

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

PESQUISA DOS GENES *icaA*, *icaD* e *bap* DE ADESÃO
INTERCELULAR BACTERIANA E FORMAÇÃO DE BIOFILME POR
Staphylococcus aureus E *Staphylococcus* coagulase-negativa
ISOLADOS DE MASTITE BOVINA

ANELISE SALINA

Botucatu-SP
Março/2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

PESQUISA DOS GENES *icaA*, *icaD* e *bap* DE ADESÃO
INTERCELULAR BACTERIANA E FORMAÇÃO DE BIOFILME
POR *Staphylococcus aureus* E *Staphylococcus coagulase-*
negativa ISOLADOS DE MASTITE BOVINA

ANELISE SALINA

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para
obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Titular Helio Langoni
Co-orientadora: Virgínia Bodelão Richini-Pereira

Botucatu-SP
Março/2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Salina, Anelise.

Pesquisa dos genes *icaA*, *icaD* e *bap* de adesão intercelular bacteriana e formação de biofilme por *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase-negativa* isolados de mastite bovina / Anelise Salina. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Helio Langoni

Coorientador: Virginia Bodelão Richini-Pereira

Capes: 50502000

1. *Staphylococcus aureus*. 2. Mastite. 3. Vermelho congo. 4. Biofilme. 5. Saúde pública. 6. Reação em cadeia de polimerase.

Palavras-chave: Mastites; SCN; Saúde pública; *Staphylococcus aureus*; Vermelho congo.

*“Talvez não tenha conseguido
fazer o melhor, mas lutei para
que o melhor fosse feito. Não
sou o que deveria ser, mas,
graças a Deus, não sou o que
era antes”.*

(Martin Luther King)

Anelise Salina. Pesquisa dos genes *icaA*, *icaD* e *bap* de adesão intercelular bacteriana e formação de biofilme por *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase-negativa isolados de mastite bovina. Defesa: 13/03/2015. Local: FMVZ/UNESP – Campus de Botucatu/SP.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Prof. Titular Helio Langoni

Presidente e Orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu/SP

Prof. Adjunto Paulo Francisco Domingues

Membro Titular

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu/SP

Prof. Adjunto Vera Lúcia Mores Rall

Membro Titular

Departamento de Microbiologia e Imunologia

Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP - Botucatu/SP

Prof. Assistente José Carlos de Figueiredo Pantoja

Membro Suplente

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu/SP

Prof. Adjunto Marcos Veiga dos Santos

Membro suplente

Departamento de Nutrição e Produção Animal - VNP

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP - Pirassununga/SP

DEDICATÓRIA

À minha mãe Marisa que não mediu esforços para me ajudar até o dia de hoje, sempre ao meu lado me apoiando, incentivando e dando forças para seguir até aqui. Sem ela nada disso seria alcançado.

À minha avó Angelina (em memória), que sempre me apoiou, celebrou comigo todas as conquistas e infelizmente se foi antes de poder compartilhar comigo desta vitória.

Aos meus primos, Anna Carla e Gustavo Henrique ainda que distantes, sempre torcendo por mim.

Ao meu namorado Fernando pelo companheirismo, espera, paciência e mesmo longe fisicamente, sempre comigo em meus pensamentos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força nos momentos difíceis e alegria nas conquistas alcançadas.

Ao meu orientador Prof. Hélio Langoni, pelo acolhimento, amizade e confiança no meu trabalho e pela orientação nesses anos.

À Profa. Vera Lúcia Mores Rall por sua importante e indispensável colaboração na elaboração do trabalho, cedendo amostras de controle positivo para os genes de formação de biofilme.

À minha co-orientadora Virgínia Bodelão Richini-Pereira pela atenção, ajuda e ensinamentos referentes a biologia molecular.

Aos professores do Departamento Higiene Veterinária e Saúde Pública, pelo agradável convívio e pelos ensinamentos ministrados em disciplinas.

Ao Assistente de Suporte Acadêmico Benedito Donizete Menozzi, que participou na obtenção de amostras.

Aos amigos do laboratório, Gabriela, Marcelinha, Sâmea, Felipe Guimarães, obrigada pela ajuda e pela amizade.

A amiga Ariane que mesmo nos Estados Unidos sempre me ajudou com minhas dúvidas sobre biologia molecular.

A todos os colegas do Departamento Higiene Veterinária e Saúde Pública, pela amizade.

Às vizinhas, Ana Paula, Daniela e Laís pela amizade.

À minha família, em especial, a minha mãe, por me proporcionar esta oportunidade de estar aqui em Botucatu e poder cursar a pós-graduação, pelo seu carinho, amor e confiança.

Ao meu namorado Fernando, que sempre esteve ao meu lado, me deu apoio e incentivo para continuar nessa caminhada.

*A FAPESP, Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão de bolsa para a realização deste trabalho.
Processo número 2013/14383-9*

Muito Obrigada a todos vocês, amigos, parentes, professores, colegas, pois vocês contribuíram de alguma forma para a conquista de mais uma vitória.

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: Sequência dos oligonucleotídeos e tamanhos dos produtos amplificados, utilizados na reação de PCR para detecção de genes <i>icaA</i> , <i>icaD</i> , <i>bap</i> e <i>coa</i>	33
--	----

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1: Distribuição das frequências da relação da intensidade de reação positiva ao teste de CMT com o agente envolvido e média do $\log_{(10)}$ dos resultados de CCS, em estirpes de *S. aureus* e SCN de amostras oriundas de mastite bovina subclínica e clínica em duas propriedades do estado de São Paulo, no período de Novembro de 2013 a Julho de 2014. 39
- TABELA 2: Frequência dos genes *icaA*, *icaD* e *bap* e sua relação com a média do $\log_{(10)}$ de CCS de amostras de *S. aureus* oriundas de mastite subclínica bovina em duas propriedades do estado de São Paulo, no período de Novembro de 2013 a Julho de 2014. 40
- TABELA 3: Relação entre a presença dos genes *icaA*, *icaD* e *bap* e sua morfologia em VC de amostras de *S. aureus* oriundas de mastite bovina subclínica em duas propriedades do estado de São Paulo, no período de Novembro de 2013 a Julho de 2014. 41

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1: Fases de formação do biofilme. (1) adesão primária, (2) adesão irreversível, (3) desenvolvimento precoce da arquitetura do biofilme, (4) maturação e (5) dispersão. 16
- FIGURA 2: Identificação fenotípica do gênero *Staphylococcus*. A = resistência à bacitracina (0,04 U) e sensibilidade à furazolidona (100µg). B = prova da coagulase livre em tubo em isolados de *S. aureus*. C = fermentação de açúcares (manitol, maltose e trealose). 30
- FIGURA 3: Etapa da extração de ácido nucleico, adição de tampão de lavagem à coluna. 31
- FIGURA 4: Colônias negras em ágar vermelho congo, estirpes de *S. aureus* produtoras de biofilme em placa (esquerda). Controle positivo ATCC 25923 (direita). 34
- FIGURA 5: Isolados de *S. aureus* em escala 0,5 de MacFarland (esquerda). Coloração da placa com cristal violeta 1% (direita). 36
- FIGURA 6: Eletroforese em gel de agarose a 2% demonstrando os produtos amplificados do gene *icaA* obtidos de amostras de *S. aureus* pelo método de PCR convencional. Linha 1: marcador de peso molecular 100bp. Linhas 2 a 4: amostras positivas para o gene *icaA*. Linhas 5 e 7: amostras negativas para o gene *icaA*. Linha 10: controle positivo ATCC 25923 (1315pb). Linha 11: controle negativo ATCC 12228. 42
- FIGURA 7: Eletroforese em gel de agarose a 2% demonstrando os produtos amplificados do gene *icaD* obtidos de amostras de *S. aureus* pelo método de PCR convencional. Linha 1: marcador de peso molecular 50bp. Linhas 2 a 11: amostras positivas para o gene *icaD*. Linhas 12 e 13: amostras negativas para o gene *icaD*. Linha 17: controle positivo ATCC 25923 (381pb). Linha 18:

controle negativo ATCC 12228. Linha 19: controle negativo da PCR (ausência de DNA). 43

FIGURA 8: Eletroforese em gel de agarose a 2% demonstrando os produtos amplificados do gene *bap* obtidos de amostras de *S. aureus* pelo método de PCR convencional. Linha 1: marcador de peso molecular 100bp. Linhas 2 a 9: amostras negativas para o gene *bap*. Linha 10: controle positivo ATCC 25923 (971pb). Linha 11: controle negativo ATCC 12228. 43

LISTA DE ABREVIATURAS

Ágar Vermelho Congo	VC
<i>Brain Heart Infusion</i>	BHI
<i>Biofilm Associated Protein</i>	<i>bap</i>
<i>California Mastitis Test</i>	CMT
<i>Clean-in-place</i>	CIP
Contagem de Células Somáticas.....	CCS
Exopolissacarídeos.....	EPS
Polissacarídeo intercelular/adesina.....	PIA
<i>Polimerase Chain Reaction</i>	PCR
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>S. aureus</i>
<i>Staphylococcus coagulase-negativa</i>	SCN
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	3
1 INTRODUÇÃO	4
2 REVISÃO DE LITERATURA	8
2.1 Leite	8
2.2 Mastite e qualidade do leite	9
2.2.1 <i>California Mastitis Test</i> (CMT) e Contagem de Células Somáticas (CCS).....	11
2.3 <i>Staphylococcus</i> sp	11
2.4 Biofilmes	14
2.4.1 Etapas de formação	16
A) Adesão primária	16
B) Adesão irreversível	18
2.5 Biofilmes e mastite	20
2.6 Biofilmes e sua importância na Medicina Veterinária.....	21
2.7 Aspectos de saúde pública	22
2.7.1 Biofilmes e indústria de alimentos	22
2.8 Biofilmes e infecções nosocomiais	23
3 OBJETIVOS	25
3.1 Geral	25
3.2 Específicos.....	25
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 Características das propriedades	27
4.1.1 Propriedade A.....	27
4.1.2 Propriedade B.....	27
4.2 Seleção dos animais.....	28
4.3 Amostras.....	28
4.3.1 Tamis, <i>California Mastitis Test</i> e colheita de leite para cultivo microbiológico	28
4.3.2 Contagem de células somáticas.....	29
4.3.3 Isolamento e identificação de estafilococos.....	29
4.4 Caracterização genotípica	31

4.4.1	Extração do DNA.....	31
4.4.2	Amplificação do ácido nucléico - Reação em Cadeia pela Polimerase (Polimerase Chain Reaction - PCR).....	32
4.5	Visualização dos produtos amplificados	33
4.6	Caracterização fenotípica	34
4.6.1	Produção de pigmento em meio ágar vermelho congo (VC).....	34
4.6.2	Produção de biofilme em placa de poliestireno	35
4.7	Análises estatísticas.....	36
5	RESULTADOS	37
6	DISCUSSÃO	45
6.1	Presença dos genes icaA, icaD e bap	45
6.2	Produção de biofilme em ágar vermelho congo e no teste de aderência e placas.....	46
6.3	Contagem de células somáticas	49
7	CONCLUSÕES	52
8	BIBLIOGRAFIA	54
	TRABALHO CIENTÍFICO	71

Anelise Salina. Pesquisa dos genes *icaA*, *icaD* e *bap* de adesão intercelular bacteriana e formação de biofilme por *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase-negativa isolados de mastite bovina. Botucatu, 2015. 100p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, São Paulo.

RESUMO

Staphylococcus aureus é comum em infecções intramamárias, que frequentemente se tornam crônicas, entre outros fatores, pela capacidade dessa bactéria em produzir biofilme. Objetivou-se verificar a capacidade produtora de biofilme em estirpes de *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN), oriundas de mastite bovina clínica e subclínica. Um total de 100 cepas de *S. aureus* e 100 cepas de SCN foram isoladas de casos de mastites subclínicas e clínicas em duas propriedades do Estado de São Paulo. O teste de triagem da mastite subclínica foi o *California Mastitis Test* (CMT). Foi realizada Contagem de Células Somáticas (CCS) e cultivo microbiológico das amostras de leite. Pesquisou-se a presença de genes *icaA*, *icaD* e *bap* pela Reação em Cadeia pela Polimerase (*Polimerase Chain Reaction* - PCR) e caracterização fenotípica no ágar Vermelho Congo (VC) e teste de produção de biofilme em placas. Não houve relação entre a intensidade da reação ao CMT e a CCS. A média de CCS foi de $2,88 \pm 0,59$ para *S. aureus* e $2,71 \pm 0,35$ para SCN. Não houve significância estatísticas entre os valores de CCS para estirpes que continham a presença dos genes pesquisados. Porém as médias dos valores de CCS foram maiores nos isolados que continham tais genes. As frequências de *icaA*, *icaD* e *bap* em *S. aureus* foram de 82%, 83% e 58%, respectivamente. Observou-se que dos 83 isolados de *S. aureus* que apresentaram *icaD*, 82 (98,8%) também apresentaram *icaA*, com significância estatística no Teste Exato de Fischer ($p < 0,001$). Na associação entre os genes *icaA* e *bap*, também foi observada associação significativa pois das 82 estirpes que apresentaram *icaA*, foi possível observar a presença de *bap* em 56 (68,3%). Das 83 linhagens que continham o gene *icaD* em 56 (67,5%) delas, também foi detectada presença do gene *bap*. Não houve concordância entre os testes fenotípicos ($K < 0,2$). A positividade no vermelho congo revelou que 25% das estirpes de *S. aureus* produziram biofilme *in vitro*. Já no teste de aderência em placas, esse número foi menor, com 15% de positividade. Pela análise dos

resultados, pode-se verificar que ambos os testes fenotípicos não foram indicados para avaliar a capacidade produtora de biofilme em linhagens de *S. aureus* de mastite bovina. A presença de quaisquer dos genes pesquisados, não refletiu no processo inflamatório, bem como na CCS.

Palavras-chave: Mastites, vermelho congo, *S. aureus*, SCN, Saúde Pública.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is common in intramammary infections, which often become chronic, among other factors, by the ability of this bacteria to produce biofilm. The objective was to verify the production of biofilm capacity in strains of *S. aureus* and coagulase negative *Staphylococcus* (CNS), derived from clinical and subclinical bovine mastitis. A total of 100 strains of *S. aureus* and 100 strains of CNS were isolated from cases of subclinical and clinical mastitis in two properties of São Paulo State. The screening test of subclinical mastitis was the California Mastitis Test (CMT). Somatic Cell Count (SCC) and microbiological culture of milk samples was performed. We researched the presence of *icaA*, *icaD* and *bap* genes by the Polymerase Chain Reaction (PCR) and phenotypic characterization on congo red agar (CRA) and biofilm production on plates. There was no observed relationship between the intensity of the reaction to the CMT and SCC. The mean of SCC was 2.88 ± 0.59 for *S. aureus* and 2.71 ± 0.35 for CNS. There was no significant statistical between SCC values for strains containing the presence of those researched genes. But the means of the CCS values were higher in isolates that containing such genes. The frequency *icaA*, *icaD* and *bap* in *S. aureus* were 82%, 83% and 58%, respectively. It was observed that the 83% of *S. aureus* isolates that had *icaD*, 82 (98.8%) also had *icaA*, with statistical significance in the Fischer's exact test ($p < 0.001$). In association between *icaA* and *bap* genes, was also observed significant association, for the 82 strains that showed *icaA*, we observed the presence of *bap* in 56 (68.3%). Of the 83 strains that containing the *icaD* gene, 56 (67.5%) of them was also detected the presence of *bap* gene. There was no agreement between the phenotypic tests ($K < 0.2$). The positivity on congo red agar revealed that 25% of *S. aureus* strains produced *in vitro* biofilm. In the adhesion test plates, this number was lower, with 15% of positivity. Examining the results, it can be seen that both phenotypic tests were not recommended to assess the capacity of biofilm production in strains of *S. aureus* from bovine mastitis. The presence of any the genes studied, not reflected in the inflammatory process, as well as the CCS.

Keywords: Mastitis, congo red, *S. aureus*, CNS, Public Health.

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A produção leiteira no Brasil está em quinto lugar no ranking mundial. Anualmente, o país produz em média 32,3 bilhões de litros de leite, contudo, o rebanho brasileiro apresenta um baixo índice de produção, em torno de 1,471 litros/vaca/ano. Em 2013, o valor bruto da produção foi de R\$22,9 bilhões (BRASIL, 2014).

A mastite é considerada a doença mais importante do gado leiteiro, impactando negativamente a cadeia produtiva do leite, com queda de produção, menor rendimento dos produtos lácteos, custos com medicamentos e honorários profissionais. Em alguns casos, há a perda do teto ou mesmo do animal, decorrente de septicemias podendo ainda haver descarte prematuro do animal (LANGONI, 2013). Constitui um problema de saúde pública, pela veiculação de patógenos, bem como de suas enterotoxinas, aos seres humanos (OLIVEIRA et al., 1999; LANGONI et al., 2011; GUIMARÃES et al., 2013).

S. aureus é frequentemente isolado de mastite subclínica e infecções crônicas em todo o mundo. No Brasil, a frequência do isolamento é estimada em 20% dos casos de mastite (ACOSTA et al., 2014). A cronicidade da mastite por *S. aureus* pode ser atribuída a diferentes fatores de virulência, incluindo a formação de biofilme no interior da glândula mamária. Inicialmente, *S. aureus* coloniza o canal do teto e, após essa etapa, adere aos ductos do epitélio e alvéolos, e iniciando a produção de toxinas. A presença do micro-organismo, estimula a migração de macrófagos e neutrófilos do sangue, elevando os valores de CCS (RAZA et al., 2013).

SCN são relatados historicamente na literatura como de menor importância nas mastites. Porém, estudos mais recentes têm mostrado que esse grupo de micro-organismo são responsáveis pela produção de enterotoxinas e formação de biofilme, induzindo a resposta imune e celular, assim como *S. aureus* (DE FREITAS GUIMARÃES et al., 2013; RUMI et al., 2013).

Biofilmes são aglomerados de matriz exopolissacarídica e bactérias que colonizam superfícies bióticas ou abióticas. A formação ocorre pela adesão inicial de uma célula bacteriana a uma superfície. Posteriormente outras células se aderem à primeira ocorrendo a multiplicação. Esse aglomerado celular é

embebido em uma matriz extracelular que protege os micro-organismos da dessecação, agentes químicos e antimicrobianos (COSTERTON, 1999). O papel dos biofilmes pode ser benéfico, como no caso da alimentação de crustáceos, em que o biofilme é considerado como rica fonte nutricional resultando em aumento na sobrevivência (BALLESTER, 2008). Também é favorável na degradação de matéria orgânica, de poluentes, tratamento de efluentes domésticos e industriais (MELO, 2013). Entretanto, na maioria dos casos, é considerado maléfico, contaminando matérias-primas da indústria de alimentos (KASNOWSKI et al., 2010), colonizando glândulas mamárias e resultando em infecções crônicas (OLIVEIRA et al., 2006) ou ainda, sendo responsáveis por infecções nosocomiais (HENRIQUES et al., 2013). Sendo assim, os biofilmes bacterianos representam um problema na saúde pública, pela persistência das infecções por *S. aureus* e SCN em bovinos leiteiros e pela contaminação da matéria-prima pronta nos laticínios em virtude da constante eliminação de micro-organismos em biofilmes previamente aderidos em superfícies.

