

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES DE *Staphylococcus aureus* E *Streptococcus agalactiae* ASSOCIADAS ÀS MASTITES BOVINAS
PERSISTENTE E NÃO PERSISTENTE**

Mônica Pacheco da Silva
Doctor Scientiae

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S586i
2015
Silva, Mônica Pacheco da, 1986-
Identificação e caracterização de estirpes de *Staphylococcus aureus e Streptococcus agalactiae* associadas às mastites bovinas persistente e não persistente / Mônica Pacheco da Silva.
– VIÇOSA, MG, 2015.
xii, 73f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Andréa de Oliveira Barros Ribon.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Staphylococcus aureus*. 2. *Streptococcus agalactiae*.
3. Mastite. 4. Bovino - Doenças. 5. Bacteriologia veterinária.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 579.35

MÔNICA PACHECO DA SILVA

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES DE *Staphylococcus aureus* E *Streptococcus agalactiae* ASSOCIADAS ÀS MASTITES BOVINAS PERSISTENTE E NÃO PERSISTENTE

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015

MÔNICA PACHECO DA SILVA

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES DE *Staphylococcus aureus* E *Streptococcus agalactiae* ASSOCIADAS ÀS MASTITES BOVINAS PERSISTENTE E NÃO PERSISTENTE

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 30 de novembro de 2015

Cynthia Canêdo da Silva

Cláudia Lúcia de O. Pinto

Maria Aparecida S. Moreira

Mary Hellen Fabres-Klein

Andréa de Oliveira Barros Ribon
(Orientadora)

À minha família que é a minha vida,

Dedico!

ii

AGRADECIMENTOS

À Deus por não me desamparar em nenhum momento da minha vida e preencher a minha vida com sua misericórdia, providência e amor.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular por ter me proporcionado mais esta conquista.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À professora e orientadora Andréa de Oliveira Barros Ribon por me acolher em seu grupo de pesquisa, pela paciência, dedicação e disposição em discutir, sugerir, aconselhar e propor novas ideias para a condução dos trabalhos.

À Dra Claudia Lúcia Oliveira Pinto – EPAMIG, Dra Cynthia Canêdo da Silva e Dra Mary Hellen Fabres-Klein pela participação na banca de defesa.

À Prof^a. Maria Aparecida Scatamburlo Moreira, por permitir o meu acesso aos laboratórios e equipamentos do Departamento de Veterinária, possibilitando o emprego da técnica de PFGE, os experimentos com as células MAC-T e participação na bancade defesa.

À Prof^a. Denise que nos cedeu os ovos de *Galleria mellonella* para os experimentos *in vivo* e a enzima de restrição SmaI para os ensaios de macrorrestrição.

Ao professor Gustavo Ferreira Martins por nos orientar nos experimentos de histopatologia com a *Galleria mellonella*.

Ao Dr. Guilherme Nunes de Souza da Embrapa Gado de Leite pelas análises estatísticas do capítulo 1.

Aos veterinários e estagiários do PDPL que nos forneceram as amostras de leite e nos deram suporte necessário no acompanhamento dos rebanhos.

Aos meus pais José Wilson e Marilda e meu irmão Edson, pelo amor incondicional que sempre dedicaram à mim, que por muitas vezes abriram mão dos seus sonhos para que os meus fossem possíveis, suportaram as minhas ausências e sempre me incentivaram com palavras de força e carinho para que eu não desanimasse. Vocês que sempre me mostraram que não é possível ir muito longe sem respeito, humildade e o amor.

Aos meus familiares que mesmo distantes são tão presentes na minha vida!

Ao meu namorado Fábio Antônio por todo amor, cumplicidade e companheirismo que dedicamos um ao outro.

Aos amigos de Januária e Montes Claros, que mesmo distantes se fazem tão constantes e essenciais na minha vida, e também aos amigos de Viçosa. Aos amigos e colegas do LBM pela acolhida, convivência e aprendizado no laboratório, especialmente ao grupo do “leite” que me ajudou com os experimentos e sugestões ao longo do trabalho. Aos colegas dos demais laboratórios do Departamento pelos momentos de descontração.

Ao Eduardo, secretário do Programa de Pós Graduação em Bioquímica Aplicada pela competência, apoio e amizade.

Aos demais professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pelos ensinamentos e conselhos durante a minha formação.

A todos que torceram por mim, obrigada!

BIOGRAFIA

Mônica Pacheco da Silva, filha de José Wilson Oliveira da Silva e Marilda Pacheco Corrêa, nasceu na cidade de Januária, Minas Gerais, em 01 de março de 1986.

Em dezembro de 2003 concluiu o ensino médio e o curso Técnico em Agropecuária no Centro Federal de Educação Tecnológica de Januária, atual IFNMG campus Januária.

Em fevereiro de 2005 ingressou no curso de Ciências Biológicas na Universidade Estadual de Montes Claros – UNIMONTES, tornando-se licenciada em biologia em janeiro de 2009.

Em agosto de 2009 ingressou no Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, MG, defendendo sua dissertação em julho de 2011.

Ingressou no Programa Pós Graduação em Bioquímica Aplicada em agosto de 2011, em nível de doutorado, na Universidade Federal de Viçosa, MG, submetendo-se à defesa de tese em 24 de novembro de 2015.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1. O panorama leiteiro no Brasil e em Minas Gerais.....	1
1.2. Mastite bovina – aspectos gerais.....	2
1.3. Patógenos contagiosos da mastite bovina: <i>Streptococcus agalactiae</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	5
2. REFERÊNCIAS	10
CAPÍTULO 1: Distribuição e caracterização de patógenos da mastite subclínica em um rebanho da Zona de Minas Gerais	16
RESUMO	17
1. INTRODUÇÃO	18
2. MATERIAL E MÉTODOS	21
2.1. Coleta de Amostras de Leite Mastítico.....	21
2.2. Isolamento e Identificação dos Micro-organismos	21
2.3. Caracterização Genotípica	22
2.4. Produção de Biofilme	24
2.5. Atividade Hemolítica.....	24
3. RESULTADOS	25
3.1. Prevalência de <i>S. aureus</i> e <i>S. agalactiae</i> em amostras de leite mastítico subclínico	25
3.2. Diversidade genética dos patógenos.....	26

3.3. Dinâmica das infecções causadas por <i>S. agalactiae</i>	26
3.4. Caracterização fenotípica dos isolados bacterianos	29
4. DISCUSSÃO	32
5. REFERÊNCIAS	36
CAPÍTULO 2: Genetically related <i>Staphylococcus aureus</i> show phenotypic variation undetected by DNA-based methods	43
ABSTRACT	45
INTRODUCTION	46
METHODS	48
Bacterial strains and culture conditions.....	48
DNA-based methods	48
Phenotypic assays.....	49
Infection of <i>Galleria mellonella</i> larvae	49
Histopathology of <i>G. mellonella</i> infected with <i>S. aureus</i>	50
MAC-T assays	51
Statistical analysis	52
RESULTS	53
Differences in phenotype between genetically related <i>S. aureus</i> strains.....	53
Differences in virulence between genetically related <i>S. aureus</i> strains	55
Response of <i>Galleria mellonella</i> to infection with <i>S. aureus</i> strains.....	57
Invasion, persistence and cytotoxicity in MAC-T cells	58
DISCUSSION	60
ACKNOWLEDGEMENTS	64
REFERENCES	65

LISTA DE ABREVIACÕES

- BHI** – Brain Heart Infusion
- CCS** – Contagem de células somáticas
- CFU** – Colony forming unit
- clfA* – Gene que codifica o fator de aglutinação Clfa
- clfB* - Gene que codifica o fator de aglutinação Clfb
- CMT** – California Mastitis Test
- cna* - Gene que codifica a proteína de ligação do colágeno
- dNTP** – Desoxinucleotídeos trifosfatados
- fnBP* - Gene que codifica a proteína de ligação à fibronectina
- hla* - Gene que codifica a α -hemolisina
- hlb* - Gene que codifica a β -hemolisina
- MAC-T** – Células do epitélio mamário bovino
- MLVA** – Análise em multilocus de repetições em tandem de número variável
- PCR** – Reação da Polimerase em Cadeia
- PFGE** – Pulse Field Gel Electrophoresis
- SAG** – *Streptococcus agalactiae*
- SAU** – *Staphylococcus aureus*
- SCV** - Small Colony Variant
- sdrCDE* – Gene que codifica a proteína de ligação à sialoproteína e fibrinogênio
- sea* – Gene que codifica a enterotoxina A
- sec* - Gene que codifica a enterotoxina C
- sed* – Gene que codifica a enterotoxina D
- sej* – Gene que codifica a enterotoxina J
- spA* - Gene que codifica a proteína A
- sspA* - Gene que codifica a serina protease V8
- TSA** - Tryptic Soy Agar

RESUMO

SILVA, Mônica Pacheco, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2015. **Identificação e caracterização das estirpes *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* associadas às mastites bovinas persistente e não persistente.** Orientadora: Andréa de Oliveira Barros Ribon. Coorientadores: Humberto Josué de Oliveira Ramos, Luciano Gomes Fietto e Maria Aparecida Vasconcelos Paiva Brito.

Staphylococcus aureus e *Streptococcus agalactiae* são patógenos contagiosos associados à forma subclínica e persistente da mastite bovina, principal doença da pecuária leiteira. Neste trabalho avaliou-se a presença de dois patógenos em amostras de leite CMT positivas coletadas durante seis meses de animais pertencentes a um rebanho da Zona da Mata de Minas Gerais. Foi encontrada uma alta prevalência dos patógenos contagiosos o que indica possível falta de higiene nos procedimentos de rotina de ordenha ou falha no tratamento da doença. A análise de multilocus de repetições em tandem de número variável (MLVA) revelou apenas um genótipo de *S. aureus* e seis genótipos de *S. agalactiae*, alguns dos quais foram associados a infecções persistentes e ao número de parições do animal. A maioria das bactérias isoladas foi considerada forte produtora de biofilme e no caso de *S. aureus*, os isolados apresentaram uma variada atividade hemolítica. É possível que esses fenótipos contribuam com a persistência da infecção. No capítulo 2, estirpes de *S. aureus* isoladas de animal com manifestação de mastite persistente ou não persistente foram contrastadas quanto a características importantes para a patogênese bacteriana e virulência *in vivo*. Genotipagem por eletroforese em campo pulsado (PFGE) revelou que as bactérias possuíam uma similaridade de 90%. As duas estirpes contrastadas apresentaram os mesmos genes de virulência. Porém, elas diferiram significativamente na produção de hemolisina e biofilme, na capacidade de invasão e persistência em células do epitélio mamário bovino (MAC-T). Nos ensaios *in vivo* realizados com o modelo *Galleria mellonella*, a estirpe SAU 302 revelou-se mais virulenta do que a SAU 322. Uma forte reação do sistema imune do inseto foi observada mediante infecção com as bactérias. Os resultados mostraram variações fenotípicas entre as estirpes geneticamente relacionadas que podem contribuir positivamente para o desenvolvimento da doença e devem ser cuidadosamente exploradas. Conclui-se que bactérias geneticamente relacionadas podem apresentar uma variação fenotípica não revelada por técnicas de fingerprint do DNA e que esta variação pode ter uma implicação na progressão da mastite bovina. Sugere-se a definição de um conjunto de ensaios fenotípicos relevantes

para a doença a fim de caracterizar bactérias isoladas de animais com manifestação conhecida.

ABSTRACT

SILVA, Mônica Pacheco, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2015. **Identification and characterization of strains *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* associated with persistent or non persistent bovine mastitis.** Advisor: Andréa de Oliveira Barros Ribon. Co-advisors: Humberto Josué de Oliveira Ramos, Luciano Gomes Fietto, and Maria Aparecida Vasconcelos Paiva Brito.

Staphylococcus aureus and *Streptococcus agalactiae* are contagious pathogens associated with subclinical and persistent bovine mastitis, the main disease of dairy cattle. In this work we investigated the presence of these pathogens in samples of milk CMT-positive collected during six months from animals belonging to a herd from the Zona da Mata of Minas Gerais. A high prevalence of the contagious pathogens was found indicating a possible lack of hygiene in the milking routine procedures or failure in the treatment of the disease. The multilocus variable-number tandem repeat analysis of (MLVA) revealed one genotype of *S. aureus* and six genotypes of *S. agalactiae*, some of them associated with persistent infections and calving number. Most bacterial isolates was considered strong biofilm producer and for *S. aureus* the isolates showed a variation in hemolytic activity. These phenotypes may contribute to the persistence of the infection. In Chapter 2, we analyzed the *in vivo* virulence and phenotypic traits believed to be important for the pathogenicity of bovine *S. aureus*. In this study the strains SAU 302 and SAU 322 isolated from animals with persistent or non-persistent mastitis, respectively, were contrasted. Genotyping by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) revealed a genetic relatedness of 90% between bacteria. The two strains showed the same set of virulence genes investigated. However, significant differences were seen in the production of hemolysin and biofilm, in invasiveness and persistence in the bovine mammary epithelial cells (MAC-T). *In vivo* tests carried out with the *Galleria mellonella* model showed that SAU 302 was more virulent than the SAU 322. A strong reaction of the insect immune system was observed upon infection with both bacteria. Despite their genetic proximity, the strains showed a phenotypic variation undetected by DNA-based methods that can contribute to the development of the disease and should be explored further. Our present study suggests that a set of phenotypic assays relevant to bovine mastitis should be defined and used to analyze a collection of bacteria for

which information on the nature of the clinical manifestation is available.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. O panorama leiteiro no Brasil e em Minas Gerais

O leite está entre os principais produtos da agropecuária brasileira e tem um papel relevante no suprimento de alimentos, na geração de emprego e na renda da população. A produção brasileira de leite de vaca teve um lugar de destaque no panorama mundial com 35,17 bilhões de litros produzidos em 2014, um incremento de 2,7% em relação ao ano anterior (IBGE, 2014). Isso colocou o Brasil em quinto lugar no ranking dos países com maior produção de leite no mundo, perdendo apenas para a União Europeia, Índia, Estados Unidos e China. Desse volume, 70,37% foram direcionados à indústria de laticínios e o restante, destinado ao autoconsumo, produção artesanal de queijos e derivados (IBGE, 2014).

No cenário nacional, a região Sudeste destaca-se como a segunda maior produtora de leite (12,16 bilhões de litros/ano) o que representa 34,6% da produção nacional, perdendo apenas para a região Sul (12,20 bilhões de litros/ano), com 34,7% da produção do país. O Estado de Minas Gerais apresenta o maior rebanho leiteiro do país, com 25,2%, do total de vacas ordenhadas e é apontado como o principal produtor, contribuindo isoladamente com 9,37 bilhões de litros/ano, o que corresponde a 77,0% de toda a produção da Região Sudeste e a 26,6% do total da produção nacional (IBGE, 2014).

Em 2014, as exportações de leite e lácteos no estado de Minas Gerais obtiveram um alto crescimento relativo comparado a 2013, rendendo ao estado um montante de US\$138,08 milhões, valor aproximadamente 9 vezes maior do que o obtido no ano anterior, relativo à 21,62 mil toneladas de leite exportados (SEAPA, 2015). Associado a esse panorama de supremacia, o governo mineiro implementou, em julho de 2007, o Polo de Excelência de Leite e Derivados com a proposta de consolidar a liderança de Minas Gerais no desenvolvimento sustentável do setor leiteiro. A importância da atividade leiteira para Minas Gerais ficou também evidente no Censo Agropecuário realizado pelo IBGE, em que revelou que 40% dos 551 mil estabelecimentos rurais do estado estão voltados para a produção de leite (IBGE, 2014a). Deste total, quase 80% são caracterizados como produção familiar, o que faz da atividade leiteira a principal fonte de renda de muitos mineiros.

Ao contrário do imaginado, a produtividade dos rebanhos leiteiros em Minas Gerais (1.591,11 litros leite/vaca/ano) é menor se comparada à produtividade observada em rebanhos de outros estados, como Rio Grande do Sul (2.899,54 litros leite/ano) e

Paraná (2.533,97 litros leite/vaca/ano), mas, em média, maior do que a média nacional (1.525 litros/leite/vaca/ano) em 2014 (EMBRAPA, 2015). Os municípios de Araras (SP), Castro (PR) e Carlos Barbosa (RS) lideram em termos de produtividade (IBGE, 2014).

Em Minas Gerais, alguns programas tentam reverter essa situação para garantir o aumento da produtividade e da sustentabilidade dos estabelecimentos leiteiros mineiros, entre eles o Minas Leite, coordenado pela Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (SEAPA) e Emater-MG, e o Programa para Desenvolvimento da Pecuária Leiteira (PDPL), sediado na Universidade Federal de Viçosa. O PDPL em mais de duas décadas de existência já conseguiu-se aumentar a produtividade leiteira em mais de 300% com assistência mensal às propriedades leiteiras da microrregião de Viçosa (PDPL, 2015).

1.2. Mastite bovina – aspectos gerais

A mastite bovina é uma importante doença que afeta diretamente a produtividade de leite. Estimativas demonstram que nos Estados Unidos as perdas econômicas podem chegar a quase U\$ 2 bilhões/ano como consequência da redução na produção e qualidade do leite, do aumento das despesas com tratamento veterinário ou descarte precoce dos animais (Bhatt *et al.*, 2011; Whelehan *et al.*, 2011). Um estudo realizado na Alemanha desenvolveu-se um modelo para determinar as perdas econômicas associadas à doença em que foi demonstrado que os valores podem variar entre €65 a €182 por vaca/ano, dependendo da gravidade do quadro clínico (Huijps *et al.*, 2010). No Brasil faltam estimativas que demonstrem as perdas econômicas em função da mastite, mas em 2007, Dias (2007) reportou que ocorre uma queda de 12 a 15% na produção de leite todos os anos, ou seja, um desperdício de 2,4 bilhões de litros de leite/ano.

A mastite bovina é uma inflamação da glândula mamária causada principalmente por bactérias, que uma vez instaladas na glândula mamária, multiplicam-se e produzem toxinas ou outras substâncias que causam danos ao tecido mamário (Kim *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2011). A doença pode ser classificada como mastite ambiental ou mastite contagiosa, dependendo do micro-organismo responsável pela infecção (Smith *et al.*, 1985; Bradley, 2002). Os patógenos que causam a mastite ambiental não são adaptados para sobreviver no interior do hospedeiro e por isso são conhecidos como oportunistas da glândula mamária. Ocasionalmente, estes micro-organismos invadem o interior do úbere do animal, multiplicam-se e são rapidamente

eliminados pelo sistema imune do hospedeiro. Os patógenos mais frequentemente encontrados nos casos de mastite ambiental são espécies do gênero *Streptococcus* sp. (com exceção do *Streptococcus agalactiae*) e bactérias do grupo coliformes, e o principal reservatório destes micro-organismos é o ambiente onde os animais vivem (Smith *et al.*, 1985; Bradley, 2002). Contrariamente a mastite ambiental, a mastite contagiosa é causada por micro-organismos considerados aptos a sobreviver no interior do hospedeiro, especialmente na glândula mamária. *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* são os dois principais patógenos responsáveis pela forma contagiosa da doença, e os animais infectados representam o principal reservatório da doença (Bradley, 2002; Riekerink *et al.*, 2006).

A mastite bovina pode ser considerada como mastite clínica ou subclínica de acordo com o grau de infecção do animal. A mastite clínica apresenta sintomas facilmente detectáveis, como edema, aumento de temperatura, hiperemia e sensibilidade da glândula mamária, presença de grumos, pus, sangue e outras alterações nas características do leite. A mastite subclínica não é diagnosticada visivelmente, mas a detecção pode ser feita por meio da contagem de células somáticas no leite (CCS), que é alta no leite do animal doente em função das células somáticas que são recrutadas para eliminar os micro-organismos invasores responsáveis pela infecção (Silveira *et al.*, 2005; Whelehan *et al.*, 2011). A relação estabelecida é de um caso clínico para 20 a 40 casos subclínicos (Du Preez *et al.*, 2000), o que reforça a necessidade de identificar animais com essa manifestação para evitar a disseminação do patógeno pelo rebanho.

No Brasil, a Instrução Normativa 62 determina que o leite cru refrigerado pode conter valores máximos de CCS de 600.000 células/mL e prevê uma redução deste número para 100.000 células/mL a partir de 2017 em todos os estados (Instrução Normativa 62, 2011). Na Europa, valores de $CCS \geq 200.000$ células/mL já são considerados como infecções subclínicas de mastite e valores de $CCS < 200.000$ células/mL são consideradas infecções latentes (Zecconi *et al.*, 2006). O valor de CCS é utilizado como uma ferramenta de diagnóstico para discriminar entre animais saudáveis e doentes (Riggio *et al.*, 2013). Desta forma, é importante para o produtor preocupar-se em reduzir estes valores, pois o montante pago pelo leite é diretamente proporcional à qualidade do mesmo.

