

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO
RIO DE JANEIRO**

ALINE DE OLIVEIRA CAMPOS

**ANÁLISE DO ENVOLVIMENTO DA FOSFATASE NEUTRA
EXTRACELULAR NA FORMAÇÃO DE BIOFILME MONOESPECÍFICO
DE *Staphylococcus* spp.**

Rio de Janeiro

2016

ALINE DE OLIVEIRA CAMPOS

**ANÁLISE DO ENVOLVIMENTO DA FOSFATASE NEUTRA
EXTRACELULAR NA FORMAÇÃO DE BIOFILME MONOESPECÍFICO
DE *Staphylococcus* spp.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial a obtenção do grau de bacharel em ciências biológicas com habilitação em biotecnologia pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

Orientadora: Prof^a Dr^a Thaís Souza Silveira Majerowicz

Rio de Janeiro

2016

ALINE DE OLIVEIRA CAMPOS

**ANÁLISE DO ENVOLVIMENTO DA FOSFATASE NEUTRA
EXTRACELULAR NA FORMAÇÃO DE BIOFILME MONOESPECÍFICO
DE *Staphylococcus* spp.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial a obtenção do grau de bacharel em ciências biológicas com habilitação em biotecnologia pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

Orientadora: Prof^a Dr^a Thais Souza Silveira Majerowicz

Aprovado pela banca examinadora em fevereiro de 2016

Dr^a Thais Souza Silveira Majerowicz (IFRJ)

Dr^a Janaína dos Santos Nascimento (IFRJ)

Dr^a Lisvane Paes Vieira (UFRJ)

Dedico esse presente trabalho à minha avó Jovina Campos, que sempre teve orgulho de minhas conquistas e sempre sonhou alto sobre meu futuro. Hoje, ela está comemorando a passagem de mais uma etapa de minha vida, esteja ela onde estiver.

Agradecimento

Agradeço imensamente à Dr^a Thaís Majerowicz, que durante os últimos dois anos dedicou seu tempo a me ensinar e orientar, com a mesma segurança e alegria mesmo nos momentos de indecisão. Que, também, sempre me fez dar o melhor de mim, e me ensinou que mesmo que uma tarefa dê muito trabalho, o resultado sempre é compensador, principalmente se for roxo. Agradeço pela confiança em me escolher para realizar esse trabalho, e pelas risadas, inúmeras, que adoçaram cada dia de trabalho exaustivo.

Agradeço à Janaína dos Santos pela disponibilização dos isolados criopreservados no laboratório de Microbiologia do IFRJ *campus* Rio de Janeiro, e também por toda ajuda ao meu trabalho, por todos os conselhos nos protocolos elaborados e por fazer o ambiente laboratorial mais aconchegante e divertido.

Agradeço, também, à equipe de monitores do laboratório de Microbiologia por sempre me ajudarem a realizar meu trabalho com qualidade. Agradeço ao meu grande amigo e namorado Juan Martinez, por sempre querer o melhor de mim em todas as tarefas da faculdade, e me ensinar que o melhor é o mínimo que podemos dar. Por me ouvir treinar as apresentações das Jornadas de Iniciação Científica e ter a paciência de analisar e comentar cada uma delas, sempre com comentários construtivos.

Agradeço também à minha família por me estimularem a aprender mais e mais quando me perguntam a base científica de eventos do dia-a-dia.

Agradeço a minha mãe, que sempre teve confiança e fé na minha dedicação pelo estudo, e na minha busca pelo saber, que nunca me obrigou a estudar, me ensinando que a vontade de conquistar nossos sonhos deve vir de dentro, e não das pessoas ao nosso redor.

Por fim, agradeço ao IFRJ pela oportunidade de aprender tudo o que aprendi, e a FAPERJ, CAPES e ao CNPq por permitirem que essa pesquisa seja feita com qualidade.

RESUMO

Algumas espécies do gênero *Staphylococcus* possuem a capacidade de formação de biofilme, uma matriz extracelular composta principalmente por polissacarídeos, que confere proteção a essas bactérias. A proteína de adesão extracelular é conhecida por ter papel relevante na fase inicial de formação do biofilme, pois se sabe que essa proteína se adere a uma fosfatase neutra na parede bacteriana, e a proteínas da membrana basal do hospedeiro, como fibronectina e vitronectina. As fosfatases são enzimas caracterizadas por defosforilar diversos substratos, e conhecidas por seu importante papel na regulação de eventos fisiológicos celulares, como nutrição, divisão celular e vias metabólicas. A função conhecida da fosfatase neutra extracelular no contexto do biofilme é apenas de ancoramento, não sendo descrito se há alguma função enzimática nesse contexto para tal proteína. Com os métodos empregados nesse estudo, não foi possível identificar atividade fosfatásica neutra extracelular em cepas de *Staphylococcus* coagulase-positivos isoladas de alimentos, porém duas cepas de *Staphylococcus aureus* e uma de *Staphylococcus epidermidis* apresentaram atividade fosfatásica extracelular detectável e com diferença entre as espécies. Enquanto as cepas comerciais de *Staphylococcus aureus* apresentaram uma atividade fosfatásica alta, a cepa de *Staphylococcus epidermidis* mostrou uma atividade extremamente baixa, próximo ao nulo, sugerindo que, caso haja uma relação entre a atividade fosfatásica neutra extracelular e a formação de biofilme, o *Staphylococcus aureus* é o melhor candidato para ser estudado.

Palavras-chave: *Staphylococcus*. Fosfatase. Biofilme. Proteína de adesão extracelular.

ABSTRACT

Some species of the genus *Staphylococcus* are able to produce biofilm, an extracellular matrix that protects these bacteria, which has polysaccharides as major components. An important protein in this matrix is the extracellular adhesion protein (Eap) that plays a role in adhesion of bacteria to the substrate or host proteins. The Eap binds to host proteins, like fibronectin and vitronectin, and is able to redock to an extracellular neutral phosphatase located on bacterial cell wall. Phosphatases are enzymes responsible for dephosphorylation of many different substrates and are involved in nutrition, cellular communication, cellular division and other physiological intracellular events. The extracellular neutral phosphatase is known as a physical spot for Eap redock, and there is no evidence of a physiological substrate to this enzyme in biofilm's formation. Using the methods presented on this study, it was not possible to determine an extracellular neutral phosphatase activity on the samples obtained from food. However, it was possible to detect that activity from two *Staphylococcus aureus* and one *Staphylococcus epidermidis* strains. The activity observed in *Staphylococcus aureus*' biofilm was greater than the activity found on *Staphylococcus epidermidis*' biofilm, indicating that if there is a correlation between biofilm formation and extracellular neutral phosphatase activity, *Staphylococcus aureus* would be the ideal model to be studied.

Key-words: *Staphylococcus*. Phosphatase. Biofilm. Extracellular adhesion protein.

LISTA DE ABREVIATURAS

SCP	<i>Staphylococcus</i> Coagulase Positivo
SCN	<i>Staphylococcus</i> Coagulase Negativo
SEA/B/D/E/H	Enterotoxina A/B/D/E/H De <i>Staphylococcus</i>
CVs	Colônias Variantes
eDNA	DNA Extracelular
PIA	Adesina Polissacarídica Intracelular
PNAG	N-Acetil-Glucosamina
Bap	Proteína Associada Ao Biofilme
MSCRAMMs	Componentes Microbianos De Superfície Que Reconhecem Moléculas De Matriz Adesiva
MRSA	<i>Staphylococcus Aureus</i> Resistente A Meticilina
BHI	Infusão Cérebro-Coração
CFL	Câmara De Fluxo Laminar
<i>p</i> -NPP	<i>para</i> -NitroFenolFosfato
<i>p</i> -NP	<i>para</i> -Nitrofenol
NaOH	Hidróxido De Sódio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1. GÊNERO <i>STAPHYLOCOCCUS</i>	10
1.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	11
1.1.2. O GÊNERO <i>Staphylococcus</i> COMO CAUSADOR DE INTOXICAÇÃO ALIMENTAR.....	13
1.2. O BIOFILME.....	15
1.2.1. COMPOSIÇÃO DO BIOFILME.....	17
1.2.1.1. ADESINA INTRACELULAR POLISSACARÍDICA (PIA).....	18
1.2.1.2. PROTEÍNA DE ADESÃO EXTRACELULAR (EAP).....	20
1.2.2. FORMAÇÃO DO BIOFILME.....	20
1.3. ENZIMAS FOSFATASES.....	23
1.4. PROBLEMÁTICA MUNDIAL DAS INFECÇÕES ESTAFILOCÓCICAS.....	24
1.5. OBJETIVOS.....	26
1.5.1. OBJETIVO GERAL.....	26
1.5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
2. DESENVOLVIMENTO.....	27
2.1. METODOLOGIA.....	27
2.1.1. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DE <i>Staphylococcus</i> COAGULASE POSITIVOS (SCP).....	27
2.1.1.1. CAPACIDADE DE FERMENTAÇÃO DE MANITOL E RESISTÊNCIA A MEIO COM ALTO TEOR DE SALINIDADE.....	27
2.1.1.2. CAPACIDADE DE REDUÇÃO DO RELUTETO E PRODUÇÃO DE LECITINASE.....	28
2.1.1.3. CAPACIDADE DE COAGULAÇÃO EM TUBO.....	28
2.1.1.4. ANÁLISE MORFOTINTORIAL PELA COLORAÇÃO DE GRAM.....	28
2.1.1.5. CAPACIDADE DE DEGRADAÇÃO DE DNA (DNASE).....	29
2.1.2. SCREENING DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME DOSSCP.....	29
2.1.3. CURSO TEMPORAL DE ATIVIDADE FOSFATÁSICA NO BIOFILME...30	30
2.2. RESULTADOS.....	32
2.3. DISCUSSÃO.....	40
3. CONCLUSÃO.....	44
4. REFERÊNCIAS.....	45