Considerando a importância das mastites pelo impacto negativo na cadeia produtiva do leite e a alta prevalência dos estafilococos em sua etiologia e os problemas para a saúde pública, propusemos o presente estudo.

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leite

O leite possui um alto valor nutricional, sendo consumido por crianças e adultos e constitui importante fonte de renda para vários segmentos da cadeia produtiva leiteira (RIBEIRO, 2008). Ocupa lugar de destaque na economia mundial e, considerando sua importância social, no Brasil, gera milhões de empregos em, aproximadamente, um milhão de propriedades rurais. O Brasil ocupa o quinto lugar no agronegócio da produção leiteira mundial, com consumo per capita anual de 172,6 litros de leite por habitante, enquanto o recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) é de 210 litros ano/habitante (LANGONI et al., 2011; BRASIL, 2014). No período de 2000 a 2011 o Brasil aumentou sua produção de leite em 4,2% ao ano, enquanto Argentina e México, dois países que também estão no topo dos maiores produtores da América Latina, aumentaram em 2% (FAO, 2013).

O ano de 2014 se iniciou com incremento das exportações no agronegócio brasileiro em relação ao primeiro trimestre de 2013. A Bolívia, Sri Lanka, África do Sul e Venezuela foram os principais destinos do leite *in natura* produzido no Brasil. De janeiro a março de 2014 foram adquiridos, pelas indústrias processadoras de leite, 6.186 bilhões de litros, um aumento de 8,9% sobre o primeiro trimestre de 2013. A região Sudeste foi responsável pela maior taxa de aquisição, com 41,4% do referido produto e o Estado de São Paulo com 10,6% (IBGE, 2014).

Estimativas do Governo Brasileiro, apontaram que o país apresentará um aumento de 1,9% na produção anual de leite em 10 anos, de 2013 a 2023. Tal incremento da produção corresponderá a 41,3 bilhões de litros de leite cru no final do período das projeções, representando 20,7% a mais do que a produção de 2013 (BRASIL, 2013).

2.2 Mastite e qualidade do leite

A mastite é a inflamação da glândula mamária que mais onera a produção leiteira. Gera impacto negativo pela alta prevalência nos rebanhos e, conseqüentemente, queda de produção, além de custos com medicamentos para tratamento e mão de obra, honorários profissionais, descarte precoce e morte de animais e descarte de leite (LANGONI et al., 2011). Devem ser considerados, ainda, os aspectos relacionados a saúde pública. No Brasil, embora não existam dados estatísticos sobre o assunto, frequentemente ocorrem casos de infecções humanas associadas ao consumo de leite cru ou de derivados produzidos com leite contaminado com micro-organismos patogênicos (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004).

Problemas com mastite ainda são muito frequentes na pecuária leiteira mesmo com intensas pesquisas para o diagnóstico e controle desta enfermidade. Inúmeros micro-organismos estão envolvidos na etiologia. Porém, vários estudos de diferentes regiões do Brasil têm referido o gênero *Staphylococcus* como o mais importante na etiologia das mastites (LANGONI et al., 1991; OLIVEIRA et al., 2011; GUIMARÃES et al., 2012; SAAB et al., 2014). No gênero *Staphylococcus*, *S. aureus* destaca-se na cadeia epidemiológica de transmissão de doenças veiculadas por alimentos, sendo responsável por produzir enterotoxinas e desencadear quadros de gastroenterites alimentares (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004).

As mastites são classificadas em subclínicas e clínicas, podendo ser de origem fisiológica, traumática, alérgica, metabólica e infecciosa. Infecções clínicas se apresentam com resposta inflamatória mais severa, com alterações evidenciáveis no leite, úbere e, em alguns casos, acometimento sistêmico. Já as mastites subclínicas não apresentam alterações visíveis no leite e úbere, sendo detectáveis somente a partir de exames laboratoriais (MARTINS et al., 2010). Os casos subclínicos, são facilmente disseminados no rebanho oferecendo ao produtor uma falsa impressão de tranquilidade em relação à ocorrência de mastite (BUENO et al., 2002).

A forma subclínica é a manifestação mais comum. Há testes que indicam sua presença nos rebanhos leiteiros, como o *California Mastitis Test* (CMT) e a Contagem de Células Somáticas (CCS) que visam o diagnóstico precoce da

inflamação e conseqüente redução de perdas econômicas (ANDRADE, 2012). Este tipo de mastite determina mudanças na composição do leite, como concentração de gordura, minerais, proteínas, enzimas e lactose. Quando ocorre alterações nas concentrações de lactose, proteína, gordura e aumento da permeabilidade vascular estão presentes, o resultado é a passagem de substâncias do sangue para o leite, como sódio, cloro e imunoglobulinas (CUNHA et al., 2008). Caracteriza-se pelo aumento de células somáticas, ausência de mudanças visíveis no úbere ou quarto afetado e queda de 15-45% na produção leiteira (BHUTTO et al., 2012).

As mastites clínicas apresentam sinais evidentes, como edema, aumento de temperatura, endurecimento e dor na glândula mamária, aparecimento de pus, grumos ou qualquer alteração visível no leite. Para cada caso de mastite clínica, estima-se que haja 35 de subclínica (BUENO et al., 2002). Apresenta variações no grau da severidade de acordo com o curso da patologia. Dessa forma, pode acometer apenas um quarto mamário ou todos, e como há aumento de permeabilidade vascular, os componentes do sangue se misturam aos do leite sendo liberados no leite (ANDRADE, 2012).

Epidemiologicamente, é dividida em contagiosa e ambiental. A mastite contagiosa é caracterizada pela transmissão de animal para animal, apresentando como principais patógenos *S. aureus*, outras espécies de SCN, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis* e *Mycoplasma* sp. Os micro-organismos relacionados a ocorrência de mastite contagiosa apresentam como habitat preferencial, o interior da glândula mamária e superfície da pele dos tetos. Assim, são transmitidos durante o momento da ordenha pelas mãos do ordenhador, teteiras ou panos de secagem quando utilizados em vários animais. No rebanho brasileiro, as mastites por micro-organismos contagiosos são mais comuns na forma subclínica, acarretando grande prejuízo econômico aos produtores (SAAB et al., 2014).

Nas mastites classificadas como ambientais estão envolvidos patógenos presentes no próprio ambiente de criação dos animais, sendo os mais frequentes: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus uberis*, *Enterobacter* sp, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus* sp (PEDRINI e MARGATHO, 2003).

2.2.1 *California Mastitis Test* (CMT) e Contagem de Células Somáticas (CCS)

Existem muitos métodos de identificação de mastites. Dentre os mais utilizados pode-se indicar o CMT e a CCS. O CMT é muito utilizado na identificação de mastite subclínica, de acordo com o método descrito por Schalm e Noorlander (1957). Um aumento no escore de CMT é acompanhado de um aumento de CCS, mas não é necessariamente indicativo de infecção intramamária devido a presença de patógenos específicos (BUTTHO et al., 2012). A interpretação do teste se baseia na interpretação visual do leite com o reagente. O reagente interage com o material genético das células somáticas liberadas durante a infecção intramamária, resultando em um gel espesso cuja gelificação é diretamente proporcional ao número de células somáticas (MELO, 2008).

Durante a infecção subclínica, as células epiteliais secretoras e vasculares do tecido mamário são alteradas acarretando a liberação no leite. Essa perda celular é decorrente de vários fatores, entre eles o micro-organismo envolvido na mastite, idade do animal, época do ano, estado nutricional e potencial genético do animal. O aumento da CCS é proporcional ao estágio de lactação e nas vacas mais velhas, a resposta celular é mais intensa decorrente de lesões teciduais e infecções anteriores (CUNHA et al., 2008). Desde julho de 2014, o número máximo permitido na CCS em propriedades leiteiras no Brasil é de 500.000 células/mL (BRASIL, 2011).

A capacidade de *S. aureus* se aderir na glândula mamária e causar infecções crônicas está associada, entre outros fatores, à presença de biofilme. A aderência produzida estimula a migração de macrófagos e neutrófilos do sangue para o local, resultando no aumento da CCS com edema da glândula, danos ao sistema imune e células epiteliais (RAZA et al., 2013).

2.3 *Staphylococcus* sp

O gênero *Staphylococcus* compreende mais de 50 espécies, descritas até 2009. Apresenta duas divisões baseadas na habilidade de coagular o plasma: *Staphylococcus* coagulase-negativa e *Staphylococcus* coagulase-positiva. Espécies de SCN têm sido isoladas com frequência em mastites bovinas,

sendo consideradas uma classe emergente no cenário das mastites (PYÖRÄLÄ et al., 2009). A etiologia das mastites varia bastante de acordo com a região, porém as espécies de SCN isoladas com maior frequência são *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus chromogenes* (SANTOS et al., 2011); *Staphylococcus saprophyticus* (FONTANA et al., 2012). *Staphylococcus epidermidis* é considerado frequente em infecções hospitalares em humanos, associado a formação de biofilme em catéteres ou próteses. Os SCN participam em 50-70% dos casos de infecções hospitalares (HENRIQUES et al., 2013).

Está presente na pele e mucosas de mamíferos e aves. Dentre os *Staphylococcus*, a espécie mais estudada na etiologia das mastite é *S. aureus*, responsável por grande parte das infecções humanas e nos animais (MELO et al., 2012) e segundo Dias & Zuccoli (2012) importante pela produção de toxinas e resistência a antimicrobianos como oxacilina (MRSA – *S. aureus* resistente a oxacilina/meticilina) e vancomicina (VISA - *S. aureus* resistente a vancomicina).

Dentre as dificuldades encontradas no tratamento das mastites estafilocócicas, pode-se citar a capacidade de *S. aureus* desenvolver resistência frente aos antimicrobianos e a formação de biofilme (BABRA et al., 2013). Dentre os diferentes fatores de virulência, o biofilme é responsável pela menor resposta no tratamento das mastites causadas por *S. aureus*. A patogênese de determinadas cepas de *S. aureus* é atribuída a fatores extracelulares e à presença de toxinas, como aderência, formação de biofilme e resistência à fagocitose. A presença do biofilme é considerada a base da persistência de infecções crônicas, fato determinante para o aumento de estudos moleculares baseados na formação de biofilmes (CUCARELLA et al., 2001).

S. aureus está entre os principais patógenos nos casos de mastites subclínicas em rebanhos leiteiros, com grandes perdas econômicas na indústria leiteira mundial. Muitos estudos têm sido realizados para diminuir as perdas decorrentes de infecções por *S. aureus*, visando a melhoria da saúde da glândula mamária. Entretanto, no Brasil estudos têm apontado esse micro-organismo como o mais isolado em amostras de leite bovino (ZAFALON et al., 2007; COELHO et al., 2009).

Staphylococcus spp apresentam fatores de virulência que dificultam o tratamento das mastites. Podemos definir fator de virulência como a capacidade do micro-organismo de causar danos ao hospedeiro e levando a ocorrência de sinais clínicos da doença. *S. aureus* é relatado na literatura como responsável na produção de uma série desses fatores, como a produção de enterotoxinas (SEs), responsáveis pelo grande número de intoxicações de origem bacteriana nos humanos (NADER FILHO et al., 2007), síndrome do choque tóxico (TSST-1), importante fator de virulência relacionado à ocorrência de casos graves de mastite (SÁ et al., 2004), β -hemolisina (*hly*), produção de biofilme mediada por genes presentes no loco *icaADBC* e gene *bap*, entre outros (IKAWATY et al., 2010).

A produção de coagulase é uma característica fenotípica importante e está relacionada virulência de *S. aureus*. Genotipicamente é possível identificar *Staphylococcus* coagulase-positiva pela PCR e *Restriction of Fragment Length Polymorphism* (RFLP), podendo identificar facilmente estafilococos coagulase positiva tanto de amostras humanas quanto animais (MOMTAZ et al., 2011). A identificação de diferentes variantes de *S. aureus* é importante para garantir a eficácia e eficiência do controle de mastites (ACOSTA et al., 2014).

Quanto aos aspectos de saúde pública, enterotoxinas provenientes de *S. aureus*, têm sido implicadas em surtos de intoxicações alimentares. Enterotoxinas produzidas por esse micro-organismo têm sido isoladas de leite pasteurizado, iogurte caseiro, leite em pó, achocolatados e sorvetes, bem como de outros derivados lácteos. A contaminação desses derivados pode ser oriunda de vacas com mastite, dos manipuladores envolvidos na produção (SÁ et al., 2004) ou ainda pela liberação de estruturas do biofilme que se desprendem no momento da industrialização, comprometendo a qualidade microbiológica do leite (BOARI et al., 2009).

Staphylococcus coagulase negativa são relatados na literatura como de menor importância nas mastites. No entanto, têm sido isolados com frequência em casos de mastites mesmo em fazendas que adotam programas efetivos para controle de *S. aureus* e *Streptococcus agalactiae*. São um grupo bastante heterogêneo de micro-organismos encontrados no ambiente de ordenha, equipamentos e pele dos tetos dos animais (SANTOS et al., 2011).

Estudos têm relacionado a presença de SCN com altas contagens de células somáticas e também associados a presença de biofilmes causando infecções crônicas (RUMI et al., 2013). Embora não estejam relacionados a todos os casos, são considerados causadores de mastite subclínica e clínica em rebanhos leiteiros (SAMPIMON et al., 2009) e, de acordo com De Freitas Guimarães et al. (2013), são também produtores de enterotoxinas clássicas.

Taponen et al. (2007) relataram que cerca de 50% das infecções intramamárias persistentes, são relacionadas com a presença de SCN, com consequente aumento da CCS. Aproximadamente 50% dos quartos infectados apresentam cura espontânea durante a lactação.

2.4 Biofilmes

Biofilmes são aglomerados celulares mono ou multiespécies, sésseis, que se aderem a um substrato biótico ou abiótico (COSTERTON, 1999). Essa estrutura é embebida em uma cápsula de matriz de polímeros extracelulares (exopolissacarídeos - EPS), onde os micro-organismos se aderem fortemente a uma superfície por filamentos orgânicos de natureza proteica ou polissacarídica (MELO, 2008; BOARI et al., 2009; NEVES, 2012), exibindo um fenótipo alterado no que diz respeito a taxa de crescimento e transcrição de genes (GIAOURIS et al., 2014).

Um biofilme apresenta grande parte de sua composição em água, podendo conter de 97 a 99%, tornando-o altamente hidrofílico (MELO, 2008; NEVES, 2012), característica que impede fisicamente a penetração de agentes antimicrobianos nessa estrutura (KASNOWSKI et al., 2010). A maioria dos biofilmes apresentam composição heterogênea, com mais de um micro-organismo envolvido, constituindo um complexo ecossistema microbiológico que, juntamente com os produtos extracelulares, constituem uma matriz orgânica. Quando há produção de substâncias tóxicas por algum micro-organismo presente, estas podem limitar a colonização de outras espécies (KASNOWSKI et al., 2010).

A matriz EPS produzida por algumas bactérias, denominadas colonizadoras, é responsável pela aderência primária e, a partir dela, surgem as bactérias secundárias que podem se aderir diretamente na colonizadora

primária ou ainda nos agregados extracelulares, sendo considerada fundamental na formação de biofilme (NEVES, 2012). Essa espécie de crosta formada por proteínas, lipídeos, fosfolipídeos, carboidratos, ácidos nucleicos e teioicos (GUITON et al., 2009), sais minerais e vitaminas favorece a proliferação e multiplicação de micro-organismos abaixo dessa superfície. Ainda impede a penetração de agentes físicos e químicos utilizados comumente nos processos de higienização de indústrias (MELO, 2008; KASNOWSKI et al., 2010).

A EPS é a camada mais externa do biofilme, promovendo a interação com o meio. Esta estrutura é capaz de adsorver cátions, metais e toxinas e confere proteção contra radiações UV, alterações de pH, choques osmóticos e dessecação (BOARI et al., 2009).

Algumas cepas de *S. aureus* são produtoras de cápsula exopolissacarídica, considerada como fator de virulência em infecções intramamárias (OLIVEIRA et al., 2011), conferindo proteção contra fagócitos celulares (FOX et al., 2005).

Quanto à formação dos biofilmes, diferentes teorias foram propostas. Marshall et al. (1971) propuseram que a formação do biofilme consistia em duas etapas, sendo a primeira delas reversível relacionada a força de Van der Waals geradas por interações moleculares, resultando em uma fácil remoção bacteriana. Já a segunda etapa, classificada pelos autores como irreversível, foi associada à presença de interações físicas entre o micro-organismo e a superfície, fase que se dá a síntese de material extracelular.

A formação de um biofilme envolve basicamente duas etapas, como proposto por Marshall et al. (1971): inicia com a aderência da bactéria na superfície da glândula mamária mediada por um antígeno capsular, denominado adesina capsular polissacarídica (PSA), seguida pelo acúmulo, maturação e fase de separação, associada com a produção de adesina intercelular polissacarídica (PIA/PNAG), essencial para a disseminação dos estafilococos (GÖTZ, 2002; VASUDEVAN et al., 2003; SIMOJOKI et al., 2012).

Atualmente a teoria mais aceita para formação de um biofilme ocorreria em cinco etapas, apresentadas na Figura 1: (1) adesão primária, (2) adesão irreversível, (3) desenvolvimento precoce da arquitetura do biofilme, (4) maturação e (5) dispersão (ABDALLAH et al., 2009; SREY et al., 2013).

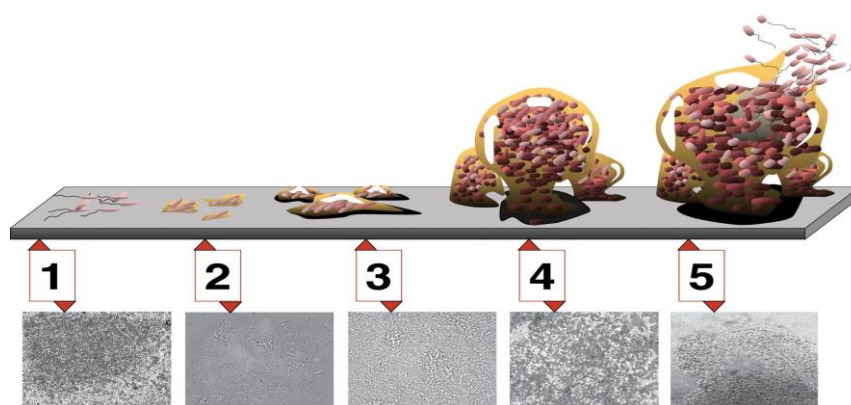


FIGURA 1: Fases de formação do biofilme. (1) adesão primária, (2) adesão irreversível, (3) desenvolvimento precoce da arquitetura do biofilme, (4) maturação e (5) dispersão (SREY et al., 2013).

2.4.1 Etapas de formação

A) Adesão primária

A adesão bacteriana, nessa fase, depende de propriedades físico-químicas da superfície. A fixação inicial pode ser ativa ou passiva e depende da motilidade celular, força de cisalhamento ou difusão da bactéria em seu estado planctônico. As células aderentes possuem pouca quantidade de EPS e apresentam movimento browniano, podendo ser facilmente removidas e voltarem ao seu estilo de vida livre (SREY et al., 2013). As características polares da bactéria, do meio e da superfície desempenham função repulsiva ou atrativa, no que diz respeito a adesão (NEVES, 2012).

