



JULIANA ROSA DA SILVA

**DIVERSIDADE GENÉTICA E CARACTERIZAÇÃO DA
VIRULÊNCIA EM *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE
MASTITE EM REBANHOS BOVINOS BRASILEIROS**

LAVRAS - MG

2019

JULIANA ROSA DA SILVA

**DIVERSIDADE GENÉTICA E CARACTERIZAÇÃO DA VIRULÊNCIA EM
Staphylococcus aureus ISOLADOS DE MASTITE EM REBANHOS BOVINOS
BRASILEIROS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Doutora.

Orientador
Dr. Geraldo Márcio da Costa
Co-orientador
Dr. João Batista Ribeiro

LAVRAS - MG

2019

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Silva, Juliana Rosa da.

Diversidade genética e caracterização da virulência em
Staphylococcus aureus isolados de mastite em rebanhos bovinos
brasileiros / Juliana Rosa da Silva. - 2019.

130 p. : il.

Orientador(a): Geraldo Márcio da Costa.

Coorientador(a): João Batista Ribeiro.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Genotipagem. 2. Fenotipagem. 3. *Galleria mellonella*. I. da
Costa, Geraldo Márcio. II. Ribeiro, João Batista. III. Título.

JULIANA ROSA DA SILVA

**DIVERSIDADE GENÉTICA E CARACTERIZAÇÃO DA VIRULÊNCIA EM
Staphylococcus aureus ISOLADOS DE MASTITE EM REBANHOS BOVINOS
BRASILEIROS**

**GENETIC DIVERSITY AND CHARACTERIZATION OF VIRULENCE IN
Staphylococcus aureus STRAINS ISOLATED FROM MASTITIS IN BRAZILIAN
BOVINE HERDS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 07 de fevereiro de 2019

Dra. Ana Paula Peconick	UFLA
Dra. Elaine Maria Seles Dorneles	UFLA
Dr. João Batista Ribeiro	EMBRAPA
Dra. Monalessa Fábria Pereira	UFES

Dr. Geraldo Márcio da Costa
Orientador

LAVRAS - MG

2019

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar, permitindo a conclusão de mais esta etapa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – UFLA, pela oportunidade de realizar este curso.

À EMBRAPA CNPGL, pela oportunidade de realização dos experimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida e pelo financiamento ao projeto.

Ao meu orientador Dr. Geraldo Márcio da Costa, pela orientação, paciência, conselhos e tantos ensinamentos transmitidos durante todo nosso convívio.

Ao meu co-orientador Dr. João Batista Ribeiro, por me acolher na EMBRAPA, por ser tão compreensivo, por apoiar minhas decisões e por tantos ensinamentos.

À banca examinadora, por aceitar o convite e colaborar com o trabalho.

À Maysa, por toda ajuda, pelas distrações após o trabalho sempre acompanhadas de alguma *gordice* e pela grande amizade.

À Dircéia, pela amizade, pelos muitos conselhos que sempre chegam na hora e que mesmo longe sempre pude contar.

Aos demais colegas de trabalho, por compartilharem tantos momentos especiais e colecionar histórias.

À minha prima, Priscila, pela enorme amizade e companheirismo, sempre disposta a ajudar.

Aos meus pais que nunca mediram esforços para me ajudar, sempre me apoiaram e sempre aplaudiram minhas conquistas.

Às minhas irmãs, que posso contar sempre e torcem pelo meu sucesso.

Aos meus sobrinhos, Hugo e Duda, por encherem meus dias de alegria.

Ao meu marido, pelo amor, paciência, carinho e compreensão, sempre entendendo a falta de tempo e não medindo esforços para me ajudar.

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

MUITO OBRIGADA!

“O sucesso nasce do querer. Sempre que o homem aplicar a determinação e a persistência para um objetivo, ele vencerá os obstáculos, e se não atingir o alvo, pelo menos fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

A mastite bovina é a doença de maior impacto econômico para a bovinocultura leiteira em todos os continentes e *Staphylococcus aureus* é um de seus principais agentes etiológicos. Este patógeno possui uma variedade de fatores de virulência que levam a mastite clínica ou subclínica e infecções intramamárias crônicas de difícil tratamento. Além da mastite, este agente é responsável por outras enfermidades nos animais e no homem, tais como, endocardites, osteomielites e septicemia, sendo bastante importante para a saúde pública. Os objetivos desse trabalho foram realizar a caracterização fenotípica, usando como modelo experimental larvas de *Galleria mellonella*, e genotípica, pelas técnicas de *Pulsed-field Gel Electrophoresis* (PFGE), *Multiple locus VNTR fingerprinting* (MLVF) e prospecção de genes de virulência codificadores de adesinas e toxinas em duas populações de *S. aureus* provenientes de mastite bovina, isolados entre os anos de 1994 e 2014, sendo uma restrita ao Estado de Minas Gerais, contendo isolados de origem clínica e subclínica, e outra contendo isolados de mastite subclínica de rebanhos de sete estados brasileiros. Os resultados das análises fenotípicas mostraram que larvas de *G. mellonella* constituem um modelo prático e eficiente para avaliar fenótipos de virulência em isolados de *S. aureus* provenientes de mastite bovina, permitindo a distinção de isolados mais e menos virulentos. A infecção experimental em *G. mellonella* demonstrou que os isolados provenientes de mastite subclínica foram, em geral, mais virulentos. As técnicas de genotipagem utilizadas se mostraram efetivas para caracterização de *S. aureus* e apontaram a existência de tipos genéticos predominantes amplamente disseminados entre diferentes rebanhos. Embora a PFGE tenha sido ligeiramente mais discriminatória, a MLVF também se confirmou como uma boa técnica de tipagem, permitindo um agrupamento que refletia parcialmente o agrupamento demonstrado pela PFGE. A MLVF, com um nível de similaridade de 80%, apresentou um *cluster* com predomínio de amostras clínicas e outro com amostras subclínicas em predominância. O conjunto de genes de virulência que codificam os fatores de aglutinação (*ClfA* e *ClfB*), a proteína de ligação à fibronectina (*FnBPA*), as toxinas (*Hla*, *Hlb* e *Luk-ED*), a proteína de ligação a elastina (*Ebps*) e a proteína de ligação ao colágeno (*Cna*) foi amplamente presente na população de isolados de mastite subclínica provenientes de sete estados brasileiros sendo que a frequência desses genes variou de 58 a 97,7%. Os resultados demonstraram que esse conjunto de proteínas deve ser melhor avaliado e pode ser promissor como um conjunto de antígenos para constituir novas vacinas para prevenção da mastite causada por *S. aureus* em rebanhos bovinos brasileiros. Em conclusão, este trabalho contribuiu para o entendimento da epidemiologia da mastite bovina no Brasil, demonstrando a grande diversidade genética dos isolados que causam mastite no país, porém, com predomínio de linhagens especializadas que devem ser mais bem estudadas para o desenvolvimento de novas formas de controle e prevenção desta doença.

Palavras-chave: Genotipagem. Fenotipagem. *Galleria mellonella*. PFGE. MLVF.

ABSTRACT

The bovine mastitis is the disease of greatest economic impact for dairy herds worldwide and *Staphylococcus aureus* is one of its main etiological agents. This pathogen has a variety of virulence factors that lead to clinical or subclinical mastitis, and chronic intramammary infections of difficult treatment. In addition to mastitis, this agent is responsible for other diseases in animals and man, such as endocarditis, osteomyelitis and septicemia, being quite important for public health. The objectives of this work were to accomplish the phenotypic characterization, using the experimental model of *Galleria mellonella* larvae and genotypic using the Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE), Multiple Locus VNTR fingerprinting (MLVF) and prospect of virulence genes encoding adhesins and toxins in two populations of *S. aureus* from bovine mastitis, isolated between 1994 and 2014, being one restricted to the State of Minas Gerais, containing isolates of clinical and subclinical origin and one containing subclinical mastitis isolates from herds of seven Brazilian states. The results of the phenotypic analyzes showed that *G. mellonella* larvae constitute a practical and efficient model to evaluate virulence phenotypes in *S. aureus* isolates from bovine mastitis, allowing the distinction of more and less virulent isolates. The experimental infection in *G. mellonella* showed the predominance of more virulent strains among those coming from subclinical mastitis. The genotyping techniques used were effective for the characterization of *S. aureus* and indicated the existence of predominant genetic types widely disseminated among different herds. Although PFGE was slightly more discriminatory, MLVF also was confirmed as a good typing technique, allowing a clustering that partially reflected the clustering demonstrated by PFGE. The MLVF, with a level of similarity of 80%, showed a cluster with predominance of clinical strains and another with predominance of subclinical strains. The set of virulence genes encoding agglutination factors (*ClfA* and *ClfB*), fibronectin binding protein (*FnBPA*), toxins (*Hla*, *Hlb* and *Luk-ED*), elastin binding protein (*Ebps*), and the collagen binding protein (*Cna*) was widely present in the population of subclinical mastitis isolates from seven Brazilian states and the frequency of these genes ranged from 58 to 97.7%. The results show that this set of proteins should be better evaluated and may be promising as a set of antigens to constitute news vaccines for prevention of mastitis caused by *S. aureus* in Brazilian dairy herds. In conclusion, this work contributed to the understanding of the epidemiology of bovine mastitis in Brazil, showing the great genetic diversity of the isolates that cause mastitis in the country, but with a predominance of specialized strains that should be better studied for the development of new forms of control and prevention of this disease.

Key-words: Genotyping. Phenotyping. *Galleria mellonella*. PFGE. MLVF.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE.....	10
1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1	Mastite bovina.....	13
2.2	<i>Staphylococcus aureus</i>.....	14
2.2.1	Mecanismos de virulência.....	15
2.2.2	Mecanismos de infecções persistentes.....	18
2.3	Técnicas de caracterização molecular.....	20
2.4	<i>Galleria mellonella</i> como modelo de estudos de virulência microbiana.....	23
3	CONCLUSÃO.....	25
	REFERÊNCIAS.....	26
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS À SUBMISSÃO.....	39
	ARTIGO 1 Caracterização fenotípica de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de mastite bovina por meio da infecção experimental em <i>Galleria mellonella</i>.....	39
	ARTIGO 2 Fatores de virulência e genotipagem por MLVF e PFGE em <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de mastite clínica e subclínica em rebanhos bovinos do Estado de Minas Gerais, Brasil.....	77
	ARTIGO 3 Genotipagem por PFGE e fatores de virulência em <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de mastite bovina de rebanhos brasileiros.....	95

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A mastite bovina é uma doença importante para a bovinocultura leiteira devido aos altos prejuízos econômicos que acarreta. É caracterizada pela inflamação da glândula mamária que decorre geralmente da infecção por uma variedade de patógenos, incluindo algas, fungos, leveduras e bactérias, dentre as quais destaca-se o *Staphylococcus aureus* (RUEGG, 2012). Este agente está presente nos rebanhos bovinos brasileiros, tendo sido detectado pela primeira vez em 1978 (MULLER et al., 1978), a partir de então ele é descrito em propriedades de todo o país, com frequências de isolamento que variam de 12,6% a 70,9% (ANDRADE et al., 2000; BANDEIRA et al., 2013; COSTA et al., 2012; FREITAS et al., 2005; LANGONI et al., 2009; MARTINS et al., 2010; ZANETTE; SCAPIN; ROSSI, 2010).

A infecção por *S. aureus* provoca perdas significativas na produção de leite pela permanente destruição das células do epitélio da glândula mamária (BARKEMA; SCHUKKEN; ZADOKS, 2006). A patogênese se desenvolve devido à capacidade do agente produzir uma gama de fatores de virulência envolvidos com diversas funções, auxiliando na colonização, adesão, invasão da glândula mamária, bem como na evasão do sistema imune do hospedeiro (FLUIT, 2012; FOSTER et al., 2014; SCALI et al., 2015). O tratamento das infecções intramamárias ocasionadas por este agente é difícil e o controle baseado na prevenção de novas infecções, segregação e descarte dos animais infectados. O microrganismo se dissemina por meio das mãos dos ordenhadores, moscas e equipamentos de ordenha (PETERSSON-WOLFE; MULLARKY; JONES, 2010).

Além da mastite bovina, *S. aureus* é responsável por outras infecções em seres humanos e animais, tais como, infecções de pele, endocardites e osteomielites (DAVIS, 2005; LEONARD; MARKEY, 2008). Nesse contexto, há necessidade de se conhecer melhor esse importante patógeno, entender a patogênese da doença, as vias de disseminação e os fatores de virulência que participam do processo de infecção para desvendar novas formas de tratamento, controle e prevenção. Grande parte dos trabalhos tem sido realizada *in vitro* (CREMONESI et al., 2015; ELSAYED; MAHMOUD EL-

BAGOURY; DAWOUD, 2015; GOGOI-TIWARI et al. 2015; KLEIN et al., 2012) e poucos dados surgem baseados em dados *in vivo* ou *ex vivo*, avaliando, por exemplo, a patologia causada por diferentes isolados (RAINARD et al., 2017).

Vários métodos têm sido utilizados para a genotipagem de *S. aureus*, sendo que os mais comuns incluem *Pulsed-field Gel Eletroforesis* (PFGE) (ADKINS; MIDDLETON; FOX, 2016), *Multilocus sequence type* (MLST) (SMITH et al., 2005), *Multilocus variable-number tandem repeat analysis* (MLVA) (SOBRAL et al., 2012), *Multiple locus VNTR fingerprinting* (MLVF) (SABAT et al., 2006) e *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) (COSTA et al., 2012). A técnica de PFGE, embora seja mais demorada, tem sido considerada a ferramenta de genotipagem de maior poder discriminatório para *S. aureus* e um bom método para se estabelecer relações clonais em estudos epidemiológicos e moleculares (ADKINS; MIDDLETON; FOX, 2016; SOMMERHAUSER et al., 2003; TENOVER et al., 1995; ZADOCKS et al. 2002). Porém, a técnica de MLVF tem mostrado poder discriminatório semelhante a PFGE, com as vantagens de ser menos honerosa e menos laboriosa, permitindo com mais facilidade aplicação a um grande número de isolados (SABAT et al., 2003; SABAT et al., 2006).

Estudos de fenotípicos de virulência em *S. aureus* podem ser realizados em modelos como culturas de células (IQBAL et al., 2016), tecido (explante) de glândula mamária (MAGRO et al., 2017), animais vertebrados como camundongos (BENTON et al., 2004) e coelhos (REINOSO et al., 2002) e invertebrados como *Drosophila melanogaster* (NEEDHAM et al., 2004), *Tenebrio molitor* (MCGONIGLE; PURVES; ROLFF, 2016) e *Galleria mellonella* (SHARMA-KUINKEL et al., 2015). Os modelos invertebrados, quando comparados aos vertebrados, são mais baratos, mais fáceis de estabelecer e manter nos laboratórios, podem ser criados em larga escala e não estão sujeitos as mesmas restrições éticas (RAMARÃO; NIELSEN-LEROUX; LERECLUS, 2012).

As larvas do inseto *G. mellonella* têm se destacado dentre os modelos de animais invertebrados, pois além das vantagens comuns a todos, estas são relativamente grandes e podem ser incubadas à temperatura ideal de crescimento para patógenos comuns em mamíferos, em torno de 37° C (LIONAKIS, 2011; RAMARÃO; NIELSEN-LEROUX; LERECLUS, 2012). A resposta imune de *G. mellonella* é inata (celular e humoral), assim como de outros insetos e pode ser mensurada experimentalmente (STRAND, 2008). O potencial desse modelo para o estudo da virulência bacteriana tem sido demonstrado por trabalhos nos quais cepas atenuadas em modelos

mamíferos demonstram menor virulência em *G. mellonella* e cepas que causam infecções graves também são altamente virulentas para as larvas (JANDER; RAHME; AUSUBEL, 2000; MYLONAKIS et al, 2005; PELEG et al., 2009; SHARMA-KUINKEL et al., 2015).

Neste trabalho, buscou-se realizar uma caracterização fenotípica, usando como modelo experimental larvas de *G. mellonella*, e genotípica, pelas técnicas de PFGE, MLVF e prospecção de genes de virulência em duas populações de *S. aureus* provenientes de mastite bovina, sendo uma restrita ao Estado de Minas Gerais, contendo amostras de origem clínica e subclínica e outra contendo amostras de mastite subclínica de sete estados brasileiros.

Objetivo geral:

Realizar a caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *S. aureus* provenientes de casos de mastite bovina de rebanhos brasileiros.

Objetivos específicos:

I. Caracterizar isolados provenientes de mastite bovina clínica e subclínica, geneticamente diversos, utilizando o modelo de infecção *G. mellonella* através da avaliação da sobrevivência após infecção, recuperação bacteriana da hemolinfa, melanização do vaso dorsal e exame histológico.

II. Avaliar o potencial uso de larvas de *G. mellonella* para o estudo da virulência em cepas de *S. aureus* isoladas de mastite em bovinos.

III. Avaliar genótipos isolados de *S. aureus* provenientes de casos de mastite clínica e subclínica de rebanhos do Estado de Minas Gerais, Brasil, por meio das técnicas de tipagem PFGE e MLVF e por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para prospecção dos genes de virulência codificadores das proteínas dos fatores de aglutinação (*ClfA* e *ClfB*), da proteína de ligação à fibronectina (*FnBPA*), das toxinas (*Hla* e *Luk-ED*) e da proteína de ligação a elastina (*Ebps*).

IV. Determinar as relações genotípicas entre isolados de *S. aureus*, provenientes de rebanhos das regiões Norte, Sul e Sudeste do Brasil por meio da PFGE e PCR para prospecção dos genes de virulência codificadores das proteínas do fator de aglutinação (*ClfA* e *ClfB*), da proteína de ligação à fibronectina (*FnBPA*), das toxinas (*Hla*, *Hlb* e *Luk-ED*), da proteína de ligação a elastina (*Ebps*) e da proteína de ligação ao colágeno (*Cna*).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Mastite bovina

A mastite, cuja nomenclatura originou-se do grego *masto*-glândula mamária e *itis*-inflamação, é uma reação inflamatória da glândula mamária, geralmente associada a presença de microrganismos (BLOOD; STUDDERT, 1999; NOTEBAERT; MEYER, 2006). Tem sido considerada a doença infecciosa mais importante e que causa os maiores prejuízos aos rebanhos bovinos leiteiros em todo o mundo (ACOSTA et al., 2016; DE VLIEGHER et al., 2012; KEEFE, 2012; KOT et al., 2016; PAUL; GANGULY, 2014).

Esses prejuízos estão relacionados ao descarte de leite dos animais em tratamento, gastos com medicamentos, descarte de animais cronicamente infectados e, eventualmente, morte de animais doentes (JAMALI et al., 2018; PETON; LE LOIR, 2014). No mundo, foram estimadas perdas anuais de 35 milhões de dólares em decorrência desta enfermidade (BRADLEY, 2002). No Brasil, Costa et al. (1999) apontaram custos com a prevenção da mastite de US\$ 23,98 por vaca/ano e perdas estimadas em US\$ 317,38 por vaca/ano. Na Holanda, Suécia e Estados Unidos foi proposto que as perdas econômicas em decorrência da mastite são da ordem de US\$ 80 a US\$ 125 por vaca (HOGEVEEN et al., 2011). É necessário destacar também o impacto da mastite na saúde pública, pois, muito agentes etiológicos dessa doença podem causar sérias enfermidades nos seres humanos, bem como causar intoxicações alimentares. Além disto, o leite pode conter resíduos de antibióticos e bactérias resistentes que podem ser propagadas na comunidade (DE VLIEGHER et al., 2012).

A mastite bovina pode se apresentar de forma clínica ou subclínica. A forma clínica apresenta sinais de inflamação, caracterizados por edema, hipertermia, vermelhidão e dor na glândula mamária, bem como o aparecimento de grumos, pus, sangue ou alterações nas características do leite. Em alguns casos ocorre febre, anorexia podendo levar até a morte do animal (TOZZETTI; BATAIER; ALMEIDA, 2008). Por outro lado, a mastite subclínica não demonstra sinais inflamatórios observáveis, ocorrendo alterações na composição do leite como o aumento na

contagem de células somáticas, aumento nos teores de sódio e cloro, proteínas séricas e diminuição do percentual de caseína, gordura, sólidos totais e lactose (SANTOS; FONSECA, 2007).

Quando considerado o modo de transmissão, a mastite pode ser classificada em ambiental ou contagiosa. Como o próprio termo coloca, a mastite ambiental está relacionada ao hábitat da vaca, sendo causada por patógenos que vivem no ar, na cama, na água e fezes como exemplo pode-se citar *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. A mastite contagiosa é transmitida de vaca para vaca, principalmente durante a ordenha e os principais agentes etiológicos são *Streptococcus agalactiae* e *S. aureus* (BOGNI et al., 2011).

S. aureus encontra-se entre os agentes etiológicos mais comuns da mastite no Brasil (BRITO et al., 1999; COSTA, 2008) e no mundo (WANG et al., 2015), sendo responsável por casos clínicos, subclínicos e quadros crônicos com manifestações clínicas ocasionais de difícil controle (RUEGG, 2012). A patogênese da mastite por esse agente ainda não foi totalmente compreendida, sabe-se que este possui uma variedade de fatores de virulência e que os genótipos associados a mastite também são diversos (KLEIN et al., 2012; MITRA et al., 2013; WOLF et al., 2011). Há uma necessidade de compreender melhor como essa doença ocorre, quais fatores de virulência estão principalmente envolvidos e quais as características do patógeno que favorecem sua adaptação na glândula mamária para que, de posse dessas informações, sejam identificadas formas efetivas de tratamento, controle e prevenção da doença (RAINARD et al., 2017).

2.2 *Staphylococcus aureus*

S. aureus é uma bactéria Gram-positiva produtora de catalase, cuja nomenclatura deriva do grego *staphylé*, que em português significa "cachos de uva" e *coccus* "grão" ou "semente", que caracteriza a estrutura desse patógeno, descoberto pelo cirurgião alemão Anton J. Rosenbach (1842-1923) em 1884 (ROSENBAACH, 1884). O termo *aureus*, derivado do latim "ouro", é devido à característica desse patógeno de apresentar colônias geralmente pigmentadas de amarelo, quando cultivado em meio de cultura sólido (TORTORA et al., 2012). As células de *S. aureus* possuem diâmetro entre 0,5 e 1,5 µm, não possuem mobilidade e nem esporulam. O cultivo pode ser realizado em meios comuns, caldo ou ágar simples, à temperatura ótima de 37°C. Essa espécie

também de desenvolve na presença de 7,5% de cloreto de sódio e produz coagulase, enzima cuja presença auxilia na caracterização da espécie (CASSETARI et al., 2005).

Este patógeno é importante tanto em medicina humana quanto veterinária. Sua presença em um hospedeiro pode determinar doenças clínicas graves, incluindo septicemia, ou o hospedeiro pode permanecer colonizado de forma assintomática durante muito tempo (FREITAS et al., 2013; TONG et al., 2015). Dentre as patologias comumente causadas em animais estão as dermatites, abscessos e infecções do trato urinário em equinos, dermatites em cães e mastite que pode ocorrer em bovinos, ovinos, caprinos e suínos (PETON; LE LOIR, 2014). A gravidade e o desfecho da infecção são decorrentes da integridade da resposta imunológica do hospedeiro e dos mecanismos de virulência presentes no patógeno que o auxiliam na colonização, na adesão e invasão do organismo, bem como no escape do sistema imune do indivíduo infectado (FERREIRA et al., 2014; FOSTER et al., 2014; SCHUKKEN et al., 2011).

2.2.1 Mecanismos de virulência

No início do processo de infecção, *S. aureus* já utiliza mecanismos para se evadir do sistema imune e colonizar o hospedeiro. Um exemplo é o uso de uma proteína reguladora de ferro (*IsdA*), localizada na superfície da bactéria, que se liga à lactoferrina impedindo que ela promova o seu efeito antiestafilocócico (CLARKE; FOSTER, 2008). *S. aureus* também codifica o gene *oatA*, que codifica uma enzima capaz de conferir resistência a lisozima, peptídeo antimicrobiano presente nos hospedeiros (BERA et al., 2006). A colonização é facilitada por diversas moléculas ligadas à superfície bacteriana, denominadas “*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*” (MSCRAMMS), incluindo o ácido teicóico, proteína A (*SpA*), fatores de aglutinação (*ClfA* e *ClfB*) e proteínas que se ligam à fibronectina (*FnBPA* e *FnBPB*), ao colágeno (*Cna*), ao fibrinogênio (*Efb*) e à elastina (*EbpS*) (CHEUNG; PROJAN; GRESHAM, 2002; FERRY et al., 2005).

S. aureus é capaz de interferir no seu reconhecimento pelos *PRRs* (Receptores reconhecedores de padrão, em inglês) das células do sistema imune hospedeiro. Na glândula mamária já foi experimentalmente demonstrado que *S. aureus* diminui a expressão de NOD1/2 no tecido do canal do teto, o que pode auxiliar o não reconhecimento do patógeno pelas células do

tecido que está sendo invadido (WHELEHAN et al., 2011). Outro exemplo é em relação ao TLR2, pois foi demonstrado que a ligação de moléculas embebidas na camada de peptídeoglicanos da parede de *S. aureus* ao TLR2 nas células apresentadoras de antígeno pode induzir a secreção de IL-10, citocina antiinflamatória, diminuindo uma futura resposta das células T do hospedeiro (PERES; MADRENAS, 2013).

A quimiotaxia de células de defesa para o local da infecção é outro ponto importante no desenvolvimento da doença e proteínas produzidas pelo *S. aureus* interferem também neste aspecto do sistema imunológico inato. A proteína de aderência extracelular (*Eap*) se liga às moléculas de adesão intercelular 1 (*ICAM-1*) na superfície das células endoteliais bloqueando a ligação destas com proteínas da superfície de neutrófilos, prevenindo assim a adesão leucocitária, transmigração e extravasamento dos neutrófilos (FOSTER, 2005, 2009). A proteína inibitória de quimiotaxia (*CHIPS*) também reduz o recrutamento de neutrófilos atuando juntamente com a proteína *Eap* (DE HASS et al., 2004; FOSTER, 2005). A proteína semelhante à superantígenos estafilocócicos (*SSL5*) inibe a ativação de leucócitos pelas quimiocinas, pois possui receptores para essas substâncias, impedindo que se liguem aos seus alvos celulares (BESTEBROER et al., 2009). A proteína inibitória de *FPRL1* (*FLIPr*) inibe a mobilização de cálcio em neutrófilos ativados o que também resulta em prejuízos para a ação neutrofílica contra o patógeno (PRAT et al., 2006).

S. aureus utiliza de diferentes mecanismos para evadir da ação dos fagócitos, entre os quais se destaca a cápsula polissacarídica, um fator anti-opsonização. A cápsula pode interferir com a deposição de imunoglobulinas e componentes do complemento na superfície da célula bacteriana e com o acesso aos receptores Fc pelos neutrófilos, pois, proteínas do sistema complemento podem ser depositadas sobre a superfície da parede da bactéria, por baixo da cápsula, ficando, assim, inacessível aos neutrófilos (FOSTER, 2009; WATTS et al., 2005). *SpA* é a proteína mais abundante na parede celular dos estafilococos, sendo capaz de se ligar aos receptores Fc de IgG prejudicando a fagocitose mediada por opsonização (FALUGI et al., 2013). A proteína de ligação a imunoglobulinas (*Sbi*) também se liga, de forma semelhante a *SpA*, a região Fc da IgG e pode também se ligar a C3 do complemento (SMITH et al., 2011). *ClfA* é capaz de se ligar ao fibrinogênio do hospedeiro, dificultando o reconhecimento do patógeno pelos fagócitos, além disso, é capaz de clivar o componente C3b do complemento, prejudicando a opsonização mediada pelo complemento (HAIR et al., 2010).

Quando a fagocitose não pode ser evitada, outros mecanismos de escape podem ser recrutados. As enzimas superóxido-dismutases (*SodA* e *SodM*) inativam os radicais superóxido produzidos pelos neutrófilos (KARAVOLOS et al., 2003) e a catalase (*KatG*) transforma o peróxido de oxigênio em compostos atóxicos (COSGROVE et al., 2007). A estafiloxantina é um pigmento carotenóide que também fornece resistência aos agentes oxidantes produzidos pelos neutrófilos (LIU et al., 2005). Já a flavohemoglobina (*Hmp*) tem a tarefa de eliminar as espécies reativas de nitrogênio (RICHARDSON; DUNMAN; FANG, 2006). Além disso, a estafiloquinase (*Sak*) é capaz de inibir o efeito bactericida das α -defensinas (JIN et al., 2004) e a aureolisina tem atividade proteolítica sobre a catelicidina LL-37 (SIEPRAWSKA-LUPA et al., 2004).

Apesar dos neutrófilos serem importantes para a eliminação de *S. aureus*, curiosamente o recrutamento deles pode resultar em aumento da carga bacteriana e patogenicidade. Foi demonstrado que neutrófilos com *S. aureus* intracelular são deficientemente fagocitados por macrófagos. *S. aureus* regula positivamente o sinal "don't eat me" CD47 nos neutrófilos, evitando seu engolfamento. Além disso, *S. aureus* é capaz de induzir a apoptose, o que permite sua resistência à lise fagocítica e escape para o ambiente extracelular (GREENLEE-WACKER et al., 2014).

Além de sua capacidade para inibir a morte mediada por fagócitos, *S. aureus* também manipula as respostas imunes inatas induzindo a morte de células imunes via PSMs (modulinas solúveis em fenol) e diferentes toxinas (McCARTHY; LINDSAY, 2013). A *Hla* (α -toxina) se liga ao receptor ADAM10 e forma poros, levando a morte das células (BECKER et al., 2014). As γ -hemolisinas AB e CB (*HlgAB* e *HlgCB*) promovem a lise de neutrófilos, monócitos e macrófagos de humanos e primatas (MALACHOWA; DeLEO, 2011). *LukED* (Leucotoxina ED) também é uma toxina formadora de poros que usa o receptor para quimiocinas CCR5 para matar linfócitos T, macrófagos e células dendríticas. Em células deficientes em CCR5, esta proteína pode ainda se ligar aos receptores de quimiocinas CXCR1 e CXCR2 (REYES-ROBLES et al., 2013).

Diferentes fatores de virulência interferem com a ação do sistema complemento. A ligação de *Sbi* a imunoglobulinas inibe a ligação de C1q a essas mesmas, bloqueando a via clássica e ainda, sua ligação em C3 prejudica a ativação da via alternativa (BURMAN et al., 2008; HAUPT et al., 2008). A estafiloquinase (*Sak*) cliva C3b gerando um produto inativo (iC3b) ligado a superfície bacteriana (ROOIJAKKERS et al., 2005). A adesina de ligação ao colágeno (*Cna*) também se liga

a C1q inibindo a via clássica (KANG et al., 2013). A aureolisina é capaz de clivar o C3 em C3a e C3b, que deveria aumentar a atividade do complemento, porém, esse C3b gerado é mais facilmente degradado por fatores do hospedeiro (LAARMAN et al., 2011). A proteína estafilocócica inibidora do complemento (SCIN) é considerada o mais potente inibidor do complemento produzido por *S. aureus*. Esta proteína se liga na superfície das C3 convertases, bloqueando a continuidade da cascata proteolítica. A proteína extracelular de ligação ao fibrinogênio (*Efb*) também pode se ligar ao C3b (ROOIJAKKERS et al., 2005).

Devido a essa variedade de mecanismos para escapar do sistema imune e desenvolver a infecção, muitos grupos de pesquisa trabalham para identificar antígenos chave, que possam ser utilizados em vacinas, porém, até o momento, não foi desenvolvido nenhum imunoprolático com a eficácia desejada (BRÖKER; MROCHEN; PÉTON, 2016; LI et al., 2015).

2.2.2 Mecanismos de infecções persistentes

Embora *S. aureus* já tenha sido tradicionalmente considerado um patógeno extracelular, sabe-se que o mesmo tem habilidade para sobreviver em diferentes tipos de células e este estilo de vida pode facilitar a persistência a longo prazo nos tecidos do hospedeiro, pois as bactérias são amplamente protegidas contra tratamentos antimicrobianos e contra o sistema imunológico quando se encontram no interior das células (SENDI; PROCTOR, 2009). Dentre as células infectadas encontram-se células epiteliais, endoteliais, osteoblastos, fibroblastos e queratinócitos que podem funcionar como um reservatório endógeno para recolonização ou infecção. Desta forma, a sobrevivência deste microrganismo dentro das células tem sido colocada como contribuinte na ocorrência de doenças crônicas e de difícil tratamento, como a osteomielite (LÖFFLER et al., 2014). No caso da mastite, a sobrevivência intracelular foi definida como um componente importante da patogênese, tendo sido comprovada a ocorrência de *S. aureus* dentro de células alveolares extraídas de leite de vacas infectadas (HEBERT et al., 2000).

Outra forma para o estabelecimento de infecções crônicas são as *Small Colony Variants* (SCVs), um fenótipo instável de bactérias de baixo crescimento, com metabolismo reduzido, que formam pequenas colônias em placas de ágar e secretam menos exotoxinas, por exemplo, β -toxina (CAO et al., 2017; PROCTOR et al., 2006). No que se refere às questões clínicas, SCVs tem maior

capacidade de persistir no interior de células de mamíferos, são menos susceptíveis a antibióticos quando comparadas ao fenótipo selvagem e podem causar infecções latentes ou recorrentes emergindo a partir do ambiente intracelular, onde estavam protegidas (PROCTOR et al., 2006). As alterações metabólicas e a diminuição na expressão de genes de virulência permitem que esse fenótipo bacteriano evite amplamente a ativação das respostas imunes do hospedeiro (LÖFFLER et al., 2014). Além da capacidade de viver dentro das células, as SCVs podem aumentar a formação de biofilmes, tornando a eliminação por tratamento antibacteriano ainda mais difícil (SINGH et al., 2009).

Biofilmes são caracterizados por uma natureza crônica e persistente, alta resistência aos agentes antimicrobianos e redução das defesas imunológicas, além do que, podem sofrer dispersão disseminando células bacterianas que podem causar infecção em outros pontos do corpo do indivíduo (ARCHER et al., 2011; LISTER; HORSWILL, 2014). *S. aureus* forma biofilmes em tecidos do hospedeiro como ossos e válvulas cardíacas, levando a doenças crônicas como osteomielite e endocardite, ou em materiais implantados como cateteres venosos e próteses (BARRETT; ATKINS, 2014; ELGHARABLY et al., 2016; THURLOW et al., 2011). Na bovinocultura leiteira os biofilmes tem grande importância, pois podem se formar na glândula mamária e equipamentos de ordenha dificultando o tratamento e controle da mastite (MELCHIOR; VAARKAMP; FINK-GREMMELS, 2006). Muitas vezes a capacidade para formar biofilmes é necessária para a virulência de cepas patogênicas, permitindo a sobrevivência e disseminação. Cepas incapazes de produzir biofilmes foram avirulentas em vários modelos animais (CUCARELLA et al., 2001; KROPEC et al., 2005).

Para se manter no organismo hospedeiro, *S. aureus* pode induzir imunomodulação por meio da regulação da diferenciação funcional de macrófagos. Em um modelo de infecção na forma de biofilmes associados a cateter em camundongos, *S. aureus* atenuou a fagocitose por macrófagos e polarizou essas células em direção ao fenótipo alternativo M2, que regula negativamente as respostas inflamatórias (THURLOW et al., 2011). Em consonância com esses achados, os macrófagos de pacientes com rinosinusite crônica com pólipos nasais mostram capacidade reduzida de fagocitar *S. aureus* e são polarizados também para o fenótipo M2, em comparação com macrófagos de pacientes com rinosinusite crônica sem pólipos nasais. Estes achados sugerem que

a ativação alternativa de macrófagos contribui para a infecção crônica por *S. aureus* e colonização (KRYSKO et al., 2011).

A imunomodulação também pode ser relacionada as células T. Foi demonstrado que as células T perderam gradualmente a capacidade de responder a estimulação antigênica e entraram em um estado de anergia com a progressão da infecção, quando esta se tornava uma infecção persistente, em um modelo murino. A baixa resposta foi revertida pela co-estimulação com um ativador de proteína quinase C, sugerindo que o que ocorre é uma falha nos eventos de sinalização do receptor de células T. A presença destas células T específicas para os antígenos, porém anérgicas pode contribuir para o insucesso das respostas imunitárias durante as infecções crônicas (ZIEGLER et al., 2011).

2.3 Técnicas de caracterização molecular

Técnicas diferentes de caracterização molecular são amplamente utilizadas nos estudos envolvendo *S. aureus*, a fim de estabelecer relações epidemiológicas entre diferentes isolados de uma determinada população. Essas técnicas são capazes de definir e monitorar alterações genéticas, auxiliando também no entendimento da distribuição de clones dentro de uma comunidade, de um hospital e em ambientes de produção, principalmente para estudo de surtos, elucidando as rotas de transmissão do patógeno. Essas técnicas permitem responder questões, como por exemplo, se a cepa A está relacionada à cepa B, ou ainda se dentro de determinado período os isolados são indistinguíveis, clonalmente relacionados ou tem características distinguíveis para serem considerados como estirpes diferentes (NSOFOR, 2016)

Por melhor que seja uma técnica, apenas os seus resultados não são suficientes, eles devem ser utilizados no contexto epidemiológico, utilizando dados clínicos e demográficos relacionados à doença infecciosa em estudo. As análises podem ser realizadas em diferentes níveis, de acordo com cada situação, que podem ser investigações locais, regionais, nacionais ou ainda internacionais, sendo que para cada situação diferentes métodos podem ser aplicados. Para a escolha do método, os critérios de conveniência, como custos, acessibilidade e rapidez para obtenção dos resultados devem ser levados em consideração (VAN BELKUM et al., 2007). Não

existe atualmente um método ideal, sendo que cada técnica possui suas vantagens e desvantagens (SABAT et al., 2013).

As técnicas que têm sido utilizadas para genotipagem de *S. aureus* incluem *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) (COSTA et al., 2012), tipagem de *Spa* (SHOPSIN et al., 1999), *Multilocus sequence type* (MLST) (TAKANO et al., 2008), *Multilocus variable-number tandem repeat analysis* (MLVA) (SOBRAL et al., 2012), *Multiple locus variable-number tandem repeat fingerprinting* (MLVF) (DU et al., 2014), sequenciamento genômico (DIEP et al., 2006), ribotipagem (CREMONESI et al., 2015) e *Pulsed-field Gel Eletroforesis* (PFGE) (SRENIK et al., 2018).

