



ALESSANDRA PEREIRA SANT'ANNA SALIMENA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E
MOLECULAR DE *Staphylococcus aureus*
ISOLADOS DE MASTITE BOVINA**

LAVRAS – MG

2016

ALESSANDRA PEREIRA SANT'ANNA SALIMENA

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE MASTITE BOVINA

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

Orientadora

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

LAVRAS – MG

2016

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

Salimena, Alessandra Pereira Sant'Anna.

Caracterizaçãofenotípica e molecular de *Staphylococcus aureus*
isolados demastite bovina / Alessandra Pereira Sant'Anna Salimena. –
Lavras: UFLA, 2016.

78 p.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador(a): Roberta Hilsdorf Piccoli.

Bibliografia.

1. *cap.* 2. *icaAD*. 3. *bap*. 4. Cápsula. 5. Adesina. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

ALESSANDRA PEREIRA SANT'ANNA SALIMENA

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE MASTITE BOVINA

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

APROVADA em 7 de março de 2016.

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli	UFLA
Dra. Carla Christine Lange	Embrapa
Dr. Disney Ribeiro Dias	UFLA
Dra. Maria Aparecida V. Paiva e Brito	Embrapa
Dra. Patricia Gomes Cardoso	UFLA

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli
Orientadora

LAVRAS – MG
2016

*Para todos que já tiveram um momento de fraqueza. Não vai doer para sempre,
então, não deixe isso afetar o que há de melhor em você.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me iluminar, guiar meus passos e me dar forças para prosseguir quando os obstáculos surgiram.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, meus colegas de curso e todos os professores.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos e oportunidade de realizar o doutorado sanduíche.

À minha orientadora, Rô, pela oportunidade de realizar este trabalho, pelos ensinamentos, conversas e desabafos desde o nosso primeiro contato no mestrado.

À minha coorientadora, Carla, pelos conhecimentos adquiridos, desde a graduação até a conclusão deste trabalho.

A Cida, por estar sempre à disposição, com suas ideias valiosas.

Ao Calvinho, por me receber tão carinhosamente na Argentina e permitir que parte do experimento tivesse sido realizada em seu laboratório, demonstrando total confiança em meu trabalho.

À amiga querida e maravilhosa pessoa Cecília Camussone, não tenho palavras para expressar o quanto foram valiosas suas contribuições na caminhada do doutorado.

Ao meu eterno namorado, Alexandre Salimena, por sempre me apoiar com todo carinho e amor nessa jornada de estudos. Te amarei eternamente!

Aos meus pais, Angelo (sempre presente) e Genilda, por me ensinarem a alcançar meus objetivos com toda força e nunca desistir mesmo frente a um obstáculo. Às minhas irmãs, Valéria, Angelica e Vivian, pelas palavras de incentivo e compreensão nas horas ausentes.

À amiga Maiara, que fiz na república, por todos os momentos que compactuamos de desespero e desabafos. Afinal, convivíamos mais do que com os nossos familiares.

Aos meus amigos e irmãos de coração, Mikelli e Ricardo, que sempre estiveram disposição para me ajudar nos momentos mais difíceis que surgiram durante essa trajetória.

A Eliane, que sempre esteve à disposição para me ajudar.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia do Leite da Embrapa Gado de Leite, Marcos, João Batista, Letícia, Wanessa, Alessandro, Humberto, Carol, Erika, Iury, Eliene, Selda, Letícia, Deivid, Liliane, Janaína, Bruna e Paula, por todo suporte no doutorado.

Aos amigos do INTA, Virginia, Maira, Adriana, Pamela, Mauro, Nicolás, Ariel, Francisco, Nancy, Roxy, Ana, Noe, Emanuel, Vilma, Miguel, Alejandro e Marcelo, pela boa convivência, ensinamentos e ajuda nos momentos em que mais precisei enquanto estive na Argentina.

Aos colegas que me incentivaram em Lavras, Angelica, Gláucia, Wesley, Nayane, Luciana, Alessandra, Maíra, Milene, Victor, Aline, Cristiane, Glécia, Tenile, Viviane, Roberta, Kamilla e Letícia.

A Rose, pela educação, sempre disposta a ajudar.

A todos que, de alguma forma e em algum momento, me ajudaram na realização deste sonho.

RESUMO GERAL

A mastite é uma inflamação da glândula mamária, causada primariamente pela invasão e a multiplicação de bactérias no parênquima glandular, podendo ser considerada doença de maior significância econômica na pecuária leiteira mundial. *Staphylococcus aureus* é um patógeno frequentemente associado à mastite em rebanhos bovinos, em todo o mundo. A análise da diversidade genética de *S. aureus* e o estudo de diferentes cepas têm sido vistos como etapas indispensáveis para o controle mais efetivo da doença. Diversos fatores de virulência, tais como resistência à fagocitose, reconhecimento e ligação a proteínas da matriz extracelular do hospedeiro, polissacarídeos capsulares e capacidade de metabolizar substratos presentes no leite, contribuem para a diversidade genética de *S. aureus* e auxiliam no estabelecimento das infecções causadas pelo patógeno. Mediante algumas condições, os microrganismos se aderem, interagem com diversas superfícies e iniciam o crescimento celular, sendo, então, formado o biofilme. O presente estudo foi realizado com o objetivo de detectar a presença de genes envolvidos na produção de polissacarídeos capsulares e a formação de biofilmes em *S. aureus* isolados a partir de amostras de leite bovino de três diferentes regiões do Brasil, bem como a produção de polissacarídeos capsulares e biofilmes, *in vitro*. Foi avaliada a presença dos genes *cap*, *icaAD* e *bap*, pela técnica de PCR. A detecção e a quantificação da produção de polissacarídeos capsulares foram realizadas utilizando-se antissoros e ensaios de ELISA. A análise da produção de biofilme foi realizada em microplacas de poliestireno estéreis, de fundo plano com tampa. Todos os 159 isolados de *S. aureus* investigados apresentaram o gene *cap*, tendo 80% apresentado o gene *cap5* e 20% apresentado o gene *cap8*. Sessenta e nove por cento dos isolados apresentaram polissacarídeo capsular (PC) *in vitro* e, dentre estes, 58% foram PC5 e 11%, PC8. Todos os isolados apresentaram os genes *icaA* e *icaD*, e 95,6% dos isolados apresentaram o gene *bap*. Dos 159 isolados analisados, 97,5% eram produtores de biofilme. Detectou-se associação significativa entre o genótipo e o fenótipo capsular e a quantidade de formação de biofilme. Estes resultados indicam elevado potencial de patogenicidade entre *S. aureus* isolados de leite bovino coletado de três regiões diferentes do Brasil.

Palavras-chave: *cap*. *icaAD*. *bap*. Cápsula. Adesina.

GENERAL ABSTRACT

Mastitis is an inflammation of the mammary gland primarily caused by the invasion and multiplication of bacteria in the glandular parenchyma, and is considered of greater economic significance disease in world dairy farming. *Staphylococcus aureus* is a pathogen often associated with of mastitis dairy herds in around the world. Analysis of genetic diversity of *S. aureus* and the study of different strains have been seen as necessary steps for the effective control of the disease. Several virulence factors, such as resistance to phagocytosis recognition and binding to the lost extracellular matrix proteins, capsular polysaccharides and the ability to metabolize substrates present in the milk contribute to the genetic diversity of *S. aureus* and assist in the establishment of infection caused by the pathogen. Upon certain conditions, the microorganisms adhere, interact with various surfaces and initiate cell growth by forming biofilms. This study was conducted with the aim of detecting the presence of genes involved in capsular polysaccharide production and biofilm formation in *S. aureus* strains isolated from bovine mastitis samples located in three different regions of Brazil, as well as the production of polysaccharides and capsular biofilms, *in vitro*. The presence of the genes *cap*, *icaAD* and *bap* by PCR was evaluated. The detection and quantification of capsular polysaccharide production was performed using ELISA assays. The analysis of biofilm production was carried out in flat bottom sterile polystyrene microtiter plates with lid. All 159 isolates investigated harboured the *cap* gene being that 80% carried the *cap5* gene and 20% carried the *cap8* gene. Sixty-nine percent of the isolates have capsular polysaccharide (CP) *in vitro*, of these 58% are PC5 and PC8 11%. All isolates harboured the *icaA* and *icaD* genes, and 95.6% of the isolates carried the *bap* gene. Of the 159 isolates analyzed, 97.5% were biofilm producers. A significant association between the capsular genotype and phenotype and the amount of biofilm formation was detected. These results indicate a high pathogenicity potential among *S. aureus* isolated from bovine milk collected from three different regions of Brazil.

Keywords: *cap*. *icaAD*. *bap*. Capsule. Adhesin.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	10
1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Mastite bovina	13
2.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	14
2.2.1	Formação de biofilme	17
2.2.2	Polissacarídeos capsulares	23
2.2.2.3	Papel dos polissacarídeos capsulares na virulência de <i>S. aureus</i> ..	26
2.2.2.4	Produção de cápsula <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	28
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
	REFERÊNCIAS	33
	SEGUNDA PARTE	48
	ARTIGO Genotypic and phenotypic detection of capsular polysaccharide and biofilm formation in <i>Staphylococcus aureus</i> isolated from bovine milk collected from Brazilian dairy farms ..	48

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A mastite bovina é uma doença importante para a bovinocultura leiteira, devido à alta incidência de casos clínicos e subclínicos e aos prejuízos econômicos que acarreta. Esta doença resulta da infecção da glândula mamária, principalmente por bactérias do gênero *Staphylococcus* (RUEGG, 2012). Dentro deste gênero, *Staphylococcus aureus* é reconhecido como o principal patógeno da mastite bovina e seus principais sítios de localização nos animais parecem ser os quartos mamários infectados.

No Brasil, diversos estudos relatam este agente em amostras de leite de bovinos com mastite (COELHO et al., 2009; LANGE et al., 1999; REIS; SILVA; BRESCIA, 2003; ZAFALON et al., 2007).

S. aureus pode produzir uma série de fatores de virulência que contribuem para que a bactéria vença as defesas fagocíticas do hospedeiro, facilite sua aderência às células epiteliais e a colonização dos tecidos, favorecendo sua persistência extracelular e garantindo, com êxito, sua instalação e manutenção nos tecidos do hospedeiro. Entre estes fatores está a produção de um mucopolissacarídeo extracelular (*slime*) que auxilia na aderência e na colonização do epitélio glandular mamário. A habilidade de *S. aureus* de aderir à superfície do epitélio tem sido associada à produção de biofilmes, que são descritos como aglomerações de células embebidas em matriz heterogênea extracelular, resultando em estruturas tridimensionais com características fisiológicas específicas (CERCA et al., 2007; GAD et al., 2009).

Diversos polissacarídeos compõem o *slime*, mas um polissacarídeo específico de alto peso molecular, que tem a mesma função da cápsula

bacteriana e intervém na aderência inicial das bactérias às superfícies dos polímeros, é denominado polissacarídeo capsular/adesina (PS/A) (GÖTZ, 2002).

O PS/A é descrito como componente da superfície celular e da camada do biofilme que protege as bactérias das defesas do hospedeiro e da fagocitose. Ele está envolvido no primeiro passo da adesão primária, que é seguida pela proliferação das células em agrupamentos de multicamadas (ARCIOLA; BALDASSARI; MONTANARO, 2001).

A proliferação das células para aderir e formar biofilme é mediada pela produção do polissacarídeo intercelular adesina (PIA); sua síntese é codificada pelo produto do locus *ica* do operon *icaADBC*. Os genes e os produtos do locus *ica* são fundamentais para a formação de biofilmes e a virulência dos microrganismos. Eles são regulados em resposta a fatores ambientais, como glicose, anaerobiose, alta osmolaridade e temperatura, limitação de etanol e ferro (ARCIOLA; BALDASSARI; MONTANARO, 2001; O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000).

A produção de biofilmes por *Staphylococcus* tem sido relatada em bactérias isoladas de diversas partes do mundo, podendo estar presente em infecções intramamárias bovinas (CUCARELLA et al., 2001; VASUDEVAN et al., 2003) ou em infecções humanas (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; JAIN; AGARWAL, 2009; LOPEZ; PETER-ROTH; CLAVERIE-MARTIN, 2002; MATHUR et al., 2006).

Cepas de *S. aureus* produzem polissacarídeo capsular (PC) *in vivo* ou sob condições culturais definidas (LEE et al., 1993; STRINGFELLOW et al., 1991). Estas cepas capsuladas são mais resistentes à absorção fagocítica do que as cepas não capsuladas (KARAKAWA et al., 1988; THAKKER et al., 1998). Em modelos de infecção estafilocócica em roedores, anticorpos anticapsulares protegeram animais contra a morte, a bacteremia, a endocardite, e a metástase para baço, fígado e rins (FATTOM et al., 1996; LEE et al., 1997).

Onze tipos de PC demonstrados por precipitação e aglutinação com antisoros monoespecíficos (SOMPOLINSKY et al., 1985). Há um consenso em relação ao fato de que PC5 e PC8 são os sorotipos predominantes em infecções estafilocócicas humanas. A avaliação da produção de cápsula por cepas de *S. aureus* isoladas de ruminantes mostrou resultados variados.

Klein et al. (2012) consideram que, no Brasil, os dados sobre as características genótípicas e fenótípicas de isolados de *S. aureus* são limitados, ressaltando a importância do país no mercado mundial de lácteos.

O rápido isolamento e a caracterização dos estafilococos do leite de vacas e novilhas são fundamentais para evitar a propagação destes agentes no rebanho e, conseqüentemente, a implantação de um controle bem sucedido da mastite (ZADOKS et al., 2002).

O presente estudo foi realizado com o objetivo de detectar a presença de genes envolvidos na produção de polissacarídeos capsulares e na formação de biofilmes em amostras de *S. aureus* isoladas de mastite bovina localizadas em três diferentes regiões do Brasil, bem como a produção de polissacarídeos capsulares e biofilmes, *in vitro*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Mastite bovina

Mastite bovina é a inflamação da glândula mamária que ocorre, principalmente, em resposta à invasão do teto por microrganismos, mas também pode ter origem traumática, alérgica ou metabólica. Quanto à forma de apresentação, a doença é classificada como clínica ou subclínica. O edema do quarto mamário, a sensibilidade ao toque, além da presença de coágulos e, algumas vezes, a presença de sangue no leite são os sintomas mais comuns da mastite clínica. Nos casos mais severos, o que se observa é uma reação generalizada, em que o animal apresenta febre, perda de apetite, desidratação e septicemia, que pode evoluir para morte (FREITAS et al., 2005).

Na maioria dos rebanhos, a forma clínica da mastite é a mais evidente e que maiores preocupações causa ao produtor. Entretanto, a forma mais comum e responsável pelos maiores prejuízos é a subclínica, que alguns especialistas preferem denominar infecção subclínica. Nesta, não há alterações visíveis no leite e no úbere. Para a sua detecção é imprescindível a realização de testes, para evidenciar a infecção ou a comprovação do aumento do número de células somáticas. Considera-se que, para cada caso de mastite clínica, ocorram entre 20 e 50 casos de mastite subclínica (RUEGG, 2012).