Outra forma de diagnóstico da mastite subclínica é por meio de métodos indiretos como o CMT (*California Mastitis Test*), que consiste em misturar jatos de leite com um reagente e com base na reação, determinar o grau de infecção pelo grau de coagulação. As críticas ao método são a baixa sensibilidade e incapacidade de

identificar o patógeno, informação necessária para a correta adoção de medidas terapêuticas (Riggio *et al.*, 2013).

O método padrão para o diagnóstico da mastite bovina é o cultivo e identificação dos micro-organismos. Para isso, o leite é coletado dos quartos mamários e encaminhado ao laboratório, onde alíquotas são semeadas em meios de culturas seletivos (Godden *et al.*, 2007). Uma vez identificados os principais grupos, outros testes são realizados para a identificação das espécies. Recomenda-se que as amostras sejam coletadas de todos os quartos mamários, inclusive os que apresentarem escore negativo no teste CMT, considerando a possibilidade que esses possam estar infectados com patógenos contagiosos (Brito *et al.*, 1999).

O diagnóstico microbiológico permite identificar de forma rápida os problemas no rebanho e adotar medidas de manejo, como o Programa de Seis Pontos, que têm como objetivo reduzir a incidência da mastite bovina. Esse programa inclui práticas voltadas para saúde do úbere do animal e controle dos patógenos da mastite, como adoção de medidas de higiene e identificação, segregação e descarte de animais com manifestação crônica de mastite. Se aplicado de forma adequada, esse programa é capaz de melhorar a qualidade do leite produzido na fazenda (Molina *et al.*, 2011), o que beneficia o produtor e os consumidores.

O sucesso no tratamento da mastite bovina depende de fatores como o diagnóstico preciso, escolha correta da rota de administração, seleção do terapêutico apropriado, estágio que o tratamento foi iniciado, severidade da patologia no úbere, tratamento suporte e fatores de pré-disposição à doença. Apesar de não existir um consenso quanto ao tratamento da mastite, a infusão de drogas intramamárias destaca-se como sendo o método mais utilizado (Barkema *et al.*, 2006).

Nos casos de mastite subclínica e mastite clínica aguda são recomendadas apenas terapias intramamárias, a menos que haja envolvimento de bactérias muito virulentas ou vacas leiteiras extremamente valiosas, recomendando-se, nestes casos, o tratamento com antibióticos via parenteral (Barkema *et al.*, 2006). Para o tratamento das mastites clínica aguda e hiperaguda, recomenda-se combinar infusões intramamárias com terapia parenteral. Já para os casos de mastite crônica, é recomendado abater o animal doente ou eliminar o quarto mamário infectado. A administração de antibióticos intramamários e via parenteral, combinado com anti-inflamatórios também pode ser adotada (Du Preez, 2000).

Há mais de uma década, Fagliari *et al.*, (1990) sinalizaram que apenas o quadro clínico da doença era insuficiente para subsidiar a escolha do antibiótico. Isso ainda é a

prática nos dias atuais, o que faz com que a antibioticoterapia indiscriminada gere um problema ainda maior para o controle da doença, que é a resistência bacteriana a antibióticos. Um estudo realizado entre 1992 e 1993 em rebanhos do Sudeste do Brasil foi demonstrado a suscetibilidade de todos os isolados de *S. aureus* a gentamicina e a resistência de 43,9% a penicilina causada pelo uso indiscriminado desse antibiótico em rebanhos da região (Lange *et al.*, 1999). Porém, quase 75% e 23% de isolados de *Staphylococcus* spp. de propriedades leiteiras do Nordeste foram resistentes a ampicilina e gentamicina, respectivamente (Medeiros *et al.*, 2009). Os resultados mostraram ainda que o perfil de suscetibilidade das bactérias isoladas de diferentes regiões nordestinas pode variar significativamente, verificando-se a necessidade de realização de testes de sensibilidade *in vitro* antes da adoção de um tratamento padrão entre fazendas.

1.3. Patógenos contagiosos da mastite bovina: *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus*

Streptococcus agalactiae e *Staphylococcus aureus* são patógenos contagiosos associados às infecções intramamárias bovinas e frequentemente causam mastite subclínica e crônica (Zadoks e Fitzpatrick, 2009; Schukken *et al.*, 2011). A principal forma de disseminação dessas bactérias no rebanho é de vaca para vaca, sendo que os animais infectados servem como reservatório da infecção. Historicamente, esses patógenos são agrupados por possuírem epidemiologia semelhante, no entanto, há diferenças consideráveis em suas patobiologias que resultam em grandes variações em seus níveis de prevalência no rebanho e nos animais (Keefe, 2012).

Streptococcus agalactiae é considerado um patógeno contagioso obrigatório da glândula mamária, uma vez que não é capaz de sobreviver por longos períodos fora deste ambiente (Keefe, 1997; Keefe, 2012). Esse micro-organismo é capaz de aderir ao tecido mamário do hospedeiro e o ambiente específico do úbere permite o crescimento e proliferação deste patógeno. A virulência de algumas estirpes de *S. agalactiae* está associada com diferenças na capacidade de adesão ao epitélio mamário das vacas (Jain, 1979; Wanger *et al.*, 1984). A mastite causada por *S. agalactiae* pode se manifestar na forma clínica ou subclínica, sua progressão é lenta, podendo levar à fibrose e atrofia do quarto afetado resultando em uma doença crônica, latente que diminui a produção e aumenta a contagem de células somáticas (CCS) do leite (Awale *et al.*, 2012). Uma vez que o animal é infectado, o micro-organismo persiste nas cisternas do teto e da glândula

mamária, com ondas periódicas de multiplicação, aumento de virulência e invasão tecidual (Marques *et al.*, 2006; Perez Neto & Zappa, 2011).

O tratamento da mastite bovina causada por *S. agalactiae* normalmente é feito por infusão de drogas intramamárias comercialmente disponíveis. A susceptibilidade deste patógeno aos agentes antimicrobianos é bastante elevada e por isso, a terapia intramamária é um método bastante eficaz e relativamente simples para erradicação de *S. agalactiae* (Keefe, 1997; Zadoks e Fitzpatrick, 2009). Em rebanhos com alta prevalência de casos de mastite causados por *S. agalactiae*, é importante a utilização das drogas intramamárias para impedir a disseminação do patógeno. Além da terapia com as drogas intramamárias, é importante adotar um sistema de práticas de higiene durante a ordenha, terapia da vaca seca e cuidados para evitar a reintrodução do micro-organismo no rebanho. Essas medidas adotadas em conjunto podem reduzir ou eliminar a infecção ao longo de alguns anos (Keefe, 1997; Keefe, 2012).

Staphylococcus aureus é considerado um patógeno contagioso encontrado na pele, nos tetos e dentro do úbere do animal, transmitido de uma vaca para outra durante a ordenha. É descrito como um dos patógenos mais prevalentes em casos de mastite no mundo, em especial às infecções subclínicas (Zadoks *et al.*, 2011; Behiry *et al.*, 2012). Uma característica associada a *S. aureus* é a persistência das infecções intramamárias que ocorre em função da habilidade que o micro-organismo tem de adaptar-se ao hospedeiro, o que resulta em um quadro persistente da doença. Há mais de uma década estudos relatam manifestações de mastite persistente causada por *S. aureus* (Myllys *et al.*, 1997; Haveri *et al.*, 2008). Porém, foi proposto que as estirpes que causam infecções persistentes sejam diferentes das que causam infecções transitórias, sendo responsáveis por um quadro clínico menos severo e com maior possibilidade de disseminação no rebanho (Schukken *et al.*, 2011).

Infecções intramamárias causadas por *S. aureus* não respondem bem a antibioticoterapia, provavelmente pela capacidade de adaptação do patógeno ao hospedeiro. Embora seja caracterizado como um patógeno extracelular, *S. aureus* é capaz de invadir e sobreviver dentro de células do hospedeiro, como células epiteliais mamárias, neutrófilos e macrófagos, o que permite a bactéria a escapar do sistema imune do animal infectado (Zadoks *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2011; Behiry *et al.*, 2012). Isso pode levar a uma infecção subclínica crônica que pode persistir por toda a vida do animal.

Outro mecanismo adotado por *S. aureus* é a sua capacidade de crescer aderido ao tecido hospedeiro formando um biofilme (Dhanawade *et al.*, 2010). Tal condição

confere à bactéria um ambiente mais seguro, uma vez que a matriz extracelular de carboidratos e exopolissacarídeos que reveste o biofilme os protege da ação de antibióticos e outras perturbações do ambiente. Estudos mostraram que a resistência de células bacterianas é maior quando crescidas na forma de biofilme (Olson *et al.*, 2002; Kirby *et al.*, 2012), enquanto bactérias planctônicas (livres) são sensíveis a baixas concentrações dos antibióticos testados. No seu trabalho, Melchior e colaboradores (2007) avaliaram a sensibilidade de estirpes de *Staphylococcus aureus* que crescem formando biofilme a diferentes antimicrobianos. Esses autores observaram diferenças claras entre as estirpes e entre os antimicrobianos analisados, sugerindo que a capacidade de formação de biofilme pelo patógeno está associada com a menor taxa de cura no tratamento com antimicrobianos. Dessa forma, é possível que a capacidade de formação de biofilme por *S. aureus* seja mais um fator a contribuir para o insucesso da antibioticoterapia nos rebanhos leiteiros.

No início do século XX, Kolle & Hetsch (1906) descreveram a existência de um fenótipo peculiar de *S. aureus* que resultava na emergência de uma subpopulação de bactérias auxotróficas. Essas bactérias foram denominadas SCV (*Small Colony Variant*) em face das colônias puntiformes, e resultavam da multiplicação nove vezes mais lenta quando comparada a bactérias com o fenótipo normal. Outras características associadas às colônias SCV são a ausência de hemólise e resistência a certas classes de antibióticos, essa última devido a uma deficiência na cadeia transportadora de elétrons (Von Eiff, 2008). Porém, o mais relevante em relação à *S. aureus* SCV é a sua persistência *in vivo*, resultado de sua capacidade de sobreviver intracelularmente células do hospedeiro (Melter & Radojevic, 2010).

Embora o fenótipo SCV seja muito estudado em isolados clínicos de *S. aureus* que provocam infecções em humanos, existem relatos esporádicos que associam SCV à mastite crônica. Atalla *et al.*, (2008) foram os primeiros a descreverem o isolamento de *S. aureus* SCV em casos de mastite bovina persistente e sugerirem que SCV pode ser um importante contribuinte para a sobrevivência prolongada de *S. aureus* em alguns casos de mastite. Alkasir *et al.*, (2012) também identificaram um isolado com características de SCV dentre oito isolados provenientes de animais com manifestação de mastite crônica na China. Porém, mais estudos são necessários para relacionar o fenótipo SCV a infecções intramamárias recorrentes.

A grande heterogeneidade genética existente em populações naturais de *S. aureus* de origem bovina também é um agravante que afeta o prognóstico da mastite bovina. O conhecimento dessa diversidade pode ser explorado para determinar a

estrutura genética dos isolados associados à mastite bovina e direcionar estratégias eficientes para controlar infecções intramamárias contra as estirpes mais associadas à doença (Kapur *et al.*, 1995; Ote *et al.*, 2011). Embora alguns autores indiquem que poucos clones de *S. aureus* são responsáveis pela maioria dos casos de mastite nos rebanhos leiteiros e que alguns desses têm distribuição geográfica mundial (Smith *et al.*, 2005; Rabello *et al.*, 2007; Almeida *et al.*, 2011), outros autores sugerem que as infecções causadas por *S. aureus* são diferentes entre os rebanhos em função das diferenças existentes entre as estirpes encontradas (Zecconi *et al.*, 2006; Klein *et al.*, 2012). Em seu estudo, Haveri e colaboradores (2007) reportaram a presença de diferentes genes de virulência em isolados de *Staphylococcus aureus* causando infecções intramamárias bovina persistente e não persistente. Estes autores observaram uma associação entre genes que codificam toxinas superantigênicas (PTSAg) e as infecções persistentes.

Estirpes de *S. aureus* podem produzir uma gama de fatores de virulência, como adesinas, enzimas de degradação, toxinas superantigênicas dentre outros e a combinação de tais fatores influenciam na progressão da infecção (Ote *et al.*, 2011; Piccinini *et al.*, 2012). Pesquisas conduzidas com isolados humanos e veterinários reforçam a importância de avaliar a combinação desses fatores para melhor entendimento de infecções estafilocócicas (Von Eiff *et al.*, 2004; Zecconi *et al.*, 2006; Taverna *et al.*, 2007). 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 apresentadas pelos animais.

Klein *et al.* (2012) mostraram que os principais genes de virulência presentes em *S. aureus* isolados no Sudeste do Brasil foram *clfB* (91%), *spa* (85,9%), *sdrCDE* (85,9%), *fnBP*(63,5%), e que esses genes de virulência estavam presentes em mais de 75% dos isolados analisados. Esses autores ao compararem aos resultados reportados por Ikawaty *et al.* (2010) e Kumar *et al.* (2010) verificaram que a combinação de genes de virulência encontrada não era a mesma detectada por outros grupos de pesquisa. Os autores ainda reforçaram a necessidade de se caracterizar estirpes provenientes de rebanhos leiteiros de diferentes origens geográficas haja vista que a predominância de um gene de virulência em isolados de um rebanho não é indicativo de sua presença no genoma de bactérias de outras localidades. Porém, é de fundamental importância que novos estudos sejam feitos com estirpes isoladas a partir de animais com manifestações conhecidas para estabelecer uma correlação entre fatores de virulência e tipo de

manifestação. Uma vez definidos marcadores de prognóstico eles podem ajudar a traçar estratégias para melhor controle da doença nos rebanhos leiteiros.

Neste trabalho foram feitos os isolamento, identificação e caracterização dos patógenos contagiosos *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* provenientes de amostras de leite de animais com manifestação de mastite bovina persistente e não persistente em um rebanho leiteiro da Zona da Mata de Minas Gerais. A genotipagem pela análise em multilocus de repetições em tandem de número variável (MLVA) não revelou diferença entre os isolados de *S. aureus*, embora seis genótipos de *S. agalactiae* tenham sido encontrados no rebanho, dos quais três foram mais associados a infecções persistentes. Posteriormente, duas estirpes de *S. aureus*, uma isolada de animal com mastite persistente e outra de não-persistente, foram contrastadas quanto à virulência in vivo, capacidade de invasão e persistência em células do epitélio bovino e presença de genes de virulência. Os resultados mostraram que apesar da proximidade genética, as estirpes apresentaram uma variação fenotípica que pode contribuir para o desenvolvimento da mastite bovina.

REFERÊNCIAS

- Alkasir, R., Liu, X., Zahra, M., Ferreri, M., Su, J. & Han, B. (2012). Characteristics of *Staphylococcus aureus* small colony variant and its parent strain isolated from chronic mastitis at a dairy farm in Beijing, China. *Microb Drug Resist*, doi:10.1089.
- Almeida, L.M., Almeida, M.Z.P.R.B., Mendonça, C.L.M. & Mamizuka, E.M. (2011). Novel sequence types (STs) of *Staphylococcus aureus* isolates causing clinical and subclinical mastitis in flocks of sheep in the northeast of Brazil. *J Dairy Sci*, **78**: 373-378.
- Atalla, H., Gyles, C., Jacob, C.L., Moisan, H., Malouin, F. & Mallard, B. (2008). Characterization of a *Staphylococcus aureus* small colony variant (SCV) associated with persistent bovine mastitis. *Foodborne Pathog Dis*, **5**: 785-799.
- Awale, M.M., Dudhatra, G.B., Kumar, A., Chauhan, B.N. & Kamani, D.R. (2012). Bovine Mastitis: A threat to economy. 1:295. doi:10.4172/scientificreports.295.
- 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*. *J Dairy Sci*, **89**: 1877-1895.
- Behiry, A., Schlenker, G., Szabo, I. & Roesler, U. (2012). *In vitro* susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with subclinical mastitis to different antimicrobial agents. *J Vet Sci*, **13**: 153-161.
- Bhatt, V.D., Patel, M.S., Joshi, C.G. & Kunjadia, A. (2011). Identification and antibiogram of microbes associated with bovine mastitis. *Anim Biotech*, **22**: 163-169.
- Bradley, A. J. (2002). Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet J*, **164**, 116-128.
- 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 Zoo*, **51**: 129-135.
- Dhanawade, N.B., Kalorey, D.R., Srinivasan, R., Barbuddhe, S.B. & Kurkure, N.V. (2010). Detection of intercellular adhesion genes and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Vet Res Commun*, **34**: 81-89.
- Dias, R.V.C. (2007). Principais métodos de diagnóstico e controle da mastite bovina. *Acta Vet Brasilica*, **1**: 23-27.

- Du Preez, J.H. (2000). Bovine mastitis therapy and why it fails. *J S Afr Vet Assoc*, **71**: 201-208.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. (2015). Centro de Inteligência do Leite. Disponível em: <http://www.cileite.com.br/content/leite-em-n%C3%BAmoros-produ%C3%A7%C3%A3o>. Acessado em 17 de novembro de 2015.
- Fagliari, J.J., Lucas, A. & Ferreira Neto, J.M. (1990). Sensibilidade a drogas antimicrobianas de bactérias isoladas de vacas com mastite clínica e subclínica. *Cien Vet*, **4**: 11-13.
- Godden, S., Lagio, A., Bey, R., Leslie, K., Ruegg, P. & Dingwell, R. (2007). Use of on-farm culture systems in mastitis control programs. National Mastitis Council Regional Meeting, Visalia, California. Verona: National Mastitis Council, 1-9.
- 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**: 3728-3735.
- Haveri, M., Roslöf, A., Rantala, L. & Pyörälä. (2007). Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistente and nonpersistente intramammary infections with diferente clinical characteristics. *J Appl Microbiol*, **103**: 993-1000.
- Huijps, K., Theo, Lam, J.G.M.T. & Hogeveen, H. (2008) Costs of mastitis: facts and perception. *J Dairy Res*, **75**: 113-120.
- Ikawaty, R., Brouwer, E.C., Van Duijkeren, E., Mevius, D., Verhoef, J. & Fluit, A.C. (2010). Virulence factors of genotyped bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates in the Netherlands. *Int J Dairy Sci*, **5**: 60-70.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. (2014). Produção da Pecuária Municipal, volume 42. Disponível no site: http://www.ibge.gov.br/biblioteca/visualizacao/periodicos/84/ppm_2014_v42_br.pdf. Acessado em 16 de novembro de 2015.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. (2014a). Censo Agropecuário 2006. Disponível no site: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/agri_familiar_2006/familia_censoagro2006.pdf. Acessado em 17 de novembro de 2015.
- Instrução Normativa 62. (2011). Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>. Acessado em: 05 de março de 2013.

- Jain, N.C. (1979). Common mammary pathogens and factors in infection and mastitis. *J Dairy Sci*, **62**: 128-134.
- Kapur, V., Sischo, W.M., Greer, R.S., Whittam, T.S. & Musser, J.M. (1995). Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *J Clin Microbiol*, **33**: 376-380.
- Keefe, G. P. (1997) *Streptococcus agalactiae* mastitis: A review. *Can Vet J*; **38**: 429-437.
- Kim, Y., Atalla, H., Mallard, B., Robert, C. & Karrow, N. (2011). Changes in Holstein cow milk and serum proteins during intramammary infection with three different strains of *Staphylococcus aureus*. *BMC Vet Res*, **7**:51-64.
- Kirby, A.E., Garner, K. & Levin, B.R.(2012). The relative contributions of physical structure and cell density to the antibiotic susceptibility of bacteria in biofilms. *Antimicrob Agents Ch*, **56**: 6480-6491.
- Klein, R.C., Klein, M.H.F., 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**: 183-188.
- Kolle, W. & Hetsch, H. (1906). Die Experimentelle bakteriologie und die infektionskrankheiten: mit besonderer berücksichtigung der immunitätslehre. ein lehrbuch für studierende, *Ärzte und Medizinalbeamte*. 5., erweiterte Aufl. Berlin: Urban & Schwarzenberg, 1916-17.
- Kumar, R., Yadav, B.R. & Singh, R.S. (2010). Genetic determinants of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from milk of mastitic crossbred cattle. *Curr Microbiol*, **60**: 379-386.
- Lange, C.; Cardoso, M.; Senczek, D.; Schwarz, S. (1999). Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. *Vet Microbiol*, **67**: 127-141.
- Marques. (2006). Criação de Bovinos. *Cons Vet e Publ*, **6**: 435-450.
- Medeiros, E.S., Mota, R.A., Santos, M.V., Freitas, M.F.L., Pinheiro Júnior, J.W. & Teles, J.A.A. (2009). Perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* de linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de vacas com mastite subclínica. *Pesquisa Vet Bras*, **29**: 569-574.
- Melchior, M.B., Fink-Gremmels, J., Gaastra, W. (2007). Extended antimicrobial susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis growing in biofilms. *Vet. Microbiol*, **125**: 141–149.

