

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 BIOCIÊNCIAS 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

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

Keywords: MSCRAMMs, Biofilm, Enterotoxins, PFGE.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Mastite Bovina

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2.1.4 Cápsulas polissacarídicas (*Polysaccharide capsule* – PC)

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

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

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

1.2.1.5 Produção de Biofilme

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

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

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

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

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

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

1.2.1.6 Adesão e Invasão Celular

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

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

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

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

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

1.2.2 Caracterização Molecular

1.2.2.1 Grupo *agr*

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

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

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

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

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

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

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

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

- Clutterbuck, A.L., E.J. Woods, D.C. Knottenbelt, P.D. Clegg, C.A. Cochrane, S.L. Percival. 2007. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Vet. Microbiol.* 121:1–17. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.12.029>.
- Cocchiato, J. L., M. I. Gomez, A. Risley, R. Solinga, D. O. Sordelli, J. C. Lee. 2006. Molecular characterization of the capsule locus from non-typeable *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 59(3):948-960. <https://doi.org/10.1111/j.13652958.2005.04978.x>.
- Cucarella, C., M. Á. Tormo, C. Ubeda, M. P. Trotonda, M. Monzón, C. Peris, B. Amorena, I. Lasa, J. R. Penadés. 2004. Role of biofilm-associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect and Immun.* 72(4): 2177-2185. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.4.2177-2185.2004>.
- Cunha, R. P. L., L. R. Molina, A. U. Carvalho, E. J. Facury Filho, P. M Ferreira, M. B. Gentilini. 2008. Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com número de lactações, produção e composição química do leite em vacas da raça Holandesa. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 60(1):19-24.
- Darwish, S. F., H. A. Asfour. 2013. Investigation of biofilm forming ability in *Staphylococci* causing bovine mastitis using phenotypic and genotypic assays. *Sci. World J.* <http://dx.doi.org/10.1155/2013/378492>.
- De Bentzmann S., A. Tristan, J. Etienne, N. Brousse, F. Vandenesch, G. Lina. 2004. *Staphylococcus aureus* isolates associated with necrotizing pneumonia bind to basement membrane type I and IV collagens and laminin. *J Infect Dis.* 190:1506. <https://doi.org/10.1086/424521>.
- Denayer, S., L. Delbrassinne, Y. Nia, N. Botteldoorn. 2017. Food-borne outbreak investigation and molecular typing: high diversity of *Staphylococcus aureus* strains and importance of toxin detection. *Toxins.* 9(12):407. <https://doi.org/10.3390/toxins9120407>.
- Fernández, M.M.; Marzi, M.C.; Berguer, P.; Burzyn, D.; Langley, R.J.; Piazzon, I.; Mariuzza, R.A.; Malchiodi, E.L. Binding of natural variants of staphylococcal superantigens SEG and SEI to TCR and MHC class II molecule. *Mol. Immunol.*, 43: 927- 938, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2005.06.029>.
- Foster, T. J., J. A. Geoghegan, V. K. Ganesh, M. Höök. 2014. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat. Rev. Microbiol.* 12(1):49-62. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3161>.
- Fowler, T., E. R. Wann, D. Joh, S. Johansson, T. J. Foster, M. Höök. 2000. Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell β 1 integrins. *Eur. J. Cell Biol.* 79(10):672-679. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00104>.
- Haveri, M., A. Roslöf, L. Rantala, S. Pyörälä. 2007. Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. *J. Appl. Microbiol.* 103(4):993-1000. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03356.x>.
- He, W., S. Ma, L. Lei, J. He, X. Li, J. Tao, X. Wang, S. Song, Y. Wang, J. Shen, C. Cai, C. Wu. 2020. Prevalence, etiology, and economic impact of clinical mastitis on

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Malachowa, N., S. D. Kobayashi, A. D. Porter, K. R. Braughton, D. P. Scott, D. J. Gardner, D. M. Missiakas, O. Schneewind, F. R. DeLeo. 2016. Contribution of *Staphylococcus aureus* coagulases and clumping factor A to abscess formation in a rabbit model of skin and soft tissue infection. Plos One.11(6):0158293. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158293>.
- McAdow, M., H. K. Kim, A. C. Dedent, A. P. A. Hendrickx, O. Schneewind, D. M. Missiakas. 2011. Preventing *Staphylococcus aureus* sepsis through the inhibition of its agglutination in blood. Plos Pathog. 7(10):1002307. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002307>.
- Mechesso, A. F., S. J. Kim, H. S. Park, J. H. Choi, H. J. Song, M. H. Kim, S. K. Lim, S. S. Yoon, D. C. Moon. 2021. First detection of Panton-Valentine leukocidin–positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST30 in raw milk taken from dairy cows with mastitis in South Korea. J. Dairy Sci.104(1):969-976. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19004>.
- Melake, N. A., A. S. Zakaria, N. H. Ibrahim, M. A. Salama, A. Z. Mahmoud. 2014. Prevalence of agr specificity groups among in vitro biofilm forming methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from nasal carriers. Int. J. Microbiol. Res. 5:76-84. <https://doi.org/10.5829/idosi.ijmr.2014.5.2.83184>.
- Melchior, M. B., M. H. J. Van Osch, R. M. Graat, E. Van Duijkeren, D. J. Mevius, W. Gaastra, M. Nielen, J. Fink-Gremmels. 2009. Biofilm formation and genotyping of *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: evidence for lack of penicillin-resistance in Agr-type II strains. Vet. Microbiol. 137: 83-89. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.12.004>.
- Melles, D.C., W.B.V. Leeuwen, H.A.M. Boelens, J.K. Peeters, H.A. Verbrugh, A.V. Belkum. 2006. Panton-Valentine leukocidin genes in *Staphylococcus aureus*. Emerg. Infect. Dis. 12:1174–1175. <https://doi.org/10.3201/eid1207.050865>.
- Monistero, V., A. Barberio, F. Biscarini, P. Cremonesi, B. Castiglioni, H. U. Graber, E. Bottini, A. Ceballos-Marquez, V. Kroemker, I. M. Petzer, C. Pollera, C. Santisteban, M. Veiga Dos Santos, V. Bronzo, R. Piccinini, G. Re, M. Cocchi, P. Moroni. 2020. Different distribution of antimicrobial resistance genes and virulence profiles of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical mastitis in six countries. J. Dairy Sci.103(4): 3431-3446. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17141>.
- Monistero, V., H. U. Graber, C. Pollera, P. Cremonesi, B. Castiglioni, E. Bottini, A. Ceballos-Marquez, L. Lasso-Rojas, V. Kroemker, N. Wente, I. M. Petzer, C. Santisteban, J. Runyan, M. V. Dos Santos, B. G. Alves, R. Piccinini, V. Bronzo, M. S. Abbassi, M. B. Said, P. Moroni. 2018. *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in eight countries: genotypes, detection of genes encoding different toxins and other virulence genes. Toxins. 10(6):247. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins10060247>.
- Munson, S. H., M. T. Tremaine, M. J. Betley, R. A. Welch. 1998. Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus*. Infect. Immun. 66:3337–3348.

- Nimmo, G. R. 2012. USA300 abroad: Global spread of a virulent strain of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin. Microbiol. Infect. 18:725–734. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03822.x>.
- Omoe, K., D. L. Hu, H. K. Ono, S. Shimizu, H. Takahashi- Omoe, A. Nakane, T. Uchiyama, K. Shinagawa, K. Imanishi. 2013. Emetic potentials of newly identified staphylococcal enterotoxin-like toxins. Infect. Immun. 81:3627–3631. <https://doi.org/10.1128/IAI.00550-13>.
- O'Neill, E., C., Pozzi, P., Houston, D., Smyth, H., Humphreys, D. A., Robinson, J. P. O'gara. 2007. Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. J. Clin. Microbiol. 45(5):1379-1388. <https://doi.org/10.1128/JCM.02280-06>.
- Ono, H. K., K. Omoe, K. Imanishi, Y. Iwakabe, D. L. Hu, H. Kato, N. Saito, A. Nakane, T. Uchiyama, K. Shinagawa. 2008. Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins, types S and T. Infect. Immun. 76:4999–5005. <https://doi.org/10.1128/IAI.00045-08>.
- Ono, H. K., S. Hirose, K. Narita, M. Sugiyama, K. Asano, D. L. Hu, A. Nakane. 2019. Histamine release from intestinal mast cells induced by staphylococcal enterotoxin A (SEA) evokes vomiting reflex in common marmoset. PLoS Pathog. 15:1007803. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007803>.
- Ono, H. K., Y. Sato'o, K. Narita, I. Naito, S. Hirose, J. Hisatsune, K. Asano, D. L. Hu, K. Omoe, M. Sugai, A. Nakane. 2015. Identification and characterization of a novel staphylococcal emetic toxin. Appl. Environ. Microbiol. 81(20):7034-7040. <https://doi.org/10.1128/AEM.01873-15>.
- O'Riordan, K., J. C. Lee. 2004. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. Clin. Microbiol. Rev. 17(1):218-234. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.1.218-234.2004>.
- Pereyra, E., F. Picechc, M. S. Rennaa, C. Baravallea, C. S. Andreottia, R. Russic, L. F. Calvino, C. Diezc, B. E. Dallarda. 2016. Detection of *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm-producing genes and their expression during internalization in bovine mammary epithelial cells. Vet Microbiol. 183:69-77. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.12.002>.
- Pérez, V. K. C., G. M. da Costa, A. S. Guimarães, M. B. Heinemann, A. P. Lage, E. M. S. Dorneles. 2020. Relationship between virulence factors and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. J. Glob. Antimicrob. Resist. 22:792-802. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.06.010>.
- Peters, M. D. P, I. D. B. Silveira, V. Fischer. 2015. Impact of subclinical and clinical mastitis on sensitivity to pain of dairy cows. Animal. 9:2024-2028. <https://doi.org/10.1017/S1751731115001391>.
- Piccinini, R., V. Borromeo, A. Zecconi. 2010. Relationship between *S. aureus* gene pattern and dairy herd mastitis prevalence. Vet. Microbiol. 145(1-2):100-105. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.03.005>.
- Pinzón-Sánchez, C., P. L. Ruegg. 2011. Risk factors associated with short-term post-treatment outcomes of clinical mastitis. J. Dairy Sci. 94(7): 3397-3410. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3925>.

- Prajapati, B. S., R. B. Prajapati. 2010. Toxic shock syndromes. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2(1): 10-13. [https://doi.org/10.1016/S2212-8328\(10\)80033-5](https://doi.org/10.1016/S2212-8328(10)80033-5).
- Prakash, P. H., V. Rajan, S. Gopal. 2017. Predominance of SCCmec types IV and V among biofilm producing device-associated *Staphylococcus aureus* strains isolated from tertiary care hospitals in Mysuru, India. *Enferm Infecc Microbiol Clin*.35(4): 229-235. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2016.09.005>.
- Rahimi, E., H. G. Safai. 2010. Detection of classical enterotoxins of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis in Isfahan, Iran. *Vet. Microbiol*.141(3-4):393-394. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.09.023>.
- Ren, Q., G. Liao, Z. Wu, J. Lv, W., Chen. 2020. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from subclinical bovine mastitis in southern Xinjiang, China. *J. Dairy Sci.* 103: 3368-3380. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17420>.
- Ronco, T., I. C. Klaas, M. Stegger, L. Svennesen, L. B. Astrup, M. Farre, K. Pedersen. 2018. Genomic investigation of *Staphylococcus aureus* isolates from bulk tank milk and dairy cows with clinical mastitis. *Vet. Microbiol*.215:35-42. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.01.003>.
- Rossi, B. F., E. C. Bonsaglia, J. C. Pantoja, M. V. Santos, J. L. Gonçalves, A. F. Júnior, V. L. Rall. 2021. Association between the accessory gene regulator (*agr*) group and the severity of bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Sci*.104(3): <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19275>.
- Rossi, B. F., E. C. R. Bonsaglia, I. G. Castilho, S. T. A. Dantas, A. Salina, H. Langoni, J. C. F. Pantoja, P. E. Budri, D. Fitzgerald-Hughes, A. Fernandes Júnior, V. L. M. Rall. 2019. Genotyping of long-term persistent *Staphylococcus aureus* in bovine subclinical mastitis. *Microb. Pathog*.132: 45-50. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.04.031>.
- Sabour P. M., J. J. Gill, D. Lepp, J. C. Pacan, R. Ahmed, R. Dingwell, K. Leslie.2004. Molecular typing and distribution of *Staphylococcus aureus* isolates in Eastern Canadian dairy herds, *J. Clin. Microbiol.* 42:3449–3455. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.8.3449-3455.2004>.
- Sacco, S. C., N. S. Velázquez, M. S. Renna, C. Beccaria, C. Baravalle, E. A. Pereyra, S. Monecke, L. F. Calvino, B. E. Dallard. 2020. Capacity of two *Staphylococcus aureus* strains with different adaptation genotypes to persist and induce damage in bovine mammary epithelial cells and to activate macrophages. *Microb. Pathog*. 142: 104017. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104017>.
- Salimena, A. P., C. C. Lange, C. Camussone, M. Signorini, L. F. Calvino, M. A. Brito, C. A. V. Borges, A. S. Guimarães, J. B. Ribeiro, L. C. Mendonça, R. H. Piccoli. 2016. Genotypic and phenotypic detection of capsular polysaccharide and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk collected from Brazilian dairy farms. *Vet. Res. Commun.* 40(3-4): 97-106. <https://doi.org/10.1007/s11259-016-9658-5>.
- Schalm, O.W., D.O noorlander. 1957. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. *J Am Vet Med Assoc*.130:1 99–204.

