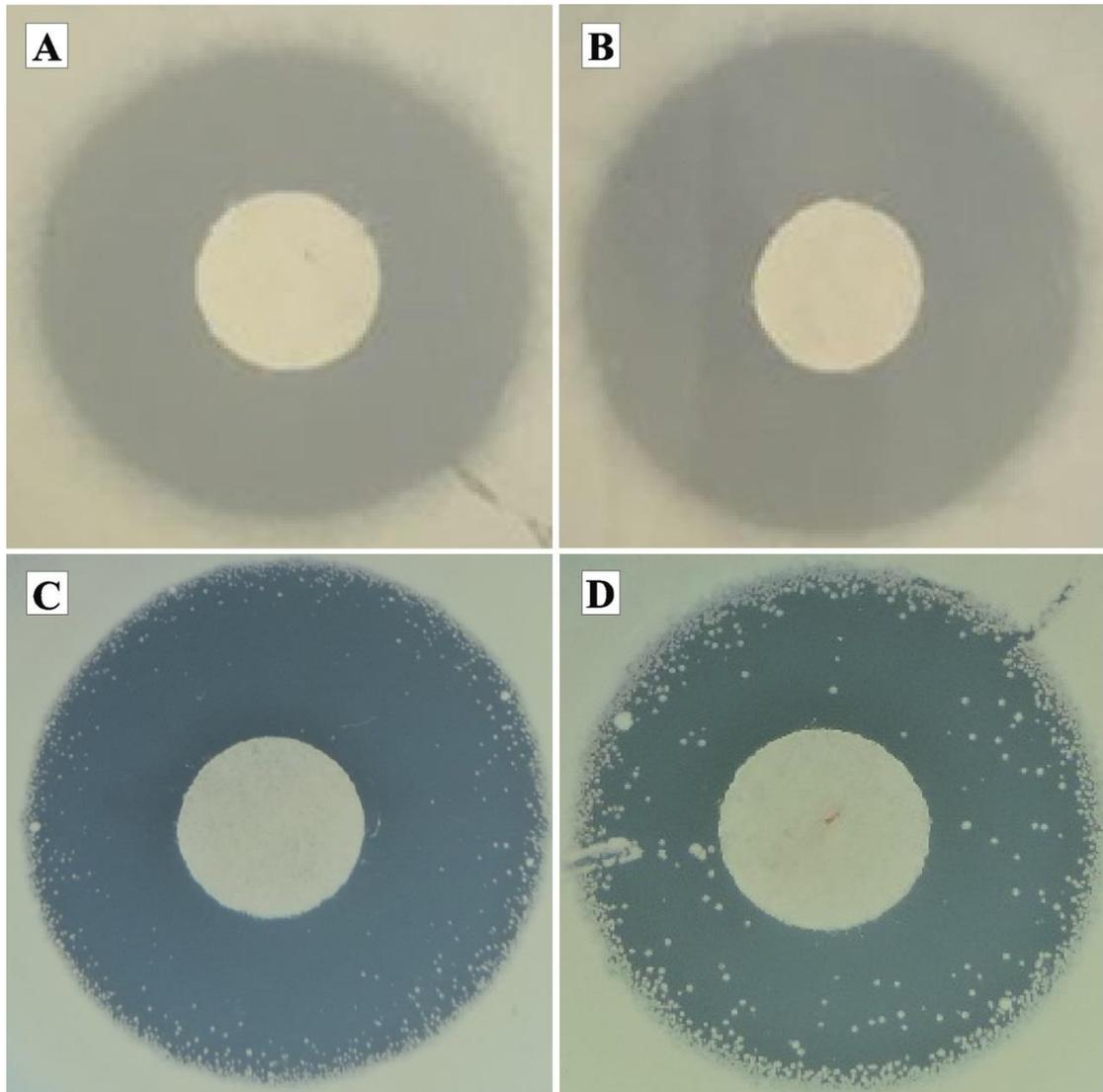
753
754
755
756
757
758

Figura Suplementar 2. TDtest em ágar Mueller-Hinton para os isolados Cap 7.1, Cap 7.2. (A e B) - MH e disco de enrofloxacina 0,5 µg; (C e D) - MH e as células reativadas após incubação com glicose 40%.

759
760

CAP 10.1

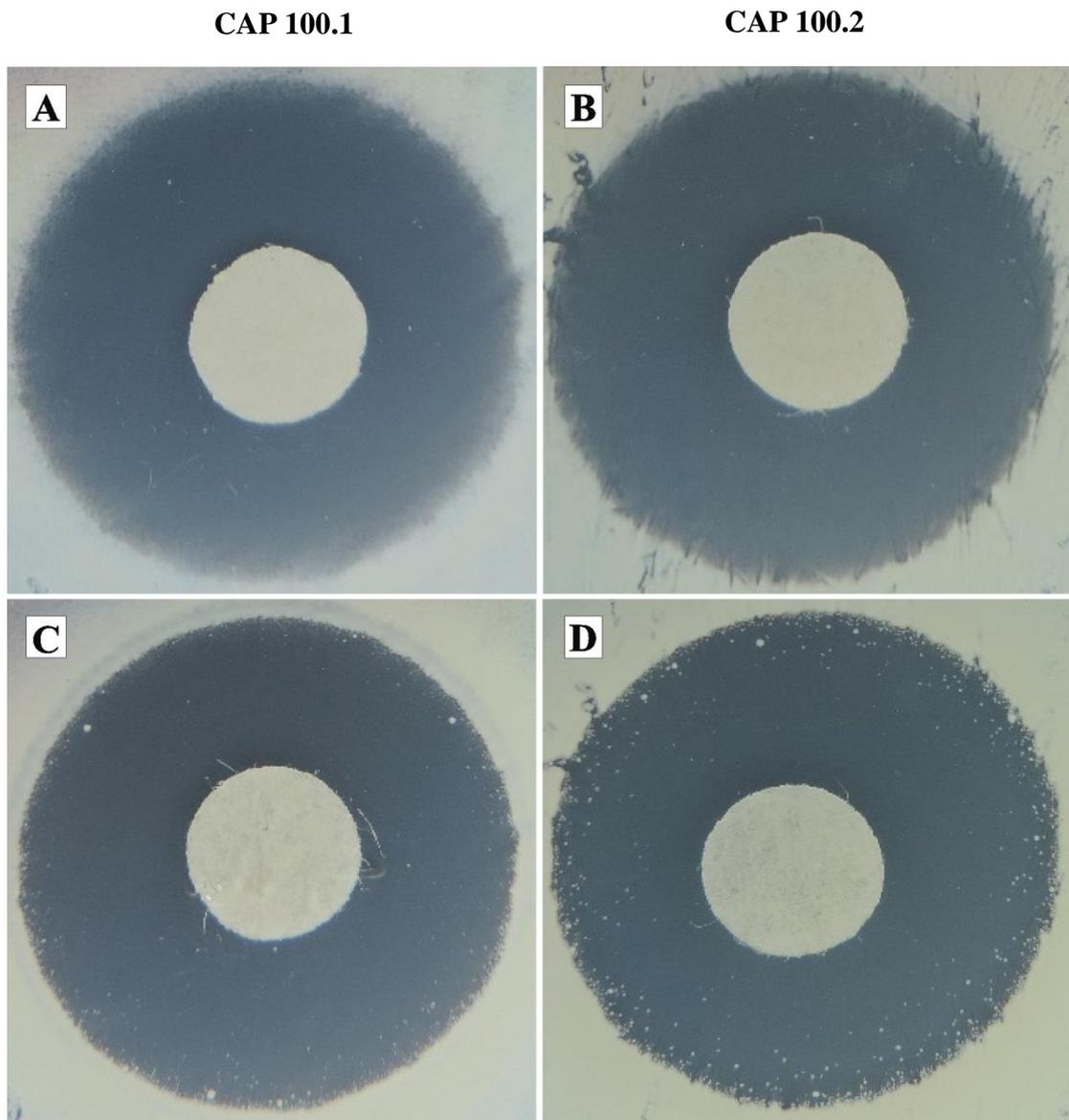
CAP 10.2



761
762
763
764
765
766

Figura Suplementar 3. TDtest em ágar Mueller-Hinton para os isolados Cap 10.1, Cap 10.2. (A e B) - MH e disco de enrofloxacina 0,5 µg; (C e D) - MH e as células reativadas após incubação com glicose 40%.

767
768



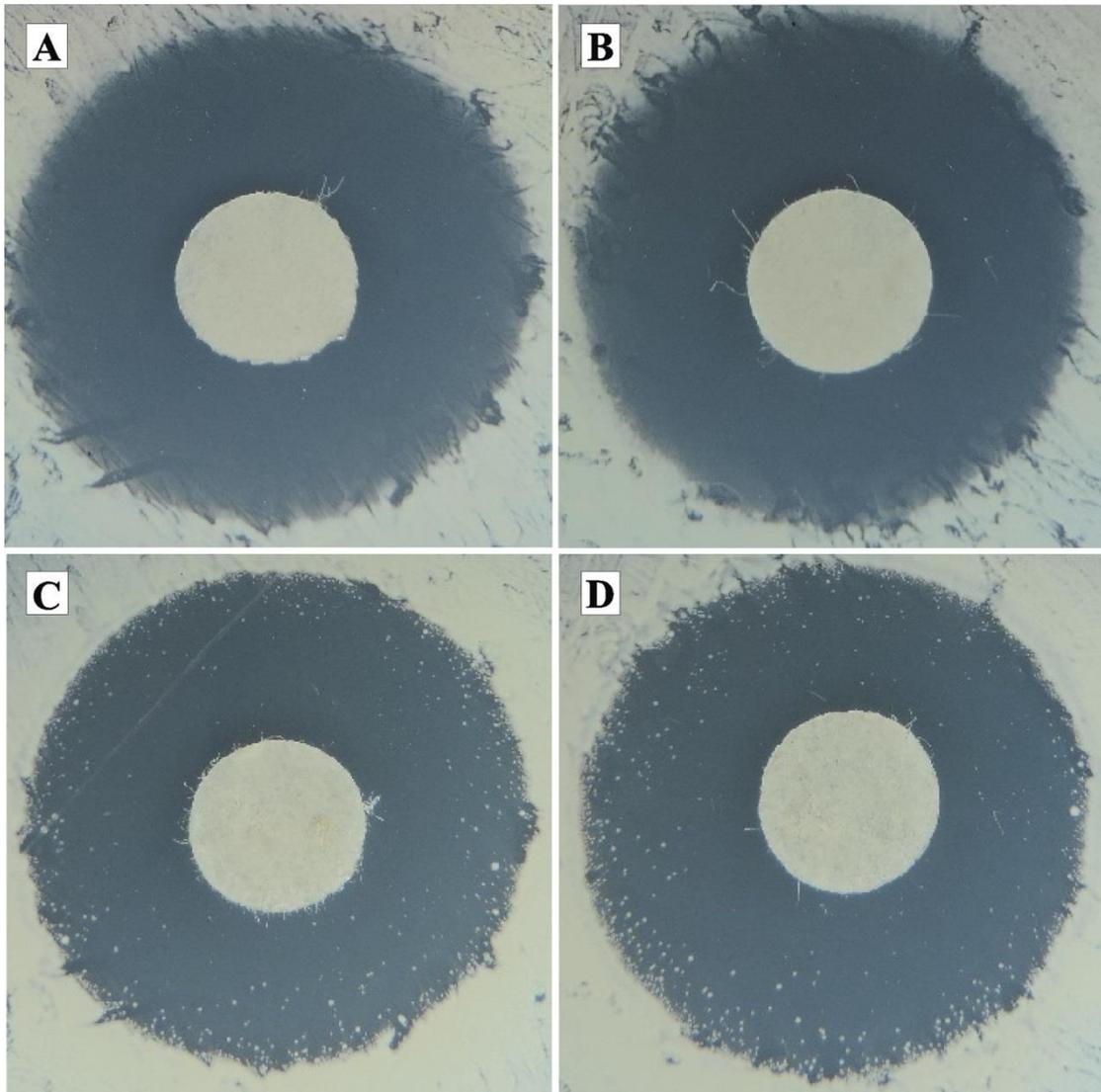
769
770
771
772
773
774

Figura Suplementar 4. TDtest em ágar Mueller-Hinton para os isolados Cap 100.1, Cap 100.2. (A e B) - MH e disco de enrofloxacina 0,5 µg; (C e D) - MH e as células reativadas após incubação com glicose 40%.

775
776

CAP 101.1

CAP 101.2



777
778
779
780
781
782

Figura Suplementar 5. TDtest em ágar Mueller-Hinton para os isolados Cap 101.1, Cap 101.2. (A e B) - MH e disco de enrofloxacina 0,5 µg; (C e D) - MH e as células reativadas após incubação com glicose 40%.

**CAPÍTULO 2 - GENÔMICA COMPARATIVA DE *Staphylococcus warneri*
PERSISTENTES ORIUNDOS DE MASTITE CAPRINA ASSOCIADA AO USO DE
ENROFLOXACINA**

Artigo a ser submetido à Revista *Peerj*

(Fator de impacto 2.380; Qualis A2)

1 **Genômica comparativa de *Staphylococcus warneri***
2 **persistentes oriundos de mastite caprina associada ao uso**
3 **de enrofloxacina**

4
5 Chirles Araújo de França¹, Alessandra da Silva², Danillo Sales Rosa¹, Gutiele do Nascimento
6 do É¹, Diego Lucas Neres Rodrigues², Raquel Emna Hurtado Castillo², Thiago de Jesus
7 Sousa², Roselane Gonçalves dos Santos², Anne Cybelle Pinto Gomide², Maria Aparecida
8 Scatamburlo Moreira³, Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida⁴, Gisele Veneroni
9 Gouveia⁵, João José Simoni Gouveia⁵, Renata de Faria Silva Souza¹, Bertram Brenig⁶,
10 Aristóteles Góes-Neto⁷, Siomar Castro Soares⁸, Rommel Thiago Juca Ramos⁹, Vasco Ariston
11 de Carvalho Azevedo², Mateus Matiuzzi da Costa¹

12
13 ¹ Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal, Campus Ciências Agrárias,
14 Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Petrolina, Pernambuco, Brasil

15 ² Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM), Instituto de Ciências Biológicas,
16 Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

17 ³ Laboratório de Doenças Bacterianas (LDBAC), Departamento de Veterinária, Universidade
18 Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

19 ⁴ Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Medicinais (NEPLAME), Universidade Federal
20 do Vale do São Francisco (UNIVASF), Petrolina, Pernambuco, Brasil

21 ⁵ Laboratório de Genética e Biotecnologia, Campus Ciências Agrárias, Universidade Federal
22 do Vale do São Francisco (UNIVASF), Petrolina, Pernambuco, Brasil

23 ⁶ Instituto de Medicina Veterinária, Universidade de Göttingen, Göttingen, Niedersachsen,
24 Germany

25 ⁷ Laboratório de Biologia Molecular e Computacional de Fungos (LBMCF), Instituto de
26 Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais,
27 Brasil

28 ⁸ Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal do
29 Triângulo Mineiro, Uberaba, Brasil

30 ⁹ Centro de Genômica e Biologia de Sistemas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade
31 Federal do Pará (UFPA), Belém, Pará, Brasil

32 * Autor Correspondente

33 E-mail: mateus.matiuzzi@univasf.edu.br

34 RESUMO

35 **Introdução:** A mastite é uma inflamação intramamária que compromete a produção de leite,
36 sendo um dos agentes etiológicos mais prevalentes do gênero *Staphylococcus* spp., como
37 *Staphylococcus warneri*. A terapia antimicrobiana é típica na prática clínica, no entanto, isso
38 pode gerar a seleção de isolados resistentes. Além disso, os micro-organismos podem
39 sobreviver à ação antimicrobiana sem alterações na concentração inibitória mínima, fenômeno
40 definido como persistência. Portanto, este estudo teve como objetivo identificar genes
41 associados à persistência de isolados de *S. warneri* oriundos de mastite caprina.

42 **Material e métodos:** Os genomas de oito isolados persistentes de *S. warneri* de mastite
43 clínica em cabras foram sequenciados, sendo adquiridos antes (4) e após (4) o tratamento com
44 enrofloxacin. As relações filogenômicas e a plasticidade genética foram determinadas. Além
45 disso, foi realizada a busca por genes associados à resistência e virulência, bem como a
46 presença de polimorfismos de nucleotídeo único (SPNs).