1. INTRODUÇÃO

1.1. GÊNERO *Staphylococcus*

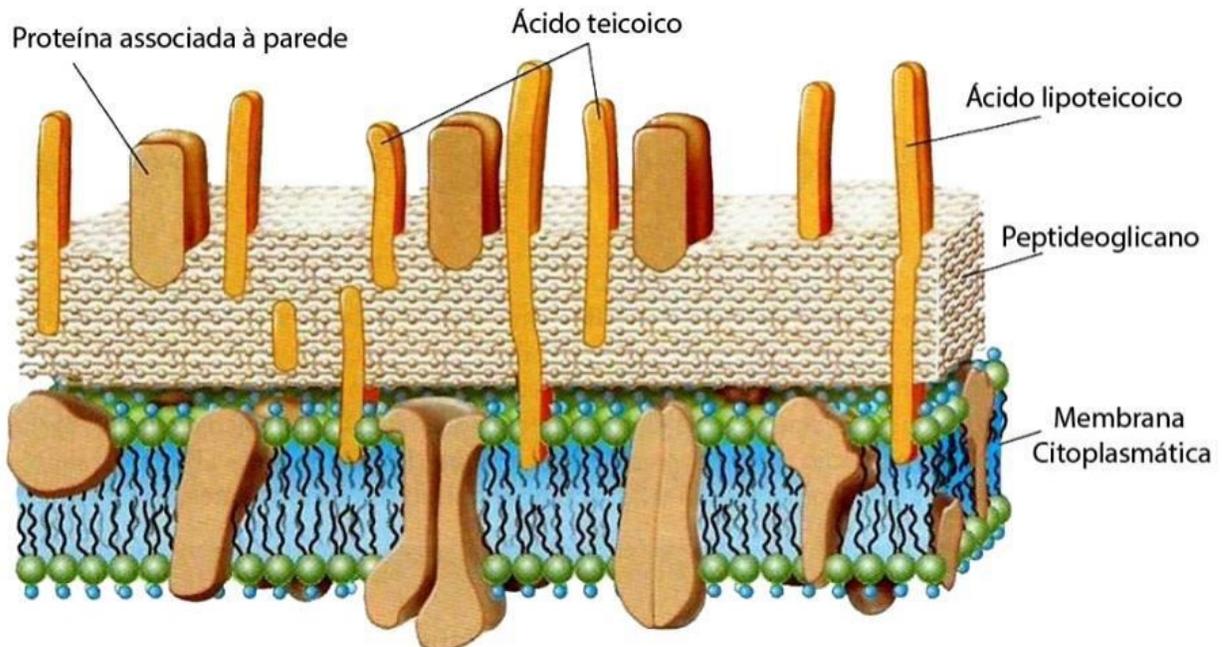
Dentre as bactérias mais conhecidas e estudadas nos dias de hoje, destacam-se as do gênero *Staphylococcus*. Essas bactérias encontram-se amplamente distribuídas na natureza, mas também podem ser encontradas na pele e mucosa de mamíferos e aves (OTTO, 2013; TUEMMERS & SALDIVIA, 2015), onde vivem sem causar danos ao hospedeiro, mas que eventualmente podem causar infecções oportunistas nos mesmos (TYAGI *et al*, 2015).

Esse gênero é composto por 45 espécies e 24 subespécies (EUZEBY, 2011) e dentre elas algumas se destacam devido a sua importância médica, como o *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Outras espécies, como o *Staphylococcus haemolyticus*, também possuem importância médica, estando relacionado com alguns casos de endocardite, sepse e infecções geniturinárias (OTTO, 2008).

As espécies desse gênero possuem morfologia arredondada (em forma de cocos) e são Gram-positivas (Figura 1). Essas bactérias podem ser facilmente observadas através de microscópio ótico, podendo estar isoladas (cocos) ou agrupadas em forma de cacho de uva (*Staphylococcus*). Eles possuem em geral 1µm de diâmetro, se organizam em pequenos agregados e não esporulam. São microrganismos aeróbios e tipicamente catalase positivos, o que permite a sua diferenciação de outros grupos de cocos como o *Streptococcus*, além da organização dessas bactérias ao microscópio ótico não ser em forma de linha, como os *Streptococcus* (BLAIOTTA *et al*, 2009).

Esses cocos Gram-positivos possuem alta resistência à salinidade, permitindo que, em laboratório, eles sejam isolados facilmente com o uso de meios seletivos como o ágar manitol salgado, que contém 7,5% de cloreto de sódio. Algumas espécies, como o *Staphylococcus aureus*, possuem uma pigmentação e odor característicos, o que também facilita sua identificação e isolamento. (LALLY *et al*, 1985).

Figura 1 – Parede celular de uma bactéria Gram-positiva



As bactérias Gram-positivas apresentam uma parede celular espessa, composta principalmente por peptidoglicanos, onde há ácidos teicóicos e lipoteicóicos inseridos, além de diversas proteínas. A morfologia da parede bacteriana permite com que a maioria das bactérias sejam classificadas em dois grandes grupos: Gram-positivas e Gram-negativas. (MADIGAN *et al*, 2010)

1.1.1. *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus* é uma espécie de bactéria Gram-positiva conhecida por ser um comensal de seres humanos, aves e mamíferos, apesar de serem também fatores de risco para o surgimento de infecções (DALL'ANTONIA *et al*, 2005; ELLIS *et al*, 2014). Estudos demonstram que em uma população saudável, 65% das vezes em que uma infecção nasal ocorre, a cepa responsável era antes um comensal, e em infecções de origem hospitalar essa porcentagem aumenta para 80% (WERTHEIN *et al*, 2004).

Essa bactéria também pode atuar como patógeno oportunista, causando infecções em humanos (KLOOS, 1980), gatos, gado, aves e coelhos, tendo grande impacto econômico quando presente nesses animais (PATERSON *et al*, 2014). Quando uma infecção atinge uma criação de gado, por exemplo, ela só é percebida quando os animais começam a morrer, e o tratamento de todos os animais é extremamente caro. Além disso, alguns produtos alimentícios oriundos de bovinos, como o leite, não podem

conter resíduos de antimicrobianos, dificultando sua venda após tal tratamento em vacas lactantes (BRASIL, 2002). Em adição, não há restrições estabelecidas para a venda de carne bovina contendo antibióticos (BRASIL, 2007), mas diversos estudos vêm apontando a presença desses medicamentos na carne e influenciando a venda desses produtos, estimulando empresas frigoríficas a diminuir a administração desses antibióticos (BORGES & FREITAS, 2002; NETO *et al*, 2015).

Em humanos, *S. aureus* causa infecções em adultos saudáveis e, de modo mais grave, em pacientes hospitalizados (PATERSON *et al*, 2014). Essas infecções irão causar uma série de danos ao paciente, dependendo do local de colonização, como por exemplo a endocardite causada pela colonização as válvulas do coração. Além disso, essa espécie também já foi descrita como causadora de infecções no trato respiratório, urinário e digestivo, além de serem responsáveis por alguns casos de pneumonia e sepse.

Essa espécie é particularmente importante na Microbiologia Médica e Alimentícia por sua capacidade de formação de biofilme, que a protege de produtos químicos de higienização e antibióticos, dentre outros. Na área alimentícia, essa bactéria é mundialmente conhecida por causar infecções alimentares, muitas vezes pela produção de biofilme e toxinas em alimentos e em suas embalagens. Esses alimentos quando não armazenados de forma correta, favorecem a proliferação desses microrganismos, aumentando os riscos de intoxicação alimentar. Além disso, durante o cozimento do alimento contaminado, as bactérias ali presentes podem ser eliminadas, mas o mesmo não pode ser dito de algumas toxinas produzidas por elas. Essas toxinas quando ingeridas, além de interagir com o sistema imune, irão provocar principalmente febre, vômito e náuseas no hospedeiro.

Na área médica, essa bactéria é conhecida por causar infecções agudas de pele, como abscessos (COSTERTON *et al*, 1999), geralmente provocadas pela liberação de enzimas e toxinas que degradam a matriz extracelular do tecido, facilitando a dispersão das bactérias pelo organismo (IWATSUKI *et al*, 2006). Ela também é capaz de causar infecções crônicas, e muitas vezes persistentes, que geralmente estão relacionadas à produção de biofilme (CHATTERJEE *et al*, 2014). Nessas infecções recorrentes essa espécie é especialmente problemática devido ao surgimento de

multirresistência a antimicrobianos (LOWY, 1998), fato comum hoje em dia entre as espécies de *S. aureus*. Estima-se que dentre as infecções causadas por essa espécie, um quarto seja persistente (KLUYTMANS *et al*, 1997).