- Shallcross, L. J., E. Fragaszy, A. M. Johnson, A. C. Hayward. 2013. The role of the Panton-Valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 13(1):43-54. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70238-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70238-4).
- Simojoki, H., P. Hyvönen, C. P. Ferrer, S. Taponen, S. Pyörälä. 2012. Is the biofilm formation and slime producing ability of coagulase-negative staphylococci associated with the persistence and severity of intramammary infection? *Vet Microbiol.* 158(3):344-352. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.02.031>.
- Sospedra, I. M. J., J. M. Soriano. 2012. Report of toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1) from *Staphylococcus aureus* isolated in food handlers and surfaces from foodservice establishments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 80:288-290. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.03.011>.
- Spoor, L. E., E. Richardson, A. C. Richards, G. J. Wilson, C. Mendonca, R. K. Gupta, P. R. McAdam, S. Nutbeam-Tuffs, N. S. Black, J. P. O’Gara, C. Y. Lee, J. Corander, J. R. Fitzgerald. 2015. Recombination-mediated remodelling of host-pathogen interactions during *Staphylococcus aureus* niche adaptation. *Microb. Genom.* 1:000036. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000036>
- Su, Y. C., A. C. Wong. 1995. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin. *H. Appl. Environ. Microbiol.* 61:1438–1443.
- Suzuki, Y., H. K. Ono, Y. Shimojima, H. Kubota, R. Kato, T. Kakuda, S. Hirose, D. L. Hu, A. Nakane, S. Takai, K. Sadamasu. 2020. A novel staphylococcal enterotoxin SE02 involved in a staphylococcal food poisoning outbreak that occurred in Tokyo in 2004. *Food Microbiol.* 92: 103588. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103588>
- Tenover, F. C. R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, B. Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33:2233-2239.
- Thomas, D. Y., S. Jarraud, B. Lemerrier, G. Cozon, K. Echasserieau, J. Etienne, M. L. Gougeon, G. Lina, F. Vandenesch. 2006. Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster. *Infect. Immun.* 74:4724–4734. <https://doi.org/10.1128/IAI.00132-06>
- Tristan A, Y. Benito, R. Montserret, S. Boisset, E. Dusserre, F. Penin, F. Ruggiero, J. Etienne, H. Lortat-Jacob, G. Lina, M. G. Bowden, F. Vandenesch. 2009. The signal peptide of *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin LukS component mediates increased adhesion to heparan sulfates. *PLoS One.* 4:5042. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005042>.
- Tuchscher, L. P., M. I. Gomez, F. R. Buzzola, L. F. Calvino, J. C. Lee, D. O. Sordelli. 2007. Characterization of a new variant of IS257 that has displaced the capsule genes within bovine isolates of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 75(11): 5483-5488. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.00747-07>.
- Valotteau, C., V. Prystopiuk, G. Pietrocola, S. Rindi, D. Peterle, V. De Filippis, T. J. Foster, P. Speziale Y. F. Dufrêne. 2011. Single-cell and single-molecule analysis

- unravels the multifunctionality of the *Staphylococcus aureus* collagen-binding protein Cna. ACS nano.11(2):2160-2170. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b08404>.
- Vasudevan, P., M. K. M. Nair, T. Annamalai, K. S. Venkitanarayanan. 2003. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. Vet. Microbiol. 92:179–185, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00360-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00360-7)
- Vaughn, J. M., R. D. Abdi, B. E. Gillespie, O. K. Dego. 2020. Genetic diversity and virulence characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis. Microb. Pathog. 144: 104171. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104171>.
- Veh, K. A., R. C. Klein, C. Ster, G. Keefe, P. Lacasse, D. Scholl, J. P. Roy, D. Haine, S. Dufour, B. G. Talbot, A. O. Ribon, F. Malouin. 2014. Genotypic and phenotypic characterization of *Staphylococcus aureus* causing persistent and nonpersistent subclinical bovine intramammary infections during lactation or the dry period. J. Dairy Sci.98:155–168. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8044>
- Wang, W., X. Lin, T. Jiang, Z. Peng, J. Xu, L. Yi, F. Li, S. Fanning, Z. Baloch. 2018. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* cultured from raw milk taken from dairy cows with mastitis in Beijing, China. Front. Microbiol. 9:1123. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01123>.
- Wilson, G. J., K. S. Seo, R. A. Cartwright, T. Connelley, O. N. Chuang-Smith, J. A. Merriman, C. M. Guinane, J. Y. Park, G. A. Bohach, P. M. Schlievert, W. I. Morrison, J. R. Fitzgerald. 2011. A novel core genome-encoded superantigen contributes to lethality of community-associated MRSA necrotizing pneumonia. PLoS Pathog. 7: e1002271. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002271>.
- Wu, S., F. Zhang, J. Huang, Q. Wu, J. Zhang, J. Dai, H. Zeng, X. Yang, M. Chen, R. Pang, T. Lei, Y. Zhang, L. Xue, J. Wang, Y. Ding. 2019. Phenotypic and genotypic characterization of PVL-positive *Staphylococcus aureus* isolated from retail foods in China. Int. J. Food Microbiol. 304:119-126. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.05.021>.
- Yang, X., F. Dong, S. Qian, L. Wang, Y. Liu, K. Yao, W. Song, J. Zhen, W. Zhou, H. Xu, H. Zheng. 2019. Accessory gene regulator (agr) dysfunction was unusual in *Staphylococcus aureus* isolated from Chinese children. BMC Microbiol.19(1):1-12. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1465-z>.
- Zayda, M. G., Y. Masuda, A. M. Hammad, K. I. Honjoh, A. M. Elbagory, T. Miyamoto. 2020. Molecular characterisation of methicillin-resistant (MRSA) and methicillin-susceptible (MSSA) *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis and Egyptian raw milk cheese. Int. Dairy J. 104:104646. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104646>.
- Zmantar, T., K. Chaieb, H. Makni, H. Miladi, F. B. Abdallah, K. Mahdouani, A. Bakhrouf. 2008. Detection by PCR of adhesins genes and slime production in clinical *Staphylococcus aureus*. J. Basic Microbiol. 48(4):308-314. <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.200700289>.
- Zuniga, E., P. A. Melville, A. B. S. Saldenberg, M. A. Laes, F. F. Gonsales, S. R. S. Salaberry, F. Gregori, P. E. Brandão, F. G. B. Santos, N. E. Lincopan, N. R.

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

717 **CAPÍTULO 1: Diferenças no perfil genético de *S. aureus* isolados de leite de vacas**
718 **com mastite clínica e subclínica.**
719

RESUMO

Staphylococcus aureus é conhecido mundialmente pela grande variedade de fatores de virulência que influenciam diretamente o desenvolvimento de infecções. A mastite, doença que acomete rebanhos ao redor do mundo, é responsável por grandes perdas econômicas e, no Brasil, o *S. aureus* é considerado um dos principais patógenos envolvidos. A mastite subclínica é conhecida pela ausência de sintomas no animal e sem alterações no leite enquanto a clínica apresenta sintomas que variam de acordo com a gravidade, sempre com alterações na aparência do leite. Com isso, o objetivo do estudo foi avaliar as diferenças e relações genéticas entre os fatores de virulência mais importantes, como o biofilme (*bap*, *icaA* e *icaD*), enterotoxinas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei* e *sej*), a Toxina da Síndrome do Choque Tóxico (*tsst-1*), a Leucocidina Panton-Valentin (*pvl*), as proteínas envolvidas no processo de adesão e invasão celular (MSCRAMMs) e o tipo de *agr* com os graus de severidade da mastite clínica e com a mastite subclínica. O PFGE também foi utilizado com objetivo de discriminar perfis genéticos entre os tipos da doença. Foram utilizados 151 isolados, sendo 50 obtidos a partir de leite de vacas com mastite subclínica e 101, de mastite clínica. Todos os isolados foram capazes de produzir biofilme, não havendo diferença entre os tipos de mastite. Os isolados subclínicos apresentaram relação estatística com os genes *sea*, *sec*, *see*, *tsst-1* e *pvl*. Já os clínicos, com os genes *seg*, *seh*, *sei*, *bap* e *icaA*. A maioria dos genes das MSCRAMMs (*fnbA*, *fib*, *clfA*, *clfB*, *cna*, *ebpS*) também foi associado aos isolados clínicos. Os resultados obtidos mostraram que existem diferenças genômicas no potencial de virulência entre os isolados de *S. aureus*, obtidos de casos de mastite clínica e subclínica. Porém, o tipo de locus *agr* parece exercer um papel fundamental na expressão e repressão desses genes, impactando diretamente na progressão da doença. Além disso, o PFGE diferenciou de maneira clara, clones causadores de mastite de mastite clínica e subclínica.

Palavras-chave: MSCRAMMs, enterotoxinas, biofilme, PFGE.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is known worldwide for the wide variety of virulence factors that directly influence the development of infections. Mastitis, a disease that affects herds around the world, is responsible for great economic losses and *S. aureus* is considered one of the main pathogens involved. Subclinical mastitis is known for the absence of symptoms in the animal and no changes in the milk, while clinical mastitis presents symptoms that vary according to severity, always with changes in the appearance of the milk. Thus, the aim of the study was to evaluate the main pathogenic differences, such as biofilm formation, presence of genes encoding enterotoxins (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei* and *sej*), shock syndrome toxic toxin (*tsst-1*) and Panton-Valentin Leucocidin (*pvl*) and MSCRAMMs in *S. aureus* causing clinical and subclinical mastitis. Furthermore, compare the presence of these with the regulator gene *agr* (*accessory regulatory gene*). PFGE was also used to discriminate genetic profiles between the types of the disease. A total of 151 isolates were used, 50 obtained from milk from cows with subclinical mastitis and 101 from clinical mastitis. All isolates were able to produce biofilm, with no difference between the types of mastitis. The subclinical isolates showed a statistical relationship with the genes *sea*, *sec*, *see*, *tsst-1* and *pvl*. On the other hand, the clinical isolates, with the *seg*, *seh*, *sei*, *bap* and *icaA* genes. Most MSCRAMM genes (*fnbA*, *fib*, *clfA*, *clfB*, *cna*, *ebpS*) were also associated with clinical isolates. The results obtained showed that there are genomic differences in the virulence potential between *S. aureus* isolates, obtained from cases of clinical and subclinical mastitis. However, the type of *agr* locus seems to play a key role in the expression and repression of these genes, directly impacting disease progression. In addition, the PFGE clearly differentiated the pulse types causing mastitis from clinical and subclinical mastitis.

Keywords: MSCRAMMs, Enterotoxins, Biofilm, PFGE

INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é uma das bactérias patogênicas mais envolvidas em casos de mastite bovina e está amplamente distribuída em rebanhos de gado leiteiro em vários países (Schmidt et al., 2017), sendo isolada em 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). Essa bactéria é conhecida por apresentar uma extensa variedade de fatores de virulência, gerando diferentes perfis genéticos que devem ser considerados na avaliação do desenvolvimento de infecções (Perez et al., 2020). Peton et al. (2014) compararam um isolado de *S. aureus* obtido de mastite leve crônica (Newbould 305), com uma estirpe isolada de mastite clínica severa (RF122) e observaram diferenças que poderiam interferir na gravidade da doença. Com isso, várias hipóteses foram levantadas para explicar a cronicidade da mastite por *S. aureus*, como a formação de biofilme e a invasão de tecidos.

A presença do biofilme está relacionada com a aderência e colonização desse micro-organismo nas células do epitélio mamário bem como a evasão do sistema imune do hospedeiro e resistência a antimicrobianos (Khoramrooz et al., 2016). A produção de biofilme é controlada principalmente pelo *operon ica* (Prakash et al., 2017), composto pelos genes *icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC*, além do *icaR* (regulatório) sendo os dois primeiros os mais importantes na formação de biofilme em *S. aureus* (Vasudevan et al., 2003). O gene *bap* (*biofilm associated protein*) tem sido encontrado somente em isolados, obtidos de leite de vacas com mastite (Darwish et al., 2013 Khoramrooz et al., 2016) e apenas a sua expressão permite que isolados produzam biofilme, mesmo na ausência do *operon ica* (Cucarella et al., 2004).

As MSCRAMMs (Componentes da Superfície Microbiana Reconhecedores de Moléculas Adesivas da Matriz) são proteínas associadas à adesão e invasão de células hospedeiras (Klein et al., 2012) que se ligam a uma variedade de componentes extracelulares em mamíferos (Zmantar et al., 2008), como as proteínas de ligação a fibrinogênio (Fib), fatores de aglutinação A e B (ClfA e ClfB), proteínas de ligação à fibronectina (FnBPA e FnBPB), proteína de ligação ao colágeno (Cna) (Khoramrooz et al., 2016), proteína de ligação à elastina (EbpS) (Downer et al., 2002) e a proteína ligadora à laminina (Eno) (Carneiro et al., 2004). Com a adesão à superfície celular, *S. aureus* pode invadir células epiteliais, instalar-se em partes mais profundas da glândula

mamária e persistir no hospedeiro por mais tempo, sem causar inflamação aparente (Castilho et al., 2017).

A presença de genes que codificam as enterotoxinas estafilocócicas (SEs) já foi relatada em vários estudos que envolvem *S. aureus* isolados de mastite (Rossi et al., 2019; Khoramrooz et al., 2016; Rahimi et al., 2010). Segundo Piccinini et al. (2010), superantígenos, mais especificamente algumas enterotoxinas, tem um papel no desenvolvimento da mastite bovina, criando um ambiente favorável para a colonização. Haveri et al. (2007) correlacionaram a presença de *sed* e *sej* em casos de mastite persistente, por outro lado, Veh et al. (2014) associaram o gene *seg* à uma redução na probabilidade da bactéria causar mastite persistente durante a lactação, apontando para possíveis diferentes funções, considerando-se diferentes enterotoxinas.

Além da avaliação de diferentes perfis genéticos envolvidos na virulência desse patógeno, o rastreamento molecular das relações genéticas dos isolados, usando técnicas como o Gel de Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE) pode auxiliar a investigação da transmissão e persistência do patógeno nos rebanhos (Melake et al., 2014). Alguns estudos mostraram a coexistência de linhagens heterogêneas dentro de uma mesma fazenda bem como a existência da mesma linhagem em propriedades distintas (Sabour et al., 2004; Rossi et al., 2019; Vaughn et al., 2020).

Com isso, o objetivo do estudo foi avaliar diferenças na presença dos genes que codificam para a produção de exotoxinas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei* e *sej*, *tsst-1*, *pvl*), produção de biofilme (*icaA*, *icaD* e *bap*) e das MSCRAMMs (*fnbA*, *fnbB*, *fib*, *clfA*, *clfB*, *cna*, *eno* e *ebpS*), envolvidos nos casos de mastite subclínica e na mastite clínica leve e moderada. Também foi objetivo desse estudo, a caracterização molecular desses isolados pela tipagem do locus *agr* e por PFGE.

MATERIAL E MÉTODOS

Um total de 151 amostras de conveniência de *S. aureus* (Rossi et al., 2021) foram utilizadas neste estudo, das quais 50 (33,1%) foram isoladas de leites de vacas com mastite subclínica, 73 (48,3%) de mastite clínica com severidade leve e 28 (18,5%), com severidade moderada. As amostras foram isoladas de 20 rebanhos leiteiros distribuídos no estado de São Paulo (Rossi et al., 2021). Este estudo foi

aprovado pelo Comitê de Ética Animal, da FMVZ/UNESP, Botucatu Universidade Estadual Paulista (UNESP; Brasil) (nº 0136/2017).

O diagnóstico de mastite subclínica foi confirmado pela ausência de sintomas clínicos ou de alterações do leite e pelo California Mastitis Test (CMT). Posteriormente no laboratório, foi realizada a contagem de células somáticas (CCS) (normal até 200.000 células/mL) por citometria de fluxo (Somacount 300 Instrument. Bentley Instruments, Chaska, MN (Pantoja et al., 2009).

Cada fazenda contava com funcionários capacitados e previamente treinados para distinção dos graus de severidade da mastite clínica, baseando-se na seguinte classificação: Mastite clínica grau 1 (leve) foi classificada pela observação de alterações macroscópicas no leite (grumos e pus) e a de grau 2, quando, além de alterações no leite, também havia sinais inflamatórios da glândula mamária (Pinzón-Sánchez e Ruegg, 2011).

A ausência de isolados de *S. aureus*, obtidos de casos de mastite severa pode ser considerada uma limitação nesse trabalho, mas deve ser ressaltado que *S. aureus* raramente causa esse tipo de infecção.

Deteção dos genes associados às exotoxinas (SEs, PVL e TSST-1), produção de biofilme e MSCRAMMs.

A extração de DNA foi realizada como descrita por Rossi et al. (2021). Todas as 151 cepas foram submetidas a testes de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para pesquisa dos genes que codificam as enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI e SEJ (Johnson et al., 1991; Mehrotra et al., 2000; Omoe et al., 2002; Nashev et al., 2004). As cepas padrão ATCC 13565 (*sea*), ATCC 14458 (*seb*), ATCC 19095 (*sec*), FRI 361 (*sed, seg, sei*), ATCC 27664 (*see*) e FRI 137 (*seh*) foram utilizadas como controle positivo nas reações.