Os métodos baseados em sequenciamento são vantajosos por fornecer dados não ambíguos, permitirem comparações entre laboratórios e permitirem a criação de bancos de dados computadorizados que podem ser acessados em vários lugares do mundo facilitando a comparação dos estudos entre diferentes grupos de pesquisa (CARRIÇO et al., 2006). O sequenciamento do genoma, capaz de trazer as informações mais completas sobre o organismo em estudo, ainda não está disponível para o uso na rotina de muitos laboratórios (SABAT et al., 2013). A MLST, que baseia-se no sequenciamento de fragmentos internos de sete genes *housekeeping*, é uma excelente ferramenta para tipagem de *S. aureus* (ENRIGHT et al., 2000), porém, é uma técnica cara e trabalhosa, além de ter um poder discriminatório moderado, não sendo adequado para uso em ocasiões de surto (SABAT et al., 2012).

A PFGE, eletroforese em gel de campo pulsado, é considerada como técnica padrão ouro para tipagem de *S. aureus*, entretanto, é uma técnica trabalhosa e a comparação dos dados entre laboratórios ainda é um desafio (COOKSON et al., 2007). É considerada uma técnica de excelente poder discriminatório, com alta concordância epidemiológica e excelente repetibilidade intralaboratorial (SABAT et al., 2013). Essa técnica baseia-se na clivagem do DNA bacteriano por uma endonuclease de restrição que reconhece sítios de seis pares de bases, produzindo menos de 30 fragmentos que são separados em eletroforese com alternância periódica da direção do campo elétrico e são visualizados em gel de agarose como bandas, formando um padrão particular no gel. Os resultados levam entre dois e quatro dias para serem alcançados e a análise dos dados deve ser cuidadosa, mesmo quando são utilizados sistemas computadorizados (VAN BELKUM et al., 2007). Essa técnica é capaz de investigar grande parte do genoma (> 90%), portanto, inserções ou

eliminações de elementos genéticos móveis e grandes recombinações no DNA genômico resultarão em mudanças no padrão de bandas (SABAT et al., 2013).

Diferentes abordagens para a análise dos dados da PFGE são propostas. Tenover et al. (1995) determinaram que isolados são considerados clones se apresentarem o mesmo padrão de bandas, intimamente relacionados quando apresentassem diferenças em duas ou três bandas, possível parentesco quando a diferença fosse de quatro a seis bandas e sem parentesco quando as diferenças fossem em sete bandas ou mais. Atualmente as análises baseiam-se em programas computadorizados, como o *software Bionumerics* (Applied Maths[®], Bélgica) que, com base no número e na posição das bandas, geram uma representação numérica deste padrão e permite comparação entre padrões por meio da determinação de coeficientes de similaridade (GOERING, 2010).

A MLVA é uma técnica baseada em PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) que baseia-se na amplificação de regiões do genoma onde existem repetições de pequenas sequências de bases nitrogenadas, denominadas *Variable number of tandem repeat regions* (VNTR's). Após a amplificação, os resultados podem ser sequenciados para a interpretação, avaliando qual o número de repetições da sequência amplificada em cada *locus* (VAN BELKUM et al., 2007). Os resultados também podem ser avaliados através de eletroforese, quando utilizadas grandes unidades de repetição pode ser utilizado o gel de agarose e quando são pequenas, é comum utilizar eletroforese capilar ou gel de poliacrilamida, que permite a determinação mais precisa do tamanho do produto de amplificação (TIMMONS et al., 2016). Quando a eletroforese é utilizada e os resultados são avaliados a partir do padrão de bandas revelado nos géis a técnica passou a ser denominada MLFV (*Multiple locus VNTR fingerprinting*) (SABAT et al., 2006).

A MLVF desenvolvida para *S. aureus*, analisa por PCR multiplex as regiões polimórficas de sete genes (*sspA*, *spa*, *sdrC*, *sdrD*, *sdrE*, *clfA* e *clfB*) e é mais barata, mais rápida e mais simples de executar que a PFGE (SABAT et al., 2003). O poder discriminatório desta técnica foi considerado comparável ao da PFGE e superior ao MLST, MLVA, tipagem de *Spa* e outros métodos baseados em PCR, além disso, se mostrou como uma técnica de excelente reprodutibilidade e alta concordância com outras técnicas de tipagem (HOLMES et al., 2010; KARYNSKI et al., 2008; LUCZAK-KADLUBOWSKA et al., 2008; MALACHOWA et al., 2005; SABAT et al., 2003).

2. 4 *Galleria mellonella* como modelo de estudos de virulência microbiana

O uso de modelos invertebrados tem se tornado mais comum no estudo da patogênese bacteriana, devido a uma série de vantagens que eles oferecem, tais como, a não necessidade de aprovação por comitê de ética, os custos relativamente baixos, a possibilidade de realização de testes em grande escala e o fornecimento dos resultados em um curto espaço de tempo (KEMP; MASSEY, 2007; LI et al., 2013; LIONAKIS, 2011).

As larvas de *G. mellonella* têm sido escolhidas por serem relativamente grandes (12-20 mm), facilitando a manipulação e obtenção de tecidos para análise das amostras, possuírem um sistema imune com elevado grau de estruturas, semelhante em vários pontos com o dos vertebrados, serem economicamente viáveis, além de serem alojadas em pequenos espaços e incubadas a 37°C, o que permite o estudo de patógenos adaptados a mamíferos (LIONAKIS, 2011; PEREIRA et al., 2015).

A maioria dos trabalhos realizados envolve a aplicação dos organismos patogênicos na hemocele, com auxílio de seringas. Os efeitos da virulência são mensurados por meio do cálculo da dose letal (LD50), sobrevivência após desafio, exames histológicos dos tecidos do inseto, mensuração da produção de óxido nítrico, contagem de hemócitos, taxa de recuperação dos patógenos ou expressão gênica (DALTON et al., 2017; FEDHILA; NEL; LERECLUS, 2002; NIELSEN-LEROUX et al., 2012; PEREIRA et al., 2015).

Outros trabalhos têm utilizado a inoculação via oral de bactérias fluorescentes para seguir a trajetória e o processo de colonização ao longo do corpo das larvas (FREITAK et al., 2014; WOJDA, 2017). Recentemente foi descrito um novo método para avaliação da sobrevivência das larvas e multiplicação dos patógenos em seu interior. Esse método utiliza placas de 96 poços onde as larvas são alocadas e a placa levada a um espectrofotômetro. Desta forma, é possível avaliar o momento exato das mortes, pois, o aparelho consegue detectar a ausência de movimento em cada um dos poços. Além disso, usando as bactérias fluorescentes, é possível quantificar a multiplicação dessa bactéria dentro da larva, permitindo o uso da mesma larva para verificar dois parâmetros: sobrevivência e multiplicação do patógeno (PARTHUISOT; ROUQUETTE; FERDY, 2018).

Dentre os trabalhos envolvendo *S. aureus* destaca-se o trabalho de Peleg et al. (2009) que estabeleceu *G. mellonella* como um bom modelo de estudo para esse patógeno, associando a virulência na larva à virulência em modelo mamífero (camundongo). Neste trabalho foi utilizada usada uma cepa *knockout* para o gene *agr*, um regulador de virulência que já se mostrou importante em vários hospedeiros. Quando foi comparada a virulência causada pela cepa mutante e pela cepa sem mutação ficou evidenciado que a cepa mutante causou menos mortes que a estirpe sem mutação, tanto em *G. mellonella* como em camundongos.

Sharma-Kuinkel et al. (2015) também verificaram a associação entre resultados de testes de virulência de *S. aureus* realizados em camundongos com aqueles realizados em *G. mellonella*. Nos dois modelos ocorreu o aumento de sobrevivência dos hospedeiros infectados por cepas do complexo clonal 30 quando comparada a outras cepas utilizadas no mesmo experimento. Além do uso dos camundongos e das larvas, o trabalho avaliou características moleculares dos isolados, através de análises das sequências genômicas e de transcriptomas. As análises mostraram que características de patogenicidade estão relacionadas ao perfil genômico e sugeriu que genótipos específicos de *S. aureus* provocam tipos distintos de infecção.

Vários trabalhos têm utilizado o modelo de *G. mellonella* para estudar a influência de genes na virulência de *S. aureus*. Por meio da mutação ou deleção de genes específicos é possível observar que as cepas com mutação são atenuadas em relação às cepas das quais se originaram. Nesse sentido, podem ser citados os trabalhos de Gao et al. (2010), Purves et al. (2010), Quiblier et al. (2013), Cameron et al. (2015) e Silva et al. (2018) que desenvolveram cepas mutantes nos genes *relA*, *gapA* e *gapB*, *secDF*, *mprF* e *ric*, respectivamente. O gene *relA* codifica uma enzima responsável por modular os níveis de guanosina pentafosfato, os genes *gapA* e *gapB* codificam duas enzimas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase homólogas, *secDF* contribui para a exportação de proteínas, *mprF* está envolvido na biossíntese de fosfolípidios e *ric* relacionado aos centros de reparo de metabolismo do ferro.

Como foi visto, existe uma gama de possibilidades para estudar a virulência de *S. aureus* utilizando *G. mellonella* e o modelo está cada vez mais bem estudado e bem estabelecido. Novas formas mais eficientes para avaliação e interpretação dos resultados vêm sendo descobertas e dentre as últimas novidades encontra-se o primeiro sequenciamento genômico de *G. mellonella*

(LANGE et al., 2018). Desta forma, a falta de estudo do genoma de *G. mellonella*, que era colocado por muitos como um empecilho para a utilização do modelo, já está sendo sanada.

3 CONCLUSÃO

A mastite bovina é uma doença multifatorial que causa grandes prejuízos nos rebanhos leiteiros em todo o mundo. Entre os diferentes patógenos envolvidos na etiologia desta doença, destaca-se a bactéria *S. aureus* como um dos principais agentes. Este patógeno é dotado de diversos mecanismos de virulência que lhe possibilitam colonizar e invadir os hospedeiros, escapando do sistema imune e causando infecções geralmente crônicas. Diversas técnicas moleculares podem ser usadas para genotipagem de *S. aureus* auxiliando no entendimento da epidemiologia e patogênese das doenças por ele causadas. *G. mellonella* é um modelo animal invertebrado promissor para fenotipagem de *S. aureus* e de outras bactérias permitindo alcançar resultados parcialmente comparáveis àqueles obtidos em modelos mamíferos.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, A. C. et al. Mastites em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 7, p. 565-573, julho 2016.
- ADKINS, P. R. F.; MIDDLETON, J. R.; FOX, L.K. Comparison of Virulence Gene Identification, Ribosomal Spacer PCR, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Typing of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Cases of Subclinical Bovine Mastitis in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 54, n. 7, p. 1871-1876, July 2016.
- ANDRADE, M. A. et al. Sensibilidade *in vitro* de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de vacas com mastite subclínica. **Ciência Animal Brasileira**, v. 1, n. 1, p. 53-57, jan./jun. 2000.
- ARCHER, N. K. et al. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. **Virulence**, Austin, v. 2, n. 5, p. 445-459, Sept./Oct. 2011.
- BANDEIRA, F. S. et al. Frequência de *Staphylococcus aureus* em casos de mastite bovina subclínica na região sul do Rio Grande do Sul. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, n. 1, p. 1-6, 2013.
- BARKEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y. H.; ZADOKS, R. N. Invited Review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 6, p. 1877-1895, June 2006.
- BARRETT, L.; ATKINS, B. The clinical presentation of prosthetic joint infection. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 69, Suppl 1, p. 25-27, Sept. 2014.
- BECKER, R. E. et al. Tissue-specific patterning of host innate immune responses by *Staphylococcus aureus* α -toxin. **Journal of innate immunity**, v. 6, n. 5, p. 619-631, 2014.
- BENTON, B. M. et al. Large-Scale Identification of Genes Required for Full Virulence of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 186, n. 24, p. 8478-8489, Dec. 2004.
- BERA, A. et al. The presence of peptidoglycan *O*-acetyltransferase in various Staphylococcal species correlates with lysozyme resistance and pathogenicity. **Infection and Immunity**, Washington, v. 74, n. 8, p. 4598-4604, Aug. 2006.

- BESTEBROER, J. et al. Staphylococcal SSL5 inhibits leukocyte activation by chemokines and anaphylatoxins. **Blood**, New York, v. 113, n. 2, p. 328-337, Jan. 2009.
- BLOOD, D. C.; STUDDERT, V. P. Saunders Comprehensive Veterinary Dictionary. 2nd Ed, **WB Saunders**. London, United Kingdom, 1999.
- BOGNI, C. et al. War against mastitis: current concepts on controlling bovine mastitis Pathogens. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**, Singapore, p. 483-494, 2001.
- BRADLEY, A. J. Bovine mastitis: an evolving disease. **Veterinary Journal**, London, v. 164, n. 2, p. 116-128, Sept. 2002.
- BRITO, M. A. V. P. et al. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 51, n. 2, p. 129-135, 1999.
- BRÖKER, B. M.; MROCHEN, D.; PÉTON, V. The T Cell Response to *Staphylococcus aureus*. **Pathogens**, Basel, v. 5, n. 1, p. 1-23, Mar. 2016.
- BURMAN, J. D. et al. Interaction of human complement with Sbi, a staphylococcal immunoglobulin-binding protein: indications of a novel mechanism of complement evasion by *Staphylococcus aureus*. **Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 283, n. 25, p. 17579-17593, June 2008.
- CAMERON, D. R. et al. Impact of daptomycin resistance on *Staphylococcus aureus* virulence. **Virulence**, v. 6, n. 2, p. 127-131, 2015.
- CAO, S. et al. Alternative Evolutionary Pathways for Drug-Resistant Small Colony Variant Mutants in *Staphylococcus aureus*. **mBio**, Washington, v. 8, n. 3, p. 1-15, May/June 2017.
- CARRIÇO, J. A. et al. Illustration of a common framework for relating multiple typing methods by application to macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 7, p. 2524–2532, July 2006.
- CASSETTARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. S. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality? **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 9, n. 1, p. 70-76, Feb. 2005.
- CHEUNG, A. L.; PROJAN, S. J.; GRESHAM, H. The genomic aspect of virulence, sepsis, and resistance to killing mechanisms in *Staphylococcus aureus*. **Current Infectious Disease Reports**, v. 4, n. 5, p. 400-410, Oct. 2002.

- CLARKE, S. R.; FOSTER, S. J. IsdA protects *Staphylococcus aureus* against the bactericidal protease activity of apolactoferrin. **Infection and Immunity**, Washington, v. 76, n. 4, p. 1518-1526, Apr. 2008.
- COOKSON, B. D. et al. Evaluation of molecular typing methods in characterizing a European collection of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: the HARMONY collection. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, n. 6, p. 1830-1837, June 2007.
- COSGROVE, K. et al. Catalase (KatA) and alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) have compensatory roles in peroxide stress resistance and are required for survival, persistence, and nasal colonization in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 189, n. 3, p. 1025-1035, Feb. 2007.
- COSTA, E. O. da. et al. Mastite subclínica: prejuízos causados e os custos de prevenção em propriedades leiteiras. **Revista do Núcleo de Apoio a Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, São Paulo, v. 2, n. 2, p. 16-20, mar./abr. 1999.
- COSTA, G. M. et al. Population diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazilian dairy herds. **Research in Veterinary Science**, London, v. 93, n. 2, p. 733-735, Oct. 2012.
- COSTA, G. M. **Mamite bovina em rebanhos leiteiros da região sul do estado de Minas Gerais**. 2008. 123 p. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.
- CREMONESI, P. et al. Genomic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains associated with high within-herd prevalence of intramammary infections in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 98, n. 10, p. 6828-6838, Oct. 2015.
- CUCARELLA, C. et al. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, n. 9, p. 2888-2896, May 2001.
- DALTON, J. P. et al. A novel restraint device for injection of *Galleria mellonella* larvae that minimises the risk of accidental operator needle stick injury. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 99, Mar. 2017.
- DAVIS, J. S. Management of bone and joint infections due to *Staphylococcus aureus*. **Internal Medicine Journal**, Carlton, v. 35, p. 79-96, Dec. 2005. Suplemento 2.
- DE HASS, C. J. et al. Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial antiinflammatory agent. **The Journal of experimental medicine**, v. 199, n. 5, p. 687-695, Mar. 2004.

DE VLIEGHER, S. et al. Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 95, n. 3, p. 1025-1040, Mar. 2012.

DIEP, B. A. et al. Complete genome sequence of USA30, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, **The Lancet**, v. 367, n. 9512, p. 731-739, Mar. 2006.

DU, X. et al. An Improved MLVF Method and Its Comparison with Traditional MLVF, *spa* Typing, MLST/SCC*mec* and PFGE for the Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 1, p. 725-742, Jan. 2014.

ELGHARABLY, H. et al. Current Hypotheses in Cardiac Surgery: Biofilm in Infective Endocarditis. **Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery**, Philadelphia, v. 28, n. 1, p. 56-59, Spring 2016.

ELSAYED, M. S.; MAHMOUD EL-BAGOURY, A. E.; DAWOUD, M. A. Phenotypic and genotypic detection of virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and subclinical mastitis in cattle and water buffaloes from different farms of Sadat City in Egypt. **Veterinary World**, v. 8, n. 9, p. 1051-1058, Sept. 2015.

ENRIGHT, M. C. et al. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 3, p. 1008-1015, Mar. 2000.

FALUGI, F. et al. Role of protein A in the evasion of host adaptive immune responses by *Staphylococcus aureus*. **mBio**, Washington, v. 4, n. 5, p. 1-9, Aug. 2013.

FEDHILA, S.; NEL, P.; LERECLUS, D. The InhA2 metalloprotease of *Bacillus thuringiensis* strain 407 is required for pathogenicity in insects infected via the oral route. **Journal of bacteriology**, Washington, v. 184, n. 12, p. 3296-3304, June 2002.

FERREIRA, D. de C. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in HIV patients: Risk factors associated with colonization and/or infection and methods for characterization of isolates – a systematic review. **Clinics**, São Paulo, v. 69, n. 11, p. 770-776, Nov. 2014.

FERRY, T. et al. Virulence determinants in *Staphylococcus aureus* and their involvement in clinical syndromes. **Current Infectious Disease Reports**, v. 7, n. 6, p. 420-428, Nov. 2005.

FLUIT, A. C. Livestock-associated *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, v. 18, n. 8, p. 735-744, Aug. 2012.

FOSTER, T. J. Colonization and infection of the human host by staphylococci: adhesion, survival and immune evasion. **Journal of Veterinary Dermatology**, v. 20, n. 5-6, p. 456-470, Oct. 2009.

- FOSTER, T. J. et al. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 12, n. 1, p. 49-62, Jan. 2014.
- FOSTER, T. J. Immune Evasion by Staphylococci. **Nature reviews Microbiology**, London, v. 3, n. 12, p. 948-958, Dec. 2005.
- FREITAK, D. et al. The maternal transfer of bacteria can mediate transgenerational immune priming in insects. **Virulence**, v. 5, n. 4, p. 547-554, May 2014.
- FREITAS, A. B. de. et al. *Staphylococcus aureus* resistentes em animais de companhia. **Revista Eletrônica Novo Enfoque**, v. 16, n. 16, p. 95-101, 2013.
- FREITAS, M. F. L. de. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus coagulase* positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 2, p. 171- 177, abr./jun. 2005.
- GAO, W. et al. Two Novel Point Mutations in Clinical *Staphylococcus aureus* Reduce Linezolid Susceptibility and Switch on the Stringent Response to Promote Persistent Infection. **PloS Pathogens**, San Francisco, v. 6, n. 6, June 2010.
- GOERING, R. V. Pulsed field gel electrophoresis: A review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. **Infection, genetics and evolution**, Amsterdam, v. 10, n. 7, p. 866-875, Oct. 2010.
- GOGOI-TIWARI, J. et al. Relative distribution of virulence-associated factors among Australian bovine *Staphylococcus aureus* isolates: Potential relevance to development of an effective bovine mastitis vaccine. **Virulence**, v. 6, n. 5, p. 419-423, June 2015.
- GREENLEE-WACKER, M. C. et al. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by human neutrophils prevents macrophage efferocytosis and induces programmed necrosis. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 192, n. 10, p. 4709-4717, May 2014.
- HAIR, P. S. et al. Clumping factor A interaction with complement factor I increases C3b cleavage on the bacterial surface of *Staphylococcus aureus* and decreases complement-mediated phagocytosis. **Infection and immunity**, Washington, v. 78, n. 4, p. 1717-1727, Apr. 2010.
- HAUPT, K. et al. The *Staphylococcus aureus* protein Sbi acts as a complement inhibitor and forms a tripartite complex with host complement Factor H and C3b. **PloS Pathogens**, San Francisco, v. 4, n. 12, p. 1-13, Dec. 2008.
- HÉBERT, A. et al. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 193, n. 1, p. 57-62, Dec. 2000.

- HOGVEEN H, et al. Economic aspects of mastitis: new developments. **New Zealand Veterinary Journal**, Wellington, v. 59, n.1, p. 16-23, Jan. 2011.
- HOLMES, A. et al. Comparison of two multilocus variable-number tandem-repeat methods and pulsed-field gel electrophoresis for differentiating highly clonal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 48, n. 10, p. 3600-3607, Oct. 2010.
- IQBAL, Z. et al. Comparative virulence studies and transcriptome analysis of *Staphylococcus aureus* strains isolated from animals. **Scientific Reports**, v. 6, n. 35442, p. 1-12, Oct. 2016.
- JAMALI, H. et al. Invited review: Incidence, risk factors, and effects of clinical mastitis recurrence in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 101, n. 6, p. 4729-4746, June 2018.
- JANDER, G.; RAHME, L. G.; AUSUBEL, F. M. Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 182, n. 13, p. 3843-3845, July 2000.
- JIN, T. et al. *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 172, n. 2, p. 1169-1176, Jan. 2004.
- KANG, M. et al. Collagen-binding microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule (MSCRAMM) of Gram-positive bacteria inhibit complement activation via the classical pathway. **Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 288, n. 28, p. 20520-20531, July 2013.
- KARAVOLOS, M. H. et al. Role and regulation of the superoxide dismutases of *Staphylococcus aureus*. **Microbiology**, Reading, v. 149, n. 10, p. 2749-2758, Oct. 2003.
- KARYNSKI, M. et al. Molecular surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by multiple-locus variable number tandem repeat fingerprinting (formerly multiple-locus variable number tandem repeat analysis) and *spa* typing in a hierarchic approach. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 62, n. 3, p. 255-262, Nov. 2008.
- KEEFE, G. Update on Control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. **The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Madison, v. 28, n. 2, p. 203-2016, July 2012.
- KEMP, M. W.; MASSEY, R. C. The use of insect models to study human pathogens. **Drug Discovery Today**, Oxford, v. 4, n. 3, p. 105-110, Autumn 2007.

KLEIN, R. C. et al. *Staphylococcus aureus* of bovine origin: genetic diversity, prevalence and the expression of adhesin-encoding genes. **Veterinary Microbiology**, v. 160, n. 1-2, p. 183-188, Nov. 2012.

KOT, B. et al. Virulence gene profiles in *Staphylococcus aureus* isolated from cows with subclinical mastitis in eastern Poland. **The Journal of Dairy Research**, v. 83, n. 2, p. 228-235, May 2016.

KROPEC, A. et al. Poly-N-acetylglucosamine production in *Staphylococcus aureus* is essential for virulence in murine models of systemic infection. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, n. 10, p. 6868–6876, Oct. 2005.

KRYSKO, O. et al. Alternatively activated macrophages and impaired phagocytosis of *S. aureus* in chronic rhinosinusitis. **Allergy**, Copenhagen, v. 66, n. 3, p. 396-403, Mar. 2011.

LAARMAN, A. J. et al. *Staphylococcus aureus* metalloprotease aureolysin cleaves complement C3 to mediate immune evasion. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 186, n. 11, p. 6445-6453, June 2011.

LANGONI, H. et al. Aspectos citológicos e microbiológicos do leite em propriedades no sistema orgânico de produção. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 11, p. 881-886, nov. 2009.

LEONARD, F. C.; MARKEY, B. K. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: a review. **The Veterinary Journal**, London, v. 175, n. 1, p. 27-36, Jan. 2008.

LI, D. D. et al. Using *Galleria mellonella*-*Candida albicans* Infection Model to Evaluate Antifungal Agents. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 36, n. 9, p. 1482-1487, 2013.

LI, Z. et al. Immunomodulation and Disease Tolerance to *Staphylococcus aureus*. **Pathogens**, Basel, v. 4, n. 4, p. 793-815, Nov. 2015.

LIONAKIS, M. S. *Drosophila* and *Galleria* insect model hosts: new tools for the study of fungal virulence, pharmacology and immunology. **Virulence**, v. 2, n. 6, p. 521-527, Nov./Dec. 2011.

LISTER, J. L.; HORSWILL, A. R. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lausanne, v. 4, n. 178, p. 1-9, Dec. 2014.

LIU, G. Y. et al. *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. **Journal of experimental medicine**, New York, v. 202, n. 2, p. 209-215, July 2005.

- LÖFFLER, B. et al. Staphylococcus aureus persistence in non-professional phagocytes. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 304, n. 2, p. 170-176, Mar. 2014.
- LUCZAK-KADLUBOWSKA, A. et al. Usefulness of multiple-locus VNTR fingerprinting in detection of clonality of community- and hospitalacquired *Staphylococcus aureus* isolates. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 94, n. 4, p. 543-53, Nov. 2008.
- MAGRO, G. et al. An explant of heifer mammary gland to study the immune response of the organ. **Research in Veterinary Science**, London, v. 114, p. 44-50, Oct. 2017.
- MALACHOWA, N. et al. Comparison of multiple-locus variablenumber tandem-repeat analysis with pulsed-field gel electrophoresis, spa typing, and multilocus sequence typing for clonal characterization of *Staphylococcus aureus* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 7, p. 3095-3100, July 2005.
- MALACHOWA, N.; DELEO, F. R. *Staphylococcus aureus* survival in human blood. **Virulence**, v. 2, n. 6, p. 567-569, Nov./Dec. 2011.
- MARTINS, R. P. et al. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá, MT. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 1, p. 181-187, jan./mar. 2010.
- MCCARTHY, A. J.; LINDSAY, J. A. *Staphylococcus aureus* innate immune evasion is lineage-specific: a bioinformatics study. **Infection, genetics and evolution**, Amsterdam, v. 19, p. 7-14, Oct. 2013.
- MCGONIGLE, J. E.; PURVES, J.; ROLFF, J. Intracellular survival of *Staphylococcus aureus* during persistent infection in the insect *Tenebrio molitor*. **Developmental and Comparative Immunology**, Elmsford, v. 59, p. 34-38, June 2016.
- MELCHIOR, M. B.; VAARKAMP, H.; FINK-GREMMELS, J. Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? **The Veterinary Journal**, London, v. 171, n. 3, p. 398-407, May 2006.
- MITRA, S. D. et al. *Staphylococcus aureus* spa type t267, clonal ancestor of bovine subclinical mastitis in India. **Journal of applied microbiology**, Oxford, v.114, n. 6, p.1604-1615, June 2013.
- MULLER, E. E. et al. Estudo da Prevalência de Mastite Bovina. **Semina**, Porto Alegre, v. 2, n. 1, p.47-48, abr. 1978.
- MYLONAKIS, E. et al. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, n. 7, p. 3842-3850, July 2005.

- NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Microbiological Procedures for Diagnosis of Bovine Udder Infection and Determination of Milk Quality**, 4. ed. Madison: WI, NMC Inc., 2004. p. 1-47.
- NEEDHAM, A. J. et al. *Drosophila melanogaster* as a model host for *Staphylococcus aureus* infection. **Microbiology**, Washington, v. 150, p. 2347-2355, July 2004.
- NIELSEN-LEROUX, C. et al. How the insect pathogen bacteria *Bacillus thuringiensis* and *Xenorhabdus/Photorhabdus* occupy their hosts. **Current Opinion in Microbiology**, New York, v. 15, n. 3, p. 220-231, June 2012.
- NOTEBAERT, S.; MEYER, E. Mouse models to study the pathogenesis and control of bovine mastitis. A review. **The Veterinary quarterly**, v. 28, n. 1, p. 2-13, Mar. 2006.
- NSOFOR, C. A. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): principles and applications in molecular epidemiology: a review. **International Journal of Current Research in Medical Sciences**, v. 2, n. 2, p. 38-51, 2016.
- PARTHUISOT, N.; ROUQUETTE, J. FERDY, J. -B. A high-throughput technique to quantify pathogens' virulence on the insect model *Galleria mellonella*. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 152, p. 69-72, Sept. 2018.
- PAUL, I.; GANGULY, S. Bovine mastitis, an economically important bacterial infection of udder in cattle: A review. **Indian Journal of Scientific Research**, v. 2, n. 2, p. 1-2, 2014.
- PELEG, A. Y. et al. Reduced Susceptibility to Vancomycin Influences Pathogenicity in *Staphylococcus aureus* Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 4, p. 532-536, Feb. 2009.
- PEREIRA, M. F. et al. *Galleria mellonella* is an effective model to study *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. **Microbiology**, Reading, v. 161, p. 387-400, Feb. 2015.
- PERES, A. G.; MADRENAS, J. The broad landscape of immune interactions with *Staphylococcus aureus*: From commensalism to lethal infections. **Burns**, Guildford, v. 39, n. 3, p. 380-388, May 2013.
- PETERSSON-WOLFE, C. S.; MULLARKY, I. K.; JONES, G. M. *Staphylococcus aureus* Mastitis: Cause, Detection and Control. **Virginia Tech Invent the Future**. Communications and Marketing, College of Agriculture and Life Sciences, Virginia Polytechnic Institute and State University, 2010.
- PETON, V.; LE LOIR, Y. *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. **Infection, genetics and evolution**, Amsterdam, v. 21, p. 602-615, Jan. 2014.

- PRAT, C. et al. A new staphylococcal antiinflammatory protein that antagonizes the formyl peptide receptor-like 1. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 177, n. 11, p. 8017-8026, Dec. 2006.
- PROCTOR, R. A. et al. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. **Nature Reviews. Microbiology**, London, v. 4, n. 4, p. 295–305, Apr. 2006.
- PURVES, J. et al. Comparison of the Regulation, Metabolic Functions, and Roles in Virulence of the Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Homologues *gapA* and *gapB* in *Staphylococcus aureus*. **Infection and immunity**, Washington, v. 78, n. 12, p. 5223-5232, Dec. 2010.
- QUIBLIER, C. et al. Secretome analysis defines the major role of SecDF in *Staphylococcus aureus* virulence. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 5, p. 1-12, May 2013.
- RAINARD, P. et al. Knowledge gaps and research priorities in *Staphylococcus aureus* mastitis control. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, n. S1, p. 1-17, Oct. 2017.
- RAMARÃO, N.; NIELSEN-LEROUX, C.; LERECLUS, D. The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. **Journal of visualized experiments: JoVE**, v. 70, n. e4362, p. 1-7, Dec. 2012.
- REINOSO, E. et al. Bovine and rabbit models for the study of a *Staphylococcus aureus* avirulent mutant strain, RC122. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 66, n. 4, p. 285-288, Oct. 2002.
- REYES-ROBLES, T. et al. *Staphylococcus aureus* leukotoxin ED targets the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 to kill leukocytes and promote infection. **Cell Host & Microbe**, Cambridge, v. 14, n. 4, p. 453-459, Oct. 2013.
- RICHARDSON, A. R.; DUNMAN, P. M.; FANG, F. C. The nitrosative stress response of *Staphylococcus aureus* is required for resistance to innate immunity. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 61, n. 4, p. 927-939, Aug. 2006.
- ROOIJAKKERS, S. H. et al. Anti-opsonic properties of staphylokinase. **Microbes and infection**, Paris, v. 7, n. 3, p. 476-484, Mar. 2005.
- ROSENBACH, A. J. Mikro-Organismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen. **Wiesbaden, J.F. Bergmann**, p. 18, 1884.
- RUEGG, P. L. New perspectives in udder health management. **The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Madison, v. 28, n. 2, p. 149-163, July 2012.
- SABAT, A. et al. Comparison of PCR-Based Methods for Typing *Staphylococcus aureus* Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 10, p. 3804-3807, Oct. 2006.

SABAT, A. et al. New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 4, p. 1801-1804, Apr. 2003.

SABAT, A. J. et al. Microfluidic-Chip-Based Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Fingerprinting with New Primer Sets for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 50, n. 7, p. 2255-2262, July 2012.

SABAT, A. J. et al. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. **European Surveillance**, v.18, n. 4, p. 20380, Jan. 2013.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L.F. L. **Estratégias para Controle de Mastite e Melhoria na Qualidade do Leite**. Barueri: Manole, 2007, 307p.

SCALI, F. et al. Which are important targets in development of *Staphylococcus aureus* mastitis vaccine? **Research in Veterinary Science**, London, v. 100, p. 88-99, June 2015.

SCHUKKEN, Y. H. et al. Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 144, n. 3-4, p. 270-289, Dec. 2011.

SENDI, P.; PROCTOR, R. A. *Staphylococcus aureus* as an intracellular pathogen: the role of small colony variants. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 17, n. 2, p. 54-58, Feb. 2009.

SHARMA-KUINKEL, B. K. et al. Potential Influence of *Staphylococcus aureus* Clonal Complex 30 Genotype and Transcriptome on Hematogenous Infections. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 2, n. 3, p. 1-13, June 2015.

SHOPSIN, G. M. et al. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 11, p.3556-63, Nov. 1999.

SIEPRAWSKA-LUPA, M. et al. Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 48, n. 12, p. 4673-4679, Dec. 2004.

SILVA, L. O. et al. Repair of Iron Centers RIC protein contributes to the virulence of *Staphylococcus aureus*. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 312-317, Jan. 2018.

SINGH, R. et al. Role of persisters and small-colony variants in antibiotic resistance of planktonic and biofilm-associated *Staphylococcus aureus*: an *in vitro* study. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 58, n. 8, p. 1067–1073, Aug. 2009.

SMITH, E. J. et al. The Sbi protein is a multifunctional immune evasion factor of *Staphylococcus aureus*. **Infection and immunity**, Washington, v. 79, n. 9, p. 3801-3809, Sept. 2011.

SMITH, E. M. et al. Multilocus sequence typing of intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 9, p. 4737-4743, Sept. 2005.

SOBRAL, D. et al. High throughput multiple locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) of *Staphylococcus aureus* from human, animal and food sources. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 5, p. 1-11, May 2012.

SOMMERHÄUSER, J. et al. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 96, n. 1, p. 91-102, Oct. 2003.

SRENIK, M. E. et al., Characterisation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from mastitis bovine milk in Argentina. **The Journal of Dairy Research**, v. 85, n. 1, p. 57-63, Feb. 2018.

STRAND, M. R. The insect cellular immune response. **Insect Science**, v. 15, n. 1, p. 1-14, Jan. 2008.

TAKANO, T. et al. Novel Characteristics of Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Belonging to Multilocus Sequence Type 59 in Taiwan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 3, p. 837-845, Mar. 2008.

TENOVER, F. C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 9, p. 2233-2239, Sept. 1995.

THURLOW, L. R. et al. *Staphylococcus aureus* biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation in vivo. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 186, n. 11, p. 6585–6596, June 2011.

TIMMONS, C. et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for strain discrimination of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 125, p. 70-80, June 2016.

TONG, S. Y. et al. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 28, n. 3, p. 603-661, July 2015.

TORTORA, G. J; FUNKE, B. R; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TOZZETTI, D. S.; BATAIER, M. N.; ALMEIDA, L. R. Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas – Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n.10, 2008.

VAN BELKUM, A. et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, v. 13, Suppl. 3, p. 1-46, Oct. 2007.

WANG, D. et al. Bovine mastitis *Staphylococcus aureus*: antibiotic susceptibility profile, resistance genes and molecular typing of methicillin-resistant and methicillin-sensitive strains in China. **Infection, genetics and evolution**, Amsterdam, v. 31, p. 9-16, Apr. 2015.

WATTS, A. et al. *Staphylococcus aureus* strains that express serotype 5 or serotype 8 capsular polysaccharides differ in virulence. **Infection and immunity**, Washington, v. 73, n. 6, p. 3502-3511, June 2005.

WHELEHAN, C. J. et al. Experimental *Staphylococcus aureus* infection of the mammary gland induces region-specific changes in innate immune gene expression. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 140, n. 3-4, p. 181-189, Apr. 2011

WOJDA, I. Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. **Insect Science**, v. 24, n. 3, p. 342-357, June 2017.

WOLF, C. et al. Genomic and proteomic characterization of *Staphylococcus aureus* mastitis isolates of bovine origin. **Proteomics**, Weinheim, v.11, n.12, p. 2491-2502, June 2011.

ZADOKS, R. N. et al. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking equipment and bovine Milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis and binary typin. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 11, p. 3894-3902, Nov. 2002.

ZANETTE, E.; SCAPIN, D.; ROSSI, E. M. Suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de bovinos com suspeita de mastite. **Unoesc & Ciência – ACBS**, Joaçaba, v. 1, n. 1, p. 65-70, jan./jun. 2010.

ZIEGLER, C. et al. The dynamics of T cells during persistent *Staphylococcus aureus* infection: From antigen-reactivity to in vivo anergy. **EMBO molecular medicine**, Chichester, v. 3, n. 11, p. 652-666, Nov. 2011.

1 **SEGUNDA PARTE – ARTIGOS À SUBMISSÃO**

2 **ARTIGO 1 – Normas da Revista Ciência Rural**

3 **Caracterização fenotípica de *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina por meio da**
4 **infecção experimental em *Galleria mellonella***

5 **Phenotypic characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis by**
6 **means of the experimental infection in *Galleria mellonella***

7

8 **RESUMO**

9 A bactéria *Staphylococcus aureus* é um patógeno responsável por uma diversidade de
10 doenças em seres humanos e animais. Nos bovinos, ela é um dos principais agentes causadores de
11 mastite, levando a prejuízos econômicos expressivos para os produtores e laticínios, portanto,
12 trabalhos que visem o conhecimento da patogênese desse agente são de grande importância.
13 *Galleria mellonella* tem se destacado como um modelo animal invertebrado para o estudo de
14 diferentes agentes bacterianos, mostrando características favoráveis como um baixo custo e
15 facilidade de manutenção nos laboratórios, quando comparada a modelos mamíferos. Os objetivos
16 desse trabalho foram utilizar o modelo de infecção experimental em larvas de *G. mellonella* para
17 determinar diferenças fenotípicas de virulência em dez isolados de *S. aureus* geneticamente
18 diversos, provenientes de mastite clínica e subclínica em bovinos. Após a infecção experimental,
19 foram avaliadas a sobrevivência das larvas até 72 horas, a contagem de *S. aureus* na hemolinfa em
20 1, 2, 4, 18 e 24 horas, a intensidade da melanização do vaso dorsal do inseto e as características
21 teciduais por meio da histologia, 4 horas após a infecção. Os resultados da análise de sobrevivência

1 demonstraram diferenças evidentes nos fenótipos de virulência, permitindo distinguir isolados com
2 alta, intermediária e baixa virulência. Os exames histológicos mostraram que todos os isolados
3 foram capazes de induzir uma resposta imune nas larvas, com a formação de nódulos e pontos de
4 melanização. Este é o primeiro trabalho utilizando larvas de *G. mellonella* para avaliar a virulência
5 em cepas de *S. aureus* molecularmente distintos, causadores de mastite clínica e subclínica. Os
6 resultados apresentados aqui fornecerão subsídios para outros trabalhos, nos quais esses isolados
7 serão estudados de forma mais intensa, identificando pontos que auxiliem no desenvolvimento de
8 novas alternativas para controle e prevenção da mastite bovina.