A persistência dessas infecções pode estar relacionada à diversos fatores. Algumas hipóteses sugerem ser devido a capacidade da bactéria em infectar uma célula hospedeira e, uma vez dentro dela, diminuir seu metabolismo (PROCTOR *et al*, 1995), automaticamente diminuindo a formação de autolisinas produzidas e garantindo uma maior sobrevivência (PROCTOR *et al*, 2006). Outras propõem que a persistência está relacionada com a existência de colônias variantes (CVs) de *Staphylococcus aureus*, que possuiriam genes de resistência a antimicrobianos, que mais tarde seriam selecionados positivamente e garantiriam a sobrevivência da colônia. A primeira correlação entre essas colônias variantes e as infecções persistentes de *Staphylococcus aureus* foi descrita em 1995 (PROCTOR *et al*, 1995). A produção de biofilme também é outro fator relacionado a infecções recorrentes causadas por essa bactéria.

1.1.2. O GÊNERO *Staphylococcus* COMO CAUSA DE INTOXICAÇÕES ALIMENTARES

Outra grande preocupação que se tem com esses microrganismos é a ocorrência de intoxicações alimentares, que é caracterizada pela ingestão de alimentos ou água contaminada com microrganismos produtores de toxinas ou com as próprias toxinas. As bactérias patogênicas capazes de causar infecções alimentares geralmente possuem habilidade para penetrar, sobreviver e se multiplicar em células do hospedeiro (le LOIR *et al*, 2003). Um exemplo de bactéria são as do gênero *Staphylococcus*, considerado um problema mundial (HENNEKINNE *et al*, 2012) e a principal causa de intoxicação alimentar nos Estados Unidos (BALABAN & RASOOLY, 2000).

Dentro desse o gênero, a espécie *Staphylococcus aureus* é especialmente perigosa devido a liberação de toxinas e resistência a antibióticos (CHAIBENJAWONG & FOSTER, 2011). Essa espécie não é capaz de produzir esporos, mas sua resistência à salinidade, variação de temperatura e pH faz com que a mesma ofereça grande perigo durante o preparo e o processamento de alimentos (CHAIBENJAWONG &

FOSTER, 2011). Na maioria dos casos, essas bactérias causam intoxicação alimentar devido à presença de enterotoxinas no alimento, que não são completamente destruídas durante seu cozimento, diferente da bactéria em si (MURRAY, 2005).

Os sintomas são desencadeados por uma ou mais toxinas produzidas por essa bactéria (le LOIR *et al*, 2003), e se iniciam de três a quatro horas após a ingestão desses alimentos, dependendo da quantidade de toxina ingerida (MURRAY, 2005). Os sintomas mais comuns são vômito, cólicas abdominais e náusea (le LOIR *et al*, 2003), podendo também ocorrer quadros de diarreia, que geralmente são mais perigosos em crianças e adultos imunossuprimidos. Contudo, esses sintomas desaparecem em cerca de 24 a 48 horas, fazendo com que apenas 10% dos pacientes procurem um médico (MURRAY, 2005).

A detecção dessas enterotoxinas pode ser feita através de amostras do alimento, por métodos de bioensaios, biologia molecular, técnicas imunológicas, ou pela detecção da bactéria no alimento (CHAIBENJAWONG & FOSTER, 2011). Estima-se que a ingestão de 0,1µg dessas enterotoxinas já seja capaz de causar intoxicação alimentar (ARGUDÍN *et al*, 2010). Essas moléculas também são conhecidas como superantígenos, devido à sua capacidade de produzir uma reação pirogênica, causar imunossupressão e estimular a proliferação não específica de linfócitos T no hospedeiro (le LOIR *et al*, 2003).

Essas enterotoxinas também oferecem risco à saúde populacional em geral, uma vez que alguns tipos apresentam resistência a diversos fatores, como temperatura, resistindo ao cozimento dos alimentos, pH estomacal, ação das enzimas estomacais, altas e baixas temperaturas e a mudanças ambientais, como seca (le LOIR *et al*, 2003).

A enterotoxina A de *Staphylococcus aureus* (SEA) é a mais comum observada em casos de intoxicação alimentar em diversos países, seguida por SED e SEB, em menor frequência (ARGUDÍN *et al*, 2010). Em todos os casos de intoxicação alimentar causada por enterotoxinas de *S. aureus* ocorrem eventos de vômito, possivelmente causado por SEA a SEE e SEH (le LOIR *et al*, 2003).

A ação conjunta das enterotoxinas presentes em alimentos contaminados com a formação de biofilme nesses alimentos ou em plásticos de embalagens dão aos *Staphylococcus* um forte potencial patogênico, que muitas vezes resulta em infecções

persistentes em seus hospedeiros. Todavia, os casos que causam maior alarme aos órgãos de saúde pública são os que envolvem algum tipo de resistência a antibióticos, pois além de oferecer grande risco ao hospedeiro, que permanecerá exposto à essas enterotoxinas e à infecção causada por essa bactéria, também oferece risco de disseminação para a população, podendo gerar uma epidemia grave, cenário comum em muitos hospitais (AUNG *et al*, 2015; IBRAHIM, 2015; PATHARE *et al*, 2015).

1.2. O BIOFILME

O biofilme é muitas vezes definido como uma matriz extracelular polimérica, que envolve as células que o produzem (COSTERTON *et al*, 1994). Esse modo de crescimento é favorável para as bactérias, que se desenvolvem melhor dentro do biofilme do que em sua forma de vida planctônica (SINGH *et al*, 2009). Para uma célula ser capaz de produzir essa matriz ela deve apresentar mudanças fisiológicas, como mudanças no padrão de expressão gênica e de produção de proteínas (ARCHER *et al*, 2011), além de conseguir sobreviver com os substratos disponíveis (LONG *et al*, 2014).

Algumas bactérias são conhecidas por serem capazes de produzir o biofilme, como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* (STEPANOVIC *et al*, 2004), *S. aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Tais espécies são especialmente perigosas para o homem por provocarem infecções alimentares e de origem nosocomial (COSTERTON *et al*, 1999; SIMSEK *et al*, 2009; THOMPSON *et al*, 2010; DAMACENO *et al*, 2015; NORMANNO *et al*, 2015).

Outra espécie relevante no ambiente hospitalar e capaz de formar biofilme é o *Staphylococcus epidermidis* (KARSTEN, *et al*, 2014). Essa bactéria é frequentemente encontrada em isolados clínicos, principalmente nos Estados Unidos e na Europa, o que pode ser facilitado pela presença de biofilme e genes de resistência (PETTI *et al*, 2008).

O teste clássico de diferenciação de *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) e *Staphylococcus* coagulase positivos (SCP) é o teste de coagulação em tubo, que utiliza plasma de coelho para verificar a formação ou não de um coágulo (van GRIETHUYSEN *et al*, 2001). Os demais testes para a identificação de SCN são semelhantes aos da

identificação de SCP: Gram-positivos, majoritariamente catalase positivos e anaeróbios facultativos (GARCIA, 2010).

Quando o biofilme é produzido, as bactérias ali presentes ficam mais protegidas de diversos fatores abióticos, como variação de temperatura, osmolaridade e umidade (OTTO, 2013), alguns produtos químicos de higienização (JOSEPH *et al*, 2001), além de fatores bióticos, como células do sistema imune de seu hospedeiro (LONG *et al*, 2014) e os eventuais antibióticos que esse paciente venha a tomar.

Uma vez envoltas por essa matriz, essas bactérias inibem a ação do sistema imune do hospedeiro (de la FUENTE-NUNEZ *et al*, 2013), como a ação de macrófagos, que não penetram eficientemente na matriz do biofilme, fazendo com que essa célula libere toxinas na tentativa de eliminar o antígeno ali presente (SCHERR *et al*, 2014).

Além disso, as bactérias produtoras de biofilme estão protegidas dos antimicrobianos administrados, uma vez que eles dificilmente se difundem na matriz do biofilme (SINGHAL *et al*, 2011) ou não se difundem de nenhuma forma (SINGH *et al*, 2010). Esses dois fatores em conjunto auxiliam no desenvolvimento de infecções persistentes e recorrentes (COSTERTON *et al*, 1999), que muitas vezes são características de infecções por *S. aureus*.

A instalação dessas infecções persistentes pode estar associada à formação de células quiescentes, que se mantêm metabolicamente inativas dentro do biofilme, e, portanto, não sofrem a ação dos antimicrobianos (PROCTOR *et al*, 2006; LEWIS, 2010). Nesse caso, quando as células se tornam ativas e são liberadas em seu estado planctônico elas retomam sua sensibilidade aos medicamentos, não tendo alterações a nível genético (SINGH *et al*, 2009).

