

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 27/08/2023.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



INFLUÊNCIA DA CÁPSULA E DE OUTROS FATORES DE
VIRULÊNCIA DE *Staphylococcus aureus* NA MASTITE
SUBCLÍNICA E NOS DIFERENTES NÍVEIS DE GRAVIDADE
NA MASTITE CLÍNICA CONTAGIOSA.

BRUNA FERNANDA ROSSI

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutora no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia de Parasitas e Micro-organismos.

Vera Lúcia Mores Rall

**BOTUCATU-SP
2021**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

INFLUÊNCIA DA CÁPSULA E DE OUTROS FATORES DE
VIRULÊNCIA DE *Staphylococcus aureus* NA MASTITE
SUBCLÍNICA E NOS DIFERENTES NÍVEIS DE GRAVIDADE
NA MASTITE CLÍNICA CONTAGIOSA

Bruna Fernanda Rossi

Profa. Dra. Vera Lúcia Mores Rall

Dra. Erika Carolina Romão Bonsaglia

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutora no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia de Parasitas e Micro-organismos.

Vera Lúcia Mores Rall

**BOTUCATU - SP
2021**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Rossi, Bruna Fernanda.

Influência da cápsula e de outros fatores de virulência de *Staphylococcus aureus* na mastite subclínica e nos diferentes níveis de gravidade na mastite clínica contagiosa / Bruna Fernanda Rossi. - Botucatu, 2021

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Vera Lúcia Mores Rall
Coorientador: Erika Carolina Romão Bonsaglia
Capes: 21202001

1. *Staphylococcus aureus*. 2. Enterotoxinas. 3. Mastite.
4. Biofilmes. 5. Fatores de virulência.

Palavras-chave: Agr; Biofilme; Enterotoxinas; MSCRAMMs.

*Dedico esse trabalho aos meus pais Vera e José Eduardo, ao Rodolfo
e a essa nova vida que está se formando.*

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos...

A Deus pelo dom da vida, por sempre me dar força e coragem para enfrentar os desafios e seguir em frente e pelas pessoas essenciais que Ele colocou em meu caminho;

Aos meus pais Vera e José Eduardo que são os alicerces da minha vida, por toda dedicação, apoio, incentivo e amor incondicional;

Ao Rodolfo por sempre estar ao meu lado, me incentivando e apoiando;

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Vera Lúcia Mores Rall por me receber em seu laboratório, por acreditar em mim e por todos os ensinamentos durante esses anos;

À minha co-orientadora, Dr^a Erika Carolina Romão Bonsaglia pelos ensinamentos durante todos esses anos e por ter se tornado uma grande amiga.

Às minhas amigas pela companhia do dia a dia, pela amizade e por estarem sempre ao meu lado;

Aos servidores do Setor de Microbiologia e Imunologia;

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

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização e conclusão de mais essa etapa em minha vida.

SUMÁRIO

RESUMO	07
ABSTRACT	08
1. INTRODUÇÃO	09
1.1. Mastite Bovina	09
1.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	10
1.2.1. Fatores de Virulência de <i>S. aureus</i>	10
1.2.1.1. Enterotoxinas estafilocócicas (<i>staphylococcal enterotoxins</i> - SEs).....	10
1.2.1.2 Toxina da Síndrome do Choque Tóxico (<i>toxic shock syndrome toxin</i> – TSST-1)	11
1.2.1.3 Leucocidina Panton-Valentine (<i>Panton-Valentin leucocidin</i> - PVL).....	12
1.2.1.4 Cápsulas polissacarídicas (<i>Polysaccharide capsule</i> – PC)	12
1.2.1.5. Produção de Biofilme	13
1.2.1.6. Adesão e Invasão Celular	14
1.2.2. Caracterização Molecular	15
1.2.2.1. Grupo <i>agr</i>	15
1.2.2.2. Gel de eletroforese em campo pulsado (<i>Pulsed field gel electrophoresis</i> - PFGE)..	16
2. OBJETIVOS	17
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
CAPÍTULO 1	27
CAPÍTULO 2	60

1 RESUMO

2 Importante por causar sérios prejuízos às fazendas leiteiras, a mastite bovina por
3 *Staphylococcus aureus* pode desencadear casos subclínicos e clínicos, com severidade
4 leve, moderada ou grave, dependendo da resposta imunológica do hospedeiro e dos
5 fatores de virulência da bactéria, sendo alguns deles, controlados por genes como o *gene*
6 *acessório regulador (agr)*, além do envolvimento de possíveis linhagens específicas.
7 Com isso, o objetivo do estudo foi avaliar as diferenças e relações genéticas entre os
8 fatores de virulência mais importantes, como o biofilme (*bap*, *icaA* e *icaD*),
9 enterotoxinas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei* e *sej*), a Toxina da Síndrome do
10 Choque Tóxico (*tsst-1*), a Leucocidina Pantón-Valentín (*pvl*), as proteínas envolvidas
11 no processo de adesão e invasão celular (MSCRAMMs) e os tipos capsulares e de *agr*
12 com os graus de severidade da mastite clínica e com a mastite subclínica, além de
13 observar os pulsotipos envolvidos em cada tipo da doença, pelo *Pulsed field gel*
14 *electrophoresis* (PFGE). Foram usados 50 isolados de *S. aureus*, obtidos de casos de
15 mastite bovina subclínica, 73 de casos de clínica leve e 28 de clínica moderada. Os
16 isolados subclínicos apresentaram relação estatística com os genes *sea*, *sec*, *see*, *tsst-1* e
17 *pvl*. Já os clínicos, com os genes *seg*, *seh*, *sei*, *bap* e *icaA*. A maioria dos genes das
18 MSCRAMMs (*fnbA*, *fib*, *clfA*, *clfB*, *cna*, *ebpS*) também estiveram associados aos
19 isolados clínicos. Todos os isolados foram capazes de produzir biofilme, não havendo
20 diferença entre os tipos de mastite. Isolados contendo o gene *agrI* e sem o locus *agr*
21 (*agr-*) foram mais os prevalentes entre os casos de mastite subclínica, enquanto os
22 contendo os genes *agrII* e *agrIII* foram mais prevalentes nos casos clínicos. Os tipos
23 capsulares 5 (*cap5*) e 8 (*cap8*) foram encontrados em 42% e 44% dos isolados
24 subclínicos e em 38,6% e 58,4% dos clínicos, respectivamente. Foram encontrados 72
25 pulsotipos e não foram observados isolados clínicos e subclínicos num mesmo cluster.
26 Os resultados obtidos mostraram que existem diferenças genômicas, considerando-se o
27 potencial de virulência dos isolados de *S. aureus*, obtidos de casos de mastite clínica e
28 subclínica. Porém, o tipo de locus *agr* parece exercer um papel fundamental na
29 expressão e repressão desses genes, impactando diretamente na progressão da doença.
30 Além disso, o PFGE diferenciou de maneira clara, pulsotipos encontrados em casos de
31 mastite de mastite clínica e subclínica.

32

33

34

35

36 **Palavras-chave:** MSCRAMMs, Biofilme, Enterotoxinas, PFGE.