9
10 **Palavras-chave:** *S. aureus*, vacas, *G. mellonella*, patogênese

11
12 **ABSTRACT**

13 The bacterium *Staphylococcus aureus* is a pathogen involved in a diversity of diseases in
14 humans and animals. In dairy cattle, it is one of the main agents causing mastitis, leading to
15 significant economic losses for producers and dairy industries, therefore, works aimed the
16 knowledge of pathogenesis of this agent are of great importance. *Galleria mellonella* has been
17 highlighted as an invertebrate animal model for the study of different bacterial agents, showing
18 favorable characteristics as a low cost and ease of maintenance in laboratories when compared to
19 mammalian models. The objectives of this work were to use the experimental infection model in
20 *G. mellonella* larvae to determine phenotypic virulence differences in ten genetically diverse *S.*
21 *aureus* isolates from clinical and subclinical mastitis in cattle. After the experimental infection the

1 survival of the larvae was evaluated up to 72 hours, the count of *S. aureus* in the hemolymph at 1,
2 2, 4, 18 and 24 hours, the intensity of melanization of the dorsal vessel of the larvae and the tissue
3 characteristics through histology, 4 hours after infection. The results of the survival analysis
4 showed evident differences in virulence phenotypes, allowing to distinguishing isolates with high,
5 intermediate and low virulence. Histological tests showed that all the isolates were able to induce
6 an immune response in the larvae, with the formation of nodules and melanization points. This is
7 the first work using *G. mellonella* larvae to evaluate strains of *S. aureus* molecularly distinct
8 isolated from clinical and subclinical mastitis cases. The results presented here will provide
9 subsidies for other studies, in which these isolates will be studied more intensely, identifying points
10 that help in the development of new alternatives for the control and prevention of bovine mastitis.

11 **Key words:** *S. aureus*, cows, *G. mellonella*, pathogenesis.

12

13 INTRODUÇÃO

14

15 *Staphylococcus aureus* é uma bactéria responsável por múltiplas patologias em seres
16 humanos e animais. Em seres humanos é capaz de causar desde doenças simples como infecções
17 de pele até endocardites, osteomielites e septicemia (TONG et al., 2015). Nos animais, também é
18 um patógeno importante, responsável, por exemplo, por quadros de bacteremia em cães e equinos
19 (LEONARD & MARKEY, 2008), infecções pós cirúrgicas em equinos (VAN DUIJKEREN et al.,
20 2010), infecções de pele em gatos (ABRAHAM et al., 2007), mastite em cabras, ovelhas
21 (PORRERO et al., 2012) e em bovinos (WANG et al., 2015).

1 A mastite bovina é a doença economicamente mais importante na bovinocultura leiteira
2 devido ao grande impacto econômico causado nas propriedades e indústrias de laticínios (BAR-
3 GAL et al., 2015). Os prejuízos ocasionados nas propriedades estão relacionados com a queda na
4 produção de leite, leite descartado de animais em tratamento, gastos com medicamentos,
5 substituição precoce de vacas e, eventualmente, morte de animais doentes. Nos laticínios, as perdas
6 advêm de alterações nas características físico-químicas do leite, como a redução de gordura e
7 caseína, além de aumentar a contagem de células somáticas, levando a perda de rendimento dos
8 produtos lácteos (PETON & LE LOIR, 2014).

9 *S. aureus* encontra-se entre os agentes etiológicos mais comuns da mastite no Brasil
10 (BRITO et al., 1999; COSTA, 2008; SILVA et al., 2013) e no mundo (WANG et al., 2015), sendo
11 responsável por casos clínicos, subclínicos e quadros crônicos com manifestações clínicas
12 ocasionais de difícil controle (RUEGG, 2012). A patogênese da mastite bovina por esse agente é
13 complexa, envolve múltiplos fatores de virulência que favorecem sua sobrevivência e
14 multiplicação na glândula mamária (ZECCONI & SCALI, 2013). Há uma necessidade de se
15 conhecer melhor o processo de infecção por *S. aureus* no microambiente do úbere, visando
16 compreender a relação patógeno-hospedeiro, o que possibilitará desenvolver formas mais efetivas
17 de controle e prevenção para a doença. Diversos estudos foram realizados *in vitro* focando a
18 virulência e patogênese deste agente (KLEIN et al., 2012; CREMONESI et al., 2015; ELSAYED
19 et al., 2015; GOGOI-TIWARI et al., 2015), contudo, são poucos os estudos baseados em dados *in*
20 *vivo* ou *ex vivo*, avaliando, por exemplo, a patologia causada por diferentes isolados (RAINARD
21 et al., 2017).

1 Estudos de virulência em *S. aureus* podem ser realizados em vários modelos como culturas
2 de células (IQBAL et al., 2016), tecido (explante) de glândula mamária (MAGRO et al., 2017),
3 animais vertebrados como camundongos (BENTON et al., 2004) e coelhos (REINOSO et al., 2002)
4 e invertebrados como *Drosophila melanogaster* (NEEDHAM et al., 2004), *Tenebrio molitor*
5 (MCGONIGLE et al., 2016) e *G. mellonella* (SHARMA-KUINKEL et al., 2015). Os modelos
6 invertebrados, quando comparados aos vertebrados, são mais baratos, mais fáceis de estabelecer e
7 de se manter nos laboratórios, podem ainda ser criados em larga escala e não estão sujeitos as
8 mesmas considerações éticas (RAMARÃO et al., 2012).

9 Neste contexto, o uso de larvas de *G. mellonella* tem se destacado em estudos de
10 patogênese e de virulência para diferentes espécies microbianas, pois, além das vantagens citadas,
11 permitem incubação a 37°C (temperatura ideal de crescimento de vários patógenos) e são
12 relativamente grandes, facilitando a manipulação (LIONAKIS, 2011). Além disto, a resposta
13 imune inata (celular e humoral) em *G. mellonella* apresenta características semelhantes à resposta
14 imune nos vertebrados. Em *G. mellonella*, a resposta celular é mediada por hemócitos e envolve
15 processos como fagocitose, nodulação e coagulação. As defesas humorais são compostas de
16 moléculas efetoras solúveis, como peptídeos antimicrobianos, proteínas *complement-like* e
17 produtos criados por cascatas proteolíticas, como a via da fenoloxidasas, capazes de imobilizar ou
18 destruir patógenos (HULTMARK, 1993; LAVINE & STRAND, 2002; STRAND, 2008). Essa
19 resposta pode ser mensurada e parcialmente comparada a resposta imune dos mamíferos pois, tem
20 sido demonstrado que cepas atenuadas em modelos mamíferos demonstram menor virulência em
21 *G. mellonella* e cepas que causam infecções graves também são altamente virulentas para as larvas

1 (JANDER et al., 2000; MYLONAKIS et al., 2005; PELEG et al., 2009; SHARMA-KUINKEL et
2 al., 2015). O objetivo desse trabalho foi utilizar o modelo de infecção experimental em larvas de
3 *G. mellonella* para determinar diferenças fenotípicas de virulência em 10 isolados de *S. aureus*
4 geneticamente diversos, provenientes de mastite clínica e subclínica em bovinos.

5

6 MATERIAL E MÉTODOS

7 1 – Isolados bacterianos:

8 No presente estudo, foram utilizados isolados provenientes de nove rebanhos bovinos
9 leiteiros do Estado de Minas Gerais, Brasil, sendo quatro isolados provenientes de casos de mastite
10 clínica e seis de mastite subclínica. A caracterização fenotípica dos isolados foi realizada por meio
11 de testes de triagem que incluíram a morfologia macroscópica e microscópica, testes de catalase,
12 oxidase, coagulase e produção de acetoina (teste de *Voges Proskauer*), realizados e interpretados
13 segundo o NATIONAL MASTITIS COUNCIL (2004). A identificação genotípica também foi
14 realizada em estudo prévio (COSTA et al., 2012), sendo baseada em reação em cadeia da
15 polimerase (PCR) espécie-específica para o gene *femA*. Os isolados permaneceram estocados em
16 caldo glicerinado, em ultrafreezer à temperatura de -70°C , até a execução dos testes.

17 Para a escolha dos 10 isolados que foram utilizados neste ensaio foram realizados testes
18 de triagem em *G. mellonella*, utilizando-se doses infectantes de 10^5 a 10^8 UFC/larva, em 30 isolados
19 pertencentes a mesma coleção. Esta triagem possibilitou identificar isolados dotados de alta e baixa
20 virulência e definir a dose de 10^6 UFC/larva (que permitiu avaliar a diferença entre isolados de
21 diferentes virulências) que seria utilizada no estudo de virulência para as larvas de *G. mellonella*.

2 – Análises fenotípicas em larvas de *G. mellonella*

As análises foram baseadas em infecção experimental das larvas, sendo avaliadas: a sobrevivência das larvas até 72 horas pós inoculação; o desenvolvimento de *S. aureus* na hemolinfa nos tempos de 1, 2, 4, 18 e 24 horas após a infecção; a resposta imunológica de *G. mellonella* pela visualização macroscópica da intensidade da melanização do vaso dorsal e o exame histológico de larvas de cada um dos tratamentos quatro horas após a infecção experimental.

As larvas dos insetos foram fornecidas pelo Laboratório de Parasitologia da Embrapa – CNPGL (Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Leite) e foram criados com dieta artificial a 25°C até o início dos experimentos.

2.1 - Preparo dos inóculos e inoculações

Os isolados de *S. aureus* foram cultivados em Ágar sangue e incubados a 37°C por 24 horas e em seguida colônias isoladas foram transferidas para 5 mL de caldo Mueller Hinton (Himedia® França), até atingir a DO (densidade óptica) de 0,1 a 620 nm. Foram então incubadas a 37°C por 4 horas, para atingir a fase exponencial de crescimento. As culturas (1 mL) foram lavadas três vezes com PBS (*Phosphate Buffered Saline*) estéril, realizando-se centrifugações a 12000 x g por 3 minutos entre as lavagens e a DO foi mensurada para garantir a inoculação de 10⁶ UFC/larva. Uma DO de 0,12 era considerada ideal. Uma alíquota de 10 µL, correspondentes a 10⁶ UFC de cada isolado foi injetada na última *proleg* esquerda das larvas, utilizando-se seringas de insulina BD (BD-Becton Dickinson®, Estados Unidos). Todas as larvas utilizadas se encontravam no último instar de desenvolvimento e pesavam de 250 a 300 mg. Grupos de larvas não infectadas (CONTROLE) e de larvas inoculadas apenas com PBS foram utilizados como controle dos testes.

1 Larvas inoculadas com a amostra *S. aureus* ATCC29213, já descrita como bastante virulenta neste
2 modelo (PELEG et al., 2009), foram utilizadas como controles positivos.

3 Em todos os experimentos foram utilizados 13 tratamentos, incluindo *S. aureus*
4 ATCC29213, CONTROLE, PBS, *S. aureus* 4S-158, *S. aureus* 12C-525, *S. aureus* 13C-561, *S.*
5 *aureus* 16S-717, *S. aureus* 16S-721, *S. aureus* 17S-762, *S. aureus* 19C-828, *S. aureus* 23C-999, *S.*
6 *aureus* 31S-1443 e *S. aureus* 36S-1698. Após a preparação dos inóculos e inoculações, as larvas
7 eram acondicionadas em placas de Petri forradas com papel filtro, protegidas da luz e incubadas
8 em estufa bacteriológica a 37°C. O número de larvas utilizado, o tempo de incubação e os períodos
9 de observação estão descritos nos próximos itens por serem distintos entre os diferentes
10 experimentos realizados. Em todos os ensaios de infecção experimental, ao fim das inoculações,
11 parte do inóculo era plaqueado em Ágar Mueller Hinton (Himedia® França) para contagem e
12 confirmação da dose inoculada (10^6 UFC/larva). Após as inoculações, a alimentação das larvas era
13 suspensa em todos os tratamentos.

14 2. 2- Testes de sobrevivência após desafio

15 Após a preparação dos inóculos e inoculações, conforme descrito no item 2.1, grupos de
16 10 larvas em cada um dos tratamentos foram acondicionadas em placas de Petri forradas com papel
17 filtro, as placas também foram protegidas da luz e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por
18 72 horas. As placas foram observadas a cada 24 horas, larvas mortas eram removidas e os
19 resultados registrados. Larvas foram consideradas mortas se não apresentassem nenhum
20 movimento em resposta à estímulo. Os resultados foram analisados pelo programa SigmaPlot
21 versão 14.0 (Systat Software, Inc®, Estados Unidos), utilizando-se o método de Kaplan-Meier.

1 Diferenças nas taxas de sobrevivência foram calculadas pelo teste de Log-rank e comparações
2 múltiplas realizadas pelo método de Holm-Sidak, com nível de significância de 5%. Estas análises
3 permitiram definir isolados de alta, média e baixa virulência, bem como estabelecer as curvas de
4 sobrevivência. Os experimentos foram realizados em triplicata biológica e experimental (n=10
5 larvas por réplica, totalizando 90 larvas por tratamento).

6 2.3 - Quantificação de *S. aureus* na hemolinfa após desafio

7 A quantificação do isolado inoculado nas larvas foi realizada nos tempos de 1, 2, 4, 18 e
8 24 horas após a infecção em cada um dos tratamentos. Antes da coleta da hemolinfa, as larvas
9 permaneciam durante 5 minutos em gelo, 5 minutos em álcool 70% e 5 minutos em PBS estéril.
10 Uma perfuração era realizada na parte posterior da larva, próximo às últimas *prolegs*, com auxílio
11 de uma agulha. Uma leve compressão era realizada no corpo da larva e 20 µl de hemolinfa eram
12 coletados de cada larva com auxílio de pipeta automática. Para cada um dos tratamentos, em cada
13 um dos tempos, eram coletadas amostras de três larvas. A hemolinfa coletada era diluída em série,
14 uma alíquota de cada diluição plaqueada em Ágar sal manitol (Kasvi[®], Brasil) e incubada a 37°C
15 por 24 horas para contagem. A contagem de UFC foi determinada por meio da técnica de
16 microgotas, determinando a quantidade de bactérias recuperadas em cada tempo em um volume de
17 10 µl (mesmo volume injetado). Os resultados foram analisados pelo programa Sisvar (UFLA,
18 Brasil) por meio do Teste de Tukey, no qual um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente
19 significativo.

20 2.4 - Avaliação da intensidade da melanização do vaso dorsal e exames histológicos

1 Seguindo a metodologia descrita no item 2.1, um grupo de cinco larvas para cada
2 tratamento foi mantido em estufa bacteriológica a 37°C por 4 horas. Após esse período, a
3 melanização do vaso dorsal foi avaliada macroscopicamente e registrada fotograficamente.

4 Após o registro das fotografias, três larvas em cada tratamento foram seccionadas em sua
5 porção posterior do corpo com auxílio de tesoura e fixadas em solução de PBS contendo 10% de
6 formaldeído, para preparação das lâminas histológicas. As amostras foram desidratadas em uma
7 série de etanol crescente (70 – 100%) e incorporadas em parafina. Os blocos foram seccionados
8 (3-4 mm) em micrótomo (Leica Biosystems®), sendo os cortes montados em lâminas de
9 microscopia e corados com hematoxilina e eosina. A formação de nódulos, regiões de melanização
10 nos corpos gordurosos e nas células pericárdicas foram analisadas para os diferentes isolados
11 testados, bem como a integridade dos tecidos foi avaliada nos grupos CONTROLE e PBS. Imagens
12 foram registradas em fotografias sob microscopia óptica.

13 3 – Caracterização molecular dos isolados por *Pulsed-field Gel Electrophoresis* (PFGE)

14 A técnica de PFGE foi utilizada para avaliar a diversidade genética das amostras, sendo
15 utilizado um dispositivo de campo elétrico homogêneo (CHEF DRII, Bio-Rad®, Estados Unidos).
16 As amostras foram semeadas em Ágar BHI (*brain heart infusion*) (Sigma-Aldrich®, Índia) e
17 incubadas em estufa bacteriológica durante 18 h a 37° C. No dia seguinte uma colônia isolada de
18 cada amostra foi transferida para tubos contendo três mL de caldo BHI (*brain heart infusion*)
19 (Sigma-Aldrich®, Índia) e novamente incubadas em estufa bacteriológica a 37° C por 20 a 24 horas.
20 Os *pellets* foram obtidos por centrifugação de 650 µl das culturas a 12000g durante três minutos e
21 ressuspensas em 350 µl de TE (10mM Tris HCl, 5 mM EDTA, pH 8,0). Em cada amostra foi

1 adicionado 350 µl de agarose *low melting* (Bio-Rad[®], Estados Unidos) fundida a 2% e mantida a
2 55°C até o momento do uso, essa mistura foi utilizada para preencher os moldes. Os *plugs*, após a
3 solidificação, foram incubados por no mínimo 4 horas a 37°C em Tampão EC (6mM Tris HCl, 1
4 M NaCl, 100 mM EDTA, 0,5% Brij-L23, 0,2% deoxicolato de sódio, 0,5% de laurosilsarcosina) e
5 lisostafina (1 mg/mL). Os *plugs* foram então lavados cinco vezes em TE (10mM Tris HCl, 5 mM
6 EDTA, pH 8,0) e armazenados em 3 mL de TE a 4°C até o momento do uso. Uma fatia de três mm
7 de cada *plug* foi incubada em 100 µl tampão de endonuclease de restrição (Sigma-Aldrich[®], Índia)
8 a 37°C por 30 minutos. O tampão foi então descartado e o *plug* digerido em 100 µl de solução de
9 endonuclease de restrição contendo 20U da enzima *SmaI* (Sigma-Aldrich[®], Índia) por 24 horas a
10 37°C.

11 Após a restrição com *SmaI*, os *plugs* foram colocados nos poços do gel de agarose 1,5%
12 em TBE 0,5X (0,9 M Tris Base, 0,9 M Ácido Bórico, 1 mM EDTA pH 8,0) a 14 °C. O marcador
13 Lambda PFG Marker (New England Biolabs[®], Estados Unidos) foi incluído como padrão de
14 tamanho molecular. O gel correu a 6 V/cm por 23 horas com um tempo de pulso inicial de 5
15 segundos e pulso final de 40 segundos, foi corado com brometo de etídio (50 µg/mL) e fotografado
16 sob luz ultravioleta no L-Pix Chemi Photo Digitizer (Loccus Biotecnologia[®], Brasil). O padrão de
17 bandas foi analisado visualmente e utilizando-se o *Software Bionumerics* versão 7.5 (Applied
18 Maths[®], Bélgica). As bandas foram automaticamente atribuídas pelo computador e corrigidas
19 manualmente depois que as imagens originais foram verificadas e avaliadas visualmente. A análise
20 de agrupamento foi realizada com base no coeficiente Dice e no método de grupo de pares não

1 ponderados usando médias aritméticas (UPGMA) e a *Minimum Spanning Tree* (MST) foi gerada
2 para avaliar a associação dos padrões de agrupamento dos isolados e perfis de virulência avaliados.

3 4 – Pesquisa de genes de virulência

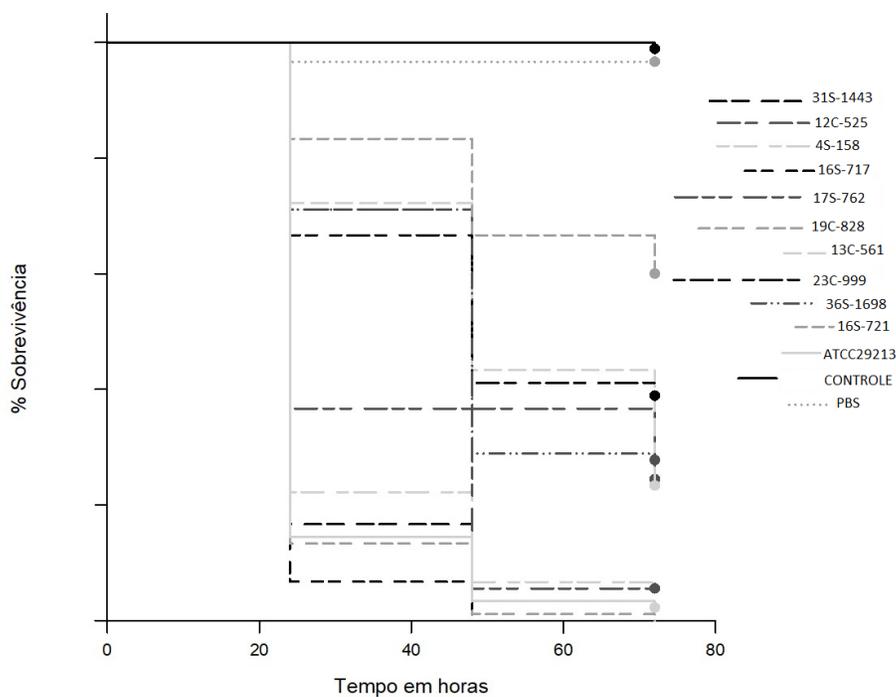
4 A presença dos genes de virulência codificadores das proteínas do fator de aglutinação
5 (*ClfA* e *ClfB*), da proteína de ligação à fibronectina (*FnBPA*), das toxinas (*Hla* e *Luk-ED*) e da
6 proteína de ligação a elastina (*Ebps*) foi avaliada por meio da PCR. Foram utilizados iniciadores
7 previamente descritos na literatura sendo que, para os genes *ClfA*, *ClfB*, *FnBPA* e *Hla* foram
8 utilizados os iniciadores descritos por STER et al. (2005), para o gene *Ebps* os iniciadores descritos
9 por TRISTAN et al. (2003) e para o gene *LuK-ED* os iniciadores descritos por JARRAUD et al.
10 (2002).

11 Foram realizadas reações individuais para cada um dos genes-alvo, contendo tampão 1X,
12 0,25mM de cada dNTP, 2,5mM MgCl₂, 0,25 mM de cada iniciador, 1,5U Taq polimerase e 50 ng
13 de DNA molde. A amplificação foi realizada em termociclador GeneAmp[®]PCR System 9700
14 (Applied Biosystems[®], Estados Unidos) programado para desnaturação inicial a 95 °C por 5
15 minutos, seguida de 35 ciclos a 95 °C por 30 segundos, 53 °C por 30 segundos e 72 °C por 30
16 segundos, com uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Utilizou-se DNA *Ladder* de 100 pb
17 (Ludwig[®], Brasil). Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados após eletroforese em
18 gel de agarose (1,5%, p/v), corados com solução de brometo de etídio (0,005%, p/v). O registro
19 das imagens foi feito em fotodocumentador L-Pix Chemi Photo Digitizer (Loccus Biotecnologia[®],
20 Brasil).

21

1 RESULTADOS

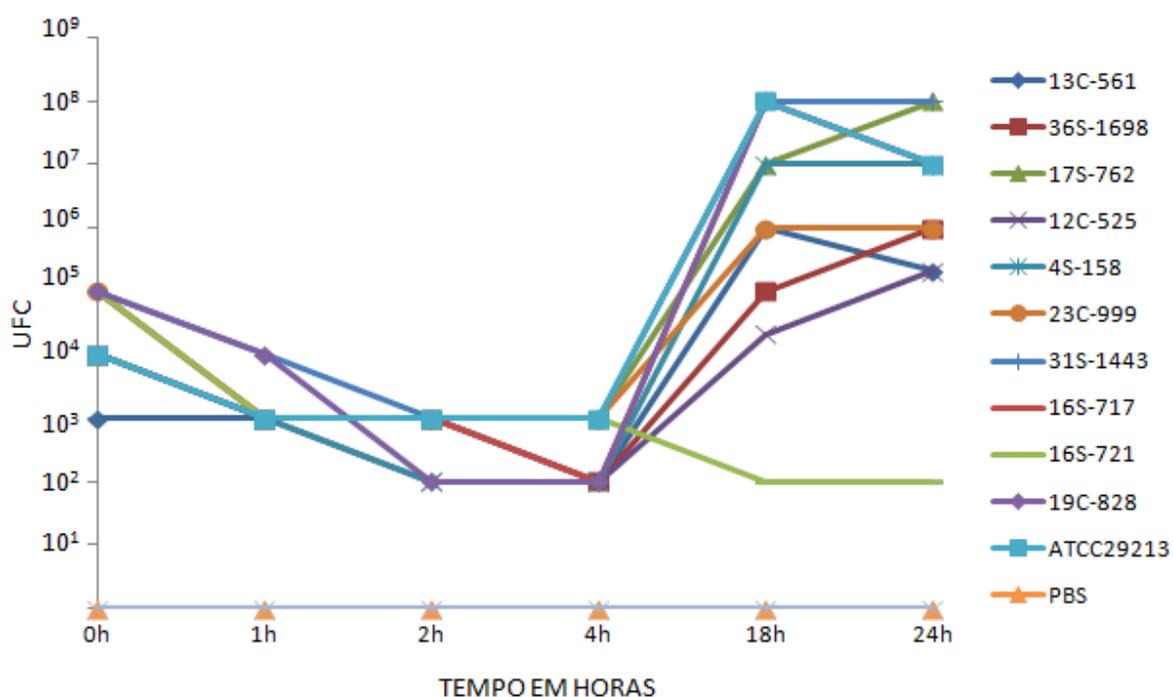
2 As análises de sobrevivência mostraram que os isolados testados apresentaram variações
 3 nos índices de letalidade das larvas quando uma mesma dose infectante foi utilizada (10^6
 4 UFC/larva). Dentre as amostras de origem de mastite clínica (12C-525, 13C-561, 19C-828, 23C-
 5 999) foi possível observar que a amostra 19C-828 foi a mais virulenta neste modelo experimental,
 6 diferindo de forma significativa das demais, pois, as amostras 12C-525, 13C-561, 23C-999 se
 7 enquadraram entre as amostras menos virulentas (Método de Holm-Sidak - $p < 0,05$). A figura 1
 8 ilustra a porcentagem de sobrevivência das larvas 24, 48 e 72 horas após a infecção para os
 9 tratamentos avaliados.



11 Figura 1: Gráfico da sobrevivência de larvas de *Galleria mellonella* em 24, 48 e 72 horas
 12 após as inoculações.

1 Ao observar o comportamento das amostras de origem subclínica (4S-158, 16S-717, 16S-
2 721, 17S-762, 31S-1443, 36S-1698) também foi possível detectar amostras mais e menos
3 virulentas. As amostras 4S-158, 16S-717, 17S-762 e 31S-1443 foram muito virulentas, a amostra
4 16S-721 teve uma virulência intermediária, enquanto a amostra 36S-1698 foi a menos virulenta
5 desse grupo. Portanto, a maior parte das amostras de origem subclínica apresentou alta virulência
6 neste modelo (Método de Holm-Sidak - $p < 0,05$).

7 A habilidade dos isolados em infectar as larvas, sobrevivendo e se multiplicando em seus
8 tecidos, foi comprovada por meio da contagem de UFC/10 μ l (mesmo volume inoculado) na
9 hemolinfa das larvas em diferentes momentos pós-infecção. Foram observadas diferenças entre as
10 contagens de bactérias nos diferentes tratamentos (figura 2), porém, a única diferença
11 estatisticamente significativa foi em relação ao isolado 16S-721 no tempo 24 horas, que neste
12 tempo, não diferiu dos tratamentos CONTROLE e PBS (Teste de Tukey $p < 0,05$). Houve uma
13 queda no número de bactérias recuperadas no final do período de observação nos tratamentos
14 ATCC29213, 13C-561 e 16S721 (figura 2). Dentre os isolados de origem clínica, o isolado 19C-
15 828 foi o que apresentou a maior taxa de recuperação tanto no tempo 18, como no 24 horas,
16 enquanto no grupo de amostras de origem subclínica, os isolados 4S-158, 16S-717, 17S-762 e 31S-
17 1443 foram recuperados em quantidades maiores que 36S-1698 e 16S-721 nesses mesmos tempos,
18 portanto, os isolados recuperados em maior quantidade nos tempos 18 e 24 horas coincidem com
19 os isolados identificados com alta virulência na análise de sobrevivência.



1
2 Figura 2: Representação gráfica das contagens de *S. aureus* na hemolinfa de larvas de *G.*
3 *mellonella* em diferentes tempos pós-infecção.

4 As larvas inoculadas com os diferentes isolados apresentaram diferentes níveis de
5 melanização quatro horas após a infecção experimental e em todos os tratamentos (exceto
6 CONTROLE e PBS) foi possível observar pontos de melanização na região do vaso dorsal (figura
7 3).

8



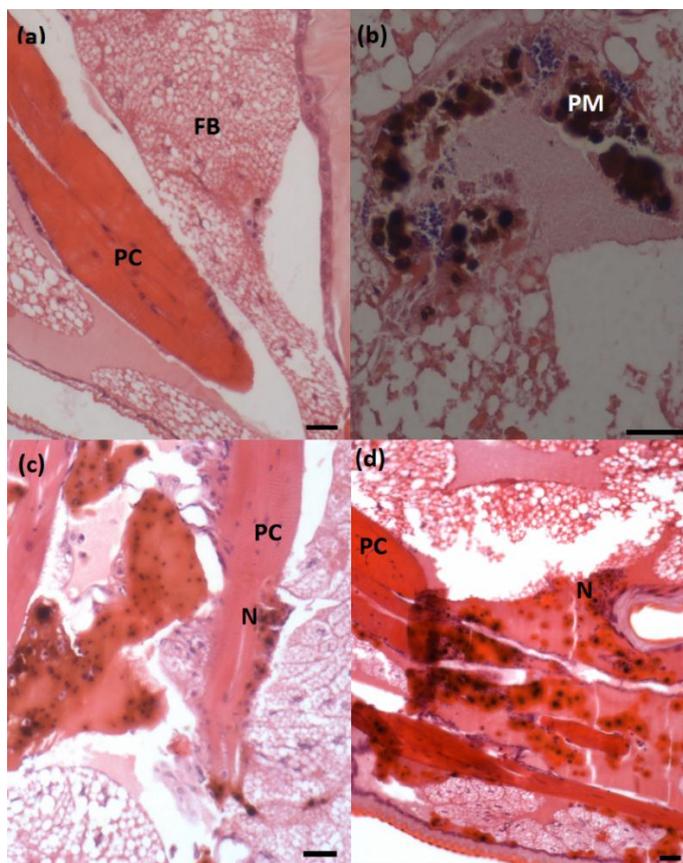
1
2 Figura 3: Larvas de *Galleria mellonella* 4 horas após a infecção experimental, mostrando
3 a melanização do vaso dorsal (indicado pelas setas). Pode-se observar diferentes níveis de
4 melanização entre os diferentes tratamentos.

5 Maior melanização foi observada para os isolados apresentados com alta virulência na
6 análise de sobrevivência: ATCC29213, 19C828, 4S-158, 16S-717, 17S-762, 31S-1443.

7 Os exames histológicos mostraram que a infecção experimental pelos isolados de *S.*
8 *aureus* avaliados nesse trabalho foi capaz de ativar a resposta imune, tanto celular quanto humoral,
9 nas larvas de *G. mellonella*, levando a formação de nódulos com hemócitos aderentes e regiões de
10 melanização. A avaliação histológica das larvas que receberam aplicação de PBS (figura 4(a))
11 mostra a integridade dos tecidos, onde não se observa melanização do corpo gorduroso ou de
12 células pericárdicas. Por outro lado, a histologia do tratamento ATCC29213 (figura 4(b)), mostrou

1 uma resposta imune intensa, representada por regiões de melanização, formação de nódulos e
2 hemócitos circulantes próximos aos pontos de melanização.

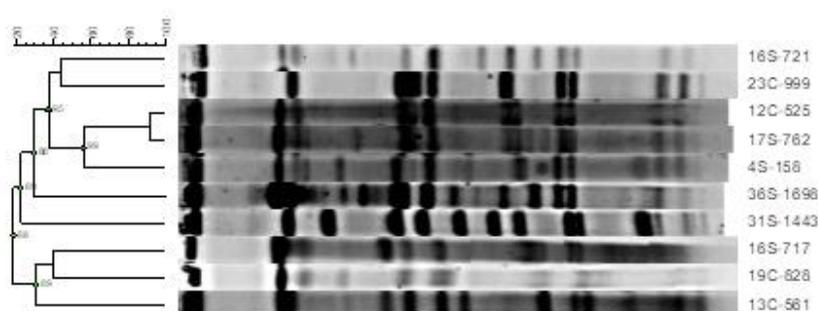
3 A figura 4 (c) mostra que o isolado 12C-525, pouco virulento, foi capaz de ativar o sistema
4 imune das larvas, com a formação de nódulos e pontos de melanização, porém, isso ocorreu de
5 forma menos intensa que para isolados de alta virulência, como é o caso do 19C-828 (figura 4 (d))
6 onde se observam pontos de melanização nas células pericardiais, nódulos maduros com
7 melanização no centro e pontos de melanização no corpo gorduroso.



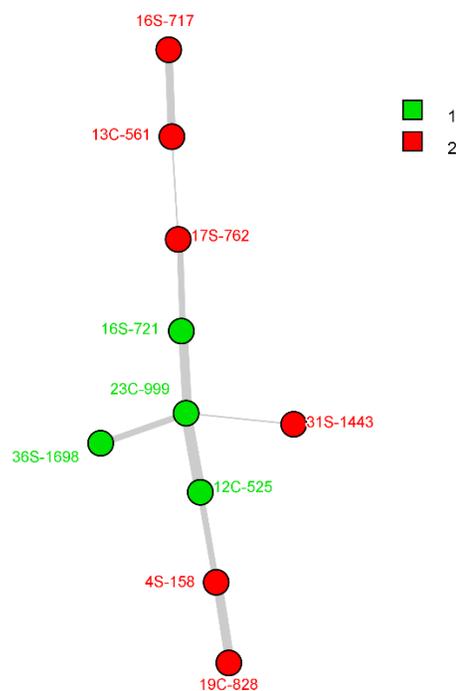
8
9 Figura 4: Exames histológicos de *G. mellonella* 4 horas após a infecção experimental
10 mostrando a resposta imune celular e humoral. (a) grupo PBS com tecidos íntegros, corpo

1 gorduroso (FB) e células pericardiais (PC). (b) grupo ATCC29213 com intensos pontos de
 2 melanização nos tecidos. (c) grupo 12C-525 (pouco virulento) com formação de nódulos e regiões
 3 de melanização pouco intensas, não há melanização no corpo gorduroso. (d) grupo 19C-828 (muito
 4 virulento) com intensas regiões de melanização, pontos de melanização nas células pericardiais,
 5 nódulos maduros com melanização no centro e pontos de melanização no corpo gorduroso. Barras
 6 10 μm .

7 Os isolados utilizados pertenciam a 10 diferentes pulsotipos obtidos pela técnica de PFGE,
 8 considerando 100% de similaridade (figura 5) e a dois perfis de virulência, sendo que eles variavam
 9 apenas na presença ou ausência do gene *Ebps*. Os isolados 12C-525, 16S-721, 23C-999 e 36S-1698
 10 pertenciam ao perfil um, contendo os genes *ClfA*, *ClfB*, *FnBPA*, *Hla*, *Luk-ED* e os isolados 4S-158,
 11 13C-561, 16S-717, 17S-762, 19C-828 e 31S-1443 pertenciam ao perfil dois, contendo os genes
 12 *ClfA*, *ClfB*, *FnBPA*, *Hla*, *Luk-ED* e *Ebps*. Os isolados pertencentes ao perfil um eram geneticamente
 13 mais relacionados pela técnica de PFGE (figura 6).



14
 15 Figura 5 : Dendrograma dos dez isolados utilizados para infecção experimental em *G.*
 16 *mellonella*, provenientes de casos de mastite clínica e subclínica, utilizando os resultados obtidos
 17 pela técnica de PFGE com 100 % de similaridade.



1

2 Figura 6: *Minimum-spanning tree* (MST) dos dez isolados utilizados para as análises em

3 *G. mellonella* apresentando os pulsotipos determinados pela técnica de *Pulsed-field Gel*

4 *Eletroforesis* (PFGE). As cores verde e vermelha representam os perfis de virulência um e dois,

5 respectivamente. O MST apresentado é o que apresenta o maior escore de confiabilidade geral e

6 foi calculado utilizando UPGMA (método de pares não ponderados usando médias aritméticas)

7 associado à regra de prioridade e à reamostragem de permutação.

8

9 **DISCUSSÃO**

10 Os dez isolados utilizados representam uma diversidade de genótipos demonstrados pela

11 técnica de PFGE, pertencendo a dez pulsotipos diferentes, porém, são geneticamente relacionados

12 como observado nas figuras 5 e 6. Esta variedade de genótipos foi suficiente para refletir uma

1 diversidade de fenótipos de virulência, possibilitando identificar, principalmente pela análise de
2 sobrevivência, isolados dotados de alta, intermediária e baixa virulência em *G. mellonella*.

3 A análise de sobrevivência mostrou uma predominância de amostras mais virulentas
4 dentre as amostras de origem subclínica (4S-158, 16S-717, 17S-762 e 31S-1443), sendo que a
5 amostra 19C-828 foi a única que se destacou como muito virulenta dentre as amostras de origem
6 clínica, pois, 12C-525, 13C-561 e 23C-999 se enquadraram no grupo pouco virulento, juntamente
7 com a 36S-1698, única amostra de origem subclínica pouco virulenta.