A mastite pode ter como causa diversos patógenos, mas são as bactérias os principais agentes etiológicos, normalmente divididas em duas categorias, os designados “contagiosos” e os “ambientais” (daí as designações mastite contagiosa e mastite ambiental). Na mastite ambiental, o reservatório do patógeno é o próprio ambiente, que pode estar presente no ar, na cama, na água e nas fezes das vacas leiteiras. Dentre os principais patógenos contagiosos encontra-se *S. aureus*. Os patógenos ambientais mais comuns são divididos em

dois grupos, coliformes e estreptococos do ambiente (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 2001).

2.2 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* foi proposto, em 1884, por Rosenbach e inserido dentro da família *Micrococaceae*. Estudos de biologia molecular, perfis de ácidos graxos, composição de parede celular e, principalmente, estudos com RNA ribossômico 16S promoveram a inclusão deste gênero em uma nova família, a *Staphylococcaceae* (GARRITY, 2006).

Staphylococcus são cocos gram-positivos, imóveis, com diâmetro entre 0,5 a 1,5 μm e, por dividirem-se em planos diferentes, quando vistos ao microscópio, aparecem na forma de cacho de uvas. São bactérias anaeróbias facultativas, com maior crescimento sob condições aeróbias, quando, então, produzem catalase (FRANCO; LANDGRAF, 2008; GARRITY, 2006). São bactérias mesófilas e a temperatura de crescimento encontra-se na faixa de 7 °C a 47,8 °C e o pH de crescimento variando entre 4,2 e 9,3, com ótimo entre 7 a 7,5 (BERGDOLL, 1990). Apresentam metabolismo respiratório e fermentativo, metabolizando carboidratos, com produção de ácidos (CUNHA NETO et al., 2002). O crescimento ocorre em ágar nutritivo e ágar-sangue (HENNEKINNE; DE BUYSER; DRAGACCI, 2012; QUINN et al., 2011). Considerando a atividade de água (a_w), os estafilococos são únicos em sua capacidade de multiplicar-se em valores inferiores aos normalmente considerados mínimos para bactérias não halofílicas. São tolerantes a concentrações de 10% a 20% de cloreto de sódio, em que o valor mínimo de a_w considerado é de 0,83 (FERREIRA, 2003; PORTOCARRERO; NEWMAN; MIKEL, 2002).

Cerca de 50 espécies de estafilococos e 24 subespécies (EUZÉBY, 2012) são reconhecidas e divididas em duas categorias: coagulase positiva e coagulase

negativa. Essa divisão é baseada na capacidade de coagulação do plasma, que é uma propriedade considerada importante como marcador de patogenicidade (BECKER; EIFF, 2011). A coagulase é uma enzima produzida por algumas espécies de estafilococos, principalmente por *S. aureus*, que, por ativação da protrombina, resulta na conversão do fibrinogênio em fibrina. O teste da coagulase tem sido largamente utilizado para diferenciação de *S. aureus* e outras espécies coagulase negativa (CHANG; HUANG, 1996; MADANI; GREENLAND; RICHARD, 1998).

A capacidade de crescer em diferentes condições ambientais faz com que *S. aureus* se desenvolva com facilidade em diversos alimentos (TRANTER, 1990). As peculiaridades do seu habitat tornam sua presença largamente distribuída na natureza, contaminando os alimentos pelos manipuladores, na maioria portadores assintomáticos, e pelos animais, principalmente gado leiteiro com mastite (BALABAN; RASOOLY, 2000).

Durante a fase exponencial, o metabolismo desta bactéria é rápido e eficiente para assegurar um crescimento constante. Conforme o tempo decorre, o metabolismo celular é reorganizado para a sobrevivência a longo prazo em condições desfavoráveis (HARRIS; FOSTER; RICHARDS, 2002).

S. aureus tem parede celular composta por camada espessa de peptidoglicano associada a ácido teicoico e proteínas estruturais, entre outros compostos. A membrana celular é uma estrutura bilaminar convencional, apresentando, em sua camada externa, ácidos lipoteicoicos ligados por pontes de dissacarídeos a um glicolípido. Esta espécie se caracteriza também por apresentar múltiplos fatores de virulência que contribuem para o estabelecimento e a manutenção da infecção (PEACOCK et al., 2002), alguns dos quais estariam relacionados com a gravidade da doença desenvolvida no hospedeiro (FOURNIER et al., 2008).

Esses elementos de virulência podem ser divididos em dois grupos, componentes associados à superfície celular e enzimas degradativas em conjunto com exotoxinas (toxinas superantigênicas). Tem sido demonstrado que, durante o cultivo *in vitro* do microrganismo, os fatores de virulência associados à superfície bacteriana se expressam, preferencialmente, na fase logarítmica de crescimento, ao passo que fatores de secreção são liberados na fase pós-logarítmica. Inicialmente, as adesinas de superfície reconheceriam as estruturas do hospedeiro, facilitando a colonização. Uma vez cumprida esta etapa, a bactéria secreta grande variedade de outros fatores pelos quais obtém nutriente, invade, sobrevive e se dissemina. Estes fatores incluem enzimas (serina proteases, cisteína proteases, lipases) e exotoxinas (α , β , γ e δ hemolisinas, leucotoxinas, enterotoxinas), que são responsáveis pelos efeitos patológicos observados durante o desenvolvimento da infecção, que danificam as células hospedeiras (células epiteliais e do sistema imune) devido ao seu efeito citolítico (NOVICK, 2003; PROJAN; NOVICK, 1997; SHOMPOLE et al., 2003).

Para alcançar a persistência intracelular, *S. aureus* deve evitar a resposta imune e inflamatória do hospedeiro. Esta fina teia regulatória seria a chave da patogênese da infecção por *S. aureus* que conduz à cronicidade da doença e que, ao mesmo tempo, permite a adaptação do microrganismo a mudanças do meio ambiente durante o curso da infecção, bem como a sobrevivência e a persistência intracelular (GARZONI et al., 2007; TUCHSCHERR et al., 2010).

Staphylococcus aureus expressa também, em sua superfície, adesinas, proteínas antiopsonizantes (proteína A, fator de aglutinação A) e camada extracelular de polissacarídeos que impedem a fagocitose do mesmo (FOSTER, 2005). Na glândula mamária bovina, uma vez que o patógeno invade o órgão, ele deve superar a ação expulsiva da ordenha frequente. É por isso que adesão, sobrevivência e multiplicação de *S. aureus* no epitélio mamário são os primeiros eventos decisivos na patogênese da infecção. Este comportamento protegeria o

patógeno da resposta imune do hospedeiro, do tratamento com antibióticos, e contribuiria para a sua persistência no tecido mamário (HEBERT et al., 2000).

2.2.1 Formação de biofilme

Diversos fatores de virulência, como exotoxinas, proteínas de superfície e polissacarídeos extracelulares de *S. aureus*, têm sido relatados em amostras isoladas de mastite bovina. Além disso, tem-se determinado que a formação de biofilme por estas cepas torna-se também um importante fator de virulência que contribui para a sua patogênese (AGUILAR; AMORENA; ITURRALDE, 2001; TÜRKYILMAZ; ESKIIZMIRLILER, 2006).

Com relação à adesão inicial, quanto mais hidrofóbica for a célula bacteriana, maior a sua capacidade de se ligar diretamente à superfície tecidual (BOARI et al., 2009; MEYLHEUC et al., 2006; SHENG; TING; PEHKONEN, 2007). Os diferentes graus de hidrofobicidade de uma célula são conferidos por fatores de virulência associados à adesão, como pili, fímbrias e flagelos, bem como pela membrana externa, e os diferentes graus de eletronegatividade conferidos pela presença de grupos funcionais polares, como fosfatos, carboxilas, hidroxilas e ácido teicoico (FLACH; KARNOPP; CORÇÃO, 2005; VANHAECKE et al., 1990).

A adesão de *S. aureus* ao epitélio da glândula mamária é considerada o primeiro ponto crítico na patogenia da mastite, sendo a maioria das cepas de *S. aureus* causadoras da doença circundada por uma camada polissacarídica espessa (*slime*) (AGUILAR; AMORENA; ITURRALDE, 2001; BASELGA et al., 1993; VASUDEVAN et al., 2003).

A habilidade de *S. aureus* de aderir à superfície do epitélio está associada à produção de biofilmes, composto de multicamadas de células embebidas em uma matriz polimérica extracelular (HARRISON; TURNER;

CERI, 2005; MELO et al., 2012) que exibem alteração fenotípica em relação ao crescimento planctônico (Figura 1) (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999).

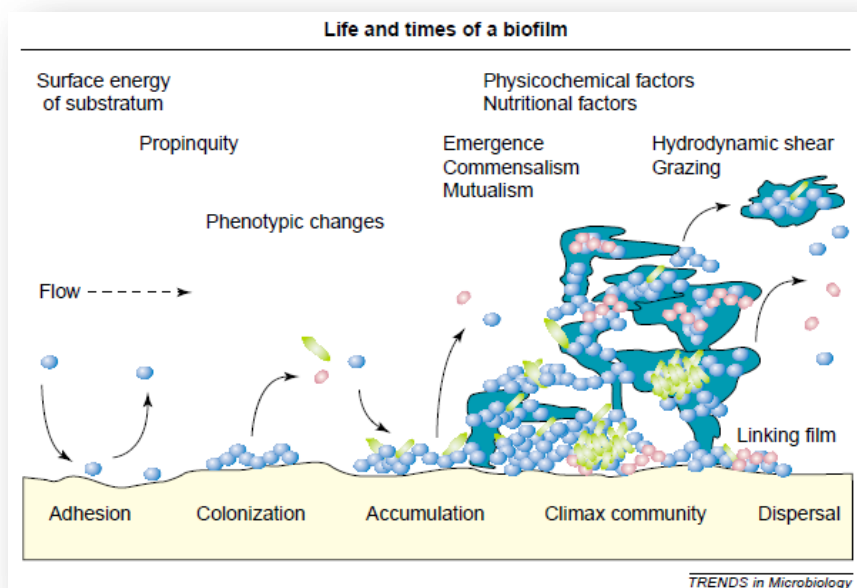


Figura 1 Ciclo de desenvolvimento do biofilme (JENKINSON; LAPPIN-SCOTT, 2001)

No biofilme, as bactérias são menos suscetíveis ao tratamento por antibióticos e à ação do sistema imune inato do hospedeiro. A capacidade de formação de biofilmes é fonte de estudo, tanto em medicina humana quanto veterinária, e a melhor compreensão desta característica fornece subsídios para a aplicação de medidas de tratamento mais eficazes na mastite bovina (MELCHIOR; VAARKAMP; FINK-GREMMELS, 2006). A camada *slime* dificulta a fagocitose por células do sistema imunológico do hospedeiro, pois este mucopolissacarídeo facilita a adesão bacteriana a biomateriais, o qual não é

removível, mesmo após lavagens sucessivas (DEGO; DIJK; NEDERBRAGT, 2002).

Sauer, Rickard e Davies (2007) identificaram biofilme como sendo um agrupamento de células microbianas associadas a superfícies, o qual se encontra envoltos por substâncias poliméricas extracelulares (*Extracellular Polymeric Substances*, EPS) hidratadas. Essas substâncias desempenham papel importante na ligação por meio de filamentos de natureza proteica ou polissacarídica e na colonização de microrganismos às superfícies de contato com alimentos.

A implicação dos biofilmes em infecções crônicas despertou interesse crescente na caracterização de genes relacionados à sua formação (CAIAZZA; O'TOOLE, 2003; LIM et al., 2004; TORMO et al., 2005). Diversos genes podem estar envolvidos na capacidade individual de cada cepa em formar biofilmes. Dentre estes, podem-se citar o gene *ica* (adesão intercelular) e o *bap* (proteína associada ao biofilme), entre outros (CRAMTON et al., 1999; CUCARELLA et al., 2004; KOZITSKAYA et al., 2004).

A matriz de EPS é responsável pela estrutura, coesão e integridade funcional do biofilme. Sua composição química, heterogênea e complexa (PEREIRA, 2001) determina a maioria das propriedades físico-químicas e biológicas das bactérias (FLEMMING; WINGENDER, 1999). Polissacarídeos, proteínas, fosfolipídeos, ácido teicóico e, até mesmo, ácidos nucleicos constituem as EPS (DONLAN; COSTERTON, 2002). O DNA extracelular, liberado pela autólise de células bacterianas, forma importante parte da matriz de EPS, influenciando tanto a estrutura do biofilme como a adesão inicial célula-superfície e célula-célula (HARMSSEN et al., 2010; THEERTHANKAR et al., 2010). No entanto, proteínas e polissacarídeos, que correspondem de 75% a 89% da composição das EPS, são os principais componentes (TSUNEDA et al., 2003).

Um dos polissacarídeos principais constituintes da matriz do biofilme é poli-N-acetil β -1,6 glucosamina (*polysaccharide intercellular adhesin*-PIA/PNAG) sintetizado por proteínas codificadas pelo grupo de genes *icaADBC*, denominado *locus* de adesão intercelular (*intercellular adhesion locus*) (GÖTZ, 2002; REZA, 2000; RISLEY et al., 2007).

Dentro deste grupo de genes, foi relatado que *icaA* e *icaD* desempenham papel importante na formação de biofilme em *S. aureus*. O gene *icaA* contém uma sequência sinal típica que codifica N-acetilglicosaminil transferase, uma enzima envolvida na síntese de oligômeros de N-acetilglicosamina a partir de UDP-N-acetilglicosamina (ARCIOLA; BALDASSARI; MONTANARO, 2001; ROMERO et al., 1999). Além disso, *icaD* tem sido associado à expressão de N-acetilglicosaminil transferase, resultando na expressão fenotípica do PC (GERKE et al., 1998).

Outros componentes, como ácidos teicoicos, proteínas de bactérias, incluindo proteína estafilocócica de superfície (*staphylococcal surface protein*-I-SSP-I), *clumping factor A*, proteínas associadas ao biofilme (*biofilm associated proteins*-Bap) e DNA extracelular contribuem também para a estrutura do biofilme (CUCARELLA et al., 2001; ROUCH; SKURRAY, 1989; VAUTOR et al., 2008).

Um dos mecanismos relacionados à produção de biofilme em *S. aureus* pode ser devido à existência da proteína Bap, sendo esta essencial para a fixação primária e a acumulação celular (SCARAMELLI; GONZÁLEZ, 2016; SIMPSON; SKURRAY; FIRTH, 2000).

O gene *bap* foi identificado em isolados de *S. aureus* de mastite bovina, nos quais tem papel fundamental na adesão em superfícies de poliestireno, adesão intercelular e formação de biofilme (CUCARELLA et al., 2001, 2002; EIFF; PETERS; HEILMANN, 2002).

No entanto, em um estudo conduzido em 350 isolados de *S. aureus* de mastite bovina e 75 isolados de casos clínicos humanos, concluiu-se que o gene *bap* estava presente em apenas 5% dos isolados de origem bovina e em nenhum dos isolados humanos. Porém, todos aqueles isolados que continham o gene resultaram em elevada capacidade de aderência e produção de biofilme (SCARAMELLI; GONZÁLEZ, 2016).

Boari et al. (2009) não observaram a formação de biofilme a 4 °C, caracterizando-se um processo de adesão microbiana. Nesta temperatura foi constatado o pior desempenho de *S. aureus* ($p < 0,005$), sendo o número máximo de células sésseis, aos 10 dias, de $3,7 \times 10^4$ UFC/cm². Este fato, em condições práticas, apontou que esta temperatura, empregada em tanques de expansão por refrigeração, seria uma alternativa à redução da formação de biofilmes por *S. aureus*. Entretanto, não se devem menosprezar os malefícios do processo de adesão. Este fato também pode ser relacionado com as espécies de *Pseudomonas* relatadas por Caixeta et al. (2012).