37 **ABSTRACT**

38 Important for causing serious damage to dairy farms, bovine mastitis by *Staphylococcus*
39 *aureus* can trigger subclinical and clinical cases, with mild, moderate or severe severity,
40 depending on the host's immune response and the bacteria's virulence factors, and some
41 of them are controlled by genes such as the *regulatory accessory gene (agr)*, in addition
42 to the involvement of possible specific lineages. Thus, the aim of the study was to
43 evaluate the differences and genetic relationships between the most important virulence
44 factors, such as biofilm (*bap*, *icaA* and *icaD*), enterotoxins (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *sec*,
45 *seh*, *sei* and *sej*), Toxic Shock Syndrome Toxin (*tsst-1*), Leucocidin Pantón-Valentín
46 (*pvl*), proteins involved in cell adhesion and invasion (MSCRAMMs) and capsular and
47 *agr* types with degrees of severity of clinical mastitis and with subclinical mastitis, in
48 addition to observing the pulse types involved in each type of disease, using Pulsed field
49 gel electrophoresis (PFGE). We used 50 *S. aureus* isolates obtained from cases of
50 subclinical, 73 from mild clinical and 28 from moderate clinical bovine mastitis. The
51 subclinical isolates showed a statistical relationship with the genes *sea*, *sec*, *see*, *tsst-1*
52 and *pvl*. The clinicians, with the genes *seg*, *seh*, *sei*, *bap* and *icaA*. Most MSCRAMM
53 genes (*fnbA*, *fib*, *clfA*, *clfB*, *cna*, and *ebpS*) were also associated with clinical isolates.
54 All isolates were able to produce biofilm, with no statistical difference between both
55 types of mastitis. Isolates containing the *agrI* gene and without the *agr* locus (*agr-*) were
56 more prevalent among cases of subclinical mastitis, while those containing the *agrII* and
57 *agrIII* genes were more prevalent in clinical cases. Capsular types 5 (*cap5*) and 8 (*cap8*)
58 were found in 42% and 44% of subclinical isolates and in 38.6% and 58.4% of the
59 clinical ones, respectively. Seventy-two pulse types were found, and clinical and
60 subclinical isolates were not observed in the same cluster. The results obtained showed
61 that there are genomic differences, considering the virulence potential of *S. aureus*
62 isolates, obtained from both cases of clinical and subclinical mastitis. However, the type
63 of *agr* locus seems to play a role in the expression and repression of these genes,
64 directly impacting disease progression. In addition, the PFGE clearly differentiated the
65 pulse types found in cases of mastitis from clinical and subclinical mastitis.

66

67 **Keywords:** MSCRAMMs, Biofilm, Enterotoxins, PFGE.

68 1. INTRODUÇÃO

69 1.1 Mastite Bovina

70
71 A mastite bovina é uma das doenças mais prevalentes em rebanhos leiteiros,
72 afetando diretamente a quantidade e qualidade do leite produzido (Hogeveen e Van,
73 2017). É caracterizada por interações entre hospedeiro, meio ambiente e agentes
74 infecciosos (Perez et al., 2020), principalmente bactérias que causam inflamação no
75 úbere devido ao aumento de células somáticas, em resposta à invasão no canal do teto
76 (Jones e Bailey, 2009). De acordo com a gravidade do processo inflamatório, essa
77 doença pode ser classificada como subclínica ou clínica (Peters et al., 2015).

78 A mastite subclínica é caracterizada pela ausência de sintomas clínicos no
79 animal e de alterações visíveis no leite, mas ocorrendo o aumento da contagem de
80 células somáticas (CCS) e variações nas concentrações de gordura, sais minerais,
81 proteínas, enzimas e lactose. Além disso, pelo aumento da permeabilidade vascular e
82 com a passagem de substâncias do sangue para o leite, também pode-se detectar sódio,
83 cloro e imunoglobulinas (Cunha et al., 2008). Os casos subclínicos são facilmente
84 disseminados no rebanho, causando ao produtor uma falsa impressão de tranquilidade
85 em relação à ocorrência de mastite (Bueno et al., 2002). Nesse caso, a doença é somente
86 detectada por testes como o California Mastitis Test (CMT, Schalm e Noorlander, 1957)
87 ou CCS (Peters et al., 2015).

88 Na mastite clínica, ocorrem sinais patológicos evidentes como o aumento do
89 úbere e a presença de dor e rubor. As alterações no leite também são visíveis, sendo
90 quantitativas (de redução no volume à ausência) e qualitativas (mudanças na aparência e
91 na composição) (Peters et al., 2015). O monitoramento da gravidade dos casos clínicos
92 é um conceito atual e de grande valor em programas de controle da mastite. A variação
93 na intensidade dos sintomas classifica a doença em grau 1 (leve), com alterações
94 visíveis somente no leite (grumos e pus); grau 2 (moderado), com as alterações físicas
95 no leite e sinais inflamatórios da glândula mamária como hiperemia, congestão,
96 edema e dor à apalpação e grau 3 (grave), com as alterações no leite e na glândula
97 mamária já descritas e também no estado geral do animal (febre, anorexia, desidratação,
98 taquicardia, dificuldade respiratória, diminuição dos movimentos ruminais, prostração,
99 decúbito e morte). Em geral, de 50 a 70% dos casos de mastite clínica são de gravidade
100 leve, 20 a 40%, moderada e 5 a 15%, graves (Pinzón-Sánchez e Ruegg, 2011; Ribeiro et
101 al., 2016).

1.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) pertence à família Staphylococcaceae. São bactérias Gram-positivas, catalase e coagulase positivas, não formam esporos, não são móveis e são considerados anaeróbios facultativos (Vaughn et al., 2020). É um micro-organismo comensal humano e de outros mamíferos, que coloniza persistentemente as narinas de aproximadamente 20-25% da população adulta saudável, enquanto 60% são colonizados de forma intermitente (Lister e Horswill, 2014).

S. aureus é considerado um dos principais patógenos bacterianos envolvidos na mastite bovina contagiosa (Bonsaglia et al., 2018; Wang et al., 2018), sendo isolado de casos subclínicos (Rossi et al., 2019; Ren et al., 2020; Zayda et al., 2020) e clínicos (Ronco et al., 2018; Monistero et al., 2020; He et al., 2020).

Sua capacidade de causar uma ampla variedade de doenças depende da expressão de vários fatores de virulência que, agindo em conjunto, permitem ao micro-organismo evadir do sistema imune e se adaptar aos diferentes nichos, além de poder conferir resistência aos antimicrobianos. Assim, a diversidade genética de isolados de *S. aureus* influencia o desenvolvimento de doenças em hospedeiros humanos e em animais (Tuchscher et al., 2007).

1.2.1 Fatores de Virulência de *Staphylococcus aureus*

1.2.1.1 Enterotoxinas estafilocócicas (*staphylococcal enterotoxins* - SEs)

As enterotoxinas estafilocócicas (SEs) são proteínas extracelulares hidrossolúveis e com baixo peso molecular, que estão relacionadas com intoxicações de origem alimentar, atuando em receptores eméticos específicos presentes na parede intestinal (Denayer et al., 2017). Até o momento, foram descritos 29 tipos de SEs, classificados de SEA a SEZ, (Letertre et al., 2003; Thomas et al., 2006) além de *sel26*, *sel27* (Aung et al., 2019) e dos tipos 01 e 02 (Hisatsune et al., 2017; Suzuki et al., 2020).

As SEs classificadas como clássicas (SEA, SEB, SEC, SED e SEE) são responsáveis pela grande maioria dos casos de intoxicação alimentar (Ono et al., 2015) e, aproximadamente, apenas 5%, são causadas pelos outros tipos (Jay et al., 2005). São resistentes à muitas condições ambientais como variações de pH e temperatura. Além disso, a pasteurização é capaz de destruir a bactéria, mas não a toxina pré-formada no alimento (Hennekinne et al., 2012) e a presença de genes que codificam SEs tem sido relatada em vários estudos que envolvem *S. aureus*, isolados de mastite (Rahimi e Safai,

136 2010; Khoramrooz et al., 2016; Rossi et al., 2019). As SEs são consideradas
137 superantígenos, que se caracterizam por ligações simultâneas ao Complexo Maior de
138 Histocompatibilidade (CMH) de classe II na célula apresentadora de antígeno e aos
139 receptores de células T, sem a presença de antígenos específicos. Com essa ligação,
140 podem ocorrer efeitos sistêmicos como febre alta, vômito, diarreia e disfunções
141 hepáticas e renais (Fernández et al., 2006).