O contato de doses subletais de antimicrobianos com essas bactérias pode gerar um gargalo populacional, selecionando as células que naturalmente possuam alguma resistência àquela droga (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2001), e que irão fundar uma nova colônia, agora resistente àquele medicamento, característica que geralmente se adquire hereditariamente (MURAKAMI & TOMASZ, 1989; KATAYAMA *et al*, 2000).

Estudos prévios demonstram que bactérias possuem uma maior capacidade de formação de biofilme em superfícies hidrofóbicas (SINDE & CARBALLO, 2000;

DONLAN, 2002) como materiais feitos de plástico, como por exemplo, próteses hospitalares e embalagens de comida, que vem sendo cada vez mais utilizadas nos dias de hoje (POMPERMAYER & GAYLARDE, 2000). No caso dos utensílios cirúrgicos colonizados por cepas resistentes a antimicrobianos, é recomendável trocar a peça para que a infecção seja combatida, uma vez que, como visto, é extremamente difícil remover uma população bacteriana protegida pelo biofilme (DAROUCHE, 2004). Em próteses feitas de metais e outros materiais que não plástico, a formação do biofilme originalmente se dá pela deposição de proteínas do hospedeiro nesses materiais, fazendo com que haja a adesão das bactérias nessa superfície e posterior produção da matriz extracelular (FRANÇOIS *et al*, 1996).

1.2.1. COMPOSIÇÃO DO BIOFILME

A composição do biofilme dependerá da estirpe bacteriana, principalmente quando falamos as proporções de cada componente (ABRAHAM e JEFFERSON, 2012), mas alguns compostos mais importantes são encontrados em biofilmes de diversas espécies, e alguns até essenciais para o desenvolvimento do mesmo.

Em geral, há uma predominância de polissacarídeos, embebidos em proteínas, proteases (MOORMEIER *et al*, 2014) e ácidos nucleicos, como DNA (CUE *et al*, 2012; FOSTER *et al*, 2014). Esse último é um componente essencial para a estruturação e desenvolvimento do biofilme, tanto na fase inicial de sua formação quanto em fases mais tardias (QIN *et al*, 2007).

Esse DNA extracelular (eDNA) é provindo de autólise de células bacterianas (THOMAS & HANCOCK, 2009) e a sua importância está associada às cargas negativas do DNA, que promovem uma estruturação eletrostática na matriz do biofilme (MANN *et al*, 2009). Além disso, esse eDNA é capaz de se associar com outras proteínas, como as toxinas beta, formando oligômeros insolúveis, que dão mais sustentação ao biofilme (NOVOTNY *et al*, 2013).

A autólise sofrida por essas bactérias é provinda da ação de hidrolases de mureína, que degradam os peptidoglicanos da parede celular, responsáveis pelo arranjo dessa estrutura durante os processos de divisão celular (SADYKOV & BAYLES, 2012). A proteína CidA, gerada pelo operon *cidABC*, forma um poro na

membrana da célula, sendo responsável pela autólise (SADYKOV & BAYLES, 2012). Essa regulação tem se mostrado estar relacionada a fatores de estresse que ocorrem nos microambientes formados dentro do biofilme, como a falta de oxigenação sofrida nas regiões mais basais do biofilme (MOORMEIER *et al*, 2013). Essa autólise também libera proteínas intracelulares na matriz do biofilme, que não necessariamente deveriam ser incorporadas à matriz, cuja participação ainda não está bem elucidada (FOULSTON *et al*, 2014).

Outras proteínas importantes na composição do biofilme e em seu desenvolvimento inicial (adesão) são, principalmente, proteínas de superfície, como a proteína de ligação ao fibrinogênio, proteína associada ao biofilme (BAP) e fator de aglutinação B (ABRAHAM & JEFFERSON, 2012). Existem também proteínas secretadas que são essenciais na maturação do biofilme, são elas: as adesinas, como proteína de adesão extracelular (Eap) e coagulases, e toxina beta (SUGIMOTO *et al*, 2013). Essas proteínas também estão sujeitas a variações de acordo com as espécies de bactérias as quais o biofilme está relacionado, podendo também definir a especificidade de cada proteína a cada tipo de infecção (e hospedeiro) de acordo com a espécie relacionada (ARTINI *et al*, 2013) e a resposta do hospedeiro àquela infecção (HOUSTON *et al*, 2011).

1.2.1.1. ADESINA INTRACELULAR POLISSACARÍDICA (PIA)

A adesina intracelular polissacarídica (PIA) (WEAVER *et al*, 2012), também conhecida como polímero de N-acetil-glucosamina (PNAG) (O'GARA, 2007) ou exopolissacarídeo de *Staphylococcus aureus* (JOYCE *et al*, 2003), é uma das proteínas mais importantes na composição o biofilme, principalmente em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Em algumas espécies, a produção dessa proteína está intimamente relacionada com sua virulência (ROHDE *et al*, 2009). Essa adesina é formada por β -1,6-glicosaminoglicano, sendo um polímero com pelo menos 130 resíduos de 2-deoxi-2-amino-D-glicopiranosílicos.

Essa adesina foi recentemente encontrada na superfície de bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli*, *Yersinia pestis* e *Pseudomonas fluorescens* (GANESHNARAYAN *et al*, 2009), sugerindo uma convergência evolutiva entre bactérias

Gram-positivas e Gram-negativas. Segundo Brooks e Jefferson (2014), a expressão dessa proteína pode ser ligada ou desligada através da inativação de um de seus loci (*icaC*) pela variação do número de repetições em tandem de um tetranucleotídeo relacionado (TTTA). O que acontece nesse caso é a produção de um códon de parada prematuro, que faz a proteína PIA (que possui 303 aminoácidos) ser produzida apenas com 47 aminoácidos, perdendo sua função.

Ela é encontrada em abundância na superfície celular (HEILMANN *et al*, 1996), e produzida por enzimas codificadas no loci *icaADBC* que são responsáveis também pela sua exportação e modificação. Uma série de microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos dependem de sua produção para obterem sucesso no desenvolvimento do biofilme (ROHDE *et al*, 2009), como *S. epidermidis* e *S. aureus*. Contudo, alguns microrganismos são capazes de produzir e desenvolver seu biofilme sem a produção de PIA, indicando o envolvimento de outras adesinas nesse processo (CHOKR *et al*, 2006; HENNIG *et al*, 2007). Exemplo disso é a proteína associada ao biofilme (Bap), relacionada com o biofilme de *Staphylococcus coagulase negativos* (TORMO *et al*, 2005) em bovinos (VALLE *et al*, 2012), não tendo associação conhecida com bactérias isoladas de humanos (TANG *et al*, 2013).

Essa proteína é tão importante no contexto do biofilme que alguns cientistas cogitam a possibilidade de desenvolver uma vacina que estimule a produção de antígenos específicos para PIA (EBERT *et al*, 2011). Estudos realizados por Sadovskaya (2007) demonstraram que, em ratos inoculados com PIA, houve a produção de anticorpos específicos anti-PIA, etapa importante na produção de uma vacina segura e eficaz.

1.2.1.2. PROTEÍNA DE ADESÃO EXTRACELULAR (EAP)

A proteína de adesão extracelular (Eap) é essencial durante a fase inicial de produção de biofilme, tendo papel fundamental de promover a adesão célula-hospedeiro ou célula-substrato. Essa proteína é secretada pela bactéria e tem a capacidade de se aderir a proteínas do soro do hospedeiro, como vibronectina, fibronectina e proteínas da matriz (PALMA *et al*, 1999). Estudos feitos pelos autores supracitados apontaram a relação entre o ancoramento da Eap em moléculas como a

vitronectina, fibronectina, fibrinogênio e protrombina com a colonização por *Staphylococcus aureus* durante processos de cicatrização de feridas.

Após esse ancoramento inicial, a Eap se liga à célula bacteriana através de uma fosfatase neutra (THOMPSON *et al*, 2010), ou a ácidos teicóicos (VUONG *et al*, 2002) da parede bacteriana, promovendo a ligação bactéria-hospedeiro. Essa proteína pode, ainda, se ligar a outras Eaps, promovendo a ligação célula a célula (HUSSIAN *et al*, 2008). A ligação da Eap e da fosfatase neutra da parede bacteriana com proteínas do hospedeiro podem, ainda, através da atividade dessa fosfatase, influenciar processos de sinalização celular na célula hospedeira e de internalização de bactérias (FLOCK & FLOCK, 2001).