47 **Resultados:** Três sequências completas e cinco em formatos preliminares dos genomas foram
48 determinadas. Os isolados foram considerados bastante clonais e, na análise pangenômica,
49 foram encontrados 2017 genes no genoma central e entre 176 a 336 genes acessórios. No
50 entanto, nenhum gene único foi encontrado nas linhagens de *S. warneri* persistentes de
51 mastite. De acordo com as análises de distribuição de COG, os genes estão envolvidos em
52 funções gerais, transcrição, replicação e recombinação/reparo. Três fagos e seis ilhas
53 genômicas foram previstos e totalmente compartilhados por todos os genomas persistentes de
54 *S. warneri*. Da mesma forma, sete genes de resistência e seis genes de virulência foram
55 igualmente compartilhados, por exemplo, o gene da bomba de efluxo *norA* e seu regulador
56 *mgrA*. A análise SPNs detectou 13 variantes, uma em uma região não codificadora e 12 em
57 regiões codificantes. O gene *alsS* (acetolactato sintase) apresentou a maioria das variações
58 (sete), cinco das quais eram sinônimos e duas não eram sinônimos.

59 **Conclusão:** Análises genômicas comparativas mostraram alta similaridade entre os isolados
60 persistentes de *S. warneri*, independente da época de coleta, o que indica o grande potencial
61 de disseminação desses isolados entre animais e conseqüentemente seu risco à saúde pública.
62 Este estudo nos permitiu traçar o perfil genético de isolados persistentes de *S. warneri* e a
63 presença de genes relacionados a processos cruciais de persistência bacteriana.

64 **Palavras-chave:** Caprinocultura, *Staphylococcus* spp., Fluoroquinolonas, Tolerância
65 Antimicrobiana.

66 INTRODUÇÃO

67 A mastite tem duas formas primárias de manifestação, subclínica e clínica e, se a
68 infecção persistir por um período prolongado, torna-se crônica (Mørk et al., 2012; Grunert et
69 al., 2018; Lima et al., 2020). Vários agentes etiológicos podem causar esta doença. No
70 entanto, o gênero *Staphylococcus* spp. é diagnosticado com mais frequência em pequenos
71 ruminantes (Contreras et al., 2007), especialmente *Staphylococcus* coagulase-negativo (SCN),
72 e, entre eles, *Staphylococcus warneri* (Koop et al., 2012; Ceniti et al., 2017; Bernier Gosselin
73 et al., 2019). Este grupo é considerado um reservatório de diferentes genes que codificam

74 enterotoxinas estafilocócicas responsáveis por intoxicações alimentares (Rall et al., 2014;
75 Casaes Nunes et al., 2016), bem como vários genes de resistência (Szczuka, Jabłońska &
76 Kaznowski, 2016; Bitrus et al., 2018; Gizaw et al., 2020).

77 A terapia antimicrobiana é o principal método de tratamento contra a mastite
78 (Nickerson et al., 2020). A classe das fluoroquinolonas é altamente eficaz contra infecções
79 bacterianas e é amplamente utilizada na medicina humana e animal (López et al., 2015), como
80 a enrofloxacina (ENO), que foi desenvolvida para uso apenas na clínica veterinária
81 (Babaahmady & Khosravi, 2011; López et al., 2015). Devido ao uso exacerbado e sem
82 precedentes desses medicamentos, a multirresistência antimicrobiana tem se mostrado um
83 grande desafio, uma vez que as alternativas terapêuticas são escassas (Polveiro et al., 2020).
84 Este cenário é agravado pela capacidade inerente do micro-organismo de usar diferentes
85 estratégias de sobrevivência, incluindo a persistência bacteriana. Nesse fenômeno, uma
86 subpopulação bacteriana pode sobreviver a tratamentos com antibióticos bactericidas sem
87 alterar os valores de sensibilidade na concentração inibitória mínima - CIM (Brauner et al.,
88 2016; Balaban et al., 2019). Fluoroquinolonas causam danos ao DNA ao inibir
89 topoisomerasas II (girase) e IV (Ojkic et al., 2020). O DNA das células persistentes não
90 escapa do dano causado pelo antibiótico, e o reparo do DNA pós-tratamento é necessário para
91 a sobrevivência (Völzing & Brynildsen, 2015). Em células que não crescem, essa
92 sobrevivência depende do tempo gasto durante o reparo do DNA e a retomada dos processos
93 relacionados ao crescimento, como a síntese de DNA (Mok & Brynildsen, 2018). A própria
94 DNA girase também desempenha um papel na indução da persistência. Em *Mycobacterium*
95 *tuberculosis*, a deleção do gene levou à ativação do sistema SOS via *recA/lexA* e tolerância a
96 antibióticos mediada pela indução de células persistentes. Enquanto isso, a inibição da
97 expressão de *recA* resultou na reversão fenotípica (Choudhary et al., 2019).

98 A genômica é uma estratégia que pode fornecer um melhor entendimento dos possíveis
99 fatores envolvidos na persistência (Sela et al., 2018; Bai et al., 2019). No entanto, não há
100 relatos desse tipo de estudo com *S. warneri*, e o número de genomas dessa espécie
101 depositados no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) ainda é mínimo. Além
102 disso, a maioria dos genomas está relacionada a isolados humanos e ambientais
103 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>), sem genoma depositado de cepas isoladas de cabras
104 com mastite.

105 Assim, este estudo visa contribuir para o conhecimento das características genômicas e
106 das relações filogenéticas de *S. warneri* persistente, originado de mastite caprina antes e após
107 a terapia antimicrobiana com enrofloxacina.

108 MATERIAL E MÉTODOS

109 Isolados bacterianos

110 Oito isolados de *S. warneri* foram obtidos de quatro animais com mastite clínica e
111 histórico de uso recorrente de enrofloxacina - ENO, localizados no município de Viçosa-
112 Brasil. (20.7467991 S 43.0193046 W - SisGen AEB34A6). As bactérias foram isoladas antes
113 (código.1) e depois (código.2) do tratamento com ENO (Lima et al., 2020). Os isolados foram
114 nomeados neste estudo como Cap 9.1, Cap 9.2, Cap 10.1, Cap 10.2, Cap 100.1, Cap 100.2,

115 Cap 101.1, e Cap 101.2. A análise de espectrometria MALDI-TOF confirmou a identidade
116 dos isolados, e a persistência foi provada *in vitro* usando o ensaio da curva de morte, obtendo
117 a duração mínima para morte (MDK) 99 e 99,9 (dados não publicados).

118 **Extração, sequenciamento, montagem, anotação e depósito dos genomas**

119 Os isolados foram cultivados em ágar Brain Heart Infusion (BHI - Acumedia®,
120 Lansing, United States) a 37 ° C por 24 h. O ácido desoxirribonucléico (DNA) foi extraído a
121 partir de um protocolo por precipitação de sal (Regitano et al., 2009). A qualidade foi avaliada
122 em gel de agarose a 1% e quantificação de DNA com o Qubit dsDNA BR Assay Kit no Qubit
123 Fluorometer (Thermo Scientific™, Waltham, United States).

124 O sequenciamento genômico foi realizado utilizando a plataforma Illumina Hiseq
125 *paired-end* (Illumina, San Diego, CA, USA). A qualidade das leituras foi verificada usando o
126 FastQC tool (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). As montagens *ab*
127 *initio* dos genomas foram realizadas utilizando o Unicycler versão 3 (Wick et al., 2017). A
128 ordenação dos scaffolds, resultantes das montagens, foi realizada utilizando os scripts
129 SSPACE Standard versão 3.0 (Boetzer et al., 2011), GapFiller version 1.10 (Boetzer &
130 Pirovano, 2012), e CONTIGuator versão 2.7. A cepa que apresentou a identidade e cobertura
131 mais significativa na análise ANIb, por meio da plataforma Jspecies
132 (<http://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/>), foi adotado como referência. Os *gaps* restantes
133 foram preenchidos usando o fechamento automático de *gaps* com GFinisher versão 1.2 e
134 curadas com a ferramenta CLC Genomics Workbench versão 7.0
135 (<https://www.qiagenbioinformatics.com/products/clc-genomics-workbench>).

136 Os genomas foram submetidos à anotação automática com o software PROKKA versão
137 3.0 (Seemann, 2014) (<https://github.com/tseemann/prokka>), usando os parâmetros padrões do
138 programa e depositados no banco de dados NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os
139 isolados, o número de acesso do GenBank e os metadados dos genomas usados neste estudo
140 estão disponíveis na tabela 1.

141 **Tabela 1. Cepas de *Staphylococcus warneri* isoladas de diferentes hospedeiros usados neste estudo (conjunto de dados).**

	Nome do genoma	Isolados	Hospedeiro	Nível	Fonte de isolamento	Localização geográfica	Número de Acesso
1	<i>Staphylococcus warneri</i> Cap9.1 *	Cap 9.1	Caprino	Completo	Mastite	Brasil	JAATOG000000000
2	<i>Staphylococcus warneri</i> Cap9.2 *	Cap 9.2	Caprino	Completo	Mastite	Brasil	JAANHJ000000000
3	<i>Staphylococcus warneri</i> Cap10.1 *	Cap 10.1	Caprino	Draft	Mastite	Brasil	JAANHI000000000
4	<i>Staphylococcus warneri</i> Cap10.2 *	Cap 10.2	Caprino	Draft	Mastite	Brasil	JAANKH000000000
5	<i>Staphylococcus warneri</i> Cap100.1 *	Cap 100.1	Caprino	Completo	Mastite	Brasil	CP049802-CP049805
6	<i>Staphylococcus warneri</i> Cap100.2 *	Cap 100.2	Caprino	Draft	Mastite	Brasil	JAANHL000000000
7	<i>Staphylococcus warneri</i> Cap101.1 *	Cap 101.1	Caprino	Draft	Mastite	Brasil	JAANHM000000000
8	<i>Staphylococcus warneri</i> Cap101.2 *	Cap 101.2	Caprino	Draft	Mastite	Brasil	JAANHN000000000
9	<i>Staphylococcus warneri</i> NCTC4133	NCTC4133	Ambiental	Completo	<i>Sponge cake</i>	USA: Chicago	GCA_900636255.1
10	<i>Staphylococcus warneri</i> NCTC11044	NCTC11044	Humano	Completo	Pele	Desconhecida	GCA_900636385.1
11	<i>Staphylococcus warneri</i> 22.1	22.1	Cultura celular	Completo	Contaminação de laboratório	Belarus: Minsk	GCA_003571725.1
12	<i>Staphylococcus warneri</i> WS479	WS479	Humano	Completo	Desconhecida	China: Wenzhou	GCA_014495745.1
13	<i>Staphylococcus warneri</i> WB224	WB224	Humano	Completo	Montagem metagenômica	China: Chengdu	GCA_013137955.1
14	<i>Staphylococcus warneri</i> GD01	GD01	Suíno	Completo	Tecido de abscesso muscular	China: Guangdong	GCA_007833855.1
15	<i>Staphylococcus warneri</i> SWO	SWO	Humano	Completo	Água de condensação Nave espacial Shenzhou-10	China: Nei Mongol	GCA_003691405.1
16	<i>Staphylococcus warneri</i> NCTC7291	NCTC7291	Humano	Completo	Pele	Desconhecida	GCA_900636265.1
17	<i>Staphylococcus warneri</i> FDAARGOS_754	SK66	Humano	Completo	Pele normal do braço direito	USA: VA	GCA_013267715.1
18	<i>Staphylococcus warneri</i> SG1	SG1	Desconhecido	Completo	Contaminação de laboratório	Desconhecida	GCA_000332735.1
19	<i>Staphylococcus warneri</i> 16A	16A	Búfalo	Completo	Leite de búfala	Brasil	GCA_007814275.1

142 Cap 9.1, 10.1, 100.1, 101.1 compreendem isolados antes do tratamento com enrofloxacina, e Cap 9.2, 10.2, 100.2, e 101.2 englobam isolados após o
143 tratamento com enrofloxacina. * sequenciado neste estudo. Os genomas enumerados entre 9 e 19 pertencem ao banco de dados NCBI.

144 **Pangenômica e relação filogenômica de isolados de *S. warneri* persistentes**

145 A análise pangenômica foi realizada com os parâmetros padrões do pipeline de
146 pangenome Roary (Page et al., 2015) e software BPGA (Bacterial Pan Genome Tool)
147 versão 1.3 (Chaudhari, Gupta & Dutta, 2016). A árvore filogenômica foi inferida por
148 FastTree (Price, Dehal & Arkin, 2010), usando o método de máxima verossimilhança.
149 A plataforma iTol versão 3 (Letunic & Bork, 2016) foi usado para personalizar a árvore
150 filogenômica. Comparada a uma matriz de presença e ausência de genes centrais e
151 acessórios, a visualização da árvore foi gerada usando o script roary_plots.py e
152 Phandango website versão 1.3 (Hadfield et al., 2017).

153 **Plasticidade de genomas de isolados de *S. warneri* persistentes**

154 A análise da plasticidade genômica foi desenvolvida usando o preditor de ilha
155 genômica IslandViewer4 (Bertelli et al., 2017), e o software BRIG foi utilizado para a
156 visualização do mapa circular, utilizando a linhagem Cap 9.2 como referência por
157 apresentar o maior número de ilhas. (Alikhan et al., 2011). O PHASTER foi usado para
158 identificar os fagos e o PlasmidFinder, versão 2.1, foi usado para os plasmídeos a fim de
159 prever os elementos móveis. A previsão de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs)
160 foi realizada com a ferramenta Parsnp (Treangen et al., 2014). O mapa de calor e o
161 dendrograma da presença e ausência de variantes foram gerados com a ferramenta
162 online Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>).

163 **Genes de virulência e resistência de isolados de *S. warneri* persistentes**

164 A análise da presença e ausência de fatores de virulência, bem como de
165 resistência, foi realizada por meio da ferramenta Abricate (Seemann, 2014), com o
166 apoio dos bancos de dados de resistência CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance
167 Database) (McArthur et al., 2013), ARG-NNOT (Gupta et al., 2014) e Resfinder
168 (Feldgarden et al., 2019). O banco de dados VFDB (Virulence Factor Database) foi
169 usado para encontrar genes relacionados à virulência (Chen et al., 2005). O gráfico do
170 mapa de calor de presença e ausência foi gerado pelo software online Morpheus
171 (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>).

172 **RESULTADOS**

173 **Caracterização de genomas de isolados de *S. warneri* persistentes**

174 Os genomas sequenciados das oito cepas de *S. warneri* variaram entre 2,4 e 2,5
175 Mb em tamanho, com aproximadamente 33% de conteúdo de GC. A montagem de três
176 genomas completos (Cap 9.1, 9.2 e 100.1) e cinco rascunhos (Cap 10.1, 10.2, 100.2,
177 101.1 e 101.2) exibiu um scaffold contendo *gaps* em alguns casos. O arquivo
178 “Excluded.fsa” gerado pelo CONTIGuator, contendo as sequências que não foram
179 mapeadas ao genoma de referência, foi submetido à anotação funcional, identificação
180 dos plasmídeos e posterior curadoria manual (Tabela S1). A presença de origens de
181 plasmídeo foi observada em todos os cromossomos (Tabela 2). Esta caracterização
182 permitiu identificar quatro pontos de diferentes origens na maioria dos isolados, rep
183 (pKH21), *repC* (Cassette), CDS11947 (pSZ4), e *repA* (SAP016A). No genoma Cap

184 100.1, apenas dois pontos de origem de plasmídeo foram encontrados, rep (pKH21) e
185 CDS11947 (pSZ4) (Table S2). A nível de regiões codificantes, 53 delas foram
186 observadas em pelo menos sete genomas de mastite caprina *S. warneri*, onde a maioria
187 delas estavam associadas a proteínas com funções desconhecidas. Entre estes, algumas
188 sequências apresentaram regiões de domínios associados a toxinas (Toxin zeta) e
189 transposases (transposase da família IS256 IS256 e transposase da família IS1595
190 ISSsu9). A previsão funcional dos cromossomos resultou entre 2.356 e 2.359
191 sequências de genes codificadores de proteínas (Tabela 2). Como esperado, todas as
192 cepas isoladas antes e após o tratamento com ENO foram preditas como *S. warneri*.