142 Até o momento, além das enterotoxinas clássicas, 15 tipos de SEs (SEG, SEH,
143 SEI, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER, SES, SET, SEY e SE02) já
144 apresentaram atividade emética significativa em algum primata, sendo consideradas
145 como potenciais agentes causadores de intoxicação de origem alimentar (Su e Wong,
146 1995; Munson et al., 1998; Ono et al., 2008; Omoe et al., 2013; Ono et al., 2015; Ono et
147 al., 2019; Suzuki et al., 2020). Enquanto isso, pelo menos sete outros tipos (SEIJ, SEIU,
148 SEIV, SEIW, SEIX, SEIZ e SEI01) foram classificados como enterotoxinas
149 estafilocócica semelhante à superantígeno (SEI) (Lina et al., 2004), sem apresentar
150 potencial emético comprovado em primatas (Letertre et al., 2003; Thomas et al., 2006;
151 Wilson et al., 2011; Spoor et al., 2015; Hisatsune et al., 2017). Além de causarem
152 intoxicações, essas enterotoxinas parecem ter um papel no desenvolvimento da mastite,
153 criando um ambiente favorável para a colonização e alguns genes que codificam essas
154 enterotoxinas têm sido associados, em maior ou menor frequência, aos casos de mastite
155 (Piccinini et al., 2010). De fato, Haveri et al. (2007) correlacionaram a presença de *sed* e
156 *sej* em casos de mastite persistente. Por outro lado, Veh et al. (2014) associaram o gene
157 *seg* a uma redução na probabilidade da bactéria causar mastite persistente durante a
158 lactação, demonstrando diferentes funções para diferentes enterotoxinas.

159

160 **1.2.1.2 Toxina da Síndrome do Choque Tóxico (*toxic shock syndrome toxin*** 161 **- TSST-1)**

162 A toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1) foi originalmente denominada
163 como Enterotoxina Estafilocócica F (SEF), porém uma caracterização adicional revelou
164 uma importante divergência estrutural e funcional em relação às outras SEs, que seria a
165 ausência de propriedades eméticas, sendo reclassificada somente como um
166 superantígeno (Benkerroum, 2018). Essa toxina promove a liberação de citocinas como
167 fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 (IL-1) e IL-6. Os sintomas dessa
168 síndrome foram descritos pela primeira vez em crianças que apresentaram febre alta,
169 vômito, diarreia, hipotensão, anormalidades neurológicas além de descamação da pele

170 das mãos e pés (Prajapati e Prajapati, 2010). Posteriormente, TSST-1 foi encontrada em
171 *S. aureus* isolados de pacientes com septicemia, de cavidades nasais de adultos jovens
172 considerados portadores saudáveis, manipuladores de alimentos, alimentos manipulados
173 e de mastite bovina (Sospedra e Soriano, 2012).

174 Segundo Perez et al. (2020), TSST-1 contribui para reações inflamatórias na
175 glândula mamária. A frequência de *S. aureus* portadores do gene *tsst-1* em isolados de
176 mastite bovina parece variar amplamente entre os países e rebanhos, como demonstrado
177 por Monistero et al. (2018) que encontraram positividade de 37% nos isolados
178 argentinos, 23% nos alemães, 16% nos tunisianos e 6% nos italianos. Além disso, foi
179 relatado que a produção simultânea de TSST-1 e de enterotoxinas por *S. aureus* pode
180 contribuir para uma resposta inflamatória mais grave em bovinos (Perez et al. 2020).

181

182 **1.2.1.3 Leucocidina Panton-Valentine (*Panton-Valentin leucocidin* - PVL)**

183 A leucocidina Panton-Valentine (PVL), codificada pelos genes *lukS-PV* e *lukF-*
184 *PV* e transmitidos por bacteriófagos (Melles et al., 2006), é uma toxina específica de *S.*
185 *aureus* que interfere nas defesas imunológicas do hospedeiro ao romper as membranas
186 das células fagocíticas, contribuindo para a gravidade das infecções (Mechesso et al.,
187 2021) e desempenhando um papel fundamental na necrose de tecido (Shallcross et al.,
188 2013). A presença dessa toxina em ruminantes leiteiros tem sido associada à mastite
189 bovina (Mechesso et al., 2021). Já em humanos, a toxina está relacionada às infecções
190 cutâneas graves e, ocasionalmente, pneumonia necrosante que pode levar à morte
191 (Nimmo, 2012).

192 Alguns estudos têm relatado que o peptídeo PVL pode estar relacionado com a
193 aderência de *S. aureus*, uma vez que cepas PVL-positivas associadas com pneumonia
194 necrotizante têm forte afinidade com proteínas da matriz extracelular do hospedeiro (De
195 Bentzmann et al., 2004; Tristan et al., 2009; Lo e Wang, 2010). Além disso, segundo
196 Wu et al. (2019), também pode estar associada a doenças invasivas.

197

198 **1.2.1.4 Cápsulas polissacarídicas (*Polysaccharide capsule* – PC)**

199 *S. aureus* também pode produzir cápsula polissacarídica (PC), o que aumenta a
200 virulência da cepa, pois a protege da fagocitose (O’Riordan and Lee, 2004; Tuchscher
201 et al., 2007) pelos neutrófilos polimorfonucleares (PMN), que são considerados a
202 principal linha de defesa da glândula mamária contra patógenos invasores (Ambroggio
203 et al., 2018). Entre os onze sorotipos de cápsulas identificados em *S. aureus*, apenas os

204 sorotipos 1 (PC1), 2 (PC2), 5 (PC5) e 8 (PC8) foram caracterizados quimicamente,
205 sendo os dois últimos, os mais prevalentes em isolados de infecções bovinas (Salimena
206 et al., 2016). Os sorotipos PC1 e PC2 são raramente isolados quando comparados aos
207 sorotipos PC5 e PC8 (Tuchscher et al., 2007) e quando os isolados não apresentam
208 PC5 ou PC8, são considerados como não tipáveis (NT) (Ambroggio et al., 2018).

209 A presença de *S. aureus* encapsulados é variável e pode ser influenciada pela
210 região geográfica do isolado (Cocchiaro et al., 2006). Estudos em diversos países
211 mostraram essa variação, alguns apresentando todos ou quase todos os isolados com
212 genes para produção de cápsula (Bardiau et al., 2014; Khichar and Kataria, 2014) mas,
213 em contrapartida, alguns estudos apresentaram baixo percentual da presença desse fator
214 de virulência (Babra et al., 2013; Marques et al. 2013).

215

216 **1.2.1.5 Produção de Biofilme**

217 A capacidade de produção de biofilme também é considerada um dos
218 principais fatores de virulência, pois está relacionada com a aderência e colonização
219 desses micro-organismos nas células do epitélio mamário bem como com a evasão do
220 sistema imune do hospedeiro e resistência a antibióticos, tornando a eliminação de um
221 isolado produtor de biofilme, um grande desafio para a cura da mastite bovina
222 (Khoramrooz et al., 2016).

223 O biofilme é constituído por uma comunidade microbiana sésil, com células
224 ligadas a um substrato (biótico ou abiótico) e umas às outras, que estão envoltas por
225 uma matriz polissacarídica, composta por substâncias poliméricas extracelulares
226 produzidas pelas próprias bactérias (Clutterbuck et al., 2007).

227 A produção do biofilme é dividida nas fases de adesão, maturação e de
228 dispersão. Na fase de adesão, células planctônicas se aderem às superfícies (bióticas ou
229 abióticas) e em seguida, essas células começam a se proliferar formando microcolônias.
230 Com o acúmulo cada vez maior de bactérias, a matriz polissacarídica começa a ser
231 produzida, auxiliando na proteção e manutenção do biofilme e esse período é chamado
232 de maturação. Quando o biofilme atinge sua densidade máxima, as bactérias começam a
233 se dispersar para o ambiente para reiniciar o desenvolvimento do biofilme em outros
234 locais, na fase de dispersão (Kostakioti et al., 2013).