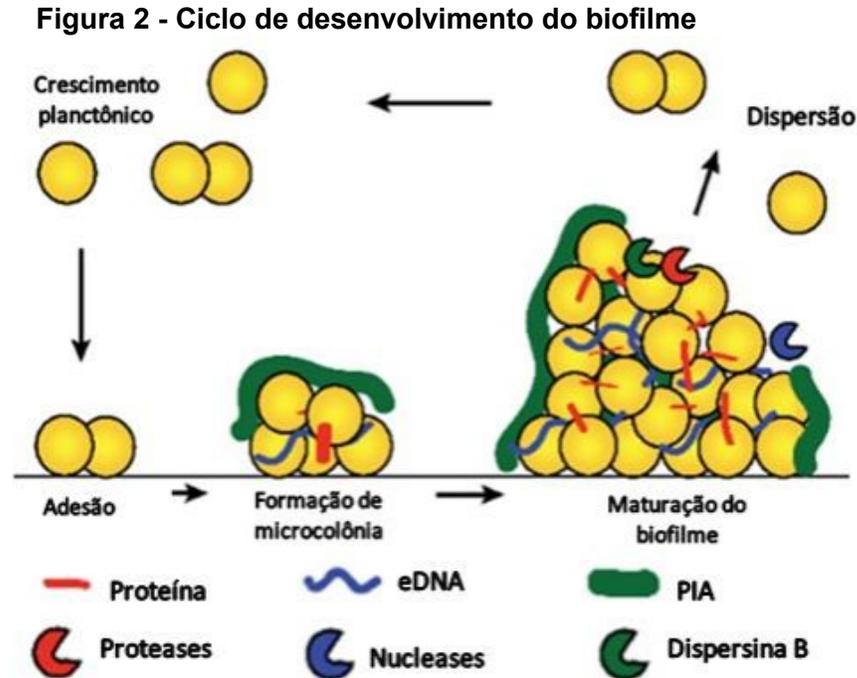
A Eap é conhecida por contribuir com a patogênese em *Staphylococcus*, como o *S. aureus*, principalmente em abscessos de pele que tem difícil cicatrização, ou úlceras e feridas cronicamente infectadas (GRIMBLE *et al*, 2001). No caso do *Staphylococcus aureus*, as cepas que não produzem a Eap geralmente possuem uma redução na afinidade e capacidade de colonizar e invadir tecido do hospedeiro (KREIKEMEYER *et al*, 2002).

1.2.2. FORMAÇÃO DO BIOFILME

O desenvolvimento do biofilme bacteriano é um evento amplamente estudado, principalmente devido a sua importância médica e ambiental. A formação de um biofilme maduro depende de etapas como a adesão, para promover o posicionamento das células basais e posterior proliferação celular. A divisão desse processo em estágios também é bem caracterizada. A maioria dos autores segrega esse evento em três etapas: adesão inicial, maturação e dispersão (Figura 2) (LISTER & HORSWILL, 2014).

No estágio inicial de formação de biofilme, há a adesão de células planctônicas (DONLAN, 2002) através do ancoramento das bactérias a seus substratos. Como visto, as bactérias possuem preferência por superfícies de plástico para a formação do biofilme, mas algumas autolisinas também são relacionadas a essa etapa, como a autolisina AtlE (HEILMANN *et al*, 1997). Nessa etapa, células planctônicas se associam

ao substrato ou a proteínas do hospedeiro e se não forem removidas, começam a se proliferar intensamente e a produzir biofilme.



Modelo de crescimento bacteriano em biofilme. Em resumo, ao entrarem em contato com uma superfície, as células planctônicas se aderem utilizando proteínas como a Eap. Após a fixação há uma multiplicação intensa, formando uma microcolônia, que começa a produzir a matriz extracelular. A biomassa vai então se acumulando até a maturação do biofilme. Após, sinais ambientais de dentro do biofilme começam a desencadear a ativação de mecanismos de dispersão, liberando células planctônicas que irão recomençar o ciclo, colonizando outros ambientes (adaptado de LISTER & HORSWILL, 2014).

Outras proteínas também estão envolvidas nessa adesão primária, como algumas proteínas de superfície conhecidas como componentes microbianos de superfície que reconhecem moléculas de matriz adesiva (MSCRAMMs) (FOSTER *et al*, 2014). Essas proteínas são responsáveis por ligar-se a moléculas do hospedeiro, como fibrinogênio, fibronectina e colágeno.

Posteriormente, ocorre uma intensa proliferação bacteriana, e as novas células são aderidas às mais basais por ação de adesinas (GÖTZ, 2002). Essa multiplicação continua até a maturação do biofilme, concomitante à produção de matriz extracelular.

Nessa fase a expansão do biofilme é tão intensa que fatores como nutrientes e oxigênio não se difundem homoganeamente em toda a matriz, podendo criar nichos com microambientes diferenciados. As células nesses nichos, mesmo sendo geneticamente semelhantes, sofrem pressões seletivas diferentes e possuem um padrão de expressão de proteínas também diferenciado.

Além disso, a permanência nesses ambientes pode fazer com que a célula sofra uma adaptação ao nicho, ou levá-la a morte. Se a força seletiva empregada nesse nicho for muito alta, certos genótipos podem ser fixados, enquanto outros eliminados, fazendo com que o genótipo final dessa célula seja diferente das demais.

Essa multiplicação intensa de bactérias e produção intensa de matriz extracelular permanece até que o biofilme amadureça. Após essa maturação há a dispersão bacteriana, onde algumas células são liberadas, em unidades ou em grupos (BOLES & HORSWILL, 2008). Isso significa que, se for um biofilme crescido em um cateter intravenoso, por exemplo, nessa fase as células liberadas são carregadas para o restante do organismo via corrente sanguínea, colonizando outros locais como as válvulas do coração, podendo causar endocardite.

Até cinco anos atrás essa fase não era muito bem elucidada (MACK *et al*, 2009), mas com o aumento de microrganismos multirresistentes a drogas, como o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), tornou-se imprescindível elaborar novas técnicas de combates aos biofilmes (BOLES & HORSWILL, 2008). Moormeier *et al* (2014) abordam a fundo sobre esta fase em seus estudos mais recentes.

Exemplo disso são os D-aminoácidos, conhecidos por estimular a fase de dispersão em biofilmes de *S. aureus* e em outras bactérias (KOLODKIN-GAL *et al*, 2010). Para isso, então, um método utilizando esses D-aminoácidos foi elaborado, no qual esses aminoácidos eram complexados a peptídeo-glicanos, impedindo a adesão de uma proteína da matriz à parede bacteriana. Hochbaum *et al* (2011) testou esse mecanismo em cepas de *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e outras bactérias e obteve resultados semelhantes: o biofilme não se formava devido a não ligação das adesinas à parede celular bacteriana.

Contudo, Leiman *et al* (2013) recentemente demonstrou que esse fenótipo era causado por uma mutação específica na cepa utilizada. No evento, ocorreu uma mutação no gene DTD, que codifica uma proteína responsável por impedir a incorporação errada de D-aminoácidos em proteínas. O resultado observado foi, então, consequência da interferência na síntese e proteínas, que impede o crescimento do biofilme e sobrevivência das células.

1.3. ENZIMAS FOSFATASES

As enzimas fosfatases são caracterizadas pela sua capacidade de defosforilar substratos quando ativas, vastamente conhecidas pelo seu papel em eventos fisiológicos importantes na célula, como nutrição, regulação de etapas do metabolismo e da divisão celular. Além disso, essas enzimas também são conhecidas por regular a comunicação célula-a-célula (HUNTER, 1998). Elas atuam em contraposição às enzimas quinases, que fosforilam substratos, muitas vezes compartilhados, e juntas comandam a ativação ou inativação de diversos processos fisiológicos na célula (MUSTELIN, 2007).

O principal papel dessas duas enzimas é ativar ou desativar outras enzimas e proteínas, mantendo o funcionamento fisiológico da célula. As fosfatases, como qualquer enzima, possuem um pH ótimo de atuação, que dependerá de acordo com o tipo de fosfatase. A fosfatase de interesse desse estudo é a fosfatase neutra localizada na parede celular de *Staphylococcus* coagulase positivos, portanto o pH ótimo de atuação, e o que será utilizado nos ensaios de fosfatase é o pH 7,0.

Mesmo essas enzimas tendo papéis fundamentais em muitos eventos da célula, sabe-se apenas que durante a formação do biofilme a Eap pode se ligar a essa fosfatase neutra da parede bacteriana, fazendo um ancoramento entre o substrato e a bactéria. Estudos feitos por Flock & Flock (2001) demonstraram a interação entre essa fosfatase e a Eap, ressaltando que a atividade enzimática permanece ativa mesmo após ocorrer a ligação. Contudo, ainda não está elucidado se há um substrato para essa enzima no contexto de formação de biofilme.

1.4. PROBLEMÁTICA MUNDIAL DAS INFECÇÕES ESTAFILOCÓCICAS

O surgimento de novas cepas de bactérias multirresistentes (ANDERSON & O'TOOLE, 2008), como o MRSA, vem alertando a população mundial nos dias de hoje. Não só cientistas, mas médicos e pacientes estão enfrentando os impactos dessas bactérias no seu cotidiano. Tornou-se extremamente importante identificar novos métodos de combate a essas bactérias e descobrir novos alvos farmacológicos que possam agir em conjunto aos antimicrobianos (ALLEN *et al*, 2014). O MRSA, por exemplo, é resistente a praticamente todos os antibióticos β -lactâmicos, e é um problema global em saúde pública (PATERSON *et al*, 2014).

Outro problema, menos severo, é a persistência de infecções bacterianas, principalmente devido às células que ficam latentes dentro do biofilme e, assim, resistentes aos antimicrobianos. Para resolver esse problema, tem sido estudada a utilização de fatores de dispersão (CONLON *et al*, 2013). Nesse caso, haveria a dispersão do biofilme e exposição das células quiescentes, que passariam a ser metabolicamente ativas e sensíveis aos antimicrobianos e vulneráveis a sistema imunológico do paciente.