Bactérias do gênero *Staphylococcus* são produtoras de várias adesinas proteínáceas e não proteínáceas. Adesinas proteínáceas pertencem a um grupo denominado proteínas de superfície ancoradas covalentemente ou ancoradas na parede celular (*cell wall-anchored* - CWA). Esse grupo inclui a família das adesinas/autolisinas e proteínas que atravessam a membrana. *S. aureus* pode expressar mais de 24 CWA, facilitando sua adesão. Já os SCN expressam uma quantidade inferior (FOSTER et al., 2014). Como exemplo, *S. epidermidis* que expressa 12 proteínas (NEVES, 2012). A PS/A está envolvida na aderência inicial da bactéria e a protege das defesas do hospedeiro

impedindo a fagocitose e favorecendo a multiplicação bacteriana (MELO et al., 2011).

Diversas proteínas são expressas na superfície de *S. aureus*, denominadas MSCRAMMs (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules* - componentes da superfície bacteriana reconhecedores de moléculas adesivas). Tais componentes se ligam à proteínas da matriz extracelular do hospedeiro (BOWDEN et al., 2005; IKAWATY et al., 2010), como fibronectina, fibrinogênio e colágeno (FOSTER et al., 2014). MSCRAMMs podem mediar a adesão de *S. aureus* em diferentes tipos celulares e superfícies abióticas, porém o papel das MSCRAMMs ainda não foi totalmente elucidado (CUCARELLA et al., 2001). Enzimas transpeptidase conhecidas como sortases, principalmente sortase A, presentes na maioria das bactérias gram-positivas (GUITON et al., 2009) podem mediar a aderência primária da bactéria em superfícies e são responsáveis pela ligação entre as proteínas de membrana e o peptidoglicano bacteriano (NEVES, 2012). Outra proteína importante é conhecida como agr, que regula a produção de diversos fatores de virulência presentes na superfície bacteriana e promove a adesão da bactéria a uma superfície biótica ou abiótica (VAUTOR et al., 2007).

As proteínas de membrana interagem com uma variedade de tecidos animais e humano, proteínas séricas e polipeptídeos da matriz extracelular. Essas interações permitem aos estafilococos a adesão em diferentes linhagens celulares com consequente invasão e apoptose das células epiteliais acometidas. Além dessa interação promovida entre a superfície e o tecido do hospedeiro, as MSCRAMMs dos *S. aureus* se ligam a proteínas séricas do hospedeiro e rapidamente colonizam superfícies de biopolímeros imediatamente após a implantação de equipamentos cirúrgicos (CUCARELLA et al., 2002).

A proteína de superfície BAP (biofilm-associated protein) possui 2276 aminoácidos (LASA et al., 2006) e é responsável por promover a fixação primária em superfícies inertes, ao contrário da PIA/PNAG (intercelular/adesina - PIA, composto de um polímero poli-N-acetil- β -(1-6)-glucosamina ou poli-N-acetilglucosamina - PNAG) que parece ser responsável apenas pela adesão intercelular (CUCARELLA et al., 2001; CUCARELLA et al., 2002; CUCARELLA

et al., 2004). A expressão de *bap* leva a formação do biofilme mesmo sem o operon *icaADBC*. Em bovinos há evidências da importância de *bap* em mastites por *S. aureus*.

As propriedades da superfície exposta, desempenham importante papel na aderência bacteriana. Alguns fatores influenciam na aderência, como as características físico-químicas do material da superfície, expressão de fatores de virulência da bactéria (FLACH et al., 2005), pH, temperatura (MELO, 2008; SREY et al., 2013) e hidrofobicidade da superfície (ARAÚJO et al., 2009). A hidrofobicidade de determinado material é expressa como a energia livre de interação entre dois entes físicos imersos na água. Uma superfície é considerada hidrofóbica quando as moléculas do sólido tem maior interação entre si do que pela água. Superfície hidrofílica é classificada quando a interação das moléculas do sólido imerso em água é repulsiva (ARAÚJO et al., 2009).

Inicialmente, o gene *bap* de *S. aureus* era incluído na ilha de patogenicidade móvel SaPI_{bov2} e sua mobilidade dependia de uma proteína recombinase auto-codificada. As ilhas de patogenicidade são ilhas genômicas presentes apenas em micro-organismos patogênicos e são responsáveis por carrear um ou mais genes de virulência (FORTES et al., 2012). O gene *bap* nunca foi encontrado em isolados de *S. aureus* de amostras humanas. No entanto, um gene ortólogo *bap* está presente no núcleo celular de diferentes espécies de SCN que colonizam a pele humana. *S. aureus* que possuem o gene *bap* são produtores de biofilme mesmo sem a presença do PIA/PNAG (VALLE et al., 2012).

B) Adesão irreversível

A variação da fase reversível para a irreversível ocorre quando há uma mudança da interação fraca que ocorre entre as bactérias para uma forte interação com a EPS. A interação entre o aglomerado e a superfície se dá por forças dipolo-dipolo, ligações iônicas ou covalentes, por pontes de hidrogênio ou forças hidrofóbicas. Nesse momento, as células estão aderidas ao substrato, biótico ou abiótico, dificultando sua remoção (NEVES, 2012). A fase irreversível é caracterizada pela adesão intercelular de *S. aureus*, a fim de que

ocorra um aglomerado celular mediado pela produção de PIA/PNAG (GERKE et al., 1998; CUCARELLA et al., 2001; VALLE et al., 2012). Mack et al. (1996) purificaram compostos específicos de *S. epidermidis* produtor de biofilme, e obtiveram duas frações polissacarídicas. A primeira, apresentando mais de 80% na composição, composta de um homoglicano linear de pelo menos 130 resíduos de β -1,6-ligada 2-deoxi-2-amino-D-glucopiranosil principalmente N-acetilado. A segunda fração, estruturalmente relacionada com o polissacarídeo I, porém com menor teor de não-N-acetilados e carregados positivamente.

PIA/PNAG compõe o grupo de adesinas não proteínáceas, bem como a parede teicóica e ácido lipoteicóico (BECKER et al., 2014). Ácidos teicóicos são compostos de fosfato e ribitol e estão presentes na parede bacteriana, e os lipoteicóicos possuem glicerol. Esses polímeros desempenham um papel importante na formação inicial do biofilme, pois possuem uma carga positiva elevada e se ligam à parede celular bacteriana, que na maioria das espécies possui carga negativa em pH neutro (GROSS et al., 2001). A expressão dessas proteínas podem ser alteradas pelas condições de crescimento, enquanto outras são encontradas na fase estacionária do crescimento bacteriano (FOSTER et al., 2014).

A proliferação celular e formação de biofilme é um fator de virulência e se dá pela presença do *locus ica*, composto por quatro genes *icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC* organizados em um *operon* (*icaADBC*) e também um gene regulatório *icaR*. Esse operon é responsável pela expressão da PIA/PNAG, presente na parede celular (GERKE et al., 1998) responsável pela aderência e colonização no tecido mamário (GÖTZ, 2002; ARCIOLA et al., 2004; GUIMARÃES et al., 2012).

IcaA, C e D estão presentes na membrana celular, enquanto *icaB* está presente no sobrenadante da cultura, ou seja, fora da membrana da célula. *IcaA* apresenta atividade da enzima N-acetilglucosaminil-transferase com N-acetil glucosamina como substrato. A expressão somente do *icaA* apresenta uma baixa atividade enzimática porém quando co-expresso com o *icaD*, a atividade é aumentada em até 20 vezes, o que leva a expressão fenotípica do polissacarídeo capsular (GERKE et al., 1998; GÖTZ, 2002; VASUDEVAN et al., 2003.; ARCIOLA et al., 2004; O'GARA, 2007). *IcaD* pode atuar no direcionamento de *icaA* para ligação na membrana, podendo atuar também na

ligação *icaA-icaC*. Oligômeros de N-acetil glucosamina produzidos pelos genes *icaAD* atingem um comprimento máximo de 20 resíduos e quando co-expressos com *icaC*, produzem longa cadeia que reagem com anti-soro de PIA (GÖTZ, 2002).

Estudos in vitro detectaram resíduos de não acetilados por espectroscopia de massa. Sabe-se que, inicialmente, o produto principal é acetilado e a desacetilação é um passo subsequente à produção de PIA, que leva a carga positiva de N-glucosamina, sugerindo que *icaB* esteja envolvido nessa etapa, sendo responsável pela desacetilação de PIA. O papel de *icaC* na síntese de biofilme é desconhecido. No entanto, estudos indicaram que *icaA* e *icaC* são fundamentais na produção de PIA, pois quando inativados, *Staphylococcus carnosus* perdeu sua característica fenotípica de adesão intercelular. Sugere-se que *icaC* está envolvido na translocação de polissacarídeo pela membrana citoplasmática (GÖTZ, 2002).

2.5 Biofilmes e mastite

Desde 1990, os biofilmes tem sido reconhecidos na medicina como responsáveis por causar infecções crônicas. *S. epidermidis* e *S. aureus*, presente em infecções nosocomiais, *Escherichia coli* nas infecções na próstata e biliares e *Streptococcus* sp importante em periodontites, cáries dentárias, endocardites, meningite, entre outras. Essas bactérias participam também na etiologia das mastites, dificultando o tratamento de infecções crônicas, podendo-se relacionar à sua capacidade de formação de biofilme (MELCHIOR et al., 2006).

Estabelecida a presença de biofilme, ocorre a adesão e a colonização do epitélio da glândula mamária por micro-organismos, dificultando a atuação do sistema imunológico, tornando as infecções persistentes (OLIVEIRA et al., 2006). Na infecção intramamária, agrupamentos bacterianos são desenvolvidos no interior do úbere facilitando a adesão deste patógeno no epitélio mamário (OLIVEIRA et al., 2011).

Melchior et al. (2006) revelaram que a presença de bactérias formadoras de biofilme contribui para a ocorrência de infecções crônicas nas mastites bovinas, com dificuldades no tratamento.

Evidências de que a infecção intramamária esteja associada com a formação de biofilme é realçada pela resistência dos patógenos aos antimicrobianos. Foi evidenciado por Hensen et al. (2000), que ao testar a sensibilidade de neomicina, neomicina com penicilina, neomicina com tetraciclina, neomicina com bacitracina e tetraciclina com bacitracina estes antimicrobianos foram mais sensíveis para células não aderentes de *S. aureus* que para células aderentes.

Estudo realizado por Melo (2008) demonstrou que a gentamicina e a eritromicina foram os antimicrobianos menos efetivos contra *S. aureus* nos biofilmes. Os aspectos de resistência de cepas deste patógeno produtor de biofilmes devem ser avaliados considerando-se as dificuldades relacionadas ao tratamento de mastites e as menores taxas de cura no tratamento das mastites ocasionadas por *S. aureus* (AMORENA et al., 1999; COELHO et al., 2009; BABRA et al., 2013). Estudos in vitro mostraram que as bactérias presentes nos biofilmes apresentam 10-1000 vezes mais resistência aos antimicrobianos, quando comparado ao mesmo agente, em estado planctônico (AMORENA et al., 1999).

Quanto a efetividade do hipoclorito de sódio contra cepas de *S. aureus*, a concentração de 150ppm após 5min de contato foi incapaz de inibir o crescimento bacteriano. Quando o tempo de contato foi aumentado para 10min, houve inibição do crescimento de todas as cepas em estudo. Na concentração de 300ppm todas as bactérias em biofilme foram eliminadas (MELO, 2011).

2.6 Biofilmes e sua importância na Medicina Veterinária

O risco de infecção é elevado nos animais, em razão do meio ambiente que estão inseridos, expondo-os a inúmeros patógenos ambientais, presentes nas fezes, lama ou cama dos animais.

A presença de biofilmes nos *S. aureus* isolados de animais parece estar envolvida em doenças como pneumonia, abscessos hepáticos, enterites, feridas e infecções intramamárias podendo ser de origem ambiental ou parte da microbiota normal dos animais (CLUTTERBUCK et al., 2007). Biofilmes podem ocorrer em suturas de feridas (KÖNIG et al., 2014), feridas crônicas em

cavalos (COCHRANE et al., 2009) e infecções intramamárias crônicas associadas, a presença do gene *bap* (CUCARELLA et al., 2004).

S. aureus é frequentemente relatado na literatura, como um dos principais responsáveis por infecções crônicas (COSTERTON et al., 1999) com persistência da infecção, relacionada à resistência bacteriana (BABRA et al., 2013).

2.7 Aspectos de saúde pública

2.7.1 Biofilmes e indústria de alimentos

Uma vez aderido à superfícies bióticas ou abióticas, os micro-organismos passam de um estado inicialmente planctônico a um estado sésil, formando microcolônias que posteriormente se desprendem e retornam ao seu estado planctônico. Uma vez constituídos, os biofilmes oferecem uma fonte de contaminação constante pois liberam células de micro-organismos patogênicos como *S. aureus* comprometendo a qualidade de matérias primas ou ainda do produto já finalizado (BOARI et al., 2009).

No contexto de segurança alimentar, o biofilme se desenvolve nos alimentos, utensílios e superfícies, o que desencadeia dificuldade na sua remoção. Na indústria de alimentos, a formação de biofilme acarreta riscos para a saúde do consumidor, bem como prejuízos financeiros. Dentre os micro-organismos que desencadeiam a formação de biofilme, *S. aureus* é um dos responsáveis por gerar problemas econômicos e de saúde pública. Uma vez constituído, o biofilme é de difícil remoção, pela forte adesão gerada pelas bactérias (KASNOWSKI et al., 2010).

Bactérias associadas à formação de biofilme são mais resistentes aos antibióticos, desinfetantes e defesas imunológicas do organismo (MELCHIOR et al., 2006). Na indústria de laticínios, a elevada taxa microbiana aderida às diversas superfícies, como aço, inox, policarbonato, ferro entre outros, pode contaminar os alimentos, constituindo risco à saúde do consumidor e prejuízos financeiros pela redução na vida de prateleira dos produtos lácteos (KASNOWSKI et al., 2010).

Nas indústrias lácteas, biofilme consiste em um problema significativo. Na maioria dos casos, a contaminação do leite e seus derivados ocorre no processo de industrialização, devido a limpeza e desinfecção inapropriadas dos equipamentos (SIMÕES et al., 2010). O controle de biofilme geralmente envolve o processo *clean-in-place* (CIP). Produtos a base de cloro são os mais utilizados no processo de sanitização, outros como quaternário de amônio, ácidos aniônicos e compostos de iodo também são utilizados em sistemas CIP (OLIVEIRA et al., 2013).

2.8 Biofilmes e infecções nosocomiais

Utilizado para definir infecções de origem hospitalar, o termo nosokomeion - local onde se tratam doentes - deriva do grego. Infecções nosocomiais são aquelas cujo doente adquire no ambiente hospitalar ou após o momento da alta, desde que esteja diretamente relacionada com qualquer procedimento hospitalar. O problema é reconhecido como um dos flagelos mundiais na saúde pública. Apesar dos avanços na redução dessas infecções, o impacto em termos de saúde do paciente é enorme tanto em aspectos sociais quanto econômicos. A dificuldade na erradicação e tratamento dessas infecções se dá pela multirresistência dos micro-organismos e a formação de biofilmes em materiais hospitalares (HENRIQUES et al., 2013).

A formação de biofilmes, na maioria dos ambientes, é constituída por aglomerados celulares multiespécies. Em contraste, nas infecções nosocomiais, *S. epidermidis* está presente em aproximadamente 80%, em razão de pertencer a microbiota natural da pele humana (GÖTZ et al., 2002).

Considerando os gastos no tratamento e manutenção de um paciente em um hospital e aumento da morbimortalidade, infecções hospitalares são consideradas um problema de saúde pública. Infecções no trato urinário por agentes como *Proteus* sp e *Pseudomonas* sp tendem a formar biofilmes em catéteres. O reconhecimento dessas bactérias podem designar um falso positivo, não correspondendo a bacteriúria verdadeira (ALMEIDA et al., 2007).

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Verificar a capacidade de produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* e SCN isoladas de amostras de leite oriundas de casos de mastite clínica e subclínica bovina.

3.2 Específicos

- Investigar a presença dos genes *icaA*, *icaD* e *bap* responsáveis pela formação de biofilme e adesão intercelular, em cepas de *S. aureus*;
- Avaliar a capacidade de produção de biofilme dos *S. aureus* e de SCN apresentada no ágar vermelho congo;
- Avaliar a produção de biofilme por estirpes de *S. aureus* em placas de poliestireno;
- Relacionar a presença dos genes de formação de biofilmes com a intensidade dos casos de mastite subclínica, bem como sua relação com a CCS.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

A colheita do material foi realizada em duas propriedades leiteiras do estado de São Paulo. No manejo de ordenha, as duas propriedades realizam antissepsia dos tetos antes da ordenha (*pré-dipping*) e após a ordenha (*pós-dipping*). Foram realizadas um total de nove visitas, em intervalos mensais, para atingir o número de estirpes proposto.

4.1 Características das propriedades

4.1.1 Propriedade A

Foram analisadas 485 amostras de leite de vacas das raças Jersey, Holandesa e mestiça (Jersey X Holandesa) no período de Novembro de 2013 a Julho de 2014. O número médio de animais em lactação é de 130 vacas, ordenhadas mecanicamente três vezes ao dia. A produção média é de 3 mil litros de leite por dia, com sistema de criação semi-extensivo.

4.1.2 Propriedade B

Foram analisadas 264 amostras de leite de vacas da raça Holandesa P.O. no período de Novembro de 2013 a Julho de 2014. O número médio de animais em lactação é de 400 vacas ordenhadas mecanicamente três vezes ao dia. A produção média é de 11 mil litros de leite por dia, com sistema de criação intensivo.

As análises microbiológicas, contagem de células somáticas e moleculares foram realizadas no Núcleo de Pesquisa em Mastites (NUPEMAS), do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, da FMVZ - UNESP/Botucatu, SP.

4.2 Seleção dos animais

Em ambas as propriedades, todas as vacas lactantes foram submetidas mensalmente à prova do *California Mastitis Test*, para identificação de mastite subclínica, sendo colhidas amostras de leite reagentes ao teste, a partir da reação 1+. Dos animais que apresentavam quadro clínico evidente de mastite, também foram colhidas amostras em tubos previamente esterilizados.

4.3 Amostras

Foram utilizadas 100 cepas de *S. aureus* e 100 cepas de SCN isoladas de casos de mastites bovinas subclínicas e clínicas nas propriedades descritas anteriormente.

4.3.1 Tamis, *California Mastitis Test* e colheita de leite para cultivo microbiológico

Foram desprezados os três primeiros jatos de leite e realizado o CMT (SCHALM & NOORLANDER, 1957) com aproximadamente 2 mL de leite, adicionando-se o mesmo volume de reagente. Foram colhidas amostras de leite positivas ao teste com escores de 1+, 2+ e 3+.

A partir desse resultado, foi realizada a lavagem com água, secagem com papel toalha descartável e desinfecção do óstio do teto, com solução de álcool iodado a 5%. Foram colhidas amostras de 5 mL de leite, em frascos de vidro previamente esterilizados, designados especificamente para a realização de exame microbiológico. As amostras foram transportadas para o laboratório sob temperatura de refrigeração, em caixa de material isotérmico contendo gelo reciclável. Nos casos de mastites clínicas o diagnóstico foi procedido pelo exame de secreção láctea e caneca de fundo preto (prova de Tamis) com observação de características do leite, como presença de grumos, pus, sangue ou leite em dessora.

4.3.2 Contagem de células somáticas

Simultaneamente a obtenção de amostras para exame microbiológico, foram colhidas das mesmas mamas, amostras de aproximadamente 25 mL de todos os quartos mamários e individualmente dos quartos reagentes ao CMT.