Millezi et al. (2013) mostraram que, após dois dias de cultivo, a bactéria *Aeromonas hydrophila* já havia formado biofilme sobre a superfície, alcançando 6,6 ciclos log UFC/cm², sendo que, após 10 dias de cultivo, o número de células sésseis aumentou para 7,8 log UFC/cm². Esse aumento ocorreu devido à multiplicação das células já aderidas, uma vez que o leite foi renovado a cada dois dias. Como foi utilizado o leite desnatado nesse trabalho, sugeriu-se que suas características nutricionais influenciaram a rápida formação do biofilme.

Em revisão realizada por Chmielewski e Frank (2003) foi demonstrado que uma camada de matéria orgânica sobre a superfície pode promover e facilitar a adesão bacteriana. Além disso, estes autores afirmam que o tempo de contato entre as células e as superfícies também exerce influência na adesão bacteriana. A adesão reversível das células às superfícies ocorre entre 20

minutos e, no máximo, 4 horas de contato. Após este período, a remoção destas células requer a aplicação de força física, produtos químicos ou calor.

Salimena et al. (2014) observaram que as células de *S. aureus* aderiram à superfície de polipropileno a partir de 48 horas, e a adesão aumentou em pequena proporção até 240 horas.

De acordo com Christensen et al. (1982) e Knobloch et al. (2001), a expressão da produção de biofilme por cepas estafilocócicas pode depender da presença de cloreto de sódio, assim como de outras condições ambientais.

Oliveira et al. (2012) avaliaram a formação de biofilme de células bacterianas aderentes em poços de microplacas de poliestireno. Ambas as estirpes bacterianas (*Escherichia coli* enteropatogênica - EPEC e *Listeria monocytogenes*) utilizadas foram capazes de aderir e formar biofilme sobre a superfície de poliestireno, sendo EPEC classificada como forte e *L. monocytogenes*, como moderada formadora de biofilme. De acordo com Banks e Bryers (1991), a dominância de determinadas espécies microbianas em um biofilme está intimamente relacionada com a sua taxa de crescimento e reprodução.

Conforme relatado por Arcuri (2000), na cadeia de produção de alimentos há correlação positiva entre a falha nos procedimentos de higiene e a formação destes filmes bacterianos, pois, havendo condições, as células aderidas evoluem para microcolônias e, assim, posteriormente, para o biofilme maduro. Além disso, a obtenção higiênica do leite e o atendimento a demais itens que compõem as boas práticas de processamento de alimentos são imprescindíveis para o controle destes microrganismos na cadeia alimentar.

Embora a base genética e fenotípica para a produção de biofilmes tenha sido bem caracterizada em diversas espécies de estafilococos em infecções associadas à presença de próteses, existem poucos estudos em relação à produção de biofilmes em isolados de *S. aureus* de mastite bovina (MELCHIOR

et al., 2009; MILANOV et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011; VASUDEVAN et al., 2003).

2.2.2 Polissacarídeos capsulares

S. aureus produzem polissacarídeos capsulares, tanto *in vivo* quanto em condições favoráveis de cultivo (LEE et al., 1993; STRINGFELLOW et al., 1991). Polissacarídeos capsulares (PC) são importantes na patogênese de infecções estafilocócicas e têm sido postulados como um dos principais fatores de virulência da bactéria (O'RIORDAN; LEE, 2004).

Foi proposta a existência de 11 sorotipos de PC isolados a partir de infecções humanas, no entanto, apenas quatro tipos (PC1, PC2, PC5 e PC8) foram isolados e caracterizados quimicamente, e não há evidência suficiente para concluir que os demais apresentem cápsulas ou estruturas quimicamente diferentes dos anteriores. Posteriormente, foi descrita a presença de outro tipo capsular, 336, em *S. aureus* isolados de mastite bovina; no entanto, sua estrutura química não foi caracterizada e demonstrou-se, recentemente, que os isolados que expressaram o polissacarídeo de superfície 336 tinham os genes *cap5* ou *cap8* (HAN; PAK; GUIDRY, 2000; O'RIORDAN; LEE, 2004).

Estes PCs que foram descritos em *S. aureus*, correspondendo aos sorotipos PC1 a PC11 e PC336, aumentam a virulência por conferir às bactérias propriedades antifagocitárias (FERRY et al., 2005).

O PC é um heterodímero de ácido N-acetil manosaminurônico (ManNAcA) e N-acetil-fucosamina (FucNAc), com grupo O-acetil, e pode estar localizado em diferentes sítios segundo o sorotipo capsular (SUTRA; POUTREL, 1994).

Existem diferentes métodos para a caracterização das cepas de *S. aureus* de acordo com o tipo de PC, e um dos mais utilizados consiste na utilização de

anticorpos policlonais ou monoclonais específicos para as cápsulas dos tipos 1, 2, 5 e 8 (KARAKAWA et al., 1988). As cepas que não reagem com nenhum desses anticorpos são consideradas como não tipáveis (NT) porque os protótipos dessas linhagens não apresentam seus antissoros correspondentes (GUIDRY et al., 1994; JONES, 2005; TUCHSCHERR et al., 2007). Cepas NT podem ser isoladas a partir 20% a 25% das infecções humanas (MIDDLETON; LUBY; ADAMS, 2009; SHINEFIELD et al., 2002).

Amostras de *S. aureus* que apresentam os sorotipos 1 e 2 são altamente encapsuladas e originam colônias mucoides em meio sólido, facilmente observadas por microscopia. Os sorotipos 5 e 8 são denominados microencapsulados, já que produzem pouco material capsular, originando colônias não mucoides, compactas em meio sólido, que são indistinguíveis das colônias geradas por cepas não encapsuladas (O'RIORDAN; LEE, 2004; SUTRA; POUTREL, 1994).

De todos os sorotipos relatados, PC1 e PC2 são raramente encontrados, enquanto PC5 e PC8 foram presentes a partir de infecções humanas e bovinas. PC5 e PC8 são os tipos capsulares predominantes, presentes em 85%-90% dos isolados clínicos de *S. aureus* em diferentes estudos (GUIDRY et al., 1997; ROGHMANN et al., 2005; ROMERO et al., 1999; SOMPOLINSKY et al., 1985; SORDELLI et al., 2000; SUTRA; RAINARD; POUTREL, 1990; TOLLERSRUD et al., 2000).

Estruturalmente, PC5 e PC8 demonstram grandes semelhanças. Ambos são compostos pelos mesmos açúcares.

Tipo 5 $\rightarrow 4$)- β -D-ManNAcA-(1 \rightarrow 4)- α -L-FucNAc(3OAc)-(1 \rightarrow 3)- β -D-FucNAc-(1 \rightarrow

Tipo 8 \rightarrow 3)- β -D-ManNAcA(4OAc)-(1 \rightarrow 3)- α -L-FucNAc-(1 \rightarrow 3)- α -D-FucNAc-(1 \rightarrow

No entanto, diferem em algumas ligações, na configuração anomérica de um dos resíduos FucNAc e na localização do grupo O-acetil (JONES, 2005). Além disso, o *locus* do PC5 e PC8 é alélico e compreende uma região de 17,5 kb do cromossoma (O'RIORDAN; LEE, 2004), cada uma contendo 16 genes estritamente relacionados, a partir de *capA* a *capP*, transcritos em uma orientação (SAU et al., 1997). Por conseguinte, as sequências de aminoácidos previstas de 12 dos 16 genes de quadros de leitura abertos do grupo de genes *cap5* e *cap8* são quase idênticas. Os genes específicos se encontram na região central do *locus* que compreende os genes *cap5H* (*cap8H*) para *cap5K* (*cap8K*) (O'RIORDAN; LEE, 2004) (Figura 2). A expressão dos genes ocorre *in vitro*, principalmente durante a fase de crescimento pós-exponencial, e é influenciada por fatores ambientais, tais como concentração de sal e pH (TUCHSCHERR et al., 2010).

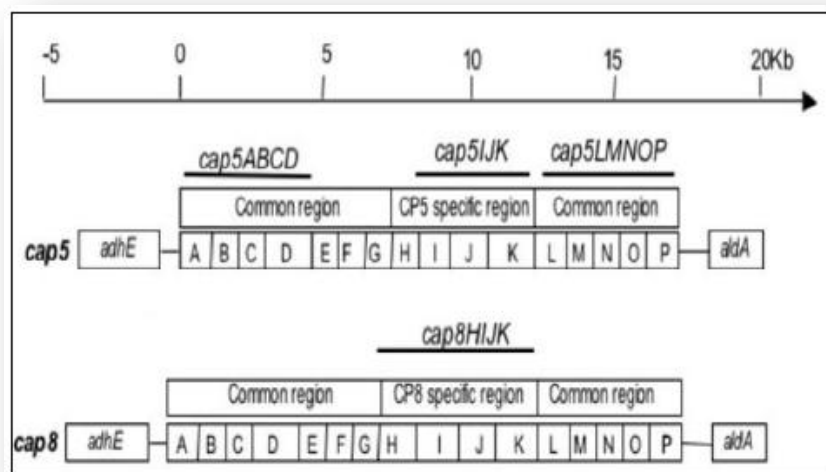


Figura 2 Comparação de genes *cap5* e *cap8* de *Staphylococcus aureus*. *cap5* e *cap8* consistem em 16 genes (desde *capA* até *capP*), ladeados pelos genes *adhE* (upstream) e genes *aldA* (downstream). Os genes estão apresentados em caixas (SAU et al., 1997)

São descritas variações entre as amostras PC5 e PC8 de *S. aureus* isoladas de infecção intramamária bovina de diferentes localidades geográficas (GUIDRY et al., 1997; IKAWATY et al., 2010; POUTREL et al., 1988; REVELLI; RODRÍGUEZ, 2001; SOMPOLINSKY et al., 1985; SORDELLI et al., 2000; TOLLERSRUD et al., 2000).

Em estudo conduzido por Tollersrud et al. (2000), nos Estados Unidos e na Europa, *cap5* foi amplificado em 14,9% e *cap8* em 27,1% dos isolados de *Staphylococcus* spp. oriundos de mastite bovina.

Dois estudos realizados com *S. aureus* isolados de rebanhos leiteiros dos EUA (GUIDRY et al., 1998; TOLLERSRUD et al., 2000) reportaram em torno de 40% de amostras típaveis para os tipos capsulares 5 e 8, com prevalência do sorotipo 8. No estudo de Guidry et al. (1998), as amostras NT para os sorotipos 5 e 8 (59%) foram típaveis para o sorotipo 336.

Na França, 69% dos 212 isolados recuperados a partir de leite de vacas eram do sorotipo 5 (51%) ou 8 (18%) (POUTREL et al., 1988). Em contrapartida, apenas 17% das amostras de *S. aureus* isoladas de mastite bovina em Israel produziram o sorotipo 5 ou 8 (SOMPOLINSKY et al., 1985). Em estudo realizado por Sordelli et al. (2000), apenas 14% das 195 estirpes bovinas isoladas na Argentina reagiram com anticorpos para PC5 ou PC8. Guidry et al. (1997, 1998) verificaram a presença de cápsulas dos sorotipos 5 e 8 entre *S. aureus* isolados de vacas com mastite nos Estados Unidos e em quatro países europeus. Os resultados mostraram que os 100% dos isolados americanos e 70% dos isolados europeus foram tipificáveis com anticorpos para PC5 ou PC8.

2.2.2.3 Papel dos polissacarídeos capsulares na virulência de *S. aureus*

Em diversos estudos tem sido demonstrado que a cápsula é um fator de virulência de suma importância na patogênese das infecções estafilocócicas e

que os sorotipos PC5 e PC8 desempenham papel importante na patogenicidade das bactérias, pois impedem a ativação do complemento e tornam a bactéria resistente a opsonofagocitose. Desse modo, dificultam sua eliminação e incrementam sua habilidade para disseminar-se e sobreviver na corrente sanguínea e nos tecidos (ORRIORDAN; LEE, 2004; XU; ARBEIT; LEE, 1992).

A opsonofagocitose é mediada por anticorpos específicos para as moléculas da membrana ou pela ligação a receptores bacterianos (ORRIORDAN; LEE, 2004). Por isso, anticorpos contra a cápsula favorecem a opsonização, a fagocitose e, subsequentemente, a remoção das bactérias que se encontram dentro dos fagossomas de macrófagos humanos e de bovinos (CUNNION; ZHANG; FRANK, 2003; GUIDRY et al., 1997). Portanto, os PC, entre outros antígenos, têm sido considerados candidatos atrativos para serem incluídos em vacinas experimentais (LEE et al., 2005).

Existe uma vacina comercial, disponível para o controle de mastite por *S. aureus*, que contém cepas capsuladas que expressam diferentes sorotipos de PC presentes na população de isolados bovinos nos Estados Unidos (MA; COCCHIARO; LEE, 2004). Consequentemente, o conhecimento sobre a presença e a distribuição geográfica dos sorotipos capsulares nas principais fazendas leiteiras é de interesse para estimar a utilidade de se incorporar estes componentes em desenhos de vacinas.

No que diz respeito à influência da produção da cápsula na aderência de *S. aureus* a células do endotélio, verifica-se que a adesão é elevada durante a fase logarítmica de crescimento, quando a produção de PC é mínima. Em seguida, na fase estacionária de crescimento bacteriano, a expressão de PC é máxima e a capacidade de aderência de bactérias diminui. Estes dados sugerem que a expressão do PC5 e 8 mascara as adesinas presentes na superfície celular, impedindo a união da bactéria às células endoteliais (ORRIORDAN; LEE, 2004).

Em diversos modelos de infecção animal, tem sido demonstrado que cepas de *S. aureus* capsuladas são mais virulentas do que o seu mutante isogênico não capsulado (NILSSON et al., 1997; WATTS et al., 2005). No entanto, cepas não capsuladas, utilizadas para induzir infecção experimental em ratas, foram mais virulentas e persistiram por mais tempo na glândula mamária das ratas, em comparação com a cepa parental de *S. aureus* (TUCHSCHERR et al., 2005). Além disso, os mutantes sem cápsula têm demonstrado ser mais aderentes às células endoteliais e plaquetas do que as cepas capsuladas (POHLMANN-DIETZE et al., 2000; RISLEY et al., 2007).

As cepas de *S. aureus* sem cápsulas são internalizadas pelas células epiteliais mamárias da espécie bovina em maior número do que as cepas isogênicas produtoras de PC5 ou PC8 (BUZZOLA et al., 2007). A produção de cápsula impede a interação entre *S. aureus* e os fagócitos, bem como a interação entre *S. aureus* e outras células de mamíferos. Estes resultados sugerem que a modulação da expressão da cápsula pode ser um atributo importante desse patógeno, melhorando sua capacidade de sobreviver em uma variedade de nichos ambientais. De maneira semelhante, a produção de PC também pode depender, *in vivo*, da fase de crescimento (POHLMANN-DIETZE et al., 2000).

Durante os estágios iniciais da infecção, *S. aureus* expressa proteínas de aderência que lhe permitem fixar ao endotélio da glândula mamária e colonizar tecidos. Portanto, quando exposto ao leite, a bactéria que expressa o PC inibe a aderência e dificulta a fagocitose (LUONG; LEE, 2002).