235 A produção de biofilme é controlada principalmente pelo *operon* de adesão
236 intercelular, conhecido como *operon ica* (Prakash et al., 2017), sendo composto pelos
237 genes *icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC*, além do *icaR* (regulatório) e os dois primeiros genes são

238 os mais importantes na formação de biofilme por *S. aureus* (Vasudevan et al., 2003).
239 Esse *operon* é responsável por codificar as proteínas mediadoras da síntese da adesina
240 polissacarídica intercelular (PIA) ou N-acetilglicosamina polimérica (PNAG) e do
241 antígeno capsular denominado polissacarídeo/adesina capsular (PS/A) (O’Neil et al.,
242 2007), que é o responsável pela adesão inicial da bactéria às superfícies.

243 O gene *bap* (*biofilm-associated protein*), responsável por codificar a proteína
244 associada ao biofilme está envolvido na aderência inicial às superfícies e nas ligações
245 entre as células bacterianas e tem sido encontrado somente em isolados de vacas com
246 mastite (Darwish e Asfour, 2013; Khoramrooz et al., 2016). Segundo Cucarella et al.
247 (2004), a presença do gene *bap* permite que isolados produzam biofilme, mesmo na
248 ausência do *operon ica*.

249

250 **1.2.1.6 Adesão e Invasão Celular**

251 A adesão e invasão celular são fatores de virulência importantes para a
252 sobrevivência de *S. aureus* no estado comensal e durante infecções invasivas,
253 auxiliando a bactéria a se estabelecer e permanecer no hospedeiro (Foster et al., 2014;
254 Vaughn et al., 2020). A adesão é o primeiro passo para a invasão e formação de
255 biofilme, mecanismos responsáveis por proteger a bactéria do sistema imunológico do
256 hospedeiro e facilitar a infecção crônica (Loffler et al., 2014; Josse et al., 2017). Esas
257 funções são realizadas pelas “proteínas ancoradas à parede celular” (CWA - *Cellwall-*
258 *Anchored Proteins*) (Foster et al., 2014), presentes na superfície de *S. aureus*. Entre
259 elas, destacam-se as adesinas conhecidas como Componentes da Superfície Microbiana
260 Reconhecedores de Moléculas Adesivas da Matriz (MSCRAMMs - *Microbial Surface*
261 *Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*), família de proteínas que
262 apresentam semelhanças estruturais e mecanismos comuns para adesão. (Foster et al.,
263 2014).

264 A fibronectina é uma glicoproteína, com duas isoformas de proteínas ligadoras
265 de fibronectina (FnBP), FnBPA e FnBPB, com sequências muito semelhantes e
266 codificadas, respectivamente, pelos genes *fnbA* e *fnbB*, (Fowler et al., 2000; Burke et al.,
267 2010). Essas proteínas estão relacionadas com a adesão bacteriana, podendo ainda
268 promover a internalização da bactéria em células epiteliais e endoteliais (Geoghegan et
269 al., 2014). Segundo Brouillette et al. (2003), as FnBPs de *S. aureus* podem estar
270 relacionadas com a colonização das glândulas mamárias bovina, levando à mastite
271 infecciosa, pois em seu estudo com um modelo de mastite em camundongo, a presença

272 de FnBPs na superfície de *S. aureus* aumentou a capacidade da bactéria colonizar as
273 glândulas mamárias em comparação com a de um mutante sem FnBPs e, segundo
274 Zuniga et al. (2015), as FnBPs contribuem também para invasão bacteriana e inibição
275 da fagocitose.

276 Três fatores são importantes na ligação das bactérias ao fibrinogênio: os fatores
277 *clumping* A e B (Clfs) e proteína ligadora de fibrinogênio (Fib) (Zmantar et al., 2008),
278 codificados pelos genes *clfA* e *clfB* (Scali et al., 2015) e *fib* (Pereyra et al., 2016),
279 respectivamente. A ligação ao fibrinogênio pode estimular a agregação de plaquetas e a
280 formação de abscesso e pode levar à lesões tromboembólicas no coração durante a sepse
281 (McAdow et al., 2011; Malachowa et al., 2016).

282 A proteína ligadora de colágeno (Cna) desempenha importantes funções
283 fisiológicas durante a patogênese, com ligações de alta afinidade ao colágeno (Valotteau
284 et al., 2017) e sua presença também é necessária para a aderência de *S. aureus* a tecidos
285 cartilagosos *in vivo* (Simojoki et al., 2012). Já em tecidos flexíveis, a proteína EbpS é
286 responsável por fazer a ligação do *S. aureus*, devido a elastina ser o componente
287 principal (Downer et al., 2002). A ancoragem na matriz extracelular é feita pela proteína
288 ligadora de laminina (Eno), uma vez que laminina é um dos principais componentes
289 presentes (Carneiro et al., 2004).

290

291

292 **1.2.2 Caracterização Molecular**

293

294 **1.2.2.1 Grupo *agr***

295 O *gene acessório regulador (agr)* é o principal sistema responsável por regular
296 a expressão gênica de diversos fatores de virulência em *S. aureus*. Os fatores associados
297 à parede celular e a secreção de exoproteínas são as duas principais classes de fatores de
298 virulência que têm sido associados à resposta *agr*, que ocorre durante a fase de
299 crescimento pós-exponencial (Buzzola et al., 2007).

300 A primeira classe de fatores de virulência promove a adesão do hospedeiro
301 facilitando a evasão do sistema imunológico. A segunda regula a expressão da produção
302 de cápsulas de polissacarídeo e de exotoxinas, como hemolisinas, enterotoxinas e
303 proteases extracelulares, incluindo proteínas que promovem a invasão (Yang et al.,
304 2019).

305 O sistema *agr* está associado ao *quorum-sensing* e este *locus* é composto por
306 dois *operons*, um deles controlado pelo promotor P2, que apresenta os genes *agrA*,
307 *agrB*, *agrC* e *agrD* e o polimorfismo da sequência de aminoácidos desses genes (exceto
308 *agrA*) forma os grupos *agrI*, *agrII*, *agrIII* e *agrIV* (Cheraghi et al., 2017).

309 Um conjunto de características fenotípicas e genotípicas de *S. aureus* está
310 associado à persistência a longo prazo na glândula mamária bovina, incluindo o tipo *agr*
311 de cada cepa (Sacco et al., 2020). A prevalência de *S. aureus agrI* em isolados
312 subclínicos já foi relatada em estudos anteriores (Khoramrooz et al., 2016; Rossi et al.,
313 2019, Rossi et al., 2021) e segundo Melchior et al. (2009), cepas *agrI* apresentaram
314 melhor adaptação à sobrevivência intracelular, fazendo com que a bactéria persista por
315 mais tempo no hospedeiro, sem causar sintomas de inflamação ou infecção aparente
316 além de limitar a ação de antibióticos (Buzzola et al., 2007; Castilho et al., 2017). Em
317 contrapartida, os grupos *agrII* e *agrIII* foram associados a isolados clínicos (Buzzola et
318 al., 2007; Rossi et al., 2021).

319

320 **1.2.2.2 Gel de eletroforese em campo pulsado (*Pulsed field gel*** 321 ***electrophoresis* - PFGE)**

322 O rastreamento molecular das relações genéticas dos isolados usando o gel de
323 eletroforese em campo pulsado (*Pulsed field gel electrophoresis* - PFGE), entre outras
324 técnicas, pode auxiliar a investigação da transmissão e persistência do patógeno nos
325 rebanhos (Melake et al., 2014). O PFGE tem como objetivo, discriminar linhagens
326 bacterianas de uma mesma espécie (Magalhães et al., 2005). Nessa técnica, enzimas de
327 restrição digerem o genoma bacteriano total e, em seguida, é realizada a eletroforese em
328 uma cuba com campo pulsátil, discriminando bandas de diferentes pares de base
329 (Tenover et al., 1997).