Em contrapartida, muitas cepas vêm adquirindo resistência a esses fatores de dispersão, como a dispersina B e proteinase K (REFFUVEILLE *et al*, 2014). Além disso, outras preocupações com o método ainda não foram completamente estabelecidas. Por exemplo, se após a aplicação do fator de dispersão o antibiótico não for suficiente para combater as células liberadas, o que acontecerá é a distribuição das mesmas pelo organismo. Isso pode gerar êmbolos, perigosos para a circulação sanguínea do hospedeiro.

A dispersão parcial também preocupa, uma vez que só ajudaria a bactéria a se estabelecer em outros locais do organismo (JOO *et al*, 2010). A administração de doses subletais de antibióticos também causaria a liberação de DNA intracelular, favorecendo a formação de biofilme (KAPLAN *et al*, 2012), extremamente indesejável durante a administração de fatores de dispersão.

Tendo em vista o poder de resistência dos biofilmes bacterianos, e dos diversos empecilhos que os mesmos apresentam para a antibioticoterapia, elucidar melhor as vias do desenvolvimento dos biofilmes torna-se prioridade na área de saúde. Portanto,

nesse presente estudo propomos uma metodologia nova, que permita detectar a relação, ou não, da fosfatase neutra da parede bacteriana e a Eap. Caso haja uma relação importante entre essas proteínas, poderíamos ter um alvo farmacológico importante, e expor um novo caminho para os tratamentos de bactérias multirresistentes.

1.5. OBJETIVOS

1.5.1. OBJETIVO GERAL

Determinar se há relação entre a atividade da enzima fosfatase neutra localizada na parede celular bacteriana e a capacidade da bactéria em produzir a matriz extracelular do biofilme utilizando como modelo *Staphylococcus* coagulase positivos.

1.5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar *Staphylococcus* coagulase positivos dentre os isolados criopreservados no laboratório de Microbiologia do IFRJ.

Testar os isolados de interesse quanto à sua capacidade de formar biofilme.

Verificar a atividade fosfatásica neutra extracelular no biofilme.

Analisar a relação entre a intensidade de produção de biofilme e a atividade fosfatásica neutra extracelular.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1. METODOLOGIA

2.1.1. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DE *STAPHYLOCOCCUS* COAGULASE-POSITIVOS

Foram utilizados isolados de *Staphylococcus* provindos de alimentos e criopreservados no laboratório de Microbiologia do IFRJ *campus* Rio de Janeiro. Essas bactérias foram previamente isoladas de alimentos cárneos salgados e queijos, obtidos em supermercados da cidade do Rio de Janeiro e re-isolados para garantir sua pureza e identidade.

Todas as passagens e inoculações foram feitas seguindo a técnica de esgotamento, para obter colônias isoladas, assim, garantindo a pureza do isolado, confiabilidade e reprodutibilidade dos testes. Os testes utilizaram pelo menos um controle positivo, podendo ser ele *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 e/ou *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Antes do início dos testes foi feito o adequado descongelamento à temperatura ambiente dos isolados criopreservados, que foram imediatamente inoculadas em ágar infusão de cérebro-coração (BHI), que é rico em nutrientes e estimula a proliferação bacteriana.

Todas as metodologias foram feitas em câmara de fluxo laminar (CFL) e seguindo as normas de segurança e boas práticas de laboratório, conforme exposto no Manual de Laboratório de Microbiologia (SALVATORI, 2013).

2.1.1.1. CAPACIDADE DE FERMENTAÇÃO DE MANITOL E RESISTÊNCIA A MEIO COM ALTO TEOR DE SALINIDADE

O ágar manitol salgado possui como açúcar principal o D-manitol, e o indicador de pH vermelho de fenol, que irá virar de cor vermelha para amarela caso o inóculo seja capaz de fermentar esse açúcar. Foram selecionadas colônias com bom a ótimo crescimento, que deixaram o meio de cultura amarelo, pois são, provavelmente,

Staphylococcus, microrganismos de interesse, e que foram utilizados nos demais testes.

2.1.1.2. CAPACIDADE DE REDUÇÃO DO TELURETO E PRODUÇÃO DE LECITINASE

Foi utilizado o ágar Baird-Parker, no qual cada isolado foi inoculado e incubado por 24 h a 37°C. Após incubação, as colônias capazes de reduzir o telureto do meio possuíram coloração preto azulado e foram selecionadas, pois são provavelmente *Staphylococcus*.

2.1.1.3. CAPACIDADE DE COAGULAÇÃO EM TUBO

O teste de coagulação em tubo foi feito após inoculação dos isolados em ágar manitol salgado, que causa estresse osmótico nos isolados, estimulando a produção de coagulase intrínseca. Após a hidratação do plasma de coelho liofilizado com 3 mL de solução estéril de cloreto de sódio 0,9 % m/v (SCHLEIFER & KLOOS, 1975), 0,5 mL do reagente foi distribuído em tubos estéreis, onde as colônias foram inoculadas e incubadas a 37°C. Os tubos foram checados com intervalos de 30 minutos nas primeiras duas horas, e nas seguintes com intervalos de 2 horas em um total de 8 horas. Cada isolado foi avaliado pelo menos duas vezes.

2.1.1.4. ANÁLISE MORFOTINTORIAL PELA COLORAÇÃO DE GRAM

Os isolados previamente crescidos em ágar BHI foram transferidos para uma gota de água sobre uma lâmina de vidro. Após a secagem da água as bactérias foram fixadas passando a lâmina rapidamente na chama. Para realizar a coloração de Gram foi adicionado o corante cristal violeta por 45 segundos, seguido de lugol por 30 segundos. Por fim, adicionou-se álcool absoluto por 15 segundos e safranina por 45 segundos e, após secagem, as lâminas foram observadas em microscópio ótico. Após o tempo determinado para cada reagente foram feitas lavagens com água destilada. Os *Staphylococcus* Gram-positivos, desejados nesse trabalho, serão identificados como formato de cocos e arranjo semelhante a cachos de uva, de coloração violeta, devido à presença do corante cristal violeta associado às bactérias.

2.1.1.5. CAPACIDADE DE DEGRADAÇÃO DE DNA (DNASE)

Os isolados previamente incubados em ágar BHI foram inoculados em ágar DNase com 0,05 % de verde de metila, fazendo um pequeno círculo sobre o ágar. A atividade da enzima é detectada pela presença de halo translúcido ao redor dos inóculos após incubação a 37°C por 24 horas, respectivo a degradação do DNA que fica complexado com o corante verde de metila. A produção dessa enzima é uma das características que nos permitem diferenciar *Staphylococcus* spp. de *Staphylococcus aureus*, que é capaz de degradar o DNA.

2.1.2. SCREENING DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME DOS SCP

As bactérias identificadas como SCP foram analisadas quanto a sua capacidade de formação de biofilme em 24 horas, em quintuplicata e em pelo menos três experimentos distintos, seguindo um protocolo de análise baseado no método previamente estabelecido por Stepanovic *et al* (2000).

Bactérias previamente crescidas em ágar infusão de cérebro-coração (BHI) por 24 horas a 37°C são inoculadas em caldo BHI para estimular sua proliferação. Após 24 horas de incubação a 37°C, 200 µL de cada isolado foi aliqotado e incubado em placa de 96 poços em quintuplicata por 18-24 horas a 37°C, com agitação de 100 rpm, para que seja iniciada a formação de biofilme no plástico de cada placa utilizada.

Após incubação, os isolados que forem capazes de formar biofilme irão possuir células aderidas ao plástico, que posteriormente foram quantificadas pela adição 100µL de cristal violeta 0,25 % m/v por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado vertendo a placa e a mesma foi lavada com água destilada estéril três vezes. As bactérias foram fixadas pela adição de álcool absoluto por 15 minutos e, após, em cada poço foi adicionado cristal violeta. O excesso de corante foi lavado com água destilada estéril três vezes.

Como o cristal violeta fica retido dentro das bactérias, é necessário que haja o rompimento dessas células e uma solubilização do corante para se obter uma leitura representativa do biofilme. Foi então adicionado ácido acético glacial, 200 µL a 80 % v/v, e após 30 minutos a placa foi analisada por espectrofotometria ($\lambda = 600$ nm). A

reação possui como controle positivo o *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, conhecidamente capaz de formar biofilme.

O método é semi-quantitativo, e para sua análise a média das absorbâncias foram divididas pela média da absorbância do branco experimental. A amostra correspondente ao branco obteve todo o processo de revelação do biofilme idêntico ao aplicado nas amostras, porém sem a formação de biofilme devido à ausência de bactérias. A leitura obtida pelo espectrofotômetro nesses poços será relativa a restos de corante no poço, a absorbância do próprio plástico e outros interferentes que serão considerados em todas as amostras igualmente, independente da produção de biofilme.