2.2.2.4 Produção de cápsula *in vitro* e *in vivo*

S. aureus produz PC tanto *in vivo* quanto em condições definidas de cultivo (LEE et al., 1993; STRINGFELLOW et al., 1991). Os sorotipos 5 e 8 são os de maior prevalência em animais, estando associados a 70%-80% dos

isolados (GUIDRY et al., 1997; SORDELLI et al., 2000; SUTRA; POUTREL, 1994; TOLLERSRUD et al., 2000; TUCHSCHERR et al., 2007).

A expressão de PC5 e PC8 é altamente sensível a diversos sinais ao seu entorno e, provavelmente, influenciada pelo ambiente. Condições de crescimento bacteriano, tais como meio de cultura, têm demonstrado grande influência na produção da cápsula (DASSY et al., 1991; POUTREL; GILBERT; LEBRUN, 1995).

O crescimento de *S. aureus* sob limitadas concentrações de ferro e em meio sólido aumenta a produção de PC8 (LEE et al., 1993). Observou-se o aumento da produção de PC5 sob alta tensão de oxigênio, mas redução em condições alcalinas de crescimento ou na presença de extrato de levedura (DASSY et al., 1991; HERBERT et al., 1997; STRINGFELLOW et al., 1991). A produção de cápsula *in vitro* é incrementada na presença de leite ou em meio suplementado com cloreto de sódio. No entanto, não é afetada por meio que contém fosfato. Uma pequena quantidade de cápsula é produzida na fase logarítmica de crescimento e a produção máxima ocorre durante o período pós-exponencial (CUNNION; ZHANG; FRANK, 2003; DASSY et al., 1991; FOX; STEWART; FOX, 1998; POHLMANN-DIETZE et al., 2000; POUTREL; GILBERT; LEBRUN, 1995; SUTRA; RAINARD; POUTREL, 1990).

Foi demonstrado em estudos que o dióxido de carbono regula a expressão de PC5 tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Embora PC5 tenha sido expresso sob condições normais de oxigênio, a expressão deste em três diferentes cepas de sorotipo 5 foi inibida quando cultivadas em atmosfera suplementada com CO₂. A detecção quantitativa de PC8 em diferentes cepas de *S. aureus* cultivadas na presença de CO₂ gerou resultados conflitantes; algumas cepas expressaram a produção, enquanto em outras a expressão foi inibida (HERBERT et al., 1997, 2001).

Arbeit e Nelles (1997) detectaram PC8 em soro de rato com endocardite provocada por cepa de sorotipo 8, mas não no soro de animais infectados com cepa de sorotipo 5.

Utilizando cepa produtora de PC5, Hensen et al. (2000) detectaram a presença deste polissacarídeo *in vivo* em infecções mamárias agudas e crônicas de bovinos.

Na França, 70% de 212 cepas de *S. aureus* isoladas de casos de mastites clínicas e subclínicas expressaram PC5 ou PC8 (POUTREL et al., 1988). Em estudo realizado em Israel, de dezessete isolados a partir de dez propriedades leiteiras, apenas três isolados foram tipificáveis sorologicamente e o restante foi NT (SOMPOLINSKY et al., 1985). Naidu et al. (1991) reportaram que, de 100 isolados de *S. aureus* provenientes de bovinos com mastite em Malmö, Suécia, 70% produziram PC5 ou PC8.

Guidry et al. (1997) encontraram prevalência de cepas capsuladas entre 48% e 87%, nos EUA e em diferentes países da Europa, com variabilidade significativa entre os países. Por outro lado, no Japão, a prevalência dos sorotipos capsulares 5 e 8 foi de 89,6% (HATA et al., 2006).

No estudo de Guidry et al. (1998), em torno de 40% das amostras isoladas de rebanhos leiteiros dos EUA foram típicas para os tipos capsulares 5 e 8, e 70% das amostras provenientes de rebanhos leiteiros de quatro países da Europa foram típicas para os mesmos tipos capsulares.

Tollersrud et al. (2000) encontraram associação significativa entre a expressão capsular e as manifestações clínicas para PC8. Esses autores sugeriram correlação entre a expressão de PC e a gravidade dos casos clínicos de mastite causada por *S. aureus* isolados na Islândia e na Irlanda.

A informação bibliográfica sobre sorotipos capsulares em isolados de *S. aureus* que causam mastite para a região da América do Sul é escassa. Sordelli et al. (2000) analisaram 195 isolados de *S. aureus* provenientes de bovinos com

mastite em 22 províncias da Argentina e encontraram prevalência de 13,7% de cepas capsuladas. Destas, 7,1% produziram PC5 e 6,6% produziram PC8, enquanto os 86,3% restantes não reagiram com os anticorpos para PC5 e PC8.

Em estudo recente, empregou-se *polymerase chain reaction* (PCR) para detectar a presença dos *loci* capsulares *cap5* e *cap8* em 157 *S. aureus* isolados de mastite clínica e subclínica nas províncias argentinas de Santa Fé (n=91), Buenos Aires (n=31), Córdoba (n=22) e Entre Rios (n=13). Sessenta e quatro por cento dos isolados apresentaram os genes *cap5* ou *cap8* e 50% os expressaram (CAMUSSONE et al., 2012).

Marques et al. (2013) encontraram os genes *cap5* e *cap8* em seis e oito isolados, entre 38 *S. aureus* isolados de mastite no estado de Rio de Janeiro, respectivamente.

Em estudo realizado por Ambroggio et al. (2013), foi relatada a prevalência de cepas capsuladas PC5, de 23,6% no Chile e de 26,3% no Uruguai. A porcentagem de cepas NT foi de 76,4% no Chile e de 73,7% no Uruguai e, em ambos os casos, o percentual de cepas NT foi maior do que os percentuais relatados na Argentina.

No intuito de gerar informações sobre fatores de virulência de amostras de *S. aureus* isoladas no Brasil, o presente estudo foi realizado com o objetivo de detectar a presença de genes envolvidos na produção de polissacarídeos capsulares e na formação de biofilmes em amostras de *S. aureus* isoladas de mastite bovina localizadas em três diferentes regiões do Brasil, bem como a produção de polissacarídeos capsulares e biofilmes, *in vitro*.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

S. aureus produz diversos fatores de virulência que são responsáveis por modular a resposta imune do hospedeiro e contribuir diretamente para a patogênese das infecções. Componentes da superfície bacteriana desempenham papel essencial na adesão da bactéria aos tecidos do hospedeiro e os PC são responsáveis por conferirem resistência à fagocitose e à atividade de complemento, que são fundamentais para o controle e a eliminação da infecção.

Algumas cepas de *S. aureus* são capazes de formar biofilme, que consiste na aglomeração de DNA extracelular, proteínas e polissacarídeos, favorecendo a adesão e o aumento da atividade inflamatória.

Apesar de já existirem estudos que descrevem as variações na prevalência de PC5 e PC8 entre as amostras de *S. aureus* isoladas de infecção intramamária bovina de diferentes localidades geográficas, nenhum estudo demonstrou a prevalência de algum sorotipo no Brasil, que seria de fundamental importância para o desenvolvimento de estratégias de controle.

O estudo permitiu caracterizar estirpes de *S. aureus* isoladas de mastite bovina de diferentes estados brasileiros quanto à produção de PC e à formação de biofilme.

Com esta proposta, a contribuição científica irá proporcionar dados nacionais publicados de prevalência sobre sorotipos de PC de *S. aureus*, assim como informações a respeito da produção de biofilme por estas estirpes, provenientes de casos de mastite de diferentes regiões do país.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, B.; AMORENA, B.; ITURRALDE, M. Effect of slime on adherence of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine and ovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 78, n. 2, p. 183-191, Jan. 2001.
- AMBROGGIO, M. B. et al. Relevamiento de tipos capsulares de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina de Argentina, Chile y Uruguay. **Revista Argentina de Microbiología**, Buenos Aires, v. 45, p. 80, Sept. 2013.
- ARBEIT, R. D.; NELLES, M. J. Capsular polysaccharide antigenemia in rats with experimental endocarditis due to *Staphylococcus aureus*. **Journal of Infectious Diseases**, Boston, v. 155, n. 2, p. 242-246, Aug. 1987.
- ARCIOLA, C. R.; BALDASSARI, L.; MONTANARO, L. Presence of *icaA* and *icaD* and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 6, p. 2151-2156, Feb. 2001.
- ARCURI, E. F. Biofilmes bacterianos na indústria de alimentos. **Revista Leite e Derivados**, São Paulo, v. 9, n. 53, p. 40-45, 2000.
- BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 61, n. 1, p. 1-10, Oct. 2000.
- BANKS, M. K.; BRYERS, J. D. Bacterial species dominance within a binary culture biofilm. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 7, p. 1974-1979, July 1991.
- BASELGA, R. et al. Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: implications in colonization and virulence. **Infection and Immunity**, Washington, v. 61, n. 11, p. 4857-4862, Nov. 1993.
- BECKER, K.; EIFF, C. *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase-positive Cocci. In: VERSALOVIC, J. et al. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. Washington: ASM, 2011. p. 308-330.
- BERGDOLL, M. S. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 100, n. 2, p. 91-100, Mar. 1990.

BOARI, C. A. et al. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 4, p. 886-895, out./dez. 2009.

BUZZOLA, F. et al. Differential abilities of capsulated and noncapsulated *Staphylococcus aureus* isolates from diverse *agr* groups to invade mammary epithelial cells. **Infection and Immunity**, Washington, v. 75, n. 2, p. 886-891, Nov. 2007.

CAIAZZA, N. C.; O'TOOLE, G. A. Alpha-toxin is required for biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 185, n. 10, p. 3214-3217, May 2003.

CAIXETA, D. S. et al. Chemical sanitizers to control biofilms formed by two *Pseudomonas* species on stainless steel surface. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 32, n. 1, p. 142-150, Mar. 2012.

CAMUSSONE, C. et al. Genotypic and phenotypic detection of capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections in Argentina. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 1010-1014, July/Sept. 2012.

CERCA, N. et al. Molecular basis for preferential protective efficacy of antibodies directed to the poorly acetylated form of staphylococcal poly-*n*-acetyl-(1-6)-glucosamine. **Infection and Immunity**, Washington, v. 75, n. 7, p. 3406- 3413, Apr. 2007.

CHANG, T. C.; HUANG, S. H. Evaluation on coagulase activity and protein A production for the identification of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 58, n. 8, p. 858-862, Aug. 1996.

CHMIELEWSKI, R. A. N.; FRANK, J. F. Biofilm formation and control in food processing facilities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Athens, v. 2, n. 1, p. 22-32, Nov. 2003.

CHRISTENSEN, G. D. et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 22, n. 6, p. 996-1006, Dec. 1982.

COELHO, S. M. O. et al. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 5, p. 369-374, maio 2009.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infection. **Science**, New York, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, May 1999.

CRAMTON, S. E. et al. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. **Infection and Immunity**, Washington, v. 67, n. 10, p. 5427-5433, Oct. 1999.

CUCARELLA, C. et al. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, n. 9, p. 2888-2896, May 2001.

CUCARELLA, C. et al. Expression of the biofilm-associated protein interferes with host protein receptors of *Staphylococcus aureus* and alters the infective process. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, n. 6, p. 3180-3186, June 2002.

CUCARELLA, C. et al. Role of biofilm associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 72, n. 4, p. 2177-2185, Apr. 2004.

CUNHA NETO, A. et al. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 3, p. 263-271, set./dez. 2002.

CUNNION, K.; ZHANG, H.; FRANK, M. Availability of complement bound to *Staphylococcus aureus* to interact with membrane complement receptors influences efficiency of phagocytosis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, n. 2, p. 656-662, Feb. 2003.

DASSY, B. et al. Production of type 5 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus* grown in a semisynthetic medium. **Journal of General Microbiology**, London, v. 137, n. 1, p. 1155-1162, Dec. 1991.

DEGO, K. O.; DIJK, J. E. van; NEDERBRAGT, H. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion: a review. **Veterinary Quarterly**, The Hague, v. 24, n. 4, p. 181-198, Nov. 2002.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilm: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 15, n. 2, p. 167-193, Apr. 2002.

EIFF, C. von; PETERS, G.; HEILMANN, C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. **Lancet Infectious Diseases**, London, v. 2, n. 11, p. 677-685, Oct. 2002.

EUZÉBY, J. P. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature Genus *Staphylococcus***. 2012. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>>. Acesso em: 19 fev. 2016.

FATTOM, A. et al. A *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide (CP) vaccine and CP-specific antibodies protect mice against bacterial challenge. **Infection and Immunity**, Washington, v. 64, n. 5, p. 1659-1665, May 1996.

FERREIRA, A. C. **Uso do açafrão (*Curcuma longa* L.) na redução de *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 em ricotta**. 2003. 76 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

FERRY, T. et al. Virulence determinants in *Staphylococcus aureus* and their involvement in clinical syndromes. **Current Infectious Disease Reports**, New York, v. 7, n. 1, p. 420-428, Dec. 2005.

FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com confeites: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, n. 3, p. 291-296, ago. 2005.

FLEMMING, H. C.; WINDENGER, J. Extracellular polymeric substances (EPS): the biofilm construction material. In: BIOFOULING AND MATERIALS: EDMZ, COST 520 WORKSHOP, 1999, Bern. **Proceedings...** Bern, 1999. p. 2-18.

FOSTER, T. J. Immune evasion by staphylococci. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, n. 12, p. 948-58, Dec. 2005.

FOURNIER, C. et al. Bovine *Staphylococcus aureus*: association of virulence genes, genotypes and clinical outcome. **Research in Veterinary Science**, London, v. 85, n. 3, p. 439-48, Jan. 2008.

FOX, K.; STEWART, G.; FOX, A. Synthesis of microcapsule by *Staphylococcus aureus* is not responsive to environmental phosphate concentrations. **Infection and Immunology**, Washington, v. 66, n. 8, p. 4004-400, Aug. 1998.

FRANCO, B.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Ateneu, 2008. 182 p.

FREITAS, M. F. L. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. **Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 2, p. 171-177, abr./jun. 2005.

GAD, G. F. M. et al. Detection of *icaA*, *icaD* genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients. **Journal of Infection in Developing Countries**, Rome, v. 3, n. 5, p. 342-351, Mar. 2009.

GARRITY, G. M. **Bergey's manual of systematic bacteriology: the low G+C gram positives**. New York: Springer-Verlang, 2006. v. 3, 721 p.

GARZONI, C. et al. A global view of *Staphylococcus aureus* whole genome expression upon internalization in human epithelial cells. **BMC Genomics**, Geneva, v. 8, n. 171, p. 1-14, June 2007.

GERKE, C. et al. Characterization of the N- acetylglucosaminyl-transferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* - polysaccharide intercellular adhesin. **Journal of Biology Chemesty**, La Jolla, v. 273, n. 29, p. 18586-18596, 1998.

GÖTZ, F. *Staphylococcus* and biofilms. **Molecular Microbiology**, Baltimore, v. 43, n. 6, p. 1367-1378, 2002.

GUIDRY, A. J. et al. Effect of whole *Staphylococcus aureus* and mode of immunization on bovine opsonizing antibodies to capsule. **Journal of Dairy Science**, Beltsville, v. 77, n. 10, p. 2965-2974, Oct. 1994.