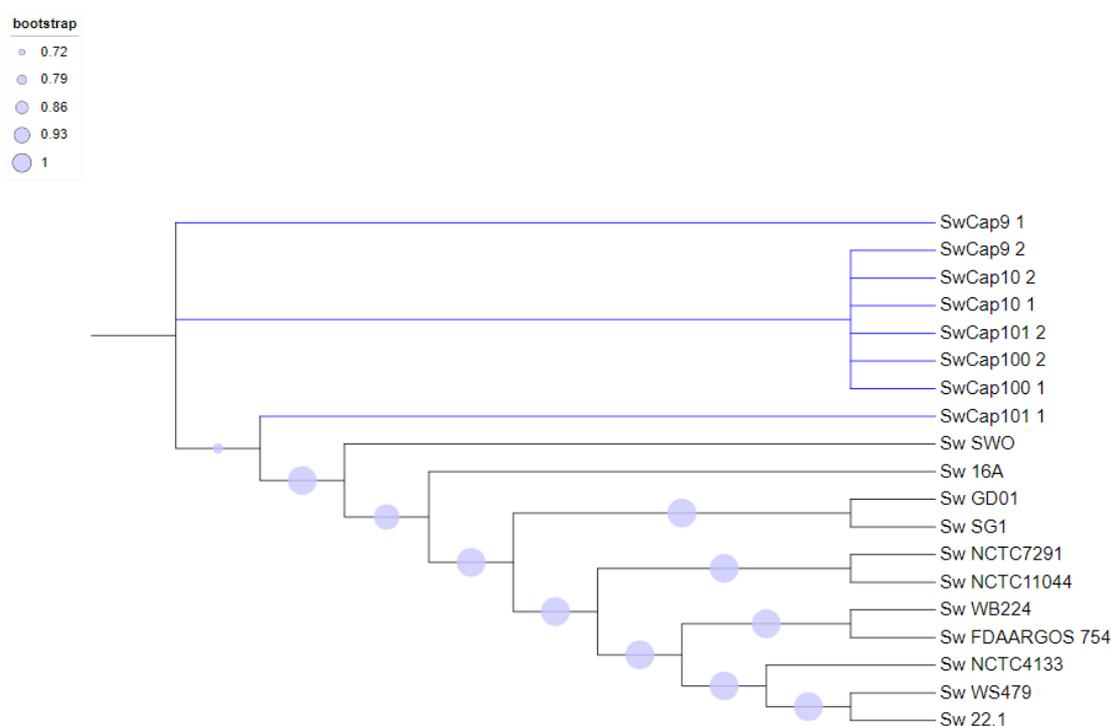
193 **Tabela 2. Características genômicas de *Staphylococcus warneri* persistentes oriundos de mastite clínica em cabras.**

Espécies	Genoma total (bp)	GC (%)	Números de gaps	Ponto de origem de Plasmídeos	Predição de CDS	NCBI Número de acesso
Cap 9.1*	2464957	32.7	0	4	2356	JAATOG000000000
Cap 9.2*	2470828	32.74	0	4	2358	JAANHJ000000000
Cap 10.1	2449667	33.61	4	4	2359	JAANHI000000000
Cap 10.2	2449519	32.61	4	4	2359	JAANHK000000000
Cap 100.1*	2464048	32.7	0	2	2359	CP049802-CP049805
Cap 100.2	2449498	32.61	4	4	2359	JAANHL000000000
Cap 101.1	2447416	32.6	11	4	2357	JAANHM000000000
Cap 101.2	2442571	32.57	12	4	2359	JAANHN000000000

194 Cap 9.1, 10.1, 100.1, 101.1 representam isolados antes do tratamento com enrofloxacina, e Cap 9.2, 10.2, 100.2, e 101.2 representam isolados após o
195 tratamento com enrofloxacina. * Cap 9.1, 9.2, e 100.1 são os únicos isolados com um genoma completo; CG corresponde à porcentagem de guanina e
196 citosina; CDS representa sequências de codificação; bp são pares de bases.

197 **Relações filogenéticas de isolados de *S. warneri* persistentes**

198 Com base na ramificação, os oito genomas de *S. warneri* persistentes eram mais
 199 relacionados entre si quando comparados aos demais genomas (11 cepas) recuperados
 200 da plataforma NCBI. Cap 9.1 foi localizado em um aglomerado maior que abrigava a
 201 maioria dos isolados a nível de distribuição populacional, organizado no mesmo clado.
 202 No entanto, Cap 101.1 permaneceu em um clado separado do cluster central (Fig. 1). Os
 203 genes foram obtidos via análise do genoma central considerando 95% de similaridade e
 204 alinhados utilizando o software MAFFT. A inferência filogenômica foi baseada na
 205 máxima verossimilhança, com suporte estatístico bootstrap variando de 0,72 a 1, em
 206 escala logarítmica, utilizando o programa FastTree.



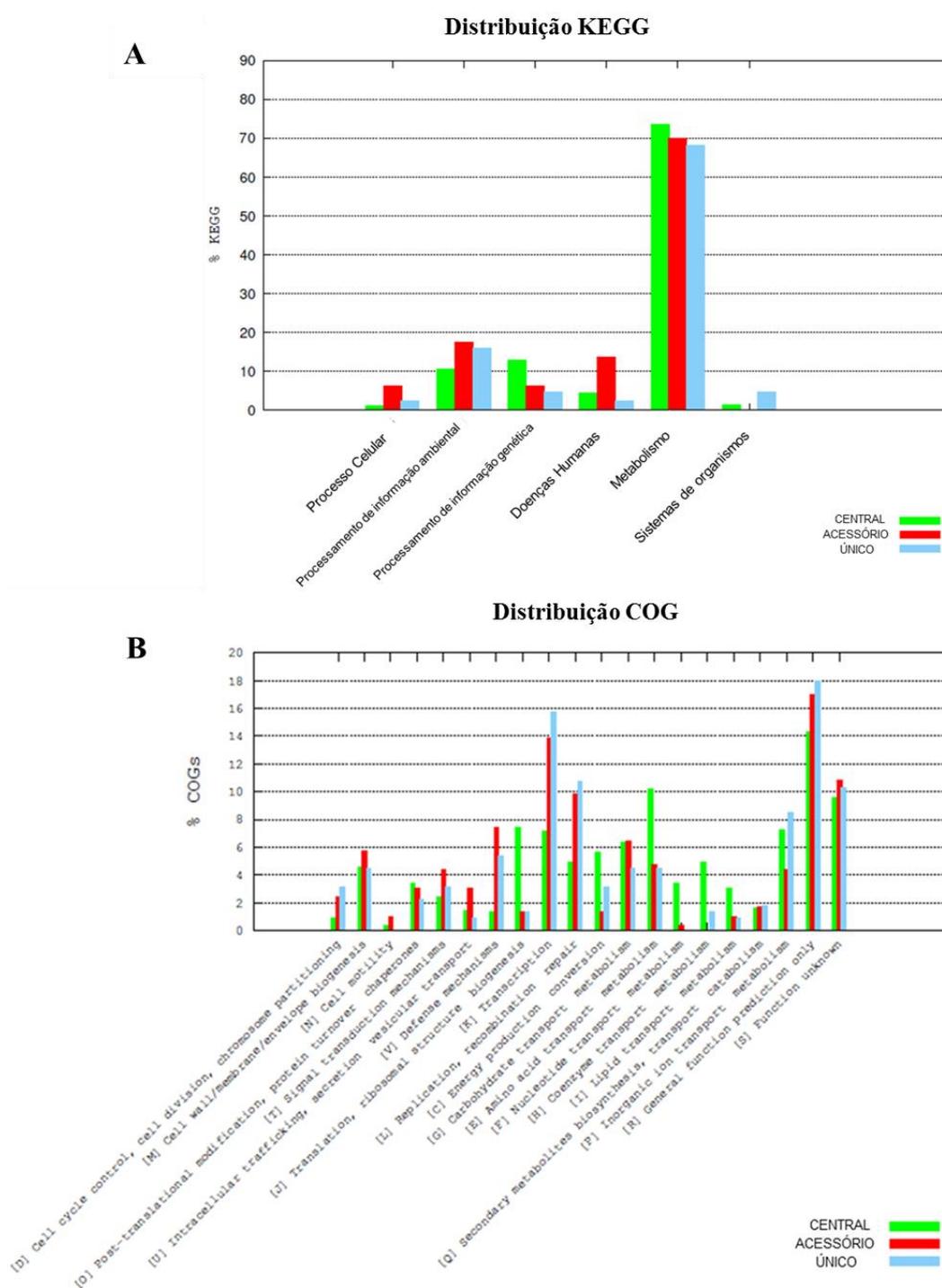
207 **Figura 1. Árvore filogenômica baseada no alinhamento de 2017 genes conservados**
 208 **entre todos os isolados de *Staphylococcus warneri* depositados no NCBI.**

209

210 Os isolados de *S. warneri* foram obtidos em uma propriedade que fazia uso
 211 frequente de ENO para diversos fins. O tratamento da mastite não apresentou resultado
 212 efetivo, apesar do perfil de sensibilidade *in vitro* dos isolados aos antibióticos. Após a
 213 confirmação dos fenótipos de persistência em *S. warneri* (dados não publicados),
 214 buscou-se identificar as características genômicas que poderiam ter contribuído para a
 215 persistência. Em termos de presença e ausência de genes, observou-se que 2017 formam
 216 o genoma central, e os genes acessórios variam entre 176 a 336. Enquanto, 571 são
 217 genes únicos distribuídos na maioria dos genomas (Tabela S3). No entanto, nenhum dos
 218 genes únicos identificados foram encontrados nos genomas de *S. warneri* persistentes.
 219 A caracterização funcional desses genes, gerados pelo programa BPGA, mostrou que a
 220 maior parte dos genes centrais, acessórios e únicos estão relacionados ao metabolismo

221 (Fig. 2), indicado pela análise KEEG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*).
222 Genes centrais e únicos estão envolvidos em todos os processos biológicos identificados
223 (processos celulares, processamento de informações ambientais, processamento de
224 informações genéticas, doenças humanas, metabolismo e sistemas orgânicos). Enquanto
225 isso, os genes acessórios estão relacionados à maioria dos processos, exceto para
226 sistemas orgânicos (Fig. 2a). A categorização funcional detalhada de COG (*Clusters of*
227 *Orthologous Groups*) previu que esses genes, em sua maioria, estão relacionados a
228 processos de funções gerais, transcrição, replicação e recombinação/reparo ou com
229 função desconhecida (Fig. 2b).

230

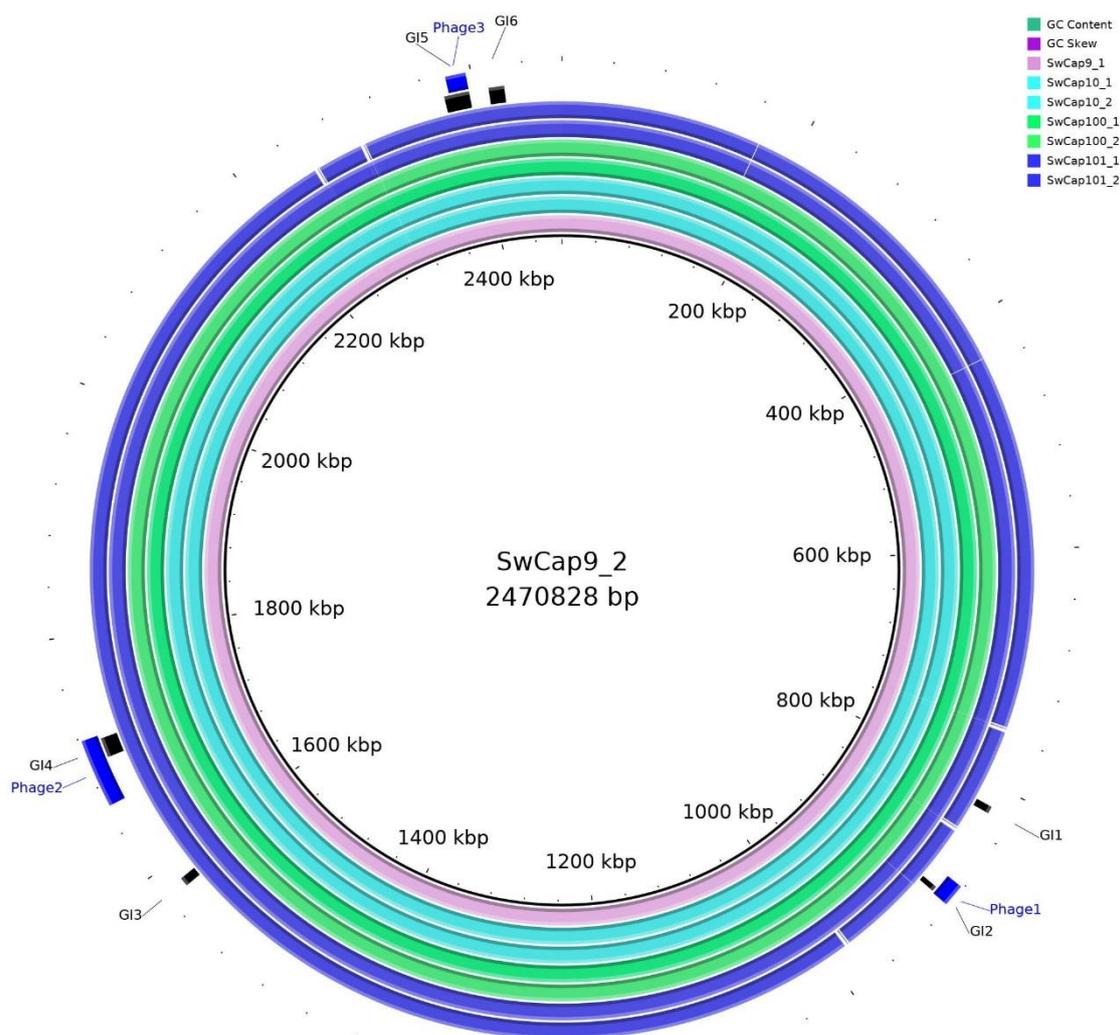


231

232 **Figura 2. Perfil funcional dos genes avaliados na análise comparativa de BPGA dos**
 233 **genomas dos isolados de *Staphylococcus warneri* depositados no NCBI. (A)**
 234 **Distribuição KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) de genes centrais,**
 235 **acessórios e únicos. (B) Distribuição COG (*Clusters of Orthologous Groups*) de genes**
 236 **centrais, acessórios e únicos. Barra verde (genes centrais), vermelha (genes acessórios)**
 237 **e azul (genes únicos).**

238 **Plasticidade dos genomas de isolados de *S. warneri* persistentes**

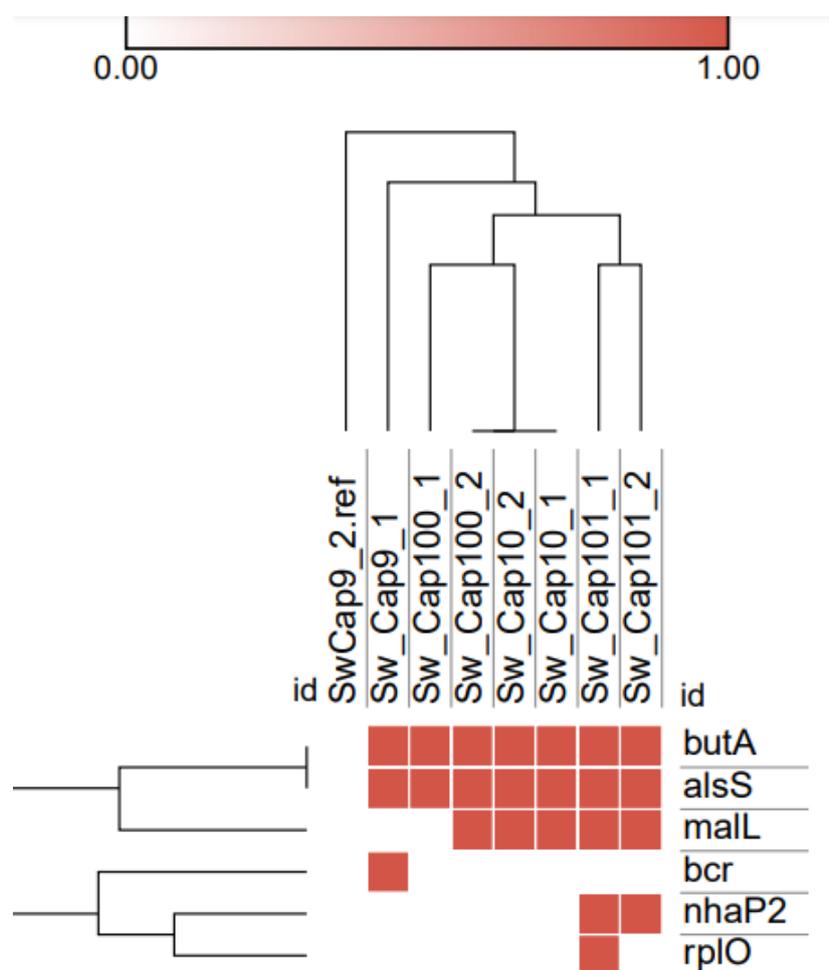
239 O mapa circular gerado pelo BRIG revelou um nível muito alto de sintenia para as
 240 regiões genômicas em isolados de *S. warneri* (Fig. S1). Os resultados permitem
 241 caracterizar os genomas como bastante clonais. Além disso, foram observadas seis ilhas
 242 genômicas e três fagos, inseridos em ilhas genômicas, totalmente compartilhados por
 243 todos os genomas de *S. warneri* isolados de caprinos. (Fig. 3). O número de proteínas
 244 codificadas pelos genes que ocorrem nesses profagos está listado na tabela
 245 complementar 4.