8 O fato de determinado isolado ocasionar uma mastite clínica ou subclínica está
9 relacionado não somente aos seus atributos de virulência, mas também aos fatores inerentes a
10 imunidade do hospedeiro (AITKEN et al., 2011). Deve-se salientar que *S. aureus*, apesar de ter
11 capacidade para infectar vários animais e também seres humanos, ocasionando uma variedade de
12 manifestações clínicas (DAVIS, 2005; LEONARD & MARKEY, 2008), possui cepas que são
13 evolutivamente adaptadas para cada tipo de hospedeiro (LOWDER et al., 2009; PRICE et al.,
14 2012). As cepas causadoras de mastite subclínica em bovinos analisadas neste estudo podem ter
15 evoluído e se adaptado para permanecer nesse hospedeiro, de forma a não ser reconhecidas e
16 eliminadas pelo sistema imune do animal. Essas amostras podem sobreviver dentro das células do
17 epitélio glandular ou ainda sob a forma de biofilme (HEBERT et al., 2000; MELCHIOR et al.,
18 2006). Embora em vários pontos a resposta imune nas larvas de *G. mellonella* possa ser comparada
19 a dos mamíferos, diferenças são evidentes, portanto, entende-se que o sistema imune dos dois
20 hospedeiros pode reagir de forma diferente frente ao mesmo patógeno, levando as diferenças nas
21 manifestações clínicas que foram observadas.

1 *G. mellonella* possui um sistema melanina-fenoloxidase, componente de seu sistema
2 imune humoral, responsável pela coagulação da hemolinfa, que pode ser observada pela
3 melanização e auxilia na eliminação de patógenos bacterianos (SHAURUB, 2012; ZDYBICKA-
4 BARABAS et al., 2014). De forma geral, cepas bacterianas mais virulentas para as larvas levam a
5 maiores níveis de melanização, evidentes nas primeiras horas após a infecção (WAND et al., 2013;
6 PEREIRA et al., 2015). Neste estudo, quatro horas após a infecção experimental foi possível
7 perceber diferenças na melanização das larvas nos diferentes tratamentos (figura 3) e os isolados
8 mais melanogênicos foram os que levaram a menores taxas de sobrevivência após 72 horas.

9 As análises histológicas mostraram que todos os isolados testados, incluindo o grupo
10 ATCC29213 tiveram a capacidade de ativar o sistema imune das larvas, levando a formação de
11 nódulos e regiões de melanização em diferentes tecidos. Isolados mais virulentos, como foi o caso
12 de 19C-828 levaram a uma resposta imune mais intensa, caracterizada por maior melanização do
13 vaso dorsal, presença de nódulos maduros, pontos de melanização próximos às células pericardiais
14 e pontos de melanização nos corpos gordurosos. Isolados menos virulentos, como o 12C-525
15 também demonstraram capacidade de ativação do sistema imune, com formação de nódulos e pontos
16 de melanização em menor escala.

17 Foi possível constatar que para todos os isolados que ocorre queda inicial no número de
18 bactérias recuperadas, isto acontece devido ao fato da resposta imune da larva ser mais intensa nas
19 primeiras horas após a infecção, dificultando a multiplicação bacteriana (LAVINE & STRAND,
20 2002). Outro aspecto que pode justificar a queda na contagem inicial é a diluição do inoculo (10 μ L)
21 na hemolinfa da larva. Após as primeiras quatro horas pós inoculação, foi possível observar que a

1 taxa de recuperação bacteriana aumenta, indicando que *S. aureus* consegue se adaptar ao novo
2 hospedeiro, possivelmente em função da expressão de fatores de virulência importantes na relação
3 hospedeiro/parasito, resistindo à resposta imune das larvas e se multiplicando. No final do período
4 avaliado (24 horas após a infecção) foi possível observar que a taxa de recuperação diminuiu para
5 alguns isolados (ATCC29213, 13C-561 e 16S721). No caso do grupo ATCC29213, utilizado como
6 controle positivo, tal fato pode decorrer do esgotamento das reservas nutritivas da larva que,
7 consequentemente, ocasiona morte de parte da população de bactérias, por outro lado, em relação
8 aos isolados 13C-561 e 16S721, que são de baixa virulência, essa observação deve ser devida a
9 efetividade da resposta imune desenvolvida pela larva e a incapacidade dessas bactérias para
10 continuar se multiplicando frente as defesas do hospedeiro.

11 Os perfis de virulência um e dois diferiam apenas no que diz respeito a presença do gene
12 *Ebps*, que codifica a proteína de ligação a elastina, sendo que o perfil dois foi composto pelos
13 isolados que possuíam esse gene. O grupo de isolados de alta virulência era em sua totalidade
14 composto por amostras do perfil dois, enquanto entre os isolados de baixa e intermediária
15 virulência, apenas o isolado 13C-561 pertencia a este mesmo perfil. Desta forma, foi possível
16 correlacionar a presença do gene *Ebps* com a alta virulência para *G. mellonella*, mas essa é uma
17 suposição delicada, diante da variedade de determinantes de virulência que podem estar ou não
18 presentes em *S. aureus* (FERRY et al., 2005). O gene *Ebps* têm sido detectado em cepas de *S.*
19 *aureus* provenientes de humanos com endocardite e osteomielite (TRISTAN et al., 2003) mas
20 parece não ser importante quando se trata da mastite (ALMEIDA et al., 2013).

1 Neste estudo, foi avaliada a frequência de seis genes de virulência, limitando a análise
2 entre genótipos e fenótipos de virulência. Por se tratar de isolados geneticamente distintos, como
3 verificado pela PFGE, é interessante realizar avaliações mais amplas desses genótipos, por
4 exemplo, um sequenciamento genômico, o que poderia fornecer informações genéticas mais
5 detalhadas e o melhor entendimento da relação fenótipo/genótipo para estes isolados. Deve-se
6 ainda salientar que os isolados de *S. aureus* estudados são originalmente associados a infecções
7 intramamárias de bovinos e que, desta forma, os determinantes de virulência aqui avaliados
8 poderiam ser relevantes para infecção na glândula mamária desta espécie. De fato, estudos
9 analisando isolados bovinos e humanos têm demonstrado que embora existam características
10 comuns entre os isolados das duas espécies, ocorrem genótipos e combinações de genes de
11 virulência predominantes para cada hospedeiro (ZADOKS et al., 2000; SUNG et al., 2008;
12 PRASHANTH et al., 2011; CHU et al., 2013).

13 Ao fazer um paralelo entre os resultados da análise de sobrevivência, da quantificação
14 das bactérias na hemolinfa e da melanização quatro horas após a infecção, tomando por base os
15 grupos de isolados de origem clínica e de origem subclínica separadamente, foi possível observar
16 que os isolados dotados de alta virulência tinham uma maior capacidade de se multiplicar nos
17 tecidos das larvas, sendo recuperados em maiores quantidades nos tempos 18 e 24 horas e também
18 levavam a uma maior melanização dos tecidos larvais (19C-828 dentre as amostras de origem
19 clínica e 4S-158, 16S-717, 17S-762 e 31S-1443 dentre as amostras de origem subclínica). Isso
20 mostra que os parâmetros utilizados nesse estudo são eficientes para a avaliação da virulência de
21 *S.aureus* provenientes de mastite bovina em *G. mellonella*.

1 O uso de larvas de insetos, como a *G. mellonella*, como modelo de infecção tem se
2 mostrado como uma alternativa interessante para estudar a virulência bacteriana, pois, apresentam
3 uma série de vantagens em relação aos modelos tradicionais, como os camundongos, por exemplo,
4 sendo economicamente interessantes e permitindo a avaliação da resposta imune inata que é
5 semelhante a dos mamíferos (RAMARÃO et al., 2012). Neste estudo, foi possível identificar vários
6 fenótipos de virulência na população estudada, o que poderá contribuir, após investigações mais
7 detalhadas dos genomas desses isolados, com o entendimento da patogênese da mastite bovina.
8 Não é possível extrapolar totalmente os resultados obtidos nas larvas para aquele esperado na
9 glândula mamária, mas estudos envolvendo *S. aureus* e este modelo tem mostrado boa correlação
10 entre *G. mellonella* e modelos mamíferos.

11 Entre os trabalhos envolvendo *S. aureus* destaca-se o trabalho de PELEG et al. (2009) no
12 qual foi demonstrada associação entre a virulência na larva e a virulência em modelo mamífero
13 (camundongo). Neste trabalho, os autores utilizaram uma cepa *knockout* para o gene *agr*, um
14 regulador de virulência que já se mostrou importante na infecção para vários hospedeiros. Quando
15 foi comparada a virulência causada pela cepa mutante e pela cepa sem mutação ficou evidenciado
16 que a cepa mutante causou menor letalidade que a estirpe sem mutação, tanto em *G. mellonella*
17 como em camundongos.

18 Outro trabalho mais recente reafirmou a associação entre resultados de virulência de *S.*
19 *aureus* em camundongos e em *G. mellonella*. Nos dois modelos ocorreu o aumento de sobrevivência
20 dos hospedeiros infectados por cepas do complexo clonal 30 quando comparada a outras cepas
21 utilizadas no mesmo experimento. Além do uso dos camundongos e das larvas, o trabalho avaliou

1 características moleculares dos isolados, através de análises das sequências genômicas e de
2 transcriptomas. As análises mostraram que características de patogenicidade estão relacionadas ao
3 perfil genômico e sugeriu que genótipos específicos de *S. aureus* estão relacionados com tipos
4 distintos de infecção (SHARMA-KUINKEL et al., 2015).

5 No que se refere ao uso deste modelo para testar a virulência de *S. aureus* proveniente de
6 mastite bovina, deve ser considerado o trabalho de SILVA (2015). Neste trabalho foram utilizados
7 apenas dois isolados que tinham 90% de similaridade genética pela técnica de PFGE e perfil
8 idêntico pela avaliação de sete genes de virulência. Um deles era causador de mastite persistente
9 (SAU302), que foi recuperado da mesma fêmea bovina durante um período de três meses e outro
10 responsável por um quadro de mastite não persistente (SAU322). O isolado de mastite persistente
11 foi mais virulento para as larvas de *G. mellonella*, causando 85% de mortes após 24 horas, enquanto
12 o isolado não persistente resultou em apenas 47% de óbitos neste mesmo período.

13 Este é o primeiro trabalho utilizando larvas de *G. mellonella* para avaliar uma variedade
14 de isolados de *S. aureus*, molecularmente distintos, causadores de mastite clínica e subclínica.
15 Nossos resultados apontaram uma grande diversidade de genótipos e fenótipos na população
16 estudada, confirmando a diversidade genética e a complexidade da patogênese da mastite causada
17 por *S. aureus*. O curso da doença depende das características do patógeno e do hospedeiro,
18 principalmente no que se refere à intensidade do sistema imune. A glândula mamária possui uma
19 resposta imune inata e adaptativa complexa e interligada levando a defesa contra organismos
20 invasores e evitando danos aos tecidos do hospedeiro. Essa resposta na glândula mamária pode ser

1 parcialmente associada à imunidade que as larvas de *G. mellonella* desenvolvem frente à infecção,
2 mostrando que seu uso pode ser interessante no estudo de patógenos causadores da mastite.

3

4 **CONCLUSÃO**

5 Larvas de *G. mellonella* constituem um modelo prático e eficiente para avaliar fenótipos
6 de virulência em isolados de *S. aureus* provenientes de mastite bovina, permitindo a distinção de
7 isolados mais e menos virulentos. Estudos mais detalhados destes isolados, como por exemplo, o
8 sequenciamento genômico, permitirão melhores associações entre o fenótipo apresentado e suas
9 características genéticas, dessa forma, será possível identificar fatores chaves para a patogênese
10 nas larvas, que poderão auxiliar no entendimento da doença na glândula mamária, contribuindo
11 para seu controle e prevenção.

12

13 **REFERÊNCIAS**

14

15 ABRAHAM, J.L. et al. Surveillance of healthy cats and cats with inflammatory skin disease for
16 colonization of the skin by methicillin- resistant coagulase-positive staphylococci and
17 *Staphylococcus schleiferi* ssp. *Schleiferi*. **Veterinary Dermatology**, Oxford, v. 18, n. 4, p. 252-
18 259, Aug. 2007. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17610491>>. Accessed:
19 Jan. 10, 2019. doi: 10.1111/j.1365-3164.2007.00604.x.

20 AITKEN, S.L. et al. Immunopathology of mastitis: insights into disease recognition and
21 resolution. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, New York, v. 16, n. 4, p. 291-

- 1 304, Dec. 2011. Available from: <[https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10911-011-](https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10911-011-9230-4)
2 9230-4>. Accessed: Jan. 06, 2019. doi: 10.1007/s10911-011-9230-4.
- 3 ALMEIDA, L.M. et al. Comparative analysis of agr groups and virulence genes among
4 subclinical and clinical mastitis *Staphylococcus aureus* isolates from sheep flocks of the
5 Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 493-498, Oct.
6 2013. Available from: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822013000200026&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
7 83822013000200026&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Accessed: Nov. 04, 2018. doi:
8 10.1590/S1517-83822013000200026.
- 9 BAR-GAL, G.K. et al. Host-specificity of *Staphylococcus aureus* causing intramammary
10 infections in dairy animals assessed by genotyping and virulence genes. **Veterinary**
11 **Microbiology**, Amsterdam, v. 176, n. 1-2, p. 143-154, Mar. 2015. Available from:
12 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17215151>>. Accessed: Nov. 12, 2018. doi:
13 10.1016/j.tvjl.2006.11.008.
- 14 BENTON, B. M. et al. Large-Scale Identification of Genes Required for Full Virulence of
15 *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 186, n. 24, p. 8478-8489, Dec.
16 2004. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC532413/>>. Accessed:
17 Oct. 03, 2018. doi: 10.1128/JB.186.24.8478-8489.2004.
- 18 BRITO, M.A.V.P. et al. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos
19 os quartos mamários das vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e**
20 **Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 51, n. 2, p. 129-135, 1999. Available from:

- 1 <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010209351999000200001&script=sci_abstract&tlng=pt>
2 . Accessed: Oct. 04, 2018. doi: 10.1590/S0102-09351999000200001.
- 3 CHU, C. et al. Differences in virulence genes and genome patterns of mastitis-associated
4 *Staphylococcus aureus* among goat, cow, and human isolates in Taiwan. **Foodborne Pathogens**
5 **and Disease**, v. 10, n. 3, p. 256-262, Mar. 2013. Available from:
6 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23489048>>. Accessed: Aug. 20, 2018. doi:
7 10.1089/fpd.2012.1278.
- 8 COSTA, G.M. **Mamite bovina em rebanhos leiteiros da região sul do estado de Minas**
9 **Gerais**. 2008. 123f. Tese de Doutorado em Sanidade Animal, Universidade Federal de Minas
10 Gerais.
- 11 COSTA, G.M. et al. Population diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis
12 in Brazilian dairy herds. **Research in Veterinary Science**, London, v. 93, n. 2, p. 733-735, Oct.
13 2012. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22035658>>. Accessed: Oct. 13,
14 2018. doi: 10.1016/j.rvsc.2011.09.014.
- 15 CREMONESI, P. et al. Genomic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains associated with
16 high within-herd prevalence of intramammary infections in dairy cows. **Journal of Dairy**
17 **Science**, Champaign, v. 98, n. 10, p. 6828-6838, Oct. 2015. Available from:
18 <[https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(15\)00521-4/fulltext](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(15)00521-4/fulltext)>. Accessed: Jan.
19 15, 2019. doi: 10.3168/jds.2014-9074.
- 20 DAVIS, J. S. Management of bone and joint infections due to *Staphylococcus aureus*. **Internal**
21 **Medicine Journal**, Carlton, v. 35, p. 79-96, Dec. 2005. Suplemento 2. Available from:

- 1 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16271064>>. Accessed: Dec. 16, 2018. doi:
2 10.1111/j.1444-0903.2005.00982.x.
- 3 ELSAYED, M.S et al. Phenotypic and genotypic detection of virulence factors of *Staphylococcus*
4 *aureus* isolated from clinical and subclinical mastitis in cattle and water buffaloes from different
5 farms of Sadat City in Egypt. **Veterinary World**, v. 8, n. 9, p. 1051-1058, Sept. 2015. Available
6 from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27047197>>. Accessed: Jan. 08, 2019. doi:
7 10.14202/vetworld.2015.1051-1058.
- 8 FERRY, T. et al. Virulence determinants in *Staphylococcus aureus* and their involvement in
9 clinical syndromes. **Current Infectious Disease Reports**, v. 7, n. 6, p. 420-428, Nov. 2005.
10 Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16225779>>. Accessed: Oct. 28, 2018.
- 11 GOGOI-TIWARI, J. et al. Relative distribution of virulence-associated factors among Australian
12 bovine *Staphylococcus aureus* isolates: Potential relevance to development of an effective bovine
13 mastitis vaccine. **Virulence**, v. 6, n. 5, p. 419-423, June 2015. Available from:
14 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26103596>>. Accessed: Jan. 02, 2019. doi:
15 10.1080/21505594.2015.1043508.
- 16 HÉBERT, A. et al. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis
17 alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. *FEMS Microbiology*
18 *Letters*, Amsterdam, v. 193, n. 1, p. 57-62, Dec. 2000. Available from:
19 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11094279>>. Accessed: Sept. 28, 2018. 10.1111/j.1574-
20 6968.2000.tb09402.x.

- 1 HULTMARK, D. Immune reactions in *Drosophila* and other insects: a model for innate
2 immunity. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 9, n. 5, p. 178-183, May 1993. Available from: <
3 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8337755>>. Accessed: Dec. 21, 2018.
- 4 IQBAL, Z. et al. Comparative virulence studies and transcriptome analysis of *Staphylococcus*
5 *aureus* strains isolated from animals. **Scientific Reports**, v. 6, n. 35442, p. 1-12, Oct. 2016.
6 Available from: < <https://www.nature.com/articles/srep35442>>. Accessed: Jan. 18, 2019. doi:
7 10.1038/srep35442.
- 8 JANDER, G. et al. Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in
9 mice and insects. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 182, n. 13, p. 3843-3845, July 2000.
10 Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10851003>>. Accessed: Oct. 15, 2018.
11 doi: 10.1128/JB.182.13.3843-3845.2000.
- 12 JARRAUD, S. et al. Relationships. Between *Staphylococcus aureus* genetic background,
13 virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. **Infection and Immunity**,
14 Washington, v. 70, n. 2, p. 631-641, Feb. 2002. Available from:
15 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11796592>>. Accessed: Dec. 12, 2018. doi:
16 10.1128/IAI.70.2.631-641.2002.
- 17 KLEIN, R.C. et al. *Staphylococcus aureus* of bovine origin: genetic diversity, prevalence and the
18 expression of adhesin-encoding genes. **Veterinary Microbiology**, v. 160, n. 1-2, p. 183-188, Nov.
19 2012. Available from: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22709438> >. Accessed: Jan. 08,
20 2019. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.05.025.

- 1 LAVINE, M.D.; STRAND, M.R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect**
2 **Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 32, n. 10, p. 1295-1309, Oct. 2002. Available
3 from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0965174802000929>>. Accessed: Aug.
4 10, 2018. doi: 10.1016/S0965-1748(02)00092-9.
- 5 LEONARD, F.C.; MARKEY, B.K. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: A
6 review. **The Veterinary Journal**, v. 175, n. 1, p. 27-36, Jan. 2008. Available from:
7 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17215151>>. Accessed: Nov. 12, 2018. doi:
8 10.1016/j.tvjl.2006.11.008.
- 9 LIONAKIS, M.S. *Drosophila* and *Galleria* insect model hosts: new tools for the study of fungal
10 virulence, pharmacology and immunology. **Virulence**, v. 2, n. 6, p. 521-527, Nov./Dec. 2011.
11 Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22186764>>. Accessed: Nov. 21, 2018.
12 doi: 10.4161/viru.2.6.18520.
- 13 LOWDER, B.V. et al. Recent human-to-poultry host jump, adaptation, and pandemic spread of
14 *Staphylococcus aureus*. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States**
15 **of America**, Washington, v. 106, n. 46, p. 19545-19550, Nov. 2209. Available from:
16 <<https://www.pnas.org/content/pnas/106/46/19545.full.pdf>>. Accessed: Dec. 14, 2018. doi:
17 10.1073/pnas.0909285106.
- 18 MAGRO, G. et al. An explant of heifer mammary gland to study the immune response of the
19 organ. **Research in Veterinary Science**, London, v. 114, p. 44-50, Oct. 2017. Available from:
20 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28314156>>. Accessed: Jan. 15, 2019. doi:
21 10.1016/j.rvsc.2017.03.002.

- 1 MCGONIGLE, J.E. et al. Intracellular survival of *Staphylococcus aureus* during persistent
2 infection in the insect *Tenebrio molitor*. **Developmental and Comparative Immunology**,
3 Elmsford, v. 59, p. 34-38, June 2016. Available from:
4 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26778297>>. Accessed: Oct. 22, 2018. doi:
5 10.1016/j.dci.2016.01.002.
- 6 MELCHIOR, M.B. et al. Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? **The Veterinary**
7 **Journal**, London, v. 171, n. 3, p. 398-407, May 2006. Available from:
8 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16624706>>. Accessed: Oct. 27, 2018. doi:
9 10.1016/j.tvjl.2005.01.006.
- 10 MYLONAKIS, E. et al. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus*
11 *neoformans* pathogenesis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, n. 7, p. 3842-3850, July
12 2005. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15972469>>. Accessed: Jan. 12,
13 2019. doi: 10.1128/IAI.73.7.3842-3850.2005.
- 14 NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Microbiological Procedures for Diagnosis of Bovine**
15 **Udder Infection and Determination of Milk Quality**, 4. ed. Madison: WI, NMC Inc., 2004. p.
16 1-47.
- 17 NEEDHAM, A.J. et al. *Drosophila melanogaster* as a model host for *Staphylococcus aureus*
18 infection. **Microbiology**, Washington, v. 150, p. 2347-2355, July 2004. Available from:
19 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15256576>>. Accessed: Nov. 20, 2018. doi:
20 10.1099/mic.0.27116-0.

- 1 PELEG, A.Y. et al. Reduced Susceptibility to Vancomycin Influences Pathogenicity in
2 *Staphylococcus aureus* Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 4, p. 532-536,
3 Feb. 2009. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19125671>>. Accessed: Jan.
4 14, 2019. doi: 10.1086/596511.
- 5 PEREIRA, M.F. et al. *Galleria mellonella* is an effective model to study *Actinobacillus*
6 *pleuropneumoniae* infection. **Microbiology**, Reading, v. 161, p. 387-400, Feb. 2015. Available
7 from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25414045>>. Accessed: Jan. 11, 2019. doi:
8 10.1099/mic.0.083923-0.
- 9 PETON, V.; LE LOIR, Y. *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. **Infection, genetics**
10 **and evolution**, Amsterdam, v. 21, p. 602-615, Jan. 2014. Available from:
11 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134813003079?via%3Dihub>>.
12 Accessed: Dec. 02, 2018. doi: 10.1016/j.meegid.2013.08.011.
- 13 PORRERO, M.C. et al. Clonal diversity of *Staphylococcus aureus* originating from the small
14 ruminants goats and sheep. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 156, n. 1-2, p. 157-161,
15 Apr. 2012. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22112857>>. Accessed: Jan.
16 14, 2019. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.10.015.
- 17 PRASHANTH, K. et al. Genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* obtained from
18 humans and bovine mastitis samples in India. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 3, n. 2,
19 p. 115-122, Apr. 2011. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21731296>>.
20 Accessed: Jan. 05, 2019. doi: 10.4103/0974-777X.81686.

- 1 PRICE, L.B. et al. *Staphylococcus aureus* CC398: host adaptation and emergence of methicillin
2 resistance in livestock. **mBio**, Washington, v. 3, n. 1, p. 305-311, Feb. 2012. Available from:
3 <<https://mbio.asm.org/content/3/1/e00305-11>>. Accessed: Nov. 11, 2018. doi:
4 10.1128/mBio.00305-11.
- 5 RAINARD, P. et al. Knowledge gaps and research priorities in *Staphylococcus aureus* mastitis
6 control. **Transboundary and Emergin Diseases**, v. 65, n. S1, p. 1-17, Oct. 2017. Available
7 from: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/tbed.12698>>. Accessed: Jan. 22, 2019.
8 doi: 10.1111/tbed.12698.
- 9 RAMARÃO, N. et al. The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate
10 bacterial pathogenesis. **Journal of visualized experiments: JoVE**, v. 70, n. e4362, p. 1-7, Dec.
11 2012. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23271509> >. Accessed: Oct. 26,
12 2018. doi: 10.3791/4392.
- 13 REINOSO, E. et al. Bovine and rabbit models for the study of a *Staphylococcus aureus* avirulent
14 mutant strain, RC122. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 66, n. 4, p. 285-
15 288, Oct. 2002. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC227018/>>.
16 Accessed: Oct. 17, 2018. doi:
- 17 RUEGG, P.L. New perspectives in udder health management. **The Veterinary Clinics of North**
18 **America: Food Animal Practice**, Madison, v. 28, n. 2, p. 149-163, July 2012. Available from: <
19 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22664200>>. Accessed: Dec. 21, 2018. doi:
20 10.1016/j.cvfa.2012.03.001.

- 1 SHARMA-KUINKEL, B.K. et al. Potential Influence of *Staphylococcus aureus* Clonal Complex
2 30 Genotype and Transcriptome on Hematogenous Infections. **Open Forum Infectious**
3 **Diseases**, v. 2, n. 3, p. 1-13, June 2015. Available from:
4 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26213692>>. Accessed: Oct. 14, 2018. doi:
5 10.1093/ofid/ofv093.
- 6 SHAURUB, E.H. Immunomodulation in insects post-treatment with abiotic agents: A review.
7 **European Journal of Entomology**, v. 109, n. 3, p. 303-316, July 2012. Available from:
8 <[https://www.researchgate.net/publication/274100487_Immunomodulation_in_insects_post-](https://www.researchgate.net/publication/274100487_Immunomodulation_in_insects_post-treatment_with_abiotic_agents_A_review)
9 [treatment_with_abiotic_agents_A_review](https://www.researchgate.net/publication/274100487_Immunomodulation_in_insects_post-treatment_with_abiotic_agents_A_review)>. Accessed: Dec. 12 , 2018. doi:
10 10.14411/eje.2012.040.
- 11 SILVA, M.P. **Identificação e caracterização de estirpes de *Staphylococcus aureus* e**
12 ***Streptococcus agalactiae* associadas às mastites bovinas persistente e não persistente.** 2015.
13 88f. Tese de Doutorado, Bioquímica Aplicada, Departamento de Bioquímica e Biologia
14 Molecular, Universidade Federal de Viçosa.
- 15 SILVA, N.C.C. et al. Molecular characterization and clonal diversity of methicillin-susceptible
16 *Staphylococcus aureus* in milk of cows with mastitis in Brazil. **Journal of Dairy Science**,
17 Champaign, v. 96, n. 11, p. 6856-6862, Nov. 2013. Available from:
18 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24054305>>. Accessed: Dec. 07, 2018. doi:
19 10.3168/jds.2013-6719.
- 20 STER, C. et al. Transcriptional profiles of regulatory and virulence factors of *Staphylococcus*
21 *aureus* of bovine origin: oxygen impact and strain-to-strain variations. **Molecular and Cellular**

- 1 **Probes**, London, v. 19, n. 4, p. 227-235. Available from:
2 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0890850805000149?via%3Dihub>>.
3 Accessed: Nov. 19, 2018. doi: 10.1016/j.mcp.2005.01.002.
- 4 STRAND, M.R. The insect cellular immune response. **Insect Science**, v. 15, n. 1, p. 1-14, Jan.
5 2008. Available from: <[https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1744-](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1744-7917.2008.00183.x)
6 [7917.2008.00183.x](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1744-7917.2008.00183.x)>. Accessed: Nov. 18, 2018. doi: 10.1111/j.1744-7917.2008.00183.x.
- 7 SUNG, J.M. et al. *Staphylococcus aureus* host specificity: comparative genomics of human
8 versus animal isolates by multi-strain microarray. **Microbiology**, v. 154, n. 7, p. 1949-1959, July
9 2008. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18599823>>. Accessed: Nov. 16,
10 2018. doi: 10.1099/mic.0.2007/015289-0.
- 11 TONG, S.Y. et al. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical
12 manifestations, and management. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 28, n. 3, p.
13 603-661, July 2015. Available from: <<https://cmr.asm.org/content/28/3/603>>. Accessed: Dec.
14 16, 2018. doi: 10.1128/CMR.00134-14.
- 15 TRISTAN, A. et al. Use of multiplex pcr to identify *Staphylococcus aureus* adhesins involved in
16 human hematogenous infections. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 9, p.
17 4465-4467, Sept. 2003. Available from:
18 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC193818/>>. Accessed: Oct. 26, 2018. doi:
19 10.1128/JCM.41.9.4465-4467.2003
- 20 VAN DUIJKEREN, E. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and horse
21 personnel: An investigation of several outbreaks. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 141,

- 1 n. 1-2, p. 96-102, Feb. 2010. Available from:
2 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113509003678?via%3Dihub>>.
3 Accessed: Jan. 02, 2019. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.08.009.
- 4 WAND, M.E. et al. Complex interactions of *Klebsiella pneumoniae* with the host immune system
5 in a *Galleria mellonella* infection model. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p. 1790-
6 1798, Dec. 2013. Available from:
7 <[https://www.researchgate.net/publication/256378111_Use_of_the_Galleria_mellonella_infectio](https://www.researchgate.net/publication/256378111_Use_of_the_Galleria_mellonella_infection_model_to_study_the_opportunistic_pathogen_Klebsiella_pneumonia_supports_the_presence_of_a_multifaceted_interaction_with_the_host_immune_response)
8 [n_model_to_study_the_opportunistic_pathogen_Klebsiella_pneumonia_supports_the_presence_](https://www.researchgate.net/publication/256378111_Use_of_the_Galleria_mellonella_infection_model_to_study_the_opportunistic_pathogen_Klebsiella_pneumonia_supports_the_presence_of_a_multifaceted_interaction_with_the_host_immune_response)
9 [of_a_multifaceted_interaction_with_the_host_immune_response](https://www.researchgate.net/publication/256378111_Use_of_the_Galleria_mellonella_infection_model_to_study_the_opportunistic_pathogen_Klebsiella_pneumonia_supports_the_presence_of_a_multifaceted_interaction_with_the_host_immune_response)>. Accessed: Jan. 09, 2019. doi:
10 10.1099/jmm.0.063032-0.
- 11 WANG, D. et al. Bovine mastitis *Staphylococcus aureus*: antibiotic susceptibility profile,
12 resistance genes and molecular typing of methicillin-resistant and methicillin-sensitive strains in
13 China. **Infection, genetics and evolution**, Amsterdam, v. 31, p. 9-16, Apr. 2015. Available from:
14 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25582604>>. Accessed: Dec. 11, 2018. doi:
15 10.1016/j.meegid.2014.12.039.
- 16 ZADOKS, R. et al. Application of pulsed-field gel electrophoresis and binary typing as tools in
17 veterinary clinical microbiology and molecular epidemiologic analysis of bovine and human
18 *Staphylococcus aureus* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 5, p.
19 1931-1939, May 2000. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10790124>>.
20 Accessed: Jan. 12, 2019.

- 1 ZDYBICKA-BARABAS, A. et al. Lysozyme and defense peptides as suppressors of
2 phenoloxidase activity in *Galleria mellonella*. **Archives of Insect Biochemistry and**
3 **Physiology**, v. 87, n. 1, p. 1-12, Sept. 2014. Available from:
4 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25044335>>. Accessed: Jan. 07, 2019. doi:
5 10.1002/arch.21175.
- 6 ZECCONI, A.; SCALI, F. *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate
7 immune defenses in human and animal diseases. **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 150, n. 1-
8 2, p. 12-22, Feb. 2013. Available from:
9 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165247813000060?via%3Dihub>>.
10 Accessed: Dec. 17, 2018. doi: 10.1016/j.imlet.2013.01.004.

ARTIGO 2 – Normas da Revista Pesquisa Veterinária Brasileira

Fatores de virulência e genotipagem por MLVF e PFGE em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite clínica e subclínica em rebanhos bovinos do Estado de Minas Gerais, Brasil¹

Juliana R. da Silva^{2*}, [inserir os demais autores]

ABSTRACT.- Silva, J.R., [inserir os demais autores] . 2019.

[Virulence factors and genotyping by MLVF and PFGE in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and subclinical mastitis in cattle herds of the State of Minas Gerais, Brazil.] Fatores de virulência e genotipagem por MLVF e PFGE em *Staphylococcus aureus* de mastite clínica e subclínica em rebanhos bovinos do Estado de Minas Gerais, Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Campus Histórico, Lavras, MG 37200-000, Brazil. E-mail: gmcosta@dmv.ufla.br

Brazil is the fourth largest producer of milk worldwide and Minas Gerais stands out as the state that produces the most milk in the country. Mastitis is the most costly disease occurring in cattle herds and *Staphylococcus aureus* is reported as one of the major causative agents of this disease in Brazilian herds. Experimental studies of virulence and molecular characterization of this pathogen are necessary to improve the understanding of the pathogenesis and epidemiology of the disease caused by it, creating new possibilities strategies of control and prevention. The objectives of this work were to characterize a population of *S. aureus* from cases of clinical and subclinical mastitis of herds of the State of Minas Gerais, Brazil, in relation to population diversity, by means of Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) and Multiple-locus variable-number tandem repeat fingerprinting (MLVF) typing techniques, to compare the typing of these two techniques and prospecting the virulence genes encoding agglutination factor proteins (*ClfA* and *ClfB*), fibronectin binding protein (*FnbPA*), toxins (*Hla* and *Luk-ED*) and elastin binding (*Ebps*), through PCR (Polymerase Chain Reaction). The results showed that the PFGE and MLVA genotyping techniques were efficient to group *S. aureus* isolates from clinical and subclinical mastitis, showing that there are predominant genotypes causing mastitis and that these are widely disseminated among different herds. Although PFGE was slightly more discriminatory (ID = 0.97 (100% similarity) and 0.67 (similarity 80%)), MLVF (ID = 087 (similarity 100% and 0.51 (similarity 80%)) was also confirmed as a good typing technique, allowing a clustering that partially reflected the clustering demonstrated by PFGE. The MLVF presented, with 80% of similarity, a cluster with predominance of clinical strains and another with predominance of subclinical strains. All isolates tested were positive for the virulence genes encoding agglutination factor proteins (*ClfA* and *ClfB*), fibronectin binding protein (*FnbPA*) and *Hla* toxin. The genes coding for *Luk-ED* toxin and elastin-binding protein (*Ebps*), respectively, were detected in 97.4% and 26.3% of the isolates. This shows that these virulence factors, except *Ebps*, may be associated with the occurrence of mastitis in this region. This study contributed to the understanding of the pathogenesis of mastitis in the State of Minas Gerais, Brazil and showed that the MLVF technique can be used as an alternative for *S. aureus* typing.

INDEX TERMS: Genotyping, Pulsed-field Gel Electrophoresis, Multiple-locus variable-number tandem repeat fingerprinting

¹Recebido em

Aceito para publicação em

²Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Campus Histórico, Lavras, MG 37200-000, Brasil. Pesquisa de doutorado com apoio _____. *Autor para correspondência: gmcosta@dmv.ufla.br

³ [inserir os demais autores

RESUMO.- O Brasil é o quarto maior produtor de leite mundial e Minas Gerais se destaca como o Estado que mais produz leite no país. A mastite é a doença mais onerosa que ocorre nos rebanhos bovinos e *Staphylococcus aureus* é relatado como um dos principais agentes causadores dessa doença em rebanhos brasileiros. Trabalhos experimentais de virulência e caracterização molecular desse patógeno são necessários para melhorar a compreensão da patogênese e epidemiologia da doença por ele causada, abrindo possibilidades para o surgimento de novas formas de controle e prevenção. Os objetivos desse trabalho foram realizar a caracterização uma população de *S. aureus* provenientes de casos de mastite clínica e subclínica de rebanhos do Estado de Minas Gerais, Brasil, quanto à diversidade populacional, por meio das técnicas de tipagem de PFGE e MLVF, comparar o resultado da tipagem dessas duas técnicas e realizar a prospecção dos genes de virulência codificadores das proteínas do fator de aglutinação (*ClfA* e *ClfB*), da proteína de ligação à fibronectina (*FnBPA*), das toxinas (*Hla* e *Luk-ED*) e da proteína de ligação a elastina (*Ebps*), através de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Os resultados mostraram que as técnicas de genotipagem PFGE e MLVA foram eficientes para agrupar os isolados de *S. aureus* provenientes de mastite clínica e subclínica, mostrando que existem genótipos predominantes causando mastite e que estes estão amplamente disseminados entre diferentes rebanhos. Embora a PFGE tenha sido ligeiramente mais discriminatória (ID= 0,97 (similaridade 100%) e 0,67 (similaridade 80%)), a MLVF (ID= 087 (similaridade 100% e 0,51 (similaridade 80%)) também se confirmou como uma boa técnica de tipagem, permitindo um agrupamento que refletia parcialmente o agrupamento demonstrado pela PFGE. A MLVF apresentou, com 80% de similaridade, um *cluster* com predomínio de amostras clínicas e outro com amostras subclínicas em predominância. Todos isolados testados foram positivos para os genes de virulência codificadores das proteínas do fator de aglutinação (*ClfA* e *ClfB*), da proteína de ligação à fibronectina (*FnBPA*) e da toxina *Hla*. Em 97,4% e 26,3% dos isolados foram detectados os genes que codificam para a toxina *Luk-ED* e para a proteína de ligação a elastina (*Ebps*), respectivamente. Isso mostra que esses fatores de virulência, exceto *Ebps*, podem estar associados a ocorrência da mastite nessa região. Este estudo contribuiu para o entendimento da patogênese da mastite no Estado de Minas Gerais, Brasil e mostrou que a técnica de MLVF pode ser utilizada como uma alternativa para a tipagem de *S. aureus*.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Genotipagem, *Pulsed-field Gel Eletroforesis*, *Multiple-locus variable-number tandem repeat fingerprinting*

INTRODUÇÃO

O Brasil é o quarto maior produtor mundial de leite, atrás apenas dos Estados Unidos, Índia e China (Vilela et al. 2017). Em 2015, o número de vacas ordenhadas foi estimado em 21.751.073 de cabeças com a produção de 35 bilhões de litros de leite. Minas Gerais produziu 27% deste total se destacando como o Estado de maior produção de leite no país (Carvalho et al. 2017). Não obstante a posição de destaque no cenário mundial, a produtividade do rebanho brasileiro (4,4 litros vaca/dia) ainda é muito baixa comparada a de outros países. Vários são os aspectos determinantes desta realidade, principalmente os altos índices de mastite que predominam nos rebanhos brasileiros (Vilela et al. 2017).