- Melter, O. & Radojevič, B. (2010). Small colony variants of *Staphylococcus aureus* – review. *Folia Microbiol*, **55**: 548-58.
- Molina, L. R., Carvalho, G. F., Meneses, R. M., Uribe, J. A. Z., Carvalho, A. U. & Filho, E. J. F. (2011). Efeito da aplicação de um programa de controle de mastite em fazendas leiteiras do estado de Minas Gerais. *In: IX Congresso Brasileiro Buiatria*. Goiânia - GO, Brasil. p.1044-1047.
- Myllys, V., Ridell, J., Björkroth, J., Biese, I. & Pyörälä, S. (1997). Persistence in bovine mastitis of *Staphylococcus aureus* clones as assessed by random amplified polymorphic DNA analysis, ribotyping and biotyping. *Vet Microbiol*, **51**: 245-251.
- Olson, M.E., Ceri, H., Morck, D.W., Buret, A.G. & Read, R.R. (2002). Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res*, **66**: 86-92.
- Ote, I., Taminau, 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**: 285-292.
- Pereira, U.P., Oliveira, D.G.S., Mesquita, L.R., Costa, G.M. & Pereira, L.J. (2011). Efficacy of *Staphylococcus aureus* vaccines for bovine mastitis: A systematic review. *Vet Microbiol*, **148**: 117-124.
- Perez Neto & Zappa. (2011). Mastite em vacas leiteiras - revisão de literatura. *Ver Cient Elet de Med Vet*, 16.
- Piccinini, R., Tassi, R., Daprà, V., Pilla, R., Fenner, J., Carter, B. & Anjum, M.F. (2012). Study of *Staphylococcus aureus* collected at slaughter from dairy cows with chronic mastitis. *J Dairy Res*, **79**: 249-255.
- Programa de Desenvolvimento da Pecuária Leiteira – Região de Viçosa - PDPL-RV. (2015). Disponível em: <http://www.pdpl.ufv.br/pdpl/scripts/apresentacao.php?pagina=resultados>. Acessado em 17 de novembro de 2015.
- Rabello, R.F., Moreira, B.M., Lopes, R.M.M., Teixeira, L.M., Riley, L.W. & Castro, A.C.D. (2007). Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from cows with mastitis in Brazilian dairy herds. *J Med Microbiol*, **56**: 1505-1511.

- Riekerink, R. G. M. O., Barkema, H. W., Veenstra, S., Poole, D. E., Dingwell, R. T. & Keefe, G. P. (2006). Prevalence of contagious mastitis pathogens in bulk tank milk in Prince Edward Island. *Can Vet J*, **47**: 567-572.
- Riggio, V., Pescec, L. L., Morreale, S. & Portolano, B. (2013). Receiver-operating characteristic curves for somatic cell scores and California Mastitis Test in Valle del Belice dairy sheep. *Vet J*, **196**: 528-532.
- Schukken, Y.H., Günther, J., Fitzpatrick, J., Fontaine, M.C., Goetze, L., Holst, O., Leigh, J., Petzl, W., Schuberth, H.J., Sipka, A., Smith, D.G.E., Quesnell, R., Watts, J., Yancey, R., Zerbe, H., Gurjar, A., Zadoks, R.N. & Seyfert, H.M. (2011). Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Vet Immunol Immunopathol*, **144**: 270-289.
- Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais - SEAPA. (2015). Panorama do Comércio Exterior do Agronegócio de Minas Gerais. Disponível no site: http://www.agricultura.mg.gov.br/images/Arq_Relatorios/Publicacoes/Panorama_2015.pdf. Acessado em 16 de novembro de 2015.
- Silveira, T.M.L., Fonseca, L.M., Lago, T.B.N. & Veiga, D.R. (2005). Comparação entre o método de referência e a análise eletrônica na determinação da contagem de células somáticas do leite bovino. *Arq Bras Med Vet Zootec*, **57**: 128-132.
- 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**: 4737-4743.
- Smith, K.L, Todhunter, D.A. & Schoenberger, P.S. (1985). Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. *J. Dairy Sci.*, **68**: 1531-1553.
- Taverna, F., Negri, A., Piccinini, R., Zecconi, A., Nonnis, S., Ronchi, S. & Tedeschi, G.(2007). Characterization of cell wall associated proteins of a *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis case by a proteomic approach. *Vet Microbiol*, **119**: 240-247.
- Von Eiff, C. (2008). Review: *Staphylococcus aureus* small colony variants: a challenge to microbiologists and clinicians. *Int J Antimicrob Ag*, **31**: 507-510.
- Von Eiff, C., Friedrich, A.W., Peters, G. & Becker, K. (2004). Prevalence of genes encoding for members of the staphylococcal leukotoxin family among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Diagn Micr Infec Dis*, **49**: 157-162.

- Wanger, A.R., Dunny, G.M. (1984). Specific agglutination of *Streptococcus agalactiae* from bovine mastitis by casein components of bovine milk. *J Dairy Sci*; **67**: 2441-2445.
- Whelehan, C.J., Meade, K.G., Eckersall, P.D., Young, F.J. & O'farrelly, C. (2011). Experimental *Staphylococcus aureus* infection of the mammary gland induces region-specific changes in innate immune gene expression. *Vet Immunol Immunop*, **15**: 181-189.
- Zadoks, R. & Fitzpatrick, J. (2009). Changing trends in mastitis. *Ir Vet J*, **62**: 59-70.
- Zadoks, R.N., Middleton, J.R., McDougall, S., Katholm, J. & Schukken, Y.H. (2011). Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. *J Mammary Gland Biol*, **16**: 357-372.
- Zecconi, A., Cesaris, L., Liandris, E., Daprà, V. & Piccinini, R. (2006). Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microb Pathogenesis*, **40**: 177-183.

CAPÍTULO 1

Distribuição e caracterização de patógenos da mastite subclínica em um rebanho da Zona da Mata de Minas Gerais

RESUMO

A mastite bovina é considerada por muitos autores a principal doença do rebanho leiteiro. *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* são patógenos contagiosos comumente associados à forma subclínica e persistente da doença. A identificação e caracterização dos patógenos em circulação no rebanho auxiliam na escolha do tratamento a ser adotado e subsidiam decisões de manejo. Neste trabalho, foram realizadas coletas de leite entre os meses de maio a outubro de 2013 a partir de vacas holandesas pertencentes a um rebanho localizado na Zona de Minas Gerais. Apenas amostras positivas para o *California Mastitis Test* (CMT) foram coletadas, totalizando 175 amostras de leite. Os testes microbiológicos revelaram a presença *S. aureus* em 70 amostras, enquanto 60 foram positivas para *S. agalactiae*. Em 17,14% do leite amostrado observou-se infecção simultânea dos patógenos. Em 36% das amostras foi observado o crescimento de bactérias de outros grupos e 4,57% foram consideradas contaminadas. Mastite persistente, definida por três ou mais episódios consecutivos da doença em um mesmo animal, foi causada por *S. aureus* em sete animais e por *S. agalactiae* em nove. Análise em multilocus de repetições em tandem de número variável (MLVA) revelou apenas um genótipo de *S. aureus* no rebanho, e seis de *S. agalactiae*, sendo o Sag T1 o mais prevalente e associado com animais que tiveram 2 partos. Os isolados de *S. aureus* e *S. agalactiae* produziram biofilme *in vitro* e uma variada atividade hemolítica foi observada em *S. aureus*. Características dos patógenos como a produção de biofilme e atividade hemolítica podem contribuir para a persistência de infecções intramamárias. A alta prevalência de *S. aureus* e *S. agalactiae* no rebanho sugere uma falha na aplicação das medidas de controle da mastite.

1. INTRODUÇÃO

O leite está entre os principais produtos da agropecuária brasileira e tem um papel relevante no suprimento de alimentos, na geração de emprego e na renda da população. A produção brasileira de leite de vaca teve um lugar de destaque no panorama mundial com 35,17 bilhões de litros produzidos em 2014, um incremento de 2,7% em relação ao ano anterior (IBGE, 2014). Isso colocou o Brasil em quinto lugar no ranking dos países com maior produção de leite no mundo, perdendo apenas para a União Europeia, Índia, Estados Unidos e China (IBGE, 2014).

A mastite bovina é uma importante doença que afeta diretamente a produtividade de leite. As estimativas mostram que nos Estados Unidos as perdas econômicas podem chegar a quase US\$ 2 bilhões/ano como consequência da redução na produção e qualidade do leite, do aumento nas despesas com tratamento veterinário ou até mesmo do descarte precoce dos animais (Bhatt *et al.*, 2011; Whelehan *et al.*, 2011). Um estudo realizado na Alemanha desenvolveu um modelo para determinar as perdas econômicas associadas à doença e revelou que o montante pode variar entre €65 a €182 por vaca/ano dependendo da gravidade do quadro clínico (Huijps *et al.*, 2010). No Brasil faltam estimativas que demonstrem as perdas econômicas em função da mastite, mas Dias (2007), reportou que ocorre uma queda de 12 a 15% na produção de leite todos os anos, ou seja, um desperdício de 2,4 bilhões de litros de leite/ano.

Staphylococcus aureus e *Streptococcus agalactiae* são espécies comumente associadas à infecção intramamária e destacam-se por se tratarem de patógenos contagiosos que causam frequentemente mastite subclínica persistente (Zadoks e Fitzpatrick, 2009; Schukken *et al.*, 2011). A principal forma de disseminação dessas bactérias no rebanho é de vaca para vaca, sendo que os animais infectados servem como reservatório da infecção. Historicamente, esses patógenos são agrupados por possuírem epidemiologia semelhante, no entanto, há diferenças consideráveis em suas patobiologias que resultam em grandes variações em seus níveis de prevalência no rebanho e nos animais (Keefe, 2012).

A persistência das infecções intramamárias causadas por *S. aureus* deve-se a sua habilidade intrínseca de se adaptar ao hospedeiro, contribuindo para um quadro persistente da doença (Bayles *et al.*, 1998; Melchior *et al.*, 2006; Buzzola *et al.*, 2007). Muitos estudos descrevem manifestações de mastite persistente causada por *S. aureus* e predominância de uma estirpe no rebanho (Myllys *et al.*, 1997; Haveri *et al.*, 2008; Schukken *et al.*, 2011). Já a mastite causada por *S. agalactiae* pode se manifestar nas formas clínica ou subclínica. Sua progressão é lenta e pode levar à fibrose e atrofia do

quarto afetado resultando em uma doença crônica, latente que diminui a produção e aumenta a contagem de células somáticas (CCS) do leite (Awale *et al.*, 2012). Uma vez que o animal é infectado, o micro-organismo persiste nas cisternas do teto e da glândula mamária, com ondas periódicas de multiplicação, aumento de virulência e invasão tecidual (Marques *et al.*, 2006; Perez Neto & Zappa, 2011).

Enquanto infecções causadas por *S. aureus* são geralmente refratárias a tratamentos com antibióticos (Witte *et al.*, 2008; Coelho *et al.*, 2009; Jamali *et al.*, 2014), as causadas por *S. agalactiae* podem ser tratadas com sucesso por antibióticos durante a lactação (Awale *et al.*, 2012). Cerca de 80 a 90% das vacas infectadas com *S. agalactiae* são, na maioria das vezes, curadas por tratamento intramamário com drogas do tipo penicilina (Ruegg, 2003). Para erradicação do patógeno, no entanto, os quartos mamários de todos os animais positivos para *S. agalactiae* devem ser tratados com um antibiótico intramamário comercializado apropriado (Erskine, 2000).

Alta prevalência de *S. aureus* e *S. agalactiae* já foi relatada nos rebanhos mineiros (Brito *et al.*, 1999). Chagas *et al.* (2012) encontraram apenas 7,2% de *S. agalactiae* em um rebanho de Indianópolis-MG, mas uma alta infecção com *S. aureus* (45,2%). Em Pernambuco, há registros da presença de *S. aureus*, embora quase o dobro dos estafilococos tenha sido identificada como *Staphylococcus* coagulase negativo (Mota *et al.*, 2012). Estudos dessa natureza têm reflexo no tratamento da doença e nas estratégias de manejo adotadas para prevenir o surgimento de novos casos da doença.

S. aureus e *S. agalactiae* secretam toxinas importantes para o estabelecimento da infecção. As estirpes estafilocócicas bovinas são reconhecidas por produzirem diferentes tipos de hemolisinas, sendo as formas β e α mais importantes para virulência de *S. aureus* (Sutra e Poutrel, 1994; Camussone e Calvinho, 2013). Aarestrup *et al.*, (1999) avaliaram isolados de *S. aureus* humanos e bovinos e verificaram uma frequência maior de β -hemolisina em isolados bovinos em comparação com isolados humanos, com 96% dos isolados bovinos carregando o gene da β -hemolisina (*hly*) e 72% expressando o fenótipo de β -hemólise. Ikawaty *et al.*, (2010) reportam a presença de *hly* em 100% dos isolados de *S. aureus* de origem bovina, enquanto Coelho *et al.*, (2011) verificaram a presença dos genes *hly* em 24% e *hly* em 16% dos isolados de *S. aureus* obtidos a partir de amostras de leite de vacas com mastite subclínica no Brasil. Ao contrário de *S. aureus*, *S. agalactiae* tem hemólise variada. Ebrahimi *et al.* (2013) encontraram que 51,6% dos *S. agalactiae* bovinos produziram α -hemolisina e não registraram isolados produtores de β -hemolisina,

Sabe-se que muitas espécies de *Streptococcus* possuem habilidade de formar biofilme, no entanto, sua relação com o estado patogênico dessas bactérias tem sido mais claramente estabelecida em infecções humanas, mais especificamente, infecções orais (Cvitkovich *et al.*, 2003). A formação de biofilme é uma importante estratégia de sobrevivência adotada por bactérias, pois garante proteção contra o sistema imune do hospedeiro e uma maior resistência a agentes antimicrobianos (Götz, 2002; Ebrahimi *et al.*, 2013; Speziale & Geoghegan, 2015). Olson *et al.* (2002) avaliando diversas cepas de bactérias de origem veterinária, observou que *S. agalactiae* isolados de mastite crônica, apesar de sensíveis a antimicrobianos, mostraram-se resistentes quando crescidos em biofilme, resultado semelhante ao descrito por Melchior *et al.*, (2006). Acredita-se que o ambiente encontrado no interior da glândula mamária estimule a formação de biofilme pelas bactérias, e isto é reforçado por estudos que mostram que o leite desnatado e a lactose estimulam a formação de biofilmes por estirpes de *S. aureus* bovina (Xue *et al.*, 2014; Fabres-Klein *et al.*, 2015). Entretanto, até o momento não se comprovou a real contribuição do biofilme na patogênese das bactérias de origem bovina.

Este trabalho acompanhou por seis meses animais com mastite subclínica persistente e não persistente pertencentes a um rebanho da Zona da Mata de Minas Gerais. Determinou-se a prevalência e a distribuição de *S. aureus* e *S. agalactiae*, o potencial hemolítico e de formação de biofilme dos isolados. A genotipagem pela análise em multilocus de repetições em tandem de número variável (MLVA) não revelou diferença entre os isolados de *S. aureus*, embora seis genótipos de *S. agalactiae* tenham sido encontrados no rebanho, dos quais três foram mais associados a infecções persistentes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta de Amostras de Leite Mastítico

As amostras de leite foram coletadas por veterinários do Programa Desenvolvimento da Pecuária Leiteira (PDPL), Viçosa – MG, durante o período de maio a outubro de 2013, em um rebanho com vacas holandesas em lactação, no município de Cajuri, região Sudeste de Minas Gerais. O teste CMT realizado para diagnosticar animais com mastite subclínica, considerando os procedimentos indicados por Quinn *et al.* (1994). Durante o período de estudo, foram acompanhado 36 animais com manifestação subclínica da mastite bovina. Amostras compostas, provenientes dos quatro quartos mamários foram obtidas mensalmente das vacas com resultado positivo para o CMT. Essas amostras foram coletadas após higienização e descarte dos primeiros jatos de leite. A coleta foi realizada cuidadosamente para evitar a contaminação por fezes e sujeira. As amostras de cada mês foram transportadas em banho de gelo para o Laboratório de Biotecnologia Molecular, LBM, da Universidade Federal de Viçosa Universidade, para análise microbiológica.

2.2. Isolamento e Identificação dos Micro-organismos

O isolamento das estirpes de *S. aureus* e *S. agalactiae* foi realizado seguindo metodologia proposta por Brito *et al.* (1999), com modificações. Uma alíquota de 10 µL da amostra de leite foi semeada com alça de repicagem descartável em placas contendo ágar TSA (Tryptic Soy Agar, HiMedia, Mumbai, India), enriquecido com 5% de sangue de carneiro desfibrinado. As placas foram mantidas a 37°C e os registros foram feitos após 24 e 48 h de incubação. As amostras foram consideradas culturas positivas quando detectado o crescimento de ≥ 2 colônias morfolologicamente idênticas por placa, sendo que as amostras com predominância de três ou mais colônias morfolologicamente distintas foram consideradas contaminadas. As colônias crescidas em ágar-sangue foram analisadas considerando morfologia, tamanho, pigmentação e presença de hemólise. Colônias isoladas com suspeitas de serem *S. aureus* ou *S. agalactiae* foram transferidas para placas contendo ágar BHI (Brain Heart Infusion, BHI HiMedia, Mumbai, India) e incubadas a 37°C por 24 h. Após a incubação, as bactérias foram identificadas de acordo com a coloração diferencial de Gram e teste da catalase. A identificação das colônias de *S. aureus* foi confirmada pelo teste de coagulase tubo, produção da acetoina e amplificação do gene *nuc* (Sasaki *et al.*, 2010). A reação de amplificação foi preparada com primer *nuc* (tabela 1), acrescido de 30 ng do DNA molde, 2 µL de

tampão de amplificação 10X, 3,0 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 1U de Taq DNA polimerase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), totalizando um volume final de 20 µl. As condições de amplificação consistiam de uma etapa de pré-desnaturação a 95°C por 5 min foi seguida por 30 ciclos de 30 seg a 95°C, 45 seg a 48,8°C e 45 seg a 72°C, com uma extensão final a 72°C por 5 min. Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1 % contendo 0,1 µg.mL⁻¹ de brometo de etídeo. *S. agalactiae* foi identificado com base na produção de hemólise do tipo beta, fator CAMP e hidrólise de hipurato de sódio; ausência de hidrólise de esculina e de crescimento em presença de bile-esculina (dos Santos *et al.*, 2007). Depois de identificados, os isolados foram mantidos em estoques de glicerol 25% a -80°C.

3.3. Caracterização Genotípica

A extração do DNA total das estirpes de *S. aureus* e *S. agalactiae* foi realizada conforme descrito por Pospiech & Neumann (1995). A técnica de PCR foi empregada para avaliar a diversidade genética dos isolados de *S. aureus* e *S. agalactiae* por MLVA, conforme descrito por Klein *et al.* (2012) e Haguenoer *et al.* (2011), respectivamente. Os primers que codificam os fatores de virulência *sspA*, *spA*, *clfA*, *clfB*, *fnBP*, *cna* e *sdrCDE* foram utilizados nas reações de amplificação com *S. aureus* (Tabela 1).

Tabela 1. Primers usados na caracterização de *Staphylococcus aureus*.

Locus	Tamanho do amplicon (pb)	Sequência do primer (5' - 3')	Referência
<i>nuc</i>	359	F-TCGCTTGCTATGATTGTGG R-GCCAATGTTCTACCATAGC	Sasaki <i>et al.</i> , 2010
<i>sspA</i>	132	F-ATCMATTTYGCM AAYGATGACCA R-TTGTCTGAATTATTGTTATCGCC	Sabat <i>et al.</i> (2003)
<i>spA</i>	290	F-AGCACCAAAAAGAGGAAGACAA R-GTTTAACGACATGTACTCCGT	Sabat <i>et al.</i> (2003)
<i>clfA</i>	945	F-GATTCTGACCCAGGTTCCAGA R-CTGTATCTGGTAATGGTCTTT	Sabat <i>et al.</i> (2003)
<i>lfB</i>	880	F-ATGGTGATT CAGCAGTAAATCC R-CATTATTTGGTGGTGA ACTCTT	Sabat <i>et al.</i> (2003)
<i>fnBP</i>	1045	F-GGTCAAGCRCAAGGACCART R-AATAATCCGCCGAACAACAT	Francois <i>et al.</i> (2005)
<i>cna</i>	1888	F-AAAATGACAAAAATGGCAAG R-CAGGTTTAGTTGGTGGTGT	Francois <i>et al.</i> (2005)
<i>sdrCDE</i>	648/580/622	F-GTAAACAATTACGATCATGATG R-TACCTGTTTCTGGTAATGCTTT	Sabat <i>et al.</i> (2003)

Os oligonucleotídeos iniciadores foram utilizados num mix com 20 ng/mL de DNA molde, 1X tampão de amplificação, 3,0 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, e 1U de JumpStart™ Taq DNA polimerase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). As condições adotadas para a amplificação dos fragmentos de DNA foram as mesmas descritas por Klein *et al.* (2012). Os produtos da reação de PCR Multiplex foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% e visualizados sob luz UV após coloração com brometo de etídio. As estirpes *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e foi usada como referência.