246

247 **Figura 3. Mapas circulares comparativos do genoma representam o software**
 248 **BRIG com genomas de *Staphylococcus warneri* isolados de mastite clínica em**
 249 **cabras. O isolado Cap 9.2 foi a referência de posição central com os três primeiros**
 250 **anéis internos mostrando seu tamanho, conteúdo de GC e inclinação de GC.**
 251 **Mapeamento de todos os profagos (azul) e ilhas genômicas (preto) encontrados na cepa**
 252 **Cap 9.2.**

253 Foram identificados treze polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), por meio
 254 do software ParSNP, em todos os isolados de *S. warneri* persistentes oriundos de
 255 mastite clínica em cabras. Uma variante foi observada em uma região não codificadora,
 256 e 12 variantes estavam presentes nas regiões codificantes de seis genes (Fig. 4). Os
 257 genes *butA* (Diacetyl reductase [(S) -acetoin forming]), *nhaP2* (K (+) / H (+) antiporter
 258 NhaP2), *bcr_2* (Bicyclomycin resistance protein), *rplO* (50S ribosomal protein L15) e
 259 *malL* (Oligo- 1,6-glucosidase) mostrou mutações não sinônimas. No entanto, o gene
 260 *alsS* (acetolactato sintase) apresentou sete variações, sendo cinco sinônimas e duas não
 261 sinônimas.



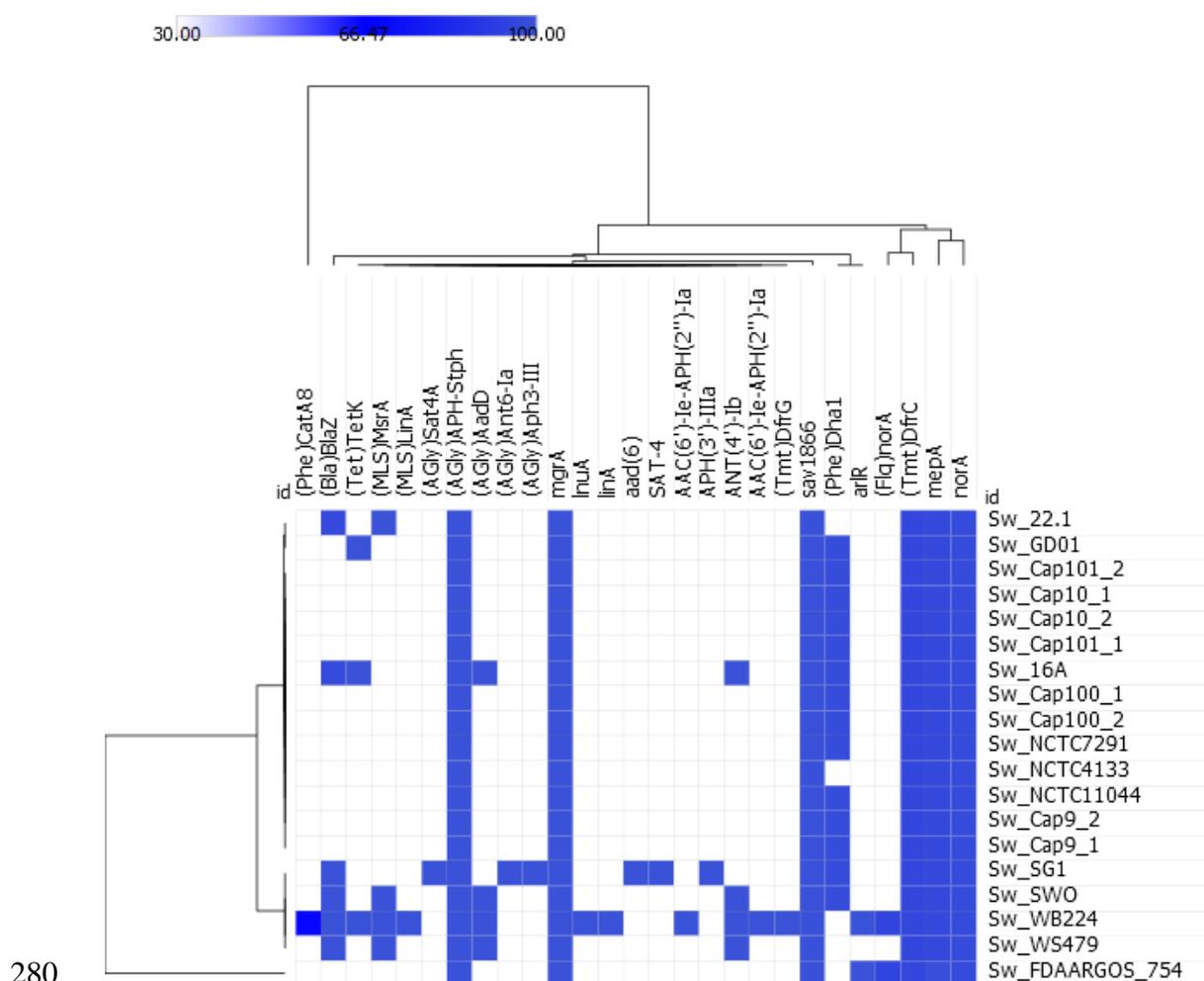
262

263

264 **Figure 4. Polimorfismos de nucleotídeo único de *Staphylococcus warneri***
 265 **persistentes oriundos de mastite clínica em cabras.** Nas colunas, são representadas as
 266 linhagens e, nas linhas, os genes. O mapa de calor indica a variação que ocorre entre a
 267 referência (Cap 9.2) em comparação com os outros genomas. Ausência da variante
 268 contra a referência (vazio) e a presença (completa). O dendrograma foi gerado por
 269 agrupamento hierárquico baseado na distância euclidiana.

270 **Genes de resistência e virulência de isolados de *S. warneri* persistentes**

271 Verificou-se neste estudo que todos os genomas possuíam 27 genes relacionados à
 272 resistência, com uma identidade mais significativa que 50% em comparação com
 273 diferentes bancos de dados (CARD, Resfinder e ARG-NNOT). Apenas sete genes são
 274 compartilhados entre todos os isolados de *S. warneri* persistentes oriundos de mastite
 275 clínica em cabras, de modo que não houve identificação de genes de resistência
 276 exclusivos de cabras (Fig. 5). A tabela 3 descreve as informações sobre os genes de
 277 resistência identificados. Esses resultados revelam que os isolados, antes e após a
 278 terapia antimicrobiana com ENO, não apresentaram diferença quanto ao perfil de
 279 resistência genética.



280 **Figura 5. Genes de resistência de *Staphylococcus warneri* persistentes de mastite**
 281 **clínica em cabras.** Os genes são representados nas colunas e isolados nas linhas. A
 282 coloração indica a porcentagem de similaridade do gene em comparação com os bancos
 283 de dados (CARD, Resfinder, and ARG-NNOT), variando de 30% a 100%. A ausência é
 284 representada por espaços vazios (em branco).
 285

286

287

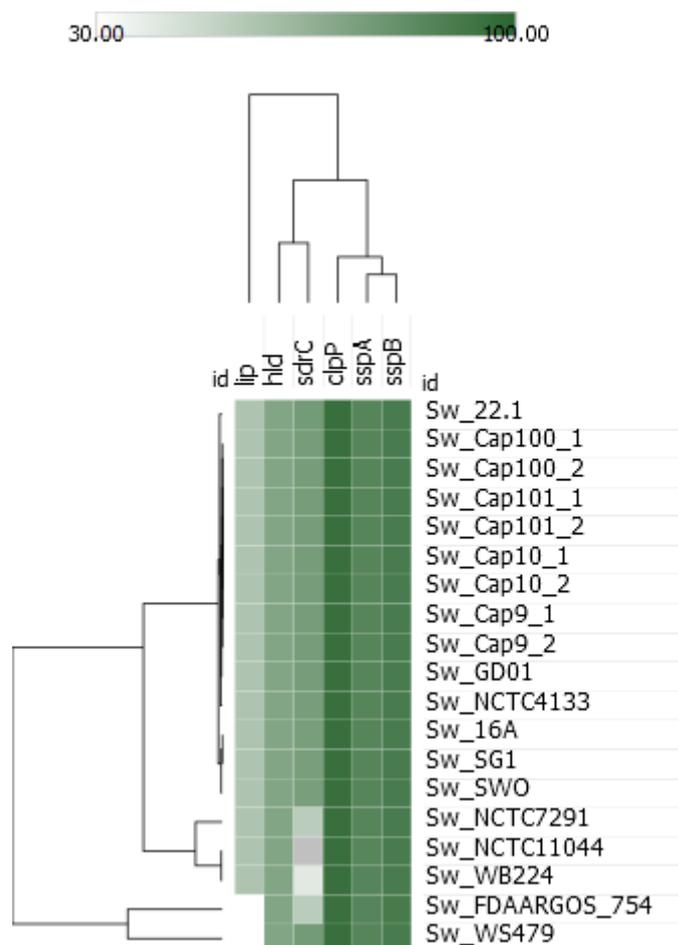
288 **Tabela 3. Genes de resistência de *Staphylococcus warneri* persistentes de mastite**
 289 **clínica em cabras.**

Gene	Classe de Drogas	Mecanismo de Resistência	Família de genes RAM	Acesso
<i>dfrC</i>	Diaminopirimidina	Substituição de alvo de antibiótico	Dihidrofolato redutase <i>dfr</i> resistente a trimetoprima	Z48233:337-822 (ARG-NOT)
<i>mepA</i>	Tetraciclina e glicilciclina		Transportador de extrusão de compostos tóxicos e multidrogas (MATE)	AY661734.1:840-2196 (CARD)
<i>mgrA</i>	Peptídeo, corante de acridina, fluoroquinolona, tetraciclina, penam, cefalosporina	Efluxo de antibiótico	Bomba de efluxo de antibiótico da superfamília do facilitador principal (MFS), bomba de efluxo de antibiótico de cassete de ligação de ATP (ABC)	NC_013450:694853-695297 (CARD)
<i>norA</i>	Fluoroquinolona, corante de acridina		Bomba de efluxo de antibiótico da superfamília do facilitador principal (MFS)	D90119:478-1644 (ARG-NOT)
<i>sav1866</i>	-		Bomba de efluxo de antibiótico de cassete de ligação de ATP (ABC)	NC_002951:1987720-1989457 (CARD)
<i>(Phe)</i> <i>Dha1</i>	Cefamicina, cefalosporina	Inativação de antibióticos	DHA beta-lactamase	BA000018:2517801-2518988(ARG-

			NOT)
<i>APH - Stph</i>	-	-	Bomba de efluxo de antibiótico de cassete de ligação de ATP (ABC)
			HE579073:177 8413- 1779213(ARG- NOT)

290 RAM: corresponde à resistência antimicrobiana.

291 Seis genes associados à virulência em *S. warneri* persistentes foram
292 identificados: *clpP* (serina protease) - promotores de tolerância ao estresse, *sdrC*
293 (proteína rica em Ser-Asp) - adesão celular, *sspA* e *sspB* (protease de Staphopains A e
294 B/V8) - patogênese, *lip* (lipase) e *hld* (δ -hemolisina). Esses achados podem indicar
295 semelhança no comportamento dos isolados, bem como mostram que não houve
296 diferença no perfil gênico de virulência em relação ao período de coleta (antes e após o
297 tratamento ENO), conforme observado na fig. 6.



298 **Figure 6. Genes de virulência de *Staphylococcus warneri* persistentes de mastite**
299 **clínica em cabras.** Os genes estão representados nas colunas e os isolados nas linhas. A
300 intensidade da coloração indica a porcentagem de similaridade do gene em comparação

301 com o banco de dados (VFDB), variando de 30% a 100%. A ausência é representada
302 por espaços vazios (em branco).

303 **DISCUSSÃO**

304 Evidências crescentes mostram que a persistência está envolvida em recidivas de
305 infecções bacterianas refratárias e no estabelecimento de mecanismos de resistência,
306 pois produz um reservatório de células viáveis na presença de antibióticos. (Levin &
307 Rozen, 2006; Cohen, Lobritz & Collins, 2013; Peyrusson et al., 2020). Estudar essas
308 células viáveis é uma oportunidade para entender a geração de células bacterianas
309 persistentes, dinâmica populacional e tolerância a antibióticos (Orman & Brynildsen,
310 2013).

311 Neste estudo, a avaliação genômica de *S. warneri* persistente isolado de mastite
312 clínica em cabras mostrou alta similaridade entre os isolados. Fatores como a
313 transferência horizontal de genes podem ter desempenhado um papel essencial na via
314 evolutiva desta espécie de SCN (Langhanki et al., 2018). O agrupamento de genes
315 ortólogos - COG demonstrou que processos de funções gerais, transcrição, replicação e
316 reparo de recombinação foram mais prevalentes em uma caracterização mais detalhada.
317 Fortes evidências afirmam que as células persistentes têm uma reprogramação
318 transcriptômica crítica para beneficiar uma rede de respostas adaptativas. Quando essas
319 células persistentes são expostas a um único antibiótico, provavelmente por meio da
320 ativação da resistência ao estresse e de genes relacionados à sobrevivência por inanição
321 e interrupção da divisão bacteriana (Geiger et al., 2012), eles causam tolerância a
322 diferentes classes de antibióticos (Peyrusson et al., 2020).

323 Sabe-se que bactérias persistentes conseguem conciliar dois mecanismos
324 antagônicos para sobreviver ao ataque de antibióticos: diminuir a maioria dos processos
325 fisiológicos durante a dormência e, simultaneamente, ativar seus sistemas de efluxo para
326 remover os antibióticos do meio intracelular (Pu et al., 2016; Pu, Ke & Bai, 2017). O
327 marcador de resistência *mgrA* foi encontrado nos isolados estudados, o que merece
328 atenção por codificar uma proteína global responsável por controlar a expressão não só
329 da bomba de efluxo NorA, que também está entre os genes de resistência identificados,
330 mas também de outras proteínas de bomba como TetG, NorB, e NorC, sendo as duas
331 últimas igualmente responsáveis pela extrusão de fluoroquinolonas (Redgrave et al.,
332 2014; van der Putten et al., 2019).

333 Além disso, *mgrA* regula outros fatores de virulência, como a síntese de cápsulas
334 (Luong, Newell & Lee, 2003). Portanto, os achados enfatizam que os sistemas de efluxo
335 podem contribuir para a formação da persistência nos isolados de *S. warneri* estudados,
336 visto que afetam a extrusão ativa de antibióticos para reduzir o acúmulo de fármacos,
337 facilitando a sobrevivência bacteriana (Du et al., 2018).