A mastite é a doença infecciosa mais importante e que causa os maiores prejuízos aos rebanhos bovinos leiteiros em todo o mundo (Keefe 2012, Vlieghe et al. 2012, Paul & Gan-Guly 2014, Acosta et al. 2016, Kot et al. 2016). Esses prejuízos estão relacionados ao descarte de leite dos animais em tratamento, gastos com medicamentos, descarte de animais cronicamente infectados e, eventualmente, morte de animais doentes (Peton & Le Loir 2014, Jamali et al. 2018). A mastite clínica é a mais facilmente observada e a que causa as maiores preocupações ao produtor, no entanto, a mastite subclínica é mais prevalente e causa os maiores prejuízos. Nesta não ocorrem alterações visíveis no leite ou no úbere, portanto, sua detecção é baseada na realização de testes que evidenciam a infecção ou apontem o aumento do número de células somáticas. Considera-se, que para cada caso de mastite clínica, ocorram entre 20 e 50 casos subclínicos (Ruegg, 2012).

Diversos agentes estão envolvidos em sua etiologia, entre eles se destaca a bactéria *Staphylococcus aureus*, um agente primário de infecções intramamárias bovinas, sendo responsável por casos clínicos, subclínicos e quadros crônicos com manifestações clínicas ocasionais que levam a perdas econômicas substanciais (Ruegg 2012). Trata-se de um agente contagioso de difícil controle e que está presente na maioria dos rebanhos leiteiros brasileiros em frequências de isolamento que variam de 12,6% a 70,9% (Andrade et al. 2000, Langoni et al. 2009, Zanette et al. 2010, Bandeira et al. 2013). No Estado de Minas Gerais esse agente já foi isolado em taxas de 19,2 % e 34,2% nos rebanhos investigados (Brito et al.1999, Costa 2008).

A infecção por *S. aureus* provoca perdas significativas na produção de leite pela permanente destruição das células do epitélio glandular (Barkema et al. 2006). A patogênese se desenvolve devido à capacidade do agente produzir uma ampla gama de fatores de virulência que possuem diversas funções, auxiliando na colonização, adesão, invasão da glândula mamária, bem como na evasão do sistema imune do hospedeiro (Fluit 2012, Foster 2014, Scali et al. 2015). A variedade de fatores de virulência desse patógeno contribui para sua diversidade genética e auxilia no estabelecimento das infecções, desta forma, estudos que enfoquem estes quesitos são fundamentais para o entendimento da relação hospedeiro-parasito e para o desenvolvimento de métodos de controle mais efetivos para a doença (Von Eiff et al. 2004, Haslinger-Loffler et al. 2005).

Vários métodos têm sido utilizados para a genotipagem de *S. aureus*, sendo que os mais comuns incluem *Pulsed-field Gel Eletroforesis* (PFGE) (Adkins et al. 2016), *Multilocus sequence type* (MLST) (Smith et al. 2005), *Multilocus variable-number tandem repeat analysis* (MLVA) (Sobral et al. 2012), *Multiple-locus variable-number tandem repeat fingerprinting* (MLVF) (Kosecka-Strojek et al. 2016) e *Restriction Fragment Length Polimorphism* (RFLP) (Costa et al. 2012). A análise de macrorrestricção do DNA cromossômico e separação dos fragmentos pela técnica de PFGE, embora seja mais demorada, tem sido considerada a ferramenta de tipagem de maior poder discriminatório para *S. aureus* e um bom método para se estabelecer relações clonais em estudos epidemiológicos e moleculares (Tenover et al. 1995, Zadocks et al. 2002, Sommerhauser et al. 2003, Adkins et al. 2016). A MLVF têm apresentado poder discriminatório semelhante ao da PFGE (Luczak-Kadlubowska et al. 2008) e apresenta as vantagens de ser mais rápida e mais barata do que outras técnicas baseadas em sequenciamento genômico (Karynski et al., 2008).

Os objetivos desse trabalho foram realizar a caracterização uma população de *S. aureus* provenientes de casos de mastite clínica e subclínica de rebanhos do Estado de Minas Gerais, Brasil, quanto à diversidade populacional, por meio das técnicas de tipagem de PFGE e MLVF, comparar o resultado da tipagem dessas duas técnicas e realizar a prospecção dos genes de virulência codificadores das proteínas do fator de aglutinação (*ClfA* e *ClfB*), da proteína de ligação à fibronectina (*FnBPA*), das toxinas (*Hla* e *Luk-ED*) e da proteína de ligação a elastina (*Ebps*), através de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados bacterianos. Foram utilizados 76 isolados de *S. aureus* provenientes de 22 rebanhos de bovinos leiteiros do Estado de Minas Gerais, Brasil, coletados no período de janeiro a setembro de 2004. Deste total, 31 amostras são provenientes de casos mastite clínica e o restante (45) proveniente de casos de mastite subclínica. Os municípios aos quais pertenciam os rebanhos, bem como o número de amostras de origem clínica e subclínica dentro dos rebanhos estão descritos no quadro 1.

Quadro 1: Municípios de Minas Gerais, Brasil nos quais os isolados foram coletados, rebanhos nos municípios e número de isolados de origem clínica e subclínica em cada rebanho:

Município	Rebanhos e Isolados S: Subclínica/ C:Clínica
Lavras	R1(1S;1C), R31(1C;1S)
Ijaci	R3 (5S;3C)
Ingaí	R4(2S;1C), R11(2S;1C), R21(1S;1C), R24(1S;1C), R27(4S;2C)
Perdões	R7(2S;1C)
Bom Sucesso	R12(2S;1C), R30(1S;1C)
Itutinga	R13(1S;1C), R15(3S;1C)
Nazareno	R14(1S;1C), R16(5S;3C)
Carrancas	R17(2S;1C)
Ribeirão Vermelho	R19(2S;2C)
Itumirim	R22(1S;1C), R23(1S;2S)
Nepomuceno	R29(2S;1C)
São Gonçalo do Sapucaí	R34(3S;2C)
Três Corações	R36(2S;2C)

A caracterização fenotípica dos isolados foi realizada previamente por meio de testes de triagem que incluíram a morfologia macroscópica e microscópica, testes de catalase, oxidase, coagulase e produção de acetoina (teste de *Voges Proskauer*), realizados e interpretados segundo o *National Mastitis Council* (NMC 2004). Isolados fenotipicamente identificados como *S. aureus* foram submetidos à identificação genotípica por meio de PCR espécie-específica para o gene *femA*, de acordo com Costa et al. 2012. Os isolados utilizados neste estudo foram estocados em caldo glicerinado, em ultrafreezer em temperatura de -70°C, até a execução dos testes.

Pulsed-field Gel Eletroforesis (PFGE). A técnica de PFGE foi utilizada para avaliar a diversidade genética das amostras, sendo utilizado um dispositivo de campo elétrico homogêneo (CHEF DRII, Bio-Rad®, Estados Unidos). Os isolados de *S. aureus* foram semeados em Ágar BHI (*brain heart infusion*) (Sigma-Aldrich®, Índia) e incubados em estufa bacteriológica durante 18 h a 37° C. No dia seguinte uma colônia isolada de cada amostra foi transferida para tubos contendo 3 mL de caldo BHI (*brain heart infusion*) (Sigma-Aldrich®, Índia) que foram incubados em estufa bacteriológica a 37° C por 20 a 24 horas. Os *pellets* foram obtidos por centrifugação de 650 µl das culturas a 12000g durante três minutos e ressuspensos em 350 µl de TE (10mM Tris HCl, 5 mM EDTA, pH 8,0). Em cada amostra foi adicionado 350 µl de agarose *low melting* (Bio-Rad®, Estados Unidos) fundida a 2% e mantida a 55°C até o momento do uso, essa mistura foi utilizada para preencher os moldes. Os *plugs*, após a solidificação, foram incubados por no mínimo 4 horas a 37°C em Tampão EC (6mM Tris HCl, 1 M NaCl, 100 mM EDTA, 0,5% Brij-L23, 0,2% deoxicolato de sódio, 0,5% de laurosilsarcosina) e lisostafina (1 mg/mL). Os *plugs* foram então lavados cinco vezes em TE (10mM Tris HCl, 5 mM EDTA, pH 8,0) e armazenados em 3 mL de TE a 4°C até o momento do uso. Uma fatia de 3 mm de cada *plug* foi incubada em 100 µl de tampão de endonuclease de restrição (Sigma-Aldrich®, Índia) a 37°C por 30 minutos. O tampão foi então descartado e o *plug* digerido em 100 µl de solução de endonuclease de restrição contendo 20U da enzima SmaI (Sigma-Aldrich®, Índia) por 24 horas a 37°C. Após a restrição com SmaI, os *plugs* foram colocados nos

poços do gel de agarose 1,5% em TBE 0,5X (0,9 M Tris Base, 0,9 M Ácido Bórico, 1 mM EDTA pH 8,0) a 14 °C. O marcador Lambda PFG Marker (New England Biolabs®, Estados Unidos) foi incluído como padrão de tamanho molecular. O gel correu a 6 V/cm por 23 horas com um tempo de pulso inicial de 5 segundos e pulso final de 40 segundos. Os géis foram corados com brometo de etídio (50 µg/mL) e fotografados sob luz ultravioleta no L-Pix Chemi Photo Digitizer (Loccus Biotecnologia®, Brasil). O padrão de bandas dos géis foi analisado visualmente e utilizando-se o *software Bionumerics* versão 7.5 (Applied Maths®, Bélgica), construindo-se dendogramas de representação hierárquica das ligações entre os isolados. As bandas foram automaticamente atribuídas pelo computador e corrigidas manualmente depois que as imagens originais foram verificadas e avaliadas visualmente. A análise de agrupamento foi realizada com base no coeficiente de Dice e no método de grupo de pares não ponderados com média aritmética (UPGMA) utilizando 1,5% de otimização e 2% de tolerância. A *minimum spanning tree* (MST) foi gerada para avaliar a associação dos padrões de agrupamento dos isolados pela PFGE e *clusters* encontrados pelo MLVF, apresentação clínica, rebanhos e municípios. MST utilizada tem o maior escore geral de confiabilidade e foi montada utilizando o UPGMA para calcular a matriz de distância no Algoritmo de Prism associado com a regra de prioridade e a reamostragem de permutação (Feil et al. 2004). O dendrograma foi avaliado com 100% de similaridade e atribuindo um ponto de corte de 80%.

Multilocus variable-number tandem repeat fingerprinting (MLVF). As análises de MLVF foram realizadas utilizando os iniciadores descritos por Sabat et al. 2003 (MATERIAL SUPLEMENTAR). A extração e purificação do DNA dos isolados foram realizadas seguindo-se o protocolo descrito por Oliveira et al. 2002. O kit Multiplex PCR (Qiagen®, Alemanha) foi utilizado em uma reação de volume total de 10 µl contendo 5 µl de Master Mix Multiplex, 3 µl de água Milli-Q, 1 µl de DNA (50 ng/ µl) e 2 µl de um *pool* dos iniciadores (1 µM de cada iniciador).

As amostras foram colocadas em termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems®, Estados Unidos) programado para desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 95 °C por 30 segundos, 53 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos, com uma extensão final a 72 °C por 5 minutos. A eletroforese dos produtos de PCR foi realizada em gel de agarose 2%, a 80 volts, durante duas horas. Utilizou-se DNA *ladder* de 100 pares de bases (pb) (Ludwig®, Brasil). Os géis foram corados com brometo de etídio (50 µg/mL) e as imagens capturadas em transluminador L-Pix Chemi Photo Digitizer (Loccus Biotecnologia®, Brasil). O padrão de bandas dos géis foi analisado visualmente e por meio do *software Bionumerics* versão 7.5 (Applied Maths®, Bélgica), construindo-se dendogramas de representação hierárquica das ligações entre os isolados. As bandas foram automaticamente atribuídas pelo computador e corrigidas manualmente depois que as imagens originais foram verificadas e avaliadas visualmente. A análise de agrupamento foi realizada com base no coeficiente de Dice e no método de grupo de pares não ponderados com média aritmética (UPGMA). A MST foi gerada para avaliar o padrão de agrupamento da MLVF com o maior escore geral de confiabilidade e foi montada utilizando o UPGMA para calcular a matriz de distância no Algoritmo de Prism associado com a regra de prioridade e a reamostragem de permutação (Feil et al. 2004). O dendrograma foi avaliado com 100% de similaridade e atribuindo um ponto de corte de 80%.

Determinação do índice numérico de discriminação (ID). O poder discriminatório das técnicas de PFGE e MLVF foi determinado de acordo com o índice numérico descrito por Hunter & Gaston 1988 (http://insilico.ehu.es/mini_tools/discriminatory_power/index.php). O valor de ID indica a probabilidade que dois isolados selecionados aleatoriamente da população teste sejam classificados em diferentes genótipos.

Pesquisa dos genes de virulência. A presença dos genes de virulência codificadores das proteínas do fator de aglutinação (*ClfA* e *ClfB*), da proteína de ligação à fibronectina (*FnBPA*), das toxinas (*Hla* e *Luk-ED*) e da proteína de ligação a elastina (*Ebps*) foi avaliada por meio da PCR.

Foram realizadas reações individuais para cada um dos genes-alvo, contendo tampão 1X, 0,25mM de cada dNTP, 2,5mM MgCl₂, 0,25 mM de cada iniciador, 1,5U Taq polimerase e 50 ng de DNA molde. A amplificação foi realizada em termociclador GeneAmp®PCR System 9700 (Applied Biosystems®, Estados Unidos) programado para desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 95 °C por 30 segundos, 53 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos, com uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Utilizou-se DNA *Ladder* de 100 pb (Ludwig®, Brasil). Os iniciadores utilizados foram descritos por Jarraud et al. (2002), Tristan et al. (2003) e Ster et al. (2005). Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados após eletroforese em gel de agarose (1,5%, p/v), corados com solução de brometo de etídio etídio (50 µg/mL). O registro das imagens foi feito em fotodocumentador L-Pix Chemi

Photo Digitizer (Loccus Biotecnologia®, Brasil). Os resultados foram agrupados em quatro perfis de virulência e as análises estatísticas realizadas pelo Teste de Fisher, com nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Genotipagem (PFGE e MLVF)

As análises da PFGE apontaram 48 pulsotipos entre os 76 isolados analisados e o índice de discriminação da técnica foi de 0,97, considerando 100% de similaridade. Ao estabelecer um ponto de corte de 80% de similaridade o índice de discriminação caiu para 0,62 e foi possível dividir os isolados em 7 *clusters* e 3 *singletons*. O *cluster* C1 foi o que compilou o maior número de isolados (45) e teve isolados representantes de 19 dos 22 rebanhos em estudo. Na sequência apresentada pela figura 1 o *cluster* C2 (3 isolados), C3 (11 isolados), C4 (2 isolados), C5 (6 isolados), C6 (3 isolados), C7(3 isolados). Não houve associação entre os agrupamentos da análise de PFGE e a apresentação clínica.

As análises de MLVF apontaram 28 perfis moleculares nos 76 isolados analisados e o índice de discriminação da técnica foi de 0,87, considerando 100% de similaridade. Ao estabelecer um ponto de corte de 80% de similaridade, foi possível dividir os isolados em 5 *clusters* e 9 *singletons*, com índice de discriminação de 0,51. O *cluster* C1 foi o maior, contendo 53 isolados, seguido de C2 e C5 (4 isolados) e C3 e C4 (3 isolados) (figura 2). Das 45 amostras pertencentes ao C1 de PFGE, 43 pertenciam ao C1 de MLVF, mostrando uma concordância de 95,5% entre as técnicas nos *clusters* predominantes. O C3 de PFGE contém dois isolados que fazem parte do C3 de MLVF, assim como o C5 de PFGE tem dois isolados pertencentes ao C2 de MLVF. Dois dos três *singletons* de PFGE também foram determinados como *singletons* pelo MLVF (80% de similaridade). O *cluster* C2 de MLVF conteve 3 isolados de origem clínica e 1 isolado de origem subclínica, enquanto o *cluster* C5 dessa mesma técnica conteve 3 isolados de origem subclínica e apenas 1 isolado de origem clínica (80% de similaridade) (figura 2).

A figura 3 representa a MST da técnica de PFGE para todos os isolados e as cores mostram os 5 *clusters* e 9 *singletons* observados pela técnica de MLVF com ponto de corte de 80% de similaridade. Em verde observa-se as amostras do *cluster* C1 de MLVF que se encontram estreitamente relacionadas também pela técnica de PFGE. A figura 4 representa a MST da técnica de MLVF e as cores mostram os mesmos 5 *clusters* e 9 *singletons* definidos por essa técnica (80% similaridade) e observados na figura 3.

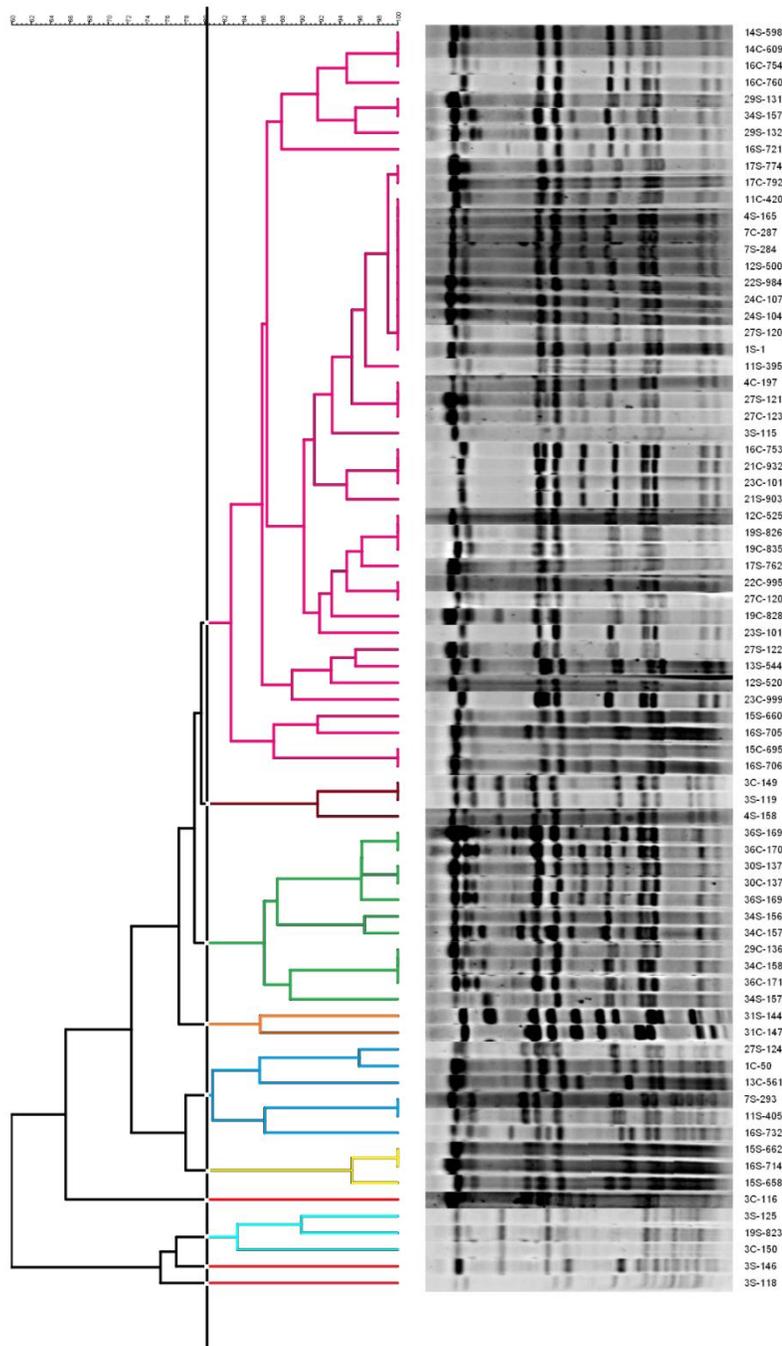


Fig.1. Dendrograma dos 76 isolados de *Staphylococcus aureus* provenientes de vacas com mastite clínica e subclínica de 22 rebanhos leiteiros de Minas Gerais, Brasil, utilizando os resultados obtidos pela técnica de PFGE com 100 e 80% de similaridade. A identificação dos isolados representa o número de identificação do rebanho, a apresentação clínica e a identificação das amostras. Cores apresentam os *clusters* e *singletons* considerando 80% de similaridade.

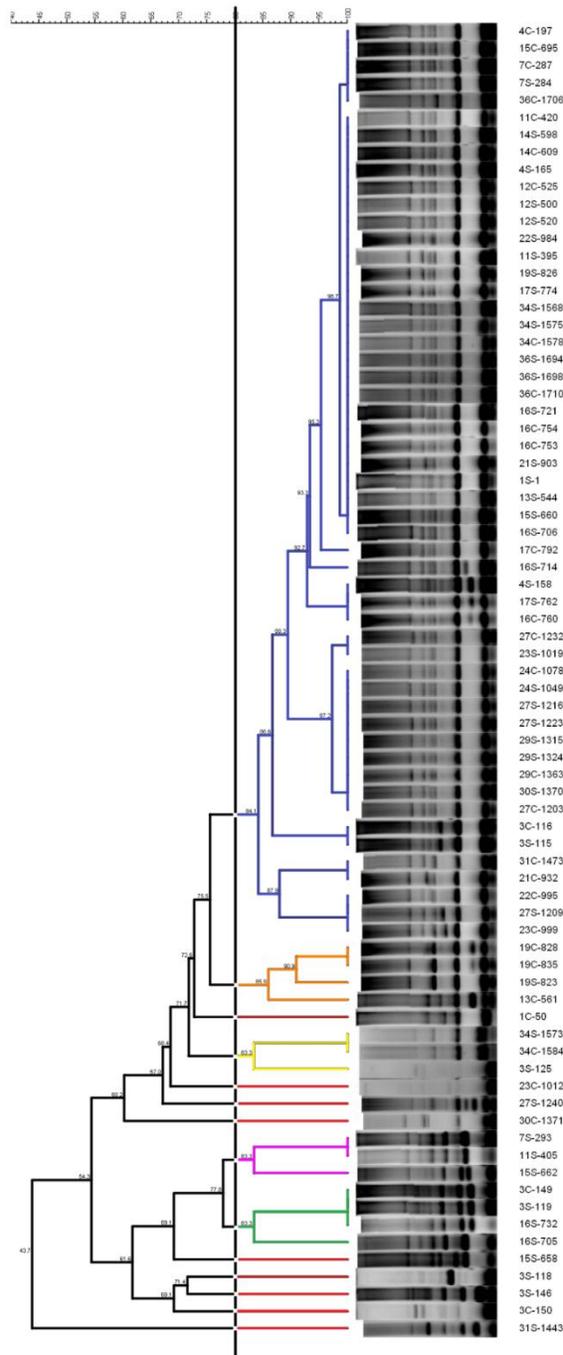


Fig.2. Dendrograma dos 76 isolados de *Staphylococcus aureus* provenientes de vacas com mastite clínica e subclínica de 22 rebanhos leiteiros de Minas Gerais, Brasil, utilizando os resultados obtidos pela técnica de MLVF com 100 e 80% de similaridade. A identificação dos isolados representa o número de identificação do rebanho, a apresentação clínica e a identificação das amostras. Cores apresentam os *clusters* e *singletons* considerando 80% de similaridade.

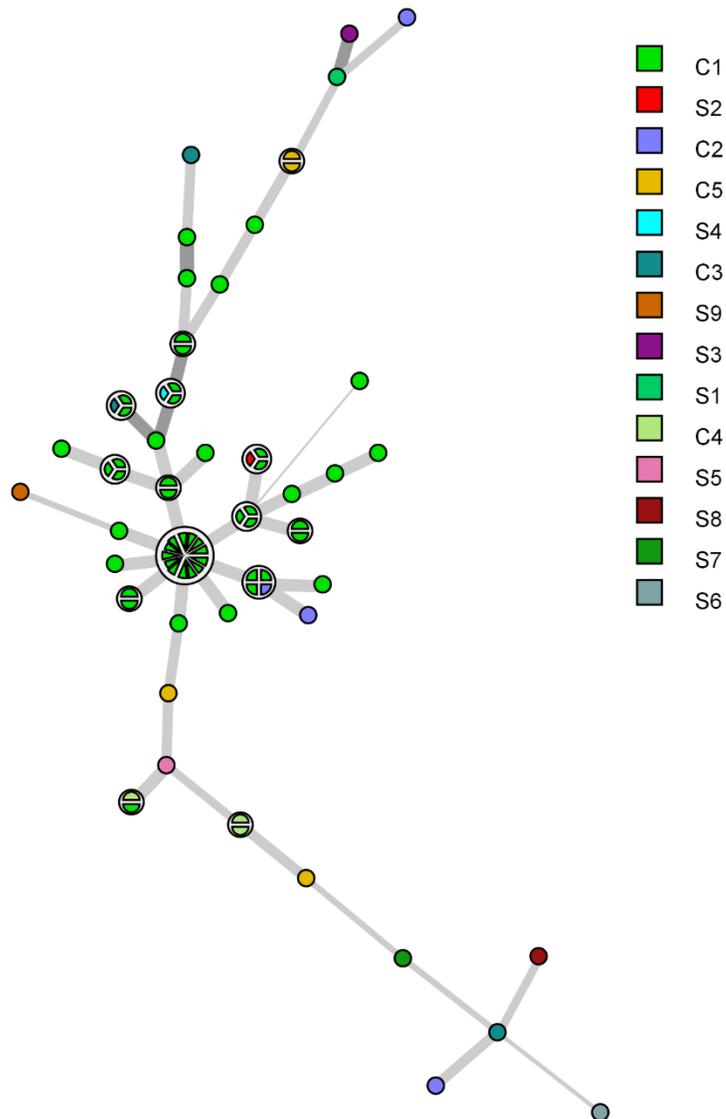


Fig. 3. *Minimum spanning tree* (MST) apresentando o agrupamento da técnica de PFGE dos 76 isolados de *Staphylococcus aureus* provenientes de vacas com mastite clínica e subclínica de 22 rebanhos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. Esta MST é a que apresenta o maior escore geral de confiabilidade e foi calculada utilizando UPGMA (método de grupo de pares não ponderados utilizando médias aritméticas) associado à regra de prioridade e reamostragem de permutação. Cores apresentam os cinco *clusters* (C) e nove *singletons* (S) determinados pela técnica de MLVF com ponto de corte de 80% de similaridade.

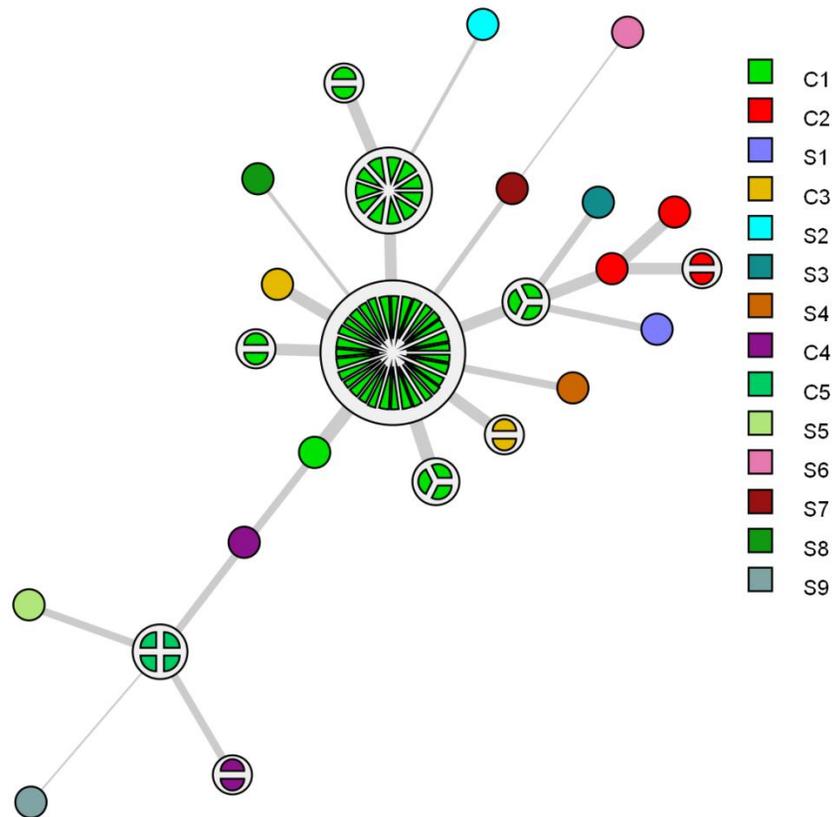


Fig. 4 *Minimum spanning tree* (MST) apresentando o agrupamento da técnica de MLVF dos 76 isolados de *Staphylococcus aureus* provenientes de vacas com mastite clínica e subclínica de 22 rebanhos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. Esta MST é a que apresenta o maior escore geral de confiabilidade e foi calculada utilizando UPGMA (método de grupo de pares não ponderados utilizando médias aritméticas) associado à regra de prioridade e reamostragem de permutação. Cores apresentam os cinco *clusteres* (C) e nove *singletons* (S) determinados pela técnica de MLVF com ponto de corte de 80% de similaridade.

Pesquisa de genes de virulência

Todos os 76 isolados testados foram positivos para os genes de virulência codificadores das proteínas do fator de aglutinação (*ClfA* e *ClfB*), da proteína de ligação à fibronectina (*FnbPA*) e da toxina *Hla*. Em 97,4% (n=74) e 26,3% (n=20) dos isolados foram detectados os genes que codificam para a toxina *Luk-ED* e para a proteína de ligação a elastina (*Ebps*), respectivamente. Os perfis genéticos de virulência são apresentados no quadro 2.

Quadro 2. Perfis gênicos de virulência encontrados em amostras de *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em rebanhos bovinos de Minas Gerais, Brasil

Perfil/Gene	<i>CifA</i>	<i>CifB</i>	<i>FnBPA</i>	<i>Hla</i>	<i>Luk-ED</i>	<i>Ebps</i>	Nº de amostras
Perfil 1	+	+	+	+	+	-	55 ^a
Perfil 2	+	+	+	+	+	+	19 ^b
Perfil 3	+	+	+	+	-	-	1 ^c
Perfil 4	+	+	+	+	-	+	1 ^c

^{a,b,c}Representam frequências diferentes entre os perfis – Teste Exato de Fisher (p<0,05)

DISCUSSÃO

Estudos de genotipagem fornecem evidências laboratoriais de que isolados epidemiologicamente relacionados, ou seja, coletados em determinada região e período, também possuem relações genéticas auxiliando na compreensão das vias de disseminação de cepas dentro e entre rebanhos (Tenover et al. 1995, Le Maréchal et al. 2011). A maioria (19) dos rebanhos analisados continha isolados que foram agrupados no cluster C1 pela técnica de PFGE, considerando 80% de similaridade, e este *cluster* correspondia em 95,5% ao *cluster* predominante da técnica de MLVF. É possível especular que os isolados pertencentes a esse grupo majoritário possuem características que favorecem sua persistência na glândula mamária e sua disseminação entre os animais. Diferentes pesquisadores (Buzolla et al. 2001, Cabral et al. 2004, Piccinini et al. 2010) também propuseram que isolados predominantes possuem características que conferem vantagens sobre outras cepas para sobreviver no ambiente e colonizar o úbere bovino.

Outros trabalhos, utilizando diferentes técnicas de tipagem para *S. aureus* provenientes de mastite bovina tem relatado resultados equiparáveis. Costa et al. 2012 estudaram por meio da técnica de RFLP uma população de *S. aureus* isolados de rebanhos brasileiros e observaram a existência de clones predominantes dispersos entre os rebanhos que respondiam pela maioria das infecções. Lundberg et al. 2014 trabalharam com 185 isolados a partir de rebanhos da Suécia pela técnica de PFGE e observaram que apenas três pulsotipos caracterizavam 74% dos isolados. Boss et al. 2016 analisaram 456 cepas de 12 países pelas técnicas de RS-PCR (*Ribosomal spacer*-PCR), *spa typing* e MLST e também concluíram que alguns clones de *S. aureus* são predominantes dentro das populações.

Considerando os agrupamentos pela técnica de MLVF (80% de similaridade), 75% dos isolados do *cluster* C2 eram provenientes de casos de mastite clínica, por outro lado, 75% dos isolados do *cluster* C5 vieram de animais com mastite subclínica. Esses grupos de isolados podem conter características que os tornam mais especializados para causar determinada apresentação clínica e este fato pode ser melhor investigado através de uma avaliação mais aprofundada desses isolados, como por exemplo, o sequenciamento genômico. Zadoks et al. (2000) relataram a ocorrência de associações entre diferentes linhagens e a severidade do processo inflamatório na glândula mamária, aferida através da contagem de células somáticas no leite, porém, os próprios autores relataram a necessidade de mais estudos para realizar correlações definitivas entre as características da doença e o perfil molecular dos isolados.

A observação de agrupamento de isolados provenientes de mastite clínica e subclínica foi restrita aos dois *clusters* de MLVF citados, desta forma, na maior parte das vezes, as características genéticas estudadas não estavam relacionadas ao tipo de mastite que os isolados originaram. Embora seja inquestionável o papel dos fatores de virulência na patogênese bacteriana, segundo Aitken et al. (2011), a gravidade da mastite muitas vezes está relacionada a fatores inerentes a reposta imune do animal acometido, que pode variar, por exemplo, de acordo com o período da lactação, das condições ambientais, da ocorrência de doenças concomitantes, dentre outros fatores. Já foi comprovado que bovinos possuem determinantes genéticos específicos que podem predispor à mastite e determinar a severidade dos casos (Yuan et al. 2012, Chen et al. 2018).

As técnicas de PFGE e MLVF apresentaram índices discriminatórios equiparáveis, 0,87 e 0,97 (100% de similaridade) e 0,51 e 0,62 (80% de similaridade) para MLVF e PFGE, respectivamente, mas PFGE foi ligeiramente mais discriminatória. Ao comparar as figuras 3 e 4 também é possível observar que PFGE foi mais discriminatória, determinando grupos menores e isolados geneticamente mais distantes que os apresentados pela MLVF na figura 4.

Deve-se ressaltar que MLVF foi capaz de tipificar todos os isolados do estudo e permitiu formar agrupamentos parcialmente relacionados aos da PFGE (figura 3), desta forma, MLVF caracterizou-se como uma boa técnica de tipagem para estudar isolados provenientes de casos de mastite clínica e subclínica. Esta técnica também tem sido utilizada com sucesso para tipificar isolados de *S. aureus* de origem humana (Karynski et al. 2008) e isolados resistentes a meticilina (Glasner et al. 2013). Caracteriza-se por ser uma técnica mais barata, de execução mais rápida, mais fácil e exige equipamentos menos sofisticados para execução do que a PFGE (Malachowa et al. 2005).

S. aureus pode produzir uma gama de fatores de virulência, como adesinas, enzimas, toxinas dentre outros e a combinação de tais fatores influencia na progressão da infecção (Ote et al. 2011, Peton & Le Loir 2014). No entanto, existe a dificuldade de se entender a relação entre os fatores de virulência e as características da doença que se desenvolve em função da infecção por determinadas cepas. Embora vários estudos tenham sido realizados, até o momento não foi possível definir um conjunto de fatores de virulência que esteja associado à mastite bovina ou aos tipos de manifestações dessa doença apresentadas pelos animais. As análises desse estudo mostraram ampla distribuição dos genes de virulência pesquisados (*fnBPA*, *clfA*, *clfB*, *hla*, *luk-ED*) entre os isolados, com exceção do gene codificador da proteína de ligação a elastina (*ebps*) que esteve presente em apenas 26,3% dos isolados. Não foi observada associação entre os perfis de virulência estabelecidos e forma de apresentação da doença (clínica e subclínica) ou com os agrupamentos das técnicas de PFGE e MLVA. Esta falta de associação pode ser decorrente da ampla distribuição dos genes nos isolados com conseqüente formação de um número restrito de perfis (4). A extensa presença desses genes nessas amostras pode indicar associação desses fatores de virulência com a ocorrência da mastite nessa região. A relevância destes genes já foi estabelecida na patogênese de infecções estafilocócicas em seres humanos e animais (Park et al. 1996, O'Neill et al. 2008, Ashraf et al. 2017, Zhao et al. 2017) mas, considerando a diversidade de fatores de virulência que podem estar presentes nesse patógeno (Ferry et al. 2005, Haveri et al. 2008, Almeida et al. 2013, Foster et al. 2014) é preciso realizar outros estudos para conclusões mais concretas, uma vez que foi pesquisado um número restrito de genes (6).

As *FnBPs* ou proteínas de ligação a fibronectina têm sido envolvidas na invasão intracelular (Dziewanowska et al. 1999), medeiam a adesão às plaquetas através da ligação a fibronectina e fibrinogênio (Heilmann et al. 2004) e foram relacionadas ao início da formação dos biofilmes (O'Neill et al. 2008). Quando se trata da relação com a mastite, essas proteínas já foram relacionadas ao aumento da capacidade de colonização de glândulas mamárias (Brouillete et al. 2003) e estiveram presentes em 63, 5% de 85 isolados de mastite do Sudeste brasileiro (Klein et al. 2012). Os fatores de aglutinação (*ClfA* e *ClfB*) interagem com o fibrinogênio sendo importantes na adesão as células do hospedeiro bem como na evasão do sistema imune (Scali et al. 2015). *ClfA* esta envolvido na agregação plaquetária (Kerrigan et al. 2008) e na invasão de células epiteliais de glândulas mamárias bovinas (Ashraf et al. 2017), além de ter sido colocado como um bom antígeno para o desenvolvimento de vacinas (Gong et al. 2010). A presença do gene *clfA* foi associada a manifestação de mastite clínica em bovinos e bubalinos (Yadav et al. 2015). Tanto *ClfA* e quanto *ClfB* foram recentemente descritos como amplamente disseminados em isolados de mastite bovina em rebanhos da Suécia e da Austrália (Gogoi-Tiwari et al. 2015, Artursson et al. 2016). No Brasil, o gene *clfB* foi detectado em 91% dos isolados provenientes de rebanhos do Sudeste do país (Klein et al. 2012).