As sequências dos primers e as temperaturas de anelamento utilizados nas reações de amplificação com os isolados de *S. agalactiae* estão descritos na tabela 2. Reações de PCR individuais foram realizadas num volume final de 25 uL contendo 10 ng de DNA, 1X tampão de reação, 2 mM MgCl₂ e 1,25 unidades de de Taq DNA polimerase (Kapa Biosystems, MA, EUA), 200 uM de cada dNTP e 0,5 pM de cada iniciador (Tabela 1). A amplificação foi realizada em termocicladoras seguintes condições: desnaturação inicial de 5 min a 94 °C, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C durante 30 segundos, anelamento durante 30 segundos à temperatura específica para cada par de iniciador (Tabela 2) e extensão a 72 °C durante 60 s, mais um passo final de alongamento por 7 min a 72 °C. A comparação entre os perfis de bandas resultantes foi feito por eletroforese em gel de agarose 2% contendo brometo de etídio (1 µg/mL), usando como marcador de peso molecular o 100pb DNA ladder (New England BioLabs, MA, EUA).

Tabela 2. Primers usados a caracterização de *Streptococcus agalactiae*.

Locus	Sequência do primer (5'-3')	T anelamento (°C)	Referência
SAG2	F- TCTTCCAAGTGGTGCAACG R- CAACGTTTGGAGTTGCTTCA	55	Haguenoer <i>et al.</i> (2011)
SAG3	F- CAAAAACGTGCTGCCTATGA R- CATCCCTCCTCCACCAAAA	55	Haguenoer <i>et al.</i> (2011)
SAG4	F- GGTCAGTTTTTATTTATCGTAAGC R- AGTCTTGCGAAGGCAGACAC	67	Haguenoer <i>et al.</i> (2011)
SAG21	F- TGAAAGAAGTGGATTTTTCCCTA R- AAATAGGTTTTAGAACTTGGAAATCA	62	Haguenoer <i>et al.</i> (2011)
SAG22	F- TGTAACACTAGCTCCAATTTGTTTT R- TCGGTCTTGTCTCAGCAATG	68	Haguenoer <i>et al.</i> (2011)

3.4. Produção de Biofilme

As estirpes bacterianas foram caracterizadas de acordo com a formação de biofilme, conforme descrito por Klein *et al*, (2015). Resumidamente, uma suspensão de células ajustada para 0,5 na escala McFarland foi preparada e 100 µL foram adicionados em poços de uma microplaca de 96 poços contendo 100 µL de BHI. Após 22 h, o meio foi descartado e os poços foram lavados suavemente três vezes com 200 µL de solução tampão fosfato estéril (PBS), pH 7,4, seguido por coloração com 200 µL de cristal violeta 0,1% durante 30 minutos. Após três lavagens seguidas com 200 µL de água destilada estéril, 200 µL de etanol 95% foram adicionados e a densidade óptica foi checada a 560 nm. Cada uma das amostras foi testada em triplicata e o ensaio foi repetido três vezes. Como controle positivo nos ensaios de biofilme, foram utilizadas as estirpes *S. epidermidis* NRS101 (ATCC 35983) e *S. aureus* NRS155 (RN 9120), ambas forte produtoras de biofilme.

3.5. Atividade Hemolítica

A atividade hemolítica das bactérias foi avaliada conforme protocolo descrito por Qiu e colaboradores (2010), com algumas modificações. As estirpes bacterianas foram cultivadas em BHI a 37 °C por 14 h, sob agitação. Alíquotas de 1 mL foram centrifugadas (5.500g, 4°C, 1 min) e 100 µL dos sobrenadantes foram adicionados à microplaca de poliestireno de 96 poços. Em cada poço foram adicionados 50 µL de hemácias de coelho a 4%, diluídas em solução salina (NaCl 0,85%). A microplaca foi incubada a 37°C por 30 min e depois centrifugada (3.500 g, 1 min). Em uma nova placa, foram adicionados, em duplicata, 100 µL do sobrenadante seguido por leitura da densidade optica (DO_{543nm}) em leitor de microplaca (Molecular Devices VersaMax, Sunnyvale, EUA). Alíquota de 100 µL de BHI foi empregado como o branco. Água destilada e meio BHI estéril foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente. A estirpe-referência *S. aureus* ATCC 29213 foi utilizada como parâmetros comparativos. Cada isolado foi testado em triplicata e o ensaio foi repetido três vezes.

3. RESULTADOS

3.1. Prevalência de *S. aureus* e *S. agalactiae* em amostras de leite mastítico subclínico

Um total de 70 amostras foi positiva para *S. aureus* e 60 para *S. agalactiae*. Verificou-se uma alta prevalência de *S. aureus* ao longo do período da coleta, enquanto que a prevalência de *S. agalactiae* dobrou a partir do mês 3 (Fig.1). Em 17,14% do leite amostrado observou-se infecção simultânea pelos patógenos investigados. A maior taxa de infecção mista foi observada no mês 4 (27,58 % em relação a coleta mensal e 4,57% do total de amostras analisadas). Em 63 (36%) amostras CMT positivas foi observado o crescimento de bactérias de outros grupos (cocos Gram-positivos, bacilos Gram-positivos, levedura, *Enterococcus*, *Staphylococcus* Coagulase Negativo (SCN), *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus equinos*) que não foram consideradas neste trabalho. Das amostras analisadas, 4,57% foram consideradas contaminadas.

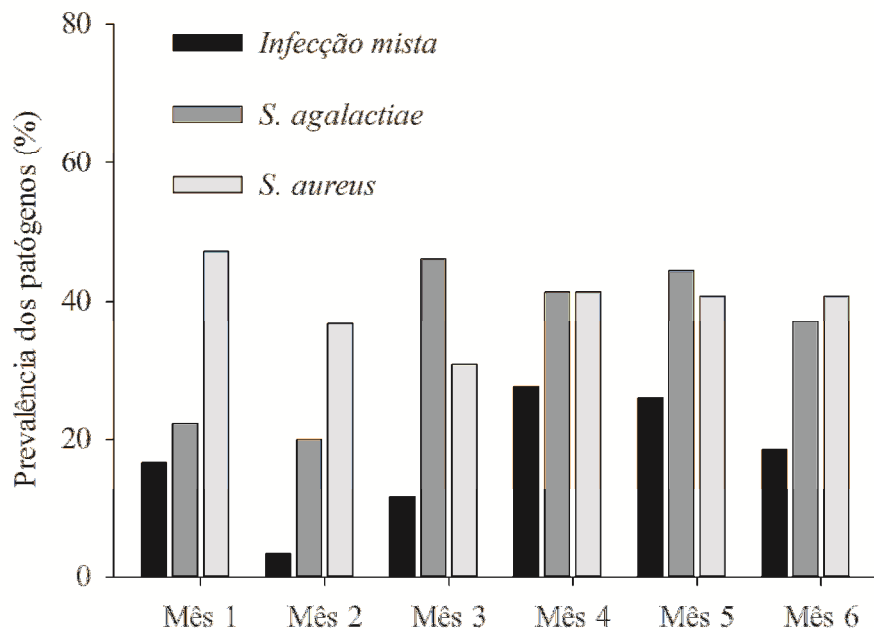


Figura 1. Prevalência e distribuição de patógenos contagiosos durante os meses de maio a outubro de 2013 isolados de amostras de leite de animais com mastite subclínica.

Dentre os animais com mastite persistente, sete (302, 308, 340, 369, 415, 443 e 469) apresentaram infecção causada por *S. aureus* por três ou mais episódios seguidos (Tabela 1). Durante seis meses consecutivos, o animal 302 foi diagnosticado com mastite subclínica causada por esse patógeno. De forma similar, infecção persistente

devido à *S. agalactiae* foi diagnosticada em nove animais (182, 220, 340, 357, 369, 406, 443, 469 e 485). Os animais 369 e 469 apresentaram o maior número de infecções recorrentes causadas pelos dois patógenos ao longo do período da coleta. Infecção mista foi verificada nos animais 182, 220, 302, 308, 340, 357, 369, 415, 417, 443, 469, 472 e 485. As infecções persistentes causadas pelos dois patógenos foram observadas em animais com três ou mais parições, com exceção do animal 485, que teve apenas uma parição.

3.2. Diversidade genética dos patógenos

Todos os isolados de *S. aureus* apresentaram o mesmo perfil de bandas MLVA (Fig. 2a). Uma maior diversidade genética foi vista em *S. agalactiae*, onde foram definidos seis perfis de bandas. Dos 60 isolados, 27 possuíam o perfil 1 (SagT1), 12 o perfil 2 (SagT2), 1 o perfil 3 (SagT3), 16 o perfil 4 (SagT4), 1 o perfil 5 (SagT5) e 3 o perfil 6 (SagT6) (Fig. 2b). Análise de agrupamento mostrou que SagT5 e SagT6 apresentaram uma similaridade de 93% enquanto SagT1 foi a estirpe que se mostrou mais distante, com 75% de similaridade com o grupo formado pelas demais. Foi possível definir uma associação entre a ordem de parto e os genótipos SagT1, SagT2 e SagT4, os mais isolados no estudo. SagT2 foi isolado de animais que tiveram 1 parição ($p < 0,05$), enquanto que SagT1 foi mais associado a 2 partos ($p < 0,05$). Como uma associação mais fraca, tem-se o SagT4 associado a animais que tiveram 3 ou mais partos.

3.3. Dinâmica das infecções causadas por *S. agalactiae*

Com base na recorrência da infecção, os animais foram classificados, a partir do segundo mês, em sadio, nova infecção, cura da infecção e infecção crônica (Tabela 4).

Uma associação altamente significativa ($p < 0,001$) foi encontrada entre o genótipo de *S. agalactiae* e a dinâmica das infecções subclínicas, onde SagT1 e SagT4 associaram-se a novas infecções, enquanto SagT2 esteve mais associado a infecções crônicas. SagT3 e SagT5 não causaram infecção crônica. SagT6 relacionou-se em apenas uma situação cuja infecção foi crônica. Acredita-se, portanto, que os tipos T3, T5 e T6 causem infecções flutuantes enquanto os tipos T1, T2 e T4 sejam responsáveis pela cronicidade de infecções (Tabela 5). As análises realizadas não identificaram associação entre as variáveis analisadas e *S. aureus* nem com infecções mistas por *S. aureus* e *S. agalactiae* ou com os outros patógenos ambientais.

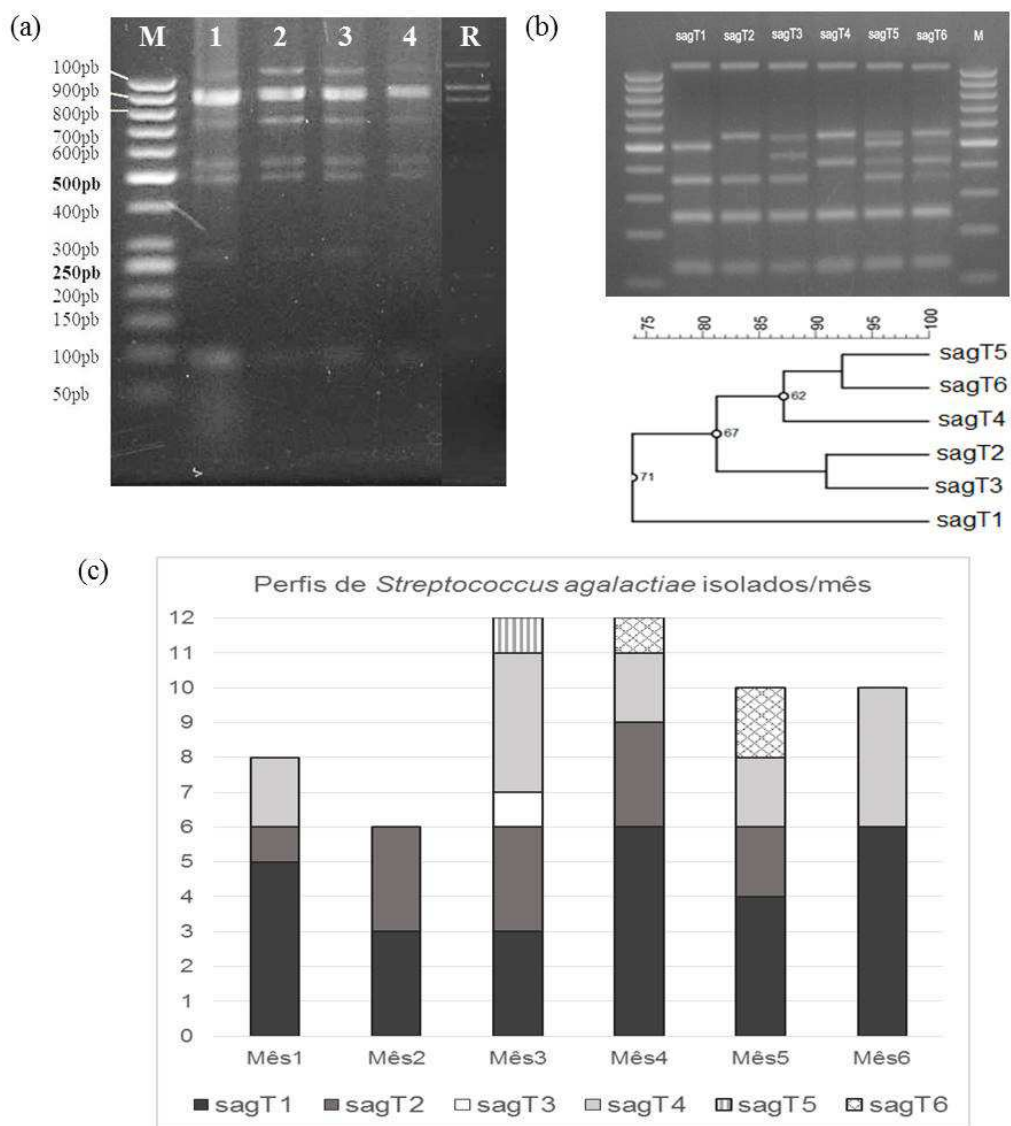


Figura 2. Genotipagem de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* isolados de amostras de leite mastítico subclínico pela técnica de MLVA. (a) Perfil de bandas obtidas para alguns isolados de *S. aureus* e *S. aureus* ATCC 29213 (R), Marcador 1000 pb (M). (b) Dendrograma UPGMA (DICE) dos seis genótipos de *S. agalactiae* encontrados no rebanho. (c) Distribuição dos genótipos de *S. agalactiae* ao longo dos meses.

Tabela 3. Isolamento e identificação dos patógenos isolados de amostras de leite de animais com mastite subclínica.

Grupo de patógeno	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6
Bacilos Gram - positivos	-	-	3 (10%)	-	1 (4.1%)	-
Cocos Gram - positivos	-	-	3 (10%)	2 (6.9%)	-	-
Levedura	-	-	1 (3.3%)	-	-	-
SCN	1 (3.3%)	1 (5.5%)	-	-	-	-
SCP - <i>Staphylococcus aureus</i>	17 (56.6%)	11 (61.1%)	8 (26.6%)	12 (41.3%)	11 (45.8%)	11 (47.8%)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	8 (26.6%)	6 (33.3%)	12 (40%)	12 (41,3%)	12 (50%)	10 (43.4%)
<i>Streptococcus / Enterococcus</i> spp.	4 (13.3%)	-	3 (10%)	3 (10.3%)	-	3 (13%)
Número total de isolados	30	18	30	29	24	23

SCN – *Staphylococcus* coagulase negativo; SCP – *Staphylococcus* coagulase positivo

Tabela 4. Dinâmica das infecções subclínicas causadas por *Streptococcus agalactiae* durante o período de estudo (% vacas/mês).

Mês	Sadia	Nova	Cura	Persistente
2	69,4	8,3	13,9	8,3
3	61,1	22,2	5,6	11,1
4	58,3	8,3	8,3	25,0
5	52,8	13,9	13,9	19,4
6	55,6	11,1	16,7	16,7

Tabela 5. Distribuição de frequência (n) do tipo de *Streptococcus agalactiae* e a dinâmica da infecção.

Genótipo	Nova	Cura	Persistente
SagT1	13	9	10
SagT2	4	4	7
SagT3	1	0	0
SagT4	9	6	5
SagT5	1	0	0
SagT6	2	1	1
Total	30	20	23

4.4. Caracterização fenotípica dos isolados bacterianos

Os isolados estudados produziam biofilme *in vitro*, com exceção apenas do isolado *S. agalactiae* 322. A produção foi classificada como forte, moderada ou fraca, de acordo com os critérios estabelecidos por Stepanović *et al.*, (2007). Um total de 64 (92%) das estirpes de *S. aureus* foi classificado como fortes produtoras de biofilme, enquanto somente 6 (8%) apresentaram produção moderada (Fig. 3a). Os isolados de *S. aureus* classificados como produtores moderados de biofilme foram recuperados de 1 animal com 5 episódios consecutivos de mastite subclínica, 4 com 3 episódios consecutivos e 1 com 2 episódios consecutivos da doença dos animais. Dentre os 60 isolados de *S. agalactiae*, 55 (93%) foram classificadas como forte produtores de biofilme, representados por SagT1 (26), SagT2 (11), SagT3 (1), SagT4 (13), SagT5 (1) e SagT6 (3). Um (1) representante de SagT4 apresentou produção moderada, 3 foram fracos produtores (SagT1, SagT2 e SagT4) e finalmente, 1 isolado SagT4 foi considerado não produtor segundo a classificação adotada. Não pode ser estabelecida uma relação entre a produção de biofilme e o perfil dos isolados ou a persistência no rebanho.

O potencial hemolítico das bactérias foi investigado em sangue de carneiro desfibrinado. Apesar de não haver distinção genotípica entre os isolados de *S. aureus*

pelo método usado, uma grande variação na capacidade de hemólise foi observada (Fig. 3b). Dos 70 isolados, 16 (22,85%) apresentaram valores de hemólise \geq estirpe referência *S. aureus* ATCC 29213 ($A_{543nm} = 0,641$). Com exceção do isolado 364 (recuperado de um animal com dois episódios alternados de mastite subclínica), todos os outros 15 isolados de *S. aureus* foram obtidos de animais que manifestaram dois ou mais episódios consecutivos de mastite subclínica. Dez isolados (14,28%) tiveram hemólise menor ou igual ao controle negativo, sendo, portanto consideradas não hemolíticas. Esses isolados foram recuperados de amostras de animais com episódios alternados da doença (220/4, 357/6, 369/1, 441/2, 441/4, 441/6), com exceção dos isolados 182 (182/1 e 182/2) e 417 que foram isolados de 2 episódios consecutivos e o isolado persistente 340 que foi isolado de 3 episódios consecutivos de mastite subclínica. Outros 44 isolados de *S. aureus* (62, 85%) tiveram valores hemolíticos correspondentes ao intervalo compreendido entre os controles positivos e negativos. Nenhuma estirpe de *S. agalactiae* apresentou hemólise pelo teste.

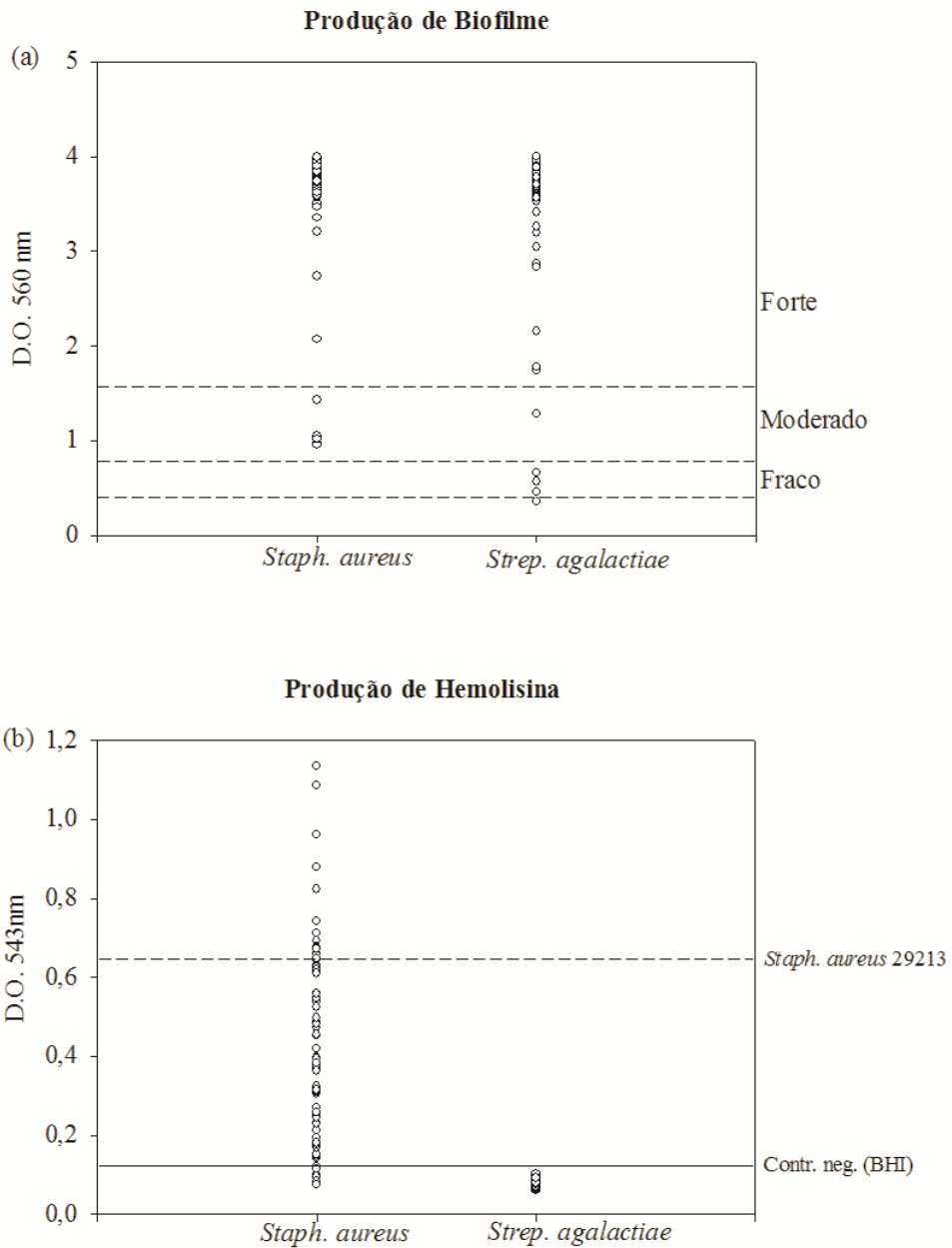


Figura 3. Caracterização fenotípica das estirpes de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* isoladas de vacas com mastite subclínica. Produção de biofilme (a) pelas estirpes de *S. aureus* e *S. agalactiae* isoladas de amostras de leite de animais com manifestações de mastite subclínica. (b) Atividade hemolítica das estirpes de *S. aureus* e *S. agalactiae*. A linha pontilhada indica o valor hemolítico de *S. aureus* ATCC 29213 e a linha contínua indica o valor hemolítico do controle negativo (BHI). Os resultados representam a média de três experimentos independentes.