GUIDRY, A. J. et al. Prevalence of capsular serotypes among *Staphylococcus aureus* isolates from cows with mastitis in the United States. **Veterinary Microbiology**, Beltsville, v. 59, n. 1, p. 53-58, Dec. 1997.

GUIDRY, A. J. et al. Serotyping scheme for *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis. **American Journal of Veterinary Research**, Beltsville, v. 59, n. 12, p. 1537-1539, Dec. 1998.

HAN, H. R.; PAK, S.; GUIDRY, A. Prevalence of capsular polysaccharide (CP) types of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk and protection of *S. aureus* infection in mice with CP vaccine. **Journal of Veterinary Medical Science**, Sapporo, v. 62, n. 12, p. 1331-1333, Aug. 2000.

HARMSSEN, M. et al. Role of extracellular DNA during biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 7, p. 2271-2279, Apr. 2010.

HARRIS, L.; FOSTER, S.; RICHARDS, R. An introduction to *Staphylococcus aureus* and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. **European Cells and Materials**, Geneva, v. 4, n. 3, p. 39-60, Aug. 2002.

HARRISON, J. J.; TURNER, R. J.; CERI, H. Persister cells, the biofilm matrix and tolerance to metal cations in biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. **Environmental Microbiology**, Wageningen, v. 7, n. 7, p. 981-994, Mar. 2005.

HATA, E. et al. Characteristics and epidemiologic genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitic milk in Hokkaido, Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, London, v. 68, n. 2, p. 165-170, Feb. 2006.

HEBERT, A. et al. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 193, n. 1, p. 57-62, Sept. 2000.

HENNEKINNE, J. A.; DE BUYSER, M. L.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 36, n. 4, p. 815-836, Nov. 2012.

HENSEN, S. et al. Use of bovine primary mammary epithelial cells for the comparison of adherence and invasion ability of *S. aureus* strain. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 3, p. 418-429, Mar. 2000.

HERBERT, S. et al. Regulation of *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide type 5: CO₂ inhibition *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Infectious Diseases**, London, v. 176, n. 2, p. 431-438, Aug. 1997.

HERBERT, S. et al. Regulation of *Staphylococcus aureus* type 5 and type 8 capsular polysaccharide by CO₂. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, n. 15, p. 4609-4613, Aug. 2001.

IKAWATY, R. et al. Virulence factors of genotyped bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates in the Netherlands. **International Journal of Dairy Science**, Wageningen, v. 5, n. 2, p. 60-70, 2010.

JAIN, A.; AGARWAL, A. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 76, n. 1, p. 88-92, Jan. 2009.

JENKINSON, H. F.; LAPPIN-SCOTT, H. M. Biofilms adhere to stay. **Trends in Microbiology**, Bristol, v. 9, n. 1, p. 9-10, Jan. 2001.

JONES, C. Revised structures for the capsular polysaccharides from *Staphylococcus aureus* Types 5 and 8, components of novel glycoconjugate vaccines. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 340, n. 6, p. 1097-1106, May 2005.

KARAKAWA, W. W. A. et al. Capsular antibodies induce type-specific phagocytosis of capsulated *Staphylococcus aureus* by human polymorphonuclear leukocytes. **Infection and Immunity**, Washington, v. 56, n. 5, p. 1090-1095, May 1988.

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

KNOBLOCH, J. K. M. et al. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. **Medical Microbiology and Immunology**, Berlin, v. 191, n. 2, p. 101-106, June 2002.

KOZITSKAYA, S. et al. The bacterial insertion sequence element IS256 occurs preferentially in nosocomial *Staphylococcus epidermidis* isolates: association with biofilm formation and resistance to aminoglycosides. **Infection and Immunity**, Washington, v. 72, n. 2, p. 1210-1215, Feb. 2004.

LANGE, C. et al. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 67, n. 2, p. 127-141, June 1999.

LEE, J. C. et al. Effect of a trivalent vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis lymphocyte subpopulations, antibody production and neutrophil phagocytosis. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 69, n. 1, p. 11-18, Aug. 2005.

LEE, J. C. et al. Effects of in vitro and in vivo growth conditions on expression of type 8 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 61, n. 5, p. 1853-1858, May 1993.

LEE, J. C. et al. Protective efficacy of antibodies to the *Staphylococcus aureus* type 5 capsular polysaccharide in a modified model of endocarditis in rats. **Infection and Immunity**, Washington, v. 65, n. 10, p. 4146-4151, July 1997.

LIM, S. et al. Molecular typing of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Korea. **Journal of Veterinary Medical Science**, Sapporo, v. 66, n. 5, p. 581-584, Jan. 2004.

LOPEZ, J. V.; PETER-ROTH, E.; CLAVERIE-MARTIN, F. Detection of *Staphylococcus aureus* clinical isolates harboring the *ica* gene cluster needed for biofilm establishment. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 4, p. 1569-1570, Apr. 2002.

LUONG, T.; LEE, C. Overproduction of type 8 capsular polysaccharide augments *Staphylococcus aureus* virulence. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, n. 7, p. 3389-3395, July 2002.

MA, J.; COCCHIARO, J.; LEE, J. C. Evaluation of serotypes of *Staphylococcus aureus* strains used in the production of a bovine mastitis bacterin. **Journal of Dairy Science**, Boston, v. 87, n. 1, p. 178-182, Jan. 2004.

MADANI, N. B.; GREENLAND, T.; RICHARD, Y. Exoprotein and slime production by coagulase-negative staphylococci isolated from goat's milk. **Veterinary Microbiology**, Wageningen, v. 59, n. 2/3, p. 139-145, Jan. 1998.

MARQUES, V. F. et al. Análise fenotípica e genotípica da virulência de *Staphylococcus* spp. e de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da mastite bovina. **Revista Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro v. 33, n. 2, p. 161-170, abr. 2013.

MATHUR, T. et al. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci and evaluation of three different screening methods. **Indian Journal of Medical Microbiology**, New Delhi, v. 24, n. 1, p. 25-29, Jan. 2006.

MELCHIOR, M. B. et al. Biofilm formation and genotyping of *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: evidence for lack of penicillin-resistance in Agr-type II strains. **Veterinary Microbiology**, Wageningen, v. 137, n. 1/2, p. 83-89, May 2009.

MELCHIOR, M. B.; VAARKAMP, H.; FINK-GREMMELS, J. Biofilms: a role in recurrent mastitis infection? **Veterinary Journal**, Wageningen, v. 171, n. 3, p. 398-407, May 2006.

MELO, P. D. C. et al. Phenotypic and molecular analysis of biofilm production by *Staphylococcus aureus* strains isolated of bovine. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, n. 1, p. 94-99, Jan./Feb. 2012.

MEYLHEUC, T. et al. Adsorption on stainless steel surfaces of biosurfactants produced by gram-negative and gram-positive bacteria: consequence on the bioadhesive behavior of *Listeria monocytogenes*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 52, n. 2, p. 128-137, May 2006.

MIDDLETON, J. R.; LUBY, C. D.; ADAMS, D. S. Efficacy of vaccination against staphylococcal mastitis: a review and new data. **Veterinary Microbiology**, Wageningen, v. 134, n. 1/2, p. 192-198, Feb. 2009.

MILANOV, D. et al. Slime production and biofilm forming ability by *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates. **Acta Veterinaria**, Praha, v. 60, n. 2/3, p. 217-226, Sept. 2010.

MILLEZI, A. F. et al. Reduction of *Aeromonas hydrophyla* biofilm on stainless steel surface by essential oils. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 44, n. 1, p. 73-80, Apr. 2013.

NAIDU, A. et al. Bovine lactoferrin receptors in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 4, p. 1218-1226, Apr. 1991.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Current concepts of bovine mastitis**. 4th ed. Madison, 2001. 64 p.

NILSSON, I. et al. The role of staphylococcal polysaccharide microcapsule expression in septicemia and septic arthritis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 65, n. 10, p. 4216-4221, Oct. 1997.

NOVICK, R. P. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. **Molecular Microbiology**, New York, v. 48, n. 6, p. 1429-1449, May 2003.

OLIVEIRA, M. et al. Invasive potential of biofilm-forming Staphylococci bovine subclinal mastitis isolates: short communication. **Journal of Veterinary Science**, Wageningen, v. 12, n. 1, p. 95-97, Mar. 2011.

OLIVEIRA, M. M. M. de et al. Control of planktonic and sessile bacterial cells by essential oils. **Food and Bioproducts Processing**, Amsterdam, v. 90, n. 4, p. 809-818, Oct. 2012.

O'RIORDAN, K.; LEE, J. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 17, n. 1, p. 218-234, Jan. 2004.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Reviews in Microbiology**, Palo Alto, v. 54, n. 1, p. 49-79, Oct. 2000.

PEACOCK, S. J. et al. Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, n. 9, p. 4987-4996, Sept. 2002.

PEREIRA, M. O. P. O. **Comparação da eficácia de dois biocidas (carbamato e glutaraldeído) em sistemas de biofilme**. 2001. 234 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) - Universidade do Minho, Braga, 2001.

POHLMANN-DIETZE, P. et al. Adherence of *Staphylococcus aureus* to endothelial cells: influence of capsular polysaccharide, global regulator *agr*, and the bacterial growth phase. **Infection and Immunity**, Washington, v. 68, n. 9, p. 4865-4871, Sept. 2000.

PORTOCARRERO, S. M.; NEWMAN, M.; MIKEL, B. *Staphylococcus aureus* survival, staphylococcal production and shelf stability of country-cured hams manufactured under different processing procedures. **Meat Science**, Barking, v. 62, n. 2, p. 267-273, Oct. 2002.

POUTREL, B. et al. Prevalence of capsular polysaccharide types 5 and 8 among *Staphylococcus aureus* isolates from cow, goat, and ewe milk. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 26, n. 1, p. 38-40, Jan. 1988.

POUTREL, B.; GILBERT, F.; LEBRUN, M. Effects of culture conditions on production of type 5 capsular polysaccharide by human and bovine *Staphylococcus aureus* strains. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, New York, v. 2, n. 2, p. 166-171, Mar. 1995.

PROJAN, S. J.; NOVICK, R. P. The molecular basis of pathogenicity. In: _____. **The staphylococci in human disease**. New York: Churchill Livingstone, 1997. p. 55-81.

QUINN, P. J. et al. **Veterinary microbiology and microbial disease**. 2nd ed. New York: J. Wiley, 2011. 400 p.

REIS, S. R.; SILVA, N.; BRESCIA, M. V. Antibioticoterapia para controle da mastite subclínica de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 6, p. 651-658, dez. 2003.

REVELLI, G.; RODRÍGUEZ, C. G. Prevalencia de agentes etiológicos causales de mastitis bovina en la zona noroeste de Santa Fe y sur de Santiago del Estero: respuesta a la sensibilidad antimicrobiana. **Tecnología Láctea Latinoamericana**, Buenos Aires, v. 6, n. 23, p. 48-53, 2001.

REZA, G. Mastitis bovina su reconocimiento clínico, programas de prevención y su terapia con antimastiticos a base de cefapirinas. **Mastitis Bovina su Reconocimiento Clínico**, Mexico, DF, v. 1, p. 1-13, 2000.

RISLEY, A. et al. Production of PC masks clumping factor A mediated adherence of *Staphylococcus aureus* to fibrinogen and platelets. **Journal of Infectious Diseases**, Boston, v. 196, n. 6, p. 919-927, Apr. 2007.

ROGHMANN, M. et al. Epidemiology of capsular and surface polysaccharide in *Staphylococcus aureus* infections complicated by bacteraemia. **Journal of Hospital Infection**, Baltimore, v. 59, n. 1, p. 27-32, Jan. 2005.

ROMERO, A.; CANIZAL, J.; POLANCO, J. Adopción de tecnología en control de mastitis y calidad de leche en establos del área de Xochimilco, D.F. In: REUNIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN PECUARIA. MÉRIDA, 1999, Yucatán. **Anales...** Yucatán, 1999. p. 19-22.

ROUCH, D.; SKURRAY, R. IS257 from *Staphylococcus aureus*: member of an insertion sequence superfamily prevalent among gram-positive and gram-negative bacteria. **Gene**, Amsterdam, v. 76, n. 2, p. 195-205, Mar. 1989.

RUEGG, P. L. New perspectives in udder health management. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, Madison, v. 28, n. 2, p. 149-163, Apr. 2012.

SALIMENA, A. P. S. et al. Scanning electron microscopy of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and polypropylene surfaces. **African Journal of Microbiology Research**, Nairobi, v. 8, n. 34, p. 3136-3143, Aug. 2014.

SAU, S. et al. The *Staphylococcus aureus* allelic genetic loci for serotype 5 and 8 capsule expression contain the type-specific genes flanked by common genes. **Microbiology**, New York, v. 143, n. 7, p. 2395-2405, July 1997.

SAUER, K.; RICKARD, A. H.; DAVIES, D. G. Biofilms and biocomplexity. **Microbe-American Society for Microbiology**, Washington, v. 2, n. 7, p. 347-353, 2007.

SCARAMELLI, A.; GONZÁLEZ, Z. **Epizootiología y diagnóstico de la mastitis bovina**. Disponível em:
<http://avpa.ula.ve/docuPDFs/libros_online/manualganaderia/seccion5/articulo9s5.pdf> . Acesso em: 16 fev. 2016.

SHENG, X.; TING, Y. P.; PEHKONEN, S. O. Force measurements of bacterial adhesion on metals using a cell probe atomic force microscope. **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v. 310, n. 2, p. 661-669, June 2007.

SHINEFIELD, H. et al. Use of a *Staphylococcus aureus* conjugate vaccine in patients receiving hemodialysis. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 346, n. 7, p. 491-496, Feb. 2002.

SHOMPOLE, S. et al. Biphasic intracellular expression of *Staphylococcus aureus* virulence factors and evidence for Agr-mediated diffusion sensing. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 49, n. 4, p. 919-927, July 2003.

SIMPSON, A.; SKURRAY, R.; FIRTH, N. An IS257-derived hybrid promoter directs transcription of a tetA(K) tetracycline resistance gene in the *Staphylococcus aureus* chromosomal mec region. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 182, n. 12, p. 3345-3352, June 2000.

SOMPOLINSKY, D. et al. Encapsulation and capsular types in isolates of *Staphylococcus aureus* from different sources and relationship to phage types. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 22, n. 5, p. 828-834, Nov. 1985.

SORDELLI, D. O. et al. Capsule expression by bovine isolates of *Staphylococcus aureus* from Argentina: genetic and epidemiological analyses. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 2, p. 846-850, Feb. 2000.

STRINGFELLOW, W. et al. *Staphylococcus aureus* growth and type 5 capsular polysaccharide production in synthetic media. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 2, p. 618-621, Feb. 1991.

SUTRA, L.; POUTREL, B. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 40, n. 2, p. 79-89, Feb. 1994.

SUTRA, L.; RAINARD, P.; POUTREL, B. Phagocytosis of mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* and expression of type 5 capsular polysaccharide are influenced by growth in the presence of milk. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 28, n. 10, p. 2253-2258, Oct. 1990.

THAKKER, M. et al. *Staphylococcus aureus* serotype 5 capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model. **Infection and Immunity**, Washington, v. 66, n. 11, p. 5183-5189, Nov. 1998.

THEERTHANKAR, D. et al. Role of extracellular DNA in initial bacterial adhesion and surface aggregation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 10, p. 3405-3408, May 2010.

TOLLERSRUD, T. et al. Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus* and others *Staphylococcus* spp. from Europe and the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 8, p. 2998-3003, Aug. 2000.