A hemolisina *Hla* e a leucocidina *LukED*, bem como outras toxinas semelhantes que estão presentes em muitos isolados de *S. aureus*, são capazes de danificar as células do hospedeiro devido aos seus efeitos citolíticos. Além de seu papel na virulência, foi recentemente relatado que o gene *hla* tem um papel que pode ser importante para a caracterização molecular de *S. aureus* (Zhang et al. 2018). *Hla* foi expressa em 37% de isolados bovinos, 59% de isolados humanos portadores assintomáticos e 13% de isolados de septicemia, sendo que todos os isolados estudados eram genotipicamente positivos para esta toxina (Aarestrup et al. 1999). Um estudo com isolados de mastite do estado do Rio de Janeiro encontrou a frequência de 24% de positivos para o gene *hla*, não estando de acordo com a alta frequência descrita no presente estudo, porém eles estudaram amostras apenas de origem subclínica (Coelho et al. 2011). Leucocidinas produzidas por isolados de mastite foram muito ativas em polimorfonucleares de bovinos, mostrando a importância dessas toxinas na patogênese da mastite (Rainard et al. 2003). Tanto *Hla* quanto *LukED* foram descritas como amplamente disseminadas em dois rebanhos bovinos estudados na Finlândia (Haveri et al. 2008).

O gene que codifica a proteína de ligação a elastina (*ebps*) foi o único dentre os pesquisados que foi encontrado em uma baixa frequência (26,3%) neste estudo. A proteína de ligação à elastina medeia a ligação entre a bactéria e a elastina, que é um dos principais componentes da matriz extracelular (Park et al. 1996). O gene *ebps* foi identificado em 58% de um total de 157 cepas de *S. aureus* provenientes de humanos (assintomáticos, portadores de endocardite e de osteomielite) (Tristan et al. 2003). Ao examinar isolados de *S. aureus* provenientes de casos de mastite em ovelhas de rebanhos do Nordeste brasileiro, o gene *ebps* não foi identificado em nenhuma das amostras (Almeida et al. 2013).

CONCLUSÕES

As técnicas de genotipagem PFGE e MLVA se mostraram efetivas para agrupar os isolados de *S. aureus* provenientes de mastite clínica e subclínica deste estudo, mostrando que existem tipos genéticos predominantes causando mastite e estes estão amplamente disseminados entre diferentes rebanhos. Embora a PFGE tenha sido ligeiramente mais discriminatória, a MLVF também se confirmou como uma boa técnica de tipagem, permitindo um agrupamento que refletia parcialmente o agrupamento demonstrado pela PFGE. A MLVF, com um nível de similaridade de 80%, apresentou um *cluster* com predomínio de amostras clínicas e outro com amostras subclínicas em predominância.

Todos isolados testados foram positivos para os genes de virulência codificadores das proteínas do fator de aglutinação (*ClfA* e *ClfB*), da proteína de ligação à fibronectina (*FnBPA*) e da toxina *Hla*. Em 97,4% e 26,3% dos isolados foram detectados os genes que codificam para a toxina *Luk-ED* e para a proteína de ligação a elastina (*Ebps*), respectivamente. Isso mostra que esses fatores de virulência, exceto *Ebps*, podem estar associados a ocorrência da mastite nessa região.

Este estudo contribui para o entendimento da patogênese da mastite no Estado de Minas Gerais, Brasil e demonstrou que a técnica de MLVF pode ser utilizada como uma alternativa para a tipagem de *S. aureus*.

REFERÊNCIAS

- Aarestrup F.M., Larsen H.D., Eriksen N.H., Elsborg C.S. & Jensen N.E. 1999. Frequency of alpha- and beta-haemolysin in *Staphylococcus aureus* of bovine and human origin. A comparison between pheno- and genotype and variation in phenotypic expression. *APMIS* 107(4):425-430.
- Acosta, A.C., Silva, L.B.G., Medeiros, E.S., Pinheiro-Júnior, J.W. & Mota, R.A. 2016. Mastites em ruminantes no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 36(7):565-573.
- Adkins P.R.F., Middleton J.R. & Fox L.K. 2016. Comparison of Virulence Gene Identification, Ribosomal Spacer PCR, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Typing of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Cases of Subclinical Bovine Mastitis in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 54(7):1871-1876.
- Aitken, S.L., Corl, C. M. & Sordillo, L. M. 2011. Immunopathology of mastitis: insights into disease recognition and resolution. *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia* 16(4):291-304.
- Almeida, L.M., Almeida M.Z., Mendonça C.L. & Mamizuka E.M. 2013. Comparative analysis of *agr* groups and virulence genes among subclinical and clinical mastitis *Staphylococcus aureus* isolates from sheep flocks of the Northeast of Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 44(2):493-498
- Andrade M.A., Filho F.C.D., Mesquita A.J. & Rocha P.T. 2000. Sensibilidade *in vitro* de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de vacas com mastite subclínica. *Ci. Ani. Bras.* 1(1):53-57.
- Artursson, K., Söderlund R., Liu, L., Stefan M. & Schelin, J. 2016. Genotyping of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis and correlation to phenotypic characteristics. *Vet. Microbiol.* 193:156-161.
- Ashraf S., Cheng J. & Zhao, X. 2017. Clumping factor A of *Staphylococcus aureus* interacts with AnnexinA2 on mammary epithelial cells. *Sci. Rep.* 7(40608):1-9.
- Bandeira F.S., Picoli T., Zani J.L., Silva W.P. & Fischer G. 2013. Frequência de *Staphylococcus aureus* em casos de mastite bovina subclínica na região sul do Rio Grande do Sul. *Arq. Inst. Biol.* 80(1):1-6.

- Barkema H.W., Schukken Y.H. & Zadoks R.N. 2006. Invited Review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *J. Dairy Sci.* 89(6):1877-1895.
- Boss R., Cosandey A., Luini M., Artursson K., Bardiau M., Breitenwieser F., Hehenberger E., Lam T., Mansfeld M., Michel A., Mösslacher G., Naskova J., Nelson S., Podpečan O., Raemy A., Ryan E., Salat O., Zangerl P., Steiner A. & Graber H.U. 2016. Bovine *Staphylococcus aureus*: Subtyping, evolution, and zoonotic transfer. *J. Dairy Sci.* 99(1):515-528.
- Brito M.A.V.P., Brito J.R.F., Ribeiro M.T. & Veiga V.M.O. 1999. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 51(2):129-135.
- Brouillete E., Talbot B.G. & Malouin F. 2003. The fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* may promote mammary gland colonization in a lactating mouse model of mastitis. *Infect. Immun.* 71(4):2292-2295.
- Buzzola F.R., Quelle L., Gomez M.I., Catalano M., Steele-Moore L., Berg D., Gentilini E., Denamiel G. & Sordelli D.O. 2001. Genotypic analysis of *Staphylococcus aureus* from milk of dairy cows with mastitis in Argentina. *Epidemiol. Infect.* 126(3):445-452.
- Cabral K.G., Lämmle C, Zschöck M., Langoni H., Sá M.E.P., Victória C. & Silva Av. 2004. Pheno and genotyping of *Staphylococcus aureus*, isolated from bovine milk samples from São Paulo State, Brazil. *Can. J. Microbiol.* 50(11):901-909.
- Carvalho G.R., Rocha D.T. & Carneiro A.V. 2017. Indicadores: Leite e Derivados, v. 8, n. 69, 2017. Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, p.1-16.
- Chen N., Wang F., Yu N., Gao Y., Huang J., Dang R., Huang Y., Lan X., Lei C. & Chen H. 2018. Polymorphisms in MX2 gene are related with SCS in chinese dairy cows. *Anim Biotechnol.* 29(2):81-89.
- Coelho S.M.O., Pereira I.A., Soares L.C., Pribul B.R. & Souza M.M.S. 2011. Profile of virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *J. Dairy Sci.* 94(7):3305-3310.
- Costa G.M. 2008. Mamite bovina em rebanhos leiteiros da região sul do estado de Minas Gerais. 2008. 123p. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 123p.
- Costa G.M., Paiva L.V., Figueiredo H.C.P., Figueiras A.R., Pereira U.P. & Silva N. 2012. Population diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazilian dairy herds. *Res. Vet. Sci.* 93(2):733-735.
- Dziewanowska K., Patti J. M., Deobald C.F., Bayles K.W., Trumble W.R. & Bohach G.A. 1999. Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infect. Immun.* 67(9):4673-4678.
- Feil E.J., Li B.C., Aanensen D.M., Hanage W.P. & Spratt B.G. 2004. eBURST: Inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J. Bacteriol.* 186(5):1518-1530.
- Ferry T., Perpoint T., Vandenesch F. & Etienne F. 2005. Virulence determinants in *Staphylococcus aureus* and their involvement in clinical syndromes. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 7(6):420-428.
- Fluit A.C. 2012. Livestock-associated *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.* 18(8):735-744.
- Foster T.J, Geoghegan J.A, Ganesh V.K. & Höök M. 2014. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat. Rev. Microbiol.* 12(1):49-62.
- Glasner C., Sabat A.J., Chlebowicz M.A., Vanderhaeghen W., Fetsch A., Guerra B., Huber H., Stephan R., Torres C., Butaye P., Voss A., Wulf M. & van Dijk J.M. 2013. High-resolution typing by MLVF unveils extensive heterogeneity of European livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates with the sequence type 398. *Int. J. Med. Microbiol.* 303(3)124-127.
- Gogoi-Tiwari J., Waryah C.B., Eto K.Y., Tau M., Wells K., Costantino P., Tiwari H.K., Isloor S., Hegde N. & Mukkur T. 2015. Relative distribution of virulence-associated factors among Australian bovine *Staphylococcus aureus* isolates: Potential relevance to development of an effective bovine mastitis vaccine. *Virulence* 6(5):419-423.
- Gong R., Hu C., Xu H., Guo A., Chen H., Zhang G. & Shi L. 2010. Evaluation of clumping factor a binding region a in a subunit vaccine against *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in mice. *Clin. Vaccine Immunol.* 17(11): 1746-1752.
- Haslinger-Löffler B., Kahl B.C., Grundmeier M., Strangfeld K., Wagner B., Fischer U., Cheung A. L., Peters G., Schulze-Osthoff K. & Sinha B. 2005. Multiple virulence factors are required for *Staphylococcus aureus*-induced apoptosis in endothelial cells. *Cell. Microbiol.* 7(8): 1087-1097.

- Haveri M., Hovinen M., Roslöf A & Pyörälä S. 2008. Molecular types and genetic profiles of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine intramammary infections and extramammary sites. *J. Clin. Microbiol.* 46(11):3728-3735.
- Heilmann C., Niemann S., Sinha B., Herrmann M., Kehrel B.E. & Peters G. 2004. *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein (FnBP)-mediated adherence to platelets, and aggregation of platelets induced by FnBPA but not by FnBPB. *J. Infect. Di.* 190(2):321-329.
- Hunter P.R. & Gaston M.A. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26(11):2465-2466.
- Jamali H., Barkema H.W., Jacques M., Lavallée-Bourget E., Malouin, F., Saini, V., Stryhn H. & Dufour S. 2018. Invited review: Incidence, risk factors, and effects of clinical mastitis recurrence in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 101(6):4729-4746.
- Jarraud S., Mougél C., Thioulouse J., Lina G., Meugnier H., Forey F., Nesme X., Etienne J. & Vandenesch F. 2002. Relationships. Between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. *Infect. Immun.* 70(2):631-641.
- Karynski M., Sabat A.J., Empel J. & Hryniewicz, W. 2008. Molecular surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by multiple-locus variable number tandem repeat fingerprinting (formerly multiple-locus variable number tandem repeat analysis) and *spa* typing in a hierarchic approach. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 62(3):255-262.
- Keefe G. 2012. Update on Control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. *Vet. Clin. North Am Food Anim. Pract.* 28(2):203-216.
- Kerrigan S.W., Clarke N., Loughman A., Meade G. Foster T.J. & Cox D. 2008. Molecular basis for *Staphylococcus aureus*-mediated platelet aggregate formation under arterial shear in vitro. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28(2):335-340.
- Klein R.C., Fabres-Klein M.H., Brito M.A.V.P., Fietto L.G. & Ribon A.O.B. 2012. *Staphylococcus aureus* of bovine origin: Genetic diversity, prevalence and the expression of adhesin-encoding genes. *Vet. Microbiol.* 160(1-2):183-188.
- Kosecka-Strojek M., Ilczyszyn W.M., Buda A., Polakowska K., Murzyn K., Panz T., Bialecka A., Kasprowicz A., Jakubczak A., Krol J., Wieliczko A., Wladyka B. & Miedzobrodzki J. 2016. Multiple-locus variable-number tandem repeat fingerprinting as a method for rapid and cost-effective typing of animal-associated *Staphylococcus aureus* strains from lineages other than sequence type 398. *J. Med. Microbiol.* 65(12): 1494-1504.
- Kot B., Szweda P., Frankowska-Maciejewska A., Piechota M. & Wolska K. 2016. Virulence gene profiles in *Staphylococcus aureus* isolated from cows with subclinical mastitis in eastern Poland. *J. Dairy Res.* 83(2):228-235
- Langoni H., Sakiyama D.T.P., Guimarães F.F., Menozzi B.D. & Silva R.C. 2009. Aspectos citológicos e microbiológicos do leite em propriedades no sistema orgânico de produção. *Pes. Vet. Bras.* 29(11):881-886.
- Le Maréchal C., Seyffert N., Jardin J., Hernandez D., Jan G., Rault L., Azevedo V., François P., Schrenzel J., van de Guchte M., Even S. Berkova N., Thiéry R., Fitzgerald J.R., Vautor E. & Le Loir Y. 2011. Molecular Basis of Virulence in *Staphylococcus aureus*. *Mastitis. PLoS One* 6(11):1-10.
- Luczak-Kadlubowska A., Sabat A., Tambic-Andrsevici A., Payer-Pal M., Krzyszton-Russjan J. & Hryniewicz W. 2008. Usefulness of multiple-locus VNTR fingerprinting in detection of clonality of community- and hospital-acquired *Staphylococcus aureus* isolates. *Antonie Van Leeuwenhoek* 94(4):543-553.
- Lundberg Å., Aspán A., Nyman A., Unnerstad H.E. & Waller K.P. 2014. Associations between bacterial genotype and outcome of bovine clinical *Staphylococcus aureus* mastitis. *Acta Vet. Scand.* 56(2):1-8.
- Malachowa N., Sabat A., Gniadkowski M., Krzyszton-Russjan J., Empel J., Miedzobrodzki J., Kosowska-Shick K., Appelbaum P.C. & Hryniewicz W. 2005. Comparison of multiple-locus variable-number tandem repeat analysis with pulsed-field gel electrophoresis, *spa* typing and multilocus sequence typing in clonal characterization of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 43(7):3095-3100.
- National Mastitis Council-NMC. 2004. Microbiological Procedures for Diagnosis of Bovine Udder Infections and Determination of Milk Quality. 4^a Ed. NMC, Verona, p.1-47.
- O'Neill E., Pozzi C., Houston P., Humphreys H., Robinson D.A., Loughman A., Foster T.J. & O'Gara J.P. 2008. A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB. *J. Bacteriol.* 190(11):3835-3850.

- Oliveira S.D., Santos L.R., Schuch D.M.T., Silva A.B., Salle C.T.P. & Canal C.W. 2002. Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. *Vet. Microbiol.* 87(1):25-35.
- Ote I., Taminiau, B., Duprez, J.L., Dizier, I. & Mainil, J.G. 2011. Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 153(3-4):285-292.
- Park P.W., Rosenbloom J., Abrams W.R., Rosenbloom J. & Mecham R.P. 1996. Molecular Cloning and Expression of the Gene for Elastin-binding Protein (*ebpS*) in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 271(26):15803-15809.
- Paul I. & Ganguly S. 2014. Bovine mastitis, an economically important bacterial infection of udder in cattle: A review. *Ind. J. Sci. Res. Tech.* 2(2):1-2.
- Peton V. & Le Loir Y. 2014. *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. *Infect. Genet. Evol.* 21:602-615.
- Piccinini R., Cesaris L., Daprà V., Borromeo V., Picozzi C., Secchi C. & Zecconi A. 2009. The role of teat skin contamination in the epidemiology of *Staphylococcus aureus* intramammary infections. *J. Dairy Res.* 76(1):36-41.
- Rainard P., Corrales J.C., Barrio M.B., Cochard T. & Poutrel B. 2003. Leucotoxic activities of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows, ewes, and goats with mastitis: importance of LukM/LukF'-PV leukotoxin. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10(2):272-277.
- Ruegg P.L. 2012. New perspectives in udder health management. *Vet. Clin. North Am. Food Anim.* 28(2):149-163.
- Sabat A., Krzyszton-Russjan J., Strzalka W., Filipek R., Kosowska K., Hryniewicz W., Travis J. Potempa J. 2003. New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 41(4):1801-1804.
- Scali F., Camussone C., Calvino L.F., Cipolla M. & Zecconi A. 2015. Which are important targets in development of *Staphylococcus aureus* mastitis vaccine? *Res. Vet. Sci.* 100:88-99.
- Smith E.M., Green L.E., Medley G.F., Bird H.E., Fox L.K., Schukken Y.H., Kruze J.V., Bradley A.J., Zadoks R.N. & Dowson C.G. 2005. Multilocus sequence typing of intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 43(9):4737-4743.
- Sobral D., Schwarz S., Bergonier D., Brisabois A., Fessler A.T., Gilbert F.B., Kadlec K., Lebeau B., Loisy-Hamon F., Treilles M., Pourcel C. & Vergnaud G. 2012. High throughput multiple locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) of *Staphylococcus aureus* from human, animal and food sources. *PLoS One* 7(5):1-11.
- Sommerhauser J., Kloppert B., Wolter W., Zschock M., Sobiraj A. & Failing K. 2003. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. *Vet. Microbiol.* 96(1):91-102.
- Ster C., Gilbert F.B., Cochard T. & Poutrel B. 2005. Transcriptional profiles of regulatory and virulence factors of *Staphylococcus aureus* of bovine origin: oxygen impact and strain-to-strain variations. *Mol. Cell Probes.* 19(4):227-235.
- Tenover F.C., Arbeit R., Goering R., Mickelsen P.A., Murray B. & Persin D.H. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33(9):2233-2239.
- Tristan A., Ying L., Bes M., Etienne J., Vandenesch F. & Lina G. 2003. Use of multiplex pcr to identify *Staphylococcus aureus* adhesins involved in human hematogenous infections. *J. Clin. Microbiol.* 41(9):4465-4467.
- Vilela D., Resende J.C., Leite J.B. & Alves E. 2017. A evolução do leite no Brasil em cinco décadas. *Revta. Política Agrícola* 26(1):5-24.
- Vlieghe S.D., Fox L.K., Piepers S., McDougall S. & Barkema H.W. 2012. Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *J. Dairy Sci.* 95(3):1025-1040.
- Von Eiff C., Fridrich A.W., Peters G. & Becker K. 2004. Prevalence of genes encoding for members of the staphylococcal leucotoxin family among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Diagn. Microbiol. Inf. Dis.* 49(3):157-162.
- Yadav R., Sharma S.K., Yadav J. & Kataria A.K. 2015. Typing of *Staphylococcus aureus* obtained from mastitic milk of cattle and buffalo on the basis of two virulence-associated genes (*spa* and *clfA*). *Vet. World* 8(3):398-402.
- Yuan Z., Chu G., Yang D., Li J., Zhang L., Li J., Dan Y., Gao X., Gao H., Xu S. & Liu Z. 2012. BRCA1: a new candidate gene for bovine mastitis and its association analysis between single nucleotide polymorphisms and milk somatic cell score. *Mol. Biol. Rep.* 2012 39(6)6625-6631.

- Zadocks R.N., van Leeuwen W.B., Kreft D., Fox L.K., Barkema H.W., Schukken Y.H. & van Belkum A. 2002. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking equipment and bovine Milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis and binary typin. *J. Clin Microbiol.* 40(11):3894-3902.
- Zadocks R., van Leeuwen W., Barkema H., Sampimon O., Verbrugh H., Schukken Y.H. & van Belkum A. 2000. Application of pulsed-field gel electrophoresis and binary typing as tools in veterinary clinical microbiology and molecular epidemiologic analysis of bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 38(5):1931-1939.
- Zanette E., Scapin D. & Rossi E.M. 2010. Suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus*. isolados de amostras de leite de bovinos com suspeita de mastite. *Unoesc&Ciência ACBS* 1(1):65-70.
- Zhang L., Gao J., Barkema H.W., Ali T., Liu G., Deng Y., Naushad S., Kastelic J.P. & Han B. 2018. Virulence gene profiles: alpha-hemolysin and clonal diversity in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine clinical mastitis in China. *BMC Vet. Res.* 14(63):1-12.
- Zhao J., Nian L., Kwok L.Y., Sun T. & Zhao J. 2017. Reduction in fecal microbiota diversity and short-chain fatty acid producers in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infected individuals as revealed by PacBio single molecule, real-time sequencing technology. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 36(8):1463-1472.

MATERIAL SUPLEMENTAR:

Quadro 1. Iniciadores utilizados nos testes de PCR para a identificação genotípica dos isolados (gene *femA*), para a *Multilocus variable-number tandem repeat analysis* (MLVA) e pesquisa dos genes de virulência codificadores das proteínas do fator de aglutinação (*ClfA* e *ClfB*), da proteína ligante à fibronectina (*FnBPA*), das toxinas (*Hla* e *Luk-ED*) e da proteína de ligação a elastina (*Ebps*)

Genes alvos	Tamanhos dos produtos	Sequência (5'-3')	Referências dos iniciadores
MLVA	-	F: GATTCTGACCCAGGTTTCAGA R: CTGTATCTGGTAATGGTTCTTT	Sabat et al. 2003
MLVA	-	F: ATGGTGATTTCAGCAGTAAATCC R: CATTATTTGGTGGTGTAACCTCTT	Sabat et al. 2003
MLVA	-	F: GTAACAATTACGGATCATGATG R: TACCTGTTTCTGGTAATGCTTT	Sabat et al. 2003
MLVA	-	F: AGCACCAAAAGAGGAAGACAA R: GTTTAACGACATGTACTCCGT	Sabat et al. 2003
MLVA	-	F: ATCMATTTYGCMAAYGATGACCA R: TTGTCTGAATTATTGTTATCGCC	Sabat et al. 2003
<i>femA</i>	132 pb	F: AAA AAAGCACATAACAAGCG R: GATAAAGAAGAAACCAGCAG	Costa et al. 2012
<i>clfA</i>	104 pb	F: TGCAACTACGGAAGAAACGCCG R: CCTCCGCATTTGTATTGCTTGATTG	Ster et al. 2005
<i>clfB</i>	194 pb	F: TGCAAGTGCAGATTCCGAAAAAAC R: CCGTCGGTTGAGGTGTTTCATTTG	Ster et al. 2005
<i>fnBPA</i>	132 pb	F: CGACACAACCTCAAGACAATAGCGG R: CGTGGCTTACTTTCTGATGCCGTTT	Ster et al. 2005
<i>hla</i>	195 pb	F: GCGAAGAAGGTGCTAACAAAAGTGG R: CGCCAATTTTTCTGTATCATCACC	Ster et al. 2005
<i>ebps</i>	186 pb	F: CATCCAGAACCAATCGAAGAC R: CTTAACAGTTACATCATCATGTTTATCTTTG	Tristan et al. 2003
<i>luk-ED</i>	269 pb	F: TGAAAAAGGTTCAAAGTTGATACGAG R: TGTATTTCGATAGCAAAAGCAGTGCA	Jarraud et al. 2002

1 **ARTIGO 3 – Normas da Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**
2 Genotipagem por PFGE e fatores de virulência em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite
3 bovina de rebanhos brasileiros
4 Genotyping by PFGE and virulence factors in *Staphylococcus aureus* strains isolated from
5 bovine mastitis in Brazilian herds

6

7 **RESUMO:** A mastite é a doença que mais causa prejuízos aos rebanhos leiteiros em todo o
8 mundo e *Staphylococcus aureus* se destaca com um de seus principais agentes etiológicos.
9 Este patógeno possui uma variedade de fatores de virulência que permitem que colonize e se
10 mantenha no organismo do hospedeiro. Os objetivos deste estudo foram caracterizar uma
11 população de 153 isolados de *S. aureus* coletados entre os anos de 1994 e 2014 e provenientes
12 de sete estados brasileiros através da técnica de *Pulsed-field Gel Electrophoresis* (PFGE) e
13 pela prospecção por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) dos genes de virulência
14 codificadores dos fatores de aglutinação (*ClfA* e *ClfB*), da proteína de ligação à fibronectina
15 (*FnBPA*), da proteína de ligação a elastina (*Ebps*), da proteína de ligação ao colágeno (*Cna*)
16 e das toxinas (*Hla*, *Hlb* e *Luk-ED*). A genotipagem por meio de PFGE apontou 93 genótipos
17 (100% de similaridade). Os isolados foram organizados em 26 grupamentos e 20 genótipos
18 únicos (90% similaridade). Foram observados grupamentos com predomínio de certos
19 pulstotipos em determinados estados, com grande variação no ano de isolamento e na origem
20 dos isolados. Os genes de virulência foram encontrados em diferentes frequências: *clfA* em
21 84,3%; *clfB* e *hla* em 81%; *hla* em 71,2%; *fnBA* em 82,3%; *cna* em 94,7%; *ebps* em 58%;
22 *lukED* em 98% dos isolados. Foram observados 40 perfis de virulência que ocorreram em
23 frequências variáveis na população. A existência de genótipos predominantes que ocorreram
24 em vários estados e ao longo do período estudado sugere que estes genótipos sejam mais bem
25 adaptados, possuindo características que lhes favoreçam na relação hospedeiro/parasito. Os
26 oito genes de virulência pesquisados foram amplamente distribuídos na população e por se
27 tratar de genes que codificam proteínas importantes para a patogênese de *S. aureus* na mastite

28 bovina podem ser interessantes no desenvolvimento de vacinas contendo as proteínas por
29 eles codificadas como antígenos.

30

31 **Palavras-chave:** PFGE, *S. aureus*, genotipagem, fatores de virulência, infecção mamária.

32

33

34 **ABSTRACT:** The bovine mastitis is a disease that causes greater economic losses
35 worldwide and *Staphylococcus aureus* stands out with one of its main etiological agents.
36 This pathogen has a variety of virulence factors that allow it to colonize and remain in the
37 host organism. The objectives of this study were to characterize a population of 153 *S. aureus*
38 strains isolated between 1994 and 2014 and from seven Brazilian states using the Pulsed-
39 field Gel Electrophoresis (PFGE) technique and the prospection of the virulence genes
40 coding for (*ClfA* and *ClfB*), fibronectin binding protein (*FnBPA*), elastin binding protein
41 (*Ebps*), collagen binding protein (*Cna*) and toxins (*Hla*, *Hlb* and *Luk-ED*), by means of the
42 Polymerase Chain Reaction (PCR). The PFGE technique pointed 93 genotypes (100%
43 similarity). The isolates were organized in 26 clusters and 20 unique genotypes (90%
44 similarity). Groupings were observed with predominance of certain pulsotypes in certain
45 states, with great variation in the year of isolation and in the origin of the isolates. Virulence
46 genes were found in different frequencies: *clfA* in 84.3%; *clfB* and *hly* in 81%; *hla* in 71.2%;
47 *fnBA* in 82.3%; *cna* in 94.7%; *ebps* in 58%; *lukED* by 98% of the isolates. It was found 40
48 virulence profiles that occurred at variable frequencies in the population. The existence of
49 predominant genotypes occurring in several states and over time shows that these genotypes
50 are more adapted, having characteristics that favor them in the relationships parasite/host.
51 The eight virulence genes investigated that encode proteins important for the pathogenesis of
52 *S. aureus* in bovine mastitis were widely distributed in the population suggest that they may
53 be interesting in the development of vaccines containing the proteins coded by them as
54 antigens.

55

56 **Key-words:** PFGE, *S. aureus*, genotyping, virulence factors, mammary infection.

57

58 INTRODUÇÃO

59 A bovinocultura de leite está entre as principais atividades agropecuárias brasileiras
60 (Rigolin-sá *et al.*, 2014) levando o país a um lugar de destaque no cenário mundial, tendo
61 sido colocado em 2016 como o quarto maior produtor de leite no mundo, atrás apenas de
62 Estados Unidos, Índia e China (IBGE, 2016). A mastite é a doença que mais causa prejuízos
63 a este ramo do agronegócio, sendo estes decorrentes dos com gastos medicamentos, descarte
64 precoce de animais, queda na produção dos animais afetados, serviços veterinários nas
65 propriedades e também aos laticínios, devido a alterações na composição do leite que
66 diminuem o rendimento e a qualidade dos derivados lácteos (Keefe, 2012; Acosta *et al.*,
67 2016; Gomes e Henriques, 2016). Trata-se de uma doença de cunho multifatorial,
68 destacando-se em sua etiologia os agentes bacterianos (Talbot e Lacasse, 2005).

69 Entre os patógenos causadores da doença, destaca-se *S. aureus*, considerado o
70 principal patógeno causador de mastite bovina em vários países (Tenhagen *et al.*, 2006;
71 Abebe *et al.*, 2016; Hoque *et al.*, 2018). No Brasil, este agente é encontrado em rebanhos de
72 vários estados com frequências de isolamento que variam de 12,6% a 70,9% (Brito *et al.*,
73 1999; Andrade *et al.*, 2000; Costa, 2008; Langoni *et al.*, 2009; Zanette *et al.*, 2010; Bandeira
74 *et al.*, 2013). Esta bactéria está envolvida em quadros de mastite clínica e subclínica com
75 aumento nas contagens de células somáticas no leite (Halasa *et al.*, 2009; Deb *et al.*, 2013;
76 Botaro *et al.*, 2015). Além disso, animais infectados podem atuar como reservatórios, levando
77 a disseminação dos patógenos que podem se adaptar causando doenças em humanos
78 (Fitzgerald, 2012). Portanto, ele também é importante para a saúde pública, pois pode causar
79 diversas enfermidades em humanos e ser altamente resistente aos antimicrobianos (Chambers
80 e DeLeo, 2009).

81 *S. aureus* é capaz de produzir uma ampla variedade de fatores de virulência que
82 podem atuar em diferentes momentos do processo infeccioso (Fluit, 2012). No início, para
83 que ocorra a sua adesão às células do hospedeiro, o patógeno expressa moléculas ligadas a

84 sua superfície tais como o ácido teicóico, a proteína A (*SpA*), os fatores de aglutinação (*ClfA*
85 e *ClfB*), as proteínas que se ligam à fibronectina (*FnBPA* e *FnBPB*), ao colágeno (*Cna*), ao
86 fibrinogênio (*Efb*), à vitronectina e à elastina (*Ebps*) (Ferry *et al.*, 2005). Após a colonização,
87 são produzidas uma grande variedade de outros fatores para obter nutrientes, invadir,
88 sobreviver e se disseminar nos tecidos do hospedeiro, dentre estes estão enzimas e
89 exotoxinas, como α , β , γ e δ hemolisinas, leucotoxinas e enterotoxinas capazes de danificar
90 as células hospedeiras devido às ações citolíticas (Novick, 2003; Shompole *et al.*, 2003;
91 Foster, 2005). Embora se saiba que muitos desses fatores de virulência contribuem para a
92 colonização e infecção da glândula mamária, os mecanismos que propiciam a evolução da
93 doença para as diversas manifestações clínicas ainda não foram totalmente compreendidos
94 (Zecconi e Scali, 2013; Peton e Loir, 2014). Estudos vem mostrando a importância de avaliar
95 as combinações desses fatores para entender melhor a patogênese das infecções
96 estafilocócicas (Zecconi *et al.*, 2006; Taverna *et al.*, 2007).

97 Trabalhos que empregaram diferentes técnicas de genotipagem demonstraram que os
98 isolados de *S. aureus* encontrados nos rebanhos são geneticamente heterogêneos, embora
99 com a existência de genótipos predominantes (Saei *et al.*, 2009; Ote *et al.*, 2011; Costa *et al.*,
100 2012; Klein *et al.*, 2012). Tal fato requer a necessidade de estudos que permitam caracterizar
101 melhor as cepas circulantes nos rebanhos e a geração de informações que possam ser
102 utilizadas no controle da doença.

103 Entre as técnicas mais utilizadas para caracterização genotípica de *S. aureus* estão a
104 *Pulsed-field Gel Electrophoresis* (PFGE) (Adkins *et al.*, 2016), *Multilocus sequence type*
105 (MLST) (Smith *et al.*, 2005), *Multilocus variable-number tandem repeat analysis* (MLVA)
106 (Sobral *et al.*, 2012), *Multiple locus variable-number tandem repeat fingerprinting* (MLVF)
107 (Kosecka-Strojek *et al.*, 2016) e *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) (Costa
108 *et al.*, 2012). A técnica de PFGE é considerada o padrão ouro para genotipagem de isolados
109 de *S. aureus* (Goering, 2010), sendo utilizada para caracterizar isolados de mastite bovina
110 (Bonsaglia *et al.*, 2018), de outros animais e de humanos (Liu *et al.*, 2018), isolados
111 multirresistentes a agentes antimicrobianos (Gökmen *et al.*, 2018) e de alimentos (Vitale *et*

112 *al.*, 2018). A ampla utilização da técnica de PFGE se deve ao seu elevado poder
 113 discriminatório, a alta concordância epidemiológica e a alta reprodutibilidade
 114 intralaboratorial (Sabat *et al.*, 2013).

115 Os objetivos deste estudo foram caracterizar genotipicamente uma população de 153
 116 cepas de *S. aureus* isoladas entre os anos de 1994 e 2014 e provenientes de sete estados
 117 brasileiros. Para tal, foi utilizada a técnica de PFGE e a prospecção dos genes de virulência
 118 codificadores dos fatores de aglutinação (*ClfA* e *ClfB*), da proteína de ligação à fibronectina
 119 (*FnBPA*), da proteína de ligação a elastina (*Ebps*), da proteína de ligação ao colágeno (*Cna*)
 120 e das toxinas (*Hla*, *Hlb* e *Luk-ED*), por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

121

122 MATERIAL E MÉTODOS

123 1 - Isolados bacterianos

124 No presente estudo, foram utilizados 153 isolados de *S. aureus* provenientes de 76
 125 municípios dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina,
 126 Rio Grande do Sul e Rondônia, coletados entre os anos de 1994 e 2014 (figura 1 e tabela 1).
 127 Os isolados fazem parte da Coleção de Microrganismos de Interesse da Agroindústria e
 128 Pecuária (CMIAP) da Embrapa sediada na Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora, Minas
 129 Gerais e permaneceram estocados a -80°C até a execução dos experimentos.

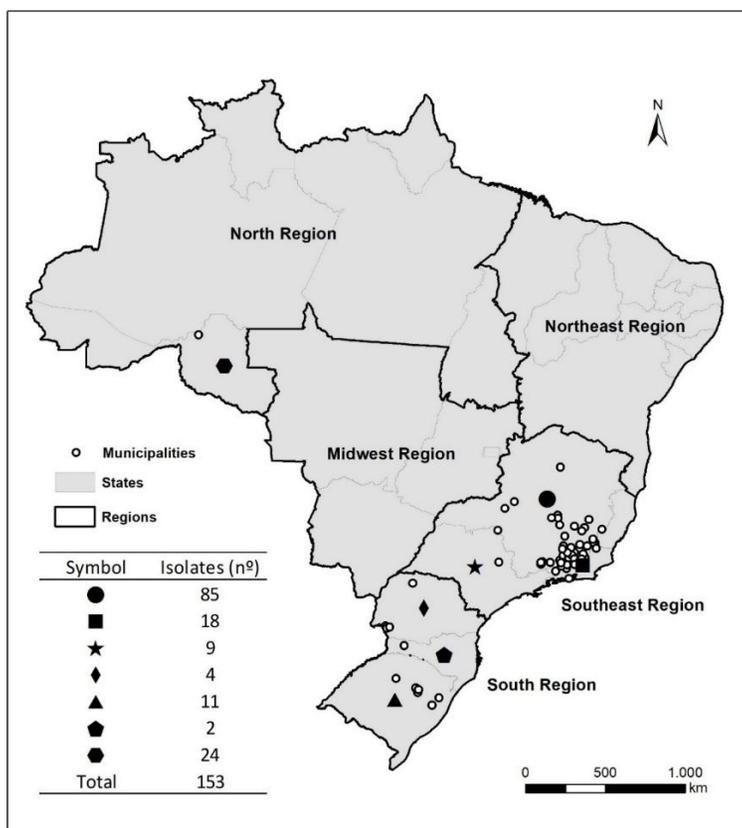
130

131 Tabela 1: Distribuição dos 153 isolados provenientes de casos de mastite subclínica em 76
 132 municípios brasileiros de acordo com o ano de isolamento e o Estado de origem. MG – Minas
 133 Gerais, SP – São Paulo, SC – Santa Catarina, RS – Rio Grande do Sul, PR – Paraná, RO -
 134 Rondônia:

Ano de	Isolamento	Estado de Origem (Número de isolados)
1994		MG (1)
1995		MG (3)

1996	MG (13); RJ (1)
1997	MG (6); RJ (2)
1998	MG (1); RJ (1)
1999	MG (4); RJ (1)
2000	MG (10); RJ (1)
2001	MG (7); RJ (3); SP (2)
2002	MG (3); RJ (1)
2011	RJ (1)
2013	MG (29); RJ (7); SP (7); PR (10); SC (2)
2014	MG (8); RS (5); RO (24)

135



136

137 Figura 1: Mapa do Brasil representando a origem dos 153 isolados de mastite
138 subclínica utilizados nesse estudo. Formas geométricas preenchidas em preto representam os
139 sete diferentes estados dos quais os isolados foram provenientes. Pequenos círculos
140 representam a dispersão dos 76 municípios que possuíam amostras representantes.

141

142 2 - *Pulsed-field Gel Electrophoresis* (PFGE)

143 A técnica de PFGE foi utilizada para avaliar a diversidade genética das amostras,
144 sendo utilizado um dispositivo de campo elétrico homogêneo (CHEF DRII, Bio-Rad[®],
145 Estados Unidos). Os isolados foram descongelados, semeados em Ágar BHI (*brain heart*
146 *infusion*) (Sigma-Aldrich[®], Índia) e incubados em estufa bacteriológica durante 18h a 37°C.
147 Após a incubação, uma colônia isolada de cada amostra foi transferida para tubos contendo
148 três mL de caldo BHI (*brain heart infusion*) (Sigma-Aldrich[®], Índia) que foram incubados
149 em estufa bacteriológica a 37°C por 20 a 24 horas. Os *pellets* foram obtidos por centrifugação
150 de 650 µl das culturas a 12000g durante três minutos e ressuspensos em 350 µl de TE (10mM
151 Tris HCl, 5 mM EDTA, pH 8,0). Em cada amostra foi adicionado 350 µl de agarose *low*
152 *melting* (Bio-Rad[®], Estados Unidos) fundida a 2% e mantida a 55°C até o momento do uso,
153 essa mistura foi utilizada para preencher os moldes. Os *plugs*, após a solidificação, foram
154 incubados por no mínimo 4 horas a 37°C em Tampão EC (6mM Tris HCl, 1 M NaCl, 100
155 mM EDTA, 0,5% Brij-L23, 0,2% deoxicolato de sódio, 0,5% de laurosilsarcosina) e
156 lisostafina (1 mg/mL). Os *plugs* foram então lavados cinco vezes em TE (10mM Tris HCl, 5
157 mM EDTA, pH 8,0) e armazenados em três mL de TE a 4°C até o momento do uso. Uma
158 fatia de três mm de cada *plug* foi incubada em 100 µl tampão de endonuclease de restrição
159 (Sigma-Aldrich[®], Índia) a 37°C por 30 minutos. O tampão foi então descartado e o *plug*
160 digerido em 100 µl de solução de endonuclease de restrição contendo 20U da enzima SmaI
161 (Sigma-Aldrich[®], Índia) por 24 horas a 37°C.