338 Dentre os fatores de virulência encontrados no presente estudo está a protease
339 *clpP*. Ela por sua vez mostrou ser um dos mediadores indispensáveis para o sistema
340 toxina-antitoxina, MazEF, para efeito de crescimento reversível e inibição de
341 persistência em células bacterianas de *E. coli* (Tripathi et al., 2014). As exoenzimas
342 bacterianas são considerados fatores de virulência em estafilococos patogênicos,

343 geralmente envolvendo proteases e lipases. As proteases *sspA* e *sspB* foram de forma
344 semelhante preditas no estudo em questão e fazem parte do operon *sspABC* cognato de
345 *S. aureus* (Tam & Torres, 2019). Foi relatado que as cepas de SCN geralmente não
346 possuem esse operon, com exceção de *S. warneri* (Nickerson et al., 2007; Yokoi et al.,
347 2016). As proteases extracelulares acima citadas têm sido apontadas como sendo
348 importantes mediadores de virulência em *S. aureus* (kolar et al., 2013), provavelmente
349 sugerindo mecanismos semelhantes na patogênese de *S. warneri* (Liu et al., 2020).

350 Simultaneamente, o gene *sdrC* contribui para a adesão célula a célula e formação
351 de biofilme em cepas de *S. aureus* (Feuillie et al., 2017). Assim, a presença desses
352 genes de virulência no repertório gênico de cepas de *S. warneri* isoladas de cabras pode
353 ter contribuído para o desenvolvimento da persistência. Outro achado relevante, apenas
354 nos isolados de mastite caprina, exceto para o isolado Cap 100.1, foi a detecção do
355 sistema epsilon da toxina zeta-antitoxina, que está relacionado ao desenvolvimento de
356 persistência em *S. aureus* pela inibição da síntese da parede celular (Mutschler et al.,
357 2011; Habib, Zhu & Sun, 2020).

358 A disponibilidade dos genomas completos e preliminares de *S. warneri* destacou
359 variações nos isolados considerados altamente clonais. As mutações que ocorreram
360 indicam que a exposição à terapia antimicrobiana pode ter influenciado nesse processo.
361 No entanto, a suscetibilidade fenotípica apresentada por eles permite inferir que o
362 desafio com ENO não induziu alterações necessárias para desencadear resistência
363 nesses isolados. Possivelmente, esses genes proporcionaram um estado de resistência
364 temporária, característico da persistência bacteriana (Brauner et al., 2016; Balaban et al.,
365 2019).

366 Os antibióticos geralmente aumentam a incidência de mutações em organismos,
367 aumentando assim a frequência de aquisição de características persistentes durante a
368 terapia profilática de longo prazo (Kohanski, DePristo & Collins, 2010; Cohen, Lobritz
369 & Collins, 2013; Windels et al., 2019). Quando relacionadas às fluoroquinolonas, essas
370 mutações ocorrem por meio do sistema de reparo do DNA, conforme relatado por Dörr,
371 Lewis & Vulić, 2009, mostrando que a persistência da ciprofloxacina depende
372 principalmente de uma resposta SOS funcional. Da mesma forma, a presença e
373 expressão eficiente de marcadores de bomba de efluxo encontrados em isolados de *S.*
374 *warneri* podem contribuir para o estado persistente. De forma semelhante, a formação
375 de biofilme, uma vez que a alta densidade celular dentro dessa estrutura aumenta a
376 transferência horizontal de genes e a competição. Isso, junto com o acúmulo de
377 produtos metabólicos, áreas microaeróbicas e estresse oxidativo, causa danos ao DNA e
378 desencadeia a resposta SOS (Zgur Bertok; Podlesek, 2020).

379 Os antipórteres do tipo NhaP são bombas iônicas secundárias e desempenham um
380 papel fundamental na homeostase iônica e no pH. Em geral, também participam de
381 outros processos biológicos críticos, como metabolismo energético, aquisição de
382 nutrientes, entre outros (Padan & Landau, 2016). Os antipórteres NhaP são codificados
383 pelos genes estruturais *nhaP1*, 2 e 3 e coordenam a troca de k^+ e Na^+ por prótons em
384 *Vibrio cholerae* (Resch et al., 2010, 2011). Fisiologicamente, o grupo NhaP mostrou-se
385 altamente eficaz na sobrevivência de *V. cholerae* em um período crítico do processo
386 infeccioso natural (Mourin et al., 2019). Considerando que a persistência é um

387 fenômeno complexo, a mutação encontrada no gene NhaP pode, entre outros fatores, ter
388 contribuído para a persistência no par de isolados Cap 101, nos diferentes períodos de
389 coleta (antes e após o tratamento com ENO).

390 Outro gene alterado foi o gene de resistência à biciclomicina (*bcr_2*) pertencente à
391 subfamília de transporte de resistência a drogas Bcr/Cfla, envolvido na patogenicidade
392 (Thamchaipenet et al., 2015). As proteínas transportadoras de resistência a drogas
393 Bcr/Cfla são conhecidas como sistemas de efluxo de proteínas transmembrana
394 pertencentes à *significant facilitating class superfamily* - MFS (Smith, Kumar & Varela,
395 2009), e como já foi elucidado, os sistemas de efluxo são contribuintes relevantes para a
396 promoção da persistência.

397 O gene *alsS* que codifica a enzima α -acetolactato sintase (ALS) apresentado em *S.*
398 *aureus*, sob condições de estresse oxidativo, causado por altas concentrações de óxido
399 nítrico, impede a acidificação intracelular, promove a produção de aminoácidos de
400 cadeia ramificada e ativação do ciclo tricarboxílico - TCA. A capacidade do *S. aureus*
401 de manter a homeostase metabólica e redox em um ambiente, como mencionado acima,
402 é essencial para sua virulência (Carvalho et al., 2017). Da mesma forma, a expressão do
403 gene *alsS* também foi relacionada à proteção de *S. aureus* quando submetido ao
404 tratamento com ácido leve dentro do biofilme (Grande et al., 2014), enfatizando o
405 padrão de adaptação de micro-organismos neste microambiente (Beenken et al., 2004).
406 Todos os genes que sofreram variações neste estudo apresentaram mutações não
407 sinônimas, principalmente o gene *alsS*. Isso pode ser apoiado pelo fato de que as taxas de
408 mutação têm uma correlação direta com o desenvolvimento de persistência (Windels et
409 al., 2019).

410 Um estudo revelou que *S. warneri* persistiu após um voo espacial, e o sistema de
411 fosfotransferase (SPT), um método distinto usado por bactérias para absorção de açúcar,
412 foi um dos fatores aumentados pela estimulação espacial de longo prazo, que resultou
413 em uma série de mudanças na parede celular, biofilmes e sensibilidade química,
414 aumentando a resistência bacteriana e adaptabilidade ao ambiente extremo (Bai et al.,
415 2019). Essas observações reforçam a hipótese de que o estado persistente pode afetar
416 micro-organismos muitas vezes negligenciados devido ao seu potencial patogênico, pois
417 um fator determinante que favorece a persistência é o nível de estresse ao qual o micro-
418 organismo estará exposto. Nesse sentido, a capacidade de muitos micro-organismos de
419 invadir, sobreviver e se replicar dentro das células hospedeiras (Mestre et al., 2010;
420 Sinha & Fraunholz, 2010), associado à capacidade de evadir o sistema imunológico,
421 muitas vezes causa mastite subclínica e doença crônica que afeta todos os mamíferos
422 em lactação (Contreras & Rodríguez, 2011). Juntos, esses fatores permitem o
423 estabelecimento de infecção persistente em rebanhos leiteiros (Wang et al., 2019;
424 Niedziela et al., 2020).

425 Portanto, é fundamental observar que, além de aumentar a resistência em
426 inúmeras bactérias (von Wintersdorff et al., 2016; Polveiro et al., 2020), a persistência
427 induzida por fluoroquinolona (Dörr, Vulić & Lewis, 2010; Barrett et al., 2019) tem
428 impacto relevante caracterizando grave risco à saúde pública, dada a ingestão de leite e
429 seus derivados contaminados por micro-organismos (Yangilar, 2013; Albenzio et al.,
430 2016; Li et al., 2017; Liu et al., 2019). Além disso, pode haver contaminação de

431 tratadores e produtores, evidenciando o potencial elo zoonótico (Abdel-Moein & Zaher,
432 2020). *S. warneri* também pode ser encontrado em diversos ambientes, como água,
433 planta, solo, entre outros (Singh, Vyas & Malaviya, 2016; Seng et al., 2017; Kianpour et
434 al., 2019; uqab et al., 2020), além de ser isolado de infecções humanas (Natsis & Cohen,
435 2018; Hebeisen et al., 2019). Todos esses aspectos podem configurar importantes
436 vetores de transmissão de bactérias persistentes, o que evidencia um contexto holístico.

437 **CONCLUSÃO**

438 O estudo genômico mostrou que todas as cepas persistentes de *S. warneri* por
439 mastite caprina, em geral, não apresentaram diferença na constituição genética quando
440 comparadas aos isolados antes e após o tratamento com ENO. Os marcadores de
441 resistência e virulência encontrados nestes isolados podem estar diretamente
442 relacionados à persistência desenvolvida. Eles exibem uma relação intrínseca com
443 processos-chave para a patogênese, como tolerância ao estresse, replicação celular,
444 adesão, formação de biofilme, inativação / alteração / substituição e efluxo de
445 antibióticos. Além disso, o número de mutações não sinônimas, especialmente no gene
446 *alsS* pode ter contribuído para o estado persistente dos isolados. Portanto, nossos
447 resultados indicam que bactérias persistentes de mastite caprina representam um sério
448 risco à saúde de animais e humanos, principalmente devido à significativa similaridade
449 genética dos isolados, o que aponta para um potencial risco de disseminação. A
450 persistência é fator determinante para falhas terapêuticas, principalmente no que se
451 refere às fluoroquinolonas, indicando a necessidade de critérios quanto à sua adoção
452 pelo médico veterinário.

453 **Agradecimentos**

454 Os autores agradecem o apoio do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento
455 Científico e Tecnológico), FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do
456 Estado de Pernambuco) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
457 Nível Superior, Brasília, Brasil), e a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP). Os
458 autores fazem parte da Rede de Ciências Ômicas (RECOM).

459 **Financiamento**

460 Este estudo foi parcialmente financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de
461 Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001. Os autores
462 também agradecem o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia
463 do Estado de Pernambuco (FACEPE - Processo APQ -0587-5.05 / 15) e Conselho
464 Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Processo 305755 /
465 2016-1).

466 **Conflito de Interesse**

467 Os autores declaram que a pesquisa foi realizada na ausência de quaisquer relações
468 comerciais ou financeiras que pudessem ser interpretadas como um potencial conflito de
469 interesses.

470 **Contribuição dos Autores**

471 **Chirles Araújo de França** concebeu e projetou os experimentos, realizou os
472 experimentos, analisou os dados, preparou figuras e ou tabelas, escreveu ou revisou as
473 minutas do artigo e aprovou a versão final.

474 **Alessandra da Silva** projetou os experimentos, realizou os experimentos, analisou os
475 dados, preparou figuras e/ou tabelas, escreveu ou revisou as minutas do artigo e aprovou
476 a versão final.

477 **Danillo Sales Rosa** realizou os experimentos, analisou os dados, criou ou revisou
478 rascunhos do artigo e aprovou o rascunho final.

479 **Gutiele do Nascimento do É** analisou os dados, criou ou revisou rascunhos do artigo e
480 aprovou o rascunho final.

481 **Diego Lucas Neres Rodrigues** realizou os experimentos, analisou os dados, criou ou
482 revisou rascunhos do artigo e aprovou o rascunho final.

483 **Raquel Emna Hurtado Castillo** realizou os experimentos, analisou os dados, criou ou
484 revisou rascunhos do artigo e aprovou o rascunho final.

485 **Thiago de Jesus Sousa** realizou os experimentos, analisou os dados, criou ou revisou
486 rascunhos do artigo e aprovou o rascunho final.

487 **Roselane Gonçalves dos Santos** realizou os experimentos, analisou os dados, criou ou
488 revisou rascunhos do artigo e aprovou o rascunho final.

489 **Anne Cybelle Pinto Gomide** analisou os dados, criou ou revisou rascunhos do artigo e
490 aprovou o rascunho final.

491 **Maria Aparecida Scatamburlo Moreira** analisou os dados, criou ou revisou
492 rascunhos do artigo e aprovou o rascunho final.

493 **Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida** analisou os dados, criou ou revisou
494 rascunhos do artigo e aprovou o rascunho final.

495 **Giselle Veneroni Gouveia** analisou os dados, criou ou revisou rascunhos do artigo e
496 aprovou o rascunho final.

497 **João José Simoni Gouveia** analisou os dados, criou ou revisou rascunhos do artigo e
498 aprovou o rascunho final.

499 **Renata de Faria Silva Souza** analisou os dados, criou ou revisou rascunhos do artigo e
500 aprovou o rascunho final.

501 **Bertram Brenig** realizou os experimentos, analisou os dados, criou ou revisou
502 rascunhos do artigo e aprovou o rascunho final.

503 **Vasco Ariston de Carvalho Azevedo** concebeu e projetou os experimentos, analisou
504 os dados, criou ou revisou as minutas do artigo e aprovou a minuta final.

505 **Mateus Matiuzzi da Costa** concebeu e projetou os experimentos, analisou os dados,
506 criou ou revisou as minutas do artigo e aprovou a minuta final.

507 **REFERÊNCIAS**

508 Abdel-Moein KA, Zaher HM. 2020. The Nasal Carriage of Coagulase-Negative
509 Staphylococci Among Animals and Its Public Health Implication. *Vector-Borne*
510 *and Zoonotic Diseases* 20:897–902. DOI: 10.1089/vbz.2020.2656.

511 Albenzio M, Santillo A, Avondo M, Nudda A, Chessa S, Pirisi A, Banni S. 2016.
512 Nutritional properties of small ruminant food products and their role on human
513 health. *Small Ruminant Research* 135:3–12. DOI:
514 10.1016/j.smallrumres.2015.12.016.

515 Alikhan N-F, Petty NK, Ben Zakour NL, Beatson SA. 2011. BLAST Ring Image
516 Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. *BMC genomics*
517 12:402. DOI: 10.1186/1471-2164-12-402.

518 Babaahmady E, Khosravi A. 2011. Toxicology of baytril (enrofloxacin). *African*
519 *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 5. DOI: 10.5897/AJPP11.644.

520 Bai P, Zhang B, Zhao X, Li D, Yu Y, Zhang X, Huang B, Liu C. 2019a. Decreased
521 metabolism and increased tolerance to extreme environments in *Staphylococcus*
522 *warneri* during long-term spaceflight. *MicrobiologyOpen* 8:e917. DOI:
523 10.1002/mbo3.917.

524 Balaban NQ, Helaine S, Lewis K, Ackermann M, Aldridge B, Andersson DI,
525 Brynildsen MP, Bumann D, Camilli A, Collins JJ, Dehio C, Fortune S, Ghigo J-
526 M, Hardt W-D, Harms A, Heinemann M, Hung DT, Jenal U, Levin BR,
527 Michiels J, Storz G, Tan M-W, Tenson T, Van Melderen L, Zinkernagel A.