A capacidade de formação do biofilme foi classificada em 3 intensidades: Forte, moderado e fraco, além da possibilidade de ser não produtora de biofilme. Os isolados classificadas como fracos produtores de biofilme obtiveram uma leitura de absorbância de uma a duas vezes maior que a média o branco. Os isolados classificados como moderados produtores de biofilme obtiveram uma leitura de absorbância de duas a quatro vezes maiores que o branco. Por fim, os classificados como fortes produtores de biofilme obtiveram uma leitura de absorbância quatro vezes maiores que o branco.

Todas as réplicas foram testadas estatisticamente de acordo com o teste de Grubbs, com $\alpha = 5\%$. Os valores tidos como *outliers* foram desconsiderados dos cálculos.

2.1.3. CURSO TEMPORAL DE ATIVIDADE FOSFATÁSICA NO BIOFILME

Para a determinação da atividade fosfatásica neutra extracelular dos isolados, foi feito um ensaio de fosfatase no biofilme, em um curso temporal de até cinco horas. As bactérias previamente crescidas em ágar BHI foram inoculadas em caldo BHI até uma densidade de 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) (ANVISA, 2008). Desse modo, obtemos aproximadamente a mesma quantidade de bactérias no início do procedimento, evitando que os diferentes resultados estejam relacionados apenas com a quantidade inicial de bactérias.

Para a realização do teste, 200 μ L dessa suspensão foram inoculados em triplicata em placas de plástico de 96 poços estéreis e foram incubadas a 37°C por uma, duas, três, quatro e cinco horas cada placa, com agitação de 100 rpm. Além disso, na

mesma placa a mesma suspensão foi inoculada em quintuplicata a fim de se analisar o desenvolvimento do biofilme durante aquele tempo de incubação.

Após a incubação a 37°C, as placas foram lavadas com tampão HEPES 0,1 M e nos poços respectivos à análise de fosfatase, foi adicionado uma solução contendo *para*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP) 5 mM em tampão HEPES 0,1 M pH7,0, um substrato artificial para a enzima, que ao ser defosforilado irá formar *para*-nitrofenol (*p*-NP). O *p*-NP possui coloração amarela, e será quantificado por espectrofotometria ao final do processo.

Após uma hora de reação, 100 µL do sobrenadante de cada poço analisado foi aliquoteado para outra placa de 96 poços, nos quais previamente foram aliquoteados 200µL de hidróxido de sódio (NaOH) 1 M. Isso causa uma elevação drástica no pH, que não estará mais no ponto ótimo de atuação da enzima, parando a reação de eventuais enzimas transferidas e deixando o *p*-NP mais amarelado. O resultado da reação foi analisado por espectrofotômetro ($\lambda = 405 \text{ nm}$), e quanto maior a absorbância observada maior foi a produção de *p*-NP e, portanto, maior a atividade fosfatásica neutra extracelular daquele isolado. A atividade enzimática foi determinada com curva-padrão de *p*-NP (DOS SANTOS *et al*, 2012)

Os poços que continham as amostras em quintuplicata, respectivas ao acompanhamento do biofilme, foram lavados com água destilada para retirar as bactérias em suspensão e o meio de cultura. Após, foi utilizado o mesmo método de revelação do biofilme descrito na seção 1.6.2. Dessa forma, foi possível avaliar a atividade da enzima nos estágios iniciais de formação de biofilme.

Duas variantes desse método foram utilizadas para quantificar a atividade fosfatásica neutra extracelular das bactérias em biofilme crescido por 24 horas com 1 e 2 horas de reação, e em suspensão. O substrato artificial utilizado, a solução tampão e solução de parada da reação foram iguais ao protocolo descrito anteriormente. Os isolados usados nesses últimos testes foram escolhidos aleatoriamente dentre os isolados fortes produtores de biofilme, moderados e fracos, de forma a testar o mesmo número de isolados de cada classe de intensidade de produção.

2.2. RESULTADOS

A partir das bactérias disponibilizadas foi possível analisar 53 isolados (Tabela 1), a partir dos quais 35 foram classificadas como de interesse e utilizadas nos demais testes.

Os isolados que obtiveram um resultado negativo em alguns desses testes não foram avaliadas quanto a capacidade de produção de biofilme ou atividade fosfatásica. Os isolados V9, V10 e V29 não obtiveram crescimento em ágar BHI, não sendo possível utilizá-los nos testes realizados. Os isolados positivos apresentaram grande crescimento em ágar manitol salgado, demonstrando alta resistência a salinidade, uma vez que o meio possui 7,5 % m/v de cloreto de sódio. Além disso, tais isolados apresentaram uma coloração amarela após incubação de 24 horas, confirmando sua capacidade de fermentar o D-manitol.

Alguns isolados não foram capazes de acidificar o meio (Figura 3), mantendo sua coloração avermelhada, outros não apresentaram crescimento nesse meio, mesmo crescendo em ágar BHI, indicando a não resistência a alta salinidade. Os isolados negativos para esse teste provavelmente não pertencem ao gênero *Staphylococcus*, uma vez que o teste é seletivo para esse gênero.

Segundo a análise mediante inoculação em ágar Baird-Parker, dentre os isolados obtidos de alimentos, apenas BP3B é da espécie *Staphylococcus aureus* (Figura 4), o que é surpreendente, uma vez que o teste da DNase, que também é usado para identificar *Staphylococcus aureus* mostrou resultados positivos para todas os isolados testados (Figura 5).

O teste de Gram (Figura 6) confirmou a identificação de alguns isolados de *Staphylococcus* e refutou outras, que tinham formato de bastão, ou cocos Gram-positivos que não possuíam arranjo em forma de cacho de uva. A proporção de isolados de interesse (positivos para os testes descritos anteriormente) foi maior que os não desejados, dando uma boa perspectiva para o trabalho. Todos os isolados eram Gram-positivos, alguns com arranjo estafilocócico e outros apenas apresentando cocos.

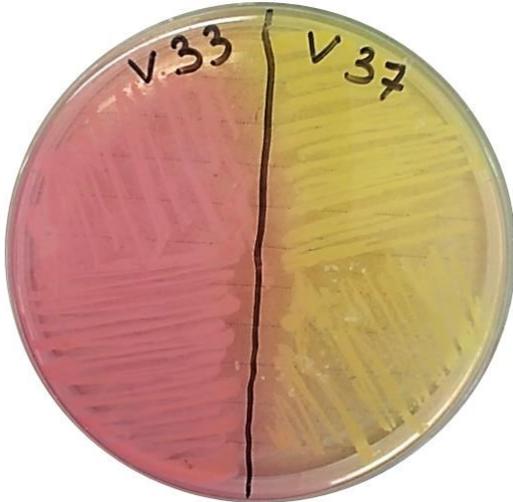
Tabela 1 – Aspectos fenotípicos dos isolados testados para a seleção de *Staphylococcus coagulase* positivos (SCP)

Isolados	Fermentação do Manitol	Resistência a salinidade	Redução do telureto	Ação da lecitinase	Ação da DNase	Análise morfotintorial	Capacidade de coagulação em tubo
BP1A	+	+	+	-	+	EGP	+
BP2A	+	+	+	-	+	EGP	+
BP2B	+	+	+	-	+	EGP	+
BP3A	+	+	+	+	+	EGP	+
BP3B	+	+	+	-	+	EGP	+
BP6A	--	+	+	-	n. t.	CGP	n. t.
BP6B	-	+	+	-	n. t.	n. t.	n. t.
BP9A	n. t.	+	+	-	n. t.	CGP	n. t.
BP9B	n. t.	--	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.
BP10A	+	+	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.
BP10B	+	+	+	-	+	EGP	+
BP11A	+	+	+	-	+	EGP	+
BP11B	+	+	+	-	+	EGP	+
BP12A	n. t.	-	+	-	+	EGP	+
BP12B	+	+	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.
BP14A	n. t.	-	+	-	+	EGP	+
BP15A	+	+	+	-	n. t.	BGP	n. t.
BP16A	+	+	+	-	+	EGP	+
BP16B	+	+	+	-	+	EGP	+
V1	n. t.	-	+	-	+	EGP	+
V2	+	+	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.
V3	-+	+	+	n. t.	+	EGP	+
V4	+	+	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.
V5	+	+	+	n. t.	+	EGP	+
V6	n. t.	+	+	n. t.	+	EGP	+
V8	n. t.	n. t.	+	n. t.	+	EGP	+
V9	+	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.
V10	+	+	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.
V11		+	+	-	+	EGP	+
V14			+	-	+	EGP	+

Isolados	Fermentação do Manitol	Resistência a salinidade	Redução do telureto	Ação da lecitinase	Ação da DNase	Análise morfolotintorial	Capacidade de coagulação em tubo
V16	+	+	+	-	+	EGP	+
V19	+	+	+	n. t.	+	EGP	+
V21	+	+	+	n. t.	+	EGP	+
V24	n. t.	-	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.
V25	+	+	+	n. t.	+	EGP	-
V26	+	+	+	n. t.	+	CGP	n. t.
V29	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.
V31	-+	+	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.
V32	--+	+	+	n. t.	+	EGP	+
V33	+	+	+	+	n. t.	n. t.	n. t.
V34	+	+	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.
V35	+	+	+	-	+	EGP	+
V37	+	+	+	-	+	EGP	+
V38	-+	+	+	n. t.	+	EGP	+
V39	+	+	+	-	+	EGP	+
V40	+	+	+	-	+	EGP	+
V41	-+	+	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.
V43	+	+	+	n. t.	+	EGP	+
V44		+	+	n. t.	+	EGP	+
V45		+	+	n. t.	+	EGP	+
V46		+	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.
V47		+	+	n. t.	+	EGP	+
V48		+	+	n. t.	+	EGP	n. t.