A contagem eletrônica de células somáticas das amostras de leite foi realizada por citometria de fluxo em equipamento Somacount 300® (BENTLEY, 1995). Foram utilizados frascos plásticos próprios, contendo conservante (bronopol), que apresenta formato de pastilha que, em contato com o leite, forma uma mistura de coloração róseo-claro. As amostras colhidas permaneceram em temperatura ambiente por, no máximo, cinco dias após a colheita, para a realização das análises.

Na técnica de citometria de fluxo, as células coradas são carregadas por um líquido sendo excitadas por um feixe de laser. Os núcleos corados emitem, por fluorescência, impulsos luminosos que são ampliados por um foto multiplicador, contados e convertidos em concentração de células somáticas (SILVEIRA et al., 2005).

4.3.3 Isolamento e identificação de estafilococos

A pesquisa da microbiota aeróbica procedeu-se semeando-se 10µL de leite de cada amostra em meio de ágar base adicionado de 5% de sangue ovino, incubando-se as placas a 37°C com observação do desenvolvimento microbiano a cada 24 horas, por três dias. A morfologia das colônias foi avaliada, com relação ao tamanho, forma, odor, produção de pigmento e hemólise. Também foi realizado o exame bacterioscópico por meio de lâminas coradas pelo método de Gram, verificando-se ao microscópio características tintoriais e morfológicas.

Foram consideradas como amostras positivas as que revelaram o isolamento de três ou mais colônias de um mesmo micro-organismo, exceto para *Staphylococcus aureus* que foram consideradas como positivas a partir do isolamento de uma colônia. No caso do isolamento de três ou mais micro-organismos a amostra foi considerada como contaminada (NMC, 1999).

Posteriormente ao isolamento das cepas em ágar sangue ovino 5% e identificação presuntiva do gênero *Staphylococcus*, os isolados foram conservados em caldo cérebro-coração (*Brain Heart Infusion* - BHI) e mantidos em temperatura de congelamento (-80°C) para realização de técnicas de biologia molecular pelas metodologias descritas a seguir.

Após a análise morfo-tintorial, cocos Gram positivos foram submetidos a provas de catalase e coagulase. *Staphylococcus* coagulase negativa foram diferenciados de *Kokuria*, com base nas provas de oxidação e fermentação da glicose, e pela resistência à bacitracina (0,04 U), indicada pela ausência de halo de inibição ou formação de halo de até 9 mm e pela sensibilidade à furazolidona (100 µg), caracterizada por halos de inibição de 15 a 35 mm de diâmetro (BAKER, 1984) (Figura 2A). A diferenciação de outras espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva, foi pela fermentação dos açúcares: manitol, maltose e trealose (Figura 2C), resistência à Polimixina B (300UI) e produção de acetoina (KONEMAN et al., 2008).

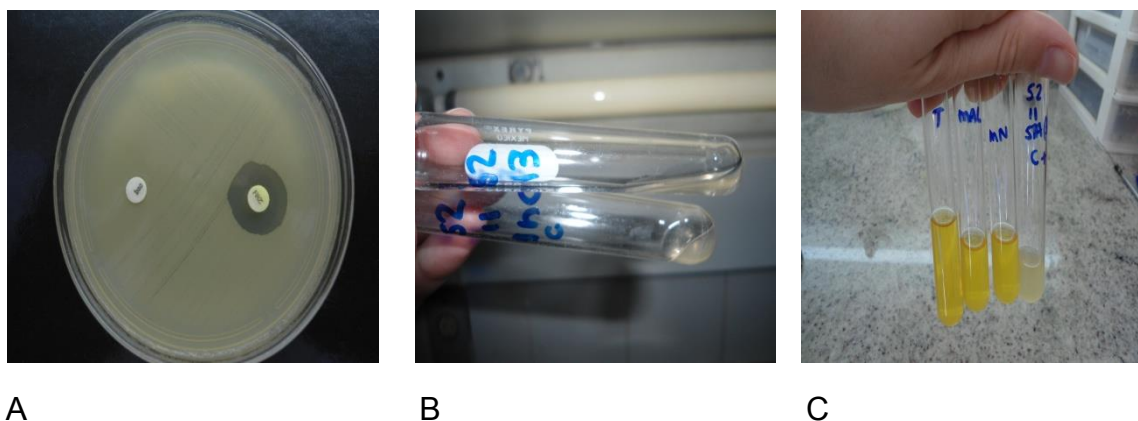


FIGURA 2: Identificação fenotípica do gênero *Staphylococcus*. A = resistência à bacitracina (0,04 U) e sensibilidade à furazolidona (100µg). B = prova da coagulase livre em tubo em isolados de *S. aureus*. C = fermentação de açúcares (manitol, maltose e trealose).

Isolados identificados como estafilococos foram submetidos à técnica de PCR para confirmação da ausência do gene da coagulase (*coa*) para os SCN e amplificação do gene *staur* para confirmação de *S. aureus*.

4.4 Caracterização genotípica

4.4.1 Extração do DNA

O ácido nucléico total foi extraído das linhagens de *S. aureus* e SCN reisoladas em ágar sangue em 24h a 37°C. A extração foi realizada com kit Illustra Blood Genomic Prep Mini Spin (GE® Healthcare), com modificação, que consistiu na digestão inicial das células de estafilococos com lisozima (10 mg/mL) e proteinase K (20 mg/mL). A seguir 400 µL do tampão de lise foram adicionados à mistura que, em seguida, foi centrifugada a 10.000 x g por 1 min. O sobrenadante foi transferido para a coluna e centrifugado a 11.000 x g por 1 min. O líquido coletado foi descartado e 500 µL de tampão de lise foram então adicionados novamente à coluna (Figura 3). Após a centrifugação e descarte do líquido coletado, 500 µL da solução de lavagem foram adicionados à coluna, submetendo o material à nova centrifugação a 11.000 x g por 3 min. A seguir, a coluna foi transferida para um microtubo de 1,5 mL e adicionados 200 µL de tampão de eluição aquecido a 70°C. As amostras foram centrifugadas a 11.000 x g por 1 minuto, e a coluna foi desprezada. O DNA extraído foi mantido a -20°C, para posterior pesquisa dos genes codificadores de biofilme.

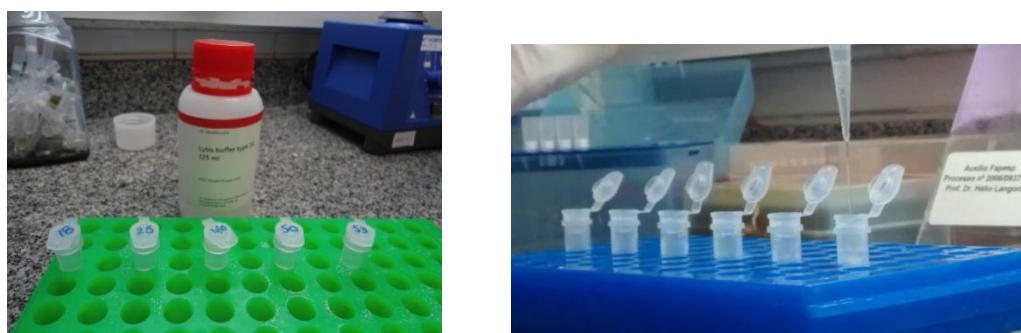


FIGURA 3: Etapa da extração de ácido nucleico, adição de tampão de lavagem à coluna.

4.4.2 Amplificação do ácido nucléico - Reação em Cadeia pela Polimerase (Polimerase Chain Reaction - PCR)

As reações de PCR foram realizadas em microtubos de 0,5mL com volume total de 25µL cada, contendo 10 pmol/ µL de cada primer, 1,0U de Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen®), 200µM de desoxiribonucleotídeos trifosfatados, PCR buffer 1x 0,75 mM de MgCl₂ e 3 µL da amostra. Cepas de referência de *S. aureus* e *S. epidermidis* foram utilizadas como controle positivo e negativo para os genes *icaA*, *icaD* e *coa* respectivamente (ATCC 25923) e (ATCC 12228) (MELO et al., 2012). Para controle positivo para o gene *bap* foi utilizado um isolado que apresentou positividade na PCR com produto de 971bp. O produto foi sequenciado e obteve-se identidade de 99% para *S. aureus* V329 (GenBank, número de acesso AY220730).

As 100 amostras caracterizadas como *S. aureus* e as 100 amostras identificadas como SCN foram submetidas à PCR para confirmação ou não da região intergênica 16S-23S presente em *S. aureus*. Para a amplificação da região intergênica 16S-23S, foram utilizados os primers *staur4* e *staur6* com o seguinte perfil de ciclagem: 94°C por 2min, seguido de 35 ciclos de amplificação com desnaturação a 94°C por 45s, anelamento a 64°C por 1min, extensão a 72° por 2 min e extensão final a 72°C por 10min (STRAUB et al., 1999; RIFFON et al., 2001)

A amplificação dos genes *icaA* e *icaD* foi realizada de acordo com Vasudevan et al. (2003) com trinta ciclos de amplificação que consistem na desnaturação a 92°C por 45s, anelamento a 49°C por 45s, alongamento a 72°C por 1min, com uma extensão final de 72°C por 7min.

Para amplificação do gene *bap* utilizou-se a metodologia descrita por Cucarella et al. (2004) com desnaturação inicial de 95°C por 4 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 54°C por 30s e extensão a 72°C por 5min.

Para confirmação da ausência do gene da coagulase, foi realizada a amplificação do gene da coagulase (*coa*) que amplifica fragmentos de perfis variados que podem ser utilizados para distinguir pelo menos 3 coagulotipos utilizando os primers descritos no quadro 1, com o seguinte perfil de ciclagem: 94 °C por 2 min, seguido de 30 ciclos de amplificação com desnaturação a

95 °C por 30s, anelamento a 55 °C por 2 min, extensão a 72 °C por 4 min e extensão final a 72 °C por 7 min de acordo com Veras et al. (2008).

A incubação foi realizada em termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf®). Os oligonucleotídeos específicos iniciadores (Quadro 1) para a amplificação dos genes *icaA* e *icaD* foram utilizados de acordo com Vasudevan et al. (2003) e do gene *bap* de acordo com Cucarella et al. (2004). Para o gene *coa* os oligonucleotídeos utilizados foram de acordo com Veras et al. (2008).

QUADRO 1: Sequência dos oligonucleotídeos e tamanhos dos produtos amplificados, utilizados na reação de PCR para detecção de genes *icaA*, *icaD*, *bap* e *coa*.

Genes	Primers	Sequência do oligonucleotídeo	Tamanho do Produto
<i>staur</i>	staur4 staur6	ACG GAG TTA CAA AGG ACG AC AGC TCA GCC TTA ACG AGT AC Straub et al. (1999)	1250pb
<i>icaA</i>	icaAF icaAR	CCT AAC TAA CGA AAG GTA G AAG ATA TAG CGA TAA GTG C Vasudevan et al. (2003)	1315pb
<i>icaD</i>	icaDF icaDR	AAA CGT AAG AGA GGT GG GGC AAT ATG ATC AAG ATA C Vasudevan et al. (2003)	381pb
<i>bap</i>	bapF bapR	CCC TAT ATC GAA GGT GTA GAA TTG CAC GCT GTT GAA GTT AAT ACT GTA CCT GC Cucarella et al. (2004)	971pb
<i>coa</i>	coaG2 coaG3	ACC ACA AGG TAC TGA ATC AAC G TGC TTT CGA TTG TTC GAT GC Veras et al. (2008)	Variável

4.5 Visualização dos produtos amplificados

A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese em gel de agarose a 2% preparado em tampão de TBE 1,0 X (89 nM Tris-HCl, 89 mM ácido bórico e 20 mM EDTA) e corado com brometo de etídeo GIBCO BRL® 10mg/mL (LifeTechnologies®). O tamanho dos produtos amplificados foi comparado com o padrão 50 pb (Norgen®) e 100 pb (Invitrogen®) e posteriormente fotografado sob transiluminação UV.

4.6 Caracterização fenotípica

4.6.1 Produção de pigmento em meio ágar vermelho congo (VC)

A produção de biofilme foi verificada segundo método descrito por Freeman et al. (1989), com algumas modificações. Para o volume total de 1000mL, esterilizou-se separadamente 900mL de ágar BHI (52g/L) e 100 mL de água MilliQ (Millipore®). Posteriormente, ao ágar a 55°C adicionou-se 30 mL de solução aquosa de vermelho congo (0,8g/L) e 70 mL de solução aquosa de sacarose (50g/L), ambas filtradas separadamente em membrana 22µ.

As cepas de *S. aureus* foram semeadas em placas contendo ágar vermelho congo e incubadas a 37°C por 24-48 horas. Colônias produtoras de biofilme apresentam coloração negra (Figura 4). Colônias vermelhas a bordô não são produtoras de biofilme e apresentam coloração vermelha com aspecto úmido (FREEMAN et al., 1989; ARCIOLA et al., 2001; VASUDEVAN et al., 2003).

Cepas de referência de *S. aureus* foram utilizadas como controle positivo (ATCC 25923) e negativo (ATCC 12228) (MELO et al., 2012).

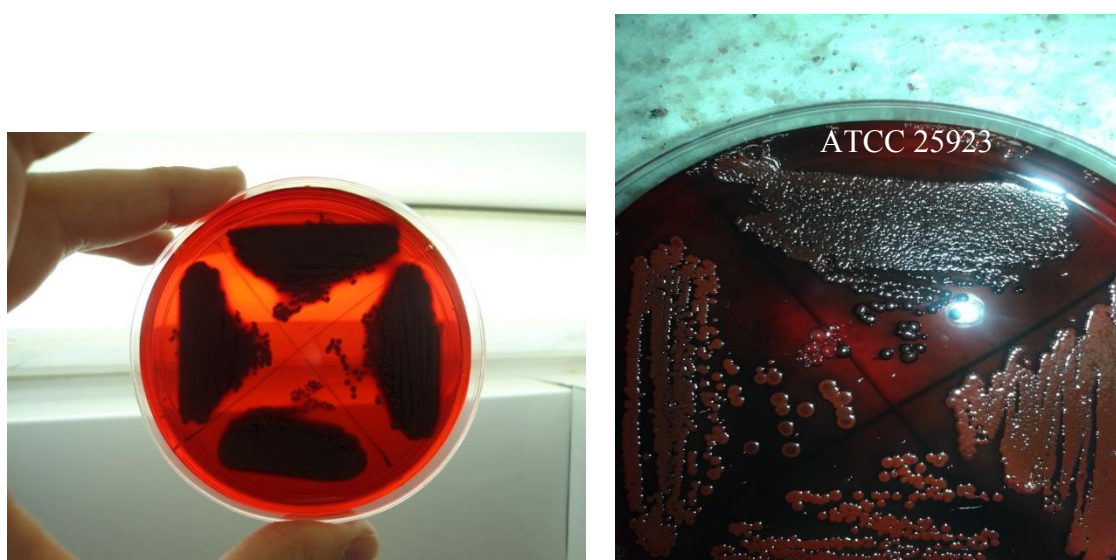


FIGURA 4: Colônias negras em ágar vermelho congo, estirpes de *S. aureus* produtoras de biofilme em placa (esquerda). Controle positivo ATCC 25923 (direita).

4.6.2 Produção de biofilme em placa de poliestireno

O teste de aderência em microplaca de poliestireno foi realizado de acordo com Christensen et al. (1985), com algumas modificações. Esse método consiste na leitura do material aderente na placa, por meio da densidade óptica.

As estirpes, previamente isoladas em caldo BHI por 24 horas, foram padronizadas na escala 0,5 de McFarland, que consiste em aproximadamente 150×10^6 unidades formadoras de colônias (Figura 5A). Posteriormente, essas culturas foram transferidas em quadruplicata, com volume de 200 μ L por poço, para placas de fundo reto com 96 cavidades, esterilizadas (modelo 92096, TPP®). Em todas as placas, foram utilizadas uma amostra de controle positivo (ATCC 25923), uma como controle negativo (ATCC 12228) e outra com BHI estéril. As placas foram incubadas a 37° por 48h em estufa BOD (Tecnal TE-391). Após esse período, o conteúdo de cada poço foi aspirado cuidadosamente com pipeta multicanal e lavado três vezes com 200 μ L de tampão fosfato salina (PBS) pH 7,2. As placas foram secas em temperatura ambiente por 1 hora. A seguir, os poços foram corados com solução de cristal violeta a 1% durante 15 min (Figura 5B). O volume foi aspirado e a seguir, os poços lavados três vezes com 200 μ L de água destilada e novamente mantidos a 1 hora em temperatura ambiente para secagem da placa.

A leitura da densidade óptica foi realizada em leitor de Elisa (Labsystems, Multiskan EX) utilizando-se filtro de 540nm, próximo ao recomendado por Christensen et al. (1985). Estirpes consideradas com produtoras de biofilme, resultaram em um valor menor que 0,1 após o cálculo da média de cada amostra subtraindo-se ao valor da média obtida da amostra de BHI não inoculado.



FIGURA 5: Isolados de *S. aureus* em escala 0,5 de MacFarland (esquerda). Coloração da placa com cristal violeta 1% (direita).

4.7 Análises estatísticas

Distribuições de frequência (PROC FREQ; SAS Institute, 2011) foram produzidas para descrever a percentagem de cepas de *S. aureus* que continham os genes responsáveis pela produção de biofilmes.

O teste de Qui-quadrado ou de Fischer (PROC FREQ; SAS Institute, 2011) foram usados para comparar a proporção de cepas produtoras de biofilmes com as características dos casos subclínicos entre as cepas produtoras ou não de biofilmes.

Análise de variância (PROC GLM; SAS Institute, 2011) foi usada para comparar a CCS média (em escala logarítmica) entre as cepas produtoras ou não de biofilmes. As análises estatísticas foram realizadas com SAS 9.2 (SAS Institute, 2011) com nível de significância estatística de 0.05.

Resultados

5 RESULTADOS

Foram confirmados 100 isolados de *S. aureus* pela amplificação do DNA cromossômico e 100 de SCN pela ausência do gene da coagulase.

Para as estirpes de *S. aureus* que possuíam o gene *bap*, a positividade no teste genotípico foi de 58% (58/100). A frequência do gene *icaA* foi 82% (82/100). Verificou-se também que a positividade para *icaD* no teste genotípico foi de 83% (83/100). A presença dos três genes pesquisados, foi observada em 56% das estirpes de *S. aureus*.

Ao se analisar a presença dos genes *icaA* e *bap* observou-se que de 82% (82/100) que foram positivas genotipicamente para *icaA*, 68,3% (56/82) também foram positivas para *bap*. A positividade para o gene *icaD* correspondeu a 83% (83/100) das amostras de *S. aureus*. Destas, 98,8% (82/83) também apresentaram o gene *icaA*. Na associação da presença dos genes *icaD* e *bap* também foi possível observar uma boa relação, sendo que dos 83% (83/100) dos *S. aureus* que apresentaram o gene *icaD*, foi possível constatar também a presença de *bap* em 67,5% (56/83).