- 528 2019. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nature*
529 *Reviews Microbiology* 17:441–448. DOI: 10.1038/s41579-019-0196-3.
- 530 Barrett TC, Mok WWK, Murawski AM, Brynildsen MP. 2019. Enhanced antibiotic
531 resistance development from fluoroquinolone persisters after a single exposure
532 to antibiotic. *Nature Communications* 10:1177. DOI: 10.1038/s41467-019-
533 09058-4.
- 534 Beenken KE, Dunman PM, McAleese F, Macapagal D, Murphy E, Projan SJ, Blevins
535 JS, Smeltzer MS. 2004. Global gene expression in *Staphylococcus aureus*
536 biofilms. *Journal of Bacteriology* 186:4665–4684. DOI:
537 10.1128/JB.186.14.4665-4684.2004.
- 538 Bernier Gosselin V, Dufour S, Adkins PRF, Middleton JR. 2019. Persistence of
539 coagulase negative staphylococcal intramammary infections in dairy goats. *The*
540 *Journal of Dairy Research* 86:211–216. DOI: 10.1017/S0022029919000311.
- 541 Bertelli C, Laird MR, Williams KP,
542 Simon Fraser University Research Computing Group, Lau BY, Hoad G, Winsor
543 GL, Brinkman FSL. 2017. IslandViewer 4: expanded prediction of genomic
544 islands for larger-scale datasets. *Nucleic Acids Research* 45:W30–W35. DOI:
545 10.1093/nar/gkx343.
- 546 Bitrus AA, Peter OM, Abbas MA, Goni MD. 2018. *Staphylococcus aureus*: A Review
547 of Antimicrobial Resistance Mechanisms. *Veterinary Sciences: Research and*
548 *Reviews* 4. DOI: 10.17582/journal.vsr/2018/4.2.43.54.
- 549 Boetzer M, Henkel CV, Jansen HJ, Butler D, Pirovano W. 2011. Scaffolding pre-
550 assembled contigs using SSPACE. *Bioinformatics* 27:578–579. DOI:
551 10.1093/bioinformatics/btq683.

- 552 Boetzer M, Pirovano W. 2012. Toward almost closed genomes with GapFiller. *Genome*
553 *Biology* 13:R56. DOI: 10.1186/gb-2012-13-6-r56.
- 554 Brauner A, Fridman O, Gefen O, Balaban NQ. 2016. Distinguishing between resistance,
555 tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nature Reviews Microbiology*
556 14:320–330. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.34.
- 557 Carvalho SM, de Jong A, Kloosterman TG, Kuipers OP, Saraiva LM. 2017. The
558 *Staphylococcus aureus* α -Acetolactate Synthase ALS Confers Resistance to
559 Nitrosative Stress. *Frontiers in Microbiology* 8. DOI:
560 10.3389/fmicb.2017.01273.
- 561 Casaes Nunes RS, Pires de Souza C, Pereira KS, Del Aguila EM, Flosi Paschoalin VM.
562 2016. Identification and molecular phylogeny of coagulase-negative
563 staphylococci isolates from Minas Frescal cheese in southeastern Brazil:
564 Superantigenic toxin production and antibiotic resistance. *Journal of Dairy*
565 *Science* 99:2641–2653. DOI: 10.3168/jds.2015-9693.
- 566 Ceniti C, Britti D, Santoro AML, Musarella R, Ciambrone L, Casalnuovo F, Costanzo
567 N. 2017. Phenotypic antimicrobial resistance profile of isolates causing clinical
568 mastitis in dairy animals. *Italian Journal of Food Safety* 6. DOI:
569 10.4081/ijfs.2017.6612.
- 570 Chaudhari NM, Gupta VK, Dutta C. 2016. BPGA- an ultra-fast pan-genome analysis
571 pipeline. *Scientific Reports* 6:24373. DOI: 10.1038/srep24373.
- 572 Chen L, Yang J, Yu J, Yao Z, Sun L, Shen Y, Jin Q. 2005. VFDB: a reference database
573 for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Research* 33:D325–D328. DOI:
574 10.1093/nar/gki008.
- 575 Choudhary E, Sharma R, Kumar Y, Agarwal N. 2019. Conditional Silencing by
576 CRISPRi Reveals the Role of DNA Gyrase in Formation of Drug-Tolerant

- 577 Persister Population in Mycobacterium tuberculosis. *Frontiers in Cellular and*
578 *Infection Microbiology* 9. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00070.
- 579 Cohen NR, Lobritz MA, Collins JJ. 2013. Microbial Persistence and the Road to Drug
580 Resistance. *Cell Host & Microbe* 13:632–642. DOI:
581 10.1016/j.chom.2013.05.009.
- 582 Contreras GA, Rodríguez JM. 2011. Mastitis: comparative etiology and epidemiology.
583 *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 16:339–356. DOI:
584 10.1007/s10911-011-9234-0.
- 585 Contreras A, Sierra D, Sánchez A, Corrales JC, Marco JC, Paape MJ, Gonzalo C. 2007.
586 Mastitis in small ruminants. *Small Ruminant Research* 68:145–153. DOI:
587 10.1016/j.smallrumres.2006.09.011.
- 588 Dörr T, Lewis K, Vulić M. 2009. SOS Response Induces Persistence to
589 Fluoroquinolones in Escherichia coli. *PLoS Genetics* 5:e1000760. DOI:
590 10.1371/journal.pgen.1000760.
- 591 Dörr T, Vulić M, Lewis K. 2010. Ciprofloxacin Causes Persister Formation by Inducing
592 the TisB toxin in Escherichia coli. *PLoS Biology* 8:e1000317. DOI:
593 10.1371/journal.pbio.1000317.
- 594 Du D, Wang-Kan X, Neuberger A, van Veen HW, Pos KM, Piddock LJV, Luisi BF.
595 2018. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nature*
596 *Reviews Microbiology* 16:523–539. DOI: 10.1038/s41579-018-0048-6.
- 597 Feldgarden M, Brover V, Haft DH, Prasad AB, Slotta DJ, Tolstoy I, Tyson GH, Zhao S,
598 Hsu C-H, McDermott PF, Tadesse DA, Morales C, Simmons M, Tillman G,
599 Wasilenko J, Folster JP, Klimke W. 2019. Validating the AMRFinder Tool and
600 Resistance Gene Database by Using Antimicrobial Resistance Genotype-

- 601 Phenotype Correlations in a Collection of Isolates. *Antimicrobial Agents and*
602 *Chemotherapy* 63. DOI: 10.1128/AAC.00483-19.
- 603 Feuillie C, Formosa-Dague C, Hays LMC, Vervaeck O, Derclaye S, Brennan MP,
604 Foster TJ, Geoghegan JA, Dufrêne YF. 2017. Molecular interactions and
605 inhibition of the staphylococcal biofilm-forming protein SdrC. *Proceedings of*
606 *the National Academy of Sciences* 114:3738–3743. DOI:
607 10.1073/pnas.1616805114.
- 608 Galardini M, Biondi EG, Bazzicalupo M, Mengoni A. 2011. CONTIGuator: a bacterial
609 genomes finishing tool for structural insights on draft genomes. *Source Code for*
610 *Biology and Medicine* 6:11. DOI: 10.1186/1751-0473-6-11.
- 611 Geiger T, Francois P, Liebeke M, Fraunholz M, Goerke C, Krismer B, Schrenzel J, Lalk
612 M, Wolz C. 2012. The stringent response of *Staphylococcus aureus* and its
613 impact on survival after phagocytosis through the induction of intracellular
614 PSMs expression. *PLoS pathogens* 8:e1003016. DOI:
615 10.1371/journal.ppat.1003016.
- 616 Gizaw F, Kekeba T, Teshome F, Kebede M, Abreham T, Hayishe H, Waktole H, Tufa
617 TB, Edao BM, Ayana D, Abunna F, Beyi AF, Abdi RD. 2020. Distribution and
618 antimicrobial resistance profile of coagulase-negative staphylococci from cattle,
619 equipment, and personnel on dairy farm and abattoir settings. *Heliyon* 6:e03606.
620 DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e03606.
- 621 Grande R, Nistico L, Sambanthamoorthy K, Longwell M, Iannitelli A, Cellini L, Di
622 Stefano A, Hall Stoodley L, Stoodley P. 2014. Temporal expression of agrB,
623 cidA, and alsS in the early development of *Staphylococcus aureus* UAMS-1
624 biofilm formation and the structural role of extracellular DNA and

- 625 carbohydrates. *Pathogens and Disease* 70:414–422. DOI: 10.1111/2049-
626 632X.12158.
- 627 Grunert T, Stessl B, Wolf F, Sordelli DO, Buzzola FR, Ehling-Schulz M. 2018. Distinct
628 phenotypic traits of *Staphylococcus aureus* are associated with persistent,
629 contagious bovine intramammary infections. *Scientific Reports* 8:15968. DOI:
630 10.1038/s41598-018-34371-1.
- 631 Gupta SK, Padmanabhan BR, Diene SM, Lopez-Rojas R, Kempf M, Landraud L,
632 Rolain J-M. 2014. ARG-ANNOT, a New Bioinformatic Tool To Discover
633 Antibiotic Resistance Genes in Bacterial Genomes. *Antimicrobial Agents and*
634 *Chemotherapy* 58:212–220. DOI: 10.1128/AAC.01310-13.
- 635 Habib G, Zhu J, Sun B. 2020. A novel type I toxin-antitoxin system modulates persister
636 cell formation in *Staphylococcus aureus*. *International journal of medical*
637 *microbiology: IJMM* 310:151400. DOI: 10.1016/j.ijmm.2020.151400.
- 638 Hadfield J, Croucher N, Goater R, Abudahab K, Aanensen D, Harris S. 2017.
639 Phandango: An interactive viewer for bacterial population genomics.
640 *Bioinformatics (Oxford, England)* 34. DOI: 10.1093/bioinformatics/btx610.
- 641 Hebeisen UP, Atkinson A, Marschall J, Buetti N. 2019. Catheter-related bloodstream
642 infections with coagulase-negative staphylococci: are antibiotics necessary if the
643 catheter is removed? *Antimicrobial Resistance and Infection Control* 8:21. DOI:
644 10.1186/s13756-019-0474-x.
- 645 Kianpour S, Ebrahiminezhad A, Deyhimi M, Negahdaripour M, Raei MJ, Mohkam M,
646 Rezaee H, Irajie C, Berenjian A, Ghasemi Y. 2019. Structural characterization of
647 polysaccharide-coated iron oxide nanoparticles produced by *Staphylococcus*
648 *warneri*, isolated from a thermal spring. *Journal of Basic Microbiology* 59:569–
649 578. DOI: 10.1002/jobm.201800684.

- 650 Kohanski MA, DePristo MA, Collins JJ. 2010. Sublethal antibiotic treatment leads to
651 multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Molecular Cell* 37:311–
652 320. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.01.003.
- 653 Kolar SL, Ibarra J A, Rivera FE, Mootz JM, Davenport JE, Stevens SM, Horswill AR,
654 Shaw LN. 2013. Extracellular proteases are key mediators of *Staphylococcus*
655 *aureus* virulence via the global modulation of virulence-determinant
656 stability. *MicrobiologyOpen* 2(1), 18–34. DOI:10.1002/mbo3.55.
- 657 Koop G, De Vlieghe S, De Visscher A, Supré K, Haesebrouck F, Nielen M, van
658 Werven T. 2012. Differences between coagulase-negative *Staphylococcus*
659 species in persistence and in effect on somatic cell count and milk yield in dairy
660 goats. *Journal of Dairy Science* 95:5075–5084. DOI: 10.3168/jds.2012-5615.
- 661 Langhanki L, Berger P, Treffon J, Catania F, Kahl BC, Mellmann A. 2018. In vivo
662 competition and horizontal gene transfer among distinct *Staphylococcus aureus*
663 lineages as major drivers for adaptational changes during long-term persistence
664 in humans. *BMC microbiology* 18:152. DOI: 10.1186/s12866-018-1308-3.
- 665 Letunic I, Bork P. 2016. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display
666 and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Research*
667 44:W242-245. DOI: 10.1093/nar/gkw290.
- 668 Levin BR, Rozen DE. 2006. Non-inherited antibiotic resistance. *Nature Reviews*
669 *Microbiology* 4:556–562. DOI: 10.1038/nrmicro1445.
- 670 Li Z, Wright A-DG, Yang Y, Si H, Li G. 2017. Unique Bacteria Community
671 Composition and Co-occurrence in the Milk of Different Ruminants. *Scientific*
672 *Reports* 7:40950. DOI: 10.1038/srep40950.
- 673 Lima MC, de Barros M, Scatamburlo TM, Polveiro RC, de Castro LK, Guimarães SHS,
674 da Costa SL, da Costa MM, Moreira MAS. 2020. Profiles of *Staphylococcus*

- 675 aureus isolated from goat persistent mastitis before and after treatment with
676 enrofloxacin. *BMC Microbiology* 20:127. DOI: 10.1186/s12866-020-01793-9.
- 677 Liu W, Sun H, Zhou Y, Li Y, Qin Y, Li R, Chen Y, Yu L, Zhao M, Zhang W, Xu Y.
678 2019. Goat Milk Consumption Ameliorates Abnormalities in Glucose
679 Metabolism and Enhances Hepatic and Skeletal Muscle AMP-Activated Protein
680 Kinase Activation in Rats Fed with High-Fat Diets. *Molecular Nutrition & Food
681 Research* 63:1900703. DOI: 10.1002/mnfr.201900703.
- 682 Liu, C., Zhao, X., Xie, H., Zhang, X., Li, K., Ma, C., & Fu, Q. (2020). Whole genome
683 sequence and comparative genome analyses of multi-resistant *Staphylococcus
684 warneri* GD01 isolated from a diseased pig in China. *PloS one* 15(5). DOI:
685 10.1371/journal.pone.0233363.
- 686 López C, García JJ, Sierra M, Diez MJ, Pérez C, Sahagún AM, Fernández N. 2015.
687 Systemic and mammary gland disposition of enrofloxacin in healthy sheep
688 following intramammary administration. *BMC Veterinary Research* 11:88. DOI:
689 10.1186/s12917-015-0406-9.
- 690 Luong TT, Newell SW, Lee CY. 2003. Mgr, a novel global regulator in *Staphylococcus
691 aureus*. *Journal of Bacteriology* 185:3703–3710. DOI: 10.1128/jb.185.13.3703-
692 3710.2003.
- 693 McArthur AG, Waglechner N, Nizam F, Yan A, Azad MA, Baylay AJ, Bhullar K,
694 Canova MJ, De Pascale G, Ejim L, Kalan L, King AM, Koteva K, Morar M,
695 Mulvey MR, O'Brien JS, Pawlowski AC, Piddock LJV, Spanogiannopoulos P,
696 Sutherland AD, Tang I, Taylor PL, Thaker M, Wang W, Yan M, Yu T, Wright
697 GD. 2013. The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrobial
698 Agents and Chemotherapy* 57:3348–3357. DOI: 10.1128/AAC.00419-13.

