

ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DA PREVALÊNCIA DE FATORES DE VIRULÊNCIA EM *Staphylococcus aureus* DE ORIGEM BOVINA

Aline Leandra Carvalho Ferreira¹, Ana Cláudia Dumont Oliveira², José Ferronato², Eduardo Milton Ramos Sanchez^{5,6}, Alessandro Guimarães^{3,4}, Sérgio Caldas⁷, Fernando Nogueira Souza^{1,2}, Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira¹

¹Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil. ²Veterinary Clinical Immunology Research Group, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. ³EMBRAPA-Gado de Leite, Juiz de Fora, Brasil. ⁴Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil. ⁵Department of Public Health, School of Health Sciences, National University Toribio Rodriguez de Mendoza of Amazonas, Chachapoyas, Peru; ⁶Laboratório de Sorologia e Imunobiologia, Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. ⁷Fundação Ezequiel Dias

INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa hoje a terceira posição na produção mundial de leite. A mastite é a doença que mais acomete os rebanhos leiteiros no mundo e é responsável por perdas que impactam toda a cadeia produtiva do leite. Por isso, o seu controle eficiente representa uma medida necessária.

Entre vários patógenos associados à mastite, *Staphylococcus aureus* é um dos principais identificados. Este patógeno pode apresentar repertório de fatores de virulência, alguns dos quais estão associados ao estabelecimento, persistência e gravidade de infecções intramamárias. Esses fatores de virulência são regulados por uma complexa rede de elementos reguladores da transcrição que são críticos na patogênese da infecção por *S. aureus*, que também permitem que esse patógeno se adapte às mudanças nas condições micro ambientais durante a infecção, aumentando assim sua sobrevivência. Assim, investigações de fatores de virulência de *S. aureus* são fundamentais para o desenvolvimento de biomarcadores diagnósticos e prognósticos e a identificação de alvos vacinais. Neste cenário, investigamos aqui a presença de um conjunto de 16 fatores de virulência de *S. aureus*, alguns deles em isolados de *S. aureus* associados a bovinos pela primeira vez.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 216 isolados de *S. aureus* (201 provenientes de casos de mastite subclínica, nove de mastite clínica e seis isolados de *swab* nasal) identificados por testes bioquímicos, confirmados por MALDI-ToF MS e pela presença do gene *nuc*. No presente estudo foram investigados a presença dos genes da leucotoxina lukE-lukD (*lukED*) e leucotoxina Pantón-Valentine (*pvl*), enterotoxinas A (*sea*), B (*seb*) e C (*sec*), síndrome do choque tóxico toxina-1 (*tsst-1*), a enzima permease específica da lactose II (*lacE*), e nove proteínas candidatas promissoras ao desenvolvimento de uma vacina eficaz [*serine-aspartate repeat-containing protein D* (*sdrD*), *serine-aspartate repeat-containing protein E* (*sdrE*), *iron-regulated determinant H* (*IsdH*), *enolase* (*eno*), *elongation factor G* (*fusA*), *phosphoglycerate kinase* (*pgk*), *cysteinyI-tRNA synthetase* (*cts*), *F0F1 ATP synthase subunit α* (*sas*), e *succinyl-diaminopimelate desuccinylase* (*sdd*)] (Stranger-Jones et al., 2006; Cunha et al., 2020; Santos et al., 2021) pela reação da cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR). Para a avaliação dos genes, os isolados de *S. aureus* foram submetidos a reações de amplificação, em um volume final de 10 μ L, adicionando 8 μ L de GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega, Madison, EUA) e 2 μ L de DNA (25 ng/ μ L). Para a identificação dos *spa* tipos presentes realizou-se à amplificação da região repetida (X) da proteína A. Inicialmente, foram realizadas análises descritivas das variáveis incluídas no estudo, com a determinação de suas frequências absolutas e relativas. Para verificar possíveis associações entre as