TORMO, M. Á. et al. Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? **Microbiology**, New York, v. 151, n. 7, p. 2465-2475, July 2005.

TRANTER, H. S. Foodborne staphylococcal illness: foodborne illness. **Lancet**, London, v. 27, n. 8722, p. 1044-1046, Oct. 1990.

TSUNEDA, S. et al. Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 223, n. 2, p. 287-292, June 2003.

TUCHSCHERR, L. et al. Antibodies to capsular polysaccharide and clumping factor A prevent mastitis and the emergence of unencapsulated and small-colony variants of *Staphylococcus aureus* in mice. **Infection and Immunity**, Washington, v. 76, n. 12, p. 5738-5744, Dec. 2005.

TUCHSCHERR, L. et al. *Staphylococcus aureus* adaptation to the host and persistence: role of loss of capsular polysaccharide expression. **Future Microbiology**, London, v. 5, n. 12, p. 1823-1832, Dec. 2010.

TUCHSCHERR, L. P. N. et al. Characterization of a new variant of IS257 that has displaced the capsule genes within bovine isolates of *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 75, n. 11, p. 5483-5488, Nov. 2007.

TÜRKYILMAZ, S.; ESKIIZMIRLILER, S. Detection of slime factor production and antibiotic resistance in *Staphylococcus* strains isolated from various animal clinical samples. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, Ankara, v. 30, n. 2, p. 201-206, Apr. 2006.

VANHAECKE, E. et al. Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to 304 and 316-L stainless steel: role of cell surface hydrophobicity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 3, p. 788-795, Mar. 1990.

VASUDEVAN, P. et al. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**, Wageningen, v. 92, n. 1/2, p. 179-185, Mar. 2003.

VAUTOR, E. et al. Evaluation of the presence of the *bap* gene in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from human and animal species. **Veterinary Microbiology**, Wageningen, v. 127, n. 3, p. 407-411, Mar. 2008.

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

XU, S.; ARBEIT, R.; LEE, J. Phagocytic killing of encapsulated and microencapsulated *Staphylococcus aureus* by human polymorphonuclear leukocytes. **Infection and Immunity**, Washington, v. 60, n. 4, p. 1358-1362, Apr. 1992.

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

ZAFALON, L. F. et al. Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: custo-benefício da antibioticoterapia de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 59, n. 3, p. 577-585, jun. 2007.

SEGUNDA PARTE**ARTIGO****Genotypic and phenotypic detection of capsular polysaccharide and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk collected from Brazilian dairy farms**

Artigo submetido conforme normas da Revista Research in Veterinary Science - RVSC-16-152

A.P.S. Salimena^{a,c}, C.C. Lange^{a*}, C. Camussone^b, M. Signorini^b, L.F. Calvino^b, M.A.V.P. Brito^a, C.A.V. Borges^a, A.S. Guimarães^a, J.B. Ribeiro^a, L.C. Mendonça^a, R.H. Piccoli^c

^aEmbrapa Dairy Cattle Research Center, Rua Eugênio do Nascimento 610, 36038-330 Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

^bRafaela Agricultural Experimental Station, INTA, Ruta 34, km 227, (2300) Rafaela, Santa Fe, Argentina

^cFederal University of Lavras, Food Science Department, PO Box 3037, 37200-000 Lavras, Minas Gerais, Brazil

*Corresponding author. Tel: +55 3233117452, Fax: +55 3233117401. E-mail: carla.lange@embrapa.br

Abstract

Staphylococcus aureus is a pathogen that frequently causes mastitis in bovine herds worldwide. This pathogen produces several virulence factors, including cell-associated adhesins, toxic and cytolytic exoproteins, and capsular polysaccharides. The aim of the present study was to test for the presence of genes involved in capsular polysaccharide production and biofilm formation in *S. aureus* isolated from bovine mastitis samples collected from 119 dairy herds located in three different Brazilian regions, as well as the production of capsular polysaccharides and biofilms, *in vitro*. The detection of the *cap*, *icaAD*, and *bap* genes was performed using PCR. The detection and quantification of capsular polysaccharide production was performed using antisera and ELISA assays. The ability of the isolates to form a biofilm was examined using the polystyrene surface of microtiter plates. All 159 *S. aureus* isolates investigated harboured the *cap* gene: 80% carried the *cap5* gene and 20% carried the *cap8* gene. Sixty-nine percent of the isolates expressed capsular polysaccharide (CP) *in vitro*, 58% expressed CP5 and 11% expressed CP8. All of the isolates harboured the *icaA* and *icaD* genes, and 95.6% of the isolates carried the *bap* gene. Of the 159 isolates analysed, 97.5% were biofilm producers. A significant association between the capsular genotype and phenotype and the amount of biofilm formation was detected. These results indicate a high potential for pathogenicity among *S. aureus* isolated from bovine milk collected from three different regions in Brazil.

Keywords: *cap*, *icaAD*, *bap*, capsule, adhesin

1. Introduction

Staphylococcus aureus is a bacterial pathogen that is responsible for a diverse spectrum of human and animal diseases. It is regarded as a very common pathogen that causes bovine mastitis, and many virulence factors contribute to the pathogenesis of staphylococcal infections (O’Riordan and Lee, 2004; Fournier et al., 2008). The knowledge of these virulence factors is of fundamental importance for the control of disease, and some of them have been targeted as components for vaccine development (Cocchiaro et al., 2006; Scali et al., 2015).

The pathogenesis of a particular *S. aureus* strain is attributed to the combined effect of extracellular factors and toxins together with the invasive properties of the strain, such as adherence, biofilm formation, and resistance to phagocytosis (Cucarella et al., 2001).

Capsular polysaccharide (CP) or the capsule is a cell wall bacterial component that protects bacteria from phagocytic uptake and enhances microbial virulence. Although eleven capsular polysaccharide serotypes have been identified, only the polysaccharides from serotypes 1, 2, 5, and 8 have been purified and chemically characterized (O’Riordan and Lee, 2004). Among them, types 5 and 8 are the most representative in clinical infection isolates from various geographic origins (Verdier et al., 2007). Serotype 336 has been reported by Guidry et al. (1998), but it is a cell wall surface antigen, specifically, a polyribitol phosphate N-acetylglucosamine, which resembles teichoic acid from the cell wall (Verdier et al., 2007).

The distribution of capsular serotypes among *S. aureus* isolates from bovine mastitis from different countries shows great variability (Poutrel et al., 1988; Guidry et al., 1998; Tollersrud et al., 2000; Han et al., 2000; Hata et al., 2006; Camussone et al., 2012). According to Guidry et al. (1998), the extracellular polysaccharide capsule is particularly relevant to bovine mastitis,

because 94 to 100% of *S. aureus* strains isolated from bovine mastitis are encapsulated.

A biofilm is a structured community of bacterial cells that are enclosed in a self-produced, polymeric matrix that adheres to an inert or living surface and constitutes a protected mode of growth that allows survival in a hostile environment (Costerton et al., 1999). Biofilms are inherently tolerant to host defences and antibiotic therapies and are the root of many persistent and chronic bacterial infections (Costerton et al., 1999), including bovine mastitis (Cucarella et al., 2004; Fox et al., 2005).

There is a consensus that the primary determinant of the accumulation phase of staphylococcal biofilm formation is polysaccharide intercellular adhesin (PIA). Production of PIA is mediated by the *icaADBC* operon, and strains harbouring this cluster are potential biofilm producers (Heilmann et al., 1996; Cramton et al., 1999).

Some proteins involved in biofilm formation have also been identified in staphylococci, including biofilm associated protein (Bap), which is encoded by the *bap* gene (Götz, 2002). Cucarella et al. (2001) demonstrated that Bap is not only involved in the primary attachment step but is also, together with PIA, involved in cell-to-cell aggregation and thus biofilm maturation. Lasa and Penades (2006) observed that staphylococcal isolates harbouring the *bap* gene were strong biofilm producers, even in the absence of the *icaADBC* operon.

Because there is scarce information about these virulence factors in *S. aureus* isolates from Brazilian dairy herds, taking into consideration the continental size of the country and the growing importance of the dairy sector, the aim of the present study was to evaluate the presence of genes involved in CP production and biofilm formation in *S. aureus* isolated from bovine milk from three different Brazilian regions and to assess the production of both CPs and biofilms *in vitro*. This information is important to estimate the usefulness of

incorporating both components, capsules and biofilm, in a future vaccine formulation appropriated for our country.

2. Material and Methods

2.1 Bacterial isolates

A total of 159 *S. aureus* isolates were included in this study. The isolates were randomly selected from a collection of bovine milk bacteria maintained at the Embrapa Dairy Cattle Research Center (Juiz de Fora, Brazil). They were isolated from 119 dairy herds located in south, southeast, and north Brazil, over a nineteen-year period (1994 - 2013) (Table 1). The isolates were identified by Gram staining and catalase, coagulase, and acetoin production according to the National Mastitis Council (2004). Phenotypic identification of *S. aureus* was confirmed by PCR amplification of the *femA* gene, which is specific for *S. aureus*, according to Mehrotra et al. (2000). Samples were stored at -80°C in skim milk (Difco, Sparks, MD, USA) containing 10% glycerol (Cromoline, Diadema, SP, Brazil). Bacterial cultures obtained from frozen stocks were grown on plates containing BHI agar (Brain Heart Infusion Agar, Himedia, Mumbai, India) for 24 h at 37°C.

2.2 PCR assays

The detection of two genes involved in polysaccharide production (i.e., *cap5* and *cap8*) and three genes involved in biofilm formation (i.e., *icaA*, *icaD*, and *bap*) was performed using PCR. Whole cell DNA was extracted using a standard phenol-chloroform procedure as described by Hesselbarth and Schwarz (1995). The primers used in the PCR reactions, the size of the amplified products and the PCR cycling conditions are described in Table 2.

For amplifications, PCR mixtures containing PCR Master Mix [10 x (100 mM Tris-HCl pH 8.8 and 500 mM KCl), 1.7 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, and 1.5 U of Taq DNA polymerase] (Ludwig Biotech, Alvorada, RS, Brazil), 10 pmol/μL of each primer and 100 ng of target DNA were used. For *cap* amplifications, the prototype *S. aureus* strains CP5 (Reynolds) and CP8 (Becker) were used as positive controls. The PCR reactions were performed on a GeneAmp® PCR System 9700 thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The PCR products were analysed by electrophoresis on 1.5% agarose gels stained with ethidium bromide.

2.3 Sequence analysis of the amplicons

The amplicons obtained in the PCR assays were sequenced by commercial sequencing facilities (i.e., Myleus Biotecnologia, Belo Horizonte, MG, Brazil and Setor de Sequenciamento de DNA da Universidade de São Paulo, SP, Brazil) to check their identity with the *cap5*, *cap8*, *icaA*, *icaD*, and *bap* genes. The primers used for the sequencing reactions were the same as those for the PCR amplifications. Sequence comparisons were made using the DNA Baser Sequence Assembler v3.5.4 (Heracle BioSoft SRL, www.DnaBaser.com). Contigs were blasted against the *Staphylococcus* spp. nucleotide database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

2.4 Detection of polysaccharide production

Antibodies: Sera from mice immunized with CP5 and CP8 bound to human serum albumin were used. Sera were kindly provided by Nazarena Pujato (Pujato et al., 2015).

Isolation and purification of CP: The CP from the prototype *S. aureus* CP5 (Reynolds) and CP8 (Becker) and from all isolates carrying *cap5* or *cap8*

genes were extracted as described by Fattom et al. (1990). The polysaccharide concentration was determined using the phenol-sulphuric acid method (Dubois et al., 1956), and CPs were visualized using SDS-Page and silver staining. The absence of proteins was verified using the bicinchoninic acid assay (Smith et al., 1985) and SDS-Page followed by Coomassie Blue staining.

ELISA: Assays were performed as follows: 5 µg of purified CPs from isolates genotyped as carrying *cap5* and *cap8* were used as antigens to sensitize 96-well plates. Plates were blocked with PBS-low-fat milk (5%) and incubated with CP5 or CP8 antisera (1/200), respectively. Finally, a goat anti-rabbit IgG conjugated to alkaline peroxidase was used as the secondary antibody, and the reaction was developed with TMB (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). All incubations were carried out at 37°C, for 60 minutes. Optical Densities (OD) were measured at 450 nm using an ELISA plate reader (Infinite® F50, Tecan, Grödig, Austria).

2.5 Detection of biofilm formation

The ability of the *S. aureus* isolates to form a biofilm was examined according to Stepanovic et al. (2007) using the polystyrene surface of flat-bottomed 96-well microtiter plates. Bacterial cultures were incubated in 5 mL of Trypticase Soy Broth (TSB, Difco, Sparks, MD, USA) at 37°C for 24 h. After incubation, the cultures were diluted with sterile TSB to obtain a turbidity similar to the 0.5 McFarland scale (i.e., $\sim 10^8$ CFU/mL) and diluted again 1:100 in TSB supplemented with 1% glucose (Merck, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) to obtain an inoculum of approximately 10^6 CFU/mL. Diluted bacteria were vortexed and then inoculated in a microtiter plate (200 µL per well). Each isolate was tested in triplicate, and the assay was repeated three times. Negative controls were represented by wells containing 200 µL of TSB. Inoculated plates were covered with a lid and incubated for 24 h at 37°C. After incubation, the

content of the wells was discarded and each well was washed three times with 300 μ l of sterile phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2). After washing, the remaining attached bacteria were heat-fixed by incubating at 60°C for 60 min. The adherent biofilm layer formed in each well was stained with 150 μ L of 2% crystal violet for 15 min at room temperature. The stain was then aspirated and the plate was rinsed under running tap water until the washings were free of stain. After the plate was air-dried at room temperature, the dye bound to the cells was eluted using 150 μ L of 95% ethanol (v/v) per well. Lastly, the covered plate was left at room temperature for 30 min without shaking. The absorbance at 570 nm was measured using a microplate reader (Microplate Spectrophotometer Eon™, BioTek® Instruments, Winooski, VT, USA). To analyse the results of biofilm formation on polystyrene microtiter plates, the bacteria adhesion capacity was classified as one of the four following categories: a non-biofilm producer, weak biofilm producer, moderate biofilm producer, or strong biofilm producer according to Stepanovic et al. (2007).

2.6 Statistical analyses

Fisher's exact test was used to test for an association between genotype (i.e., *cap5* or *cap8*) and biofilm formation (i.e., strong, moderate, weak, or non-biofilm categories) and between the biofilm formation and polysaccharide production. When a significant association was detected, the measures of association for ordinal variables, Goodman and Kruskal's gamma coefficient, Stuart's tau-c statistic and the 95% confidence interval were used to report the strength and direction of the association.

The existence of a correlation between the optical densities for CPs and biofilms was assessed by means of the Spearman's rank correlation and Pearson's linear correlation coefficient; the later was calculated by the logarithm of the densities. All analyses were conducted using R software version 3.1.3 (R

Core Team, 2015), with the exception of the estimation of the measures of association, which were conducted using the FREQ procedure of SAS version 9.2 (SAS Institute Inc., 2009). For all tests, statistical significance was considered when p was less than or equal to 0.05.

3. Results

3.1 Polysaccharide production

Two genes involved in polysaccharide production (i.e., *cap5* and *cap8*) were evaluated by PCR. Amplification of *cap* genes resulted in amplicons with the expected sizes, as presented in Table 2. DNA sequencing of the fragments obtained from two isolates carrying *cap5* or *cap8* confirmed that the fragments were representative of these genes.