162 Após a restrição com SmaI, os *plugs* foram colocados nos poços do gel de agarose
163 1,5% em TBE 0,5X (0,9 M Tris Base, 0,9 M Ácido Bórico, 1 mM EDTA pH 8,0) a 14 °C. O
164 marcador Lambda PFG Marker (New England Biolabs[®], Estados Unidos) foi incluído como

165 padrão de tamanho molecular. O gel correu a 6 V/cm por 23 horas com um tempo de pulso
166 inicial de 5 segundos e pulso final de 40 segundos. Os géis foram corados com brometo de
167 etídio (50 µg/mL) e fotografados sob luz ultravioleta no *L-Pix Chemi Photo Digitizer* (Loccus
168 Biotecnologia®, Brasil). O padrão de bandas foi analisado visualmente e utilizando-se o
169 *Software Bionumerics* versão 7.5 (Applied Maths®, Bélgica). As bandas foram
170 automaticamente atribuídas pelo programa e corrigidas manualmente depois que as imagens
171 originais foram verificadas e avaliadas visualmente. A análise de agrupamento foi realizada
172 com base no coeficiente Dice e no método de grupo de pares não ponderados usando médias
173 aritméticas (UPGMA). O dendograma foi construído com otimização de 1,5% e tolerância
174 de 2%. Árvores filogenéticas [*Minimum Spanning Tree* (MST)] foram geradas para avaliar a
175 associação dos padrões de agrupamento dos isolados pela PFGE com os perfis genéticos de
176 virulência e com o estado de origem dos isolados. A MST utilizada tem o maior escore geral
177 de confiabilidade e foi montada utilizando o UPGMA para calcular a matriz de distância no
178 Algoritmo de Prism associado com a regra de prioridade e a reamostragem de permutação
179 (Feil *et al.*, 2004). Isolados com 100% de similaridade foram considerados indistinguíveis e
180 isolados com similaridade > 90% foram dispostos em um mesmo grupamento.

181

182 3 – Pesquisa de genes de virulência

183 A presença dos genes de virulência codificadores dos fatores de aglutinação (*ClfA* e
184 *ClfB*), da proteína de ligação à fibronectina (*FnBPA*), das toxinas (*Hla*, *Hlb* e *Luk-ED*), da
185 proteína de ligação a elastina (*Ebps*) e da proteína de ligação ao colágeno (*Cna*) foi avaliada
186 por meio da PCR. Foram utilizados iniciadores previamente descritos na literatura, sendo
187 que, para os genes *clfA*, *clfB*, *fnBPA*, *hla* e *hlb* foram utilizados os iniciadores descritos por
188 Ster *et al.* (2005), para o gene *ebps* os iniciadores descritos por Tristan *et al.* (2003), para o
189 gene *luK-ED* os iniciadores descritos por Jarraud *et al.* (2002) e para o gene *cna* os iniciadores
190 descritos por Arciola *et al.* (2005).

191 Foram realizadas reações individuais para cada um dos genes-alvo, contendo tampão
192 1X, 0,25mM de cada dNTP, 2,5mM MgCl₂, 0,25 mM de cada iniciador, 1,5U Taq

193 polimerase e 50 ng de DNA molde. A amplificação foi realizada em termociclador
194 GeneAmp®PCR System 9700 (Applied Biosystems®, Estados Unidos) programado para
195 desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 95 °C por 30 segundos, 53
196 °C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, com uma extensão final a 72°C por 5 minutos.
197 Utilizou-se DNA *Ladder* de 100 pb (Ludwig®, Brasil). Os fragmentos de DNA amplificados
198 foram visualizados após eletroforese em gel de agarose (1,5%, p/v), corados com solução de
199 brometo de etídio (50 µg/mL). O registro das imagens foi feito em fotodocumentador *L-Pix*
200 *Chemi Photo Digitizer* (Loccus Biotecnologia®, Brasil). Foram determinadas as frequências
201 de cada gene na população total e por estado e os resultados foram agrupados em 40 perfis
202 de virulência.

203

204 **RESULTADOS**

205 As análises realizadas pela técnica de PFGE definiram 93 diferentes genótipos nos
206 153 isolados estudados, sendo considerados do mesmo genótipo isolados com 100% de
207 similaridade. A distribuição do número de isolados por genótipos se deu da seguinte forma:
208 71 genótipos (um isolado cada); 10 genótipos (dois isolados cada); três genótipos (três
209 isolados cada); quatro genótipos (quatro isolados cada); um genótipo (cinco isolados); um
210 genótipo (seis isolados); dois genótipos (sete isolados cada); um genótipo (12 isolados).
211 Dentro de oito genótipos, foi possível observar variação entre os anos de isolamento, sendo
212 que foram agrupadas em um mesmo genótipo amostras com diferença de até 18 anos de
213 isolamento (figura 2).

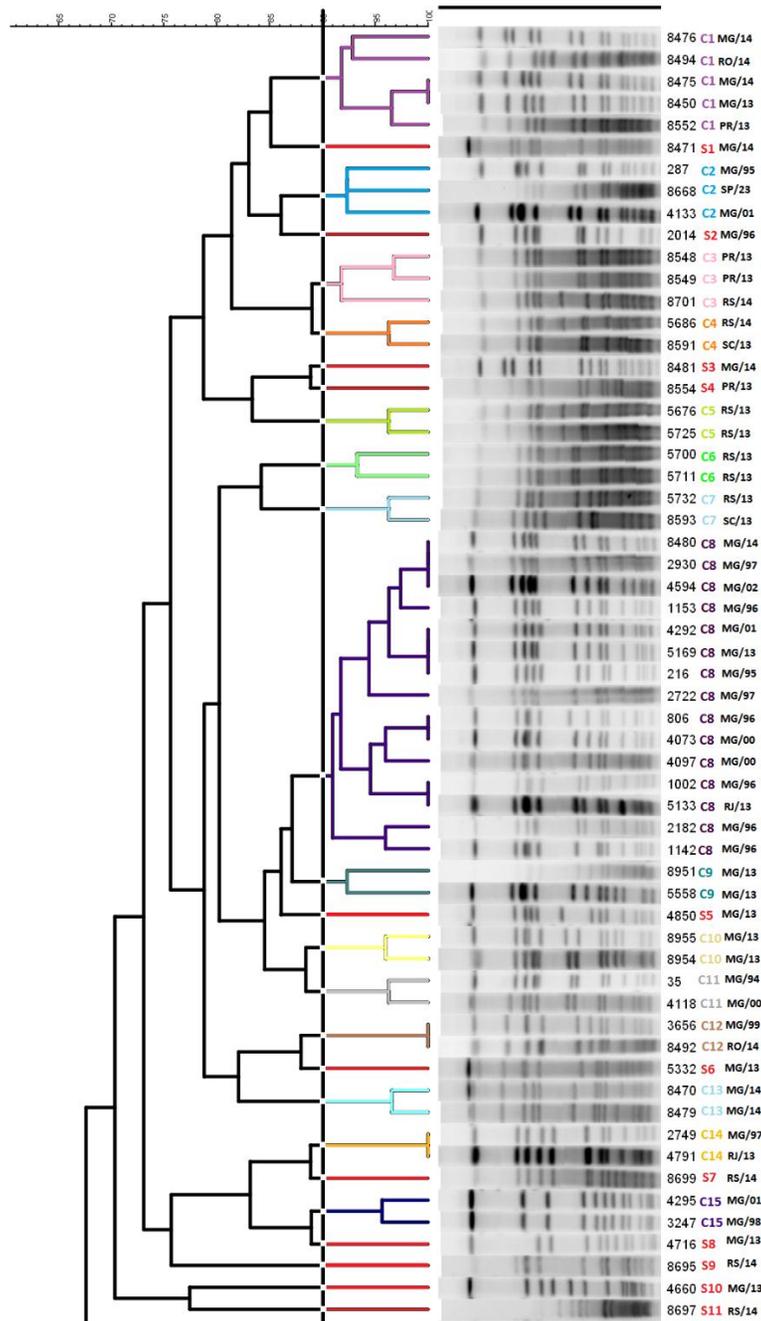
214 Ao definir um ponto de corte de 90% de similaridade, os isolados foram organizados
215 em 26 grupamentos com número variável de isolados e 20 genótipos com apenas um isolado.
216 Foi observado um grupamento predominante, contendo 40 isolados (C16), sendo a maior
217 parte deles (22) provenientes do estado de Rondônia e coletados no ano de 2014. Os demais
218 isolados desse grupamento (C16) pertenciam aos estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio
219 de Janeiro e o ano de coleta variou entre 1996 e 2013. O grupamento C8, composto por 15
220 isolados, teve um predomínio de amostras do estado de Minas Gerais (14), sendo que o ano

221 de isolamento variou entre 1996 a 2014. O grupo C20 (12 isolados) reuniu isolados de Minas
222 Gerais (3), Rio de Janeiro (4) e São Paulo (5) e teve também grande variação no ano de
223 isolamento (1997 a 2013) (figura 2).

224

225

226



227

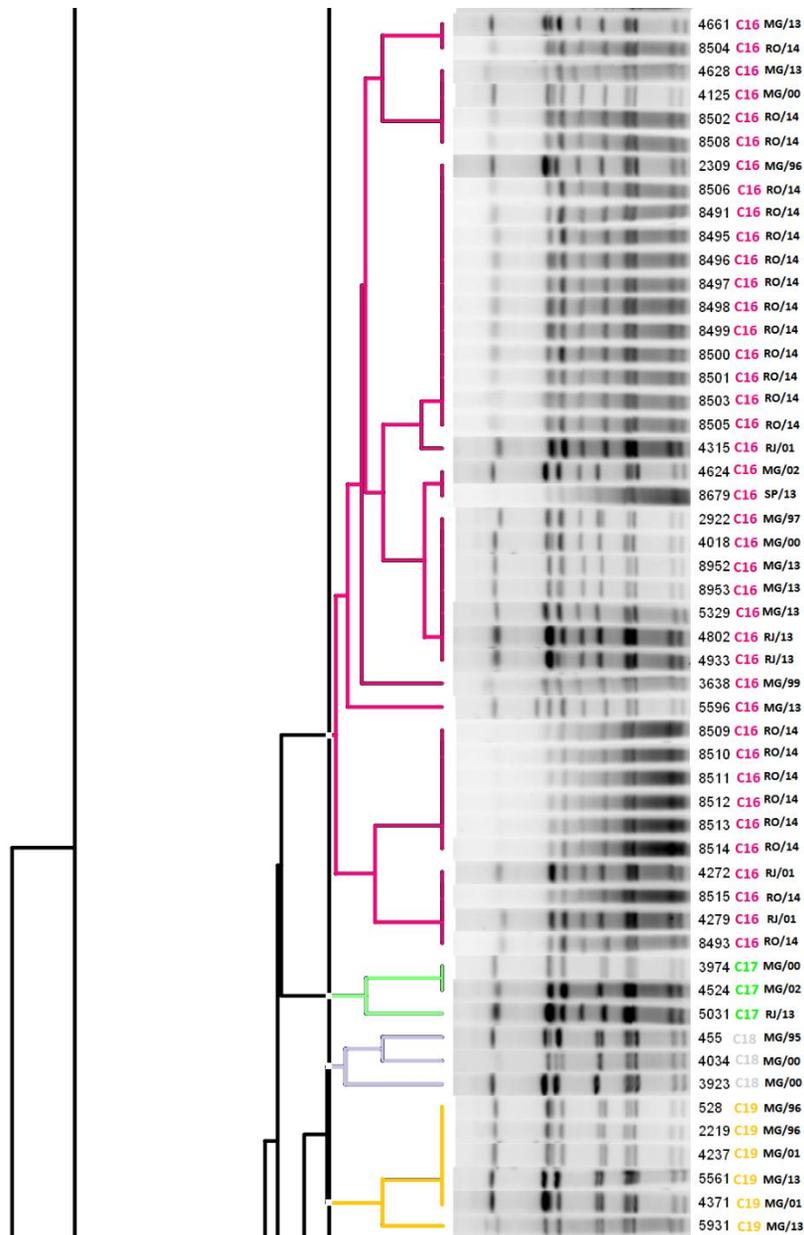
228

229

230

231

Figura 2 (parte 1): Dendrograma dos 153 isolados de *Staphylococcus aureus* provenientes de vacas com mastite subclínica de rebanhos brasileiros utilizando os resultados obtidos pela técnica de PFGE com 100 e 90% de similaridade. Cores apresentam os grupamentos e genótipos únicos considerando 90% de similaridade.



233

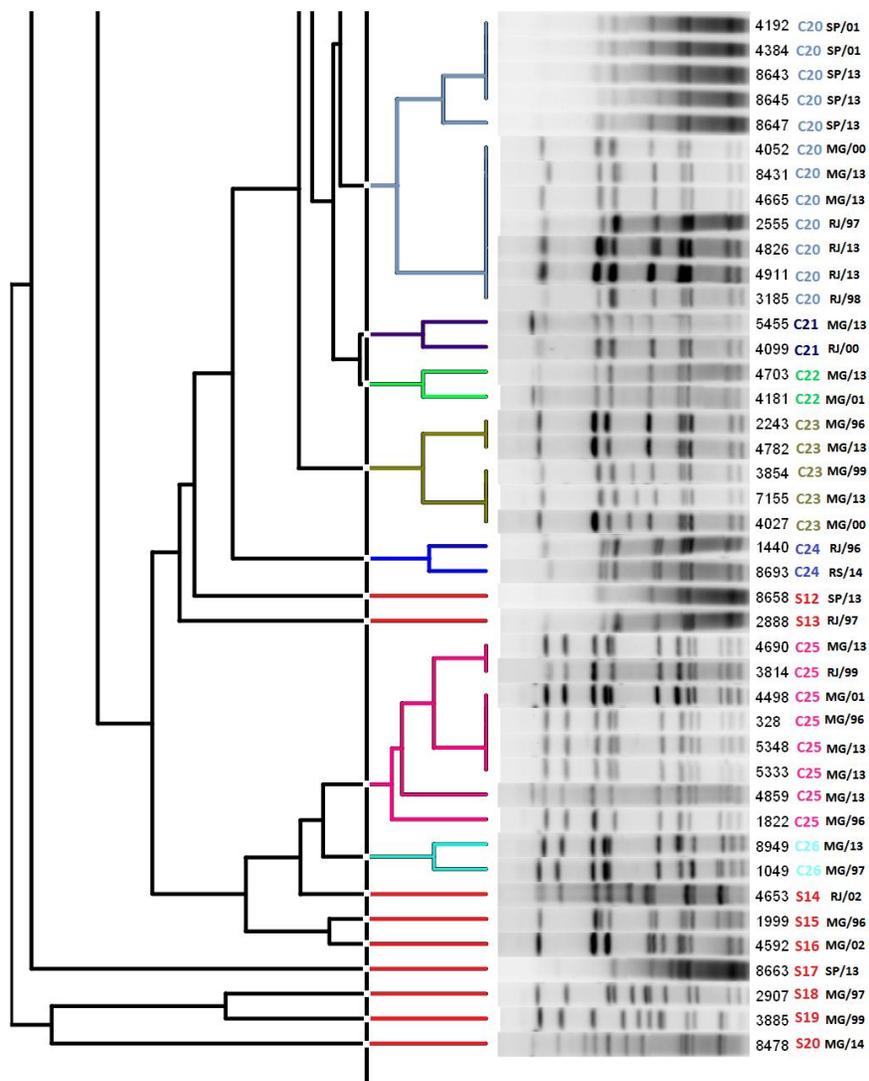
234

235

236

237

Figura 2 (parte 2): Dendrograma dos 153 isolados de *Staphylococcus aureus* provenientes de vacas com mastite subclínica de rebanhos brasileiros utilizando os resultados obtidos pela técnica de PFGE com 100 e 90% de similaridade. Cores apresentam os grupamentos e genótipos únicos considerando 90% de similaridade.



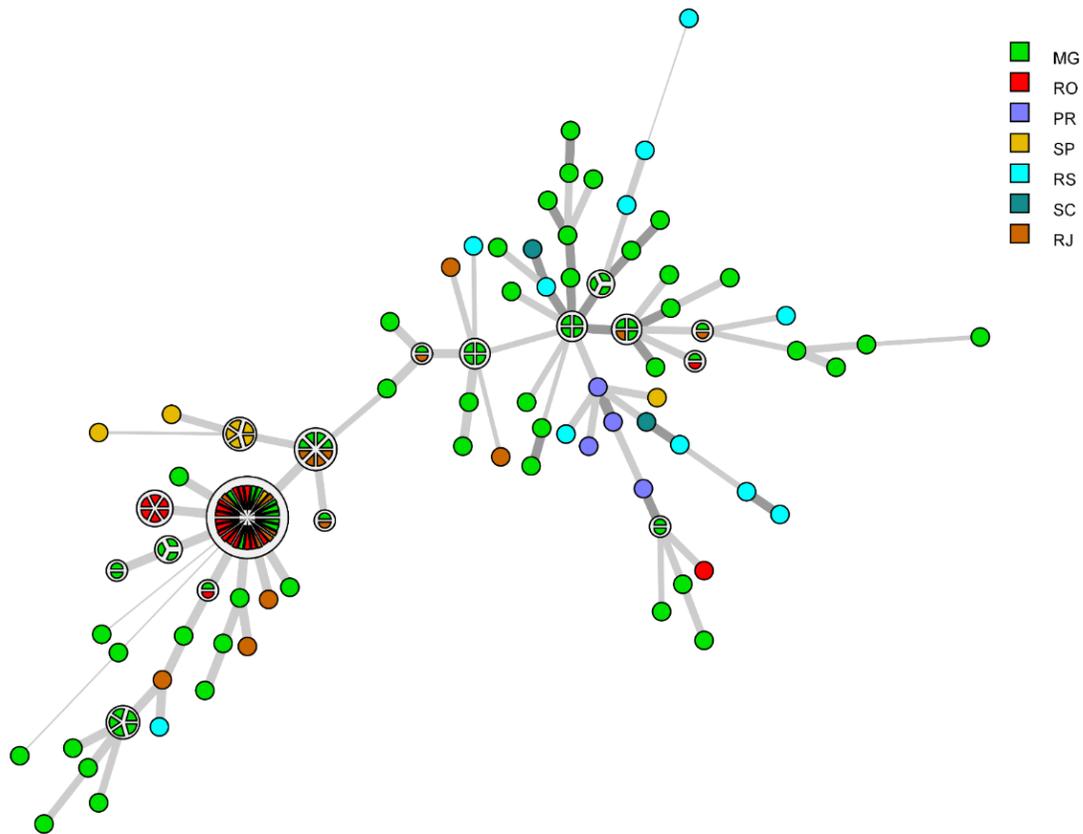
238

239 Figura 2 (parte 3): Dendograma dos 153 isolados de *Staphylococcus aureus* provenientes
 240 de vacas com mastite subclínica de rebanhos brasileiros utilizando os resultados obtidos pela
 241 técnica de PFGE com 100 e 90% de similaridade. Cores apresentam os grupamentos e
 242 genótipos únicos considerando 90% de similaridade.

243

244 A distribuição dos genótipos em relação ao Estado de origem apresentada pela MST
 245 (figura 3) mostrou que os isolados provenientes de Minas Gerais e do Rio de Janeiro eram os
 246 mais diversos, sendo encontrados em pontos distantes da MST. Por outro lado, os isolados

247 originados dos estados de São Paulo, Rondônia, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná,
248 se apresentaram, no geral, maior proximidade filogenética, apesar de alguns isolados
249 provenientes do Rio Grande do Sul, São Paulo e Rondônia se mostrarem mais distantes dos
250 demais.



251
252 Figura 3: *Minimum spanning tree* (MST) apresentando o agrupamento da técnica de PFGE
253 dos 153 isolados de *Staphylococcus aureus* provenientes de vacas com mastite subclínica de
254 rebanhos brasileiros. Esta MST é a que apresenta o maior escore geral de confiabilidade e foi
255 calculada utilizando UPGMA (método de grupo de pares não ponderados utilizando médias
256 aritméticas) associado à regra de prioridade e reamostragem de permutação. Cores
257 representam os diferentes estados de origem dos isolados.
258

259 Os genes de virulência pesquisados foram encontrados amplamente disseminados na
 260 população, sendo encontrados em diferentes frequências: *clfA* em 84,3%; *clfB* e *hly* em 81%;
 261 *hly* em 71,2%; *fnBA* em 82,3%; *cna* em 94,7%; *ebps* em 58%; *lukED* em 98%. A frequência
 262 dos genes por Estado analisado também variaram (tabela 2).

263

264 Tabela 2: Distribuição da frequência total e relativa dos genes de virulência que codificam
 265 os fatores de aglutinação (*ClfA* e *ClfB*), a proteína de ligação à fibronectina (*FnBPA*), a
 266 proteína de ligação a elastina (*Ebps*), a proteína de ligação ao colágeno (*Cna*) e as toxinas
 267 (*Hla*, *Hly* e *Luk-ED*) nos 153 isolados de *Staphylococcus aureus* avaliados. MG – Minas
 268 Gerais, SP – São Paulo, SC – Santa Catarina, RS – Rio Grande do Sul, PR – Paraná, RO –
 269 Rondônia

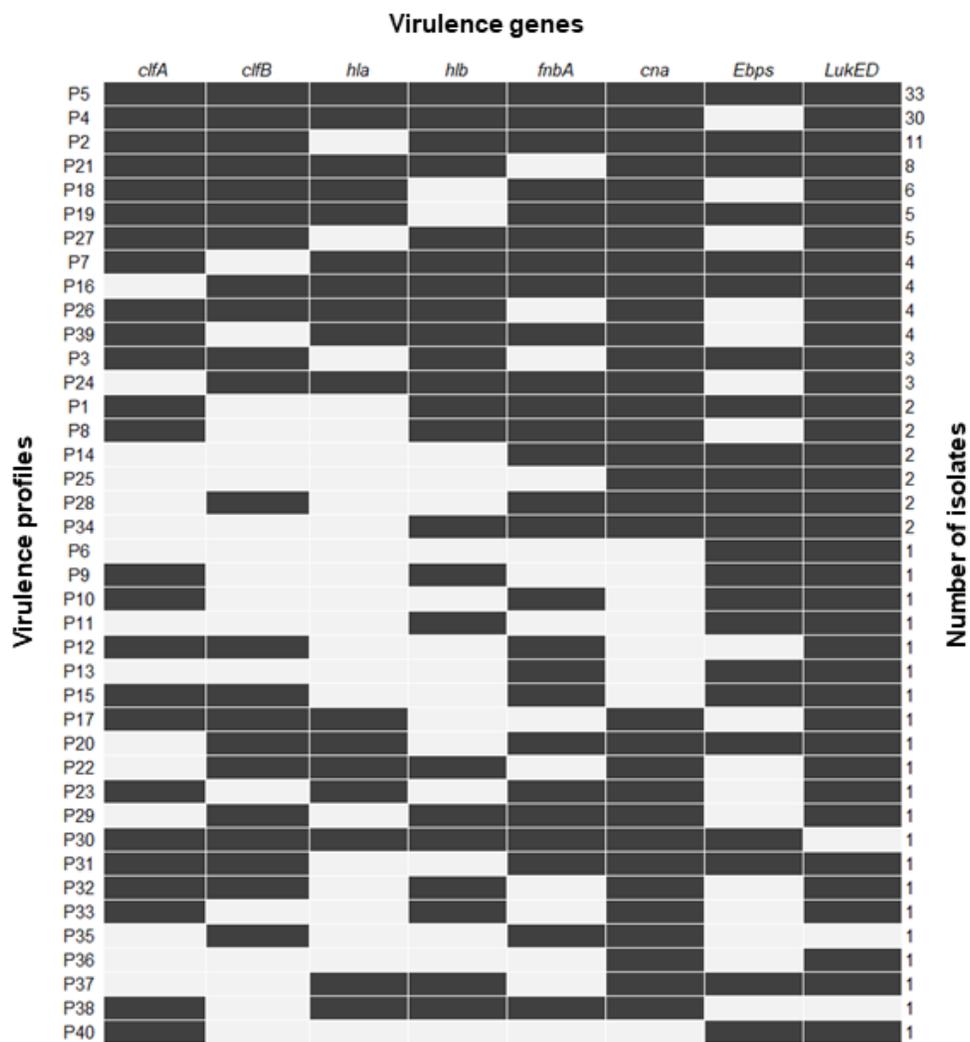
270

Estado	<i>ClfA</i>	<i>ClfB</i>	<i>Hla</i>	<i>Hly</i>	<i>FnBPA</i>	<i>Cna</i>	<i>Ebps</i>	<i>LukED</i>	Total de isolados
MG	73	72	60	68	70	78	55	84	85
	85,8%	84,7%	70,6%	80%	82,3%	91,7%	64,7%	98,8%	
RJ	14	14	12	14	17	17	11	18	18
	77,7%	77,7%	66,6%	77,7%	94,4%	94,4%	61,1%	100%	
SP	8	4	8	9	8	9	2	8	9
	88,8%	44,4%	88,8%	100%	88,8%	100%	22,2%	88,8%	
SC	1	1	2	2	1	2	1	2	2
	50%	50%	100%	100%	50%	100%	50%	100%	
RS	10	9	10	10	8	11	8	11	11
	90,9%	81,8%	90,9%	90,9%	72,7%	100%	72,7%	100%	
PR	1	2	1	1	2	4	2	3	4
	25%	50%	25%	25%	50%	100%	50%	75%	
RO	22	22	16	20	20	24	10	24	24
	91,6%	91,6%	66,6%	83,3%	83,3%	100%	41,6%	100%	

271

272 Foram determinados 40 perfis de virulência que estão representados pela figura 4. A
273 MST (figura 5) foi gerada para verificar a distribuição dos perfis de virulência na população
274 em relação ao resultado determinado pela técnica de PFGE. Observou-se que isolados
275 pertencentes ao mesmo perfil se localizaram em pontos distantes, não se agrupando em
276 congruência com os agrupamentos de genótipos determinados pela técnica de PFGE. Todos
277 os isolados testados possuíam, no mínimo, dois dos genes de virulência pesquisados.

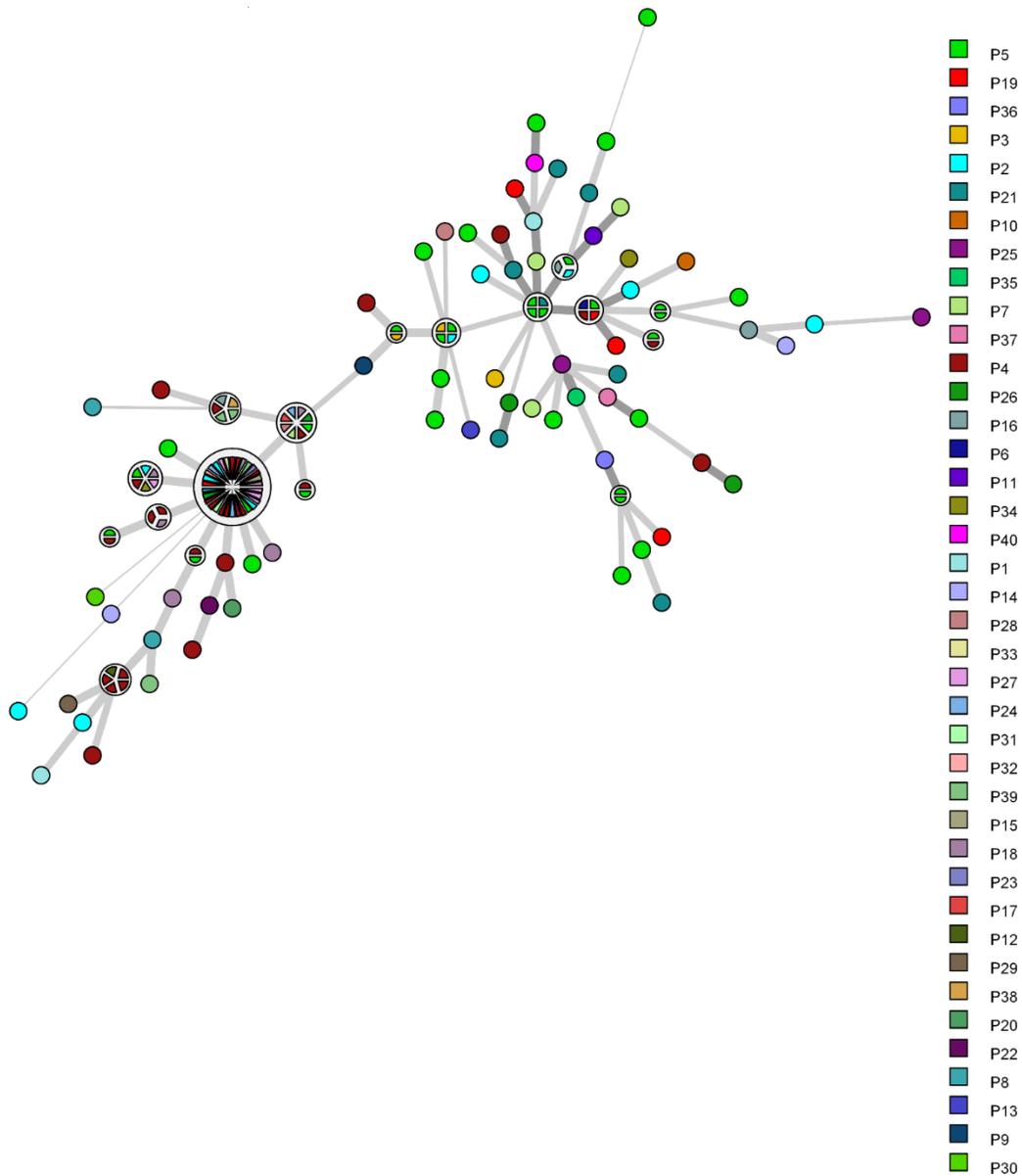
278 Os perfis 5 (P5), que reuniu isolados positivos para todos os genes, e 4, isolados
279 positivos para todos os genes exceto *Ebps*, foram os mais frequentes, contendo 33 e 30
280 isolados, respectivamente. Os estados de origem e os anos de isolamento dos isolados
281 pertencentes a esses perfis foram bastante variáveis dentro da população, sendo P5 reuniu
282 isolados dos Estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Rondônia, Paraná e Rio Grande do
283 Sul, coletados entre 1996 e 2013, enquanto P4 tinha isolados pertencentes a Minas Gerais,
284 Rio de Janeiro, São Paulo, Rio Grande do Sul, Rondônia e Santa Catarina, coletados entre
285 1996 e 2014.



286

287 Figura 4: Quarenta perfis de virulência e suas frequências nos 153 isolados de *Staphylococcus*
 288 *aureus* provenientes de casos de mastite subclínica em rebanhos bovinos brasileiros.

289 Retângulos em cinza representam a presença do respectivo gene.



290

291

292 Figura 5: *Minimum spanning tree* (MST) apresentando o agrupamento da técnica de PFGE
 293 dos 153 isolados de *Staphylococcus aureus* provenientes de vacas com mastite subclínica de
 294 rebanhos brasileiros. Esta MST é a que apresenta o maior escore geral de confiabilidade e foi
 295 calculada utilizando UPGMA (método de grupo de pares não ponderados utilizando médias

296 aritméticas) associado à regra de prioridade e reamostragem de permutação. Cores
297 representam os 40 perfis de virulência obtidos através de PCR.

298

299 **DISCUSSÃO**

300 A população de *S. aureus* abordada nesse estudo apresentou grande diversidade
301 genética, demonstrada pelos 93 genótipos obtidos pela técnica de PFGE e pelos 40 perfis de
302 virulência observados nos 153 isolados avaliados. Esta ampla diversidade pode ser atribuída
303 ao longo intervalo de obtenção dos isolados (1994-2014) e também à heterogeneidade quanto
304 à origem geográfica dos isolados, que foram provenientes de sete estados brasileiros,
305 localizados nas regiões Sul, Sudeste e Norte do país. Diferentes estudos apontaram grande
306 variação genotípica em isolados de *S. aureus* causadores de mastite bovina no Brasil e no
307 mundo (Ote *et al.*, 2011; Klein *et al.*, 2012; Bonsaglia *et al.*, 2018; Monistero *et al.*, 2018).

308 Os isolados provenientes dos estados da região Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio
309 Grande do Sul) apresentaram maior semelhança genética pela técnica de PFGE (figura 3),
310 individualmente ou mesmo quando os três estados foram avaliados em conjunto. Essa
311 observação pode resultar do fato da Região Sul ter predominantemente rebanhos altamente
312 tecnificados que produzem seus próprios animais para reposição, evitando a compra
313 constante de animais externos como acontece em outras regiões (Fernandes *et al.*, 2004;
314 Marques *et al.*, 2015). É esperado maior variação genética em fazendas que compram animais
315 em relação aos rebanhos fechados (Middleton *et al.*, 2002; Haveri *et al.*, 2008). Contudo,
316 deve ser salientado que os isolados destes estados foram provenientes apenas dos anos de
317 2013 e 2014, representando um pequeno intervalo de tempo, o que também pode justificar a
318 menor variação genética.

319 Analisando os agrupamentos determinados com 90% de similaridade, observa-se que
320 o agrupamento C8 (figura 2) reuniu isolados que foram obtidos em um amplo espaço de tempo
321 (1995 a 2014) e nos três maiores grupos (C16, C8 e C20) foi possível verificar a presença de
322 isolados de diferentes regiões geográficas. Essas observações sugerem que esse genótipos

323 podem ser mais bem adaptados à glândula mamária bovina e possam ter características que
324 lhes conferem maior capacidade para sobrevivência e disseminação entre os rebanhos.

325 A existência de genótipos amplamente disseminados tem sido frequentemente
326 relatada, tanto entre rebanhos como entre regiões (Fessler *et al.*, 2010; Castelani *et al.*, 2013;
327 Srednik *et al.*, 2018). Cabral *et al.* (2005) já haviam mostrado que algumas linhagens de *S.*
328 *aureus* possuem uma combinação de genes de virulência que permitem sua maior
329 disseminação e Magro *et al.* (2017) também propuseram que certos padrões genéticos
330 poderiam conferir maior contagiosidade às cepas.

331 *S. aureus* depende da expressão de diferentes fatores de virulência presentes na
332 superfície celular ou secretados para colonizar o hospedeiro, causar os danos celulares e
333 evadir do sistema imunológico (Foster, 2005). Esses genes ocorrem em combinações
334 variáveis para isolados causadores de mastite em diferentes regiões geográficas (Fournier *et*
335 *al.*, 2008; Adkins *et al.*, 2016; Monistero *et al.*, 2018) e permitem que esse patógeno cause
336 diferentes tipos de infecção (Capurro *et al.*, 2010; Aung *et al.*, 2011). O ganho ou perda de
337 genes de virulência pode ocorrer através de elementos genéticos móveis e essa movimentação
338 pode ser rápida e pouco relacionada a estabilidade clonal (Feil *et al.*, 2003).

339 Nesse estudo, em geral, foi observada elevada frequência dos genes de virulência na
340 população pesquisada, exceção para *ebps* (58%). Não se verificou nenhuma associação entre
341 os genótipos determinados pela técnica de PFGE e os perfis genéticos de virulência
342 encontrados (figura 5). Bonsaglia *et al.* (2018) também não encontraram vínculo entre o perfil
343 molecular e o perfil de virulência em isolados de mastite bovina, no entanto, outros estudos
344 tem mostrado relações entre o genótipo e o perfil genético de virulência pesquisado (Graber
345 *et al.*, 2009; Piccinini *et al.*, 2012). Pode-se especular que os diferentes isolados possam ter
346 compartilhado os fatores de virulência aqui estudados ao longo do tempo, por meio de
347 elementos genéticos móveis, o que justificaria a frequência e variação dos mesmos.

348 A ampla distribuição desses genes na população (58 a 97,7%) e o fato dos perfis de
349 virulência 4 e 5, que foram os mais frequentes, conterem isolados dos sete estados avaliados
350 e coletados entre 1996 e 2014 sugere que esses genes tenham papel relevante na patogênese

351 da mastite em rebanhos bovinos brasileiros. Todos estes genes já tiveram suas funções
352 relacionadas a patogênese na glândula mamária e outros estudos avaliaram a presença deles
353 em isolados do Brasil e do mundo.

354 A proteína de ligação ao colágeno (*Cna*), codificada pelo gene *cna*, interage com o
355 colágeno presente nos tecidos do hospedeiro e vem sendo relatada como um fator importante
356 para a patogênese de infecções estafilocócicas nas articulações (Patti *et al.*, 1994), válvulas
357 cardíacas (Hienz *et al.*, 1996) e em ossos (Elasri *et al.*, 2002). Neste estudo, dentre os
358 codificadores de proteínas de adesão, o gene *cna* foi o mais frequente (94,7%) sugerindo que
359 esta proteína pode ser importante para a patogênese da mastite bovina no Brasil e sua
360 interação com o tecido mamário de bovinos deve ser melhor avaliada. Esse resultado
361 contrasta com o que foi colocado por Klein *et al.* (2012), que atribuíram pequena importância
362 para esse gene nas infecções intramamárias e com Reinoso *et al.* (2008) que não encontraram
363 amostras positivas para esse gene em isolados provenientes de mastite bovina da Argentina.

364 As *FnBPs* ou proteínas de ligação a fibronectina são importantes na adesão e
365 internalização de *S. aureus* em células epiteliais mamárias de bovinos prevenindo que as
366 bactérias sejam eliminadas com o fluxo do leite no momento da ordenha (Brouillete *et al.*,
367 2003; Pereyra *et al.*, 2016). O gene *fnBPA* foi encontrado em 82,3% dos isolados desse estudo
368 e também têm sido relatado em altas frequências em estudos realizados em outros locais,
369 também com isolados de mastite bovina (Ikawaty *et al.*, 2010; Pereyra *et al.*, 2016).