Os genes *bap*, *icaA* e *icaD* (Cucarella et al., 2001; Vasudevan et al., 2003) que são os principais envolvidos na produção de biofilme também foram pesquisados. A ATCC 35983 foi utilizada como controle positivo para genes do cluster *ica* e uma cepa sequenciada *bap* positiva, para o gene *bap*.

Os genes que codificam as adesinas das MSCRAMMs (*fnbA*, *fnbB*, *fib*, *clfA*, *clfB*, *cna*, *eno* e *ebpS*) foram pesquisados segundo Tristan et al. (2003), os controles positivos foram os isolados sequenciados por Sanger, do estudo de Castilho et al. (2017).

Teste de produção de biofilme *in vitro*

Todos os isolados foram testados para a produção de biofilme *in vitro* segundo Stepanović et al. (2000), independente da presença dos genes pesquisados.

Foi realizada, a partir do crescimento de cada isolado em caldo tripticase soja (TSB), incubado por 37°C/24h, uma diluição de, aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/ml (escala 0,5 de MacFarland) em TSB acrescido de 1% de glicose, que foi plaqueada em quadruplicata, em microplaca de 96 poços e mantida a 37°C/24h sem agitação. Após esse período, o crescimento foi lavado três vezes com tampão PBS (pH 7,0) e depois, corado por 15 minutos com cristal violeta 1%. A seguir, o corante foi retirado e a placa foi novamente lavada para a retirada do excesso. Então, foi adicionado ácido acético glacial 33%, que descola e homogeniza o biofilme produzido, com leitura de 570 nm em um leitor de ELISA (Biotek, EPOCH2C 200-999nm).

Uma alíquota de TSB não inoculado foi utilizado como branco, para corrigir o valor da absorbância. A cepa ATCC 12.228 *S. epidermidis*, produtora de biofilme foi utilizada como controle positivo e *S. aureus* ATCC 12.600, como controle negativo.

A partir da média das quatro repetições da amostra (DO) e de acordo com a relação entre essa DO e a densidade óptica do controle negativo (DOc), as amostras foram classificadas segundo Stepanović et al. (2000), em não produtor de biofilme ou produtor fraco, moderado ou forte, de acordo com a seguinte fórmula:

$$DO \leq DOc = \text{não produtor de biofilme}$$

$$DOc < DO \leq (2 \times DOc) = \text{fraco produtor de biofilme}$$

$$(2 \times DOc) < DO \leq (4 \times DOc) = \text{moderado produtor de biofilme}$$

$$(4 \times DOc) \leq DO = \text{forte produtor de biofilme}$$

Teste de adesão e invasão de *S. aureus* em células de epitélio mamário bovino (*bovine mammary epithelial cells* - BMEC)

Foram selecionadas 21 cepas de *S. aureus* para os testes de adesão e invasão em células BMEC (*bovine mammary epithelial cells*), considerando-se as diferentes combinações em relação ao tipo de mastite (clínica leve, clínica moderada e subclínica), tipo capsular (cápsula tipo 5 ou tipo 8), descrito anteriormente por Rossi et al. (2021) e os diferentes perfis dos genes das MSCRAMMs. A metodologia para o teste de adesão foi realizada de acordo com Castilho et al. (2017).

Tipagem molecular por Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) e *agr* type

A metodologia de PFGE foi realizada segundo Pulsenet (CDC, 2016). Cada cepa foi incubada em caldo BHI a 35°/24 horas para a confecção dos *plugues*, em agarose *low melting* e lisostafina (100µg/mL). Após incubação overnight a 37°C, uma porção de, aproximadamente, 2 milímetros de cada *plague* foi cortada para a digestão com a enzima de restrição SmaI Fast (Thermo Scientific), durante 6 minutos. Após esse tempo, as porções dos *plugues* foram distribuídas em gel de agarose *low melting* 1% para a corrida no Chef Mapper com os parâmetros de: pulso inicial de 5 segundos, pulso final de 40 segundos, voltagem de 6V/cm e ângulo de 120°, no total de 21 horas. Ao término da corrida, o gel foi corado com brometo de etídio 1% (Invitrogen) e analisado e fotografado em analisador de imagens (AlphaImager – Alpha Esasy FC Software – AlphaInotech Corporation).

A tipagem por *agr* foi realizada por Rossi et al. (2021), segundo metodologia descritas por Shopsin et al. (2003).

Análises estatísticas

Para análises estatísticas, tabulações cruzadas (PROC FREQ; SAS Institute, Cary, NC, EUA) foram utilizadas para descrever a prevalência geral de cada gene estudado entre os tipos de mastite (subclínica, clínica leve, clínica moderada). O teste do qui-quadrado foi usado para avaliar a associação entre os genes e tipos de *agr*. A significância estatística foi declarada para $P < 0,05$.

RESULTADOS

Presença dos genes associados às enterotoxinas, *pvl* e *tsst-1*

Na Tabela 1, pode-se observar que 50% das cepas (25/50) de mastite subclínica apresentaram pelo menos um dos genes pesquisados para as enterotoxinas, sendo o gene *sec* o mais prevalente em 46% (23/50), seguido de *sea*, *see* e *seh* em 8% (4/50) e o *seg* em 4% dos isolados (2/50). Neste caso, os genes *sed*, *seb*, *sei* e *sej* não foram encontrados. Considerando-se a mastite clínica, 66,3% (67/101) dos isolados apresentaram pelo menos um desses genes e o *seh* foi o mais prevalente, estando presente em 46,5% (47/101), seguidos de *seg* e *sei* em 19,8% (20/101). O gene *sed* esteve presente em 2,0% (2/101) e o *sec* em apenas 1% (1/101). Não houve isolados clínicos positivos para *sea*, *seb* e *see*. Foi possível observar uma relação estatística entre

os genes *sec* ($p<0.0001$) e *see* ($p=0.004$) com a mastite subclínica. Já a mastite clínica, foi relacionada estatisticamente com os genes *seg* ($p=0.0096$), *seh* ($p<0.0001$) e *sei* ($p=0.0007$).

O gene responsável pela Toxina da Síndrome do Choque Tóxico (*tsst-1*) e o *pvl*, responsável pela Leucocidina Pantón-Valentine, não estiveram presentes nos isolados de mastite clínica. Em contrapartida, 68% (34/50) dos isolados subclínicos apresentaram o gene *tsst-1* ($p<0.0001$) e 6% (3/50), o *pvl* ($p=0.0129$).

Tabela 1: Prevalência dos genes responsáveis pela produção de proteínas MSACRAMMs, de exotoxinas (enterotoxinas, toxina da síndrome do choque tóxico e panton-valentine) e de biofilme, de acordo com o tipo de mastite (clínica ou subclínica), causada por *Staphylococcus aureus*, obtidos de leite de vacas doentes.

Gene	Tipos de Mastite		P-value
	Clínica %(N+/N _{total})	Subclínica %(N+/N _{total})	
<i>fnbA</i>	89,1 (90/101)	44 (22/50)	<0,0001
<i>fnbB</i>	3,0 (3/101)	-	0,2183
<i>fib</i>	95,15 (96/101)	34 (17/50)	<0,0001
<i>clfA</i>	96 (97/101)	44 (22/50)	<0,0001
<i>clfB</i>	26,7 (27/101)	-	<0,0001
<i>cna</i>	14,9 (15/101)	-	0,0041
<i>eno</i>	98 (99/101)	98 (49/50)	0,9935
<i>epbS</i>	89,1 (90/101)	44 (22/50)	<0,0001
<i>sea</i>	-	8 (4/50)	0,0040
<i>seb</i>	-	-	-
<i>sec</i>	1,0 (1/101)	46 (23/50)	<0,0001
<i>sed</i>	2,0 (2/101)	-	0,3165
<i>see</i>	-	8 (4/50)	0,0040
<i>seg</i>	19,8 (20/101)	4 (2/50)	0,0096
<i>seh</i>	46,5 (47/101)	8 (4/50)	<0,0001
<i>sei</i>	19,8 (20/101)	-	0,0007
<i>sej</i>	-	-	-
<i>tsst-1</i>	-	68 (34/50)	<0,0001
<i>pvl</i>	-	6 (3/50)	0,0129
<i>bap</i>	23,8 (27/101)	-	0,0002
<i>icaA</i>	92,1 (93/101)	40 (20/50)	<0,0001
<i>icaD</i>	100 (101/101)	98 (49/50)	0,1539

Legenda: %(N+/N_{total}): porcentagem (número de isolados positivos/ número de isolados total); -: não encontrado

Nos isolados de mastite clínica, os genes *sec* e *sed* estiveram presentes somente nos isolados de severidade moderada (Tabela 2). Os *seg* e *sei* apareceram juntos nos mesmos isolados e em isolados distintos dos que apresentaram o *seh*. Já na subclínica

960 não foi encontrada essa relação, pois o gene *sei* não foi identificado e uma cepa
961 apresentou o gene *seg* e *seh*.

Tabela 2: Prevalência dos genes responsáveis pela produção de proteínas MSACRAMMs, de exotoxinas (enterotoxinas, toxina da síndrome do choque tóxico e panton-valentine) e de biofilme, de acordo com o tipo de mastite (clínica leve ou clínica moderada, subclínica), causada por *Staphylococcus aureus*, obtidos de leite de vacas doentes.

Gene	Mastite Clínica		Mastite Subclínica	P-value
	Leve	Moderada		
	%(N+/N _{total})	%(N+/N _{total})	%(N+/N _{total})	
<i>fnbA</i>	89 (65/73)	89,3 (25/28)	44 (22/50)	<0,0001
<i>fnbB</i>	2,7 (2/73)	3,6 (1/28)	-	0,4522
<i>Fib</i>	93,2 (68/73)	100 (28/28)	34 (17/50)	<0,0001
<i>clfA</i>	94,5 (69/73)	100 (28/28)	44 (22/50)	<0,0001
<i>clfB</i>	27,4 (20/73)	25 (7/28)	-	0,0003
<i>cna</i>	11,3 (9/73)	21,4 (6/28)	-	0,0064
<i>eno</i>	97,3 (71/73)	100 (28/28)	98 (49/50)	0,6770
<i>epbS</i>	89 (65/73)	89,3 (25/28)	44 (22/50)	<0,0001
<i>sea</i>	-	-	8 (4/50)	0,0158
<i>seb</i>	-	-	-	-
<i>sec</i>	-	3,6 (1/28)	46 (23/50)	<0,0001
<i>sed</i>	-	7,2 (2/28)	-	0,0117
<i>see</i>	-	-	8 (4/50)	0,0158
<i>seg</i>	16,4 (12/73)	28,6(8/28)	4 (2/50)	0,0106
<i>seh</i>	50,7 (37/73)	35,7 (10/28)	8 (4/50)	<0,0001
<i>sei</i>	16,4 (12/73)	28,6 (8/28)	-	0,0009
<i>sej</i>	-	-	-	-
<i>tsst-1</i>	-	-	68 (34/50)	<0,0001
<i>pvl</i>	-	-	6 (3/50)	0,0454
<i>bap</i>	24,7 (18/73)	21,4 (6/28)	-	0,0008
<i>icaA</i>	90,4 (66/73)	96,4 (27/28)	40 (20/50)	<0,0001
<i>icaD</i>	100(73/73)	100(28/28)	98 (49/50)	0,3618

Legenda: %(N+/N_{total}): porcentagem (número de isolados positivos/ número de isolados total); -: não encontrado

Presença dos genes associados às MSCRAMMs e adesão e invasão em células BMEC

De acordo com a tabela 1, todos os oito genes que compõem as MSCRAMMs foram encontrados entre os isolados. O gene *eno* foi o mais prevalente, ocorrendo em 98,67% (141/151) das cepas. O gene *fnbB* não foi identificado nos isolados subclínicos e entre os clínicos, apenas 2,97% (3/101) apresentaram esse gene ($p=0,2183$). Já os genes *clfB* e *cna* que também não foram encontrados nos isolados subclínicos, apresentaram relação estatística com os isolados clínicos ($p<0.0001$ e $p=0.0041$, respectivamente).

Os demais genes, *fnbA*, *fib*, *clfA* e *epbs*, foram encontrados em ambos os tipos de mastite, mas nos isolados de mastite clínica foram bem mais frequentes do que nas cepas de subclínica ($p < 0.0001$), conforme Tabela 1.

Não houve diferença estatística na presença dos genes das MSCRAMMs em relação à mastite clínica leve e moderada (Tabela 2). E, pode-se observar que, apesar da grande variabilidade de resultados em relação aos genes da MSCRAMMs, todas os isolados aderiram e invadiram as células BMEC.

988 Tabela 3. Perfis genéticos encontrados, considerando-se o tipo capsular e de mastite e a presença dos genes da
 989 MSCRAMM, em isolados de *S. aureus*, obtidos a partir de leite de vacas com mastite.

Tipo de Mastite	Tipo Capsular	Genes MSCRAMMs								Adesão	Invasão
		<i>fnbA</i>	<i>fnbB</i>	<i>fib</i>	<i>clfA</i>	<i>clfB</i>	<i>cna</i>	<i>eno</i>	<i>epbs</i>		
Clínica Leve	5	+	-	+	+	+	-	+	+	2,8x10 ⁶	2,4x10 ⁴
Clínica Leve	5	+	-	+	+	-	-	+	+	1x10 ⁶	1,4x10 ⁴
Clínica Leve	5	-	-	-	+	-	-	-	+	1x10 ⁶	2,8x10 ³
Clínica Leve	5	+	+	+	+	-	-	+	-	5,1x10 ⁶	2,8x10 ³
Clínica Leve	8	+	-	+	+	-	+	+	+	3,3x10 ⁶	2,5x10 ⁵
Clínica Leve	8	+	-	+	+	+	+	+	+	3,2x10 ⁶	2,2x10 ⁵
Clínica Leve	8	+	-	+	+	-	-	+	+	3,1x10 ⁶	2,4x10 ⁵
Clínica Leve	8	-	-	+	-	-	-	+	-	4,1x10 ⁶	1,5x10 ⁵
Clínica Leve	8	+	-	+	+	-	-	+	-	9,2x10 ⁶	8x10 ²
Clínica Moderada	5	+	+	+	+	-	-	+	-	3,6x10 ⁶	7x10 ⁵
Clínica Moderada	5	+	-	+	+	+	-	+	+	3,9x10 ⁶	2,5x10 ⁵
Clínica Moderada	5	+	-	+	+	-	-	+	+	3,4x10 ⁶	1x10 ⁶
Clínica Moderada	5	-	-	+	+	-	-	+	-	2,4x10 ⁶	6x10 ³
Clínica Moderada	8	+	-	+	+	-	+	+	+	1,8x10 ⁶	6x10 ⁵
Clínica Moderada	8	+	-	+	+	+	+	+	+	9,3x10 ⁵	3x10 ³
Clínica Moderada	8	+	-	+	+	+	-	+	+	3,2x10 ⁶	5,1x10 ⁵
Clínica Moderada	8	+	-	+	+	+	-	+	-	3,4x10 ⁶	8,1x10 ⁵
Clínica Moderada	8	-	-	+	+	+	+	+	+	4x10 ⁶	2,3x10 ⁵
Subclínica	5	-	-	-	+	-	-	-	-	2,9x10 ⁵	1,1x10 ²
Subclínica	8	+	-	-	+	-	-	+	+	2,6x10 ⁶	1,2x10 ⁵
Subclínica	8	+	-	+	+	-	-	+	-	3,6x10 ⁶	2,9x10 ⁵

990 MSCRAMM: Componentes da Superfície Microbiana Reconhecedores de Moléculas Adesivas da Matriz

Presença dos genes *bap*, *icaA* e *icaD* e Produção de biofilme *in vitro*

Todos os 151 isolados foram capazes de produzir biofilme *in vitro*. Entre os casos subclínicos, 60% (30/50) foram considerados fortes produtores e 40% (20/50), produtores moderados (Tabela 4). Nos isolados clínicos, 70,30% (71/101) foram fortes produtores, 27,70% (28/101) produtores moderados e 2% (2/101) fracos.