330 Essa técnica é muito utilizada em contextos epidemiológicos menores como
331 demonstrado por Rossi et al. (2019), que avaliaram a presença de clones persistentes e
332 diversidade genética em um único rebanho. Estudos explorando vários ambientes, de
333 uma mesma região também já foram publicados, como o de Sabour et al. (2004), que
334 avaliaram 58 rebanhos no leste canadense e Vaughn et al. (2020), que estudaram a
335 dispersão de clones em 11 diferentes rebanhos no leste do Tennessee. Esses estudos
336 mostraram a coexistência de linhagens heterogêneas dentro de uma mesma fazenda e a
337 existência da mesma linhagem em propriedades distintas.

2. OBJETIVO

O objetivo do estudo foi associar os diferentes fatores de virulência com a mastite subclínica, mastite clínica leve ou mastite clínica moderada, buscando também perfis genéticos predominantes entre essas variações da doença pela classificação do grupo *agr* e PFGE.

2.1 Objetivos Específicos

- Associar os genes responsáveis pela produção das enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI e SEJ com os diferentes tipos de mastite (subclínica, clínica leve e clínica moderada);

- Associar os genes responsáveis pela Toxina da Síndrome do Choque e Leucocidina Panton-Valentine com os diferentes tipos de mastite (subclínica, clínica leve e clínica moderada);

- Analisar a capacidade de produção de Biofilme *in vitro* das cepas isoladas de cada tipo de mastite bem como a presença dos genes envolvidos nesse processo (*bap*, *icaA* e *icaD*);

- Relacionar os diferentes perfis genéticos dos Componentes da Superfície Microbiana Reconhedores de Moléculas Adesivas da Matriz (MSCRAMMs) encontrados nos isolados de mastite subclínica, clínica leve e clínica moderada com capacidade de adesão e invasão em células de epitélio mamário bovino (BMEC);

- Buscar perfis genéticos predominantes entre essas variações da doença pela classificação do grupo *agr* e PFGE.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 366
367
368 Ambroggio, M. B., M. S. Perrig, C. Camussone, N. Pujato, A. Bertón, E. Giannechini,
369 S. Alvarez, I. S. Marcipar, L. C. Calvino, M. S. Barbagelata. 2018. Survey of
370 potential factors involved in the low frequency of CP5 and CP8 expression in
371 *Staphylococcus aureus* isolates from mastitis of dairy cattle from Argentina, Chile,
372 and Uruguay. *J. Appl. Genet.* 59(3): 357-363. [https://doi.org/10.1007/s13353-018-](https://doi.org/10.1007/s13353-018-0443-8)
373 0443-8.
- 374 Aung, M.S., N. Urushibara, M. Kawaguchiya, A. Sumi, S. Takahashi, M. Ike, M. Ito, S.
375 Habadera, N. Kobayashi. 2019. Molecular epidemiological characterization of
376 *Staphylococcus argenteus* clinical isolates in Japan: identification of three clones
377 (ST1223, ST2198, and ST2550) and a novel Staphylocoagulase genotype XV.
378 *Microorganisms.* 7:389. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7100389>.
- 379 Bardiau, M., J. Detilleux, F. Farnir, J. G. Mainil, I. Ote. 2014. Associations between
380 properties linked with persistence in a collection of *Staphylococcus aureus* isolates
381 from bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 169(1-2):74-79.
382 <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.vetmic.2013.12.010>.
- 383 Benkerroum, N. 2018. Staphylococcal enterotoxins and enterotoxin-like toxins with
384 special reference to dairy products: An overview. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 58(12):
385 1943-1970. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2017.1289149>.
- 386 Bonsaglia, E. C. R., N. C. C. Silva, B. F. Rossi, C. H. Camargo, S. T. A. Dantas, H.
387 Langoni, F. F. Guimarães, J. R. Fitzgerald, A. Fernandes Júnior, V. L. M. Rall.
388 2018. Molecular epidemiology of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*
389 (MSSA) isolated from milk of cows with subclinical mastitis. *Microb. Pathog.* 124:
390 130-135. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.031>
- 391 Bueno, V. F. F., E. S. Nicolau, A. J. Mesquita, A. R. Ribeiro, J. A. B. Silva, E. O.
392 Costa, K. O. Coelho, R. B. S. Neves. 2002. Mastite bovina clínica e subclínica, na
393 região de Pirassununga, SP: frequências e redução na produção. *Ciênc. anim.*
394 *Bras.*3(2):47-52.
- 395 Buzzola, F. R., L. P. Alvarez, L. P. Tuchscher, M. S. Barbagelata, S. M. Lattar, L.
396 Calvino, D. O. Sordelli. 2007. Differential abilities of capsulated and
397 noncapsulated *Staphylococcus aureus* isolates from diverse *agr* groups to invade
398 mammary epithelial cells. *Infect. Immun.* 75(2): 886-891.
399 <https://doi.org/10.1128/iai.01215-06>.
- 400 Castilho, I. G., S. T. A. Dantas, H. Langoni, J. P. Araújo Jr, A. Fernandes Jr, F. C.
401 Alvarenga, L. Maia, D. Q. Cagnini, V. L. M. Rall. 2017. Host-pathogen interactions
402 in bovine mammary epithelial cells and HeLa cells by *Staphylococcus aureus*
403 isolated from subclinical bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* 100(8):6414-6421.
404 <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12700>.
- 405 Cheraghi, S., L. Pourgholi, M. Shafaati, S. H. Fesharaki, A. Jalali, R. Nosrati, M. A.
406 Boroumand. 2017. Analysis of virulence genes and accessory gene regulator (*agr*)
407 types among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in Iran. *J. Glob.*
408 *Antimicrob. Resist.* 10: 315-320. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2017.06.009>.

409 Clutterbuck, A.L., E.J. Woods, D.C. Knottenbelt, P.D. Clegg, C.A. Cochrane, S.L.
410 Percival. 2007. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Vet.*
411 *Microbiol.*121:1–17. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.12.029>.

412 Cocchiari, J. L., M. I. Gomez, A. Risley, R. Solinga, D. O. Sordelli, J. C. Lee. 2006.
413 Molecular characterization of the capsule locus from non-typeable *Staphylococcus*
414 *aureus*. *Mol. Microbiol.* 59(3):948-960.
415 <https://doi.org/10.1111/j.13652958.2005.04978.x>.

416 Cucarella, C., M. Á. Tormo, C. Ubeda, M. P. Trotonda, M. Monzón, C. Peris, B.
417 Amorena, I. Lasa, J. R. Penadés. 2004. Role of biofilm-associated protein Bap in
418 the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect and Immun.* 72(4): 2177-
419 2185. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.4.2177-2185.2004>.

420 Cunha, R. P. L., L. R. Molina, A. U. Carvalho, E. J. Facury Filho, P. M Ferreira, M. B.
421 Gentilini.2008. Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com
422 número de lactações, produção e composição química do leite em vacas da raça
423 Holandesa. *Arq Bras Med Vet Zootec.*60(1):19-24.

424 Darwish, S. F., H. A. Asfour. 2013. Investigation of biofilm forming ability in
425 *Staphylococci* causing bovine mastitis using phenotypic and genotypic assays. *Sci.*
426 *World J.* <http://dx.doi.org/10.1155/2013/378492>.

427 De Bentzmann S., A. Tristan, J. Etienne, N. Brousse, F. Vandenesch, G. Lina. 2004.
428 *Staphylococcus aureus* isolates associated with necrotizing pneumonia bind to
429 basement membrane type I and IV collagens and laminin. *J Infect Dis.* 190:1506.
430 <https://doi.org/10.1086/424521>.

431 Denayer, S., L. Delbrassinne, Y. Nia, N. Botteldoorn. 2017. Food-borne outbreak
432 investigation and molecular typing: high diversity of *Staphylococcus aureus* strains
433 and importance of toxin detection. *Toxins.* 9(12):407.
434 <https://doi.org/10.3390/toxins9120407>.