All 159 isolates amplified one of the two *cap* genes: 128 isolates (80%) amplified *cap5* and 31 isolates (20%) amplified *cap8* gene (Table 3). Thus, the majority of the isolates analysed were of the *cap5* genotype. The *cap5* genotype predominated in the isolates from the north (96%) and southeast (82%) regions, while only 47% of the isolates from the south were *cap5*, and the remaining isolates were *cap8*.

Isolates genotyped as *cap5* and *cap8* were tested with rabbit sera anti-CP5 and anti-CP8, respectively. Of the 159 *S. aureus* analysed, 92 (58%) expressed CP5 and 17 (11%) expressed CP8. Fifty isolates (31%) expressed neither CP5 nor CP8 (Table 3).

Of the 128 isolates genotyped as *cap5*, 92 (72%) expressed CP5 and 36 (28%) did not express CP5 and were considered to be phenotypically non-typeable. Of the 31 isolates genotyped as *cap8*, 17 (55%) expressed CP8 and 14 (45%) did not and were considered to be phenotypically non-typeable.

Globally, all 159 isolates from this study harboured one of the searched genes, *cap5* or *cap8*; however, only 109 isolates (69%) expressed CP *in vitro*. A higher percentage of isolates carrying the *cap8* gene did not express CP8 *in vitro* (45%) compared with isolates carrying the *cap5* gene that did not express CP5 (28%). This difference, however, was not statistically significant.

3.2 Biofilm formation

Three genes involved in biofilm formation (i.e., *icaA*, *icaD*, and *bap*) were also evaluated by PCR. All 159 *S. aureus* isolates showed amplification products that were 1315 bp and 381 bp in length, corresponding to the *icaA* and *icaD* genes, respectively. One-hundred-fifty-two isolates (95.6%) amplified a 598-bp product, corresponding to the *bap* gene. DNA sequencing of the fragments obtained by PCR from the three isolates carrying *icaA*, *icaD*, or *bap* confirmed that the fragments were a part of the amplified genes.

Of the 159 isolates analysed, 155 (97.5%) were biofilm producers: 73 isolates (45.9%) were considered to be strong biofilm producers, 47 isolates (29.6%) were classified as moderate biofilm producers and 35 isolates (22%) were classified as weak biofilm producers. Four isolates (2.5%) did not produce a biofilm. There was a predominance of the strong biofilm producer phenotype among isolates from the north (68%) and southeast (46.1%), while in the south, moderate (47%) and weak (41%) biofilm producers predominated (Table 4).

Of the 159 isolates tested, 152 had the three genes related to biofilm production, *icaA*, *icaD*, and *bap*. These isolates were classified as strong (72 isolates), moderate (44 isolates), weak (32 isolates), or non-biofilm-forming (4 isolates). The seven isolates that did not harbour the *bap* gene were biofilm producers. They were classified as strong (1 isolate), moderate (3 isolates), and weak (3 isolates) biofilm formers.

3.3 Polysaccharide production versus biofilm formation

Fifty six percent of the *cap5* isolates (and 53% of the CP5 isolates) were strong biofilm producers, whereas 93.6% of the *cap8* isolates (and 88% of the CP8 isolates) were moderate or weak producers (Table 5). There was evidence of a statistically significant association between the genotype (i.e., *cap5* or *cap8*) and amount of biofilm produced (i.e., strong, moderate, weak, or

non-biofilm categories) ($p_{\text{Fisher}} < 0.0001$; $\gamma_{\text{GK}} = -0.73$, 95% CI = -0.87 to -0.59; $\tau_c = -0.36$, 95% CI = -0.48 to -0.24) and between the phenotype (i.e., CP5 or CP8) and amount of biofilm produced ($p_{\text{Fisher}} = 0.0004$; $\gamma_{\text{GK}} = -0.69$, 95% CI = -0.90 to -0.48; $\tau_c = -0.28$, 95% CI = -0.43 to -0.14). We also found a statistically significant negative correlation of moderate intensity ($r_{\text{Pearson}} = -0.42$ for the logarithm of the variables; $p < 0.0001$; $r_{\text{Spearman}} = -0.42$; $p < 0.0001$) between the optical densities for CP production and biofilm formation.

4. Discussion

4.1 Polysaccharide production

Capsule production by *S. aureus* enhances microbial virulence by rendering the bacteria resistant to phagocytosis. The prevalence of encapsulated *S. aureus* among bovine mastitis samples is variable and influenced by the geographic source of the isolate (Cocchiario et al., 2006).

In the present study, all *S. aureus* isolates carried *cap* genes and were classified based on the presence or absence of either the *cap5* or *cap8* genes. The presence of *cap* genes in all of the isolates analysed was also reported in the studies conducted by Tollersrud et al. (2000), Salasia et al. (2004), Bardiau et al. (2014), and Khichar and Kataria (2014), with *S. aureus* isolated from bovine mastitis, as well as by Verdier et al. (2007), with *S. aureus* isolated from human infections. Nevertheless, Reinoso et al. (2008) and Camussone et al. (2012) in Argentina, Babra et al. (2013) in Australia and Marques et al. (2013) in Brazil reported lower percentages of *S. aureus* isolates collected from bovine mastitis samples carrying the *cap* gene.

Eighty percent of the isolates from this study were classified as *cap5* and the remainder as *cap8*. A higher proportion of *cap5* isolates (compared to *cap8* isolates) has also been reported by Salasia et al. (2004) in Indonesia, Reinoso et

al. (2008) and Camussone et al. (2012) in Argentina, and Khichar and Kataria (2014) in India. Other studies conducted in different countries reported that *cap5* and *cap8* were evenly distributed among *S. aureus* isolates from bovine mastitis (Bar-Gal et al., 2015) or that there was a higher proportion of *cap8* than *cap5* isolates (Salasia et al., 2004; Babra et al., 2013; Marques et al., 2013; Bardiau et al., 2014).

In our study, 58% of the isolates expressed CP5 and 11% expressed CP8. A higher proportion of isolates expressing CP5 has also been reported in studies conducted by Poutrel et al. (1988) in France and by Camussone et al. (2012) in Argentina. However, several studies that examined the CP serotype among *S. aureus* from bovine mastitis samples reported a higher proportion of serotype 8 in relation to serotype 5 or similar proportions between the two phenotypes in different countries in Europe, the USA, Korea, Japan, and Belgium (Guidry et al., 1998; Tollersrud et al., 2000; Han et al., 2000; Hata et al., 2006, Bardiau et al., 2014).

According to O’Riordan and Lee (2004), the expression of *S. aureus* CP5 and CP8 *in vitro* is highly sensitive to various environmental signals and is probably influenced by the *in vivo* environment as well. Bacterial growth conditions, such as the culture medium, have been shown to influence CP production. Capsule production *in vitro* is inhibited by yeast extract, alkaline growth conditions and anaerobiosis, but is enhanced by the growth of the bacterium in milk or in medium supplemented with up to 5% NaCl. The growth conditions could be the reason for the different results observed among the several studies and for the large number of phenotypically non-typeable isolates observed in this and other studies.

Mutations or deletions within the *cap* locus may be the reason for the failure to react to capsular antisera, as suggested previously. Cocchiario et al. (2006) demonstrated that strains that were positive for *cap* genes but that were

phenotypically non-typeable had mutations in essential *cap* genes, in regulatory loci or in the promoter upstream the *cap 5(8)A* gene, resulting in a CP-negative phenotype. These authors also reported bovine *S. aureus* strains that did not hybridize to any of the capsule genes, which indicates that the *cap 5(8)* gene cluster is absent. Tuchscher et al. (2007) detected a variant of IS257 that displaced the capsule genes within phenotypically non-typeable *S. aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina. The authors hypothesized that the deletion of the *cap5(8)* locus occurred in the past and that non-typeable isolates may have enhanced the ability to persist in subclinical intramammary infections in cows.

4.2 Biofilm formation

The ability of *S. aureus* to form biofilms helps the bacterium to survive in hostile environments within the host and is considered to be responsible for chronic and persistent infections, including bovine mastitis (Costerton et al., 1999; Cucarella et al., 2004).

Regarding the presence of *icaA* and *icaD* genes, 100% of the isolates from this study contained both genes, indicating that all harboured the *icaADBC* locus. Studies conducted with *S. aureus* isolated from bovine mastitis in different countries reported the concomitant presence of both genes in most of the *S. aureus* isolates analysed (Vasudevan et al., 2003; Cucarella et al., 2004, Szweda et al., 2012; Melo et al., 2013; Prenafeta et al., 2014; Bar-Gal et al., 2015; Castelani et al., 2015; Fabres-Klein et al., 2015). Moreover, other studies (Ciftci et al., 2009; Dhanawade et al., 2010; Coelho et al., 2011; Darwish and Asfour, 2013; Marques et al., 2013) reported that lower percentages of *S. aureus* of bovine origin harboured these genes.

Regarding the presence of the *bap* gene, it was present in 95.6% of the isolates from this study, a very high percentage compared with previous studies.

Sung et al. (2008), Vautor et al. (2008), and Szweda et al. (2012) did not find this gene among *S. aureus* isolated from bovine mastitis specimens, whereas Darwish and Asfour (2013) found only one isolate harbouring the *bap* gene. Cucarella et al. (2004) in Spain and Zuniga et al. (2015) in Brazil reported that 25.6% and 15.8% of *S. aureus* isolates from bovine mastitis samples harboured this gene, respectively.

Vautor et al. (2008) reported that the prevalence of the *bap* gene among *S. aureus* isolates, including bovine mastitis isolates, was very low. Conversely, most of the isolates analysed in the present study harboured this gene. The nature of the discrepancies between studies may be due to geographical differences. The *bap*-positive isolates from this study were obtained from farms located at different geographical regions and over a long time period, so a clonal origin of the isolates was discarded.

Tremblay et al. (2013) found biofilm-associated genes in coagulase-negative staphylococci (CNS) isolated from milk samples from Canadian dairy farms, including the *bap* gene. The distribution of the *bap* gene among CNS species varied considerably; in the species *Staphylococcus xylosus*, *bap* was detected in 92% of the isolates, a result similar to ours, although the isolates belonged to different staphylococcal species.

Concerning biofilm formation on polystyrene microtiter plates, only four isolates were not able to produce a biofilm *in vitro*. The percentage of biofilm producer isolates found in this study was similar to those reported by Babra et al. (2013), Darwish and Asfour (2013), Melo et al. (2013), and Krewer et al. (2015) in studies conducted with *S. aureus* isolated from bovine mastitis samples from Australia, Egypt and Brazil. In these studies and in our study, the percentage of biofilm producing isolates was high, ranging from 97% to 100% positivity. The percentage of biofilm producing isolates in our study was, however, higher than those reported by Vasudevan et al. (2003), Fox et al. (2005), Dhanawade et al.

(2010), Coelho et al. (2011), Szweda et al. (2012), Marques et al. (2013), Bardiau et al. (2014), and Fabres-Klein et al. (2015) with *S. aureus* from bovine mastitis samples. In studies conducted in Brazil, Coelho et al. (2011), Marques et al. (2013), and Fabres-Klein et al. (2015) found that 80%, 81% and 87% of isolates produced biofilms, respectively.

In this study almost half of the isolates were strong biofilm producers; the remainder of the isolates were moderate and weak biofilm producers. The number of strong biofilm producers was higher than that reported by Krewer et al. (2015) in *S. aureus* isolated from bovine mastitis samples from northeast Brazil.

The microtiter plate method is frequently used to detect biofilm production, but different protocols have been used in these investigations. The different culture conditions and biofilm quantification *in vitro* and also the interpretation criteria can contribute to different results between studies (Götz, 2002; Stepanovic et al., 2007; Prenafeta et al., 2014). Prenafeta et al. (2014) obtained different results for biofilm production by methicillin-resistant bovine *S. aureus* using two different interpretation criteria. Xue et al. (2014) reported that milk and lactose increased biofilm formation in two bovine mastitis *S. aureus* isolates. Fabres-Klein et al. (2015) demonstrated that milk and slime production are factors that have a positive effect on biofilm production by bovine *S. aureus*. In addition, they suggested that bovine isolates of *S. aureus* adapt to the milieu found in the udder, with milk influencing biofilm production and consequently promoting bacterial survival. According to Götz (2002), the failure of *ica*-positive staphylococcal isolates to form a biofilm *in vitro* could be due to point mutations in the locus or to the insertion of sequence elements which can turn on or off *ica* expression.

In the present study, we found a significant association between the capsular genotype and phenotype and the amount of biofilm formation, i.e., *cap5*

(or CP5) isolates tended to form more biofilm than *cap8* (or CP8) isolates. We also observed a negative correlation between the optical densities for CP production and biofilm formation, which may suggest that isolates that produce a thicker CP layer produce a thinner biofilm layer, and vice-versa.

Bardiau et al. (2014) investigated and correlated properties that may be associated with persistent mastitis, including the expression of CP5 and CP8 and biofilm production. They also observed a correlation between the capsular profile and biofilm production. As in the present study, these authors also reported that more *cap8* isolates were weak biofilm producers. On the other hand, Babra et al. (2013) investigated the association between biofilm formation and capsular phenotypes from *S. aureus* isolated from bovine mastitis samples from Australia and did not find an association between both features. However, isolates in the latest study were not categorized in relation to the amount of biofilm formed as they were in the present study and in the study from Bardiau et al. (2014).

We observed that isolates from the Brazilian southern region differed in the capsular genotype and the presence of the *bap* gene from isolates from the southeastern and northern regions. Nevertheless, due to the small number of isolates from the southern region that were analysed, this observation should be confirmed using a larger number of isolates from this region.

The great number of biofilm producer isolates observed in this study could explain the failure to treat mammary infections caused by *S. aureus* and the persistence of the infection by these organisms that is frequently reported in the literature and also by field veterinarians and producers. Staphylococcal cells embedded in a biofilm or in microcolonies are much more resistant to antibiotics than planktonic cells, and once a biofilm is formed, treatment with currently available antibiotics is difficult (Götz et al., 2002). Veh et al. (2015)

demonstrated that strains persisting through the dry period produced significantly more biofilm *in vitro* than strains that do not persist after calving.

5. Conclusion

All of the *S. aureus* isolates analysed in this study harboured genes involved in capsule production, and 69% produced capsular polysaccharide *in vitro*. All of the isolates also harboured genes that are involved in biofilm formation, and 97.5% formed a biofilm on polystyrene microtiter plates. A significant association between the capsular genotype and phenotype and the amount of biofilm formation was detected. These results indicate a high pathogenicity potential among *S. aureus* isolated from bovine milk in three different Brazilian regions and suggest that both capsule production and biofilm formation play an important role in the virulence of *S. aureus* isolated from bovine mammary glands in Brazil.

Conflict of interest statement

None.

Acknowledgements

This work was supported through funding from the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa, 02.13.14.001.00.00) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 403098/2013-0). Alessandra P. S. Salimena received a scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes). The authors express their appreciation to Marcos Aurélio Souto Silva for providing technical assistance.

References

Babra, C., Tiwari, J.G., Pier, G., Thein, T.H., Sunagar, R., Sundareshan, S., Isloor, S., Hedge, N.R., Wet, S., Deighton, M., Gibson, J., Constantino, P., Wetherall, J., Mukkur, T., 2013. The persistence of biofilm-associated antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical bovine mastitis cases in Australia. *Folia Microbiologica* 58, 469-474.