Considerando-se a gravidade da mastite clínica, 75% (55/73) dos isolados grau 1 foram fortes produtores de biofilme, 22% (16/73) produtores moderados e 3% (2/73) fraco produtor. Nos isolados clínicos moderados, não houve fraco produtor, sendo 57% (16/28) fortes produtores e 43% (12/28), produtores moderados (Tabela 4).

Tabela 4: Produção de biofilme por isolados de *S. aureus*, obtidos a partir de mastite clínica leve ou moderada e de subclínica.

Biofilme	Tipos de Mastite			P-value
	Clínica Leve %(N+/N _{total})	Clínica Moderada %(N+/N _{total})	Subclinical %(N+/N _{total})	
Forte	75,34(55/73)	57,14(16/28)	60(30/50)	0.0899
Moderado	21,92(16/73)	42,86(12/28)	40(20/50)	
Fraco	2,74(2/73)	-	-	

Legenda: %(N+/N_{total}): porcentagem (número de isolados positivos/ número de isolados total); -: não produtor

Conforme Tabela 5, os genes do cluster *ica*, envolvidos na produção de biofilme foram encontrados em quase todos os isolados, considerando-se ambos os tipos de mastite. O *icaD* só esteve ausente em um único isolado subclínico e o *icaA* esteve presente em 92% (93/101) dos isolados clínicos e em 40% (20/50) dos subclínicos, mostrando uma relação estatística com isolados clínicos ($p < 0.0001$). Não houve diferença estatística em relação à presença desse gene com os graus leve e moderado da mastite clínica, uma vez que sua presença foi observada valores muito semelhantes, conforme Tabela 2.

O gene *bap* não foi encontrado nos isolados subclínicos, ocorrendo em 23,8% (24/101) dos clínicos, com uma forte relação estatística ($p = 0.0002$) com esse tipo de mastite (Tabela 1). Já entre a mastite clínica leve e moderada, o gene esteve presente em quantidades semelhantes (Tabela 2). A presença desse gene não teve relação estatística com a intensidade da produção de biofilme (Tabela 5).

Tabela 5: Frequência dos genes associados à formação de biofilme com a intensidade de produção (fraca, moderada ou forte produção), em isolados de *S. aureus*, obtidos a partir de mastite clínica leve ou moderada e de subclínica.

Gene	Tipo de Biofilme			P-value
	Forte %(N+/N _{total})	Moderado %(N+/N _{total})	Fraco %(N+/N _{total})	
<i>icaA</i>	79.21(80/101)	68.75(33/48)	-	0.0191
<i>icaD</i>	100(101/101)	97.92(47/48)	100(2/2)	0.3396
<i>bap</i>	19.80(20/101)	8.33(4/48)	-	0.1666

Legenda: %(N+/N_{total}): porcentagem (número de isolados positivos/ número de isolados total); -: não produtor

Relação entre os tipos de *agr* (*agrI*, *agrII*, *agrIII* e NT) com os genes das exotoxinas, formação de biofilme e MSCRAMMs.

Entre os genes das enterotoxinas, *sec*, *seg*, *seh* e *sei* apresentaram relações estatísticas com os diferentes tipos de *agr* (Tabela 6). Entre as 24 cepas *sec* positivas, 29,17% (7/24) eram *agrI* e 50% (12/24) *agr*-, com uma relação maior com os *agr*- ($p=0.0383$ e $p=0.0007$, respectivamente). Já os genes *seg* e *sei* associaram-se com isolados *agrII* ($p<0.0001$), sendo 72,73% (16/22) cepas *seg* positivas *agrII* e 80% (16/20) cepas *sei* positivas *agrII*. Entre os 51 isolados que apresentaram o gene *seh*, 96,08% (49/51) eram *agrIII* ($p<0.0001$).

Entre as 24 cepas que apresentaram o gene *bap*, 95,83% (23/24) pertenciam ao grupo *agrII* ($p<0.0001$). A presença do gene *icaA*, esteve relacionada com a presença do grupo *agr*, uma vez que apenas 1,77% (2/113) dos isolados *icaA* positivos eram *agr*- ($p<0.0001$), sendo a maioria relacionada com *agrIII* 46.02% (52/113), seguida de *agrII* 33.63% (38/113) e *agrI* 18.58% (21/113).

Em relação as MSCRAMMs, cepas *fbnA* positivas foram associadas com *agrI* ($p=0.0106$), *agrII* ($p=0.0027$) e *agrIII* ($p<0.0001$). Resultado semelhante foi encontrado com o gene *clfA*. Entre as 27 cepas *clfB* positivas, 70,37% (19/27) apresentaram *agr* tipo II. Isolados *fib* positivos e *epbs* positivos apresentaram associação com isolados *agrII* e *agrIII* (Tabela 6).

1044 Tabela 6. Relação entre os tipos de *agr* (*agrI*, *agrII*, *agrIII* e NT) com os genes das enterotoxinas, formação de biofilme e MSCRAMMs, em
 1045 isolados de *S. aureus*, obtidos a partir de leite de vacas com mastite clínica e subclínica. (continua)

Gene	AgrI+	P-value	AgrII+	P-value	AgrIII+	P-value	NT+	P-value
<i>fbnA</i> +	19.64 (22/112)	0.0106	32.14(36/112)	0.0027	46.43(52/112)	<0.0001	1.79(2/112)	<0.0001
<i>fbnA</i> -	2.56(1/39)		7.69(3/39)		5.13(2/39)		84.62(33/39)	
<i>fbnB</i> +	66.67(2/3)	0.0123	0(0/3)	0.3019	33.33(1/3)	0.9294	0(0/3)	0.3366
<i>fbnB</i> -	14.19(21/148)		26.35(39/148)		35.81(53/148)		23.65(35/148)	
<i>fib</i> +	16.81(19/113)	0.3507	33.63(38/113)	0.0002	45.13(51/113)	<0.0001	4.42(5/113)	<0.0001
<i>fib</i> -	10.53(4/38)		2.63(1/38)		7.89(3/38)		78.95(30/38)	
<i>clfA</i> +	19.33(23/119)	0.0069	32.77(39/119)	0.0002	44.54(53/119)	<0.0001	3.36(4/119)	<0.0001
<i>clfA</i> -	-		0(0/32)		3.13(1/32)		96.88(31/32)	
<i>clfB</i> +	3.70(1/27)	0.0658	70.37(19/27)	<0.0001	18.52(5/27)	0.0391	7.41(2/27)	0.0321
<i>clfB</i> -	17.74(22/124)		16.13(20/124)		36.52(49/124)		26.61(33/124)	
<i>cna</i> +	13.33(2/15)	0.8293	13.33(2/15)	0.2440	73.33(11/15)	0.0014	0(0/15)	0.0250
<i>cna</i> -	15.44(21/136)		27.21(37/136)		31.62(43/136)		25.74(35/136)	
<i>eno</i> +	14.19(21/148)	0.0123	26.35(39/148)	0.3019	36.49(54/148)	0.1918	22.97(34/148)	0.6737
<i>eno</i> -	66.67(2/3)		0(0/3)		0(0/3)		33.33(1/3)	
<i>ebpS</i> +	18.75(21/112)	0.0415	33.04(37/112)	0.0006	46.43(52/112)	<0.0001	1.79(2/112)	<0.0001
<i>ebpS</i> -	5.13(2/39)		5.13(2/39)		5.13(2/39)		84.62(33/39)	
<i>sea</i> +	25.00(1/4)	0.5816	0(0/4)	0.2316	50(2/4)	3.70	25(1/4)	0.9303
<i>sea</i> -	14.97(22/147)		26.53(39/147)		35.37(52/147)		23.13(34/147)	
<i>seb</i> +	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>seb</i> -	15.23(23/151)		25.83(39/151)		35.76(24/151)		23.18(35/151)	
<i>sec</i> +	29.17(7/24)	0.0383	0(0/24)	0.0016	20.83(5/24)	0.0962	50(12/24)	0.0007
<i>sec</i> -	12.60(16/127)		30.71(39/127)		38.58(49/127)		18.11(23/127)	

1046

1047 NT: não tipável

1048

1049 Tabela 6. Relação entre os tipos de *agr* (*agrI*, *agrII*, *agrIII* e NT) com os genes das enterotoxinas, formação de biofilme e MSCRAMMs, em
1050 isolados de *S. aureus*, obtidos a partir de leite de vacas com mastite clínica e subclínica. (continuação)

Gene	AgrI+	P-value	AgrII+	P-value	AgrIII+	P-value	NT	P-value
<i>sed</i> +	0(0/2)	0.5462	100(2/2)	0.0158	0(0/2)	0.2881	0(0/2)	0.4342
<i>sed</i> -	15.44(23/149)		24.83(37/149)		36.24(59/149)		23.49(35/149)	
<i>see</i> +	50.00(2/4)	0.0498	0(0/4)	0.2316	50(2/4)	0.5471	0(0/4)	0.2655
<i>see</i> -	14.29(21/147)		26.53(39/147)		35.37(52/147)		23.81(35/174)	
<i>seg</i> +	-	0.0315	72.73(16/22)	<0.0001	13.64(3/22)	0.0192	13.64(3/22)	0.2511
<i>seg</i> -	17.83(23/129)		17.83(23/129)		39.53(51/129)		24.81(32/129)	
<i>seh</i> +	1.96(1/51)	0.0012	0(0/51)	<0.0001	96.08(49/51)	<0.0001	1.96(1/51)	<0.0001
<i>seh</i> -	22(22/100)		39(39/100)		5(5/100)		34(34/100)	
<i>sei</i> +	0(0/20)	0.0418	80(16/20)	<0.0001	5(1/20)	0.0021	15(3/20)	0.3521
<i>sei</i> -	17.56(23/131)		17.56(23/131)		40.46(53/131)		24.43(32/131)	
<i>sej</i> +	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>sej</i> -	15.23(23/151)		25.83(39/151)		35.76(54/151)		23.18(35/151)	
<i>tsst-1</i> +	23.53(8/34)	0.1261	0(0/34)	<0.0001	8.82(3/34)	0.0002	67.65(23/34)	<0.0001
<i>tsst-1</i> -	12.82(15/117)		33.33(39/117)		43.59(51/117)		10.26(12/117)	
<i>pvl</i> +	33.33(1/3)	0.3781	0(0/3)	0.3019	66.67(2/3)	0.2593	0(0/3)	0.3366
<i>pvl</i> -	14.86(22/148)		26.35(39/148)		35.14(52/148)		23.65(35/148)	
<i>bap</i> +	0(0/24)	0.0236	95.83(23/24)	<0.0001	0(0/24)	<0.0001	4.17(1/24)	0.0161
<i>bap</i> -	18.11(23/127)		12.60(16/127)		42.52(54/127)		26.77(34/127)	
<i>icaA</i> +	18.58(21/113)	0.0481	33.63(38/113)	0.0002	46.02(52/113)	<0.0001	1.77(2/113)	<0.0001
<i>icaA</i> -	5.26(2/38)		2.63(1/38)		5.26(2/38)		86.84(33/38)	
<i>icaD</i> +	18.58(21/113)	0.0481	33.63(38/113)	0.0002	46.02(52/113)	<0.0001	1.77(2/113)	<0.0001
<i>icaD</i> -	5.26(2/38)		2.63(1/38)		5.26(2/38)		86.84(33/38)	

1051

1052 NT: Não tipável

1053

Caracterização Molecular por PFGE

Entre os 151 isolados, o DNA de apenas dois (um de mastite clínica e um de mastite subclínica) não foram digeridos pela enzima *SmaI*, sendo classificados como não tipáveis. Assim, os isolados restantes foram classificados em 72 pulsotipos.

Observou-se que o mesmo pulsotipo não foi encontrado causando ambos os tipos de mastite (clínica e subclínica). Por outro lado, observou-se o mesmo pulsotipo em casos de mastite clínica leve e clínica moderada. Além disso, um mesmo cluster esteve presente em fazendas diferentes, assim como vários pulsotipos foram encontrados em uma mesma fazenda (Figura 1).

O mesmo clone que foi encontrado causando mastite clínica leve e moderada, ocorreu tanto na mesma fazenda quanto em fazendas diferentes.

A Figura 1 foi aumentada para melhor análise, em relação à Visão Geral do dendrograma e foi nomeada como Figura 1A