435 Fernández, M.M.; Marzi, M.C.; Berguer, P.; Burzyn, D.; Langley, R.J.; Piazzon, I.;
436 Mariuzza, R.A.; Malchiodi, E.L. Binding of natural variants of staphylococcal
437 superantigens SEG and SEI to TCR and MHC class II molecule. *Mol. Immunol.*, 43:
438 927- 938, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2005.06.029>.

439 Foster, T. J., J. A. Geoghegan, V. K. Ganesh, M. Höök. 2014. Adhesion, invasion and
440 evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat.*
441 *Rev. Microbiol.* 12(1):49-62. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3161>.

442 Fowler, T., E. R. Wann, D. Joh, S. Johansson, T. J. Foster, M. Höök. 2000. Cellular
443 invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the
444 bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell β 1 integrins. *Eur. J. Cell*
445 *Biol.* 79(10):672-679. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00104>.

446 Haveri, M., A. Roslöf, L. Rantala, S. Pyörälä. 2007. Virulence genes of bovine
447 *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections
448 with different clinical characteristics. *J. Appl. Microbiol.*103(4):993-1000.
449 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03356.x>.

450 He, W., S. Ma, L. Lei, J. He, X. Li, J. Tao, X. Wang, S. Song, Y. Wang, J. Shen, C.
451 Cai, C. Wu. 2020. Prevalence, etiology, and economic impact of clinical mastitis on

452 large dairy farms in China. *Vet. Microbiol.* 242: 108570.
453 <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.108570>.

454 Hennekinne, J. A., M. L. De Buyser, S. Dragacci. 2012. *Staphylococcus aureus* and its
455 food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS*
456 *Microbiol. Rev.*36(4):815-836. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x>.

457 Hisatsune, J., H. Hagiya, S. Shiota, M. Sugai. 2017. Complete genome sequence of
458 systemically disseminated sequence type 8 staphylococcal cassette chromosome
459 mec Type IV1 community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.
460 *Genome Announc.* 5:00852-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00852-17>.

461 Hogeveen, H., M. Van Der Voort. 2017. Assessing the economic impact of an endemic
462 disease: the case of mastitis. *Rev Sci Tech.* Title /Office International des
463 Epizooties. 36(1):217-226.

464 Jay, J. M., M. J. Loessner, D. A. Golden. 2005. Staphylococcal gastroenteritis. *Modern*
465 *food microbiology.* 7:545-566. https://doi.org/10.1007/0-387-23413-6_23.

466 Josse, J., F. Laurent, A. Diot. 2017. Staphylococcal adhesion and host cell invasion:
467 fibronectin-binding and other mechanisms. *Front. microbiol.* 8:2433.
468 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02433>.

469 Khichar, V., A. K. Kataria. 2014. Capsular genotyping (cap5k and cap8k) of
470 *Staphylococcus aureus* isolates from cattle with clinical mastitis. *Hum. Vet. Med.*
471 6(1):30-33.

472 Khoramrooz, S. S., F. Mansouri, M. Marashifard, S. A. A. M. Hosseini, F. A.
473 Chenarestane-Olia, B. Ganavehei, F. Gharibpour, A. Shahbazi, M. Mirzaii, D.
474 Darban-Sarokhalil. 2016. Detection of biofilm related genes, classical enterotoxin
475 genes and agr typing among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine with
476 subclinical mastitis in southwest of Iran. *Microb. Pathog.*97:45-51.
477 <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2016.05.022>.

478 Letertre, C., S. Perelle, F. Dilasser, P. Fach. 2003. Identification of a new putative
479 enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. *J. Appl.*
480 *Microbiol.* 95:38–43. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01957.x>

481 Lina, L.; Bohach, G.A.; Nair, S.P.; Hiramatsu, K.; Jouvin-Marche, E.; Mariuzza, R.
482 Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. *J. infect.*
483 *Dis.*, 189: 2334- 2336, 2004. <https://doi.org/10.1086/420852>.

484 Lister, J. L., A. R., Horswill. 2014. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent
485 developments in biofilm dispersal. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4:178.
486 <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00178>.

487 Lo, W. T., C. C. Wang. 2011. Panton-Valentine leukocidin in the pathogenesis of
488 community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection.
489 *Pediatr Neonatol.* 52(2):59-65. <https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2011.02.008>.

490 Löffler, B., L. Tuchscher, S. Niemann, G. Peters. 2014. *Staphylococcus aureus*
491 persistence in non-professional phagocytes. *Int. J. Med. Microbiol.* 304:170–176.
492 <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.11.011>.

493 Magalhães, V. D., J. C. Ferreira, C. Barelli, A. L. C. Darini, 2005. Eletroforese em
494 campo pulsante em bacteriologia uma revisão técnica. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.*
495 64(2):155-161.

496 Malachowa, N., S. D. Kobayashi, A. D. Porter, K. R. Braughton, D. P. Scott, D. J.
497 Gardner, D. M. Missiakas, O. Schneewind, F. R. DeLeo. 2016. Contribution of
498 *Staphylococcus aureus* coagulases and clumping factor A to abscess formation in a
499 rabbit model of skin and soft tissue infection. Plos One.11(6):0158293.
500 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158293>.

501 McAdow, M., H. K. Kim, A. C. Dedent, A. P. A. Hendrickx, O. Schneewind, D. M.
502 Missiakas. 2011. Preventing *Staphylococcus aureus* sepsis through the inhibition of
503 its agglutination in blood. Plos Pathog. 7(10):1002307.
504 <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002307>.

505 Mechesso, A. F., S. J. Kim, H. S. Park, J. H. Choi, H. J. Song, M. H. Kim, S. K. Lim, S.
506 S. Yoon, D. C. Moon. 2021. First detection of Pantone-Valentine leukocidin-
507 positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST30 in raw milk taken from
508 dairy cows with mastitis in South Korea. J. Dairy Sci.104(1):969-976.
509 <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19004>.

510 Melake, N. A., A. S. Zakaria, N. H. Ibrahim, M. A. Salama, A. Z. Mahmoud. 2014.
511 Prevalence of agr specificity groups among in vitro biofilm forming methicillin
512 resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from nasal carriers. Int. J.
513 Microbiol. Res. 5:76-84. <https://doi.org/10.5829/idosi.ijmr.2014.5.2.83184>.

514 Melchior, M. B., M. H. J. Van Osch, R. M. Graat, E. Van Duijkeren, D. J. Mevius, W.
515 Gaastra, M. Nielen, J. Fink-Gremmels. 2009. Biofilm formation and genotyping of
516 *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: evidence for lack of penicillin-
517 resistance in Agr-type II strains. Vet. Microbiol. 137: 83-89.
518 <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.12.004>.

519 Melles, D.C., W.B.V. Leeuwen, H.A.M. Boelens, J.K. Peeters, H.A. Verbrugh, A.V.
520 Belkum. 2006. Pantone-Valentine leukocidin genes in *Staphylococcus aureus*.
521 Emerg. Infect. Dis. 12:1174–1175. <https://doi.org/10.3201/eid1207.050865>.

522 Monistero, V., A. Barberio, F. Biscarini, P. Cremonesi, B. Castiglioni, H. U. Graber, E.
523 Bottini, A. Ceballos-Marquez, V. Kroemker, I. M. Petzer, C. Pollera, C.
524 Santisteban, M. Veiga Dos Santos, V. Bronzo, R. Piccinini, G. Re, M. Cocchi, P.
525 Moroni. 2020. Different distribution of antimicrobial resistance genes and virulence
526 profiles of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical mastitis in six
527 countries. J. Dairy Sci.103(4): 3431-3446. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17141>.