Bardiau, M., Detilleux, J., Farnir, F., Mainil, J.G., Ote, I., 2014. Association between properties linked with persistence in a collection of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Veterinary Microbiology* 169, 74-79.

Bar-Gal, G.K., Blum, S.E., Hadas, L., Ehricht, R., Monecke, S., Leitner, G., 2015. Host-specificity of *Staphylococcus aureus* causing intramammary infections in dairy animals assessed by genotyping and virulence genes. *Veterinary Microbiology* 176, 143-154.

Camussone, C., Rejf, P., Pujato, N., Schwab, A., Marcipar, I., Calvino, L.F., 2012. Genotypic and phenotypic detection of capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections in Argentina. *Brazilian Journal of Microbiology* 43, 1010-1014.

Castelani, L., Pilon, L.E., Martins, T., Pozzi, C.R., Arcaro, J.R.P., 2015. Investigation of biofilm production and *icaA* and *icaD* genes in *Staphylococcus aureus* isolated from heifers and cows with mastitis. *Animal Science Journal* 86, 340-344.

Ciftci, A., Findik, A., Onuk, E.E., Savasan, S., 2009. Detection of methicillin resistance and slime factor production of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis. *Brazilian Journal of Microbiology* 40, 254-261.

Cocchiaro, J.L., Gomez, M.I., Risley, A., Solinga, R., Sordelli, D.O., Lee, J.C., 2006. Molecular characterization of the capsule locus from non-typeable *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology* 59, 948-960.

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. *Journal of Dairy Science* 94, 3305-3310.

Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P., 1999. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318-1322.

Cramton, S.E., Gerke, C., Schnell, N.F., Nichols, W.W., Götz, F., 1999. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infection and Immunity* 67, 5427-5433.

Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I., Penades, J.R., 2001. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *Journal of Bacteriology* 183, 2888-2896.

Cucarella, C., Tormo, M.A., Úbeda, C., Trotonda, M.P., Monzón, M., Peris, C., Amorena, B., Lasa, I., Penades, J.R., 2004. Role of biofilm-associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity* 72, 2177-2185.

Darwish, S.F., Asfour, H.A.E., 2013. Investigation of biofilm forming ability in staphylococci causing bovine mastitis using phenotypic and genotypic assays. *The Scientific World Journal*, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/378492>.

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. *Veterinary Research Communications* 34, 81-89.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28, 350–356.

Fabres-Klein, M.H., Santos, M.J.C., Klein, R.C., Souza, G.N., Ribon, A.O.B., 2015. An association between milk and slime increases biofilm production by bovine *Staphylococcus aureus*. *BMC Veterinary Research*, DOI 10.1186/s12917-015-0319-7.

Fattom, A., Schneerson, R., Szu, S., Vann, W., Shiloach, J., Karakawa, W., Robbins, J., 1990. Synthesis and immunologic properties in mice of vaccines composed of *Staphylococcus aureus* type 5 and type 8 capsular polysaccharides conjugated to *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Infection and Immunity* 58, 2367-2374.

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. *Research in Veterinary Science* 85, 439-448.

Fox, L.F., Zadoks, R.N., Gaskins, C.T., 2005. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. *Veterinary Microbiology* 107, 295-299.

Götz, F., 2002. *Staphylococcus* and biofilms. *Molecular Microbiology* 43, 1367-1378.

Guidry, A., Fattom, A., Patel, A., O'Brien, C., Shepherd, S., Lohuis, J., 1998. Serotyping scheme for *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis. *American Journal of Veterinary Research* 59, 1537–1539.

Han, H.-R., Pak, S.-I., Kang, S.-W., Jong, W.-S., Youn, C.-J., 2000. Capsular polysaccharide typing of domestic mastitis-causing *Staphylococcus aureus* strains and its potential exploration of bovine mastitis vaccine development. I. Capsular polysaccharide typing, isolation and purification of the strains. *Journal of Veterinary Science* 1, 53-60.

Hata, E., Katsuda, K., Kobayashi, H., Ogawa, T., Endo, T., Eguchi, M., 2006. Characteristics and epidemiologic genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitic milk in Hokkaido, Japan. *Journal of Veterinary Medicine Science* 68, 165-170.

Heilmann, C., Schweitzer, O., Gerke, C., Vanittanakom, N., Mack, D., Götz, F., 1996. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Molecular Microbiology* 20, 1083-1091.

Hesselbarth, J., Schwarz, S., 1995. Comparative ribotyping of *Staphylococcus intermedius* from dogs, pigeons, horses and mink. *Veterinary Microbiology* 45, 11-17.

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

Krewer, C.C., Amanso, E.S., Gouveia, G.V., Souza, R.L., Costa, M.M., Mota, R.A., 2015. Resistance to antimicrobials and biofilm formation in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis in the Northeast of Brazil. *Tropical Animal Health and Production* 47, 511-518.

Lasa, I., Penades, J.R., 2006. Bap: A Family of surface proteins involved in biofilm formation. *Research in Microbiology* 157, 99-107.

Marques, V.F., Souza, M.M.S., Mendonça, E.C.L., Alencar, T.A., Pribul, B.R., Coelho, S.M.O., Lasagno, M., Reinoso, E.B., 2013. Análise fenotípica e genotípica da virulência de *Staphylococcus* spp. e de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da mastite bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33, 161-170.

Mehrotra, M., Wang, G., Johnson, W.M., 2000. Multiplex PCR for the detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin, and methicillin resistance. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 1032-1041.

Melo, P.C., Ferreira, L.M., Nader Filho, A., Zafalon, L.F., Vicente, H.I.G., Souza, V., 2013. Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. Brazilian Journal of Microbiology 44, 119-124.

National Mastitis Council, 2004. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality. 4.ed. National Mastitis Council, Verona, 47 pp.

O’Riordan, K., Lee, J.C., 2004. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. Clinical Microbiology Reviews 17, 218-234.

Potter, A., Ceotto, H., Giambiagi-deMarval, M., Santos, K.R.N., Nes, I.F., Bastos, M.C.F., 2009. The gene *bap*, involved in biofilm production, is present in *Staphylococcus* spp. strains from nosocomial infections. The Journal of Microbiology 47, 319-326.

Poutrel, B., Boutonnier, A., Sutra, L., Fournier, J.M., 1988. Prevalence of capsular polysaccharide types 5 and 8 among *Staphylococcus aureus* isolates from cow, goat, and ewe milk. Journal of Clinical Microbiology 26, 38–40.

Prenafeta, A., Sitja, M., Holmes, M.A., Paterson, G.K., 2014. Biofilm production characterization of *mecA* and *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk in Great Britain. Journal of Dairy Science 97, 4838-4841.

Pujato, N., Díaz, G., Barbagelata, M.S., Vicco, M.H., Calvinho, L.F., Marcipar, I.S., 2015. Preparation and characterization of a *Staphylococcus aureus* capsular

polysaccharide-protein conjugate prepared by a low cost technique: a proof-of-concept study. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 175, 141-154.

R Core Team, 2015. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.Rproject.org/>.

Reinoso, E.B., El-Sayed, A., Lämmler, C., Bogni, C., Zschöck, M., 2008. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. *Microbiological Research* 163, 314-322.

SAS Institute Inc, 2009. SAS/STAT® User's guide: Statistics, Version 9.2. SAS Institute, Cary, US.

Salasia, S.I.O., Khusnan, Z., Lämmler, C., Zschöck, M., 2004. Comparative studies on pheno- and genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in central Java in Indonesia and Hesse in Germany. *Journal of Veterinary Science* 5, 103-109.

Scali, F., Camussone, C., Calvino, L.F., Cipolla, M., Zecconi, A., 2015. Which are important targets in development of *Staphylococcus aureus* mastitis vaccine? *Research in Veterinary Science* 100, 88-99.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goetze, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150, 76-85.

Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., 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, 891-899.

Sung, J.M.-L., Lloyd, D.H., Lindsay, J.A., 2008. *Staphylococcus aureus* host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multi-strain microarray. *Microbiology* 154, 1949-1959.

Szweda, P., Schielmann, M., Milewski, S., Frankowska, A., Jakubczak, A., 2012. Biofilm production and presence of *ica* and *bap* genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in the eastern Poland. *Polish Journal of Microbiology* 61, 65-69.

Tollersrud, T., Kenny, K., Reitz Jr., A.J., Lee, J.C., 2000. Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcus* spp. from Europe and the United States. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 2998-3003.

Tremblay, Y.D.N., Lamarche, D., Chever, P., Haine, D., Messier, S., Jacques, M., 2013. Characterization of the ability of coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms. *Journal of Dairy Science* 96, 234-246.

Tuscherr, L.P.N., Gomez, M.I., Buzzola, F.R., Calvinho, L.F., Lee, J.C., Sordelli, D.O., 2007. Characterization of a new variant of IS257 that has displaced the capsule genes within bovine isolates of *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity* 75, 5483-5488.

Vasudevan, P., Nair, M.K.M., Annamalai, T., Venkitanarayanan, K.S., 2003. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Veterinary Microbiology* 92, 179–185.

Vautor, E., Abadie, G., Pont, A., Thiery, R., 2008. Evaluation of the presence of the *bap* gene in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from human and animals species. *Veterinary Microbiology* 127, 407-411.

Veh, K.A., Klein, R.C., Ster, C., Keefe, G., Lacasse, P., Scholl, D., Roy, J.-P., Haine, D., Dufour, S., Talbor, B.G., Ribon, A.O.B., Malouin, F., 2015. *Journal of Dairy Science* 98, 155-168.

Verdier, I., Durand, G., Bes, M., Taylor, K.L., Lina, G., Vandenesch, F., Fattom, A.I., Etienne, J., 2007. Identification of the capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus* clinical isolates by PCR and agglutination tests. *Journal of Clinical Microbiology* 45, 725–729.

Xue, T., Chen, X., Shang, F., 2014. Effects of lactose and milk on the expression of biofilm-associated genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from a dairy cow with mastitis. *Journal of Dairy Science* 97, 6129-6134.

Zuniga, E., Melville, P.A., Saidenberg, A.B.S., Laes, M.A., Gonsales, F.F., Salaberry, S.R.S., Gregori, F., Brandão, P.E., Santos, F.G.B., Lincopan, N.E., Benites, N.R., 2015. Occurrence of genes coding for MSCRAMM and biofilm-associated protein Bap in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine subclinical mastitis and relationship with somatic cell counts. *Microbial Pathogenesis* 89, 1-6.

Table 1 The origin of the *Staphylococcus aureus* isolates investigated in the present study

Region	State	Herds (n ^o)	Isolates (n ^o)	Sampling period
North	Rondônia	3	25	2011 and 2013
Southeast	Minas Gerais	75	91	1994 to 2013
	Rio de Janeiro	17	17	1996 to 2003
	São Paulo	9	9	2001 and 2009 to 2011
South	Paraná	4	4	2011
	Rio Grande do Sul	10	11	1999 and 2012
	Santa Catarina	1	2	2010
Total		119	159	

Table 2 The primers used for amplification of the *femA*, *cap5*, *cap8*, *icaA*, *icaD*, and *bap* genes in the present study

Gene	Primers	Primer sequences (5'-3')	Size of amplified products	PCR cycling conditions ^a	Reference
<i>femA</i>	GFEMAR-1	AAAAAAGCACATAACAAGCG	132	1	Mehrotra et al. (2000)
	GFEMAR-2	GATAAAGAAGAAACCAGCAG			
<i>cap5</i>	Cap5 k1	GTCAAAGATTATGTGATGCTACTGAG	361	2	Verdier et al. (2007)
	Cap5 k2	ACTTCGAATATAAACTTGAATCAATGTTATACAG			
<i>cap8</i>	Capsule 8 k1	GCCTTATGTTAGGTGATAAACC	173	2	Verdier et al. (2007)
	Capsule 8 k2	GGAAAAACACTATCATAGCAGG			
<i>icaA</i>	ICAAF	CCTAACTAACGAAAGGTAG	1315	3	Vasudevan et al. (2003)
	ICAAR	AAGATATAGCGATAAGTGC			
<i>icaD</i>	ICADF	AAACGTAAGAGAGGTGG	381	3	Vasudevan et al. (2003)
	ICADR	GGCAATATGATCAAGATAC			
<i>bap</i>	BAP2F	GAGCCAGATAAACAACAAGAAG	598	4	Potter et al. (2009)
	BAP2R	CATGCTCAGCAATAATTGGATC			

^a 1 = 94°C for 4 min, 5 x (94°C for 45 s, 56°C for 45 s, 72°C for 45 s), 20 x (94°C for 45 s, 52°C for

45 s, 72°C for 45 s), 72°C for 5 min

2 = 94°C for 5 min, 30 x (94°C for 30 s, 50°C for 30 s, 72°C for 1 min), 72°C for 5 min

3 = 94°C for 5 min, 30 x (92°C for 45 s, 45°C for 52 s, 72°C for 1 min), 72°C for 7 min

4 = 92°C for 3 min, 30 x (92°C for 1 min, 52°C for 1 min, 72°C for 1 min), 72°C for 5 min

Table 3 The distribution of the capsular polysaccharide genotypes and phenotypes for 159 *Staphylococcus aureus* isolates obtained from bovine milk collected from three geographical regions in Brazil

	Geographical regions							
	North		Southeast		South		Total	
	Genotype	Phenotype	Genotype	Phenotype	Genotype	Phenotype	Genotype	Phenotype
<i>cap5</i> (%)	24 (96%)	19 (76%)	96 (82%)	67 (57%)	8 (47%)	6 (35%)	128 (80%)	92 (58%)
<i>cap8</i> (%)	1 (4%)	1 (4%)	21 (18%)	16 (14%)	9 (53%)	0	31 (20%)	17 (11%)
NT ¹ (%)	0	5 (20%)	0	34 (29%)	0	11 (65%)	0	50 (31%)
Total	25		117		17		159	

¹NT: non-typeable

Table 4 The distribution of biofilm production phenotypes for 159 *Staphylococcus aureus* isolates from bovine milk collected from three geographical regions in Brazil

Biofilm production	North	Southeast	South	Total (%)
Strong producer	17 (68%)	54 (46.1%)	2 (12%)	73 (45.9%)
Moderate producer	7 (28%)	32 (27.4%)	8 (47%)	47 (29.6%)
Weak producer	1 (4%)	27 (23.1%)	7 (41%)	35 (22%)
Non producer	0 (0%)	4 (3.4%)	0 (0%)	4 (2.5%)
Total	25	117	17	159 (100%)

Table 5 A comparison between polysaccharide genotype and phenotype and biofilm production for 159 *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk in Brazil

Biofilm production	Polysaccharide genotype and phenotype				
	<i>cap5</i>	CP5	<i>cap8</i>	CP8	NT ¹
Strong producer	72 (56%)	49 (53%)	1 (3.2%)	1 (6%)	23 (46%)
Moderate producer	33 (26%)	23 (25%)	14 (45.2%)	6 (35%)	18 (36%)
Weak producer	20 (16%)	17 (18.5%)	15 (48.4%)	9 (53%)	9 (18%)
Non producer	3 (2%)	3 (3.5%)	1 (3.2%)	1 (6%)	0
Total	128	92	31	17	50

¹NT: non-typeable