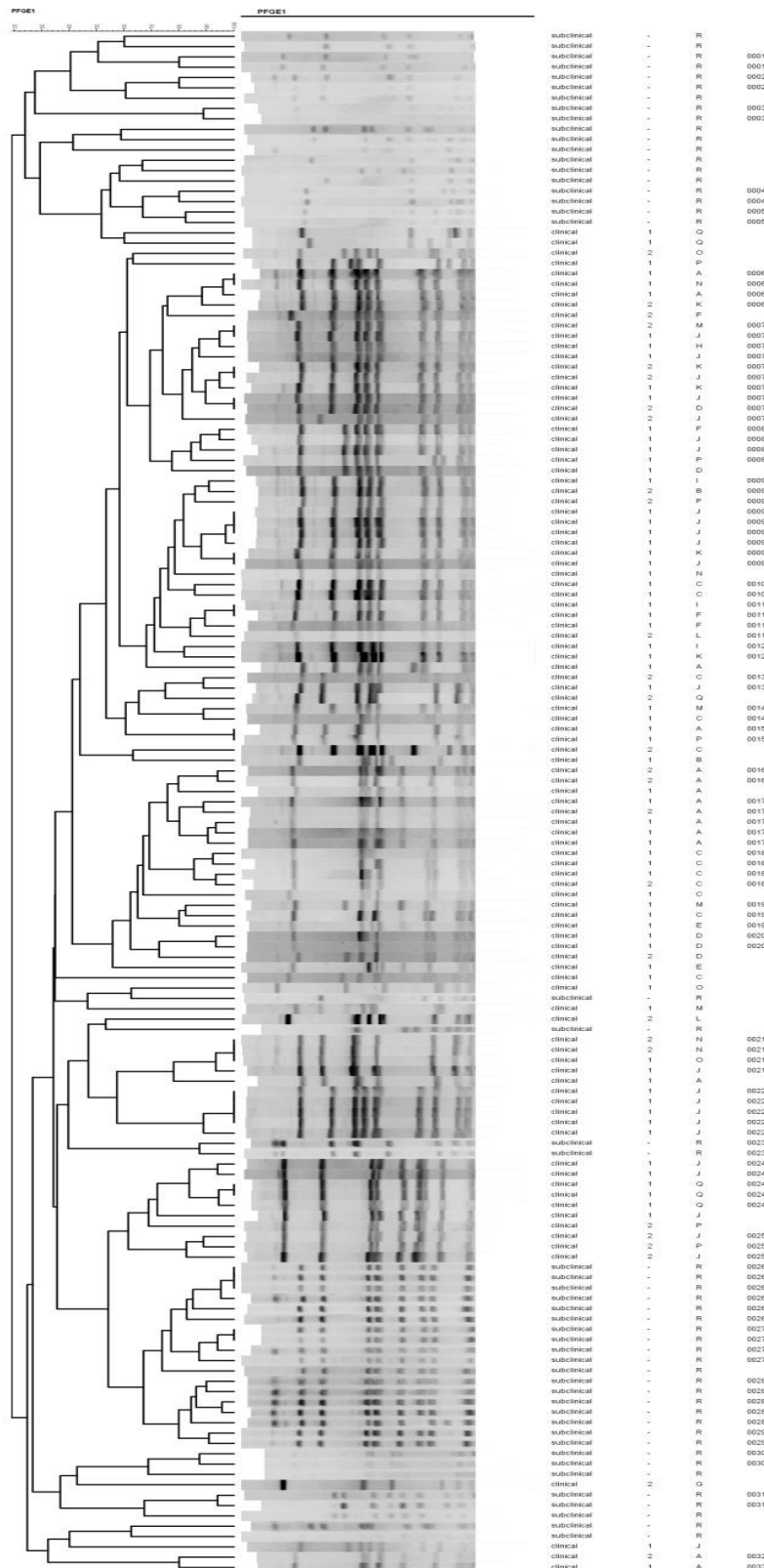
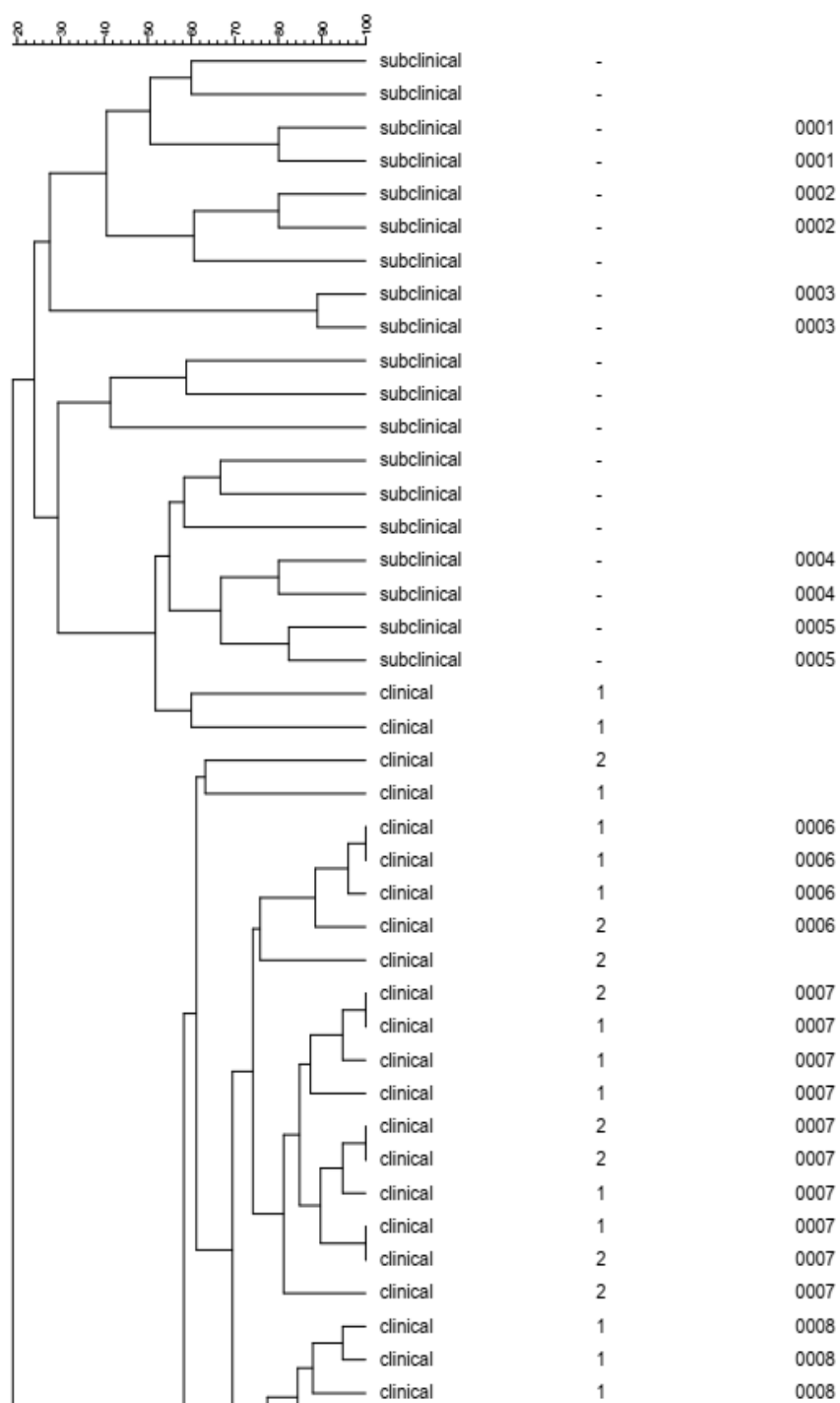
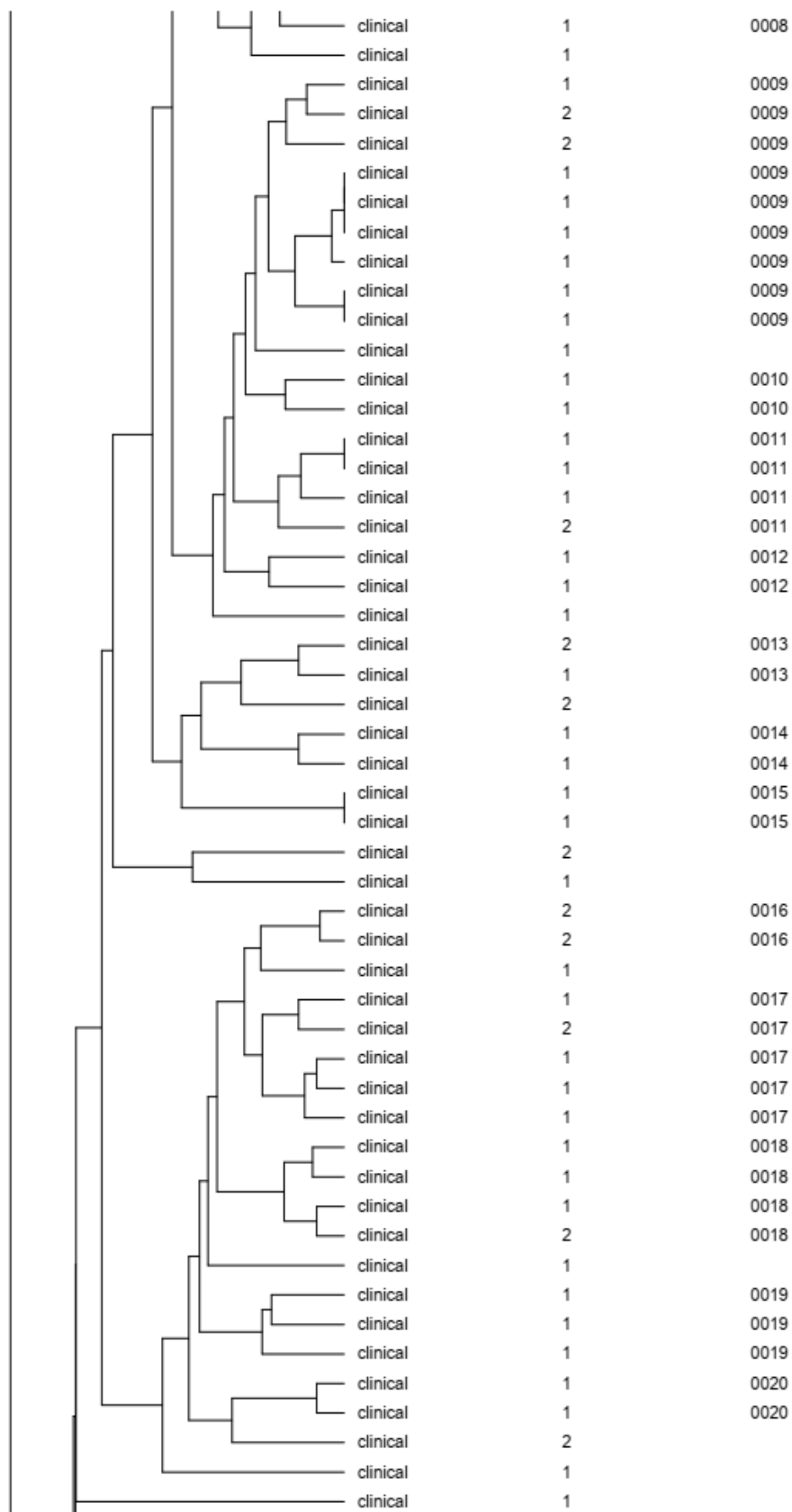
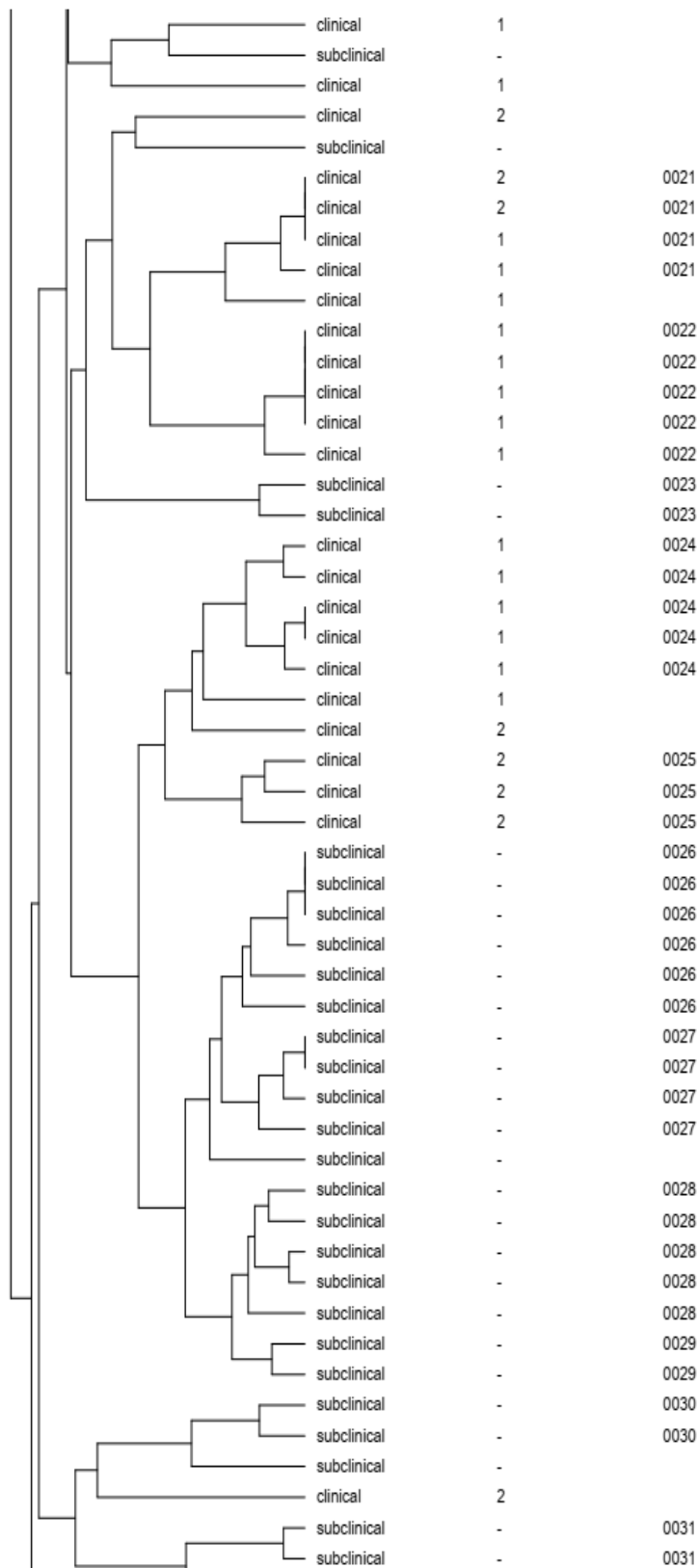


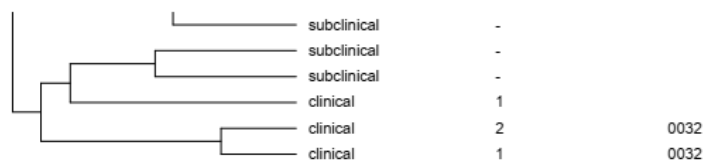
Figura 1: Visão Geral do Dendrograma dos padrões de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) de cepas de *S. aureus*, isolados dos diferentes tipos de mastite bovina. Método de clusterização UPGMA, similaridade baseada no coeficiente de Dice (%). Tolerância e otimização definidas a 1,5%.

PFGE1









1076

1077 Figura 2 A: Detalhes do Dendrograma dos padrões de eletroforese em gel
 1078 de campo pulsado (PFGE) de cepas de *S. aureus*, isolados dos diferentes
 1079 tipos de mastite bovina. Método de clusterização UPGMA, similaridade
 1080 baseada no coeficiente de Dice (%). Tolerância e otimização definidas a
 1081 1,5%.

1082

DISCUSSÃO

S. aureus ainda é um dos principais patógenos causadores de mastite e a produção de biofilme é considerada um importante fator de virulência, influenciando na patogênese da doença (Dhanawade et al., 2010).

As SEs também parecem ter um papel no desenvolvimento da mastite, pois Piechota et al. (2014) mostraram que os genes que codificam enterotoxinas foram frequentemente identificados em estafilococos isolados de leite de vacas com essa infecção (73,4%) quando comparado a isolados de leite de vacas saudáveis (20%). Segundo Fang et al. (2019), a expressão da SEC pode causar inflamação, produção de citocinas pró-inflamatórias e dano tecidual em glândulas mamárias, associando seu papel no desenvolvimento da mastite. No presente estudo, o gene *sec* foi associado com a mastite subclínica, caracterizada pela ausência de inflamação aparente. Entretanto, a expressão de *sec* parece ser controlada positivamente pelo *agr* (Yang et al., 2019)) e no presente trabalho, 50% dos isolados subclínicos *sec*⁺ foram *agr* negativos (Rossi et al. 2021).

Em contrapartida, os genes *seg* e *sei* estiveram relacionados com isolados clínicos, principalmente nos clínicos moderados e, associados, principalmente ao *agrII* e, segundo Yang et al. (2019), o *agr* regula positivamente a expressão de enterotoxinas. Neste caso os genes *seg* e *sei* aparecem juntos nos mesmo isolados, pois pertencem ao mesmo cluster *egc*, localizado na ilha genômica Tipo II vSab (Wang et al., 2009). Veh et al. (2014) associaram o gene *seg* à uma redução na probabilidade da bactéria causar mastite persistente durante a lactação, em nosso estudo, apenas 4% dos isolados subclínicos apresentaram esse gene. O gene *seh* foi o mais encontrado entre os isolados, corroborando com os resultados de Liu et al., 2014 e, segundo esses autores, a SEH tem capacidade de causar apoptose em células de glândula mamária bovina.