370 Os fatores de aglutinação *ClfA* e *ClfB* também são importantes para a adesão de *S.*
371 *aureus* as células do hospedeiro, através de sua ligação ao fibrinogênio no início do processo
372 infeccioso (Zecconi e Scali, 2013). O gene *clfB* foi detectado em 91% de isolados
373 provenientes do Sudeste brasileiro (Klein *et al.*, 2012) e neste estudo foi encontrado em alta
374 frequência (81%). Além de ser um fator de adesão, *ClfA* tem importante papel na prevenção
375 da fagocitose, auxiliando o patógeno no escape do sistema imune (Higgins *et al.*, 2006) e tem
376 sido avaliado como bom antígeno vacinal para prevenção de mastite em camundongos (Gong
377 *et al.*, 2010). O gene *clfA* é amplamente distribuído nos isolados de mastite sendo descritas
378 frequências de 100% e 96, 6% quando foram avaliados isolados originados da Argentina

379 (Pereyra *et al.*, 2016) e da Bélgica (Ote *et al.*, 2011). Neste estudo, este gene foi encontrado
380 em 84,3% dos isolados.

381 A proteína de ligação a elastina (*Ebps*), permite a ligação de *S. aureus* a elastina
382 presente na matriz extracelular das células do hospedeiro (Park *et al.*, 1996). Neste estudo, o
383 gene *ebps* foi o encontrado em menor frequência (58%) mostrando que dentre os genes
384 avaliados, este parece ter menor importância para a patogênese na mastite bovina. Essa
385 observação também foi descrita por Almeida *et al.* (2013) que não encontraram nenhuma
386 amostra positiva para *ebps* quando avaliaram isolados provenientes de casos de mastite do
387 Nordeste brasileiro. Em isolados de humanos assintomáticos, portadores de endocardite e de
388 osteomielite, a frequência desse gene foi também de 58% (Tristan *et al.*, 2003).

389 Os genes *hla* e *hlb* são codificadores das toxinas *Hla* e *Hlb* que levam a formação de
390 poros e a alterações pró-inflamatórias em células de mamíferos, inativam o sistema
391 imunológico e degradam tecidos, favorecendo a disseminação das bactérias pelo organismo
392 pelo hospedeiro (Bownik e Swicki, 2008). Ambas foram relacionadas com a aderência e
393 citotoxicidade em células epiteliais mamárias de bovinos (Cifrian *et al.*, 1996). Cepas com
394 *Hlb* mutantes atenuadas causaram mastites menos severas que as cepas de campo em ovelhas
395 (Martínez-Pulgarín *et al.*, 2009). Prince *et al.* (2012) demonstraram que *Hla* é capaz de matar
396 rapidamente células de defesa. Neste estudo o gene *hla* foi encontrado em 71,2% dos isolados
397 e *hlb* em 81%, frequências semelhantes as encontradas em isolados de mastite do Estado do
398 Rio de Janeiro (*hla* em 94,5% e *hlb* em 89,1%) (Soares *et al.*, 2017).

399 As leucocidinas compreendem um conjunto de exotoxinas formadoras de poros e
400 vários tipos já foram associados com a degradação de polimorfonucleares de bovinos, tais
401 como, LukS, LukF, LukD, LukE, LukM e LukF-PV (Yamada *et al.*, 2005; Vrieling *et al.*,
402 2016). Neste estudo, apenas foi pesquisada a presença do gene codificador das leucocidinas
403 LukD e LukE e este foi encontrado em 98% dos isolados. Esse gene também foi descrito
404 como amplamente disseminado em dois rebanhos bovinos da Finlândia (Haveri *et al.*, 2008)
405 e em isolados de rebanhos da Suécia (Artursson *et al.*, 2016).

406 Várias vacinas contra *S. aureus* foram desenvolvidas e avaliadas, tanto experimental
407 quanto comercialmente, mas até o momento nenhuma delas mostrou resultados satisfatórios
408 (Middleton, 2008; Middleton *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2011). O estudo dos genes de
409 virulência em populações de *S. aureus* é muito importante por apontar fatores que possam
410 estar associados com a maior prevalência de determinados genótipos patogênicos e a para
411 detecção de proteínas candidatas para compor uma vacina eficaz contra a mastite bovina
412 (Rabello *et al.*, 2005). Os antígenos vacinais a serem escolhidos devem ser conservados e
413 expressos pela maioria das cepas, sendo as adesinas os alvos mais interessantes (Zecconi e
414 Scali, 2013). Segundo Klein *et al.* (2012), o desenvolvimento de uma vacina efetiva contra
415 *S. aureus* deve ser baseado em uma combinação de proteínas que deve variar de acordo com
416 os perfis genéticos de determinada região geográfica. No entanto, estudos genéticos mais
417 detalhados poderão propiciar o desenvolvimento de vacinas mais efetivas que possam ser
418 utilizadas em diferentes rebanhos de diferentes regiões.

419 Os isolados desse estudo apresentaram ampla dispersão dos genes de virulência
420 avaliados, sendo que todos os isolados tinham dois ou mais dos genes pesquisados. Entre os
421 isolados, 125 (81,7%), apresentaram, no mínimo, seis dos oito genes avaliados (figura 4) e
422 nenhum gene foi ausente em nenhum dos estados envolvidos no estudo, sendo que *ebps*, nos
423 isolados de Estado de São Paulo, apresentou a menor frequência relativa (22,2%) (tabela 2).
424 A ampla frequência dos genes de virulência nos isolados aqui estudados, temporal e
425 geograficamente distintos, sugere que o conjunto de proteínas codificadas por estes genes
426 possa ser interessante para compor o desenvolvimento de uma vacina para prevenção de *S.*
427 *aureus* em rebanhos brasileiros, uma vez que esse estudo envolveu isolados de importantes
428 regiões produtoras de leite no país.

429

430 **CONCLUSÃO:**

431 A população de *S. aureus* estudada apresentou grande diversidade genética,
432 demonstrada pelos 93 genótipos obtidos pela técnica de PFGE e pelos 40 perfis de virulência
433 observados nos 153 isolados.

434 A ocorrência de genótipos predominantes ocorrendo em vários estados e ao longo do
435 tempo mostra que estes genótipos são mais adaptados, possuindo características que
436 favorecem a manutenção dos mesmos na glândula mamária bovina.

437 Os oito genes de virulência pesquisados foram amplamente distribuídos na população
438 e por se tratar de genes que codificam proteínas importantes para a patogênese de *S. aureus*
439 na mastite bovina pode ser interessante o desenvolvimento de uma vacina contendo como
440 antígenos as proteínas por eles codificadas.

441

442 MATERIAL SUPLEMENTAR: Tabela contendo os 153 isolados de *S.aureus*
 443 provenientes de rebanhos brasileiros contendo a identificação dos isolados, ano de
 444 isolamento, município de origem, genótipo determinado pela técnica de PFGE, grupamento
 445 determinado pela técnica de PFGE com 90% de similaridade e perfil de virulência:

ISOLADO	ANO	Município	GENÓTIPO	PFGE 90%	P. Virulência
35	1994	Coronel Pacheco/MG	37	C11	P1
216	1995	Juiz de Fora/MG	25	C8	P2
287	1995	Belmiro Braga/MG	6	C2	P2
455	1995	Além Paraíba/MG	63	C18	P2
328	1996	Coronel Pacheco/MG	82	C25	P3
528	1996	Rio Novo/MG	66	C19	P4
806	1996	Santos Dumont, MG	27	C8	P5
1002	1996	São João Nepomuceno/MG	29	C8	P6
1142	1996	Mar de Espanha/MG	31	C8	P7
1153	1996	Olaria/MG	24	C8	P5
1440	1996	Valença/RJ	77	C24	P8
1822	1996	Matias Barbosa/MG	84	C25	P9
1999	1996	Tebas/MG	88	S15	P1
2014	1996	Senador Cortes/MG	9	S2	P10
2182	1996	Pregos/MG	30	C8	P11
2219	1996	Pequeri/MG	66	C19	P12
2243	1996	Leopoldina/MG	75	C23	P5
2309	1996	Argirita/MG	53	C16	P2
1049	1997	Astolfo Dutra/MG	86	C26	P5
2555	1997	Três Rios/RJ	70	C20	P7
2722	1997	São Pedro dos Ferros/MG	26	C8	P7
2749	1997	Lima Duarte/MG	43	C14	P5
2888	1997	Barra Mansa/RJ	80	S13	P13
2907	1997	Matozinhos/MG	91	S18	P14
2922	1997	Juiz de Fora/MG	56	C16	P15
2930	1997	São Pedro dos Ferros/MG	23	C8	P5
3185	1998	Barra Mansa/RJ	70	C20	P5
3247	1998	Coronel Pacheco/MG	46	C15	P16
3638	1999	Lajinha/MG	57	C16	P5
3656	1999	Carvalhos/ MG	39	C12	P5
3814	1999	Vassouras/ RJ	81	C25	P3
3854	1999	Carmo do Parnaíba/MG	76	C23	P4
3885	1999	Matias Barbosa/MG	92	S19	P2
3923	2000	Visconde do Rio Branco/MG	65	C18	P17
3974	2000	Ressaquinha/MG	61	C17	P4
4018	2000	Belmiro Braga/MG	56	C16	P18
4027	2000	Volta Grande/MG	76	C23	P18
4034	2000	Patos de Minas/MG	64	C18	P18
4052	2000	Santos Dumont/MG	70	C20	P18
4073	2000	Juiz de Fora/MG	27	C8	P19
4097	2000	Solinópolis/MG	28	C8	P19
4099	2000	Rio das Flores/RJ	72	C21	P20
4118	2000	Montes Claros/MG	38	C11	P19
4125	2000	Soledade de Minas/MG	52	C16	P4
4133	2001	Carangola/MG	8	C2	P21
4181	2001	Patrocínio/MG	74	C22	P22
4192	2001	Pedregulho/SP	68	C20	P16
4237	2001	São Lourenço/MG	66	C19	P4
4272	2001	Itaperuna/RJ	60	C16	P4
4279	2001	Valença/RJ	60	C16	P23
4292	2001	Rio Preto/MG	25	C8	P16
4295	2001	Coronel Pacheco/MG	45	C15	P14
4315	2001	Campos dos Goitacazes/RJ	54	C16	P24
4371	2001	Muriaé/MG	66	C19	P4

4384	2001	Pedregulho/SP	68	C20	P4
4498	2001	Caxambu/MG	82	C25	P5
4592	2002	Tebas/MG	89	S16	P4
4594	2002	Volta Grande/MG	23	C8	P5
4624	2002	Mercês/MG	55	C16	P4
4653	2002	Rio de Janeiro/RJ	87	S14	P5
4524	2011	Barra Mansa/RJ	61	C17	P5
4628	2013	Vargem Alegre/MG	52	C16	P4
4660	2013	Itanhandú/MG	49	S10	P25
4661	2013	Viveiras/MG	51	C16	P4
4665	2013	Itanhandú/MG	70	C20	P26
4690	2013	Juiz de Fora/MG	81	C25	P5
4703	2013	Piedade da Ponte Nova/MG	73	C22	P4
4716	2013	Guarará/MG	47	S8	P2
4782	2013	Leopoldina/MG	75	C23	P4
4791	2013	Conservatória/RJ	43	C14	P5
4802	2013	Valença/RJ	56	C16	P27
4826	2013	Porciúncula/RJ	70	C20	P28
4850	2013	Funilândia/MG	34	S5	P2
4859	2013	Inhaúma/MG	83	C25	P4
4911	2013	Itaperuna/RJ	70	C20	P4
4933	2013	Itaperuna/RJ	56	C16	P2
5031	2013	Conservatória/RJ	62	C17	P5
5133	2013	Rio das Flores/RJ	29	C8	P4
5169	2013	Santos Dumont/MG	25	C8	P5
5329	2013	Tombos/MG	56	C16	P16
5332	2013	Inhaúma/MG	40	S6	P5
5333	2013	Barbacena/MG	82	C25	P2
5348	2013	Coronel Pacheco/MG	82	C25	P5
5455	2013	Matosinhos/MG	71	C21	P4
5558	2013	Leopoldina/MG	33	C9	P5
5561	2013	Ouro Branco/MG	66	C19	P4
5596	2013	Coronel Pacheco/MG	58	C16	P18
5676	2013	Ibirubá/RS	17	C5	P4
5686	2013	Taquara/RS	13	C4	P5
5700	2013	Grande Porto Alegre/RS	19	C6	P5
5711	2013	Grande Porto Alegre/RS	20	C6	P21
5725	2013	Ibirubá/RS	18	C5	P26
5732	2013	Grande Porto Alegre/RS	21	C7	P21
5931	2013	Rio Piracicaba/MG	67	C19	P29
7155	2013	Torreões/MG	76	C23	P4
8431	2013	Juiz de Fora/MG	70	C20	P24
8450	2013	Belo Horizonte/MG	3	C1	P5
8548	2013	Planalto/PR	10	C3	P25
8549	2013	Nova Esperança/PR	11	C3	P35
8552	2013	Realeza/PR	4	C1	P36
8554	2013	Capanema/PR	16	S4	P5
8591	2013	Quilombo/SC	14	C4	P37
8593	2013	Quilombo/SC	22	C7	P4
8643	2013	São Paulo/SP	68	C20	P38
8645	2013	São Paulo/SP	68	C20	P39
8647	2013	São Paulo/SP	69	C20	P39
8658	2013	São Paulo/SP	79	S12	P4
8663	2013	São Paulo/SP	90	S17	P8
8668	2013	São Paulo/SP	7	C2	P21
8679	2013	São Paulo/SP	55	C16	P39
8949	2013	Barbacena/MG	85	C26	P5
8951	2013	Ibitipoca/MG	32	C9	P34
8952	2013	Rio Preto/MG	56	C16	P27
8953	2013	Bicas/MG	56	C16	P27
8954	2013	Bias Fortes/MG	36	C10	P40
8955	2013	Bias Fortes/MG	35	C10	P5
8470	2014	Belo Horizonte/MG	41	C13	P21

8471	2014	Belo Horizonte/MG	5	S1	P3
8475	2014	Belo Horizonte/MG	3	C1	P5
8476	2014	Belo Horizonte/ MG	1	C1	P5
8478	2014	Belo Horizonte/MG	93	S20	P30
8479	2014	Belo Horizonte/MG	42	C13	P26
8480	2014	Belo Horizonte/MG	23	C8	P21
8481	2014	Belo Horizonte/MG	15	S3	P21
8491	2014	Porto Velho/RO	53	C16	P5
8492	2014	Porto Velho/RO	39	C12	P4
8493	2014	Porto Velho/RO	60	C16	P4
8494	2014	Porto Velho/RO	2	C1	P19
8495	2014	Porto Velho/RO	53	C16	P19
8496	2014	Porto Velho/RO	53	C16	P4
8497	2014	Porto Velho/RO	53	C16	P4
8498	2014	Porto Velho/RO	53	C16	P24
8499	2014	Porto Velho/RO	53	C16	P31
8500	2014	Porto Velho/RO	53	C16	P26
8501	2014	Porto Velho/RO	53	C16	P4
8502	2014	Porto Velho/RO	52	C16	P21
8503	2014	Porto Velho/RO	53	C16	P4
8504	2014	Porto Velho/RO	51	C16	P5
8505	2014	Porto Velho/RO	53	C16	P32
8506	2014	Porto Velho/RO	53	C16	P27
8508	2014	Porto Velho/RO	52	C16	P33
8509	2014	Porto Velho/RO	59	C16	P18
8510	2014	Porto Velho/RO	59	C16	P27
8511	2014	Porto Velho/RO	59	C16	P5
8512	2014	Porto Velho/RO	59	C16	P34
8513	2014	Porto Velho/RO	59	C16	P4
8514	2014	Porto Velho/RO	59	C16	P2
8515	2014	Porto Velho/RO	60	C16	P2
8693	2014	Porto Alegre/RS	78	C24	P39
8695	2014	Porto Alegre/RS	48	S9	P28
8697	2014	Porto Alegre/RS	50	S11	P5
8699	2014	Porto Alegre/RS	44	S7	P5
8701	2014	Porto Alegre/RS	12	C3	P7

446

447

448 **REFERÊNCIAS**

449

450 ABEBE, R.; HATIYA, H.; ABERA, M. *et al.* Bovine mastitis: prevalence, risk factors and
451 isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia.
452 *BMC Vet. Res.*, v.12, p.270, 2016.

453 ACOSTA, A.C.; SILVA, L.B.G.; MEDEIROS, E.S. *et al.* Mastites em ruminantes no
454 Brasil. *Pesqui. Vet. Bras.*, v.36, p.565-573, 2016.

455 ADKINS, P.R.F.; MIDDLETON, J.R.; FOX, L.K. Comparison of Virulence Gene
456 Identification, Ribosomal Spacer PCR, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Typing of
457 *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Cases of Subclinical Bovine Mastitis in the
458 United States. *J. Clin. Microbiol.*, v.54, p.1871-1876, 2016.

459 ALMEIDA, L.M.; ALMEIDA, M.Z.; MENDONÇA, C.L.; MAMIZUKA, E.M.
460 Comparative analysis of *agr* groups and virulence genes among subclinical and clinical
461 mastitis *Staphylococcus aureus* isolates from sheep flocks of the Northeast of Brazil. *Braz.*
462 *J. Microbiol.* v.44, p.493-498, 2013.

463 ANDRADE, M.A.; FILHO, F.C.D.; MESQUITA, A.J.; ROCHA, P.T. Sensibilidade *in*
464 *vitro* de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de vacas com mastite
465 subclínica. *Ci. Anim. Bras.*, v.1, p.53-57, 2000.

466 ARCIOLA, C.R.; CAMPOCCIA, D.; GAMBERINI, S. *et al.* Prevalence of *cna*, *fnbA* and
467 *fnbB* adhesion genes among *Staphylococcus aureus* isolates from orthopedic infections
468 associated to different types of implant. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.246, p.81-86, 2005.

469 ARTURSSON, K.; SÖDERLUND, R.; LIU, L. *et al.* Genotyping of *Staphylococcus aureus*
470 in bovine mastitis and correlation to phenotypic characteristics. *Vet. Microbiol.*; v.193,
471 p.156-161, 2016.

472 AUNG, M.S.; URUSHIBARA, N.; KAWAGUCHIYA, M. *et al.* Virulence factors and
473 genetic characteristics of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus*
474 *aureus* isolates in Myanmar. *Microb. Drug Resist.*, v.17, p.525-535, 2011.

- 475 BANDEIRA, F.S.; PICOLI, T.; ZANI, J.L. *et al.* 2013. Frequência de *Staphylococcus*
476 *aureus* em casos de mastite bovina subclínica na região sul do Rio Grande do Sul. *Arq. Inst.*
477 *Biol.*, v.80, p.1-6, 2013.
- 478 BONSAGLIA, E.C.R.; SILVA, N.C.C.; ROSSI, B.F. *et al.* Molecular epidemiology of
479 methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) isolated from milk of cows with
480 subclinical mastites. *Microb. Pathog.*, v.124, p.130-135, 2018.
- 481 BOTARO, B.G.; CORTINHAS, C.S.; DIBBERN, A.G. *et al.* *Staphylococcus aureus*
482 intramammary infection affects milk yield and SCC of dairy cows. *Trop. Anim. Health*
483 *Prod.*, v.47, p.61-66, 2015.
- 484 BOWNIK, A.; SIWICKI, A.K. Effects of staphylococcal hemolysins on the immune
485 system of vertebrates. *Cent. Eur. J. Immunol.*, v.33, p.87-90, 2008.
- 486 BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; RIBEIRO, M.T.; VEIGA, V.M.O. Padrão de infecção
487 intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em
488 lactação. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.51, p.129-135, 1999.
- 489 BROUILLETTE, E.; GRONDIN, G.; SHKRETA, L. *et al.* *In vivo* and *in vitro*
490 demonstration that *Staphylococcus aureus* is an intracellular pathogen in the presence or
491 absence of fibronectin binding proteins. *Microb. Pathog.*, v.35, p.159-168, 2003.
- 492 CABRAL, K.G.; LÄMMLER, C.; ZSCHÖCK, M. *et al.* Pheno- and genotyping of
493 *Staphylococcus aureus*, isolated from bovine milk samples from São Paulo State, Brazil.
494 *Can. J. Microbiol.*, v.50, p.901-909, 2004.
- 495 CAPURRO, A.; ASPÁN, A.; UNNERSTAD, H.E. *et al.* Identification of potential sources
496 of *Staphylococcus aureus* in herds with mastitis problems. *J. Dairy Sci.*, v.93, p.180-191,
497 2010.

- 498 CASTELANI, L.; SANTOS, A.F.; DOS SANTOS MIRANDA, M. *et al.* Molecular Typing
499 of Mastitis-Causing *Staphylococcus aureus* Isolated from Heifers and Cows. *Int. J. Mol.*
500 *Sci.*, v.14, p.4326-4333, 2013.
- 501 CHAMBERS, H.F.; DELEO, F.R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the
502 antibiotic era. *Nat. Rev. Microbiol.*, v.7, p.629-641, 2009.
- 503 CIFRIAN, E.; GUIDRY, A.J.; O'BRIEN, C.N.; MARQUARDI, W.W. Effect of antibodies
504 to staphylococcal _ and _ toxins and *Staphylococcus aureus* on the cytotoxicity for and
505 adherence of the organism to bovine mammary epithelial cells. *Am. J. Vet. Res.*, v.57,
506 p.1308-1311, 1996.
- 507 COSTA, G.M. *Mamite bovina em rebanhos leiteiros da região sul do estado de Minas*
508 *Gerais*. 2008. 123f. Tese (Doutorado em Sanidade Animal) - Universidade Federal de
509 Minas Gerais, Belo Horizonte.
- 510 COSTA, G.M.; PAIVA, L.V.; FIGUEIREDO, H.C.P. *et al.* Population diversity of
511 *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazilian dairy herds. *Res. Vet. Sci.*,
512 v.93, p.733-735, 2012.
- 513 DEB, R.; KUMAR, A.; CHAKRABORTY, S. *et al.* Trends in diagnosis and control of
514 bovine mastitis: A review. *Pak. J. Biol. Sci.*, v.16, p.1653-1661, 2013.
- 515 ELASRI, M.O.; THOMAS, J.R.; SKINNER, R.A. *et al.* *Staphylococcus aureus* Collagen
516 Adhesin Contributes to the Pathogenesis of Osteomyelitis. *Bone.*, v.30, p.275-280, 2002.
- 517 FEIL, E.J.; COOPER, J.E; GRUNDMANN, H. *et al.* How clonal is *Staphylococcus aureus*?
518 *J. Bacteriol.*, v.185, p.3307-3316, 2003.
- 519 FEIL, E.J.; LI, B.C.; AANENSEN, D.M. *et al.* eBURST: Inferring patterns of evolutionary
520 descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing
521 data. *J. Bacteriol.*, v.186, p.1518-1530, 2004.
- 522 FERNANDES, E.N.; BRESSAN, M.; VERNEQUE, R.S. Zoneamento da pecuária leiteira
523 da região sul do Brasil. *Ciênc. Rural*, v.34, p.485-491, 2004.

- 524 FERRY, T.; PERPOINT, T.; VANDENESCH, F.; ETIENNE, J. Virulence determinants in
525 *Staphylococcus aureus* and their involvement in clinical syndromes. *Curr. Infect. Dis. Rep.*,
526 v.7, p.420-428, 2005.
- 527 FESSLER, A.; SCOTT, C.; KADLEC, K. *et al.* Characterization of methicillin-resistant
528 *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis. *J. Antimicrob. Chemother.*,
529 v.65, p.619-625, 2010.
- 530 FITZGERALD, J.R. Livestock-associated *Staphylococcus aureus*: origin, evolution and
531 public health threat. *Trends Microbiol.*, v.20, p.192-198, 2012.
- 532 FLUIT, A.C. Livestock-associated *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.*, v.18, p.
533 735-744, 2012.
- 534 FOSTER, T.J. Immune evasion by staphylococci. *Nat. Rev. Microbiol.*, v.3, p.948-958,
535 2005.
- 536 FOURNIER, C.; KUHNERT, P.; FREY, J. *et al.* Bovine *Staphylococcus aureus*:
537 association of virulence genes, genotypes and clinical outcome. *Res. Vet. Sci.*, v.85, p.439-
538 448, 2008.
- 539 GOERING, R.V. Pulsed field gel electrophoresis: A review of application and
540 interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infect. Genet. Evol.*,
541 v.10, p.866-875, 2010.
- 542 GÖKMEN, T.G.; KALAYCI, Y.; YAMAN, A.; KÖKSAL, F. Molecular characterization
543 of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains by spa typing and pulsed field gel
544 electrophoresis methods. *BMC Microbiol.*, v.18, p.155, 2018.
- 545 GOMES, F.; HENRIQUES, M. Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic
546 Approaches. *Curr. Microbiol.*, v.72, p.377-382, 2016.
- 547 GONG, R.; HU, C.; XU, H. *et al.* Evaluation of clumping factor A binding region A in a
548 subunit vaccine against *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in mice. *Clin. Vaccine*
549 *Immunol.*, v.17, p.1746-1752, 2010.

- 550 GRABER, H.U.; NASKOVA, J.; STUDER, E. *et al.* Mastitis-related subtypes of bovine
551 *Staphylococcus aureus* are characterized by different clinical properties. *J. Dairy Sci.*, v.92,
552 p.1442-1451, 2009.
- 553 HALASA, T.; NIELEN, M.; HUIRNE, R.B.M.; HOGEVEEN, H. Stochastic bio-economic
554 model of bovine intramammary infection. *Livest. Sci.*, v.124, p.295-305, 2009.
- 555 HAVERI, M.; HOVINEN, M.; ROSLÖF, A.; PYÖRÄLÄ, S. Molecular Types and Genetic
556 Profiles of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Bovine Intramammary Infections
557 and Extramammary Sites. *J. Clin. Microbiol.*, v.46, p.3728-3735, 2008.
- 558 HIENZ, S.A.; SCHENNINGS, T.; HEIMDAHL, A.; FLOCK, J.I. Collagen Binding of
559 *Staphylococcus aureus* Is a Virulence Factor in Experimental Endocarditis. *J. Infect Dis.*,
560 v.174, p.83-88, 1996.
- 561 HIGGINS, J.; LOUGHMAN, A.; VAN KESSEL, K.P. *et al.* Clumping factor A of
562 *Staphylococcus aureus* inhibits phagocytosis by human polymorphonuclear leucocytes.
563 *FEMS Microbiol. Lett.*, v.258, p.290-296, 2006.
- 564 HOQUE, M.N.; DAS, Z.C.; RAHMANA, A.N.M.A. *et al.* Molecular characterization of
565 *Staphylococcus aureus* strains in bovine mastitis milk in Bangladesh International. *IJVSM*,
566 v.6, p.53-60, 2018.
- 567 IKAWATY, R.; BROUWER, E.C.; VAN DUIJKEREN, E. *et al.* Virulence Factors of
568 Genotyped Bovine Mastitis *Staphylococcus aureus* Isolates in The Netherlands. *J. Dairy*
569 *Sci.*, v.5, p.60-70, 2010.
- 570 INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Abate de animais,*
571 *produção de leite, couro e ovos 2016.* Disponível em:
572 <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201504_2.shtm)
573 [abate-leite-couro-ovos_201504_2.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201504_2.shtm)> Acessado em: 24 jan. 2019.
- 574 JARRAUD, S.; MOUGEL C., THIOULOUSE J. Relationships between *Staphylococcus*
575 *aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease.
576 *Infect. Immun.*, v.70, p.631-641, 2002.

- 577 KEEFE, G. Update on Control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for
578 management of mastitis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, v.28, p.203-216, 2012.
- 579 KLEIN, R.C.; FABRES-KLEIN, M.H.; BRITO, M.A.V.P. *et al.* *Staphylococcus aureus* of
580 bovine origin: genetic diversity, prevalence and the expression of adhesin-encoding genes.
581 *Vet. Microbiol.*, v.160, p.183-188, 2012.
- 582 KOSECKA-STROJEK, M.; ILCZYSZYN, W.M.; BUDA, A. *et al.* Multiple-locus
583 variable-number tandem repeat fingerprinting as a method for rapid and cost-effective
584 typing of animal-associated *Staphylococcus aureus* strains from lineages other than
585 sequence type 398. *J. Med. Microbiol.*, v.65, p.1494-1504, 2016.
- 586 LANGONI, H.; SAKIYAMA, D.T.P.; GUIMARÃES, F.F. *et al.* Aspectos citológicos e
587 microbiológicos do leite em propriedades no sistema orgânico de produção. *Pesqui. Vet.*
588 *Bras.*, v.29, p.881-886, 2009.
- 589 LIU, B.; SUN, H.; PAN, Y. *et al.* Prevalence, resistance pattern, and molecular
590 characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from healthy animals and sick
591 populations in Henan Province. China. *Gut. Pathog.*, v.10, p.31, 2018.
- 592 MAGRO, G.; BIFFANI, S.; MINOZZI, G. *et al.* Virulence Genes of *S. aureus* from Dairy
593 Cow Mastitis and Contagiousness Risk. *Toxins*, v.9, p.E195, 2017.
- 594 MARQUES, G.H.F.; STEFANO, E.D.; RIBEIRO, C.P. *et al.* A experiência brasileira na
595 erradicação da febre aftosa e o emprego do sistema I-ELISA 3ABC/EITB para certificação
596 sanitária de bovinos e bubalinos. *Arq. Inst. Biol.*, v.82, p.1-11, 2015.
- 597 MARTÍNEZ-PULGARÍN, S.; DOMÍNGUEZ-BERNAL, G.; ORDEN, J.A.; DE LA
598 FUENTE, R. Simultaneous lack of catalase and beta-toxin in *Staphylococcus aureus* leads
599 to increased intracellular survival in macrophages and epithelial cells and to attenuated
600 virulence in murine and ovine models. *Microbiology.*, v.155, p.1505-1515, 2009.
- 601 MIDDLETON, J.R. *Staphylococcus aureus* antigens and challenges in vaccine
602 development. *Expert Rev. Vaccines*, v.7, p.805-815, 2018.
- 603 MIDDLETON, J.R.; LUBY, C.D.; ADAMS, D.S. Efficacy of vaccination against
604 staphylococcal mastitis: a review and new data. *Vet. Microbiol.*, v.134, p.192-198, 2009.

- 605 MIDDLETON, J.R.; FOX, L.K.; GAY, J.M. *et al.* Use of pulsed-field gel electrophoresis
606 for detecting differences in *Staphylococcus aureus* strain populations between dairy herds
607 with different cattle importation practices. *Epidemiol. Infect.*, v.129, p.387-395, 2002.
- 608 MONISTERO, V.; GRABER, H.U.; POLLERA, C. *et al.* *Staphylococcus aureus* Isolates
609 from Bovine Mastitis in Eight Countries: Genotypes, Detection of Genes Encoding
610 Different Toxins and Other Virulence Genes. *Toxins*, v.10, p.E247, 2018.
- 611 NOVICK, R.P. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal
612 virulence., *Mol. Microbiol.*, v.48, p.1429-1449, 2003.
- 613 OTE, I.; TAMINIAU, B.; DUPREZ, J.L. *et al.* Genotypic characterization by polymerase
614 chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. *Vet.*
615 *Microbiol.*, v.153, p.285-292, 2011.
- 616 PARK, P.W.; ROSENBLOOM, J.; ABRAMS, W.R. *et al.* Molecular Cloning and
617 Expression of the Gene for Elastin-binding Protein (*ebpS*) in *Staphylococcus aureus*. *J.*
618 *Biol. Chem.*, v.271, p.15803-15809, 1996.
- 619 PATTI, J.M.; BREMELL, T.; KRAJEWSKA-PIETRASIK, D. *et al.* The *Staphylococcus*
620 *aureus* Collagen Adhesin Is a Virulence Determinant in Experimental Septic Arthritis.
621 *Infect. Immun.*, v.62, p.152-161, 1994.
- 622 PEREIRA, U.P.; OLIVEIRA, D.G.S.; MESQUITA, L.R. *et al.* Efficacy of *Staphylococcus*
623 *aureus* vaccines for bovine mastitis: A systematic review. *Vet. Microbiol.*, v.148, p.117-
624 124, 2011.
- 625 PEREYRA, E.A., PICECH, F.; RENNA, M.S. *et al.* Detection of *Staphylococcus aureus*
626 adhesion and biofilm-producing genes and their expression during internalization in bovine
627 mammary epithelial cells. *Vet. Microbiol.*, v.183, p.69-77, 2016.
- 628 PETON, V.; LE LOIR, Y. *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. *Infect. Genet.*
629 *Evol.*, v.21, p.602-615, 2014.
- 630 PICCININI, R.; TASSI, R.; DAPRÀ, V. *et al.* Study of *Staphylococcus aureus* collected at
631 slaughter from dairy cows with chronic mastitis. *J. Dairy Res.*, v.79, p.249-255, 2012.

- 632 PRINCE, L.R.; GRAHAM, K.J.; CONNOLLY, J. *et al.* *Staphylococcus aureus* induces
633 eosinophil cell death mediated by α -hemolysin. *PLoS ONE.*, v.7, p. e31506, 2012.
- 634 RABELLO, R.F; SOUZA, C.R.; DUARTE, R.S. *et al.* Characterization of *Staphylococcus*
635 *aureus* Isolates Recovered from Bovine Mastitis in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Dairy Sci.*,
636 v.88, p.3211-3219, 2005.
- 637 REINOSO, E.B.; EL-SAYED, A.; LÄMMLER, C. *et al.* Genotyping of *Staphylococcus*
638 *aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina.
639 *Microbiol. Res.*, v.163, p.314-322, 2008.
- 640 RIGOLIN-SÁ, O.; FRANÇA, N.; ESPER, K.C.P.; ANDRADE, D.P. Quality of raw
641 refrigerated milk based on SCC and TBC indicators in the Southwest of Minas Gerais state,
642 Brazil. *Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes*, v.69, p.348-356, 2014.
- 643 SABAT, A.J.; BUDIMIR, A.; NASHEV, D. *et al.* Overview of molecular typing methods
644 for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill.*, v.18, p.20380,
645 2013.
- 646 SAEI, H.D.; AHMADI, M.; MARDANI, K.; BATAVANI, R.A. Molecular typing of
647 *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis based on polymorphism of the
648 coagulase gene in the north west of Iran. *Vet. Microbiol.*, v.137, p.202-206, 2009.
- 649 SHOMPOLE, S.; HENON, K.T.; LIOU, L.E. *et al.* Biphasic intracellular expression of
650 *Staphylococcus aureus* virulence factors and evidence for Agr-mediated diffusion sensing.
651 *Mol. Microbiol.*, v.49, p.919-927, 2003.
- 652 SMITH, E.M.; GREEN L.E., MEDLEY G.F. *et al.* Multilocus sequence typing of
653 intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, v.43, p.4737-
654 4743, 2005.
- 655 SOARES, B.S.; MELO, D.A.; MOTTA, C.C. *et al.* Characterization of virulence and
656 antibiotic profile and agr typing of *Staphylococcus aureus* from milk of subclinical mastitis
657 bovine in State of Rio de Janeiro. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.69, p.843-850, 2017.
- 658 SOBRAL, D.; SCHWARZ, S.; BERGONIER, D. *et al.* High throughput multiple locus

- 659 variable number of tandem repeat analysis (MLVA) of *Staphylococcus aureus* from human,
660 animal and food sources. *PLoS ONE*, v.7, p.e33967, 2012.
- 661 SREDNIK, M.E.; USONGO, V.; LÉPINE, S. *et al.* Characterisation of *Staphylococcus*
662 *aureus* strains isolated from mastitis bovine milk in Argentina. *J. Dairy Res.*, v.85, p.57–63,
663 2018.
- 664 STER, C.; GILBERT, F.B.; COCHARD, T. POUTREL, B. Transcriptional profiles of
665 regulatory and virulence factors of *Staphylococcus aureus* of bovine origin: oxygen impact
666 and strain-to-strain variations. *Mol. Cell. Probes.*, v.19, p.227-235, 2005.
- 667 TALBOT, B.G.; LACASSE, P. Progress in the development of mastitis vaccines. *Livest.*
668 *Prod. Sci.*, v.98, p.101–113, 2005.
- 669 TAVERNA, F.; NEGRI, A.; PICCININI, R. *et al.* Characterization of cell wall associated
670 proteins of a *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis case by a proteomic
671 approach. *Vet. Microbiol.*, v.119, p.240-247, 2007.
- 672 TENHAGEN, B.A.; KÖSTER, G.; WALLMANN, J.; HEUWIESER, W. Prevalence of
673 mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in
674 Brandenburg, Germany. *J. Dairy Sci.*, v.89, p.2542-2551, 2006.
- 675 TRISTAN, A.; YING, L.; BES, M.; ETIENNE, J. Use of multiplex PCR to identify
676 *Staphylococcus aureus* adhesins involved in human hematogenous infections. *J. Clin.*
677 *Microbiol.*, v.41, p.4465-4467, 2003.
- 678 VITALE, M.; GAGLIO, S.; GALLUZZO, P. *et al.* Antibiotic resistance profiling, analysis
679 of virulence aspects and molecular genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated in Sicily,
680 Italy. *Foodborne Pathog. Dis.*, v.15, p.177-185, 2018.
- 681 VRIELING, M.; BOERHOUT, E.M.; VAN WIGCHEREN, G.F. *et al.* LukMF' is the major
682 secreted leukocidin of bovine *Staphylococcus aureus* and is produced *in vivo* during bovine
683 mastitis. *Sci. Rep.*, v.6, p.37759, 2016.

- 684 YAMADA, T.; TOCHIMARU, N.; NAKASUJI, S. *et al.* Leukotoxin family genes in
685 *Staphylococcus aureus* isolated from domestic animals and prevalence of *lukM-lukF-PV*
686 genes by bacteriophages in bovine isolates. *Vet. Microbiol.*, v.110, p.97-103, 2005.
- 687 ZANETTE, E.; SCAPIN, D.; ROSSI, E.M. Suscetibilidade antimicrobiana de
688 *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de bovinos com suspeita de mastite.
689 *Unoesc & Ciência - ACBS*, v.1, p.65-70, 2010.
- 690 ZECCONI, A.; CESARIS, L.; LIANDRIS, E. *et al.* Role of several
691 *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine
692 mammary gland. *Microb. Pathog.*, v.40, p.177-183, 2006.
- 693 ZECCONI, A.; SCALI, F. *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate
694 immune defenses in human and animal diseases. *Immunol. Lett.*, v.150, p.12-22, 2013.