variáveis foi realizado o Teste Exato de Fisher e considerado nível de significância estatística de 95%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, os genes das proteínas *eno*, *fusA*, *pgk*, *sas*, *cts* e *sdd* foram identificados em isolados de *S. aureus* de amostras de leite bovino, pela primeira vez na literatura. No presente estudo, essas proteínas foram identificadas nos distintos *spa* tipos de *S. aureus* (entre 99,5% e 100% de todos os isolados de mastite subclínica estudados) reiterando a importância destas proteínas como candidatas à vacina. Sabe-se que as seis proteínas descritas estão relacionadas a diferentes funções dos processos metabólicos e são importantes para a manutenção de atividades funcionais, como crescimento, formação de biofilme e multiplicação celular. Portanto, sugere-se que o bloqueio da atividade dessas proteínas pode levar à eliminação desse patógeno, o que poderá ser uma estratégia promissora no controle da mastite bovina por *S. aureus*.

O presente estudo identificou elevada frequência do gene *sdrE* (média 93,52%, entre 86,59 e 100%) e *isdH* (média 99,07, entre 96,08 e 100%) em todos os rebanhos. O gene *sdrD* foi detectado em apenas 34,72% (20,73 a 100%) nos rebanhos estudados. As proteínas *sdrD* e *sdrE* são componentes de superfície microbiana reconhecendo moléculas de matriz adesiva (*MSCRAMM*). As proteínas de superfície reguladoras de ferro da família *Isd* (incluindo a *IsdH*) atuam no sequestro de ferro em *S. aureus* e são consideradas importantes no metabolismo celular.

A leucotoxina *LukED* está ligada à formação de poros nas células de defesa o que provoca a morte celular. O gene *lukED* foi encontrado em 92% dos isolados (entre 82 e 100% dos isolados nos rebanhos estudados). O gene *pvl* foi identificado em apenas um rebanho (3,9% no rebanho C), sendo um gene de origem humana, e indica um sinal de alerta para transmissão interespecies.

O gene *lacE* é responsável por codificar a enzima *EII* que atua no transporte ativo da lactose, o principal carboidrato presente no leite (Sharer, et al. 2003) e está diretamente relacionada ao crescimento bacteriano. O gene *lacE* foi observado em mais de 99,7% dos isolados (entre 98,8 a 100% dos isolados entre os rebanhos estudados). Nenhum dos isolados deste estudo amplificou os genes *sea*, *seb*, *sec* e *tsst-1*.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os genes *eno*, *fusA*, *pgk*, *cysS*, *atpF* e *dapE* foram identificados entre os distintos isolados, reiterando sua importância na estratégia de desenvolvimento de uma vacina universal para *S. aureus*. Ademais, os genes *isdH*, *lacE*, *lukDE*, apresentaram-se alta prevalência enfatizando sua importância na patogênese da infecção por *S. aureus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Stranger-Jones, Yukiko K.;BAE, Taeok;SCHNEEWIND, Olaf.Vaccine assembly from surface proteins of Staphylococcus aureus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.103, n.45, p.16942-16947,2006.
- Santos KR, Souza FN, Ramos-Sanchez EM, et al.Staphylococcus aureus Protection-Related Type 3 Cell-Mediated Immune Response Elicited by Recombinant Proteins and GM-CSF DNA Vaccine. **Vaccines (Basel)**.2021;9(8):899. Published 2021 Aug 13. doi:10.3390/vaccines9080899.
- Cunha, A.F. et al. Comparison of antibody repertoires against Staphylococcus aureus in healthy and infected dairy cows with a distinct mastitis history and vaccinated with a polyvalent mastitis vaccine. **Journal of Dairy Science**. v.103, n.5 p.4588–4605, 2020.
- Sharer M.V. et al. Differential expression of the lactose transporter gene affects growth of Staphylococcus aureus in milk. **Journal of Dairy Science**. 2003;86(7):2373-2381.