O gene *pvl* vem sendo detectado em maior frequência nos últimos anos, em isolados de leite de vacas com mastite (Jia et al., 2020). Assim como outros superantígenos, o PVL pode causar apoptose em células do epitélio mamário (Liu et al., 2014). No presente estudo, o gene *pvl* esteve associado aos isolados subclínicos. Em queratócitos, o PVL não influenciou a severidade de infecção, mas as cepas produtoras de PVL podem escapar dos mecanismos de defesa do corpo, aumentando a proliferação de *S. aureus* no citoplasma (Chi et al., 2014).

A toxina da síndrome do choque tóxico é conhecida por atuar como um superantígeno, pois estimula a secreção de altos níveis de citocinas, contribuindo para reações inflamatórias na glândula mamária (Perez et al., 2020). Além disso, a associação com enterotoxinas pode contribuir para uma resposta inflamatória mais grave em bovinos (Cardoso et al., 2000). No presente estudo, o gene *tsst-1* esteve relacionado com isolados subclínicos, em conjunto com alguma enterotoxina, em 50% dos isolados. A baixa expressão de genes reguladores como o *agr*, influenciada por diversos fatores ambientais e interações genéticas está associada a uma perda substancial dos níveis de transcrição do *tsst-1* e enterotoxinas, levando, à baixa produção dessas toxinas (Castro et al., 2020; Andrey et al., 2015). E, em nosso estudo o gene *tsst-1* esteve relacionado com isolados *agr* negativos.

A capacidade de *S. aureus* invadir e sobreviver em células epiteliais mamárias influenciam as taxas de cura da doença, devido à evasão do sistema imune do hospedeiro e da ação de antibióticos, tornando a mastite uma infecção de difícil tratamento (Peton et al., 2014). Neste estudo, observou-se a presença de alguns dos genes das MSCRAMMs (*fnbA*, *fib*, *clfA*, *clfB*, *cna*) prevalentes nos isolados clínicos. O gene *cna* que esteve ausente nos isolados subclínicos, também foi encontrado em baixas porcentagens por Xu et al. (2015) (10,7%) e por Khoramian (2015) (15.6%).

O genoma de *S. aureus* apresenta muitos genes de virulência, mas tão importante quanto a presença desses genes é sua capacidade de expressão. Segundo Rossi et al. (2021) a maioria dos isolados clínicos pertenciam aos grupos *agrII* ou *agrIII* e esse *locus* é conhecido por regular negativamente a expressão de genes das MSCRAMMs (Yang et al., 2019) o que pode dificultar a internalização dessas bactérias, deixando-as expostas ao sistema imune do hospedeiro e, conseqüentemente, gerar respostas inflamatórias.

Os resultados mostraram que as taxas de adesão *in vitro* foram homogêneas entre os isolados, apesar da variação na presença dos genes das MSCRAMMs, demonstrando que não há uma proteína específica essencial a esse processo, pois pode haver uma sobreposição na ligação das MSCRAMMs em relação às proteínas do hospedeiro e assim, a ausência de uma proteína pode ser suprida por outra (Bartlett e Hulten, 2010; Foster et al., 2020).

Segundo Valle et al. (2012), a presença do gene *bap* parece reduzir a taxa de invasão dos isolados, fazendo com que as bactérias permaneçam aderidas na superfície das células hospedeiras, protegidas pelo biofilme. Em nosso estudo, a taxa de invasão foi

menor quando comparada a adesão, independente da presença do gene *bap*, mas todos os isolados foram considerados fortes produtores de biofilme (dados não mostrados).

A habilidade de *S. aureus* produzir biofilme também é uma importante ferramenta de colonização e persistência da bactéria no hospedeiro (Gomes et al., 2017). No presente estudo, todos os isolados foram capazes de produzir biofilme *in vitro*, não tendo sido encontrada relação estatística entre a produção de biofilme e os tipos de mastite. Isolados *icaA*⁺/*bap*⁻ foram os mais prevalentes, seguidos de isolados *icaA*⁻/*bap*⁻ e *icaA*⁺/*bap*⁺. Torres et al. (2019) analisaram 229 isolados de *S. aureus*, obtidas de infecções intramamárias e também encontraram como principal perfil isolados *icaA*⁺/*bap*⁻ (78,2%).

A presença do gene *icaA* foi associada aos isolados considerados fortes produtores de biofilme e *icaD*, pertencente ao mesmo *cluster*, esteve presente em quase todos os isolados. Ambos os genes, igualmente, têm sido responsabilizados pela produção de biofilme (Vancraeynest et al., 2004), embora segundo Arciola et al. (2001), somente a expressão do gene *icaA* já induz atividade enzimática suficiente para a conversão da PIA e a co-expressão de ambos os genes levaria à sua completa expressão fenotípica. Isolados MSSA estão mais ligados à produção de biofilmes polissacarídicos, envolvendo o *operon ica* (Fitzpatrick et al., 2005; Rohde et al., 2005; Kogan et al., 2006; O'Neill et al., 2007). De acordo, no presente trabalho, todas as cepas eram MSSA (dados não mostrados) e os principais genes envolvidos na síntese de biofilme foram os genes *icaD* e *icaA*.

Analisando os resultados de PFGE, um mesmo pulsotipo apresentou diferentes perfis de genes de enterotoxinas e de biofilme. Essa observação já havia sido relatada por Srinivasan et al. (2006), mostrando que o mesmo clone apresentava diversidade nos genes de virulência.

O PFGE revelou 72 pulsotipos e 32 clusters entre os 149 isolados analisados de 18 fazendas, Vaughn et al. (2020) encontraram 16 pulsotipos entre os 111 *S. aureus* distribuídos em 11 fazendas.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostraram que existem diferenças genômicas no potencial de virulência entre os isolados de *S. aureus*, obtidos de casos de mastite clínica e subclínica. Porém, mais importante que a presença desses genes e a variedade intrínseca entre esses isolados, o tipo de locus *agr* parece exercer um papel fundamental na expressão e repressão desses genes, impactando diretamente na gravidade da doença.

Ao contrário da maioria dos estudos nos quais a pequena variabilidade de clusters entre os isolados de *S. aureus* causadores de mastite, o resultado do PFGE mostrou uma grande ocorrência de diferentes pulsotipos. Além disso, essa técnica diferenciou de maneira clara, clusters causadores de mastite clínica e subclínica.

REFERÊNCIAS

- Andrey, D. O., A. Jousselin, M. Villanueva, A. Renzoni, A. Monod, C. Barras, N. Rodriguez, and W. Kelley. 2015. Impact of the regulators SigB, Rot, SarA and sarS on the toxic shock Tst promoter and TSST-1 expression in *Staphylococcus aureus*. PLoS One. 10:0135579. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135579>.
- Arciola C. R., L. Baldassarri, L. Montanaro. 2001. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter associated infections, J. Clin. Microbiol. 39:2151-2156. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.6.2151-2156.2001>.
- Bartlett A. H., K. G. Hulten. 2010. *Staphylococcus aureus* pathogenesis: secretion systems, adhesins, and invasins. Pediatr Infect Dis J.29(9):860. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e3181ef2477>.
- Cardoso H., L. Carmo, N. Silva. 2020. Detecção da toxina-1 da síndrome do choque tóxico em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. Arq Bras Med Vet Zootec. 52:07-10. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352000000100002>.
- Castilho, I. G., S. T. A. Dantas, H. Langoni, J. P. Araújo Jr, A. Fernandes Jr, F. C. Alvarenga, L. Maia, D. Q. Cagnini, V. L. M. Rall. 2017. Host-pathogen interactions in bovine mammary epithelial cells and HeLa cells by *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis. J. Dairy Sci. 100(8):6414-6421. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12700>.
- Castro, R. D., S. H. S. P. Pedroso, S. H. C. Sandes, G. O. Silva, K. C. M. Luiz, R. S. Dias, R. A. T. Filho, H. C. P. Figueiredo, S. G. Santos, A. C. Nunes, M. R. Souza. 2020. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from the production process of Minas artisanal cheese from the region of Campo das Vertentes, Brazil. J. Dairy Sci.103(3):2098-2110. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17138>.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention. 2011. Oxacillin resistant *Staphylococcus aureus* on PulseNet (OPN) laboratory protocol for molecular typing of *S. aureus* by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention.
- Chi, C. Y., C. C. Lin, I. C. Liao, Y. C. Yao, F. C. Shen, C. C. Liu, and C. F. Lin. 2014. Pantón-Valentine leukocidin facilitates the escape of *Staphylococcus aureus* from human keratinocyte endosomes and induces apoptosis. J. Infect. Dis. 209:224–235. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit445>.
- Cucarella, C., C. Colano, J. Valle, B. Amorena, I. Lasa, P. Penades. 2001. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. J. Bacteriol.183: 2888–2896. <https://doi.org/10.1128/JB.183.9.2888-2896.2001>.
- Cucarella, C., M. Á. Tormo, C. Ubeda, M. P. Trotonda, M. Monzón, C. Peris, B. Amorena, I. Lasa, J. R. Penadés. 2004. Role of biofilm-associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. Infect. Immun. 72(4):2177-2185. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.4.2177-2185.2004>.

- Darwish, S. F., H. A. Asfour. 2013. Investigation of biofilm forming ability in *Staphylococci* causing bovine mastitis using phenotypic and genotypic assays. *Sci. World J.* <http://dx.doi.org/10.1155/2013/378492>.
- Dhanawade, N. B., D. R. Kalorey, R. Srinivasan, S. B. Barbuddhe, N.V. Kurkure. 2010. Detection of intercellular adhesion genes and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Vet Res Commun* 34:81–89 34. <https://doi.org/10.1007/s11259-009-9326-0>.
- Fang, R., J., Cui, T. Cui, H. Guo, H. K. Ono, C. H. Park, M. Okamura, A. Nakane, D. L. Hu. 2019. Staphylococcal enterotoxin C is an important virulence factor for mastitis. *Toxins*. 11(3):141. <https://doi.org/10.3390/toxins11030141>.
- Fitzpatrick, F., H. Humphreys, J. P. O’Gara. 2005. Evidence for icaADBC independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 43:1973–1976. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.4.1973-1976.2005>
- Foster, C. E., M. Kok, A. R. Flores, C. G. Minard, R. A. Luna, L. B. Lamberth, S. L. Kaplan, K. G. Hulten. 2020. Adhesin genes and biofilm formation among pediatric *Staphylococcus aureus* isolates from implant-associated infections. *PloS one*. 15(6):0235115. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235115>.
- Haveri, M., A. Roslöf, L. Rantala, S. Pyörälä. 2007. Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. *J. Appl. Microbiol.*103(4):993-1000. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03356.x>.
- He, W., S. Ma, L. Lei, J. He, X. Li, J. Tao, X. Wang, S. Song, Y. Wang, J. Shen, C. Cai, C. Wu. 2020. Prevalence, etiology, and economic impact of clinical mastitis on large dairy farms in China. *Vet. Microbiol.* 242: 108570. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.108570>.
- Jia, F., W. Ma, X. Zhang, D. Wang, X. Zhou. 2020. Matrine and baicalin inhibit apoptosis induced by Pantone-Valentine leukocidin of *Staphylococcus aureus* in bovine mammary epithelial cells. *J. Dairy Sci.*103(3):2731-2742. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17619>.
- Johnson, W.M.; S.D. Tyler, F.E. Ewan, et al. 1991. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 29:426-430.
- Khoramian, B., F. Jabalameli, A. Niasari-Naslaji, M. Taherikalani, M. Emaneini. 2015. Comparison of virulence factors and biofilm formation among *Staphylococcus aureus* strains isolated from human and bovine infections. *Microb. Pathog.* 88:73-77. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.08.007>.
- Khoramrooz, S. S., F. Mansouri, M. Marashifard, S. A. A. M. Hosseini, F. A. Chenarestane-Olia, B. Ganavehei, F. Gharibpour, A. Shahbazi, M. Mirzaii, D. Darban-Sarokhalil. 2016. Detection of biofilm related genes, classical enterotoxin genes and agr typing among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine with subclinical mastitis in southwest of Iran. *Microb. Pathog.*97:45-51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2016.05.022>.

- Klein, R. C., M. H. Fabres-Klein, M. A. V. P. Brito, L. G. Fietto, and A. O. B. Ribon. 2012. *Staphylococcus aureus* of bovine origin: Genetic diversity, prevalence, and the expression of adhesin-encoding genes. *Vet. Microbiol.* 160:183–188. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.05.025>.
- Kogan, G., I. Sadovskaya, P. Chaignon, A. Chokr, S. Jabbouri. 2006. Biofilms of clinical strains of *Staphylococcus* that do not contain polysaccharide intercellular adhesin. *FEMS Microbiol Lett* 255:11–16. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2005.00043.x>.
- Liu, Y., W. Chen, T. Ali, R. Alkasir, J. Yin, G. Liu, B. Han. 2014. Staphylococcal enterotoxin H induced apoptosis of bovine mammary epithelial cells in vitro. *Toxins*. 6(12):3552–3567. <https://doi.org/10.3390/toxins6123552>.
- Mehrotra, M.; G. Wang, W.M. Johnson. 2000. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J. Clin. Microbiol.* 38:1032–1035. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.3.1032-1035.2000>.
- Melake, N. A., A. S. Zakaria, N. H. Ibrahim, M. A. Salama, A. Z. Mahmoud. 2014. Prevalence of agr specificity groups among in vitro biofilm forming methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from nasal carriers. *Int. J. Microbiol. Res.* 5:76–84. <https://doi.org/10.5829/idosi.ijmr.2014.5.2.83184>.
- Monistero, V., H. U. Graber, C. Pollera, P. Cremonesi, B. Castiglioni, E. Bottini, A. Ceballos-Marquez, L. Lasso-Rojas, V. Kroemker, N. Wente, I. M. Petzer, C. Santisteban, J. Runyan, M. V. Dos Santos, B. G. Alves, R. Piccinini, V. Bronzo, M. S. Abbassi, M. B. Said, P. Moroni. 2018. *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in eight countries: genotypes, detection of genes encoding different toxins and other virulence genes. *Toxins*. 10(6):247. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins10060247>.
- Nashev, D., K. Toshkova, S. Isrina, S. Salaisa, A. A. Hassan, C. Lammler, M. Zschock. 2004. Distribution of virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from stable nasal carriers. *FEMS Microbiol. Lett.* 233:45–52. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.01.032>.
- O'Neill, E, C. Pozzi, P. Houston, D. Smyth, H. Humphreys, D. A. Robinson, J.P. O'Gara. 2007. Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from devicerelated infections. *J Clin Microbiol* 45:1379–1388. <https://doi.org/10.1128/JCM.02280-06>.
- Omoe, K., M. Ishikama, Y. Shimoda, D. L. Hu, S. Ueda, K. Shinagawa. 2002. Detection of *seg*, *seh* and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolate harboring *seg*, *seh* or *sei* genes. *J. Clin. Microbiol.* 40:857–862.
- Pantoja, J. C. F., C. Hulland, P. L. Ruegg. 2009. Somatic cell count status across the dry period as a risk factor for the development of clinical mastitis in the subsequent lactation. *J. Dairy Sci.* 92: 139–148. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1477>.
- Pérez, V. K. C., G. M. Da Costa, A. S. Guimarães, M. B. Heinemann, A. P. Lage, E. M. S. Dorneles. 2020. Relationship between virulence factors and antimicrobial

resistance in *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. J. Glob. Antimicrob. Resist. 792-802. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.06.010>.