528 Monistero, V., H. U. Graber, C. Pollera, P. Cremonesi, B. Castiglioni, E. Bottini, A.
529 Ceballos-Marquez, L. Lasso-Rojas, V. Kroemker, N. Wente, I. M. Petzer, C.
530 Santisteban, J. Runyan, M. V. Dos Santos, B. G. Alves, R. Piccinini, V. Bronzo, M.
531 S. Abbassi, M. B. Said, P. Moroni. 2018. *Staphylococcus aureus* isolates from
532 bovine mastitis in eight countries: genotypes, detection of genes encoding different
533 toxins and other virulence genes. Toxins. 10(6):247.
534 <http://dx.doi.org/10.3390/toxins10060247>.

535 Munson, S. H., M. T. Tremaine, M. J. Betley, R. A. Welch. 1998. Identification and
536 characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus*
537 *aureus*. Infect. Immun. 66:3337–3348.

538 Nimmo, G. R. 2012. USA300 abroad: Global spread of a virulent strain of community-
539 associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin. Microbiol. Infect.
540 18:725–734. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03822.x>.

541 Omoe, K., D. L. Hu, H. K. Ono, S. Shimizu, H. Takahashi- Omoe, A. Nakane, T.
542 Uchiyama, K. Shinagawa, K. Imanishi. 2013. Emetic potentials of newly identified
543 staphylococcal enterotoxin-like toxins. Infect. Immun. 81:3627–3631.
544 <https://doi.org/10.1128/IAI.00550-13>.

545 O'Neill, E., C., Pozzi, P., Houston, D., Smyth, H., Humphreys, D. A., Robinson, J. P.
546 O'gara. 2007. Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation
547 in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. J. Clin. Microbiol.
548 45(5):1379-1388. <https://doi.org/10.1128/JCM.02280-06>.

549 Ono, H. K., K. Omoe, K. Imanishi, Y. Iwakabe, D. L. Hu, H. Kato, N. Saito, A.
550 Nakane, T. Uchiyama, K. Shinagawa. 2008. Identification and characterization of
551 two novel staphylococcal enterotoxins, types S and T. Infect. Immun. 76:4999–
552 5005. <https://doi.org/10.1128/IAI.00045-08>.

553 Ono, H. K., S. Hirose, K. Narita, M. Sugiyama, K. Asano, D. L. Hu, A. Nakane. 2019.
554 Histamine release from intestinal mast cells induced by staphylococcal enterotoxin
555 A (SEA) evokes vomiting reflex in common marmoset. PLoS Pathog. 15:1007803.
556 <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007803>.

557 Ono, H. K., Y. Sato'o, K. Narita, I. Naito, S. Hirose, J. Hisatsune, K. Asano, D. L. Hu,
558 K. Omoe, M. Sugai, A. Nakane. 2015. Identification and characterization of a novel
559 staphylococcal emetic toxin. Appl. Environ. Microbiol.81(20):7034-7040.
560 <https://doi.org/10.1128/AEM.01873-15>.

561 O'Riordan, K., J. C. Lee. 2004. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. Clin.
562 Microbiol. Rev.17(1):218-234. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.1.218-234.2004>.

563 Pereyra, E., F. Picechc, M. S. Rennaa, C. Baravallea, C. S. Andreottia, R. Russic, L. F.
564 Calvino, C. Diezc, B. E. Dallarda. 2016. Detection of *Staphylococcus aureus*
565 adhesion and biofilm-producing genes and their expression during internalization in
566 bovine mammary epithelial cells. Vet Microbiol. 183:69-77.
567 <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.12.002>.

568 Pérez, V. K. C., G. M. da Costa, A. S. Guimarães, M. B. Heinemann, A. P. Lage, E. M.
569 S. Dorneles. 2020. Relationship between virulence factors and antimicrobial
570 resistance in *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. J. Glob. Antimicrob.
571 Resist. 22:792-802. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.06.010>.

572 Peters, M. D. P, I. D. B. Silveira, V. Fischer.2015. Impact of subclinical and clinical
573 mastitis on sensitivity to pain of dairy cows. Animal. 9:2024-2028.
574 <https://doi.org/10.1017/S1751731115001391>.

575 Piccinini, R., V. Borromeo, A. Zecconi. 2010. Relationship between *S. aureus* gene
576 pattern and dairy herd mastitis prevalence. Vet. Microbiol.145(1-2):100-105.
577 <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.03.005>.

578 Pinzón-Sánchez, C., P. L. Ruegg. 2011. Risk factors associated with short-term post-
579 treatment outcomes of clinical mastitis. J. Dairy Sci. 94(7): 3397-3410.
580 <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3925>.

581 Prajapati, B. S., R. B. Prajapati. 2010. Toxic shock syndromes. *Pediatr. Infect. Dis. J.*
582 2(1): 10-13. [https://doi.org/10.1016/S2212-8328\(10\)80033-5](https://doi.org/10.1016/S2212-8328(10)80033-5).

583 Prakash, P. H., V. Rajan, S. Gopal. 2017. Predominance of SCCmec types IV and V
584 among biofilm producing device-associated *Staphylococcus aureus* strains isolated
585 from tertiary care hospitals in Mysuru, India. *Enferm Infecc Microbiol Clin*.35(4):
586 229-235. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2016.09.005>.

587 Rahimi, E., H. G. Safai. 2010. Detection of classical enterotoxins of *Staphylococcus*
588 *aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis in Isfahan, Iran. *Vet.*
589 *Microbiol*.141(3-4):393-394. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.09.023>.

590 Ren, Q., G. Liao, Z. Wu, J. Lv, W., Chen. 2020. Prevalence and characterization of
591 *Staphylococcus aureus* isolates from subclinical bovine mastitis in southern
592 Xinjiang, China. *J. Dairy Sci.* 103: 3368-3380. [https://doi.org/10.3168/jds.2019-](https://doi.org/10.3168/jds.2019-17420)
593 17420.

594 Ronco, T., I. C. Klaas, M. Stegger, L. Svennesen, L. B. Astrup, M. Farre, K. Pedersen.
595 2018. Genomic investigation of *Staphylococcus aureus* isolates from bulk tank milk
596 and dairy cows with clinical mastitis. *Vet. Microbiol*.215:35-42.
597 <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.01.003>.

598 Rossi, B. F., E. C. Bonsaglia, J. C. Pantoja, M. V. Santos, J. L. Gonçalves, A. F. Júnior,
599 V. L. Rall. 2021. Association between the accessory gene regulator (*agr*) group and
600 the severity of bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy*
601 *Sci*.104(3): <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19275>.

602 Rossi, B. F., E. C. R. Bonsaglia, I. G. Castilho, S. T. A. Dantas, A. Salina, H. Langoni,
603 J. C. F. Pantoja, P. E. Budri, D. Fitzgerald-Hughes, A. Fernandes Júnior, V. L. M.
604 Rall. 2019. Genotyping of long-term persistent *Staphylococcus aureus* in bovine
605 subclinical mastitis. *Microb. Pathog*.132: 45-50.
606 <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.04.031>.

607 Sabour P. M., J. J. Gill, D. Lepp, J. C. Pacan, R. Ahmed, R. Dingwell, K. Leslie.2004.
608 Molecular typing and distribution of *Staphylococcus aureus* isolates in Eastern
609 Canadian dairy herds, *J. Clin. Microbiol.* 42:3449–3455.
610 <https://doi.org/10.1128/JCM.42.8.3449-3455.2004>.

611 Sacco, S. C., N. S. Velázquez, M. S. Renna, C. Beccaria, C. Baravalle, E. A. Pereyra, S.
612 Monecke, L. F. Calvino, B. E. Dallard. 2020. Capacity of two *Staphylococcus*
613 *aureus* strains with different adaptation genotypes to persist and induce damage in
614 bovine mammary epithelial cells and to activate macrophages. *Microb. Pathog*.
615 142: 104017. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104017>.

616 Salimena, A. P., C. C. Lange, C. Camussone, M. Signorini, L. F. Calvino, M. A. Brito,
617 C. A. V. Borges, A. S. Guimarães, J. B. Ribeiro, L. C. Mendonça, R. H. Piccoli.
618 2016. Genotypic and phenotypic detection of capsular polysaccharide and biofilm
619 formation in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk collected from
620 Brazilian dairy farms. *Vet. Res. Commun.* 40(3-4): 97-106.
621 <https://doi.org/10.1007/s11259-016-9658-5>.