Na Tabela 1 verifica-se a intensidade positiva ao teste de CMT e sua relação com o agente envolvido, sendo que o escore 3+++ ocorreu com maior frequência tanto em *S. aureus*, com 62 (62%), quanto em SCN, com 55 (55%). Observou-se diferença estatística entre os valores médios de CCS, quando comparado entre os dois agentes ($P=0,02$). Na mesma tabela pode-se observar que a média dos valores de CCS foi maior no escore 3+++ , tanto para *S. aureus*, quanto SCN, porém não houve diferença estatística entre esses valores. Quando avaliada as médias CCS entre as espécies estudadas, obteve-se um valor mais elevado para estirpes de *S. aureus* ($2,88\pm 0,59$), que para estirpes de SCN ($2,71\pm 0,35$) com $P=0,02$.

TABELA 1: Distribuição das frequências da relação da intensidade de reação positiva ao teste de CMT com o agente envolvido e média do $\log_{(10)}$ dos resultados de CCS, em estirpes de *S. aureus* e SCN de amostras oriundas de mastite bovina subclínica e clínica em duas propriedades do estado de São Paulo, no período de Novembro de 2013 a Julho de 2014.

	Intensidade do CMT*										
	1	%	Média do $\log_{(10)}$ CCS	2	%	Média do $\log_{(10)}$ CCS	3	%	Média do $\log_{(10)}$ CCS	Clínica	%
S. aureus	16/(100) ^a	16	2,70 ($\pm 0,74$) ^a	22/(100) ^a	22	2,70 ($\pm 0,54$) ^a	62/(100) ^a	62	3,0 ($\pm 0,55$) ^a	0/(100)	0
SCN	15/(100) ^a	15	2,50 ($\pm 0,25$) ^b	22/(100) ^a	22	2,68 ($\pm 0,27$) ^b	55/(100) ^a	55	2,79 ($\pm 0,40$) ^b	8/(100)	8
Total	31/(200)	15,5		44/(200)	22		117/(200)	58,5		8/(200)	4

*Intensidade classificada como: 1=+; 2=++ e 3=+++ . Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatística entre as médias (P=0,02). CCS: Contagem de Células Somáticas; CMT: *California Mastitis Test*; $\log_{(10)}$: Média do valor de CCS em escala logarítmica de base 10; SCN: *Staphylococcus coagulase-negativa*.

Observando a tabela 2 verifica-se os valores médios obtidos na CCS em estirpes de *S. aureus* oriundas de amostras de leite de mastite subclínica em relação a presença dos genes *icaA*, *icaD* e *bap*. Observou-se que na presença dos genes de formação de biofilme, a média do valor de CCS foi maior para os três genes estudados, com 2,90 ($\pm 0,60$), 2,90 ($\pm 0,60$) e 2,89 ($\pm 0,59$) para *icaA*, *icaD* e *bap*, respectivamente. Porém, sem significância estatística.

TABELA 2: Frequência dos genes *icaA*, *icaD* e *bap* e sua relação com a média do $\log_{(10)}$ de CCS de amostras de *S. aureus* oriundas de mastite subclínica bovina em duas propriedades do estado de São Paulo, no período de Novembro de 2013 a Julho de 2014.

<i>S. aureus</i>	<i>icaA</i>	Média do $\log_{(10)}$ de CCS	<i>icaD</i>	Média do $\log_{(10)}$ de CCS	<i>bap</i>	Média do $\log_{(10)}$ de CCS
Ausência	18	2,77 ($\pm 0,55$) ^a	17	2,79 ($\pm 0,56$) ^a	42	2,86 ($\pm 0,59$) ^a
Presença	82	2,90 ($\pm 0,60$) ^a	83	2,90 ($\pm 0,60$) ^a	58	2,89 ($\pm 0,59$) ^a

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatística entre as médias (P<0,05).

Ao observar a tabela 3, nota-se a relação entre a presença dos genes estudados, com a caracterização fenotípica em ágar vermelho congo. Observou-se que das estirpes de *S. aureus* que foram positivas no VC, duas não apresentaram os principais genes de formação de biofilme. A positividade no vermelho congo foi de 25% para amostras de *S. aureus*, e 5% para amostras de SCN. No teste de produção de biofilme em placas, o número de estirpes de *S. aureus* positivas foi 15% do total testada.

Das 82 estirpes de *S. aureus* que apresentaram o gene *icaA* no teste genotípico somente 13 foram positivas no teste de aderência, representando 15,8%. Para estirpes que continham o gene *icaD*, a positividade no teste foi de 15,6%. Em nenhuma das relações foi possível encontrar diferença estatística (P=1,0). Quando avaliada a relação da presença do gene *bap* com a positividade no teste de aderência, 12 (20,7%) estirpes foram positivas ao teste com o valor de P=0,08. Esse valor representa uma tendência a serem diferentes estatisticamente.

A concordância entre os dois testes fenotípicos foi pobre ($K=-0,10$). Das 75 estirpes que foram negativas para o vermelho congo, 62 (82,7%) também foram negativas para o teste de aderência. Do total de 15 amostras positivas na produção de biofilme em placas, apenas duas estirpes, que representou 13,3%, também foram positivas no ágar vermelho congo.

TABELA 3: Relação entre a presença dos genes *icaA*, *icaD* e *bap* e sua morfologia em VC de amostras de *S. aureus* oriundas de mastite bovina subclínica em duas propriedades do estado de São Paulo, no período de Novembro de 2013 a Julho de 2014.

Morfologia no VC	Presença do gene <i>icaA</i>	Presença do gene <i>icaD</i>	Presença do gene <i>bap</i>	N/(Total)
Preta	Presente	Presente	Presente	5/(100)
Preta	Presente	Presente	Ausente	17/(100)
Preta	Ausente	Presente	Ausente	1/(100)
Preta	Ausente	Ausente	Ausente	2/(100)
Vermelha	Presente	Presente	Presente	51/(100)
Vermelha	Presente	Presente	Ausente	9/(100)
Vermelha	Ausente	Ausente	Presente	2/(100)
Vermelha	Ausente	Ausente	Ausente	13/(100)

As figuras 6, 7 e 8 mostram imagens de géis de agarose com visualização dos produtos obtidos da PCR evidenciando a positividade do gene *icaA*, *icaD*, *bap* e *coa*, respectivamente.

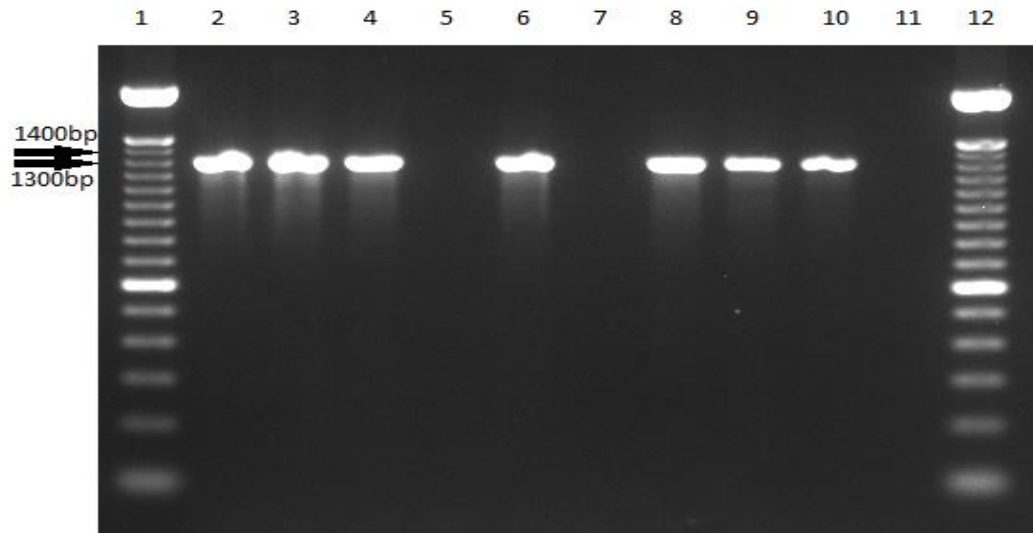


FIGURA 6: Eletroforese em gel de agarose a 2% demonstrando os produtos amplificados do gene *icaA* obtidos de amostras de *S. aureus* pelo método de PCR convencional. Linha 1: marcador de peso molecular 100bp. Linhas 2 a 4: amostras positivas para o gene *icaA*. Linhas 5 e 7: amostras negativas para o gene *icaA*. Linha 10: controle positivo ATCC 25923 (1315pb). Linha 11: controle negativo ATCC 12228.

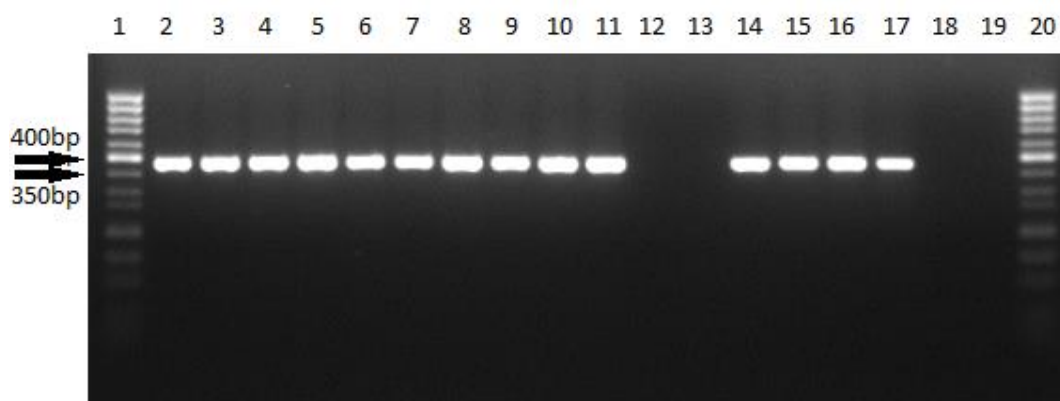


FIGURA 7: Eletroforese em gel de agarose a 2% demonstrando os produtos amplificados do gene *icaD* obtidos de amostras de *S. aureus* pelo método de PCR convencional. Linha 1: marcador de peso molecular 50bp. Linhas 2 a 11: amostras positivas para o gene *icaD*. Linhas 12 e 13: amostras negativas para o gene *icaD*. Linha 14: controle positivo ATCC 25923 (381pb). Linha 15: controle negativo ATCC 12228. Linha 16: controle negativo da PCR (ausência de DNA).



FIGURA 8: Eletroforese em gel de agarose a 2% demonstrando os produtos amplificados do gene *bap* obtidos de amostras de *S. aureus* pelo método de PCR convencional. Linha 1: marcador de peso molecular 100bp. Linhas 2 a 9: amostras negativas para o gene *bap*. Linha 10: controle positivo ATCC 25923 (971pb). Linha 11: controle negativo ATCC 12228.

Discussão

6 DISCUSSÃO

6.1 Presença dos genes *icaA*, *icaD* e *bap*

Diversos fatores estão envolvidos na formação de biofilme como, características da superfície, da bactéria e do meio que a envolve. A presença da membrana exopolissacarídea, que envolve o biofilme, fornece proteção contra agentes antimicrobianos e químicos, conferindo resistência a essa estrutura (COSTERTON, 1999).

Nas 100 estirpes de *S. aureus* isoladas de amostras de leite oriundas de bovinos com mastite subclínica, verificou-se que 82% apresentaram os genes *icaA* e *icaD*. Melo (2008), verificou a presença dos genes em 95,7% das estirpes de *S. aureus* avaliadas. Com relação a associação dos genes *icaA/icaD/bap*, 56% estirpes de *S. aureus* foram positivas para os três genes. Cucarella et al. (2004) pesquisaram 195 isolados de *S. aureus* de mastite bovina e encontraram 94,36% de positividade para *icaADBC* e desses, 25,6% também expressaram o gene *bap*. No presente estudo, amostras positivas para o gene *icaA* e *icaD* apresentaram 68,3% e 67,5%, respectivamente, de positividade para *bap*.

O gene *bap*, carregado por um transposon presente na ilha de patogenicidade móvel SaPI_{bov2}, presente apenas em isolados de *S. aureus* de origem bovina, contribui para o papel patogênico dessa bactéria em infecções persistentes (CUCARELLA et al., 2004). O gene também está presente em cepas de SCN: *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. xylosus*, *S. simulans* e *S. hyicus*, sugerindo a ocorrência de transferência horizontal entre eles do gene presente em SaPI_{bov2} (TORMO et al., 2005). A presença do gene *bap* confere cronicidade aos casos de mastite (CUCARELLA et al., 2004), porém *S. aureus* é capaz de formar biofilme mesmo sem a presença de *bap*. Essa espécie pode apresentar fatores de virulência, como a expressão de genes que regulam a maioria das proteínas de membrana estafilocócica, por exemplo *agr*, capaz de promover a adesão desse micro-organismo em superfícies inertes (VAUTOR et al. 2007; SZWEDA et al., 2012).

A presença de SCN em infecções intramamárias é muito comum, sendo considerados como patógenos emergentes nas mastites. O papel dos genes de

formação de biofilme em *S. epidermidis* isolados de material humano está bem elucidado na literatura, porém, até o presente momento, poucos estudos foram realizados para avaliação da formação de biofilme em SCN de importância veterinária. Rumi et al. (2013) verificaram a necessidade de desenharem *primers* específicos para o reconhecimento de espécies de SCN de importância veterinária, como *S. simulans*, *S. capitis*, *S. saprophyticus*, *S. caprae*, *S. sciuri*, *S. cohnii* e *S. epidermidis*. Os autores concluíram que o reconhecimento dos genes de formação de biofilme a partir de uma sequências consensuais para o gene *ica*, aumentou a sensibilidade quanto a detecção desses genes em estirpes de SCN.

Os oligonucleotídeos utilizados para detecção dos genes *icaA* e *icaD* descritos de acordo com Vasudevan et al. (2003), também foram utilizados por Simojoki et al. (2012). Esses *primers* funcionam bem para reconhecimento de estirpes de *S. aureus*, porém falham no reconhecimento de *S. epidermidis* (ATCC 35984), cepa sabidamente positiva para estes genes, considerados portanto ineficazes para a detecção desses genes em SCN (SIMOJOKI et al., 2012).

Entre as três principais espécies de estafilococos coagulase positiva: *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*, a primeira é considerada como mais importante na etiologia de mastites. A associação entre o teste de coagulase livre em tubos e a presença de beta hemólise em ágar sangue, parece ser eficiente na identificação de *S. aureus*. Porém, *S. aureus* coagulase-negativa pode ocorrer em infecções intramamárias e, se não identificado corretamente, pode resultar no erro de diagnóstico como SCN (AKINEDEN et al., 2011).

6.2 Produção de biofilme em ágar vermelho congo e no teste de aderência e placas

A caracterização fenotípica pelo ágar vermelho congo foi proposta por Freeman et al. (1989) como método alternativo para identificação da produção de biofilme em espécies de SCN. Colônias de coloração negra foram consideradas como produtoras de biofilme, representando 77,78% das cepas de SCN daquele estudo. As que apresentavam coloração vermelha, não possuíam essa capacidade. O resultados dos autores diferem do presente

estudo, o qual foi observada 5% de estirpes de SCN positivas ao vermelho congo.

Vasudevan et al. (2003) estudaram 35 amostras de *S. aureus* com objetivo de avaliar a capacidade produtora de biofilme *in vitro*, obtiveram 32 (91,4%) estirpes produtoras entre 24-48h de incubação, apresentando colônias negras com características de formação de biofilme em placas. Nenhuma estirpe expressou tal capacidade após 48h de incubação. Na caracterização genotípica, de todas as 35 cepas isoladas, foi amplificado os genes *icaA* e *icaD*.

Melo et al. (2013) encontraram 85% de cepas produtoras de colônias negras e rugosas e 15% de cepas não produtoras entre 94 amostras de *S. aureus* de mastite subclínica. Oliveira et al. (2006), Guimarães et al. (2012), Babra et al (2013) ao testarem a produção de biofilme em VC obtiveram 37,5%, 26,7% e 33,8% de positividade em amostras provenientes de casos de mastite bovina, resultados próximos ao encontrado no presente estudo, que foi de 25%, portanto, mais próximo ao de Guimarães et al. (2012).

A subjetividade na interpretação das placas do vermelho congo, torna o teste pouco reproduzível, resultado também observado por outros autores (ROHDE et al., 2001; SZWEDA et al., 2012). Arciola et al. (2001) associaram a presença dos genes *icaADBC* com o teste fenotípico, e 61% das estirpes de *S. aureus* continham os genes *icaA* e *icaD*. Rohde et al. (2001) encontraram 2,5% de positividade quando associaram o VC com a presença dos genes. Chaieb et al. (2005), Oliveira et al. (2006), Melo et al. (2013), encontraram positividade de 50%, 37,5% e 85% no vermelho congo, respectivamente. Nota-se por esses resultados que há uma variação considerável entre a associação dos testes genotípico e fenotípico. Tal fato, dificulta a relação dos resultados obtidos, com outros parâmetros avaliados.

Duas estirpes de *S. aureus* foram capazes de produzir biofilme sem a presença dos genes estudados. Chaieb et al. (2005) encontraram uma amostra que foi negativa para os dois genes mas produziu algumas colônias pretas no VC, indicando resultado positivo no teste. Ficou evidente para os autores, que a formação de biofilme pode estar associada a outros fatores, e não somente a presença dos genes *icaA* e *icaD*. Sugere-se também, que outros genes regulatórios, como exemplo o *agr*, ou ainda, outros genes de formação de

biofilme possam estar presentes nestas estirpes, estimulando a produção de PIA (MACK et al., 2000).

Mathur et al. (2006) encontraram dificuldade na relação entre o VC e outros testes fenotípicos, como método em tubos e aderência em placas. O resultado foi de 7,6% de sensibilidade, 97,2% de especificidade e 50,3% de acurácia no ágar vermelho congo. A baixa sensibilidade do teste, impossibilita a detecção de amostras verdadeiramente positivas.

A co-expressão dos genes *icaA* e *icaD* favorece o aumento da produção da enzima N-acetilglucosaminil, responsável pela formação de biofilme (GERKE et al., 1998; O'GARA, 2007). Constatou-se no presente estudo que dentre as linhagens que produziram biofilme no ágar vermelho congo, 68% (17/25) apresentaram os dois genes. Por outro lado, 80% (60/75) das amostras que não produziram biofilme no VC apresentaram *icaAD* ou *icaAD/bap*.

No presente estudo, das 100 cepas de *S. aureus* testadas fenotipicamente pela aderência em placas, 15% foram positivas ao teste. Porcentagem superior foi encontrada na presença dos genes de biofilme (86%). A relação entre os dois testes fenotípicos avaliados, foi pobre ($K < 0,20$). Vasudevan et al. (2003) não obtiveram boa relação entre a produção de biofilme em placas (68,7%) e teste genotípico, com 100% de positividade para os genes *icaA* e *icaD*.

Estudos anteriores reportaram maior eficiência na detecção de formação de biofilme quando utilizado o teste de aderência em placas em relação ao ágar vermelho congo (GUIMARÃES et al., 2012; MELO et al., 2013). No presente estudo a maior taxa de positividade no teste fenotípico foi no ágar vermelho congo em relação ao teste de aderência, com 25% e 15%, respectivamente. Esse resultado corrobora com o estudo realizado por Los et al. (2010), que ao compararem os resultados de estirpes positivas no ágar vermelho congo e no teste de aderência em placas, obtiveram 58,9% e 35,6%, respectivamente. A concordância entre os testes fenotípicos avaliados no presente estudo, foi pobre, com duas amostras positivas em ambos os testes. Esse resultado está de acordo com Oliveira et al. (2006) que também obtiveram duas estirpes de *S. aureus* positivas para ambos os testes.