- 699 Mestre MB, Fader CM, Sola C, Colombo MI. 2010. α -hemolysin is required for the
700 activation of the autophagic pathway in *Staphylococcus aureus* infected cells.
701 *Autophagy* 6:110–125. DOI: 10.4161/auto.6.1.10698.
- 702 Mok WWK, Brynildsen MP. 2018. Timing of DNA damage responses impacts
703 persistence to fluoroquinolones. *Proceedings of the National Academy of*
704 *Sciences* 115:E6301–E6309. DOI: 10.1073/pnas.1804218115.
- 705 Mørk T, Jørgensen HJ, Sunde M, Kvitle B, Sviland S, Waage S, Tollersrud T. 2012.
706 Persistence of staphylococcal species and genotypes in the bovine udder.
707 *Veterinary Microbiology* 159:171–180. DOI: 10.1016/j.vetmic.2012.03.034.
- 708 Mourin M, Wai A, O’Neil J, Hausner G, Dibrov P. 2019. Physiological, Structural, and
709 Functional Analysis of the Paralogous Cation-Proton Antiporters of NhaP Type
710 from *Vibrio cholerae*. *International Journal of Molecular Sciences* 20. DOI:
711 10.3390/ijms20102572.
- 712 Mutschler H, Gebhardt M, Shoeman RL, Meinhart A. 2011. A novel mechanism of
713 programmed cell death in bacteria by toxin-antitoxin systems corrupts
714 peptidoglycan synthesis. *PLoS biology* 9:e1001033. DOI:
715 10.1371/journal.pbio.1001033.
- 716 Natsis NE, Cohen PR. 2018. Coagulase-Negative Staphylococcus Skin and Soft Tissue
717 Infections. *American Journal of Clinical Dermatology* 19:671–677. DOI:
718 10.1007/s40257-018-0362-9.
- 719 Nickerson, N. N., Prasad, L., Jacob, L., Delbaere, L. T., & McGavin, M. J. (2007).
720 Activation of the SspA serine protease zymogen of *Staphylococcus aureus*
721 proceeds through unique variations of a trypsinogen-like mechanism and is
722 dependent on both autocatalytic and metalloprotease-specific

- 723 processing. *Journal of Biological Chemistry* 282(47): 34129-34138. DOI:
724 10.1074/jbc.M705672200.
- 725 Nickerson SC, Kautz FM, Harding AE, Ely LO, Hurley DJ. 2020. Mastitis control in
726 bred dairy heifers using dry cow therapy and teat sealant to prevent new
727 infections and to cure existing ones. *Applied Animal Science* 36:91–99. DOI:
728 10.15232/aas.2019-01920.
- 729 Niedziela DA, Murphy MP, Grant J, Keane OM, Leonard FC. 2020. Clinical
730 presentation and immune characteristics in first-lactation Holstein-Friesian cows
731 following intramammary infection with genotypically distinct *Staphylococcus*
732 *aureus* strains. *Journal of Dairy Science* 103:8453–8466. DOI:
733 10.3168/jds.2019-17433.
- 734 Ojkic N, Lilja E, Direito S, Dawson A, Allen RJ, Waclaw B. 2020. A Roadblock-and-
735 Kill Mechanism of Action Model for the DNA-Targeting Antibiotic
736 Ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 64. DOI:
737 10.1128/AAC.02487-19.
- 738 Orman MA, Brynildsen MP. 2013. Establishment of a method to rapidly assay bacterial
739 persister metabolism. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57:4398–4409.
740 DOI: 10.1128/AAC.00372-13.
- 741 Padan E, Landau M. 2016. Sodium-Proton (Na⁺/H⁺) Antiporters: Properties and Roles
742 in Health and Disease. In: Sigel A, Sigel H, Sigel RKO eds. *The Alkali Metal*
743 *Ions: Their Role for Life*. Metal Ions in Life Sciences. Cham: Springer
744 International Publishing, 391–458. DOI: 10.1007/978-3-319-21756-7_12.
- 745 Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MTG, Fookes M, Falush
746 D, Keane JA, Parkhill J. 2015. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome

- 747 analysis. *Bioinformatics (Oxford, England)* 31:3691–3693. DOI:
748 10.1093/bioinformatics/btv421.
- 749 Peyrusson F, Varet H, Nguyen TK, Legendre R, Sismeiro O, Coppée J-Y, Wolz C,
750 Tenson T, Van Bambeke F. 2020. Intracellular *Staphylococcus aureus* persists
751 upon antibiotic exposure. *Nature Communications* 11:2200. DOI:
752 10.1038/s41467-020-15966-7.
- 753 Podlesek Z, Žgur BD. 2020. The DNA Damage Inducible SOS Response Is a Key
754 Player in the Generation of Bacterial Persister Cells and Population Wide
755 Tolerance. *Frontiers in microbiology* 11:1785. DOI:
756 10.3389/fmicb.2020.01785.
- 757 Polveiro RC, Vidigal PMP, Mendes TA de O, Yamatogi RS, Lima MC, Moreira MAS.
758 2020. Effects of enrofloxacin treatment on the bacterial microbiota of milk from
759 goats with persistent mastitis. *Scientific Reports* 10:4421. DOI: 10.1038/s41598-
760 020-61407-2.
- 761 Price MN, Dehal PS, Arkin AP. 2010. FastTree 2 – Approximately Maximum-
762 Likelihood Trees for Large Alignments. *PLOS ONE* 5:e9490. DOI:
763 10.1371/journal.pone.0009490.
- 764 Pu Y, Ke Y, Bai F. 2017. Active efflux in dormant bacterial cells – New insights into
765 antibiotic persistence. *Drug Resistance Updates* 30:7–14. DOI:
766 10.1016/j.drug.2016.11.002.
- 767 Pu Y, Zhao Z, Li Y, Zou J, Ma Q, Zhao Y, Ke Y, Zhu Y, Chen H, Baker MAB, Ge H,
768 Sun Y, Xie XS, Bai F. 2016. Enhanced Efflux Activity Facilitates Drug
769 Tolerance in Dormant Bacterial Cells. *Molecular Cell* 62:284–294. DOI:
770 10.1016/j.molcel.2016.03.035.

- 771 Rall VLM, Miranda ES, Castilho IG, Camargo CH, Langoni H, Guimarães FF, Araújo
772 Júnior JP, Fernandes Júnior A. 2014. Diversity of *Staphylococcus* species and
773 prevalence of enterotoxin genes isolated from milk of healthy cows and cows
774 with subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science* 97:829–837. DOI:
775 10.3168/jds.2013-7226.
- 776 Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJV. 2014. Fluoroquinolone resistance:
777 mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends in*
778 *Microbiology* 22:438–445. DOI: 10.1016/j.tim.2014.04.007.
- 779 Regitano LCA, Niciura SCM, Ibelli AMG, Gouveia JJS. 2009. Protocolos de biologia
780 molecular aplicada à produção animal. Embrapa; 1: 72. Available from:
781 [http://www.cppse.embrapa.br/servicos/publicacao gratuita/e-](http://www.cppse.embrapa.br/servicos/publicacao gratuita/e-books/LVProtocolos.pdf)
782 [books/LVProtocolos.pdf](http://www.cppse.embrapa.br/servicos/publicacao gratuita/e-books/LVProtocolos.pdf).
- 783 Resch CT, Winogrodzki JL, Häse CC, Dibrov P. 2011. Insights into the biochemistry of
784 the ubiquitous NhaP family of cation/H⁺ antiporters. *Biochemistry and Cell*
785 *Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire* 89:130–137. DOI: 10.1139/o10-149.
- 786 Resch CT, Winogrodzki JL, Patterson CT, Lind EJ, Quinn MJ, Dibrov P, Häse CC.
787 2010. The putative Na⁺/H⁺ antiporter of *Vibrio cholerae*, Vc-NhaP2, mediates
788 the specific K⁺/H⁺ exchange in vivo. *Biochemistry* 49:2520–2528. DOI:
789 10.1021/bi902173y.
- 790 Seemann T. 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*
791 30:2068–2069. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu153.
- 792 Sela U, Euler CW, Rosa JC da, Fischetti VA. 2018. Strains of bacterial species induce a
793 greatly varied acute adaptive immune response: The contribution of the
794 accessory genome. *PLOS Pathogens* 14:e1006726. DOI:
795 10.1371/journal.ppat.1006726.

- 796 Seng R, Leungtongkam U, Thummeepak R, Chatdumrong W, Sitthisak S. 2017. High
797 prevalence of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci isolated
798 from a university environment in Thailand. *International Microbiology: The*
799 *Official Journal of the Spanish Society for Microbiology* 20:65–73. DOI:
800 10.2436/20.1501.01.286.
- 801 Singh A, Vyas D, Malaviya P. 2016. Two-stage phyto-microremediation of tannery
802 effluent by *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleid. and chromium resistant bacteria.
803 *Bioresource Technology* 216:883–893. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.06.025.
- 804 Sinha B, Fraunholz M. 2010. *Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-
805 invasion events. *International Journal of Medical Microbiology* 300:170–175.
806 DOI: 10.1016/j.ijmm.2009.08.019.
- 807 Smith KP, Kumar S, Varela MF. 2009. Identification, cloning, and functional
808 characterization of EmrD-3, a putative multidrug efflux pump of the major
809 facilitator superfamily from *Vibrio cholerae* O395. *Archives of Microbiology*
810 191:903–911. DOI: 10.1007/s00203-009-0521-8.
- 811 Szczuka E, Jabłońska L, Kaznowski A. 2016. Coagulase-negative staphylococci:
812 pathogenesis, occurrence of antibiotic resistance genes and in vitro effects of
813 antimicrobial agents on biofilm-growing bacteria. *Journal of Medical*
814 *Microbiology* 65:1405–1413. DOI: 10.1099/jmm.0.000372.
- 815 Tam K, Torres VJ. 2019. *Staphylococcus aureus* Secreted Toxins and Extracellular
816 Enzymes. *Microbiology spectrum* 7:2 10.1128/microbiolspec.GPP3-0039-2018.
817 DOI: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0039-2018.
- 818 Thamchaipenet A, Peyachoknagul S, Jittapalapong S, Pinyoowong D. 2015. Topology
819 Prediction and Motifs Identification of Bicyclomycin Resistance Protein of

- 820 Ehrlichia Canis Strain Bangkok. *Biomedical and Pharmacology Journal* 1:01–
821 08.
- 822 Treangen TJ, Ondov BD, Koren S, Phillippy AM. 2014. The Harvest suite for rapid
823 core-genome alignment and visualization of thousands of intraspecific
824 microbial genomes. *Genome Biology* 15:524. DOI: 10.1186/s13059-014-0524-x.
- 825 Tripathi A, Dewan PC, Siddique SA, Varadarajan R. 2014. MazF-induced growth
826 inhibition and persister generation in Escherichia coli. *The Journal of Biological*
827 *Chemistry* 289:4191–4205. DOI: 10.1074/jbc.M113.510511.
- 828 uqab B, Nazir R, Ahmad Ganai B, Rahi P, Rehman S, Farooq S, Dar R, Parray JA,
829 Fahad Al-Arjani Al-Arjani A-B, Tabassum B, Fathi Abd_Allah E. 2020.
830 MALDI-TOF-MS and 16S rRNA characterization of lead tolerant metallophile
831 bacteria isolated from saffron soils of Kashmir for their sequestration potential.
832 *Saudi Journal of Biological Sciences* 27:2047–2053. DOI:
833 10.1016/j.sjbs.2020.04.021.
- 834 van der Putten BCL, Remondini D, Pasquini G, Janes VA, Matamoros S, Schultsz C.
835 2019. Quantifying the contribution of four resistance mechanisms to
836 ciprofloxacin MIC in Escherichia coli: a systematic review. *The Journal of*
837 *Antimicrobial Chemotherapy* 74:298–310. DOI: 10.1093/jac/dky417.
- 838 Völzing KG, Brynildsen MP. 2015. Stationary-Phase Persisters to Ofloxacin Sustain
839 DNA Damage and Require Repair Systems Only during Recovery. *mBio*
840 6:e00731-00715. DOI: 10.1128/mBio.00731-15.
- 841 von Wintersdorff CJH, Penders J, van Niekerk JM, Mills ND, Majumder S, van Alphen
842 LB, Savelkoul PHM, Wolffs PFG. 2016. Dissemination of Antimicrobial
843 Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Frontiers*
844 *in Microbiology* 7. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00173.

- 845 Wang H, Zhou Y, Zhu Q, Zang H, Cai J, Wang J, Cui L, Meng X, Zhu G, Li J. 2019.
846 Staphylococcus aureus induces autophagy in bovine mammary epithelial cells
847 and the formation of autophagosomes facilitates intracellular replication of
848 Staph. aureus. *Journal of Dairy Science* 102:8264–8272. DOI:
849 10.3168/jds.2019-16414.
- 850 Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. 2017. Unicycler: Resolving bacterial genome
851 assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS computational biology*
852 13:e1005595. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1005595.
- 853 Windels EM, Michiels JE, Fauvart M, Wenseleers T, Van den Bergh B, Michiels J.
854 2019. Bacterial persistence promotes the evolution of antibiotic resistance by
855 increasing survival and mutation rates. *The ISME Journal* 13:1239–1251. DOI:
856 10.1038/s41396-019-0344-9.
- 857 Yangilar F. 2013. As a potentially functional food: Goat milk and products. *Journal of*
858 *Nutrition Research* 1:68–81.
- 859 Yokoi KJ, Kuzuwa S, Iwasaki SI, Yamakawa A, Taketo A, Kodaira KI. 2016.
860 Aureolysin of *Staphylococcus warneri* M accelerates its proteolytic cascade, and
861 participates in biofilm formation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*
862 80(6), 1238-1242. DOI: 10.1080/09168451.2016.1148576.

863 **Material Suplementar**

864 **Tabela 1. Caracterização funcional dos contigs não mapeados em *Staphylococcus***
 865 ***warneri* persistentes oriundos de mastite clínica em cabras.**

Isolado Excluded	Excluded (quantidade de ">")	Plasmid Finder	CDS	Genes	RNAr	RNAt
Cap 9.1	48	4	58	76	3 (16S, 23S e 5S)	15
Cap 9.2	45	4	153	163	2 (5S)	8
Cap 10.1	20	4	57	58	-	1
Cap 10.2	22	4	58	59	-	1
Cap 100.1	-	2	13	13	-	-
Cap 100.2	20	4	59	60	-	1
Cap 101.1	23	4	59	60	-	1
Cap 101.2	23	4	57	62	2 (16s e 23s)	3

866 CDS representa sequências codificadoras

867 **Tabela 2. Pontos de origens de plasmídeos de *Staphylococcus warneri* persistentes oriundos de mastite clínica em cabras.**

Isolado	Database	Plasmídeo	Identidade	Query / Template length	Contig	Posição no contig	Note	Número de acesso
Cap 9.1	Rep1	rep21	100.0	1004 / 1004	19	1491..2494	rep (pKH21)	EU350088
	Rep_trans	rep7a	99.89	945 / 945	15	9..953	repC (Cassette)	AB037671
	Rep_trans	rep7a	98.17	928 / 930	16	920..1846	CDS11947(pSZ4)	CP003669
	RepA_N	rep39	100.0	957 / 957	18	1327..2283	repA (SAP016A)	GQ900381
Cap 9.2	Rep1	rep21	100.0	1004 / 1004	edena_9p_28	70..1073	rep (pKH21)	EU350088
	Rep_trans	rep7a	99.89	945 / 945	edena_9p_17	3637..4581	repC (Cassette)	AB037671
	Rep_trans	rep7a	98.17	928 / 930	edena_9p_36	527..1453	CDS11947(pSZ4)	CP003669
	RepA_N	rep39	100.0	957 / 957	edena_9p_16	9217..10173	repA (SAP016A)	GQ900381
Cap 10.1	Rep1	rep21	100.0	1004 / 1004	scaffold16 size2531	142..1145	rep (pKH21)	EU350088
	Rep_trans	rep7a	99.89	945 / 945	scaffold12 size4441	3488..4432	repC (Cassette)	AB037671
	Rep_trans	rep7a	98.17	928 / 930	scaffold13 size4100	920..1846	CDS11947(pSZ4)	CP003669
	RepA_N	rep39	100.0	957 / 957	scaffold15 size5306	3174..4130	repA (SAP016A)	GQ900381
Cap 10.2	Rep1	rep21	100.0	913 / 1004	scaffold16 size2531	1619..2531	rep(pKH21)	EU350088
	Rep_trans	rep7a	99.89	945 / 945	scaffold12 size4441	3488..4432	repC (Cassette)	AB037671
	Rep_trans	rep7a	98.17	928 / 930	scaffold13 size4100	2255..3181	CDS11947(pSZ4)	CP003669
	RepA_N	rep39	100.0	957 / 957	scaffold10 size8462	1327..2283	repA (SAP016A)	GQ900381
Cap 100.1	Rep1	rep21	100.0	1004 / 1004	scaffold_4	971..1974	rep (pKH21)	EU350088
	Rep_trans	rep7a	98.17	928 / 930	Scaffold_2	2406..3332	CDS11947(pSZ4)	CP003669

Cap 100.2	Rep1	rep21	100.0	785 / 1004	scaffold16 size2531	1..785	rep (pKH21)	EU350088
	Rep_trans	rep7a	99.89	945 / 945	scaffold12 size4441	10..954	repC (Cassette)	AB037671
	Rep_trans	rep7a	98.17	928 / 930	scaffold13 size4100	920..1846	CDS11947(pSZ4)	CP003669
	RepA_N	rep39	100.0	957 / 957	scaffold10 size8517	1327..2283	repA (SAP016A)	GQ900381
Cap 101.1	Rep1	rep21	100.0	1004 / 1004	scaffold17 size2531	1261..2264	rep (pKH21)	EU350088
	Rep_trans	rep7a	99.89	945 / 945	scaffold13 size4441	10..954	repC (Cassette)	AB037671
	Rep_trans	rep7a	98.17	928 / 930	scaffold14 size4100	2255..3181	CDS11947(pSZ4)	CP003669
	RepA_N	rep39	100.0	957 / 957	scaffold11 size8463	1327..2283	repA (SAP016A)	GQ900381
Cap 101.2	Rep1	rep21	100.0	913/1004	Scaffold16 size2531	1619..2531	rep (pKH21)	EU350088
	Rep_trans	rep7a	99.89	945 / 945	scaffold12 size4441	3488..4432	repC (Cassette)	AB037671
	Rep_trans	rep7a	98.17	928 / 930	scaffold13 size4100	920..1846	CDS11947(pSZ4)	CP003669
	RepA_N	rep39	100.0	957 / 957	scaffold10 size8462	1327..2283	repA (SAP016A)	GQ900381

868 Cap 9.1, 10.1, 100.1, 101.1 representam isolados antes do tratamento com enrofloxacina e Cap 9.2, 10.2, 100.2 e 101.2 representam isolados após
869 tratamento com enrofloxacina.