4. DISCUSSÃO

Staphylococcus aureus e *Staphylococcus agalactiae* são dois patógenos mundialmente disseminados que causam mastite bovina. *S. agalactiae* é um patógeno intramamário obrigatório associado a infecções subclínicas, que quando evoluem para a clínica, têm sintomas mais brandos. Uma alta taxa de cura com antibióticos é conseguida, embora alguns casos possam tornar-se crônicos, o que leva ao descarte do animal. A cura por *S. aureus* é mais difícil e depende de uma combinação complexa de fatores como idade e imunidade do animal, coinfeção com outros patógenos e “background” genético do patógeno (Barkema *et al.*, 2006). Os reservatórios primários são o úbere e a pele, as manifestações podem variar de subclínica a gangrenosa, o que geralmente põe em risco a saúde do animal (Roberson *et al.*, 1994; Petersson-Wolfe *et al.*, 2010). A identificação e caracterização precisa dos patógenos responsáveis pela infecção auxiliam na decisão sobre a escolha e duração do tratamento a ser adotado e contribui para implementação de melhores estratégias de manejo e cura de infecções intramamárias bovinas (Sears e McCarthy, 2003; Barkema *et al.*, 2006).

Neste estudo analisou-se a prevalência, distribuição e infecção mista de *S. aureus* e *S. agalactiae* em amostras de leite obtidas de vacas com manifestação subclínica. *S. aureus*, presente em até 40% dos animais, foi mais prevalente que *S. agalactiae*. A elevada prevalência de mastite subclínica causada por estes patógenos contagiosos já foi reportada em trabalhos anteriores (Giannechini *et al.*, 2002; Mdegela *et al.*, 2009; Alemu *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2015). No Brasil, registros também mostram a alta prevalência de bactérias do gênero *Staphylococcus* e *Streptococcus* nos rebanhos dos estados Minas Gerais, Paraná, Piauí, Rio de Janeiro, São Paulo e Sergipe (Brito *et al.*, 1999; Ferreira *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2010; Langoni *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2011). Na América do Sul, a prevalência de *S. agalactiae* em rebanhos leiteiros é variada existindo registros de 60% no Brasil, 42% na Colômbia e 11% no Uruguai (Giannechini *et al.*, 2002; Duarte *et al.*, 2004; Keefe *et al.*, 2011; Keefe, 2012). Em um estudo conduzido em 48 propriedades leiteiras da Zona da Mata e Campo das Vertentes do Estado de Minas Gerais, *S. agalactiae* foi isolado em 60% delas (Brito *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2007), comprovando também a sua alta prevalência em rebanhos mineiros.

Alta prevalência de *S. aureus* e *S. agalactiae* em rebanhos está relacionada à falta de higiene durante a ordenha, bem como falhas no controle da mastite contagiosa (Alemu *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2015). Adicionalmente às questões associadas ao manejo dos animais, temos os fatores do hospedeiro (idade, número de parições, estado

nutricional, raça do animal e etc.) e fatores intrínsecos ao patógeno (produção de toxinas, capacidade de formar biofilme, habilidade de invadir e sobreviver no interior de células do hospedeiro, resistência à fagocitose) que dificultam a eliminação destas bactérias dos rebanhos (Cucarella *et al.*, 2001; Barkema *et al.*, 2006).

Uma série de estudos tem confirmado *S. aureus* como um dos patógenos envolvidos em casos de infecções por mais de um micro-organismo (Finelli *et al.*, 2008; Nair *et al.*, 2014). As interações entre *S. aureus* e os demais organismos coexistentes podem ser cooperativas como com *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Haemophilus influenzae* e o vírus da gripe, ou competitiva, como é o caso da interação com *Pseudomonas aeruginosa*, *Strep. pneumoniae*, *Lactobacillus* sp., e *Corynebacterium* sp.. Independentemente de as interações serem cooperativas ou competitivas, *S. aureus* dentro de uma comunidade se comporta de maneira diferente no que diz respeito ao seu crescimento em monocultura (Nair *et al.*, 2014). Não há muitos relatos de infecção mista de *S. aureus* e *S. agalactiae*, no entanto, Coelho *et al.* (2007) mostraram que *S. aureus* foi capaz de secretar bacteriocinas que inibiram o crescimento de *S. agalactiae* isolados de mastite. Apesar disso, não foi possível estabelecer relação entre o isolamento de ambos os patógenos e a dinâmica da infecção, sendo necessários mais estudos que permitam inferir se estes patógenos atuam de forma sinérgica, antagônica ou indiferente na mastite.

A caracterização molecular por MLVA mostrou que os isolados de *S. aureus* possuíam o mesmo genótipo verificado pelo perfil de bandas idêntico para genes avaliados. A elevada predominância (50/53) de um genótipo de *S. aureus* dentro de um mesmo rebanho já foi observada em outros trabalhos (Gao *et al.*, 2012). A semelhança entre esses estudos é que ambos usaram a mesma técnica para acessar a diversidade genética das estirpes em circulação, embora com um conjunto de *primers* diferentes. Porém, esta técnica revelou uma maior diversidade genética ao analisar estirpes isoladas de diferentes rebanhos de Minas Gerais (Klein *et al.*, 2012). Pela técnica de Tipagem de Sequência Multilocus (MLST-Multiple Locus Sequence Type), um mesmo genótipo foi determinado em um rebanho localizado no estado do Rio de Janeiro, embora quando os mesmos isolados foram analisados por Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE “Pulse Field Gel Electrophoresis”), diferentes pulsotipos foram encontrados (Rabello *et al.*, 2007). Há relatos de que única estirpe de *S. aureus* predomina no rebanho, sendo responsáveis pelas infecções persistentes e com maior possibilidade de transmissão, embora possam co-existir com outras estirpes (Haveri *et al.*, 2005; Barkema *et al.*, 2006; Schukken *et al.*, 2011). Porém, a técnica molecular adotada neste estudo pode não

ter sido suficientemente discriminatória, uma vez que foi possível observar diferenças nas características fenotípicas consideradas importantes para a patogenicidade, como produção de biofilme e atividade hemolítica entre as estirpes.

A tipagem de *S. agalactiae* revelou 6 genótipos com diferentes prevalências. Haguenoer *et al.*, (2011) também realizaram a tipagem por MLVA de uma coleção de 186 *S. agalactiae* não relacionados epidemiologicamente, dos quais 34 eram isolados de mastite. Uma grande heterogeneidade genética foi encontrada mostrando o potencial da técnica no estudo populacional desse patógeno. A presença de um grande número de isolados de *S. agalactiae* nos rebanhos brasileiros já havia sido mostrada previamente (Duarte *et al.*, 2004). Nesse estudo, os autores salientaram que quando um único rebanho é estudado, como no presente trabalho, observa-se a presença de isolados que partilham características comuns, como foi o caso de SagT1, T2 e T4, que apesar de geneticamente distintos, possuem características fenotípicas semelhantes.

A capacidade de produzir biofilme é considerada a base para infecções bacterianas crônicas, prejudicando a atuação do sistema imune do hospedeiro e a ação dos agentes antimicrobianos (Costerton *et al.*, 1999; Melchior *et al.*, 2006). Todos os isolados de *S. aureus* produziram biofilme, e a maioria deles (91,42%) foi caracterizada como fortes produtores de biofilme, conforme critérios previamente mencionados (Stepanović *et al.*, 2007). Vasudevan *et al.*, (2003) analisaram 35 isolados de *S. aureus* da mastite bovina e verificaram que 68,57% das estirpes foram capazes de produzir biofilme *in vitro*. Fox *et al.*, (2005) verificaram que as estirpes de *S. aureus* obtidas de vacas com infecção intramamária produziam mais biofilme que os isolados de origem extramamária (pele da teta e equipamento de ordenha), sugerindo que a produção de biofilme é um fator de risco para a infecção.

A grande maioria dos isolados de *S. agalactiae* foi forte produtora de biofilme *in vitro*, diferentemente de relatos anteriores que descreveram isolados como produtores moderados (Ebrahimi *et al.*, 2013). Existem poucos relatos sobre a formação de biofilme por estirpes de *S. agalactiae* apesar de Costerton *et al.* (1999) ter indicado o patógeno como um produtor potencial deste fator de virulência. Recentemente, Rosini e Margarit (2015) mostraram que, assim como outras bactérias Gram positivas, *S. agalactiae* é capaz de formar comunidades multicelulares que tidas como facilitadoras da persistência bacteriana.

Não foi possível observar atividade hemolítica a partir da análise dos sobrenadantes das culturas de *S. agalactiae*, apesar de se mostrarem hemolíticos em meio sólido. Existem fortes indícios de que a β -hemolisina, toxina característica deste

patógeno, seja uma proteína associada à superfície celular (Rosa-Freile *et al.*, 2014). Trabalhos anteriores mostraram a ausência de hemólise do tipo β em isolados bovinos (Duarte *et al.*, 2004; Ebrahimi *et al.*, 2013). Em *S. aureus*, a atividade hemolítica foi observada em 60 (85,71%) isolados, dos quais 16 apresentaram taxas de hemólise superiores à estirpe utilizada como referência. Acredita-se que essas hemolisinas acelerem a penetração bacteriana no úbere, convertendo o tecido do hospedeiro em nutrientes necessários para o desenvolvimento microbiano e propiciando o espalhamento para novos alvos (Ali-Vehmas *et al.*, 2001). Possivelmente a ação destas hemolisinas, combinada a outros fatores pode estar contribuindo para a elevada prevalência de *S. aureus* no rebanho. Alguns trabalhos associam a produção das formas α e β hemolisinas com infecções severas da glândula mamária (Jonsson *et al.*, 1985; Bramley *et al.*, 1989; Camussone e Calvinho, 2013). Contudo, nossos achados mostraram que os isolados de *S. aureus* recuperados de três ou mais episódios consecutivos da doença apresentavam atividade hemolítica, com exceção apenas estirpe (340) que foi classificada como não hemolítica. Esse resultado corrobora com outros estudos que relatam maior produção de hemolisina para a estirpe responsável pela manifestação persistente da doença (Peton *et al.*, 2014).

Em resumo, este trabalho isolou estirpes de *S. aureus* e *S. agalactiae* associadas à mastite bovina persistente e não-persistente. Registrou-se a infecção mista por ambos os patógenos em alguns animais. A alta prevalência encontrada no rebanho revela falhas na adoção de medidas para a prevenção da doença. Um mesmo genótipo de *S. aureus* foi encontrado, enquanto seis diferentes genótipos de *S. agalactiae* foram registrados, sendo que SagT2 foi mais associados a infecções persistentes.

5. REFERÊNCIAS

- Aarestrup, F.M., Larsen, H.D., Eriksen, N.H., Elsberg, C.S. & Jensen, N.E. (1999). Frequency of a- and b-haemolysin in *Staphylococcus aureus* of bovine and human origin. A comparison between pheno- and genotype and variation in phenotypic expression. *APMIS*, **107**: 425-30.
- Alemu, G., Almaw, G. & Abera, M. (2014). Incidence rate of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* in subclinical mastitis at smallholder dairy cattle farms in Hawassa, Ethiopia. *Afr J Microbiol Res*, **8**: 252-256.
- Ali-Vehmas, T., Vikerpuur, M., Pyörälä, S., & Atroshi, F. (2001). Characterization of hemolytic activity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitic milk. *Microbiol Res*, **155**: 339-344.
- Awale, M.M., Dudhatra, G.B., Kumar, A., Chauhan, B.N. & Kamani, D.R. (2012). Bovine mastitis: a threat to economy. **1**:295. doi:10.4172/scientificreports.295
- 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*. *J Dairy Sci*, **89**:1877-1895.
- Bayles, K. W., Wesson, C. A., Liou, L. E., Fox, L. K., Bohach, G. A. & Trumble, W. R. (1998). Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect Immun*, **66**: 336-342.
- Behiry, A., Schlenker, G., Szabo, I. & Roesler, U. (2012). In vitro susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with subclinical mastitis to different antimicrobial agents. *J Vet Sci*, **13**: 153-161.
- Bhatt, V.D., Patel, M.S., Joshi, C.G. & Kunjadia, A. (2011). Identification and antibiogram of microbes associated with bovine mastitis. *Anim Biotechnol*, **22**: 163-169.
- Bramley, A.J., Patel, A.H., O'Reilly, M., Foster, R. & Foster, T.J. (1989). Roles of alpha-toxin and beta-toxin in virulence of *Staphylococcus aureus* for the mouse mammary gland. *Infect Immun*, **57**: 2489-2494.
- 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**: 129-135.
- Buzzola, F. R., Alvarez, L. P., Tuchscher, L. P., Barbagelata, M. S., Lattar, S. M., Calvinho, L. & Sordelli, D. O. (2007). Differential abilities of capsulated and

- noncapsulated *Staphylococcus aureus* isolates from diverse agr groups to invade mammary epithelial cells. *Infect Immun*, **75**, 886-891.
- Camussone, C.M. & Calvinho, L.F. (2013). Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* asociados com infecciones mamarias en bovinos: relevancia y rol como agentes inmunógenos. *Rev Argent Microbiol*, **45**: 119-130.
- Chagas, L.G.S., Melo, P. C., Barbosa, N.G., Guimarães, E.C. & Brito, D. V. D. (2012). Ocorrência de mastite bovina causada por *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp. e *Candida* sp. em uma propriedade rural no município de Indianópolis – Minas Gerais, Brasil. *Biosci J*, **28**: 1007-1014.
- Coelho M. L. V., Nascimento, J. S., Fagundes, P. C., Madureira, D. J., Oliveira, S. S., Brito, M. A. V. P. & Bastos, M. C. F. (2007). Activity of staphylococcal bacteriocins against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* involved in bovine mastitis. *Res Microbiol*, **158**: 625-630.
- Coelho, S.M.O., Pereira, I.A., Soares, L.C., Pribul, B.R. & Souza ,M.M.S. (2011). Short communication: Profile of virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *J. Dairy Sci*, **94**: 3305-3310.
- Coelho, S.M.O., Reinoso, E., Pereira, I.A., Soares, L.C., Demo, M., Bogni, C. & Souza, M.M.S. (2009). Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Rio de Janeiro. *Pesqui Vet Bras*, **29**: 369-374.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, **284**: 1318-1322.
- Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I. & Penadés, J.R. (2001). Bap a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol*, **183**: 2888-2896.
- Cvitkovitch, D.G., Li, Y.-H., & Ellen, R.P. (2003). Quorum sensing and biofilm formation in streptococcal infections. *J Clin Invest*, **112**: 1626-1632.
- Dias, R.V.C. (2007). Principais métodos de diagnóstico e controle da mastite bovina. *Acta Vet Brasilica*, **1**: 23-27.
- Duarte, R.S., Miranda, O., Bellei, B.C., Brito, M.A.P.V. & Teixeira, L. (2004). Phenotypic and molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* isolates recovered from milk of dairy cows in Brazil. *J Clin Microb*, **42**: 4214-4222.

- Ebrahimi, A., Moatamedi, A., Lotfalian, S. & Mirshokraei, P. (2013). Biofilm formation, hemolysin production and antimicrobial susceptibilities of *Streptococcus agalactiae* isolated from the mastitis milk of dairy cows in Shahrekord district, Iran. *Vet Res Forum*, **4**: 269-72.
- Erskine, R. J. (2000). Antimicrobial drug use in bovine mastitis. Pages 712-734 in *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 3rd ed. J. F. Prescott, J. D. Baggot, and R. D. Walker, ed. Blackwell Publishing, Ames IA.
- Fabres-Klein, M.H., Santos, M.J.C., Klein, R.C., Nunes de Souza, G. & Ribon, A.O.B. (2015). An association between milk and slime increases biofilm production by bovine *Staphylococcus aureus*. *BMC Vet Res*, **11**: 3.
- Ferreira, J.L., Lins, J.L.F.H.A., Cavalcante, T.V., Macedo, N.A. & Borjas, A.L.R. (2007). Prevalência e etiologia da mastite bovina no município de Teresina, Piauí. *Cienc Anim Bras*, **8**: 261-266.
- Finelli, L., Fiore, A., Dhara, R., Brammer, L., Shay, D.K, Kamimoto, L., Fry, A., Hageman, J., Gorwitz, R., Bresee, J. & Uyeki, T. (2008). Influenza-associated pediatric mortality in the United States: increase of *Staphylococcus aureus* coinfection. *Pediatrics*, **122**: 805-811.
- Fox, L.K., Zadoks, R.N. & Gaskins, C.T. (2005). Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. *Vet Microbiol*, **107**: 295-299.
- Gao J., Ferreri M., Yu F., Liu X., Chen L., Su J. & Han B. (2012). Molecular types and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in a single herd in China. *Vet J*, **192**: 550-552.
- Giannechini, R., Concha, C., Rivero, R., Delucci, I. & Moreno López, J. (2002). Occurrence of clinical and sub-clinical mastitis in dairy herds in the West Littoral Region in Uruguay. *Acta Vet Scand*, **43**: 221-230.
- Götz, F.(2002). *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol*, **43**: 1367-1378.
- Haguenoer, E., Baty, G., Pourcel, C., Lartigue, M., Domelier, A., Rosenau, A., Quentin, L., Mereguetti & L, Lanotte, P. (2011). A multi locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) scheme for *Streptococcus agalactiae* genotyping. *BMC Microbiol*. **11**: 171.
- 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**: 3728-3735.

- Haveri, M., Taponen, S., Vuopio-Varkila, J., Salmenlinna, S. & Pyörälä, S. (2005). Bacterial genotype affects the manifestation & persistence of bovine *Staphylococcus aureus* intramammary infection. *J Clin Microbiol*, **43**: 959-961.
- Huijps, K., Theo, Lam, J.G.M.T. & Hogeveen, H. (2008) Costs of mastitis: facts and perception. *J Dairy Res*, **75**: 113-120.
- Ikawaty, R., Brouwer, E. C., van Duijkeren, E. , Mevius, D. , Verhoef, J. & Fluit, A. C. (2010). Virulence factors of genotyped bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates in the Netherlands. *Int J Dairy Sci* , **5**: 60-70.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. (2014). Produção da Pecuária Municipal, volume 42. Disponível no site: http://www.ibge.gov.br/biblioteca/visualizacao/periodicos/84/ppm_2014_v42_br.pdf. Acessado em 16 de novembro de 2015.
- Jamali, H.; Radmehr, B. & Ismail, S. (2014). Short communication: prevalence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. *J Dairy Sci*, **97**: 2226-30.
- Jonsson, P., Lindberg, M., Haraldsson, I., & Wadstrom, T. (1985). Virulence of *Staphylococcus aureus* in a mouse mastitis model: studies of alpha hemolysin, coagulase, and protein A as possible virulence determinants with protoplast fusion and gene cloning. *Infect Immun* **49**: 765-769.
- Keefe, G. (2012). Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. *Vet Clin Food Anim*, **28**: 203-216.
- Keefe, G., Chaffer, M. & Ceballos, A. (2011) Effects of *Streptococcus agalactiae* on the Colombian dairy industry. Third International Symposium on Mastitis and Milk Quality, St. Louis (MO). National Mastitis Council Inc, Verona (WI), American Association of Bovine Practitioners, Auburn (AL). **3**: 155.
- Klein, R.C., Fabres-Klein, M.H., Oliveira, L.L., Feio, R.N., Malouin, F., & Ribon, A.O.B. (2015). A C-Type Lectin from *Bothrops jararacussu* venom disrupts staphylococcal biofilms. *PLoS ONE*, doi: 10.1371.
- Klein, R.C., Klein, M.H.F., 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**: 183-188.
- Langoni, H., Penachio, D.S., Citadella, J.C.C., Laurino, F., Faccioli-Martins, P.Y., Lucheis, S.B., Menozzi, B.D. & Silva A.V. (2011). Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. *Pesq Vet Bras*, **31**: 1059-1065.