Salienta-se que no presente estudo, a produção de biofilme foi avaliada por dois testes fenotípicos. Demais autores sugerem outros métodos de

identificação de cepas de estafilococos positivas genotipicamente, como o método de eletroforese em campo pulsátil (FOX et al., 2005) ou ainda o protocolo de hibridização fluorescente *in situ* (OLIVEIRA et al., 2006), com resultados satisfatórios em ambos os testes.

6.3 Contagem de células somáticas

A redução na produção de leite decorrente da mastite subclínica ocorre pelas alterações das células epiteliais secretoras, aumento da permeabilidade vascular no alvéolo secretor, no momento da infecção. Diversos fatores estão associados ao aumento de células somáticas, idade dos animais, número de partos, período de lactação e estação do ano. No entanto, a ocorrência de infecção intramamária é o principal fator de risco relacionado ao aumento de CCS (COENTRÃO et al., 2008; CUNHA et al., 2008). Durante o processo inflamatório ocorre a migração de células polimorfonucleares e nucleares da corrente sanguínea para a glândula mamária o que desencadeia o aumento de CCS, sendo que 80 a 90% dos constituintes do processo inflamatório são neutrófilos polimorfonucleares (GUIMARÃES, 2011).

A intensidade do processo inflamatório pode ser avaliada pela CCS, sendo utilizada no presente estudo para correlacionar a presença dos genes de formação de biofilme e seu reflexo na CCS. A média dos valores de CCS, por não apresentarem distribuição normal, foi obtida pelo Log de base 10 ($\log_{(10)}$). A média do $\log_{(10)}$ de CCS foi maior em estirpes de *S. aureus* ($2,99 \pm 0,54$) e SCN ($2,78 \pm 0,39$) com escore 3+++ no teste de CMT, para ambas espécies. Esse achado era esperado, o que demonstra que SCN também são capazes de induzir resposta imune intensa, assim como *S. aureus*, com médias de CCS semelhantes. Porém, a intensidade da inflamação não refletiu no processo inflamatório, com valores de $P > 0,05$.

Diferenças entre o manejo e tipo de ordenha podem influenciar nos resultados da CCS e do CMT, por exemplo, o tipo de ordenha e manejo da propriedade. Embora um escore mais elevado no CMT, esteja relacionado com maiores contagens de células somáticas no leite, é incerto dizer quando suas pontuações estão associadas, podendo refletir infecções intramamárias por patógenos específicos. Oliveira et al. (2013) não encontraram diferenças

significativas entre as medianas de CCS obtidas de amostras de *S. aureus* e SCN, pelo teste Kruskal-Wallis.

Andrade et al. (2009) obtiveram uma média de CCS de $5,84 \pm 5,43$, valores superiores aos encontrados no presente estudo. No entanto, nesse estudo os autores não analisaram os valores de CCS para diferentes espécies de microorganismos encontradas, como no presente estudo, com relação a amostras de SCN e *S. aureus*

A média dos valores de CCS foram maiores em *S. aureus* ($2,88 \pm 0,59$) que em SCN ($2,71 \pm 0,35$). Esses resultados foram diferentes estatisticamente, quando avaliada a média de CCS entre as diferentes espécies de estafilococos ($P=0,02$). Resultado esperado, pois sabe-se que *S. aureus* são capazes de aderir ao tecido mamário, causando infecções persistentes, resultando no aumento nos valores de CCS (RAZA et al. 2013).

Mello et al. (2012) avaliaram a relação do resultado microbiológico e CCS de amostras de leite bovino compostas dos quatro quartos mamários e obtiveram elevada contagem de células somáticas em *Staphylococcus* coagulase-negativa, reforçando a capacidade de SCN desencadear processos inflamatórios com aumento de celularidade do leite.

A resposta inflamatória da glândula mamária infectada, também foi relacionada com a presença de genes responsáveis pela formação de biofilme. Pode-se observar que a presença de qualquer um dos genes de biofilme pesquisado, influenciou na contagem de células somáticas, com número mais elevado em relação as estirpes que não continham os genes. No entanto, não foi observada diferença estatística significativa nessa relação, havendo apenas uma tendência de relação entre os valores de CCS e teste genotípico ($p=0,08$).

Conclusões

7 CONCLUSÕES

Quanto à habilidade de produção de biofilme em ágar vermelho congo, estirpes de *S. aureus* e de SCN, oriundas de leite bovino mastítico representaram 25% e 5% do total de amostras positivas ao teste, respectivamente. Das 100 estirpes de *S. aureus* avaliadas, 56 apresentaram os três genes pesquisados, porém, notou-se que a presença dos genes não influenciou na formação de biofilme *in vitro*, pois apenas 5 estirpes que apresentaram os três genes, foram positivas no ágar vermelho congo.

Quando avaliada a produção de biofilme em placa, obteve-se 15% das estirpes de *S. aureus* positivas ao teste, valor inferior ao obtido no ágar vermelho congo. Considera-se desnecessária a utilização simultânea dos dois testes, pela concordância pobre entre ambos, com apenas 2 amostras positivas em comum aos dois testes de produção de biofilme.

A co-expressão do genes *icaA* e *icaD* favoreceu a produção de biofilme em ágar vermelho congo, pois das 25 amostras de *S. aureus* positivas ao teste, 17 apresentaram os dois genes em associação.

Observou-se que a formação de biofilme pode envolver a presença de outros genes ou fatores, associados a produção de biofilme.

Não foi possível observar relação entre a presença de quaisquer um dos genes, *icaA*, *icaD* e *bap* na influência da contagem de células somáticas, bem como, com a intensidade da inflamação da glândula mamária.

Bibliografía

8 BIBLIOGRAFIA

ABDALLAH, F.B, CHAIEB, K.; ZMANTAR, T.; KALLEL, H.; BAKHROUF, A. Adherence assays and slime production of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Braz. J. Microbiol.*, v.40, n.2, p.394-398, 2009.

ACOSTA, A.; GUELFER, E.; RUIZ, A.; MOTA, R.A.; UFFO, O.; GOMES-FILHO, M.A.; BARBOSA, S.B.P. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Pernambuco State, Brazil. *Comp Clin Pathol.*, v.23, p.1037–1041, 2014.

AKINEDEN, O., HASSAN, A.A.; SCHNEIDER, E.; USLEBER, E. A coagulase-negative variant of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis milk. *J. Dairy Res.*, v.78, p.38–42, 2011.

ALMEIDA, M.C; SIMÕES, M.J.S.; RADÍ, M.S.G. Ocorrência da infecção urinária em pacientes de um hospital universitário. *Rev. Ciênc Farm. Básica Apl.*, v. 28, n.2, p.215- 219, 2007.

AMORENA, B.; GRACIA, E.; MONZÓN, M.; LEIVA, J.; OTEIZA, C.; PÉREZ, M.; ALABART, J.L.; HÉRNANDEZ-YAGO, J. Assessment of biofilm-forming ability of coagulase-negative *staphylococci* isolated from contaminated platelet preparations in Canada. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.44, p.43-55, 1999.

ANDRADE, H.H. Genotipagem de cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de mastites subclínicas bovina no distrito federal e entorno. 2012. 60p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília. Brasília, Distrito Federal.

ANDRADE, U.V.C.; HARTMANN, W.; MASSON, M.L. Isolamento microbiológico, contagem de células somáticas e contagem bacteriana total em amostras de leite. *Ars veterinaria* ,v.25, n.3, 129-135, 2009.

ARAÚJO, E.A.; BERNARDES, P.C.; ANDRADE, N.J.; FERNANDES, P.E.; SÁ, J.P.N. Hidrofobicidade de ribotipos de *Bacillus cereus* isolados de indústria de laticínios. *Alim. Nutr.* v.20, n.3, p.491-497, 2009.

ARCIOLA, C.R.; BALDASSARRI, L.; MONTANARO L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of *staphylococcal* strains from catheter associated infections. *J Clin Microbiol.*, v.39, p.2151-2156, 2001.

ARCIOLA, C.R.; CAMPOCCIA, D.; GAMBERINI, S.; RIZZI, S.; DONATIA M.E.; BALDASSARRI, L.; MONTANARO, L. Search for the insertion element IS256 within the *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates collected from biomaterial-associated infections. *Biomaterials* v.25, p.4117–4125, 2004.

BABRA, C.; TIWARI, J.G.; PIER, G.; THEIN, T.H.; SUNAGAR, R.; SUNDARESHAN, S.; ISLOOR, S.; HEGDE, N.R.; WET, S de.; DEIGHTON, M.; GIBSON, J.; COSTANTINO, P.; WETHERALL, J.; MUKKUR, T. The persistence of biofilm-associated antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical bovine mastitis cases in Australia. *Folia Microbiol.*, v.58, n.6, p.469-474, 2013.

BAKER, J.S. Comparison of various methods for differentiation of *staphylococci* and *micrococci*. *J Clin Microbiol.*, v.19, p.875-79, 1984.

BALLESTER, E.L.P. Contribuição dos micro-organismos para a alimentação do camarão rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Crustacea: Decapoda) em sistemas de cultivo e estuário da Lagoa dos Patos. 2008. 73p. Tese (Doutorado em Oceanografia Biológica). Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil.

BECKER, C.; HEILMANN, C.; PETERS, G. Coagulase-Negative *Staphylococci*. *Clin. Microbiol. Rev.* v.27, n.4, p.870, 2014.

BENTLEY. Somacount 300: Operator's manual. Chasca. 1995.

BHUTTO, A.L.; MURRAY, R.D.; WOLDEHIWET, Z. California mastitis test scores as indicators of subclinical intra-mammary infections at the end of lactation in dairy cows. *Res Vet Sci.* v.92, n.1, p.13–17, 2012.

BOARI, C.A.; ALVES, M.P; TEBALDI, V.M.R.; SAVIAN, T.V.; PICCOLI, R.H. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.29, n.4, p.886-895, 2009.

BOWDEN, M.G.; CHEN, W.; SINGVALL, J.; XU, Y.; PEACOCK, S.J.; VALTULINA, V.; SPEZIALE, P.; HÖÖK, M. Identification and preliminary characterization of cell-wall-anchored proteins of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology*, v.151, p.1453-1464, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Projeções do Agronegócio: Brasil 2012/2013 a 2022/2023. Assessoria de Gestão Estratégica. Brasília, 2013, 96p.

BRASIL. Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 62 de 29/12/2011. Instrução Normativa n.62, de 29 de dezembro de 2011. Diário Oficial da União, Brasília, Distrito Federal, 30 de dezembro de 2011. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assessoria de Gestão Estratégica. Valor Bruto da Produção. Janeiro de 2014.

BUENO,V.F.F.; NICOLAU, E.S.; MESQUITA, A.J.; RIBEIRO, A.R; SILVA, J.A.B.; COSTA, E.O.; COELHO, K.O.; NEVES, R.B.S. Mastite bovina clínica e subclínica, na região de Pirassununga, SP: Frequências e redução na produção. *Ciênc. Anim. Bras.*, v.3, n.2, p.47-52, 2002.

CHAIEB, K.; MAHDOUANI, K.; BAKHROUF, A. Detection of *icaA* and *icaD* loci by polymerase chain reaction and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* isolated from dialysate and needles in a dialysis unit. *J Hosp Infect*, n.61, p.225–230, 2005.

CHRISTENSEN, G.D.; SIMPSON, W.A.; YOUNGER, J.J.; BADDOUR, L.M.; BARRET, F.F.; MELTON, D.M.; BEACHEY, E.H. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of *Staphylococci* to medical devices. *J clin microbiol.*, v.22, n.6, p.996-1006, 1985.

CLUTTERBUCK, A.L.; WOODS, E.J.; KNOTTENBELT, D.C.; CLEGG, P.D.; COCHRANE, C.A.; PERCIVAL, S.L. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Vet. Microbiol.*, v.121, p.1–17, 2007.

COCHRANE, C.A.; FREEMAN, K.; WOODS, E.; WELSBY, S.; PERCIVAL, S.L. Biofilms evidence and the microbial diversity of horse wounds. *Can. J. Microbiol.*, v.55, p.197–202, 2009.

COELHO, S.M.O.; REINOSO, E.; PEREIRA, I.A.; SOARES, L.C.; DEMO, M.; BOGNI, C.; SOUZA, M.M.S. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Rio de Janeiro. *Pesquisa Vet Brasil.*, v.29, n.5, p-369-374, 2009.

COENTRÃO, C.M.; SOUZA, G.N.; BRITO, J.R.F.; PAIVA E BRITO, M.A.V.; LILENBAUM, W. Fatores de risco para mastite subclínica em vacas leiteiras. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.60, n.2, p.283-288, 2008.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial Biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*, v.284, n.5418, p.1318-1322, 1999.

COSTERTON, J.W. Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Ag.*, n.11, p.217-221, 1999.

CUCARELLA, C.; SOLANO, C.; VALLE, J.; AMORENA, B. LASA, I.; PENADÉS, J.R. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *Journal Bacteriol.*, v.183, n.9, p.2888–2896, 2001.

CUCARELLA, C.; TORMO, M.A.; KNECHT, E.; AMORENA, B.; LASA, I.; FOSTER, T.J.; PENADÉS, J.R. Expression of the Biofilm-Associated Protein interferes with host protein receptors of *Staphylococcus aureus* and alters the infective process. *Infect. Immun.*, v.70, n.6, p.3180–3186, 2002.

CUCARELLA, C.; TORMO, M.A.; ÚBEDA, C.; TROTONDA, M.P.; MONZÓN, M.; PERIS, C.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADÉS, J.R. Role of Biofilm-associated protein *bap* in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.*, v.72, n.4, p.2177-2185, 2004.

CUNHA, R.P.L.; MOLINA, L.R.; CARVALHO, A.U.; FACURY FILHO, E.J.; FERREIRA, P.M; GENTILINI, M.B. Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com número de lactações, produção e composição química do leite em vacas da raça Holandesa. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.60, n.1, p.19-24, 2008.

DIAS, R.S.; ZUCCOLI, P.C. Infecção hospitalar por *Staphylococcus aureus* e fatores de risco para o desenvolvimento da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1) – Artigo de Revisão. Periódico científico do Núcleo de Biociências, v.02, n.03, 2012.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C.A.F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. *Ciênc. Rural*, v.34, n.4, p.1315-1320, 2004.

FAO - Food and Agriculture Organization. Faostat. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso 28 de Outubro de 2014.

FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. *Acta Sci. Vet.*, v.33, n.3, p.291-296, 2005.

FONTANA, V.L.D.S.; GIANNINI, M.J.S.M.; FONTANA, C.A.P.; LEITE, C.Q.F.; A.E. STELLA. Caracterização molecular de estafilococos isolados de Vacas com mastite subclínica e ordenhadores. *Arq. Inst. Biol.*, v.79, n.4, p.469-476, 2012.

FORTES, T.P.; FAGUNDES, M.Q.; VASCONCELLOS, F.A.; TIMM, C.D.; SILVA, E.F. Ilhas de patogenicidade de *Salmonella enterica*: uma revisão. *Rev Inst Adolfo Lutz*. v.71, n.2, p.219-27, 2012.

FOSTER, T.J.; GEOGHEGAN, J.A.; GANESH, V.K.; HÖÖK, M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews*. v.12, p.49-62, 2014.

FOX, L.K.; ZADOKS, R.N.; GASKINS, C.T. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. *Vet microbiol.*, n.107 p.295–299, 2005.

FREEMAN, D. J.; FALKINER, F. R.; KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative *staphylococci*. *J Clin Pathol.*, v.42, p.872-874, 1989.

GERKE, C.; KRAFT, A.; SUSSMUTH, R.; SCHWEITZER, O.; GÖTZ, F. Characterization of the N-Acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* Polysaccharide Intercellular Adhesin. *J. Biol. Chem.*, v.273, n.29, p.18586–18593, 1998.

GIAOURIS, E.; HEIR, E.; HÉBRAUD, M.; CHORIANOPOULOS, N.; LANGSRUD, S.; MORETRO, T.; HABIMANA, O.; DESVAUX, M.; RENIER, S.; NYCHAS, G.J. Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions

and control by alternative novel methods. *Meat Science*. v.97, n.3, p.298–309, 2014.

GÖTZ, F. *Staphylococcus* and biofilm. *Molecular Microbiology*, v.43, n.6, p.1367–1378, 2002.

GRECO, C.; MASTRONARDI, C.; PAGOTTO, F.; MACK, D.; RAMIREZ-ARCOS, S. Assessment of biofilm-forming ability of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from contaminated platelet preparations in Canada. *Transfusion*, v.48, p.969-977, 2008.

GROSS, M.; CRAMTON, S.; GÖTZ, F.; PESCHEL, A. Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infect. Immun.*, v.69, n.5, p.3423, 2001.

GUIMARÃES, F.F. Perfil de sensibilidade microbiana, pesquisa de gene *mecA* de resistência à metilina e detecção molecular de genes codificadores de enterotoxinas, em estafilococos coagulase positiva e negativa, isoladas de mastites bovinas. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011.

DE FREITAS GUIMARÃES, F.; NÓBREGA, D.B.; RICHINI-PEREIRA, V.B.; MARSON, P.M.; PANTOJA, J.C.F.; LANGONI, H. Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive *staphylococci* isolated from bovine milk. *J. Dairy Sci.*, v.96, n.5, p.2866-2872, 2013.

GUIMARÃES, G.; FRANÇA, C.A de; KRUG, F dos S.; PEIXOTO, R.M.; KREWER, C.C.; LAZZARI, A.M.; COSTA, M.M. Caracterização fenotípica, produção de biofilme e resistência aos antimicrobianos em isolados de *Staphylococcus* spp obtidos de casos de mastite em bovinos e bubalinos. *Pesquisa Vet Bras.*, v.32, n.12, p.1219-24, 2012.

GITON, P.S.; HUNG, C.S.; KLINE, K.A.; ROTH, R.; KAU, A.L.; HAYES, E.; HEUSER, J.; DODSON, K.W.; CAPARON, M.G.; HULTGREN, S.J.

Contribution of autolysin and sortase A during *Enterococcus faecalis* DNA-Dependent Biofilm Development. *Infect. Immun.*, v.77, n. 9, p. 3626–3638, 2009.

HENRIQUES, A.; VASCONCELOS, C.; CERCA, N. A importância dos biofilmes em infecções nosocomiais - O estado da arte. *Arq. med.*, v.27, n.1; p. 27-36. 2013.

HENSEN, S.M.; PAVIČIĆ, M.J.A.M.P.; LOHUIS, J.A.C.M.; DE HOOG, J.A.M., POUTREL, B. Location of *Staphylococcus aureus* within the experimentally infected bovine udder and the expression of capsular polysaccharide type 5 in situ. *J. Dairy Sci.*, v.83, p.1966-1975, 2000.

IBGE. Estatística da Produção Pecuária, 2014. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201401_publ_completa.pdf>. Acesso em 21 de julho de 2014.

IKAWATY, R.; BROUWER, E.C.; VAN DUIJKEREN, E.; MEVIUS, D.; VERHOEF, J.; FLUIT, A.C. Virulence factors of genotyped bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates in The Neatherlands. *International J. Dairy Sci.*, v.5, n.2, p.60-70, 2010.