870

871

872

873 **Tabela 2. Genes centrais, acessórios e únicos dos genomas de isolados de**
 874 *Staphylococcus warneri* depositados no NCBI.

	Nome do organismo	No. de genes centrais	No. de genes acessórios	No. de genes únicos	No. de genes exclusivamente ausentes
1	Sw_16A	2017	336	155	3
2	Sw_22.1	2017	256	25	2
3	Sw_FDAARGOS_754	2017	198	47	41
4	Sw_GD01	2017	271	70	0
5	Sw_NCTC11044	2017	215	10	17
6	Sw_NCTC4133	2017	176	6	4
7	Sw_NCTC7291	2017	220	24	0
8	Sw_SG1	2017	280	52	0
9	Sw_SWO	2017	331	37	1
10	Sw_WB224	2017	226	92	17
11	Sw_WS479	2017	293	53	1
12	SwCap100_1	2017	283	0	0
13	SwCap100_2	2017	282	0	0
14	SwCap101_1	2017	282	0	0
15	SwCap101_2	2017	283	0	0
16	SwCap10_1	2017	283	0	0
17	SwCap10_2	2017	283	0	0
18	SwCap9_1	2017	282	0	0
19	SwCap9_2	2017	280	0	0

875 1 a 11: genomas depositados no NCBI. 12 a 19: Cap 9.1, 10.1, 100.1, 101.1 representam
 876 isolados antes do tratamento com enrofloxacina e Cap 9.2, 10.2, 100.2 e 101.2
 877 representam isolados após tratamento com enrofloxacina.

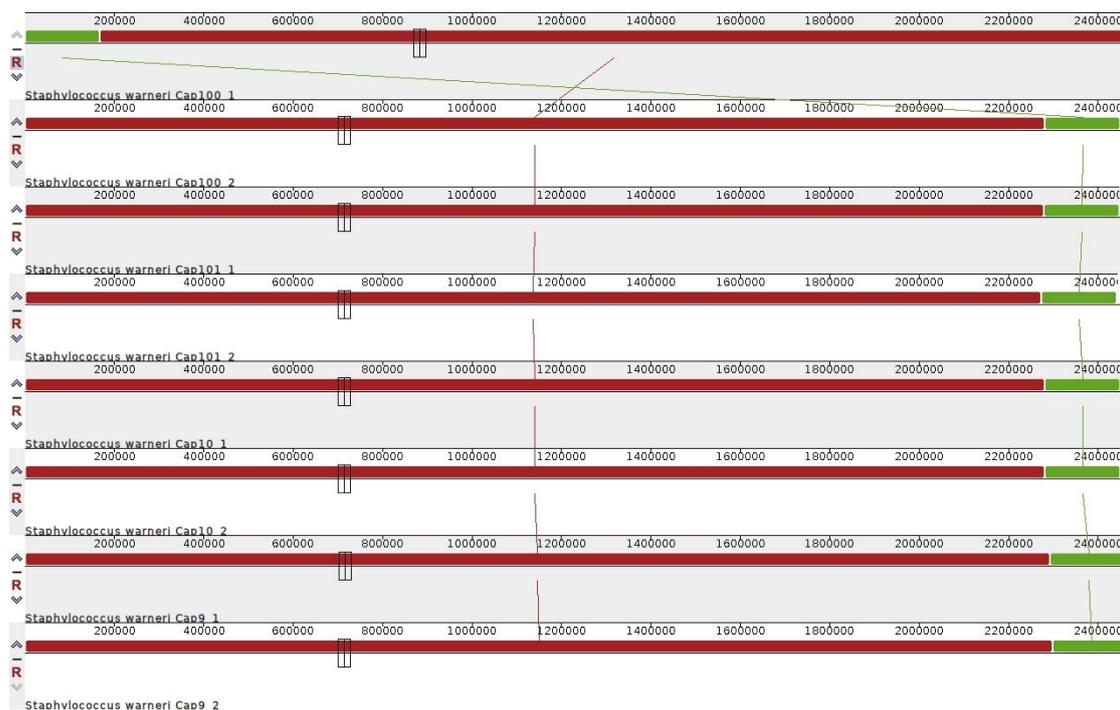
878 **Tabela 3. Proteínas codificadas pelos genes presentes nos profagos de *Staphylococcus warneri* persistentes oriundos de mastite clínica em**
 879 **cabras.**

Isolado	Região	Comprimento da região (Kb)	Integridade	Score	# Total de Proteínas	Posição da região	Fago Mais Comum	GC %
Cap 9.1	1	17.8	Incompleto	30	22	<u>882701-900577</u>	PHAGE_Staphy_PT1028_NC_007045(5)	29.32
	2	54	Intacto	150	72	<u>1663655-1717736</u>	PHAGE_Staphy_IME_SA4_NC_029025(11)	33.55
	3	16	Incompleto	10	24	<u>2373980-2389981</u>	PHAGE_Staphy_PT1028_NC_007045(9)	30.28
Cap 9.2	1	17.8	Incompleto	30	22	<u>882530-900406</u>	PHAGE_Staphy_PT1028_NC_007045(5)	29.32
	2	54.4	Intacto	150	72	<u>1663315-1717761</u>	PHAGE_Staphy_IME_SA4_NC_029025(11)	33.54
	3	16	Incompleto	10	24	<u>2379851-2395852</u>	PHAGE_Staphy_PT1028_NC_007045(9)	30.28
Cap 10.1	1	17.8	Incompleto	30	22	<u>872635-890511</u>	PHAGE_Staphy_PT1028_NC_007045(5)	29.32
	2	54.4	Intacto	150	73	<u>1653105-1707551</u>	PHAGE_Staphy_IME_SA4_NC_029025(12)	33.54
	3	16	Incompleto	10	24	<u>2358690-2374691</u>	PHAGE_Staphy_PT1028_NC_007045(9)	30.28
Cap 10.2	1	17.8	Incompleto	30	22	<u>872324-890200</u>	PHAGE_Staphy_PT1028_NC_007045(5)	29.32
	2	54.4	Intacto	150	73	<u>1653108-1707554</u>	PHAGE_Staphy_IME_SA4_NC_029025(12)	33.54
	3	16Kb	Incompleto	10	24	<u>2358542-</u>	PHAGE_Staphy_PT1028_NC_007045(9)	30.28

						2374543		
Cap 100.1	1	16	Incompleto	10	24	77365-93366	PHAGE_Staphy_PT1028_NC_007045(9)	30.28
	2	17.8	Incompleto	30	22	1050756-1068632	PHAGE_Staphy_PT1028_NC_007045(5)	29.32
	3	54.2	Intacto	150	72	1830955-1885223	PHAGE_Staphy_IME_SA4_NC_029025(11)	33.55
Cap 100.2	1	17.8	Incompleto	30	22	872324-890200	PHAGE_Staphy_PT1028_NC_007045(5)	29.32
	2	54.6	Intacto	150	72	1652794-1707427	PHAGE_Staphy_IME_SA4_NC_029025(11)	33.54
	3	16	Incompleto	10	24	2358521-2374522	PHAGE_Staphy_PT1028_NC_007045(9)	30.28
Cap 101.1	1	17.8	Incompleto	30	22	871143-889019	PHAGE_Staphy_PT1028_NC_007045(5)	29.32
	2	54.2	Intacto	150	72	1651089-1705348	PHAGE_Staphy_IME_SA4_NC_029025(11)	33.55
	3	16	Incompleto	10	24	2356439-2372440	PHAGE_Staphy_PT1028_NC_007045(9)	30.28
Cap 101.2	1	17.8	Incompleto	30	22	870967-888843	PHAGE_Staphy_PT1028_NC_007045(5)	29.32
	2	54.4	Intacto	150	72	1646054-1700500	PHAGE_Staphy_IME_SA4_NC_029025(11)	33.54
	3	16	Incompleto	10	24	2351594-2367595	PHAGE_Staphy_PT1028_NC_007045(9)	30.28

880 Cap 9.1, 10.1, 100.1, 101.1 representam isolados antes do tratamento com enrofloxacina e Cap 9.2, 10.2, 100.2 e 101.2 representam isolados após
881 tratamento com enrofloxacina. Kb: kilobase; GC: percentual de guanina e citosina.

882



883 **Fig S1. Análise sintênica de *Staphylococcus warneri* persistentes oriundos de mastite**
 884 **clínica em cabras.** Cap 9.1, 10.1, 100.1, 101.1 representam isolados antes do
 885 tratamento com enrofloxacina e Cap 9.2, 10.2, 100.2 e 101.2 representam isolados após
 886 tratamento com enrofloxacina. Este alinhamento foi realizado utilizando a opção
 887 Progressive Mauve do software Mauve. Cada bloco representa sequências
 888 compartilhadas por genomas (blocos localmente colineares).

889

890

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Concluiu-se que tolerância e persistência podem ocorrer em bactérias isoladas de animais. A tolerância encontrada em *S. aureus* e a persistência em *S. warneri* indicam que o tipo de resposta desenvolvida ao antibiótico pode ser espécie-específica, neste caso. Além disso, os isolados selecionados mostraram persistência dependente do tempo tipo I. Vale ressaltar que todos os isolados foram produtores de biofilme, capacidade que pode ter contribuído para o desenvolvimento dos fenômenos de tolerância/persistência.

O estudo genômico mostrou que todas as cepas persistentes de *S. warneri* por mastite caprina, em geral, são similares na sua constituição genética, mesmo comparando os isolados antes e após o tratamento com enrofloxacin. Os marcadores de resistência e virulência encontrados nesses isolados podem ter relação com a persistência desenvolvida, principalmente, a presença do sistema toxina-antitoxina. Além disso, o número de mutações não sinônimas pode ter contribuído para o estado persistente das cepas.

Diante disso, é imprescindível a compreensão desses fenômenos e os fatores de virulência associados, bem como a sua ocorrência nos diferentes cenários humano e animal. Até o presente momento, não há relatos bibliográficos relativos à ocorrência desses eventos em micro-organismos causadores de mastite. Portanto, essas observações elucidam a importância e o ineditismo do estudo desses fenômenos em isolados de *Staphylococcus* spp. oriundos de mastite caprina, além de viabilizar informações e promover pesquisas no intuito de determinar estratégias eficientes de eliminação.

Ademais, essa conjuntura permite planejar a adoção de métodos alternativos a serem introduzidos na cadeia leiteira, a exemplo do TDtest, que visa uma triagem dos tipos de micro-organismos tolerantes/persistentes causadores de mastite.

5 PERSPECTIVAS

- Obter genomas completos e com alta acurácia para a realização da genômica comparativa de isolados de *S. aureus* tolerantes oriundos de mastite caprina.
- Realizar a transcriptômica de isolados selecionados de *S. warneri* persistentes de mastite em cabras.
- Avaliar a interação de redes de proteínas dos isolados *S. warneri* persistentes CAP 9.1 e 9.2 para melhor compreensão das vias metabólicas envolvidas nos processos de persistência.

ANEXO**Comprovante de submissão e/ou aceitação do artigo 1**

Yahoo Mail - Your manuscript submission - 668270

Your manuscript submission - 668270**De: Frontiers Microbiology Editorial Office****(microbiology.editorial.office@frontiersin.org) Para:****chirleskb@yahoo.com.br****Data: segunda-feira, 15 de fevereiro de 2021 18:37 GMT-3**

Dear Dr França

We are pleased to inform you that we have received the manuscript "Tolerance or persistence profile in *Staphylococcus* spp. isolates from goat mastitis" to be considered for publication in *Frontiers in Microbiology*, section Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy.

You can access the review forum and track the progress of your manuscript using the following link:

<https://www.frontiersin.org/Journal/MySubmission.aspx?stage=100>

Your manuscript is now in the initial validation stage to determine its suitability for peer review. Should your manuscript be sent out for peer review, you will receive a notification once we receive the reports from reviewers and the interactive review forum is activated. You will then be able to read the review reports and exchange directly with the reviewers in the interactive review forum as well as submit a revised manuscript, if appropriate.

Best regards,

Your Frontiers in Microbiology team

Frontiers | Editorial Office -
Collaborative Peer Review Team
www.frontiersin.org
Avenue du Tribunal Fédéral 34, 1005
Lausanne, Switzerland Office T 41
21 510 17 91

For technical issues, please contact our IT Helpdesk (support@frontiersin.org) or visit our Frontiers Help Center (zendesk.frontiersin.org/hc/en-us)

-----MANUSCRIPT DETAILS-----

Manuscript title: Tolerance or persistence profile in *Staphylococcus* spp. isolates from goat mastitis Manuscript ID: 668270

Authors: Chirles de França França, Danillo Sales Rosa, Renata de Faria Silva Souza, Isabelle Caroline Pires, Gutiele do Nascimento do É, Hugo Colombari Bonfá, Jackson Roberto Guedes Silva Almeida, Magna Coroa Lima, Maria Aparecida Scatamburlo Moreira, Henrique César Pereira Figueiredo, Vasco Ariston De Carvalho Azevedo and Mateus Matiuzzi da Costa

Journal: *Frontiers in Microbiology*, section Antimicrobials,
Resistance and Chemotherapy Article type: Original Research

Submitted on: 15 Feb 2021

Research Topic: Secondary Effects of Antibiotic Exposure

-----ADDITIONAL INFORMATION-----

In order to enable a smooth and efficient review process, please familiarize yourself with the Frontiers review guidelines:

https://www.frontiersin.org/Journal/ReviewGuidelines.aspx?s=46&name=antimicrobials,_resistance_and_chemotherapy

To take part in the Resource Identification Initiative please cite antibodies, genetically modified organisms, software tools, data, databases and services using the corresponding catalog number and RRID in the text of your article.

Please see here for more information: https://www.frontiersin.org/files/pdf/letter_to_author.pdf

Comprovante de submissão e/ou aceitação do artigo 2

[PeerJ] We've received your submission: "Comparative genomics of persistent..." (#2021:02:58113:0:0:CHECK)

De: PeerJ

(info@peerj.com) Para:

chirleskb@yahoo.com.br

Data: terça-feira, 16 de fevereiro de 2021 01:11 GMT-3

PeerJ

Dear Chirles,

Thank you for submitting your article for review - **Comparative genomics of persistent *Staphylococcus warneri* from recurrent goat mastitis associated with the use of enrofloxacin.**

It will now be checked by PeerJ staff, who will email you if any changes are required. Many of our staff are on lockdown in response to COVID-19, therefore there may be a delay in processing your revision submission. We thank you for your patience in this difficult time.

After passing checks, it will be assigned to an Academic Editor, who will invite reviewers to carry out peer-review.

If you have a reviewer discount or similar, please [enter your code](#) now.

You will receive an email update at each stage, and you can check the status of your article at any time.

[View your Submission](#)

This is a great time to complete your PeerJ profile. Even the basics of a profile photo and institutional info will leave readers with a richer understanding of you and your work.

[Complete your Profile](#)

In under 3 minutes

With kind regards,

The PeerJ Team

Article ID: 58113

[Need help? Just reply to this email.](#)

Publisher of: *PeerJ – Life & Environment, PeerJ Computer Science, PeerJ Physical Chemistry, PeerJ Organic Chemistry, PeerJ Inorganic Chemistry, PeerJ Analytical Chemistry and PeerJ Materials Science*

Follow us on Twitter, Facebook, Instagram and our Blog

© 2021, PeerJ, Inc. PO Box 910224 San Diego, CA 92191, USA