- Marques. (2006). Criação de bovinos. *Cons Vet e Publ*, **6**: 435-450.
- Mdegela, R. H., Ryoba, R., Karimuribo, E. D., Phiri, E. J., Løken, T., Reksen, O., Mtengeti, E. & Urio, N. A. (2009). Prevalence of clinical and subclinical mastitis and quality of milk in smallholder dairy farms in Tanzania. *J S Afr Vet Assoc*, **80**: 163-168.
- Melchior, M.B., Vaarkamp, H. & Fink-Gremmels, J., (2006). Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? *Vet J*, **171**: 398-407.
- Mota, R.A., Medeiros, E.S., Santos, M. V., Júnior, J. W. P., Moura, A. P. B. L., Coutinho, L.C.A. (2012). Participação dos *Staphylococcus* spp na etiologia das mastites em bovinos leiteiros no estado de Pernambuco (Brasil). *Ci Anim Bras*, **13**: 124-130.
- Myllys, V., Ridell, J., Björkroth, J., Biese, I. & Pyörälä, S. (1997). Persistence in bovine mastitis of *Staphylococcus aureus* clones as assessed by random amplified polymorphic DNA analysis, ribotyping and biotyping. *Vet Microbiol*, **51**: 245-251.
- Nair, N., Biswas, R., Götz, F. & Biswas, L. (2014). Impact of *Staphylococcus aureus* on pathogenesis in polymicrobial infections. *Infect Immun*, **82**: 2162-2169.
- Oliveira, A.A., Azevedo, H.C., Seixas, L. S., Lopes, L. B. & Melo, C. B.(2010). Monitoramento microbiológico da mastite bovina em rebanho holandês na região dos tabuleiros costeiros do estado de Sergipe, Brasil. *Rev Bras Med Vet*, **32**: 193-197.
- Oliveira, C.M.C., Sousa, M.G.S., Silva, N.S., Mendonça, C.L., Silveira, J.A.S., Oaigen, R.P., Andrade, S.J.T. & Barbosa J.D. (2011). Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. *Pesq Vet Bras*, **31**: 104-110.
- Olson, M.E., Ceri, H., Morck, D. W., Buret, A.G., & Read, R.R. (2002). Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res*, **66**: 86-92.
- Perez Neto & Zappa. (2011). Mastite em vacas leiteiras - revisão de literatura. *Ver Cient Elet de Med Vet*, 16.
- Petersson-Wolfe, C. S., Mullarky, I. K. & Jones, G. M. (2010). *Staphylococcus aureus* mastitis: cause, detection and control. *Virginia Cooperative Extension*. Publication No 404-229: http://pubs.ext.vt.edu/404/404-229/404-229_pdf.pdf.

- Peton, V., Bouchard, D.S., Almeida S., Rault, L., Falentin, H., Jardin, J., Jan, G., Hernandez, D., François, P., Schrenzel, J., Azevedo, V., Miyoshi, A., Berkova, N., Even, S. & Le Loir, Y. (2014). Fine-tuned characterization of *Staphylococcus aureus* Newbould 305, a strain associated with mild and chronic mastitis in bovines. *Vet Res*, **45**: 106.
- Pospiech, A. & Neumann, B. (2005). A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. *Trends Genet*, **11**: 217-218.
- Qiu, J., Wang, D., Hua, X., Haihua, F., Jiang, Y., Xia, L., Dong, J., Lu, J.; Yu, L. & Deng, X. (2010). Subinhibitory concentrations of thymol reduce enterotoxins A and B and a-hemolysin production in *Staphylococcus aureus* isolates. *PLoS ONE*, **5**, doi: 10.1371.
- Quinn P. J., Carter, M. E., Markey, B. K. & Carter, G. R. (1994). Mastitis, p. 327-344. In: Quinn P. J., Carter M. E., Markey B. K. & Carter G. R. (ed.) *Clinical Veterinary Microbiology*. Wolfe Publishing, London.
- Rabello, R.F., Moreira, B.M., Lopes, R.M.M., Teixeira, L.M., Riley, L.W. & Castro, A.C.D. (2007). Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from cows with mastitis in Brazilian dairy herds. *J Med Microbiol*, **56**: 1505-1511.
- Roberson, J. R., Fox, L. K., Hancock, D. D., Gay, J. M. & Besser, T. E. (1994). Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. *J Dairy Sci*, **77**: 3354-3364.
- Rosa-Fraile, M., Dramsi, S. & Spellerberg, B. (2014). Group B streptococcal haemolysin and pigment, a tale of twins. *FEMS Microbiol Rev*, **38**: 932-946.
- Rosini, R & Margarit, I. (2015). Biofilm formation by *Streptococcus agalactiae*: influence of environmental conditions and implicated virulence factors. *Front Cell Infect Microbiol*, **5**: 6.
- Ruegg. (2003). *Practical strategies for treating mastitis*. University of Wisconsin, Madison.
- Santos, E.M.P., Brito, M.A.V.P., Lange, C., Brito, J.R.F. & Cerqueira, M.M.O.P. (2007). Streptococcus e gêneros relacionados como agentes etiológicos de mastite bovina. *Acta Sci Vet*, **35**: 17-27.
- Schukken, Y.H., Günther, J., Fitzpatrick, J., Fontaine, M.C., Goetze, L., Holst, O., Leigh, J., Petzl, W., Schuberth, H.J., Sipka, A., Smith, D.G.E., Quesnell, R., Watts, J., Yancey, R., Zerbe, H., Gurjar, A., Zadoks, R.N. & Seyfert, H.M.

- (2011). Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Vet Immunol Immunopathol*, **144**: 270-289.
- Sears, P.M. & McCarthy, K.K. (2003). Management and treatment of staphylococcal mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, **19**: 171-185.
- Souza, G.N., Brito, J.R.F., Moreira, E.C., Brito, M.A.V.P. & Silva, M.V.G.B. (2009). Variação da contagem de células somáticas em vacas leiteiras de acordo com patógenos da mastite. *Arq Bras Med Vet Zootec*, **61**: 1015-1020.
- Speziale, P. & Geoghegan, J.A. (2015). Biofilm formation by staphylococci and streptococci: structural, functional, and regulatory aspects and implications for pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol*, **5**: 31.
- Stepanović, S., Vuković, D., Hla V., Di Bonaventura, G., Djukić, S., Ćirković, I. & Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*, **115**: 891-9.
- Sutra, L.; & Poutrel, B. (1994). Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol*, **40**: 79-89.
- Vasudevan, P., Kumar, M., Nair, M., Annamalai, T. & Venkitanarayanan, K. S. (2003). Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet Microbiol*, **92**: 179-185.
- Whelehan, C.J., Meade, K.G., Eckersall, P.D., Young, F.J. & O'farrelly, C. (2011). Experimental *Staphylococcus aureus* infection of the mammary gland induces region-specific changes innate immune gene expression. *Vet Immunol Immunop*, **15**: 181-189.
- Witte, W.; Cuny, C.; Klare, I.; Nübel, U.; Strommenger, B. & Werner, G. (2008) Emergence and spread of antibiotic-resistant Gram-positive bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol*, **298**: 365-77.
- Xue, T., Chen, X. & Shang, F. (2014). Short communication: Effects of lactose and milk on the expression of biofilm-associated genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from a dairy cow with mastitis. *J Dairy Sci*, **97**: 6129:6134.
- Zadoks, R. & Fitzpatrick, J. (2009). Changing trends in mastitis. *Ir Vet J*, **62**: 59-70.
- Zhao, Y., Liu, H., Zhao, X., Gao, Y., Zhang, M., & Chen, D. (2015). Prevalence and pathogens of subclinical mastitis in dairy goats in China. *Trop Anim Health Production*, **47**: 429-435.

CAPÍTULO 2

Genetically related *Staphylococcus aureus* show phenotypic variation undetected by DNA-based methods

According Microbiology

**Genetically related *Staphylococcus aureus* show phenotypic variation undetected
by DNA-based methods**

Mônica Pacheco da Silva¹, Danielle Mendes Silva¹, Ananda Pereira Aguilar¹, Nadja Biondine Marriel², Gustavo Ferreira Martins², Mary Hellen Fabres Klein³ and Andréa de Oliveira Barros Ribon^{1*}

¹Laboratório de Biotecnologia Molecular, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil

²Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil

³Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil

*Corresponding author: Andrea de Oliveira Barros Ribon

E-mail addresses: abribon@ufv.br ; Tel: 55 31 3899 2837; Fax: 55 31 38992373

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is an important pathogen of dairy cattle that frequently causes subclinical mastitis, although other manifestations can be observed. Extensive work has been performed to understand the molecular basis of bacterial traits that promote intramammary infections. Although studies are usually conducted with bacteria of different genetic backgrounds, we hypothesize that genetically related bacteria exhibit different virulence properties that influence disease progression and, consequently, the clinical outcome. In this study, we analyzed the *in vivo* virulence and phenotypic characteristics believed to be important for the pathogenicity of bovine *S. aureus*. Bacteria with 90% genetic similarity isolated from animals with persistent and non-persistent mastitis were compared. *S. aureus* 302 and *S. aureus* 322 harbored all virulence genes investigated. Despite their genetic proximity, the strains had different capacities for biofilm and hemolysis production and also different levels of invasiveness and persistence in MAC-T cells. The larvae of *Galleria mellonella* were challenged with the bacterial strains, and the mortality rates at 24 h were found to be 85% for the larvae infected with *S. aureus* 302 and 47% for *S. aureus* 322. Our results revealed a hidden phenotypic variation in genetically related strains that can contribute to the development of the disease and has yet to be explored.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, bovine mastitis, virulence, phenotypic characterization, MAC-T cells

INTRODUCTION

Bovine mastitis is most commonly caused by bacteria that, once inside the mammary gland, multiply and produce toxins and other factors that damage host tissue and reduce milk production. This condition directly affects animal health and causes considerable economic losses to the dairy industry (Bhatt *et al.*, 2011; Whelehan *et al.*, 2011). *Staphylococcus aureus* is an important pathogen distributed in cattle herds worldwide and is associated with infections that range from acute to gangrenous (Watts, 1988; Bradley, 2002; Nickerson, 2011). However, most cases are subclinical and asymptomatic and progress to a chronic state, which is difficult to eliminate even with antibiotic therapy (Barkema *et al.*, 2006). Thus, rapid and accurate identification of the pathogen is essential for disease control measures.

Many groups have sought to relate genotypes to specific clinical symptoms or identify strains that will negatively impact herd health (Myllis *et al.*, 1997; Haveri *et al.*, 2005, 2007; Zecconi *et al.*, 2006; Peton *et al.*, 2014). The genotype GTB was described as highly contagious and associated with an increase in somatic cell counts (Graber *et al.*, 2009; Cremonesi *et al.*, 2015). An association between genes encoding pyrogenic toxin superantigens (PTSAg) and persistent infections was found, while the genes *spa* and *sej* were described as risk factors for subclinical mastitis (Zecconi *et al.*, 2006; Haveri *et al.*, 2007). Fournier *et al.* (2008) reported that strains of *S. aureus* harboring the enterotoxin genes *sea*, *sed* and *sej* were more contagious than others. Veh *et al.* (2015) determined that the presence of the *sec* gene was associated with non-persistent strains found in subclinical intramammary infections (IMI) during lactation. According to the authors the identification of efficient markers that distinguish between epidemiologically relevant strains will help udder-health management decision making.

DNA-based analyses are a powerful tool to study genetic diversity, to establish routes of infection and dissemination of strains within herds, and to reveal the

mechanisms involved in bacterial pathogenesis (Le Marechal *et al.*, 2011; Bergonier *et al.*, 2014). However, the high degree of similarity in the gene content of *S. aureus* strains associated with bovine mastitis the correlation between virulence genes and clinical manifestations may hinder (Herron-Olson *et al.*, 2007; Peton *et al.*, 2014). However, sequence diversity in virulence genes is likely to have consequences for the virulence of *S. aureus* and should be closely investigated instead of merely detecting conserved sequences with broad-range PCR primers. In *Escherichia coli*, point substitutions in fimbrial adhesin genes were correlated with increased bladder colonization in a murine model (Sokurenko, *et al.*, 1998). FimH variants that affected bacterial cell adhesion and invasion were also described in *Salmonella enterica* (Kisiela *et al.*, 2012). Interestingly, mutations were found in the *fimH* gene in the majority of host-adapted serovars, suggesting a role in virulence.

Generally, virulence traits are compared among bacteria with different genetic backgrounds. It is also possible that genetically related bacteria exhibit different virulence properties that influence disease progression and, consequently, the clinical outcome. Therefore, the analysis of phenotypic diversity may be a more useful approach to group isolates and define predictive markers that are correlated with disease strains. Phenotypic methods were formerly used to study bacteria, but due to the lack of discriminatory power, they have been replaced by DNA-based analyses. In recent years, we have observed a shift towards more sophisticated methods of analysis, such as the omics approaches that reveal the phenotypic plasticity that is crucial to understanding the fate of bacteria inside the mammary gland (Le Marechal *et al.*, 2011; Peton *et al.*, 2014). Although there are undeniable advantages in the use of these tools, the current costs of analysis are still a major limitation for many laboratories.

Here, we analyzed the *in vivo* virulence and some phenotypic characteristics believed to be important for the pathogenicity of bovine *S. aureus*. For this study, we

compared bacteria having a genetic similarity of 90% that were isolated from animals with persistent and non-persistent mastitis. The results showed that, despite their genetic proximity, the strains show phenotypic variation undetected by DNA-based methods that can contribute to the development of the disease and should be explored further.

METHODS

Bacterial strains and culture conditions

The reference strains *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *S. epidermidis* NRS101 (ATCC 35983) were used in this study. *S. aureus* 302 (SAU 302) was isolated from animals with persistent subclinical mastitis and *S. aureus* 322 (SAU 322) was obtained from animals with non-persistent subclinical mastitis. Mastitis was considered to be persistent if infection was recorded from the same cow for more than three consecutive months. All bacterial cultures were grown in brain heart infusion medium (BHI, HiMedia, Mumbai, India) at 37 °C for 16 h with shaking (180 rpm).

DNA-based methods

Total DNA extraction was carried out as described previously (Pospiech & Neumann, 1995). The presence of virulence genes was assessed by polymerase chain reaction (PCR) using the primers and PCR conditions described previously (Klein *et al.*, 2012). *Sma*I macrorestriction analysis of *S. aureus* strains was conducted according to Chung *et al.* (2000), with 30 U of restriction enzyme (Promega, Madison, WI, USA). The DNA fragments were separated by electrophoresis on a 1.0% agarose gel loaded with the DNA Pulse Marker 50-1,000 kb (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The run was carried out at 14 °C using the CHEF-DRIII system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), with pulse times of 40-100 s for 2 h and 2-35 s for 20 h, with an angle of 120° and voltage of 6 V cm⁻¹. After electrophoresis, the gel was stained for 20 min with 1 µg ml⁻¹ of ethidium bromide, destained in water for 40 min and photographed under UV

illumination. The gel was analyzed by visual interpretation of the banding patterns (Tenover *et al.*, 1995).

Phenotypic assays

Production of bacterial biofilm was assayed as described by Klein *et al.* (2015). *S. epidermidis* NRS 101, known as a high biofilm producer, was used as a positive control. Each sample was tested in triplicate, and the assay was repeated three times. The hemolytic activity of the strains was evaluated as described previously, with some modifications (Qiu *et al.*, 2010). The bacterial strains were grown in BHI (Himedia, Mumbai, India) at 37 °C for 14 h with agitation. Aliquots of 1 ml were centrifuged, and 100 µl of the supernatant was added into a polystyrene 96-well microplate containing 50 µl of 4% rabbit erythrocytes diluted in saline (0.85% NaCl) in each well. The microplate was incubated at 37 °C for 30 min and then centrifuged (3,500 g 1 min). The supernatant (100 µl) was transferred in duplicate to a new microplate followed by optical density measurement at a wavelength of 543 nm using a microplate reader (VersaMax Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Distilled water and the supernatant of a stationary culture of *S. aureus* ATCC 29213 were used as positive controls and saline as the negative control. The hemolytic potential of each strain was tested in triplicate, and the whole assay was repeated three times.

Infection of *Galleria mellonella* larvae

Insects were provided by the Laboratório de Genética de Micro-organismos of the Universidade Federal de Viçosa and were reared on an artificial diet at 25 °C. The experiments were conducted as described by Ramarao *et al.* (2012). Last-instar larvae weighing from 250-300 mg were immune challenged by an injection of a *S. aureus* strain grown to exponential phase and serially diluted in sterile PBS pH 7.4, yielding

inocula ranging from 10^5 to 10^8 c.f.u. per larva. Aliquots of 10 μ l of each dilution were injected into the right first proleg of the larvae using BD insulin syringes. Groups of uninjected larvae and larvae inoculated with PBS only were included as negative controls. Incubation was carried out at 37 °C in the dark. Larvae were individually examined for pigmentation, and the time of death was monitored over a period of 96 h. Larvae were considered dead if they did not move either spontaneously or in response to touch. All tests were replicated three times, and 30 larvae were used in each assay. For *in vivo* bacterial growth assays, cultures of *S. aureus* were injected into the hemocoel of larvae of *G. mellonella* (10^6 c.f.u. per larva), and bacterial growth was monitored at 0, 6, 10 and 24 h post-injection. Then, the surface of the larvae was disinfected with 70% ethanol and sterile distilled water, and cuts were made near the prolegs using Westcott microscissors. Hemolymph (10 μ l) collected from 8 individual larvae was serially diluted, and an aliquot of each sample was plated on Mannitol salt agar (Himedia, Mumbai, India) and incubated at 37 °C. C.f.u. ml⁻¹ was calculated as the average number of colonies within a countable range (25-250) obtained from a specified dilution. Uninjected larvae and larvae inoculated with PBS only were included as negative controls.

Histopathology of *G. mellonella* infected with *S. aureus*

For histopathological analysis, a minimum of 10 individuals injected with SAU 302 or SAU 322 were used. The larvae were placed in PBS (phosphate buffered saline, 0.1 M, pH 7.2) and dissected under a stereoscope. The abdominal cavity was opened laterally using microscissors, and visceral organs were removed. The dorsal abdomen, which includes the body fat and dorsal vessel, was separated from the rest of the larval body. The samples were transferred to microcentrifuge tubes containing 4% paraformaldehyde in 0.1 M PBS, pH 7.2 and stored at 4 °C. The fixed samples were

washed with PBS, dehydrated in an ascending series of ethanol (70-100%) and embedded in historesin (Leica). The samples were sectioned to a thickness of 5-7 μm using a semi-automated rotary *microtome* (Leica RM 2245) and mounted on *glass slides*. The sections were stained with toluidine blue, mounted with EukiT mounting medium (Fluka) and photographed under the light microscope.

MAC-T assays

Bovine mammary epithelial cells (MAC-T) were used in this study to test invasion, persistence and cytotoxicity of the bacteria. MAC -T cells were grown in cell culture flasks (75 cm^2) using MAC-T: DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% sterile fetal calf serum (FCS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The cells were incubated at 37 °C with 5% CO_2 . After reaching confluency, cells were treated with 0.05% trypsin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and resuspended in MAC-T medium to a concentration of 2×10^6 cells. For invasion and persistence assays, cells were seeded in 12-well plates (2×10^5 cells/well), and for the cytotoxicity assays, cells were distributed into 96-well plates (1×10^5 cells/well) and incubated overnight at 37 °C in 5% CO_2 to obtain a confluent monolayer.

The cytotoxic effects of the supernatant of *S. aureus* cultures were assessed after 24 h of incubation with MAC-T using methylthiazolyldiphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), as described by Bouchard *et al.* (2013), with some modifications. The bacterial strains were grown in BHI medium with agitation (180 rpm) at 37 °C. After 14 h of growth, the cultures were centrifuged, supernatants were filtered through a 0.22 μm filter (GVS Filter Technology, USA) and diluted in DMEM at ratio of 1:1. The diluted supernatants were added to 96-well plates with adherent cells (1×10^5 cells/well) and incubated under 5% CO_2 for 24 h at 37 °C. The wells were washed twice with sterile PBS and then incubated with MTT (0.5 mg ml^{-1}) for 4 h. The medium was removed and replaced with a developer solution

(isopropanol / 0.4 M HCl) for 30 min before absorbance was read at A570 nm. Cells incubated with BHI medium or 0.01% Triton-X at a ratio of 1:1 were used as a negative (100% viable) and positive (0% viability) controls, respectively. Relative viability was calculated based on uninfected cells.