KASNOWSKI, M.C.; MANTILLA, S.P.S; OLIVEIRA, L.A.T.; FRANCO, R.M. Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. *Rev. Cient. Elet. Med. Vet.*, n.15, 2010.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JR., W.C. Diagnóstico Microbiológico- Texto e Atlas colorido. 6a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan., 2008. 1760p.

KÖNIG, L.; KLOPFLEISCH, R.; KERSHAW, O.; GRUBER, A.D. Prevalence of biofilms on surgical suture segments in wounds of dogs, cats, and horses. *Veterinary Pathology* Online. Disponível em

<<http://vet.sagepub.com/content/early/2014/07/03/0300985814535609.full>>.

Acesso em 29 de novembro de 2014.

LANGONI, H. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. *Pesq. Vet. Bras.*, v.33, n.5, p.620-626, 2013.

LANGONI, H., PENACHIO, D.S., CITADELLA, J.C.C., LAURINO, F., FACCIOLI-MARTINS, P.Y., LUCHEIS, S.B., MENOZZI, B.D., SILVA, A.V. da. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. *Pesq. Vet Bras.*, v.31, n.12, p.1059-65, 2011.

LANGONI, H.; PINTO, M. P.; DOMINGUES, P.F.; LISTONI, F.J.P. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite bovina subclínica. *Arq. bras. med. vet. zotec.*; v.43, n.6, p.507-15, 1991.

LASA, I.; PENADÉS, J.R. Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation. *Research in Microbiology*, v.157, p.99–107, 2006.

LOS, R.; SAWICKI, R.; JUDA, M.; STANKEVIC, M.; RYBOJAD, P.; SAWICKI, M.; MALM, A.; GINALSKA, G. A comparative analysis of phenotypic and genotypic methods for the determination of the biofilm-forming abilities of *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol Lett*, n.310, p.97–103, 2010.

MACK, D.; FISCHER, W.; KROKOTSCH, A.; LEOPOLD, K.; HARTMANN, R.; EGGE, H.; LAUFS, R. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol.*, v.178, p.175–183, 1996.

MACK, D.; ROHDE, H.; DOBINSKY, S.; RIEDEWALD, J.; NEDELMANN, M.; KNOBLOCH, J.K.M.; ELSNER, H.A.; FEUCHT, H.H. Identification of three essential regulatory gene *loci* governing expression of *Staphylococcus*

epidermidis polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. *Infection and Immunity*, v. 68, n. 7, p. 3799-3807, 2000.

MARSHALL, K. C.; STOUT, R.; MITCHELL, R. Mechanism of initial events in the absorption of marine bacteria to surfaces. *J Gen Microbiol.*, v.68, p-337-348, 1971.

MARTINS, R.P.; SILVA, J.A.G da.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; ALMEIDA FILHO, E.S. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá, MT. *Ciênc. Anim. Bras.*, v.11, n.1, p.181-187, 2010.

MATHUR, T.; SINGHAL, S.; KHAN, S.; UPADHYAY, D.J.; FATMA, T.; RATTAN, A. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: An evaluation of three different screening methods. *Indian J Med Microbiol.*, v.24, p.25-9, 2006.

MELCHIOR, M.B.; VAARKAMP, H.; FINK-GREMMELES, J. Biofilms: A role in recurrent mastitis infections? *Vet J.*, v.171, n.3, p.398-407, 2006.

MELLO, P.L.; AGOSTINIS, R.O.; BARZON, E.M.; COLOMBO, R.B., SILVA, A.V.; MARTINS, L.A. Prevalência da mastite subclínica e associação dos agentes etiológicos com a contagem de células somáticas de vacas leiteiras da região Sudoeste do Paraná. *Vet. e Zootec.* v.19, n.4, p.513-521, 2012.

MELO P.C. Estudo epidemiológico, genotípico e fenotípico de estirpes de *Staphylococcus aureus* produtoras de biofilmes isoladas do ambiente de ordenha e de casos de mastite bovina. Tese de Doutorado (Doutorado em Medicina Veterinária) UNESP (Universidade Estadual Paulista), Jaboticabal-SP, 2011.

MELO, P.C. Biofilms in Veterinary Medicine - Impact and consequences of food quality and the treatment of infectious disease. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. 13ed.A. Méndez-Vilas. v. 1, p. 52-60, 2013.

MELO, P.C. Estudo fenotípico e genotípico da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas dos casos de mastite subclínica bovina. 2008. 103p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Campus de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Jaboticabal, São Paulo.

MELO, P.C.; FERREIRA, L.M.; NADER-FILHO, A.; ZAFALON, L.F.; VICENTE, H.I.G. Análise fenotípica e molecular da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite subclínica bovina. *Biosci. J.*, v.28, n.1, p.94-99, 2012.

MELO, P.C.; FERREIRA, L.M.; NADER-FILHO, A.; ZAFALON, L.F.; VICENTE, H.I.G.; SOUZA, V. Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Braz. J. Microbiol.*, v.44, n.1, p.119-124, 2013.

MOMTAZ, H.; TAJBAKHS, E.; RAHIMI, E.; MOMENI, M. Coagulase gene polymorphism of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and sub-clinical bovine mastitis in Isfahan and Chaharmahal va Bakhtiari provinces of Iran. *Comp Clin Pathol.*, v.20, p.519–522, 2011.

NADER FILHO, A.; FERREIRA, L.M.; AMARAL, L.A.; ROSSI JUNIOR, O.D.; OLIVEIRA, R.P. Produção de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico por cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas na mastite bovina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.59, n.5, p.1316-1318, 2007.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL (NMC). Laboratory handbook on bovine mastitis. Madison, Revised edition, 222p., 1999.

NEVES, T.C.C.C. Caracterização e avaliação da capacidade produtora de biofilmes em estafilococos coagulase negativos isolados de superfícies do ambiente fabril. 2012, 65p. Dissertação (Mestrado em segurança alimentar).

Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, Portugal.

O’GARA, J.P. Ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol.*, v.270, n.2, p.179–18, 2007.

OLIVEIRA, C.A.F.; CARANDINA, D.C.F.; LEE, S.H.I; BARANCELI, G.V.; CORASSIN, C.H. Resistência de isolados de *Listeria monocytogenes* a agentes sanitizantes utilizados em laticínios pela determinação da concentração inibitória mínima. *Vet. Zootec.*, v.20, n.1, p.36-37, 2013.

OLIVEIRA, C.A.F.; FONSECA, L.F.L.; GERMANO, P.M.L. Aspectos relacionados à produção, que influenciam a qualidade do leite. *Hig. aliment*, v.13, n.62, p.10-6, 1999.

OLIVEIRA, C.M.C.; SOUSA, M.G.S.; SILVA e SILVA, N.; MENDONÇA, C.L.; SILVEIRA, J.A.S.; OAIGEN, R.P.; ANDRADE, S.J.T.; BARBOSA, J.D. Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. *Pesq Vet Bras.*, v.31, n.2, p.104-110, 2011.

OLIVEIRA, J. L. P. de; KOZERSKI, N. D.; SILVA, D. R. da; SILVA, A. V. da; MARTINS, L. de. A. Fatores de risco para mastite e qualidade do leite no município de Altônia –PR. *Arq. Ciênc. Vet. Zool.*, v.16, n.1, p.61-72, 2013.

OLIVEIRA, M.; BEXIGA, R.; NUNES, S.F.; CARNEIRO, C.; CAVACO, L.M.; BERNARDO, F.; VILELA, C.L. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Vet microbiol.*, v.118, p.133–140, 2006.

OLIVEIRA, M.; BEXIGA, R.; NUNES, S.F.; VILELA, C.L. Invasive potential of biofilm-forming *Staphylococci* bovine subclinical mastitis isolates. *J. Vet. Sci.*, v.12, n.1, p.95-97, 2011.

PEDRINI, S.C.B.; MARGATHO, L.F.F. Sensibilidade de microrganismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes. *Arq. Inst. Biol.*, v.70, n.4, p.391-395, 2003.

PYÖRÄLÄ, S.; TAPONEN, S. Coagulase-negative *Staphylococci* - Emerging mastitis pathogens. *Vet microbiol.*, v.134, n.1-2, p.3-8, 2009.

RAZA, A.; MUHAMMAD, G.; SHARIF, S., ATTA, A. Biofilm producing *Staphylococcus aureus* and bovine mastitis: A Review. *Molecular Microbiology Research*, v.3, n.1, p.1-8, 2013.

RIBEIRO, M.G. Princípios terapêuticos na mastite em animais de produção e de companhia. In: Andrade S.F. (Ed.), Manual de Terapêutica Veterinária. 3ª ed. Roca, São Paulo. 936p, 2008.

RIFFON, R.; SAYASITH,K.; KHALIL, H.; DUBREUIL, P.; DROLET, M.; LAGACÉ, J. Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *J Clin Microbiol.*, v.39, n.7, p.2584-2589., 2001.

ROHDE, H.; KNOBLOCH, J.K.M.; HORSTKOTTE, M.A.; MACK, D. Correlation of *Staphylococcus aureus icaADBC* genotype and biofilm expression phenotype. *J Clin Microbiol.*, v.39, n.12,p.4595-4596, 2001.

RUMI, M.V; HUGUET, M.J., BENTANCOR, A.B.; GENTILINI, E.R. The *icaA* gene in *Staphylococci* from bovine mastitis. *J Infect Dev Ctries*, v.7, n.7, p.556-560, 2013.

SÁ, M.E.P.; CUNHA, M.L.R.S.; ELIAS, A.O.; VICTÓRIA, C.; LANGONI, H. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.41, p.320-326, 2004.

SAAB, A.B.; ZAMPROGNA, T.O.; LUCAS, T.M.; MARTINI, K.C.; MELLO, P.L.; SILVA, A.V., MARTINS, L.A. Prevalência e etiologia da mastite bovina na região de Nova Tebas, Paraná. *Semina: Ciências Agrárias*, v.35, n.2, p.835-844, 2014.

SAMPIMON, O.C.; BARKEMA, H.W.; BERENDS, I.M.G.A.; SOL, J.; LAM, T.J.G.M. Prevalence and herd-level risk factors for intramammary infection with coagulase-negative *staphylococci* in Dutch dairy herds. *Vet microbiol.*, v.134, p.37–44, 2009.

SANTOS, L.L.; COSTA, G.M.C.; PEREIRA, U.P.; SILVA, M.A.; SILVA, N. Mastites clínicas e subclínicas em bovinos leiteiros ocasionadas por *Staphylococcus* coagulase-negativa. *Rev Inst Adolfo Lutz*. v.70, n.1, p.1-7, 2011.

SAS Institute. 2011. SAS/STAT User's Guide. Version 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC.

SCHALM, G.N.; NOORLANDER, D.D. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. *J. Am. Med. Assoc.*, v.130, p. 199-204, 1957.

SILVEIRA, T.M.L., FONSECA, L.M., LAGO, T.B.N., VEIGA, D.R. Comparação entre o método de referência e a análise eletrônica na determinação da contagem de células somáticas no leite bovino. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, São Paulo, v.57, n.1, p.128-132, 2005.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L.C.; VIEIRA, M.J. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Sci. Technol.*, v.43, p.573–583, 2010.

SIMOJOKI, H.; HYVÖNEN, P.; PLUMED FERRER, C.; TAPONEN, S. PYÖRÄLÄ, S. Is the biofilm formation and slime producing ability of coagulase-

negative *Staphylococci* associated with the persistence and severity of intramammary infection? *Vet microbiol.*, v.158, n.3–4, p.344–352, 2012.

SREY, S.; JAHID, I.K.; HA, S. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, v.31, n.2, p.572–585, 2013.

STRAUB, J.A.; HERTEL, C.; HAMMES, W.P. A 23S rDNA-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat starter cultures and dairy products. *J Food Prot.*, v.62, n.10, p.1150-1156, 1999.

SZWEDA, P.; SCHIELMANN, M.; MILEWSKI, S. FRANKOWSKA, A.; JAKUBCZAK, A. Biofilm production and presence of *ica* and *bap* genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in the Eastern Poland. *Pol J Microbiol.*, v.61, n.1, p.65–69, 2012.

TORMO, M.A.; KNECHT, E.; GÖTZ, F.; LASA, I.; PENADES, J.R. Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? *Microbiology*, v.151, p.2465–2475, 2005.

TAPONEN, S.; KOORT, J.; BJÖRKROTH, J.; SALONIEMI, H.; PYÖRÄLÄ, S. Bovine intramammary infections caused by coagulase-negative *staphylococci* may persist throughout lactation according to amplified fragment length polymorphism-based analysis. *J. Dairy Sci.*, v.90, p.3301–3307, 2007.

VALLE, J.; LATASA, C.; GIL, C.; TOLEDO-ARANA, A.; SOLANO, C.; PENADÉS, J.R.; LASA, I. Bap, a biofilm matrix protein of *Staphylococcus aureus* prevents cellular internalization through binding to GP96 host receptor. *Plos Pathogen*, v.8, n.8, 2012.

VASUDEVAN, P.; NAIR, M.K.M; ANNAMALAI, T.; VENKITANARAYANAN, K.S. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet. microbiol.*, v.92, n.1–2, p.179–185, 2003.

VAUTOR, E.; CARSENTI-DELLAMONICA, H.; SABAH, M.; MANCINI, G.; PÉPIN, M.; DELLAMONICA, P. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from dairy sheep farms (*agr* group, adherence, slime, resistance to antibiotics). *Small Ruminant Res.*, v.72, n.2–3, p.197–199, 2007.

VERAS, J.F.; DO CARMO, L.S.; TONG, L.C.; SHUPP, J.W.; CUMMINGS, C.; DOS SANTOS, D.A.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; CANTINI, A.; NICOLI, J.R., JETT, M. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. *Int. J. Infect. Dis.*, v.12, p.410-415, 2008.

ZAFALON, L.F.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, J.V.; RESENDE, F.D. Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus* custo-benefício da antibioticoterapia de vacas em lactação. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.59, p.577-585, 2007.

Trabalho Científico

TRABALHO CIENTÍFICO

Artigo redigido de acordo com as normas do periódico científico “Veterinary Microbiology”

Detection of *icaA*, *icaD* and *bap* genes and biofilm production of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* from subclinical and clinical bovine mastitis

A. Salina^a, Felipe F. Guimarães^a, Virgínia B. Richini-Pereira^b, Benedito D. Menozzi^a, H. Langoni^{a*}

* *Corresponding author*

Phone: (+55) 14 3880 2094

E mail: hlangoni@fmvz.unesp.br

^aDepartment of Veterinary Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine and Animal Science (FMVZ), São Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil

^bScientific Researcher at Adolfo Lutz Institute, Bauru, SP, Brazil

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is common in intramammary infections, it causes chronic infection and can lead to biofilm formation. A total of 100 strains of *S. aureus* from subclinical mastitis and 100 strains of coagulase-negative *Staphylococcus* (CNS) isolated from subclinical and clinical mastitis in two properties of São Paulo state were evaluated for the capacity to produce biofilm. The presence of *icaA*, *icaD* and *bap* genes were performed by the Polymerase Chain Reaction (PCR) and biofilm production on Congo Red Agar (CRA) and Microtiter Plate test (MtP) in *S. aureus* strains. For CNS, the biofilm production was tested only on CRA. The frequency of *icaA*, *icaD* and *bap* in *S. aureus* were 82%, 83% and 58%, respectively. A total of 25% of *S. aureus* strains were

27 positive on CRA and 15% on MtP. Only 5% of CNS strains were positive on CRA. There was no
28 significant statistics between somatic count cell (SCC) values for the *S. aureus* strains that
29 contained the presence of the surveyed genes. The present study demonstrated that biofilm
30 production may be associated with other factors than *icaA*, *icaD* and *bap* genes, suggesting a
31 presence of other factors or genes stimulating the biofilm production in vitro. We can not observe
32 the relation between the presence of the genes researched with the intensity of inflammation as well,
33 somatic count cell.

34 **Keywords:** *S. aureus*, CNS, congo red agar, public health.

35

36 INTRODUCTION

37

38 Milk production is growing in Brazil and ranks fifth in the world ranking. The country
39 production is in average 32.3 billion liters per year, however, the Brazilian dairy cattle has a low
40 production rate, around 1.471 liters/cow/year (Brasil, 2014).

41 Mastitis remains a problem for the dairy industries and several microorganisms are involved
42 in their etiology (Guimarães et al., 2012; Saab et al., 2014). The ability of *S. aureus* to adhere in the
43 mammary gland and cause chronic infections is associated, among other factors, with the presence
44 of biofilm. The produced adhesion stimulates the migration of macrophages and neutrophils from
45 blood to the site, resulting in increased SCC and edema in the gland, damage to immune system and
46 to epithelial cells (Raza et al., 2013).

47 CNS is reported in literature as minor pathogen in mastitis. However, they have been
48 isolated frequently in cases of mastitis even in farms that adopt effective programs to control *S.*
49 *aureus* and *Streptococcus agalactiae*. It is a heterogeneous group of microorganisms associated to
50 high SCC values and also the presence of biofilm leading to chronic infections (Rumi et al., 2013).
51 The presence of biofilm has been considered the basis of persistence of chronic infections
52 (Cucarella et al., 2001).

53 Some factors may influence the bacterial adherence, as the physico-chemical characteristics
54 of the surface material, expression of virulence factors of bacteria (Flach et al., 2005), pH,
55 temperature (Srey et al., 2013) and hydrophobicity of the surface (Araújo et al., 2009).

56 The biofilm formation involves basically two steps: it starts with the adhesion of bacteria on
57 the surface of the mammary gland mediated by capsular antigen, called capsular
58 polysaccharide/adhesin (PS/A), followed by accumulation, maturation and separation phases
59 associated with the production of polysaccharide intercellular adhesion (PIA), essential to the
60 spread of *staphylococci* (Götz, 2002; Simojoki et al., 2012).

61 Cell proliferation and biofilm formation is a virulence factor and is given by the presence of
62 *ica locus*, which is comprised by four genes *icaA*, *icaD*, *icaB* and *icaC* organized in an *operon*
63 (*icaADBC*) and also a regulatory gene *icaR*. This *operon* is responsible for expression of PIA,
64 present in the cell wall (Gerke et al., 1998). PIA promotes the adhesion and colonization in the
65 mammary tissue (Götz, 2002) by bacteria. The surface protein BAP (biofilm-associated protein) is
66 responsible for promoting the primary fixation in inert surfaces. The expression of *bap* gene leads to
67 biofilm formation even without the presence of *operon icaADBC*. In dairy herds there is an
68 evidence of the importance of *bap* in mastitis caused by *S. aureus* (Cucarella et al., 2001; Cucarella
69 et al., 2004)

70 The aim of the present study was to verify the capacity of producing biofilm by *S. aureus*
71 and CNS strains, derived from subclinical and clinical bovine mastitis and the presence of *icaA*,
72 *icaD* and *bap* genes in *S. aureus* strains by PCR. The biofilm production was evaluated on CRA and
73 MtP test and also determined whether or not the presence of biofilm production genes may
74 influence the SCC values.

75

76 MATERIAL AND METHODS

77

78 *Bacterial strains*

79 The samples were isolated from milk in two dairy farms in the state of São Paulo - Brazil. A
80 total of nine monthly visits were carried out, in order to achieve the proposed number of 100 strains
81 of *S. aureus* and 100 strains of CNS. A total of 749 samples of bovine milk were analyzed from
82 July 2013 to November 2014. The California Mastitis test (CMT) was performed as described
83 previously (Schalm e Noorlander, 1957), to detect subclinical mastitis.