622 Schalm, O.W., D.O noorlander. 1957. Experiments and observations leading to
623 development of the California Mastitis Test. *J Am Vet Med Assoc*.130:1 99–204.

624 Shallcross, L. J., E. Fragaszy, A. M. Johnson, A. C. Hayward. 2013. The role of the
625 Panton-Valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review
626 and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 13(1):43-54. [https://doi.org/10.1016/S1473-](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70238-4)
627 [3099\(12\)70238-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70238-4).

628 Simojoki, H., P. Hyvönen, C. P. Ferrer, S. Taponen, S. Pyörälä. 2012. Is the biofilm
629 formation and slime producing ability of coagulase-negative staphylococci
630 associated with the persistence and severity of intramammary infection? *Vet*
631 *Microbiol.* 158(3):344-352. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.02.031>.

632 Sospedra, I. M. J., J. M. Soriano. 2012. Report of toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-
633 1) from *Staphylococcus aureus* isolated in food handlers and surfaces from
634 foodservice establishments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 80:288-290.
635 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.03.011>.

636 Spoor, L. E., E. Richardson, A. C. Richards, G. J. Wilson, C. Mendonca, R. K. Gupta,
637 P. R. McAdam, S. Nutbeam-Tuffs, N. S. Black, J. P. O’Gara, C. Y. Lee, J.
638 Corander, J. R. Fitzgerald. 2015. Recombination-mediated remodelling of host-
639 pathogen interactions during *Staphylococcus aureus* niche adaptation. *Microb.*
640 *Genom.* 1:000036. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000036>

641 Su, Y. C., A. C. Wong. 1995. Identification and purification of a new staphylococcal
642 enterotoxin. *H. Appl. Environ. Microbiol.* 61:1438–1443.

643 Suzuki, Y., H. K. Ono, Y. Shimojima, H. Kubota, R. Kato, T. Kakuda, S. Hirose, D. L.
644 Hu, A. Nakane, S. Takai, K. Sadamasu. 2020. A novel staphylococcal enterotoxin
645 SE02 involved in a staphylococcal food poisoning outbreak that occurred in Tokyo
646 in 2004. *Food Microbiol.* 92: 103588. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103588>

647 Tenover, F. C. R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H.
648 Persing, B. Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns
649 produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J.*
650 *Clin. Microbiol.* 33:2233-2239.

651 Thomas, D. Y., S. Jarraud, B. Lemercier, G. Cozon, K. Echasserieau, J. Etienne, M. L.
652 Gougeon, G. Lina, F. Vandenesch. 2006. Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2
653 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within
654 the enterotoxin gene cluster. *Infect. Immun.* 74:4724–4734.
655 <https://doi.org/10.1128/IAI.00132-06>

656 Tristan A, Y. Benito, R. Montserret, S. Boisset, E. Dusserre, F. Penin, F. Ruggiero, J.
657 Etienne, H. Lortat-Jacob, G. Lina, M. G. Bowden, F. Vandenesch. 2009. The signal
658 peptide of *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin LukS component
659 mediates increased adhesion to heparan sulfates. *PLoS One.* 4:5042.
660 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005042>.

661 Tuchscher, L. P., M. I. Gomez, F. R. Buzzola, L. F. Calvinho, J. C. Lee, D. O. Sordelli.
662 2007. Characterization of a new variant of IS257 that has displaced the capsule
663 genes within bovine isolates of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 75(11):
664 5483-5488. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.00747-07>.

665 Valotteau, C., V. Prystopiuk, G. Pietrocola, S. Rindi, D. Peterle, V. De Filippis, T. J.
666 Foster, P. Speziale Y. F. Dufrêne. 2011. Single-cell and single-molecule analysis

667 unravels the multifunctionality of the *Staphylococcus aureus* collagen-binding
668 protein Cna. ACS nano.11(2):2160-2170. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b08404>.

669 Vasudevan, P., M. K. M. Nair, T. Annamalai, K. S. Venkitanarayanan. 2003.
670 Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of
671 *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. Vet. Microbiol. 92:179–185, 2003.
672 [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00360-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00360-7)

673 Vaughn, J. M., R. D. Abdi, B. E. Gillespie, O. K. DeGo. 2020. Genetic diversity and
674 virulence characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine
675 mastitis Microb. Pathog. 144: 104171.
676 <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104171>.

677 Veh, K. A., R. C. Klein, C. Ster, G. Keefe, P. Lacasse, D. Scholl, J. P. Roy, D. Haine, S.
678 Dufour, B. G. Talbot, A. O. Ribon, F. Malouin. 2014. Genotypic and phenotypic
679 characterization of *Staphylococcus aureus* causing persistent and nonpersistent
680 subclinical bovine intramammary infections during lactation or the dry period. J.
681 Dairy Sci.98:155–168. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8044>

682 Wang, W., X. Lin, T. Jiang, Z. Peng, J. Xu, L. Yi, F. Li, S. Fanning, Z. Baloch. 2018.
683 Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* cultured from raw milk
684 taken from dairy cows with mastitis in Beijing, China. Front. Microbiol. 9:1123.
685 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01123>.

686 Wilson, G. J., K. S. Seo, R. A. Cartwright, T. Connelley, O. N. Chuang-Smith, J. A.
687 Merriman, C. M. Guinane, J. Y. Park, G. A. Bohach, P. M. Schlievert, W. I.
688 Morrison, J. R. Fitzgerald. 2011. A novel core genome-encoded superantigen
689 contributes to lethality of community-associated MRSA necrotizing pneumonia.
690 PLoS Pathog. 7: e1002271. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002271>.

691 Wu, S., F. Zhang, J. Huang, Q. Wu, J. Zhang, J. Dai, H. Zeng, X. Yang, M. Chen, R.
692 Pang, T. Lei, Y. Zhang, L. Xue, J. Wang, Y. Ding. 2019. Phenotypic and genotypic
693 characterization of PVL-positive *Staphylococcus aureus* isolated from retail foods
694 in China. Int. J. Food Microbiol. 304:119-126.
695 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.05.021>.

696 Yang, X., F. Dong, S. Qian, L. Wang, Y. Liu, K. Yao, W. Song, J. Zhen, W. Zhou, H.
697 Xu, H. Zheng. 2019. Accessory gene regulator (agr) dysfunction was unusual in
698 *Staphylococcus aureus* isolated from Chinese children. BMC Microbiol.19(1):1-12.
699 <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1465-z>.

700 Zayda, M. G., Y. Masuda, A. M. Hammad, K. I. Honjoh, A. M. Elbagory, T. Miyamoto.
701 2020. Molecular characterisation of methicillin-resistant (MRSA) and methicillin-
702 susceptible (MSSA) *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical
703 mastitis and Egyptian raw milk cheese. Int. Dairy J. 104:104646.
704 <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104646>.

705 Zmantar, T., K. Chaieb, H. Makni, H. Miladi, F. B. Abdallah, K. Mahdouani, A.
706 Bakhrouf. 2008. Detection by PCR of adhesins genes and slime production in
707 clinical *Staphylococcus aureus*. J. Basic Microbiol. 48(4):308-314.
708 <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.200700289>.

709 Zuniga, E., P. A. Melville, A. B. S. Saldenberg, M. A. Laes, F. F. Gonsales, S. R. S.
710 Salaberry, F. Gregori, P. E. Brandão, F. G. B. Santos, N. E. Lincopan, N. R.

711 Benites.2015. Occurrence of genes coding for MSCRAMM and biofilm-associated
712 protein Bap in *Staphylococcus spp.* isolated from bovine subclinical mastitis and
713 relationship with somatic cell counts. *Microb. Pathog.* 89:1-6.
714 <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2015.08.014>.

715

716