Invasion assays and persistence were conducted in accordance with Brouillette *et al.* (2004), with some adjustments. Confluent monolayers of MAC-T cells (2×10^5 cells/well) were washed twice with sterile PBS and then incubated with bacteria suspended in invasion medium (DMEM / 1% FBS) to obtain a multiplicity of infection (MOI) of 10. After 3 h of incubation at 37 °C, the cells were washed with PBS followed by addition of 1 ml of invasion medium (DMEM / 1% FCS) supplemented with gentamicin ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and lysostaphin ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Supernatants were discarded, and cell monolayers were rinsed with sterile PBS and treated for 5 min with sterile distilled water to release the intracellular microorganisms. C.f.u. ml^{-1} was determined by plating on BHI agar. The population of *S. aureus* internalized after 3 h of infection was used as the starting point for the persistence assay. Then, MAC-T cells were rinsed with sterile PBS and incubated in invasion medium (DMEM / 1% FBS) supplemented with gentamicin and lysostaphin for 24 h. The supernatants were discarded, and cell monolayers were rewashed with PBS and lysed with distilled water to release the intracellular microorganisms. The remaining population of intracellular *S. aureus* was determined by serial dilution and plating.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed with R v. 3.2.1 (R Development Core Team, 2012). For *in vitro* tests, the Student's t-test was used to evaluate the differences in biofilm production and hemolytic activity between *S. aureus* strains. The invasion

capacity and persistence of *S. aureus* in MAC-T cells were compared using the Mann-Whitney test. Data normality was determined by the Shapiro-Wilk test. Survival curves were plotted using the Kaplan-Meier method, and differences in survival were calculated by the log-rank test. A p value <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Differences in phenotype between genetically related *S. aureus* strains

The bacteria studied here were isolated from animals showing persistent (SAU 302) or non-persistent (SAU 322) mastitis. Identical band profiles were obtained by multiplex PCR for the seven virulence genes that were evaluated (data not show). The PFGE band patterns were the same except for one band present in SAU 302. The degree of similarity between the two PFGE types was calculated, and a phenogram was constructed based on the UPGMA method, revealing a remarkable similarity (90%) between the strains. Bacteria were then evaluated for biofilm production and hemolytic activity. SAU 322 was considered a high biofilm producer when compared to the reference strain *S. aureus* NRS101 but differed from SAU 302 (p <0.001) (Fig. 1a). However, SAU 302 was more hemolytic than SAU 322 (p <0.001) (Fig. 1b).

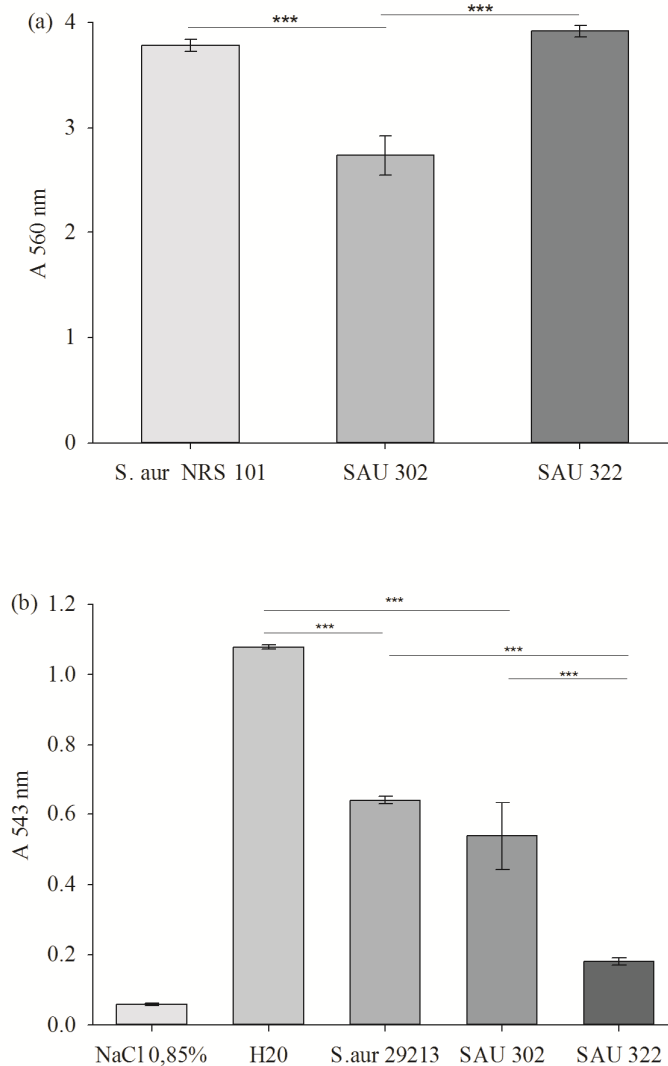


Fig. 1. Genetically related *Staphylococcus aureus* strains differ in production of biofilm and hemolytic activity. Biofilm production (a) and hemolytic activity (b) of SAU 302 and SAU 322. Biofilm production was assayed after 24 h of growth in BHI supplemented with 0.25% glucose. *S. aureus* NRS 101 was used as control for biofilm production. The hemolysis assay was conducted with supernatant obtained from cultures grown to the stationary phase. Distilled water was used as the positive control and 0.85% NaCl as the negative control in the hemolysis assay. The results represent the average of three independent experiments \pm SD, and the differences between the strains were compared by Student's t test (***) p < 0.001).

Differences in virulence between genetically related *S. aureus* strains

G. mellonella infection with *S. aureus* ATCC 29213 caused larval death, and the survival time was dependent on the concentration of inoculum (Fig. 2a). Infection with 10^8 CFU resulted in 100% mortality of *G. mellonella* after 12 h of infection. Dead larvae showed dark pigmentation (Fig. 2c) and were unresponsive to touch. Larvae infected with 10^5 CFU showed high percentages of survival after 96 h. Thus, the bacterial concentration of 10^6 CFU was selected due to intermediate mortality percentages. The two strains of *S. aureus* caused time-dependent death in at least 80% of the larvae. SAU 302 caused significantly higher mortality ($p < 0.0001$) than SAU 322 (Fig. 2b). After 24 h, 15% survival was observed in larvae infected with SAU 302 and 53% with SAU 322.

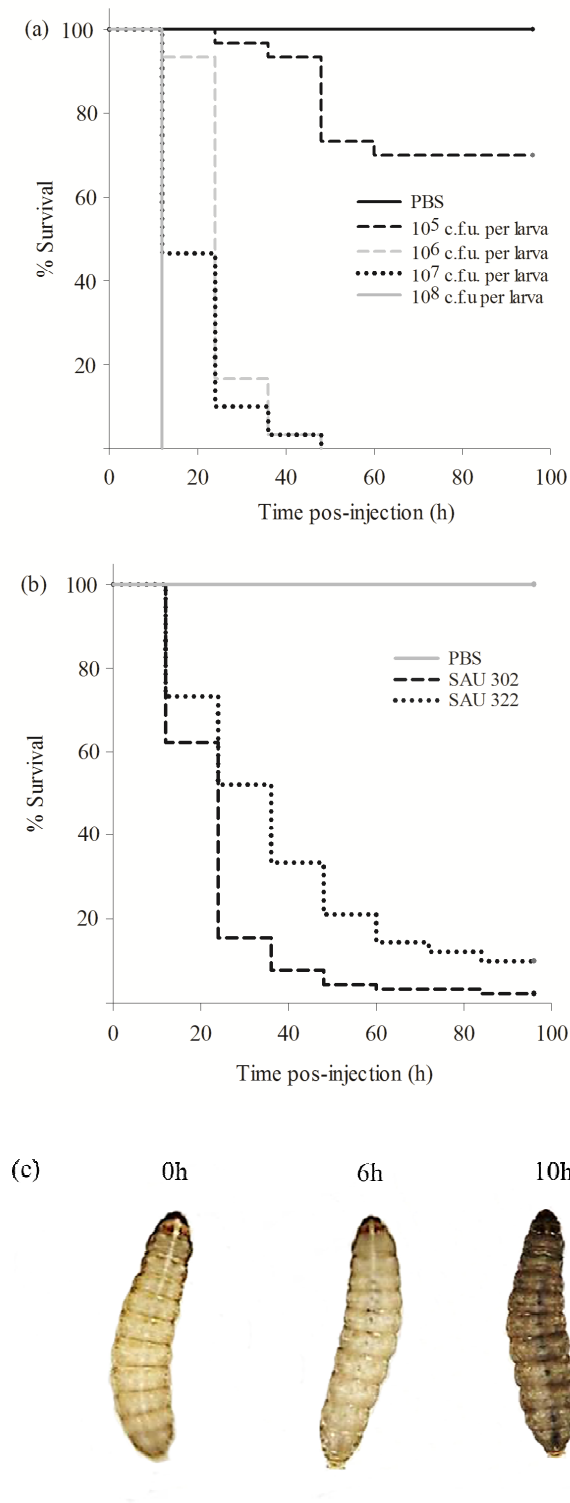


Fig. 2. Genetically related *Staphylococcus aureus* show different levels of virulence. Death of *Galleria mellonella* larvae upon infection with the reference strain *S. aureus* ATCC 29213 was dose dependent (a). Larvae injected with SAU 302 or SAU 322 were monitored for 96 h post-injection. SAU 302 caused higher mortality ($p < 0.0001$) 96 h after injection (b). Dark pigmentation observed in the body of the larvae after injection with SAU 302 (c).

Response of *Galleria mellonella* to infection with *S. aureus* strains

Vigorous humoral and cellular immune responses near the dorsal region of infected *G. mellonella* were observed. Histopathological analysis revealed regions of nodulation and melanization in the pericardium tissues and fat bodies (Fig. 3a-d). Significantly larger lesions and hyperpigmentation were observed after 6 h (Figure 4c-d) when compared to 1 h post-infection (Fig. 3a-b). Melanization regions and nodulation around bacterial cells were also observed in the parietal fat bodies of infected larvae, which were not observed in the control group (Fig. 3e-f).

To evaluate bacterial growth inside the host, the hemolymph was collected at different time points after inoculation with 10^6 CFU/larva of *S. aureus*. There was an initial reduction in the bacterial count 6 h post-injection, followed by an increase in the CFU after 10 h of infection. SAU 302 and SAU 322 reached the maximum concentration of 1.63×10^7 and 2.18×10^7 CFU / larva, respectively, after 24 h, demonstrating the bacterial ability to grow inside the host (data not shown).

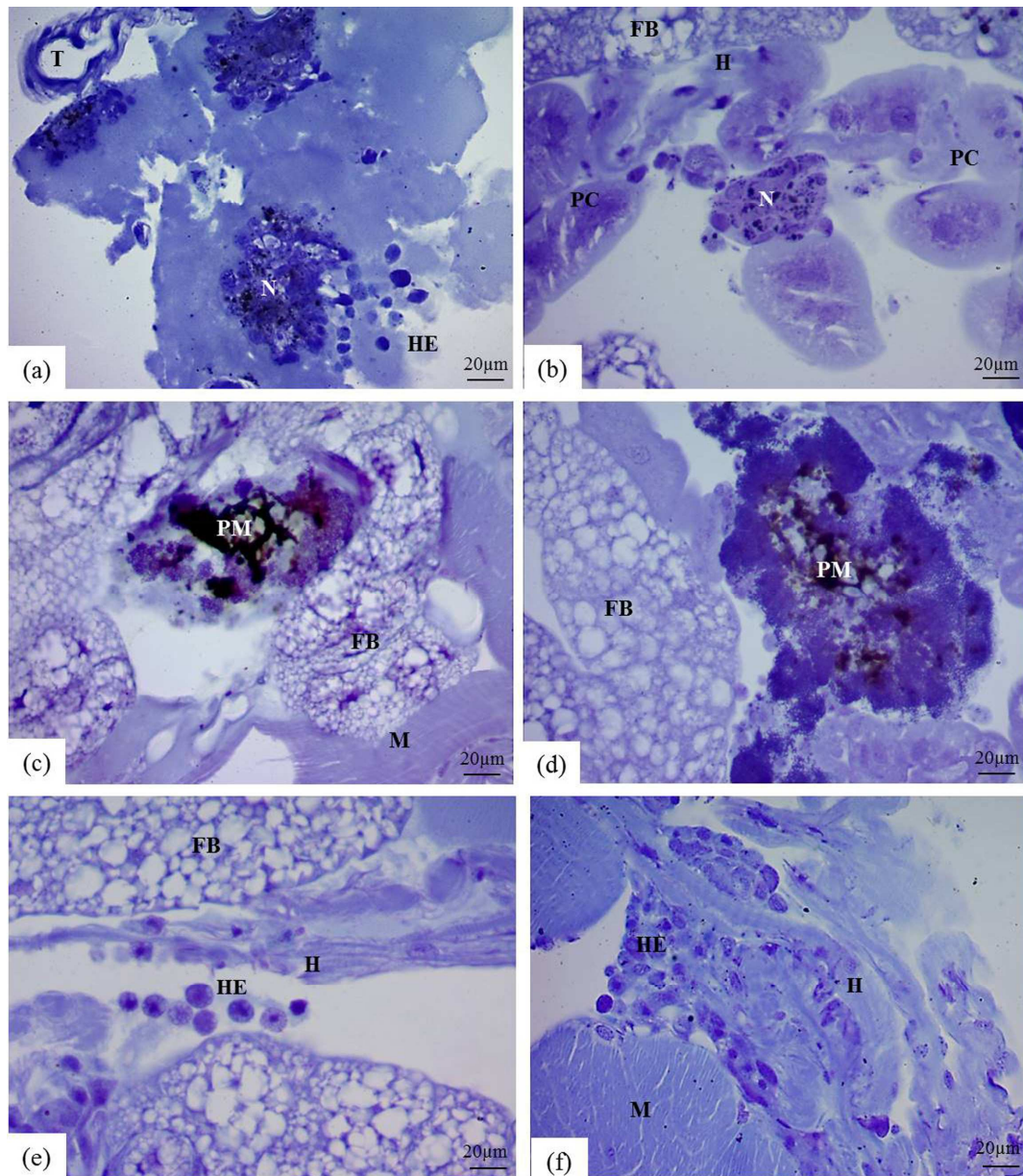


Fig. 3. Infection of *Galleria mellonella* with *Staphylococcus aureus* strains stimulates a strong immune response. Histological sections of *G. mellonella* larvae infected with 10^6 CFU of *S. aureus*/larva stained with toluidine blue 1 h after infections with SAU 302 (a) and SAU 322 (b), and 6 h after infections with SAU 302 (c) and SAU 322 (d). There are no signs of immune response in control larvae injected with PBS (e,f). Figures also show fat bodies (FB), regions of melanization (PM), sessile haemocytes (HE), aspects of the heart (H) and points of nodulation (N). Bars = 20 μ m.

Invasion, persistence and cytotoxicity in MAC-T cells

The invasiveness and persistence of *S. aureus* in MAC-T cells were also evaluated. The results showed a high invasive ability (Fig. 5a) and persistence (Fig. 4b)

of SAU 302 ($p < 0.001$) in comparison to SAU 322. The cytotoxicity of culture supernatants harvested from post-exponential phase cultures of *S. aureus* were evaluated with MAC-T cells. Cell viability was reduced by 82.57% in the presence of the supernatant of SAU 302, although no differences were observed when compared to SAU 322 (88.87%) and *S. aureus* ATCC 29213 (88.14%) (Fig. 4c).

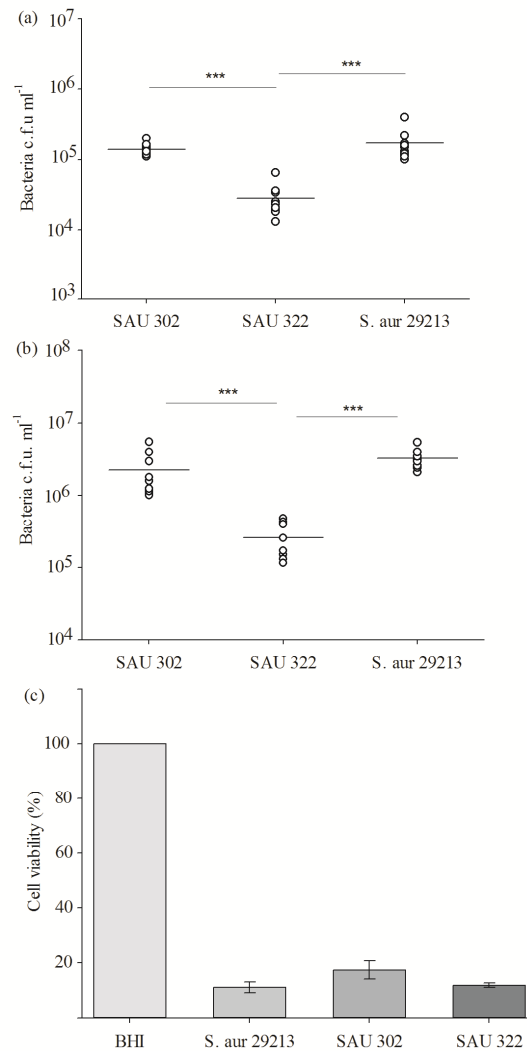


Fig. 4. Genetically related *Staphylococcus aureus* show different degrees of invasion and persistence in MAC-T cells. Invasion (a) and persistence (b) of SAU 302, SAU 322, and *S. aureus* ATCC 29213 in mammary epithelial cells. Cells were infected at an MOI of 10 for 3 h and then treated with gentamicin and lysostaphin for 30 min. Cytotoxic effect of supernatants of *S. aureus* cultures grown to stationary phase in BHI (c). MAC-T cells were incubated for 24 h with each supernatant. The values indicate means of three separate experiments. The differences between groups were compared using the Mann-Whitney test, *** $p < 0.001$.

DISCUSSION

S. aureus is a widespread pathogen that causes bovine mastitis, and the primary bacterial reservoirs are the udders and the animal's skin (Roberson *et al.*, 1994). Clinical manifestations can vary from gangrenous to mild, although the subclinical form is most frequently observed (Pettersson-Wolfe *et al.*, 2010). Infection can become chronic and persist during lactation, causing an increase in the somatic cell count of milk. *S. aureus* infections can be very difficult to treat and depend on a complex combination of factors such as age and immunity of the animal, co-infection with other pathogens and pathogen genetic background (Barkema *et al.*, 2006). Studies of the population structure of *S. aureus* have shown that (i) there are clones that cause infections exclusively in cattle, (ii) some are distributed worldwide, and (iii) multiclonality exists in herds, although there is usually a predominance of one type over others (Kapur *et al.*, 1995; Fitzgerald *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 2005; Haveri, *et al.*, 2007).

The identification of relevant clones within herds and pathogen traits that are correlated with particular manifestations can aid in preclinical identification of disease and help to define management strategies, reducing economic losses. The characterization of *S. aureus* strains present in herds primarily relies on DNA-based methods (Zadoks *et al.*, 2000; Joo *et al.*, 2001; Haveri *et al.*, 2005). These molecular techniques are important from an epidemiological perspective; however, they overlook differences in the genotype that may be related to virulence. In this study, we characterized two closely related strains of *S. aureus* that were found in the same herd and, interestingly, were isolated from animals with persistent and non-persistent subclinical mastitis. Remarkable differences in some traits considered important for the pathogenicity of *S. aureus* were found.

SAU 302 and SAU 322 harbored the same virulence genes evaluated in this study, and their PFGE banding profiles were very similar, allowing their classification

as genetically related strains (Tenover *et al.*, 1995). Bovine intramammary infections caused by different strains of *S. aureus* usually lead to differences in the host immune response (Kim *et al.*, 2011). However, a few studies have explored differences in clinical, molecular and phenotypic features of *S. aureus* subtypes and their impact in disease outcome (Vautor *et al.*, 2009; Haveri *et al.*, 2007). Our results show that, despite the relation between SAU 302 and SAU 322, marked phenotypic differences that are likely to impact mastitis progression were observed.

SAU 302 had higher hemolytic activity and lower biofilm production. The opposite was observed for the SAU 322, which produced more biofilm and was less hemolytic. This inverse relationship between the production of biofilm and hemolysis are in agreement with results previously described (Veh *et al.*, 2015) and may be due to differences in the *agr* system, which regulates these two phenotypes (Blevins *et al.*, 2002; Melchior *et al.*, 2009). Additionally, the increased production of biofilm produced by the strain SAU 322 may be an adaptation to the extracellular niche, which could also explain the reduced invasion in MAC-T cells. The opposite was observed for SAU 302.