Peton, V., D. S. Bouchard, S. Almeida, L. Rault, H. Falentin, J. Jardin, G. Jan, D. Hernandez, P. François, J. Schrenzel, V. Azevedo, A. Miyoshi, N. Berkova, S. Even, Y. Le Loir. 2014. Fine-tuned characterization of *Staphylococcus aureus* Newbould 305, a strain associated with mild and chronic mastitis in bovines. Vet. Res. 45(1):1-15. <https://doi.org/10.1186/s13567-014-0106-7>.

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

Piechota, M., B. Kot, E. Zdunek, J. Mitrus, J. Wicha, M. K. Wolska, K. Sachanowicz. 2014. Distribution of classical enterotoxin genes in staphylococci from milk of cows with-and without mastitis and the cowshed environment. Pol J Vet Sci.17(3): <https://doi.org/10.2478/pjvs-2014-0058>.

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

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

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

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

Rohde, H., C. Burdelski, K. Bartscht, M. Hussain, F. Buck, M.A. Horstkotte, J.K. Knobloch, C. Heilmann, M. Herrmann, D. Mack. 2005. Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. Mol Microbiol 55:1883–1895. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04515.x>.

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

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

Rossi, B. F., E. C. R. Bonsaglia, I. G. Castilho, S. T. A. Dantas, A. Salina, H. Langoni, J. C. F. Pantoja, P. E. Budri, D. Fitzgerald-Hughes, A. Fernandes Júnior, V. L. M. Rall. 2019. Genotyping of long-term persistent *Staphylococcus aureus* in bovine

subclinical mastitis. *Microb. Pathog.* 132: 45-50.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.04.031>.

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

Shopsin, B., B. Mathema, P. Alcabes, B. Said-Salim, G. Lina, A. Mat1suka, J. Martinez, and B. N. Kreiswirth. 2003. Prevalence of agr specificity groups among *Staphylococcus aureus* strains colonizing children and their guardians. *J. Clin. Microbiol.* 41:456–459. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.1.456-459.2003>.

Srinivasan, V., A. A. Sawant, B. E. Gillespie, S. J. Headrick, L. Ceasar, S. P. Oliver. 2006. Prevalence of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolated from milk of cows with mastitis. *Foodborne Pathog. Dis.* 3(3): 274-283. <https://doi.org/10.1089/fpd.2006.3.274>.

Stepanović, S., D. Vuković, I. Dakić, B. Savić, M. Švabić-Vlahović. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Bacteriol.* 140(2):175-179. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00122-6).

Torres, G., K. Vargas, M. Sánchez-Jiménez, J. Reyes-Velez, M. Olivera-Angel. 2019. Genotypic and phenotypic characterization of biofilm production by *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine intramammary infections in colombian dairy farms. *Heliyon*. 5(10):02535.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02535>.

Tristan, A., L. Ying, M. Bes, J. Etienne, F. Vandenesch, and G. Lina. 2003. Use of multiplex PCR to identify *Staphylococcus aureus* adhesins involved in human hematogenous infections. *J. Clin. Microbiol.* 41:4465–4467.
<https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4465-4467.2003>.

Valle, J., C. Latasa, C. Gil, A. Toledo-Arana, C. Solano, J. R. Penadés; I. Lasa. 2012. Bap, a biofilm matrix protein of *Staphylococcus aureus* prevents cellular internalization through binding to GP96 host receptor. *PLoS Pathog.* 8 :e1002843
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002843>.

Vancraeynest, D., K. Hermans, F. Haesebrouck. 2004. Genotypic and phenotypic screening of high and low virulence *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits for biofilm formation and MSCRAMMs, *Vet. Microbiol.* 103:241-247.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.09.002>.

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

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

Veh, K. A., R. C. Klein, C. Ster, G. Keefe, P. Lacasse, D. Scholl, J. P. Roy, D. Haine, S. Dufour, B. G. Talbot, A. O. Ribon, F. Malouin. 2014. Genotypic and phenotypic

1401 characterization of *Staphylococcus aureus* causing persistent and nonpersistent
 1402 subclinical bovine intramammary infections during lactation or the dry period. J.
 1403 Dairy Sci.98:155–168. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8044>.
 1404 Yang, X., F. Dong, S. Qian, L. Wang, Y. Liu, K. Yao, W. Song, J. Zhen, W. Zhou, H.
 1405 Xu, H. Zheng. 2019. Accessory gene regulator (agr) dysfunction was unusual in
 1406 *Staphylococcus aureus* isolated from Chinese children. BMC Microbiol. 19:95.
 1407 <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1465-z>.
 1408 Zayda, M. G., Y. Masuda, A. M. Hammad, K. I. Honjoh, A. M. Elbagory, T. Miyamoto.
 1409 2020. Molecular characterisation of methicillin-resistant (MRSA) and methicillin-
 1410 susceptible (MSSA) *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical
 1411 mastitis and Egyptian raw milk cheese. Int. Dairy J. 104:104646.
 1412 <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104646>.
 1413 Zmantar, T., K. Chaieb, H. Makni, H. Miladi, F. B. Abdallah, K. Mahdouani, A.
 1414 Bakhrouf. 2008. Detection by PCR of adhesins genes and slime production in
 1415 clinical *Staphylococcus aureus*. J. Basic Microbiol. 48(4):308-314.
 1416 <https://doi.org/10.1002/jobm.200700289>.

CAPITULO 2: Short Communication: Association between the accessory gene regulator (*agr*) group and the severity of bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus*

Bruna F. Rossi*, Erika C.R. Bonsaglia*, Jose C.F. Pantoja†, Marcos V. Santos‡, Juliano L. Goncalves‡; Ary Fernandes Júnior*; Vera. L. M. Rall^{1*}

*Department of Chemical and Biological Sciences, Institute of Biosciences, São Paulo State University, Rua Dr. Plínio Pinto e Silva, s/n. Zip Code 18618-691. Botucatu-SP, Brazil.

†Department of Animal Production and Preventive Veterinary Medicine, São Paulo State University, Rua Prof. Dr. Walter Mauricio Correa s/n. Zip Code 18618-681. Botucatu-SP, Brazil.

‡Department of Animal Nutrition and Production, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, Avenida Duque de Caxias Norte, 225. Zip Code 13635-900. Pirassununga, São Paulo, Brazil.

Artigo publicado em **Journal of Dairy Science**.

Received July 12, 2020.

Accepted October 15, 2020.

DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19275>

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

ABSTRACT

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) can elicit mild to more severe degrees of mastitis in cattle, depending on the response of the host's immune system and the virulence factors of the specific strains, and several of them are controlled by a global regulatory system, designated accessory gene regulator (*agr*). Thus, the objective was to examine the associations between different capsular and *agr* types and the severity of bovine mastitis caused by *S. aureus*. All strains were isolated from bovine subclinical (n = 50), mild clinical (n = 73), and moderate clinical mastitis cases (n = 28). Isolates containing the *agrI* gene and lacking the *agr* locus (*agr*⁻) were more prevalent among subclinical than in clinical mastitis cases, whereas isolates containing the *agrII* and *agrIII* genes were more prevalent among clinical mastitis cases. The capsular types 5 (*cap5*) and 8 (*cap8*) were found in 42% and 44% of the strains isolated from subclinical cases and in 38.6% and 58.4% of those isolated from clinical mastitis cases. Capsular type was not associated with type of mastitis (subclinical, mild clinical or moderate clinical). We found a strong association between *agr* type and type of mastitis, suggesting that the knowledge of *S. aureus* genetic profiles could be an additional tool to control this disease.

Keywords: capsule; immune system;

Short Communication

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) is one of the main pathogens causing contagious bovine mastitis (Bonsaglia et al., 2018), being frequently isolated in subclinical (Rossi et al., 2019) and clinical cases (He et al., 2020). The ability of *S. aureus* to cause a wide variety of clinical and subclinical manifestations depends partly on the expression of various virulence factors, acting together, and providing resistance to the immune system, allowing adaptation of the pathogen to the host immune system. As a result, the genetic diversity of *S. aureus* isolates influences the development of diseases in human hosts and animals (Tuchscher et al., 2007).

Accessory gene regulator (*agr*) is a major regulatory system for the gene expression of virulence factors of *S. aureus*, being 23 known virulence factors out of more than 70 genes regulated in response to *agr* activation (George and Muir, 2000). Cell wall-associated factors and regulation of exoprotein secretion are the two main classes of virulence factor have been associated to the *agr* response which occur during the post-exponential growth phase (Buzzola et al., 2007). The first class of virulence factors promotes the host attachment facilitating the evasion of the immune system. The second positively regulate the expression of the production of polysaccharide capsules and extracellular toxins (such as hemolysins, enterotoxins, and extracellular proteases), including degradative enzymes that promote invasion and toxins that cause disease (Yang et al., 2019).

A set of phenotypic and genotypic characteristics of *S. aureus* are associated with long-term persistence in the bovine mammary gland, including the ability to survive intracellularly, the production of capsular polysaccharides and the *agr* type of each strain (Sacco et al., 2020). The *agr* system is associated with quorum-sensing and this locus is composed of two operons, one of them controlled by the P2 promoter, which presents the *agrA*, *agrB*, *agrC* and *agrD* genes, and the polymorphism of the amino acid sequence of these genes (except *agrA*) forms the group *agrI*, *agrII*, *agrIII*, *agrIV* (Cheraghi et al., 2017). *S. aureus agrI* strains show better adaptation to intracellular survival, leading the bacteria to persist in the host for a longer period like what happen in subclinical cases, whereas the *agrII* and *agrIII* groups have been associated with clinical isolates (Buzzola et al., 2007).

The polysaccharide capsule (PC) plays an important role in mastitis because it inhibits phagocytosis (Tuchscher et al., 2007) by polymorphonuclear neutrophils

(PMN), which are considered the main line of defense of the mammary gland against invading pathogens (Ambroggio et al., 2018). The serotypes 5 (PC5) and 8 (PC8) are the most prevalent in bovine infection isolates (Salimena et al., 2016). On the other hand, despite isolates that do not have PC5 or PC8 are considered non-typable (NT) (Ambroggio et al., 2018), these capsule negative strains have been associated with the persistence of *S. aureus* in the host (Sacco et al., 2020). To our knowledge, no previous studies evaluated the association between the genetic variability in relation to capsular and *agr* types of *S. aureus* and the severity of the clinical or subclinical manifestation of bovine mastitis. Therefore, we hypothesize that the genetic variability in relation to capsular and *agr* types of *S. aureus* is associated with the severity of the clinical or subclinical manifestation of bovine mastitis.

One hundred and fifty-one convenience isolates of *S. aureus* involved in subclinical mastitis (n = 50; 33.1%; geometric mean of SCC = 683,000 cells/mL SE $\pm$ 360.3), mild clinical mastitis (n = 73; 48.3%), and moderate clinical mastitis (n = 28; 18.5%) were randomly selected from a total of 426 isolates of *S. aureus* obtained from mammary quarter milk samples of two previous cross-sectional studies conducted on seven and 13 dairy farms in Brazil (data not shown). In the present study, the 20 herds analyzed represented a 58.5% of *S. aureus* isolated from milk sampling fraction, and one to twenty-five isolates from each herd were identified at the species level. This study was approved by the UNESP's Animal Use Ethics Committee (N 0136/2017).

Subclinical mastitis was diagnosed when cows had no physical symptoms or macroscopic changes in milk, using the California Mastitis Test (CMT) (Schalm and Noorlander, 1957) and the somatic cell count, by flow cytometry (Somacount 300 Instrument, Bentley Instruments, Chaska, MN), using a threshold of 200,000 cells/mL (Pantoja et al., 2019). Clinical mastitis was characterized by visible abnormalities in the milk and/or the udder and the culture positive results for *S. aureus*. The most obvious abnormalities in the milk are flakes, clots, and a water appearance. Possible abnormalities associated with the udder are heat, swelling, and sensitivity to touch. Severity of clinical mastitis was classified as grade 1 (mild), when cows had only visible changes in milk; grade 2 (moderate) when there was abnormal milk appearance and udder abnormalities; or grade 3 (severe) when cows exhibited all aforementioned abnormalities accompanied by systemic signs of illness (Pinzón-Sánchez and Ruegg, 2011).

For Polymerase Chain Reaction (PCR) assay, the bacterial DNA was extracted using the Illustra Bacteria Mini Spin Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) according to the manufacturer's instructions. The nuclease gene (*nuc*) was amplified to reconfirm the species (CRL, 2009).

All isolates were tested for *agr* (*agrI* -IV) (Shopsin et al., 2003) and capsular typing (*cap5* and *cap8*) (Ote et al., 2011) (Primers, their characteristics, positive controls strains and references are in Supplementary Table 1).

For statistical analyses, cross tabulations (PROC FREQ; SAS Institute, Cary, NC, USA) were used to describe the overall prevalence of each studied gene among the types of mastitis (subclinical, mild clinical, moderate clinical or severe clinical). Only two *S. aureus* isolates causing severe clinical mastitis were observed. Therefore, they were not included in the analyses due to the lack of a statistically significant number. Logistic regression (PROG LOGISTIC, SAS Institute) models were used to estimate the odds of a *S. aureus* isolate being positive for each studied gene, between the types of mastitis. The odds ratios are presented with respective 95% confidence intervals (CI). A Chi-square test was used to assess the association between the *agr* and capsular types. Statistical significance was declared for $P < 0.05$.

Thus, all 151 isolates of *S. aureus* were reconfirmed as *S. aureus* due to the presence of the *nuc* gene. As detailed in Table 1, the absence of the *agr* locus (*agr*⁻) was observed in 54% of the strains isolated from subclinical mastitis and in 7.9% of those from clinical mastitis ($P < 0.0001$). We found *agrI* in 36% of subclinical mastitis and 5% of clinical cases. Conversely, *agrIII* was more prevalent in clinical mastitis (48.5%) than in subclinical cases (10%). Accordingly, *agrII* was found in 38.6% of the clinical forms and it was absent in the subclinical ones. We did not find strains belonging to the *agrIV* group.

Table 1. Odds of identifying each capsular type and the *agr* group according to clinical and subclinical mastitis caused by *S. aureus*.

Gene	SBM % (n)	CM% (n)	OR	(95% CI)	<i>P-value</i>
<i>cap5</i>	42 (21/50)	38.6 (39/101)	1.15	0.57-2.31	0.6897
<i>cap8</i>	44 (22/50)	58.4 (59/101)	0.55	0.28-1.11	0.0982
<i>agrI</i>	36 (18/50)	5 (5/101)	10.75	3.67-31.25	<0.0001
<i>agrII</i>	-	38.6 (39/101)	-	-	-
<i>agrIII</i>	10 (5/50)	48.5 (49/101)	0.11	0.04-0.32	<0.0001
<i>agr</i> ⁻	54 (27/50)	7.9 (8/101)	13.69	5.43-34.48	<0.0001

SBM: subclinical mastitis; CM: clinical mastitis; OR: odds ratio. Odds of identifying each gene between subclinical and clinical (referent) mastitis isolates; CI: *confidence interval*; *P-value* derived from *logistic regression models*. (-) not occurred.