84

85 *Isolation and characterization of bacterial strains*

86 10 μ L of milk sample was plated on blood agar 5% and MacConkey agar and incubated at
87 37°C under aerobic conditions for 24-48h. Only *Staphylococcus* colonies were used. The
88 identification of presumptive colonies of *S. aureus* was achieved by colonial morphology, Gram
89 staining, positive catalase test, and positive coagulase. Differentiation from other coagulase-positive
90 *Staphylococcus* species was performed by the fermentation of mannitol, maltose and trehalose,
91 resistance to polymyxin B (300UI) and acetoin production (Koneman et al., 2008). Coagulase
92 negative *Staphylococcus* was differentiated from *Kokuria* based on oxidation test, fermentation of
93 glucose and by resistance to bacitracin (0.04 U), as indicated by the absence of inhibition halo or 9
94 mm halo formation and also by sensitivity to furazolidone (100 mg), characterized by 15 to 35 mm
95 inhibition halo (Baker, 1984).

96

97 *Molecular identification of bacteria*

98 *DNA extraction* - Bacterial DNA was obtained after cultivation of the bacteria in 5 ml BHI (Brain
99 Heart Infusion). The extraction was performed with Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin Kit (GE
100 Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) according to the manufacturer's specification, with
101 modifications. An initial digestion of staphylococcal cells with lysozyme (10 mg/ml) was
102 performed.

103

104 *PCR-amplification of genes* - For confirmation of *S. aureus* the primers *staur4* and *staur6*
105 according to Straub et al. (1999) were used. The program used consisted of an initial denaturation at
106 94°C for 2 min followed by 35 cycles at 94°C for 45 s, 64°C for 1 min and 72°C for 2 min and a
107 final extension at 72°C for 10 min. For amplification of *icaA* and *icaD* genes the primers were used
108 according to Vasudevan et al. (2003). The program used to identify the *icaA* and *icaD* genes
109 consisted of 30 cycles at 92°C for 45 s, 49°C for 45 s and 72°C for 1 min and a final extension at
110 72°C for 7 min. For the *bap* gene amplification the method described by Cucarella et al. (2004) was
111 used, with an initial denaturation at 95°C for 4 min, followed by 40 cycles at 94°C for 30 s, 54°C
112 for 30s and a final extension at 72°C for 5 min. The CNS was confirmed using the *coa* gene,
113 according to Veras et al. (2008) with an initial denaturation at 94°C for 2 min, followed by 30
114 cycles at 95°C for 30 s, 55°C for 2 min, 72°C for 4 min and a final extension at 72°C for 7 min.

115 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 was used as positive control to *icaA*, *icaD* and *staur*
116 genes. An isolate was used for positive control of *bap* gene which was positive in PCR with 971bp
117 product. The product was sequenced and 99% identity was obtained to *S. aureus* V329 (GenBank
118 access number AY220730). For negative control *S. epidermidis* ATCC 12228 was used for all
119 reactions.

120 The PCR reactions were performed in a DNA thermal cycler (Mastercycler, Eppendorf,
121 Hamburg, Germany). After this, electrophoresis in a 2% agarose gel and staining with ethidium
122 bromide (Gibco BRL®) was performed. The gel image was recorded and analyzed.

123

124 *Phenotypic characterization of biofilm production on CRA*

125

126 Qualitative detection of biofilm formation was evaluated by the isolation strains on CRA
127 plates with modifications (Freeman et al., 1989). Inoculated plates were incubated at 37°C for 24h
128 followed by the storage at room temperature during 48h. The production of rough black colonies on
129 CRA indicated biofilm production and red colonies indicated non-biofilm production.

130

131 *Phenotypic characterization of biofilm production on MtP*

132

133 The biofilm production on MtP was performed according to Vasudevan et al. (2003). The
134 optical density was performed on ELISA reader (Labsystems, Multiskan EX) using a 540nm filter.
135 *S. aureus* strains that produced means absorbance value > 0.1 were considered positive for biofilm
136 production.

137

138 *Statistical analysis*

139 Frequency distributions were produced to describe the percentage of strains of *S. aureus* that
140 contain the genes responsible for the biofilm production. The Chi-square or Fisher's Exact Test
141 (PROC FREQ; SAS Institute, 2011) were used to compare the proportion of strains producing
142 biofilms with the intensity of subclinical cases. Analysis of variance (PROC GLM, SAS Institute,
143 2011) was used to compare the means of SCC values (in logarithmic scale) between strains that
144 contain or not the researched genes. Statistical analyzes were performed with SAS 9.2 (SAS
145 Institute, 2011) with statistical significance level 0.05.

146

147 **RESULTS**

148

149 The distribution of the frequencies of *icaA*, *icaD* and *bap* genes in *S. aureus* strains were
150 82%, 83% and 58%, respectively. Among the 100 strains of *S. aureus*, 56% presenting the three
151 genes researched.

152 Table 1 shows the positive reaction intensity to CMT related to the involved pathogen. It was
153 observed that the score 3 was more often found both in *S. aureus*, with 62% as well as in CNS, with
154 55% (P=0.02). When the SCC values among the species studied were evaluated, a higher value for
155 *S. aureus* strains (2.88±0.59) than for CNS strains (2.71±0.35) were obtained with P=0.02.

156 A total of 25 (25%) *S. aureus* strains that produced biofilm on CRA, 17 (68%) of them had the
157 *icaAD* genes. Two strains of *S. aureus* have produced biofilm on CRA without the presence of
158 researched genes (Table 2). The total of *S. aureus* strains that produced black colonies on CRA
159 were 25% and the positivity on MtP were 15%. A total of 5% of CNS strains produced biofilm on
160 CRA. Of 82 *S. aureus* strains with the *icaA* gene in genotypic test only 13 were positive in MtP,
161 representing 15.8% of strains and for the strains with the *icaD* gene the positivity was 15.6%. None
162 of the relations presented statistical difference ($P=1.0$). When evaluating the relation of the presence
163 of the *bap* gene with positivity in MtP test, 12 (20.7%) strains were positive with $P=0.08$.

164 The agreement between the two phenotypic tests was poor ($K=-0.10$). From the 75 *S. aureus*
165 strains negative on CRA, 62 (82.7%) were also negative for the MtP test. Among the 15 positive
166 strains in the adhesion test, only two, which represented 13.3% of the strains were also positive in
167 CRA.

168

169 **DISCUSSION**

170

171 The presence of CNS in intramammary infections are very common, being considered as
172 emerging pathogens in mastitis. The role of biofilm formation genes in *S. epidermidis* isolated from
173 human material is well elucidated in literature, however, to date, few studies have been conducted
174 to evaluate the biofilm formation in CNS of veterinary importance. Rumi et al. (2013) reported the
175 need for designing specific primers for recognizing species of CNS of veterinary importance, such
176 as *S. simulans*, *S. capitis*, *S. saprophyticus*, *S. caprae*, *S. sciuri*, *S. epidermidis* and *S. cohnii*. The
177 authors concluded that the recognition of genes for biofilm formation from consensus sequences for
178 a single gene increased the sensitivity and the detection of these genes in CNS strains.

179 The primers used for detection of *icaA* and *icaD* described according to Vasudevan et al.
180 (2003) were also used by Simojoki et al. (2012). These primers work well for recognition of *S.*
181 *aureus* strains, but fail to recognize *S. epidermidis* (ATCC 35984), strain known as positive for

182 these genes, considered therefore ineffective in the detection of these genes in the CNS (Simojoki et
183 al., 2012).

184 Two strains of *S. aureus* were able to produce biofilm without the presence of the researched
185 genes. Chaieb et al. (2005) found a strain that was negative for both genes (*icaA* and *icaD*) but
186 produced some black colonies on CRA. It became apparent to the authors, that biofilm formation
187 may be associated with other factors, not only the presence of *icaA* and *icaD* genes. It is also
188 suggested that other regulatory genes or also other genes of biofilm formation may be present in
189 these strains, stimulating the production of PIA (Mack et al., 2000).

190 The *bap* gene, carried by a transposon present in the mobile pathogenicity island SaPIbov2,
191 present only in *S. aureus* isolates of bovine origin, contributes to these bacteria pathogenic role in
192 persistent infections (Cucarella et al., 2004). The presence of *bap* gene confers chronicity to cases
193 of mastitis but *S. aureus* is able to form biofilms even without the presence of *bap*. These species
194 may exhibit virulence factors, such as the expression of genes that regulate most staphylococcal
195 membrane proteins, for example *agr*, able to promote the adhesion of these micro-organism on inert
196 surfaces (Vautor et al., 2007; Szweda et al., 2012).

197 Previous studies have reported greater efficiency in detection of biofilm formation when the
198 MtP test was used instead of CRA (Guimarães et al., 2012; Melo et al., 2013). In the present study
199 the highest positivity rate obtained by *S. aureus* strains was on CRA, when compared to the MtP
200 test, with 25% and 15%, respectively. This result corroborates with the study by Los et al. (2010),
201 when comparing the results of positive strains on CRA and MtP test, obtaining 58.9% of positivity
202 for CRA and 35.6% on MtP test. The agreement between the phenotypic tests evaluated in this
203 study was poor, with only two positive samples of *S. aureus* in both tests. This result is in
204 agreement with Oliveira et al. (2006) who also obtained two positive strains of *S. aureus* for both
205 tests.

206 This study emphasises the evaluation of biofilm production which was assessed by two
207 phenotypic tests. Other authors suggest other methods of identification of biofilm positive

208 *staphylococci* strains by the pulsed field gel electrophoresis (Fox et al., 2005), or fluorescent *in situ*
209 hybridisation protocol (Oliveira et al., 2006). The use of other techniques may reduce the number of
210 genetically positive strains that are phenotypically negative for biofilm formation.

211

212 **CONCLUSION**

213

214 The present study demonstrated that biofilm production may be associated with other factors than
215 *icaA*, *icaD* and *bap* genes, suggesting a presence of other factors or genes stimulating the biofilm
216 production in vitro. The total of 25 *S. aureus* strains positive on congo red agar, the most of them, 17
217 presented the *icaAD* genes, leading to full expression of polysaccharide intercellular adhesin. We
218 can not observe the relation between the presence of the genes researched with the intensity of
219 inflammation as well, somatic count cell.

220

221 **REFERENCES**

222

223 Araújo, EA, Bernardes, PC, Andrade, NJ, Fernandes, PE, Sá, JPN, 2009. Hidrofobicidade de
224 ribotipos de *Bacillus cereus* isolados de indústria de laticínios. Alim. Nutr. 20, 491-497.

225 Baker, JS, 1984. Comparison of various methods for differentiation of *staphylococci* and
226 *micrococci*. J Clin Microbiol. 19, 875-79.

227 Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assessoria de Gestão Estratégica.
228 Valor Bruto da Produção. Janeiro de 2014.

229 Chaieb, K, Mahdouani, K, Bakhrouf, A, 2005. Detection of *icaA* and *icaD* loci by polymerase
230 chain reaction and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* isolated from dialysate and
231 needles in a dialysis unit. J Hosp Infect. 61, 225–230.

232 Cucarella, C, Solano, C, Valle, J, Amorena, B, Lasa, I, Penadés, JR, 2001. Bap, a
233 *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. Journal Bacteriol. 183, 2888–
234 2896.

235 Cucarella, C, Tormo, MA, Úbeda, C, Trotonda, MP, Monzón, M, Peris, C, Amorena, B, Lasa,
236 I, Penadés, JR, 2004. Role of Biofilm-associated protein *bap* in the pathogenesis of bovine
237 *Staphylococcus aureus*. Infect Immun. 72, 2177-2185.

- 238 Flach, J, Karnopp, C, Corção, G, 2005. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com
239 leite: fatores de virulência envolvidos. *Acta Sci. Vet.* 33, 291-296.
- 240 Fox, LK, Zadoks, RN, Gaskins, CT, 2005. Biofilm production by *Staphylococcus aureus*
241 associated with intramammary infection. *Vet microbiol.* 107, 295–299.
- 242 Freeman, DJ, Falkiner, FR, Keane, CT, 1989. New method for detecting slime production by
243 coagulase negative *staphylococci*. *J Clin Pathol.* 42, 872-874.
- 244 Gerke, C, Kraft, A, Sussmuth, R, Schweitzer, O, Götz, F, 1998. Characterization of the N-
245 Acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus*
246 *epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J Biol Chem.* 273, 18586–18593.
- 247 Götz, F, 2002. *Staphylococcus* and biofilm. *Mol Microbiol.* 43, 1367–1378.
- 248 Guimarães, G, França, CA de, Krug, F dos S, Peixoto, RM, Krewer, CC, Lazzari, AM, Costa,
249 MM, 2012. Caracterização fenotípica, produção de biofilme e resistência aos antimicrobianos em
250 isolados de *Staphylococcus* spp obtidos de casos de mastite em bovinos e bubalinos. *Pesq Vet Bras.*
251 32, 1219-24.
- 252 Koneman, EW, Allen, SD, Janda, WM, Schreckenberger, PC, 2008. Diagnostico
253 Microbiologico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas. 6ªEd.
254 Guanabara Koogan, 1760p.
- 255 Los, R, Sawicki, R, Juda, M, Stankevic, M, Rybojad, P, Sawicki, M, Malm, A, Ginalska, G,
256 2010. A comparative analysis of phenotypic and genotypic methods for the determination of the
257 biofilm-forming abilities of *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol Lett.* 310, 97–103.
- 258 Mack, D, Rohde, H, Dobinsky, S, Riedewald, J, Nedelmann, M, Knobloch, JKM, Elsner, HA,
259 Feucht, HH, 2000. Identification of three essential regulatory gene *loci* governing expression of
260 *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. *Infect*
261 *Immun.* 68, 3799-3807.

- 262 Melo, PC, Ferreira, LM, Nader-Filho, A, Zafalon, LF, Vicente, HIG, Souza, V, 2013.
263 Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated
264 from bovine subclinical mastitis. Braz J Microbiol. 44, 119-124.
- 265 Oliveira, M, Bexiga, R, Nunes, SF, Carneiro, C, Cavaco, LM, Bernardo, F, Vilela, CL, 2006.
266 Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*
267 mastitis isolates. Vet microbiol. 118, 133–140.
- 268 Raza, A, Muhammad, G, Sharif, S, Atta, A, 2013. Biofilm producing *Staphylococcus aureus*
269 and bovine mastitis: A Review. Molecular Microbiology Research. 3, 1-8.
- 270 Rumi, M.V.; Huguet, M.J.; Bentancor, A.B.; Gentilini, E.R., 2013. The *icaA* gene in
271 Staphylococci from bovine mastitis. J Infect Dev Ctries, 7, 556-560.
- 272 Saab, A.B., Zamprogna, T.O., Lucas, T.M., Martini, K.C., Mello, P.L., Silva, A.V., Martins,
273 L.A., 2014. Prevalência e etiologia da mastite bovina na região de Nova Tebas, Paraná. Semina:
274 Ciências Agrárias. 35, 835-844.
- 275 Santos, L.L.; Costa, G.M.C.; Pereira, U.P.; Silva, M.A.; Silva, N., 2011. Mastites clínicas e
276 subclínicas em bovinos leiteiros ocasionadas por *Staphylococcus* coagulase-negativa. Rev Inst
277 Adolfo Lutz. 70, 1-7.
- 278 SAS Institute. 2011. SAS/STAT User's Guide. Version 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC.
- 279 Schalm, G.N., Noorlander, D.D., 1957. Experiments and observations leading to development
280 of the California Mastitis Test. J Am Med Assoc. 130, 199-204.
- 281 Simojoki, H.; Hyvönen, P.; Plumed Ferrer, C.; Taponen, S. Pyörälä, S., 2012. Is the biofilm
282 formation and slime producing ability of coagulase-negative *Staphylococci* associated with the
283 persistence and severity of intramammary infection? Vet microbiol. 158, 344–352.
- 284 Srey, S., Jahid, I.K., Ha, S., 2013. Biofilm formation in food industries: A food safety concern.
285 Food Control. 31, 572–585.

- 286 Straub, J.A., Hertel, C., Hammes, W.P., 1999. A 23S rDNA-targeted polymerase chain
287 reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat starter cultures and dairy
288 products. J Food Prot. 62, 1150-1156.
- 289 Szweda, P., Schielmann, M., Milewski, S., Frankowska, A., Jakubczak, A., 2012. Biofilm
290 production and presence of *ica* and *bap* genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows
291 with mastitis in the Eastern Poland. Pol J Microbiol. 61, 65–69.
- 292 Vasudevan, P., Nair, M.K.M., Annamalai, T., Venkitanarayanan, K.S., 2003. Phenotypic and
293 genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm
294 formation. Vet microbiol. 92, 179–185.
- 295 Vautor, E., Carsenti-Dellamonica, H., Sabah, M., Mancini, G., Pépin, M., Dellamonica, P.,
296 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from dairy sheep farms (*agr*
297 group, adherence, slime, resistance to antibiotics). Small Ruminant Res. 72, 197–199.
- 298 Veras, J.F.; DO Carmo, L.S., Tong, L.C.; Shupp, J.W.; Cummings, C.; Dos Santos, D.A.;
299 Cerqueira, M.M.O.P.; Cantini, A.; Nicoli, J.R., Jett, M., 2008. A study of the enterotoxigenicity of
300 coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in
301 Minas Gerais, Brazil. Int. J. Infect. Dis. 12, 410-415.

302 Table 1: Distribution of the frequencies of relation of intensity on CMT positive reaction with the agent involved, and the average $\log_{(10)}$ of SCC
 303 results in strains of *S. aureus* and CNS derived from milk samples of subclinical and clinical mastitis.

304

	CMT Intensity*										
	1			2			3			Clinical	
		%	Means of $\log_{(10)}$ SCC		%	Means of $\log_{(10)}$ SCC		%	Means of $\log_{(10)}$ SCC		%
<i>S. aureus</i>	16/(100) ^a	16	2,70 ($\pm 0,74$) ^a	22/(100) ^a	22	2,70 ($\pm 0,54$) ^a	62/(100) ^a	62	3,0 ($\pm 0,55$) ^a	0/(100)	0
CNS	15/(100) ^a	15	2,50 ($\pm 0,25$) ^b	22/(100) ^a	22	2,68 ($\pm 0,27$) ^b	55/(100) ^a	55	2,79 ($\pm 0,40$) ^b	8/(100)	8
Total	31/(200)	15,5		44/(200)	22		117/(200)	58,5		8/(200)	4

305 *Intensity classified as: 1=+; 2=++ e 3=+++. Different letters in the same column indicate statistical difference between the means (P=0,02). SCC: Somatic Count Cell; CMT:

306 California Mastitis Test; $\log_{(10)}$: Mean of SCC values in logarithmic scale of basis 10; CNS: Coagulase-negative *Staphylococcus*.

307 Table 2: Relation between the presence of *icaA*, *icaD* and *bap* genes and its morphology on CRA
308 by *S. aureus* strains derived from subclinical bovine mastitis.

309

Morfology on CRA	Presence of <i>icaA</i>	Presence of <i>icaD</i>	Presence of <i>bap</i>	N/(Total)
Black	Present	Present	Present	5/(100)
Black	Present	Present	Absent	17/(100)
Black	Absent	Present	Absent	1/(100)
Black	Absent	Absent	Absent	2/(100)
Red	Present	Present	Present	51/(100)
Red	Present	Present	Absent	9/(100)
Red	Absent	Absent	Present	2/(100)
Red	Absent	Absent	Absent	13/(100)

310

311