Galleria mellonella has emerged as an insect model of infection and is a reliable alternative to assess the virulence of a broad range of pathogens (Mukherjee *et al.*, 2010; Olsen *et al.*, 2011; Harding *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2015). Advantages compared to other insect models are larval survival at 37°C and similarity of the insect innate immune response to vertebrates (Kang *et al.*, 1998; Ramarao *et al.*, 2012). After 20 h of infection, SAU 302 resulted in increased mortality of larvae compared SAU 322, while the bacterial count remained the same for both bacteria (data not shown). The repertoire of virulence factors is probably different between these two strains. It is also possible that virulence determinants are differentially expressed, as observed when the biofilm production and hemolytic activity of the bacteria were compared. This

difference demonstrates the importance of phenotypic testing and likely would not have been observed if DNA-based assays such as PCR were conducted to detect virulence genes.

This is the first report to use *G. mellonella* to compare the virulence of field strains of bovine *S. aureus*. Previously, this model was employed as a good alternative to measure the efficacy of antimicrobial therapy against *S. aureus* (Desbois & Coote, 2011; Gibreel & Upton, 2013). The histopathology studies performed on bacteria-infected larvae showed host tissue destruction—abscess-like lesions characterized by extensive melanization in the hemolymph, fat body and pericardial region. It has been shown that hemocytes migrate and surround bacteria, promoting the formation of nodules, a process involving the activation of prophenoloxidase and the melanization cascade (Lavine & Strand, 2002; Browne *et al.*, 2013.). The *S. aureus* strains increased in cell number, suggesting that they are able to survive and replicate in *G. mellonella*. After 24 h, the bacterial burden in the host was very similar despite the significant difference observed in killing assays. Similar results were reported by Peleg *et al.*, (2009) who evaluated the ability of *S. aureus* strains to multiply in the *Galleria* larvae. Further studies are required to understand the interaction between *S. aureus* and *Galleria* and correlate virulence in insect and murine models, which have been shown to be a good model for mastitis studies (Brouillette *et al.*, 2004).

SAU 302 and SAU 322 also showed different abilities to invade and persist inside MAC-T cells, again underscoring a hidden phenotypic variation between the closely related strains. It is possible that differential expression of surface proteins in the *S. aureus* strains interferes with these phenotypes, promoting a different outcome. Previous studies demonstrated that the ability of *S. aureus* to adhere to the surface of the host tissue is facilitated by various surface proteins, collectively known as MSCRAMMs (Patti *et al.*, 1994). Mutants in some of these proteins revealed a dramatic

reduction in their ability to be internalized in MAC-T cells (Dziewanowska *et al.*, 1999).

SAU 302 and SAU 322 had similar cytotoxic effects on MAC-T cells. Cytotoxicity of the culture supernatants is due to extracellular toxins and enzymes produced by bacteria, and their expression is influenced by the culture conditions (Zavizion *et al.*, 1995; Dinges *et al.*, 2000; Le Marechal *et al.*, 2009). For this assay, bacteria were grown until the stationary phase in BHI medium, a condition that does not replicate the environment found inside the udder and could interfere with the production of virulence determinants. Signals produced by the host cells could also affect bacterial gene expression (Pettersson *et al.*, 1996; Lowe *et al.*, 1998; Vriesema *et al.*, 2000).

The *S. aureus* strains studied in this work were isolated from animals with persistent and non-persistent mastitis. Although we cannot rule out that the different clinical outcomes were due to host factors such as age and animal's immune system, the genetic background of the pathogen could also influence the type of manifestation. Phenotypic analysis revealed a divergence between the strains that was not found by DNA-based techniques. If SAU 302 and SAU 322 had been characterized only by PCR, there would be no relationship between virulence genes and symptoms.

It is noteworthy that some important phenotypic traits differentiated SAU 302 from SAU 322. The former was more invasive, had higher hemolytic activity and produced less biofilm when compared to SAU 322. Reports have shown that strains more likely to invade and persist inside MAC-T cells are more adapted to survival inside the mammary gland (Buzzola *et al.*, 2007). For these strains, biofilm production does not appear to be an important trait. Once internalized, *S. aureus* can escape from the endosome, multiply in the cytosol and promote cell apoptosis (Bayles *et al.*, 1998). The nutrient-poor environment encountered inside the endosome stimulates the expression of toxins such as hemolysins that contribute to endosome lysis (Jarry *et al.*,

2008; Giese *et al.*, 2011). Therefore, highly hemolytic strains could have an adaptive advantage in chronic infections. More strains isolated from persistent and non-persistent mastitis should be investigated to address this hypothesis. These results are in accordance to those previously described for *S. aureus* Newbould 305, a hemolytic strain with high hemolytic activity that causes chronic mastitis (Peton & Le Loir, 2014).

SAU 302 was more virulent than SAU 322, which is unexpected as SAU 302 causes a chronic infection. *S. aureus* invasion depends on the expression of staphylococcal surface proteins which recognize integrins on the host cells (Sinha & Fraunholz, 2012). These specific proteins may be absent from the insect cells, precluding bacteria from intracellular survival. However, we were able to show variation in bacterial virulence reaffirming that phenotypic testing is important to reveal hidden differences between genetically related *S. aureus* strains.

In summary, we showed that genetically related bacteria have phenotypic variations unrevealed by the molecular methods used for bacterial characterization. Despite strong similarities in the PFGE profile, the contrasted strains showed significant differences in the virulence phenotypes which could have implications for mastitis progression. Our present study suggests that a set of phenotypic assays relevant to bovine mastitis should be defined and used to analyze a collection of bacteria for which information on the nature of the clinical manifestation is available.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Dr. Maria Aparecida S. Moreira for granting access to laboratory facilities and Dr. Denise M. S. Bazzolli for helping with the *Galleria mellonella* assays. *S. aureus* NRS 101 was provided by the Network in Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus* (NARSA). The authors are grateful to the veterinarians from the Programa de Desenvolvimento da Pecuária Leiteira (PDPL) who collected milk samples for bacterial isolation. This work was supported by a grant from

the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, CBB-APQ-01345-14). MPS was supported by a scholarship from CAPES, and D.S. and A.P.A. received scholarships from FAPEMIG.

REFERENCES

- 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*. *J Dairy Sci*, **89**, 1877-1895.
- Bayles, K. W., Wesson, C. A., Liou, L. E., Fox, L. K., Bohach, G. A. & Trumble, W. R. (1998).** Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect Immun*, **66**, 336-342.
- Bergonier, D., Sobral, D., Feßler, A. T., Jacquet, E., Gilbert, F. B., Schwarz, S., Treilles, M., Bouloc, P., Pourcel, C. & Vergnaud, G. (2014).** *Staphylococcus aureus* from 152 cases of bovine, ovine and caprine mastitis investigated by Multiple-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). *Vet Res*, **45**, 97.
- Bhatt, V.D., Patel, M.S., Joshi, C.G. & Kunjadia, A. (2011).** Identification and antibiogram of microbes associated with bovine mastitis. *Anim Biotechnol*, **22**: 163-169.
- Blevins, J. S., Beenken, K. E., Elasri, M. O., Hurlburt, B. K. & Smeltzer, M. S. (2002).** Strain-Dependent Differences in the Regulatory Roles of *sarA* and *agr* in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, **70**, 470-480.
- Bouchard, D. S., Rault, L., Berkova, N., Le Loir, Y. & Even, S. (2013).** Inhibition of *Staphylococcus aureus* invasion into bovine mammary epithelial cells by contact with live *Lactobacillus casei*. *Appl Environ Microbiol*, **79**, 877-885.
- Bradley, A. J. (2002).** Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet J*, **164**, 116-128.

- Brouillette, E., Grondin, G., Lefebvre, C., Talbot, B. G. & Malouin, F. (2004).** Mouse mastitis model of infection for antimicrobial compound efficacy studies against intracellular and extracellular forms of *Staphylococcus aureus*. *Vet Microbiol*, **101**, 253-262.
- Browne, N., Heelan, M., Kavanagh, K. (2013).** An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. *Virulence*, **4**, 597-603.
- Buzzola, F. R., Alvarez, L. P., Tuchscher, L. P., Barbagelata, M. S., Lattar, S. M., Calvino, L. & Sordelli, D. O. (2007).** Differential abilities of capsulated and noncapsulated *Staphylococcus aureus* isolates from diverse agr groups to invade mammary epithelial cells. *Infect Immun*, **75**, 886-891.
- Chung, M., De Lencastre, H., Matthews, P., Tomasz, A., Adamsson, I., De Sousa, M. A., Camou, T., Cocuzza, C., Corso, A. & other authors (2000).** Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb Drug Resist*, **6**, 189-98.
- Cremonesi, P., Pozzi, F., Raschetti, M., Bignoli, G., Capra, E., Graber, H. U., Vezzoli, F., Piccinini, R., Bertasi, B. & other authors (2015).** Genomic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains associated with high within-herd prevalence of intramammary infections in dairy cows. *J Dairy Sci*, **98**, 6828-6838.
- Desbois, A. P. & Coote, P. J. (2011).** Wax moth larva (*Galleria mellonella*): an in vivo model for assessing the efficacy of antistaphylococcal agents. *J Antimicrob Chemother*, dkr198.
- Dinges, M. M., Orwin, P. M. & Schlievert, P. M. (2000).** Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol*, **13**, 16-34.

- 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**, 4673-4678.
- Fitzgerald, J. R., Meaney, W. J., Hartigan, P. J., Smyth, C. J. & Kapur, V. (1997).** Fine-structure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *Epidemiol Infect*, **119**, 261-269.
- Fournier, C., Kuhnert, P., Frey, J., Miserez, R., Kirchhofer, M., Kaufmann, T., Steiner, A. & Graber, H. U. (2008).** Bovine *Staphylococcus aureus*: Association of virulence genes, genotypes and clinical outcome. *Res Vet Sci*, **85**, 439-448.
- Gibreel, M. T. & Upton, M. (2013).** Synthetic epidermicin NI01 can protect *Galleria mellonella* larvae from infection with *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*, **68**, 2269–2273.
- Giese, B., Glowinski, F., Paprotka, K., Dittmann, S., Steiner, T., Sinha, B. & Fraunholz, M. J. (2011).** Expression of δ -toxin by *Staphylococcus aureus* mediates escape from phago-endosomes of human epithelial and endothelial cells in the presence of β -toxin. *Cell Microbiol*, **13**, 316-329.
- Graber, H. U., Naskova, J., Studer, E., Kaufmann, T., Kirchhofer, M., Brechbühl, M., Schaeren, W., Steiner, A. & Fournier, C. (2009).** Mastitis-related subtypes of bovine *Staphylococcus aureus* are characterized by different clinical properties. *J Dairy Sci*, **92**, 1442-1451.
- Harding, C. R., Schroeder, G. N., Reynolds, S., Kosta, A., Collins, J. W., Mousnier, A. & Frankel, G. (2012).** *Legionella pneumophila* pathogenesis in the *Galleria mellonella* infection model. *Infect Immun*, **80**, 2780-2790.

- Haveri, M., Roslöf, A., Rantala, L. & Pyörälä. (2007).** Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistente and nonpersistente intramammary infections with diferente clinical characteristics. *J Appl Microbiol*, **103**, 993-1000.
- Haveri, M., Taponen, S., Vuopio-Varkila, J., Salmenlinna, S. & Pyörälä, S. (2005).** Bacterial genotype affects the manifestation and persistence of bovine *Staphylococcus aureus* intramammary infection. *J Clin Microbiol*, **43**, 959-961.
- Herron-Olson, L., Fitzgerald, J.R., Musser, J.M. & Kapur, V. (2007).** Molecular correlates of host specialization in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* **2**, e1120.
- Jarry, T. M., Memmi, G. & Cheung, A. L. (2008).** The expression of alpha-haemolysin is required for *Staphylococcus aureus* phagosomal escape after internalization in CFT-1 cells. *Cell Microbiol*, **10**, 1801-1814.
- Joo, Y. S, Fox, L. K.; Davis, W. C., Bohach, G. A. & Park, Y. H. (2001).** *Staphylococcus aureus* associated with mammary glands of cows: genotyping to distinguish different strains among herds. *Vet Microbiol*, **80**,131-138.
- Kang, D., Liu, G., Lundström, A., Gelius, E. & Steiner, H. (1998).** A peptidoglycan recognition protein in innate immunity conserved from insects to humans. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 10078-10082.
- Kapur, V., Sischo, W. M., Greer, R. S., Whittam, T. S. & Musser, J. M. (1995).** Molecular Population Genetic Analysis of *Staphylococcus aureus* Recovered from Cows. *J Clin Microbiol*, **33**, 376-380.
- Kim, Y., Atalla, H., Mallard, B., Robert, C. & Karrow, N. (2011).** Changes in Holstein cow milk and serum proteins during intramammary infection with three different strains of *Staphylococcus aureus*. *BMC Vet Res*, **7**, 51-64.
- Kisiela, D. I., Chattopadhyay, S., Libby, S. J., Karlinsey, J. E., Fang, F. C., Tchesnokova, V., Kramer, J. J., Beskhlebnaya, V., Samadpour, M. & other**

authors (2012). Evolution of *Salmonella enterica* virulence via point mutations in the fimbrial adhesion. *PLoS Pathog*, doi:10.1371.

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**, 183-188.

Klein, R. C., Fabres-Klein, M. H., de Oliveira, L. L., Feio, R. N., Malouin, F. & Ribon, A. O. B. (2015). A C-Type Lectin from *Bothrops jararacussu* Venom Disrupts Staphylococcal Biofilms. *PLoS ONE*, **10**. e0120514.

Lavine, M. D. & Strand, M. R. (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem Molec Biol*, **32**, 1295-1309.

Le Maréchal, C., Jan, G., Even, S., McCulloch, J.A., Azevedo, V., Thiéry, R., Vautor, E. & Le Loir, Y. (2009). Development of serological proteome analysis of mastitis by *Staphylococcus aureus* in ewes. *J Microbiol Meth* **79**,: 131-136.

Le Maréchal, C., Seyffert, N., Jardin, J., Hernandez, D., Jan, G., Rault, L., Azevedo, V., François, P., Schrenzel, J. & other authors (2011). Molecular Basis of Virulence in *Staphylococcus aureus* Mastitis. *PLoS ONE*, **6**, e27354.

Loughman, A., Sweeney, T., Keane, F. M., Pietrocola, G., Speziale, P. & Foster, T. J. (2008). Sequence diversity in the A domain of *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein A. *BMC Microbiol*, **8**, 74.

Lowe, A. M., Beattie, D. T. & Deresiewicz, R. L. (1998). Identification of novel staphylococcal virulence genes by in vivo expression technology. *Mol Microbiol*, **27**, 967-76.

Melchior, M. B., Van Osch, M. H. J., Graat, R. M., Van Duijkeren, E., Mevius, D. J. & Nielen, M. (2009). Biofilm formation and genotyping of *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: evidence for lack of penicillin-resistance in Agr-type II strains. *Vet Microbiol*, **137**, 83-89.

- Mukherjee, K., Altincicek, B., Hain, T., Domann, E., Vilcinskas, A. & Chakraborty, T. (2010).** *Galleria mellonella* as a Model System for Studying *Listeria* Pathogenesis. *Appl Environ Microbiol*, **76**, 310-317.
- Myllys, V.; Ridell, J.; Björkroth, J., Biese, I. & Pyörälä, S. (1997).** Persistence in bovine mastitis of *Staphylococcus aureus* clones as assessed by random amplified polymorphic DNA analysis, ribotyping and biotyping. *Vet Microbiol* , **51**, 245-251.
- Nickerson, E.K., Wuthiekanun, V., Kumar, V., Amornchai ,P., Wongdeethai, N., Chheng, K., Chantratita, N., Putchhat, H., Thaipadungpanit, J. & other authors. (2011).** Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage in children in Cambodia. *Am J Trop Med Hyg* **84**, 313-17.
- Olive, D. M. & Bean, P.(1999).** Principles and applications of methods for dna-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol*, **37**, 1661-1669.
- Olsen, R.J., Watkins, M.E., Cantu, C.C., Beres, S.B. & Musser, J.M. (2011).** Virulence of serotype M3 group A streptococcus strains in wax worms (*Galleria mellonella* larvae). *Virulence* **2**, 111-119.
- Patti, J. M., Allen, B. L., MCGavin, M. & Höök, M. (1994).** MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissue. *Annu Rev Microbiol*, **48**, 585-617.
- Peleg, A.Y., Monga, D., Pillai, S., Mylonakis, E., Moellering, R.C., Eliopoulos, G.M. (2009).** Reduced susceptibility to vancomycin influences pathogenicity in *Staphylococcus aureus* infection. *J Infect Dis*, **199**, 532-536
- Pereira, M. F., Rossi, C. C., Queiroz, M. V., Martins, G. F., Isaac, C., Bossé, J. T., Li, Y., Wren, B. W., Terra, V. S. & other authors (2015).** *Galleria mellonella* is an effective model to study *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. *Microbiology*, **161**, 387-400.

- Petersson-Wolfe, C. S., Mullarky, I. K. & Jones, G. M. (2010).** *Staphylococcus aureus* Mastitis: Cause, Detection and Control. *Virginia Cooperative Extension*. Publication No 404–229: <http://pubs.ext.vt.edu/404/404-229/404-229.pdf>.
- Peton, V., Bouchard, D.S., Almeida S., Rault, L., Falentin, H., Jardin, J., Jan, G., Hernandez, D., François, P., Schrenzel, J., Azevedo, V., Miyoshi, A., Berkova, N., Even, S. & Le Loir, Y. (2014).** Fine-tuned characterization of *Staphylococcus aureus* Newbould 305, a strain associated with mild and chronic mastitis in bovines. *Vet Res*, **45**: 106.
- Petterson, J., Nordfelth, R., Dubinina, E., Bergman, T., Gustafsson, M., Magnusson, K. E. & Wolf-Watz, H. (1996).** Modulation of virulence factor expression by pathogen target cell contact. *Science*, **273**, 1231- 1233.
- Pospiech, A. & Neumann, B. (2005).** A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. *Trends Genet*, **11**, 217-218.
- Qiu, J., Wang, D., Xiang, H., Feng, H., Jiang, Y., Xia, L., Dong, J., Lu, J., Yu, L. & Deng, X. (2010).** Subinhibitory concentrations of thymol reduce enterotoxins A and B and α -Hemolysin production in *Staphylococcus aureus* isolates. *PLoS ONE*, **5**, e9736.
- Ramarao, N., Nielsen-Leroux, C. & Lereclus, D. (2012).** The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. *J Vis Exp*, **70**, e4392.
- Roberson, J. R., Fox, L. K., Hancock, D. D., Gay, J. M. & Besser, T. E. (1994).** Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. *J Dairy Sci*, **77**, 3354-3364.
- Sinha, B. & Fraunholz, M. (2010).** *Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion events. *Int J Med Microbiol*, **300**, 170-175.
- 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**, 4737-4743.

Sokurenko, E. V., Chesnokova, V., Dykhuizen, D. E., Ofek, I., Wu, X. R., Krogfelt, K. A., Struve, C., Schembri, M. A. & HASTY, D. (1998). Pathogenic adaptation of *Escherichia coli* by natural variation of the FimH adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 8922-8926.

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

Vautor, E., Cockfield, J., Le Maréchal, C., Le Loir, Y., Chevalier, M., Robinson, D.A., Thiery, R. & Lindsay, J. (2009). Difference in virulence between *Staphylococcus aureus* isolates causing gangrenous mastitis versus subclinical mastitis in a dairy sheep flock. *Vet Res*, **40**, 56-67.

Veh, K. A., Klein, R. C., Ster, C., Keefe, G., Lacasse, P., Scholl, D., Roy, J.-P., Haine, D., Dufour, S. & other authors (2015). Genotypic and phenotypic characterization of *Staphylococcus aureus* causing persistent and nonpersistent subclinical bovine intramammary infections during lactation or the dry period. *J Dairy Sci*, **98**,155-168.

Vriesema, A. J. M., Beekhuizen, H., Hamdi, M., Soufan, A., Lammers, A., Willekens, B., Bakker, O., Welten, A. G. A., Veltrop, M. H. A. M. & other authors (2000). Altered gene expression in *Staphylococcus aureus* upon interaction with human endothelial cells. *Infect Immun*, **68**, 1765-1772.

Watts, J. L. (1988). Etiological agents of bovine mastitis. *Vet Microbiol*, **16**, 41-66.

Whelehan, C.J., Meade, K.G., Eckersall, P.D., Young, F.J. & O'farrelly, C. (2011). Experimental *Staphylococcus aureus* infection of the mammary gland induces

region-specific changes in innate immune gene expression. *Vet Immunol Immunop* **15**, 181-189.

Zadoks, 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**, 1931-1939.

Zavizion, B., Bramley, A. J., Poutis, I., Gilmore, J., Turner, J. D., Patel, A. H. & Foster, T. J. (1995). Effects of *Staphylococcus aureus* toxins on the growth of bovine mammary epithelial cells (MAC-T) in culture. *J Dairy Sci*, **78**, 277-284.

Zecconi, A., Cesaris, L., Liandris, E., Daprà, V. & Piccinini, R. (2006). Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microb Pathogenesis* **40**, 177-183.