In the same table, we can notice that the *agrI* gene was 10.75 times more likely to be identified among strains isolated from subclinical mastitis than those isolated from clinical mastitis. In contrast, the *agr* types II and III were more prevalent among clinical isolates, as compared with subclinical isolates ($p < 0.0001$) (Tables 1 and 2). There were no *agr*⁻ isolates associated with moderate clinical cases (Table 2). The chances of identifying an *agr*⁻ isolate were 13.69 times greater for subclinical than for clinical isolates (Table 1).

1570

1571 Table 2. Prevalence of each capsular type and the *agr* group
 1572 according to mastitis type (subclinical, mild clinical, or
 1573 moderate clinical) caused by *S. aureus*.

Gene	Clinical		Subclinical
	Mild	Moderate	
	% (n)	% (n)	% (n)
<i>cap5</i>	37 (27/73)	42.9 (12/28)	42 (21/50)
<i>cap8</i>	58.9 (43/73)	57.1 (16/28)	44 (22/50)
<i>agrI</i>	4.1 (3/73)	7.1 (2/28)	36 (18/50)
<i>agrII</i>	35.6 (26/73)	46.4 (13/28)	-
<i>agrIII</i>	49.3 (36/73)	46.4 (13/28)	10 (5/50)
<i>agr⁻</i>	10.9 (8/73)	-	54 (27/50)

1574 (-) not occurred.

1575

1576 Regarding the severity of clinical mastitis, the *agrI* gene was 13.16 and 7.29 times
 1577 more likely to be identified among strains isolated from subclinical mastitis, than among
 1578 those isolated from mild or moderate clinical mastitis, respectively. An *agr⁻* strain was
 1579 9.52 times more likely to be isolated from subclinical mastitis cases, than from mild
 1580 clinical mastitis cases (Table 3).

Table 3. Chances of identifying each capsular type and *agr* group between the types of mastitis (subclinical, mild clinical, and moderate clinical) caused by *S. aureus*.

Mastitis type		Mastitis type	Gene	OR	(95% CI)	<i>P</i> -value
Moderate	vs. Mild		<i>cap5</i>	1.27	0.52-3.12	0.7984
Subclinical	vs. mild		<i>cap5</i>	1.23	0.58-2.59	0.7984
Subclinical	vs. moderate		<i>cap5</i>	0.96	0.37-2.48	0.7984
Moderate	vs. mild		<i>cap8</i>	0.93	0.38-2.26	0.2506
Subclinical	vs. mild		<i>cap8</i>	0.54	0.26-1.14	0.2506
Subclinical	vs. moderate		<i>cap8</i>	0.58	0.22-1.51	0.2506
Moderate	vs. mild		<i>AgrI</i>	1.79	0.27-11.49	<0.0001
Subclinical	vs. mild		<i>AgrI</i>	13.16	3.57-47.62	<0.0001
Subclinical	vs. moderate		<i>AgrI</i>	7.29	1.53-34.48	<0.0001
Moderate	vs. mild		<i>agrII</i>	1.45	0.64-3.83	0.3219
Subclinical	vs. mild		<i>agrII</i>	-	-	-
Subclinical	vs. moderate		<i>agrII</i>	-	-	-
Moderate	vs. mild		<i>agrIII</i>	0.89	0.36-2.14	0.0003
Subclinical	vs. mild		<i>agrIII</i>	0.11	0.04-0.32	0.0003
Subclinical	vs. moderate		<i>agrIII</i>	0.12	0.03-0.42	0.0003
Moderate	vs. mild		<i>agr⁻</i>	-	-	-
Subclinical	vs. mild		<i>agr⁻</i>	9.52	3.77-24.39	<0.0001
Subclinical	vs. moderate		<i>agr⁻</i>	-	-	-

OR: odds ratio; vs: versus. Odds of identifying each gene among mastitis types (subclinical, mild clinical, and moderate clinical); CI: *confidence interval*; *P*-value derived from logistic regression models. (-) not occurred.

Capsular types 5 (*cap5*) and 8 (*cap8*) were found, respectively, in 42% (21/50) and 44% (22/50) of subclinical mastitis and in 38.6% (39/101) and 58.4% (59/101) of clinical cases (Table 1). Only 6.6% (10/151) were non-typable for both capsules.

There was no statistical association between capsular type and type of mastitis (Tables 1 and 2), but isolates of *cap8* prevailed in the different forms of the disease

(Table 2). The *agrII* gene was more prevalent among *cap5* isolates ($p < 0.0001$), while *agr* types I and III were both more prevalent among *cap8* isolates (Table 4). The *agr*⁻ isolates were associated with the absence of *cap8* ($p < 0.0001$), which may or may not be present in *cap5* isolates ($p = 0.0014$) (Table 4). In addition, all 10 (6.6) NT isolates were *agr*⁻.

Table 4. *Agr* typing of *S. aureus* isolated from milk of cows with mastitis in relation to capsular typing.

Gene	<i>cap5</i>			<i>cap8</i>		
	Absence	Presence	<i>P</i> -value ²	Absence	Presence	<i>P</i> -value ²
	% ¹ (n)	% (n)		% (n)	% (n)	
<i>agrI</i>	22 (20/91)	5 (3/60)	0.0045	4.3 (3/70)	24.7 (20/81)	0.0005
<i>agrII</i>	5.5 (5/91)	56.7 (34/60)	<0.0001	48.6 (34/70)	6.2 (5/81)	<0.0001
<i>agrIII</i>	58.2 (53/91)	1.7 (1/60)	<0.0001	1.4 (1/70)	65.4 (53/81)	<0.0001
<i>agr</i> ⁻	14.3 (13/91)	36.7 (22/60)	0.0014	45.7 (32/70)	3.7 (3/81)	<0.0001

¹% indicate prevalence of each *agr* gene between *cap*⁺ and *cap*⁻ isolates. ² *P*-value derived from the Chi-square test to compare the prevalence of each *agr* gene between *cap*⁺ and *cap*⁻ isolates

In the present study, 54% of the subclinical isolates were *agr*⁻ and according to Yang et al. (2019), the *agr* group negatively regulates the expression of proteins associated with cell surfaces, such as the Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMMs) decreasing or inhibiting cell internalization, demonstrating that the absence of this regulation contributes to cell invasion, far from the immune system, and causes no symptoms.

Considering the subclinical isolates, 90% were *agrI* or *agr*⁻. Some authors have shown that *agr*⁻ isolates persist or coexist with *agr* positive isolates in an infection where *agr*⁻ isolates benefit from enzymes and proteins mediating virulence factors produced by *agr* positive strains. Likewise, *agr* positive strains benefit from the adhesion and initial colonization of *agr*⁻ isolates (Thompson and Brown, 2017). The prevalence of *S. aureus agrI* in subclinical isolates has been reported by Rossi et al. (2019) and according to Melchior et al. (2009), *agrI* strains show better adaptation to intracellular survival, leading the bacteria to persist in the host for a longer period,

without symptoms of inflammation or apparent infection, in addition to limiting the action of antibiotics (Buzzola, et al., 2007).

The *agrI* was found in only 3.3% (5/141) of clinical isolates and *agr*⁻ in 11% (8/101) reinforcing the strong relationship of both types to subclinical isolates. The *agrII* and *agrIII* groups, present in most clinical isolates (87%), remain in the extracellular environment, being more susceptible to the host's immune system (Buzzola et al., 2007), generating an inflammatory response and apparent infection, signs that characterize clinical mastitis. Buzzola et al. (2007) showed that *agrI* isolates (encapsulated or non-encapsulated) were internalized in MAC-T cells, with significantly higher rates than *agrII*, *agrIII* and *agrIV* isolates.

We did not find a relationship between capsular type and type of mastitis. Only 10 isolates were non-typable for both capsular types, the majority being subclinical isolates (7/10). *S. aureus* capsule negative has been shown to induce chronic experimental mastitis in mice, suggesting that loss of CP expression may improve the persistence of *S. aureus* in the host (Sacco et al., 2020). Bardiau et al. (2016) demonstrated that *cap5/agrI* isolates were better adapted in an intracellular environment, so they could be associated with chronic mastitis. However, in our study, all subclinical *cap5* isolates were *agr*⁻, indicating that the absence of *agr* locus may have decreased or inhibited the expression of the capsule, favoring cell invasion and persistence of *S. aureus* (Ambroggio et al., 2018). In addition, 81.8% (18/22) of the subclinical *cap8* isolates were *agrI*; Sacco et al. (2020) observed that *cap8/agrI* isolates showed a significantly greater capacity to adhere and internalize in MAC-T cells. It can thus be suggested that intracellular survival may be independent of the capsular type and, among other factors, be controlled by the *agr* group.

Further research should be undertaken to investigate additional phenotypic analysis, such as: capsule expression, quorum sensing, adhesive factor expression, cellular uptake; or regulatory RNA transcript analysis; or the presence of specific virulence factors (e.g. *pvl*, *tsst*, *eta*, or *etb*). Additionally, we recommend further study with more focus on severe clinical mastitis since we obtained only two isolates (both *agr III*). For that reason, it is noteworthy that factors as a sample size of severe clinical mastitis caused by *S. aureus* and the lack of investigation of other specific virulence factors may be considered as our limitations.

Taken together, the severity of bovine mastitis is determined by interactions between the pathogen and the host, but each element's real contribution to the generation of different levels of disease severity has not yet been elucidated, and clearly, the *agr* type or its absence plays an important role in this scenario.

ACKNOWLEDGMENT

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)- Finance Code 001 and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 302383/2018-2).

REFERENCES

- Ambroggio, M. B., M. S. Perrig, C. Camussone, N. Pujato, A. Bertón, E. Giannechini, S. Alvarez, I. S. Marcipar, L. C. Calvino, M. S. Barbagelata. 2018. Survey of potential factors involved in the low frequency of CP5 and CP8 expression in *Staphylococcus aureus* isolates from mastitis of dairy cattle from Argentina, Chile, and Uruguay. J. Appl. Genet. 59(3): 357-363. <https://doi.org/10.1007/s13353-018-0443-8>.
- Bardiau, M., J. Caplin, J. Detilleux, H. Graber, P. Moroni, B. Taminiau, J. G. Mainil. 2016. Existence of two groups of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis based on biofilm formation, intracellular survival, capsular profile and *agr*-typing. Vet. Microbiol. 185: 1-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.01.003>.
- Bonsaglia, E. C. R., N. C. C. Silva, B. F. Rossi, C. H. Camargo, S. T. A. Dantas, H. Langoni, F. F. Guimarães, J. R. Fitzgerald, A. Fernandes Júnior, V. L. M. Rall. 2018. Molecular epidemiology of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) isolated from milk of cows with subclinical mastitis. Microb. Pathog. 124: 130-135. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.031>.
- Buzzola, F. R., L. P. Alvarez, L. P. Tuchscher, M. S. Barbagelata, S. M. Lattar, L. Calvino, D. O. Sordelli. 2007. Differential abilities of capsulated and noncapsulated *Staphylococcus aureus* isolates from diverse *agr* groups to invade mammary epithelial cells. Infect. Immun. 75(2): 886-891. <https://doi.org/10.1128/iai.01215-06>.
- Cheraghi, S., L. Pourgholi, M. Shafaati, S. H. Fesharaki, A. Jalali, R. Nosrati, M. A. Boroumand. 2017. Analysis of virulence genes and accessory gene regulator (*agr*) types among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in Iran. J. Glob. Antimicrob. Resist. 10: 315-320. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2017.06.009>.
- CRL-AR, Community Reference Laboratory for Antimicrobial Resistance., 2009. Multiplex PCR for the Detection of the *mecA* gene and the identification of

Staphylococcus aureus. National Food Institute. Technical University of Denmark, Copenhagen, Denmark.

George, E. A., Muir, T. W. 2000. Molecular mechanisms of *agr* quorum sensing in virulent staphylococci. *Chembiochem.* 8 (8): 847- 855. <https://doi.org/10.1002/cbic.200700023>.

He, W., S. Ma, L. Lei, J. He, X. Li, J. Tao, X. Wang, S. Song, Y. Wang, J. Shen, C. Cai, C. Wu. 2020. Prevalence, etiology, and economic impact of clinical mastitis on large dairy farms in China. *Vet. Microbiol.* 242: 108570. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.108570>.

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

NMC, National Mastitis Council. Guidelines on normal and abnormal raw milk based on somatic cell counts and signs of clinical mastitis. 2001. Accessed Dez. 10, 2019. <http://www.nmconline.org/wp-content/uploads/2016/09/Guidelines-on-Normal-and-Abnormal-Raw-Milk.pdf>.

Pantoja, J. C. F., C. Hulland, P. L. Ruegg. 2009. Somatic cell count status across the dry period as a risk factor for the development of clinical mastitis in the subsequent lactation. *J. Dairy Sci.* 92: 139–148. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1477>.

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

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

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

Schalm, O. W., D. O. Noorlander. 1957. Experimental and observation leading to development of California mastitis test. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 130: 199–204.

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

Thompson, T. A., P. D. Brown. 2017. Association between the *agr* locus and the presence of virulence genes and pathogenesis in *Staphylococcus aureus* using a

1730 Caenorhabditis elegans model. Int. J. Infect. Dis. 54: 72-76.
1731 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2016.11.411>.
1732 Tuchscher, L. P., M. I. Gomez, F. R. Buzzola, L. F. Calvinho, J. C. Lee, D. O. Sordelli.
1733 2007. Characterization of a new variant of IS257 that has displaced the capsule
1734 genes within bovine isolates of *Staphylococcus aureus*. Infect. Immun. 75(11):
1735 5483-5488. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.00747-07>.
1736

Supplementary Table 1. Primers and their characteristics used for the classification of *agr* types in *Staphylococcus aureus* isolates obtained from milk of cows with clinical mastitis.

<i>gene</i>	Sequence 5' → 3'	Bp	Positive control
<i>agrI</i>	GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT	440 ¹	RN 6390
<i>agrII</i>	GTATTACTAATTGAAAAGTGCCATAGC	572 ¹	RN 6607
<i>agrIII</i>	CTGTTGAAAAAGTCAACTAAAAGCTC	406 ¹	RN 8462
<i>agrIV</i>	CGATAATGCCGTAATACCCG	588 ³	Sequenced isolate ³
<i>cap5H</i>	TGAGGATAGCGATTGAAAA	518 ²	ATCC N315
<i>cap8H</i>	ATCGAAGAACATATCCAAGG	834 ²	ATCC MW2

Bp: base pair

References

- ¹ Shopsisin B., B. Mathema, P. Alcabes, B. Said-Salim, G. Lina, A. Matsuka, J. Martinez, B. N. Kreiswirth. 2003. Prevalence of *agr* specificity groups among *Staphylococcus aureus* strains colonizing children and their guardians. J. Clin. Microbiol. 41: 456-459. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.1.456-459.2003>.
- ² Ote, I., B. Taminiau, J. N. Duprez, I. Dizier, J. G. Mainil. 2011. Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. Vet. Microbiol. 153(3-4): 285-292. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.05.042>.
- ³ Kroning, I. S., M. A. Iglesias, K. S. Mendonca, G. V. Lopes, W. P. Silva. 2018. Presence of Classical Enterotoxin Genes, *agr* Typing, Antimicrobial Resistance, and Genetic Diversity of *Staphylococcus aureus* from Milk of Cows with Mastitis in Southern Brazil. J. Food Prot. 81(5): 738-742. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-436>.