A nomenclatura “BP” e “V” são providas da identificação desses isolados em trabalhos anteriores, não relativas com quaisquer diferenças ou semelhanças entre os dois grupos. n. t. = isolado não foi testado para o respectivo método por não ter apresentado resultado desejado em algum teste anterior; EGP = Estafilococos Gram-positivos. CGP = cocos Gram-positivos; BGP = bacilos Gram-positivos; “+” e “-“ = positivos e negativos, respectivamente.

Figura 3 – Resultado de dois isolados após inoculação em ágar manitol salgado



Após incubação de 24h à 37°C podemos observar um resultado positivo (direita, isolado V37) e um resultado negativo (esquerda, isolado V33) para a utilização do D-manitol

Figura 4 – Resultado do isolado BP3B em ágar Baird-Parker



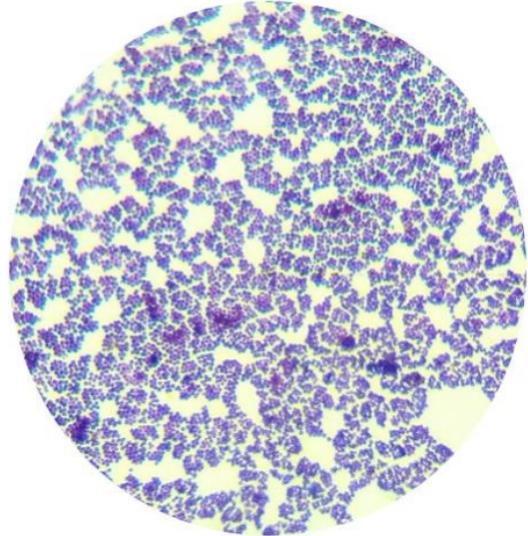
Após incubação por 24h à 37°C é possível observar colônias de centro escuro com halo translúcido.

Figura 5 – Resultado da inoculação do isolado V21 em ágar DNase



Após incubação por 24h à 37°C é possível observar o halo translúcido no inóculo, respectivo a degradação do DNA do meio pela DNase bacteriana.

Figura 6 – Fotomicrografia da análise do teste de Gram do isolado V21



A fotomicrografia demonstra cocos Gram-positivos agrupados em formato de cachos de uva, correspondente ao gênero *Staphylococcus*.

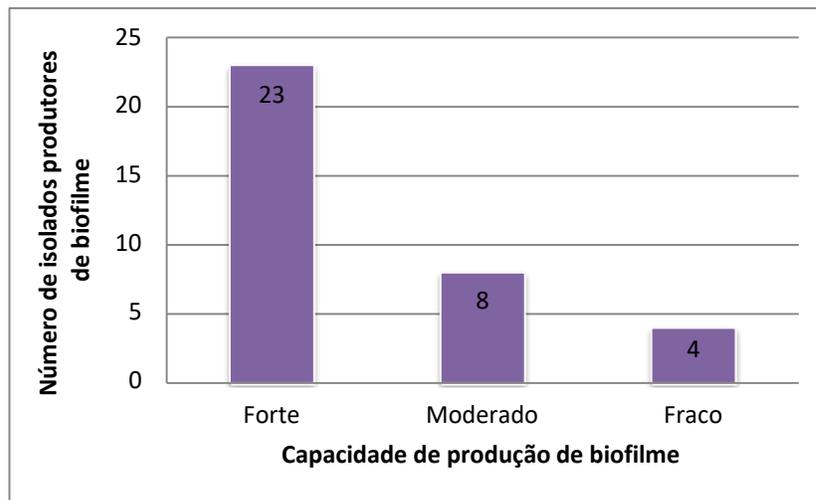
Após a análise da capacidade de formação de biofilme (Figuras 7 e 8) podemos verificar que mais de 60% dos isolados são fortes produtores de biofilme, característica muitas vezes relacionada com a espécie *Staphylococcus aureus*. Por outro lado, uma minoria foi classificada como produtora moderada ou fraca de biofilme.

Figura 7 – Biofilme produzido em placa de 96 poços em quintuplicata



Após a coloração com cristal violeta e lavagem com água destilada é possível observar a malha do biofilme macroscopicamente, evidenciada pelo cristal violeta antes de ser solubilizado

Figura 8 – Relação geral da capacidade de produção de biofilme dos isolados testados



Classificação dos isolados nas três categorias pré-definidas de acordo com a quantidade de vezes em que a absorbância média obtida foi maior do que a absorbância média obtida do branco (absorbância do isolado 0 a 1 vez maior que a absorbância do branco experimental = não produtor de biofilme; absorbância 1 a 2 vezes maior que abs. do branco experimental = fraco produtor de biofilme; abs. 2 a 4 vezes maior que a abs. do br. exp. = moderado produtor de biofilme; pelo menos 4 vezes a abs. do br. exp. = forte produtor de biofilme)

Todas as culturas foram capazes de produzir biofilme em diferentes intensidades, como esperado. Em contrapartida, o número de bactérias forte produtoras de biofilme (66%) foi maior que as fracas produtoras (23%) e as moderadas produtoras (11%).

A atividade fosfatásica observada no curso temporal (Figuras 9 e 11) foi crescente com o passar das horas, e diferente entre as espécies. As duas cepas de *Staphylococcus aureus* utilizadas demonstraram uma atividade da enzima cerca de 14 vezes maior que a apresentada pelo *Staphylococcus epidermidis* após 5 horas de incubação.

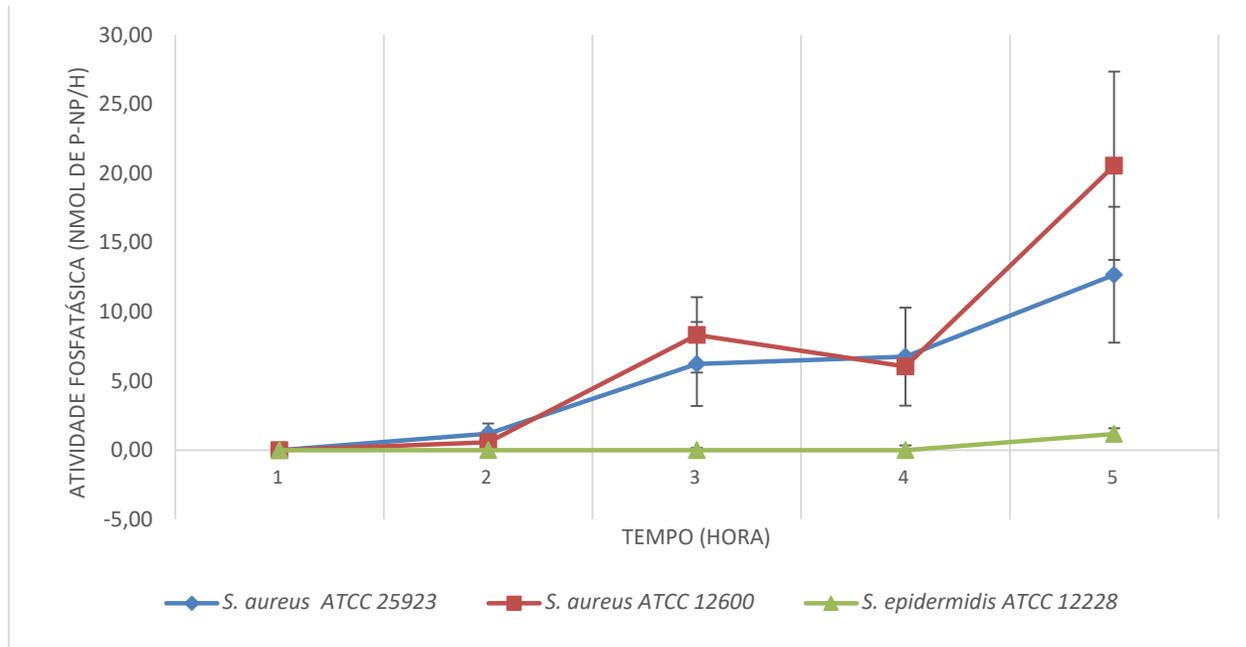
O crescimento do biofilme acompanhado durante o curso temporal (Figura 10) demonstrou-se estável em todo o experimento, sugerindo que mudanças significativas na formação do biofilme podem ser observadas apenas em tempos maiores que cinco horas.

As cepas comerciais testadas no curso temporal são classificadas como produtoras moderadas de biofilme, produzindo uma absorbância média de 2 a 3 vezes maiores que os brancos experimentais, não podendo ser diferenciadas entre si.

Os isolados V5, V6, V8, V16, V32, V48, BP1A, BP11A, BP11B e BP12A foram testados quanto sua atividade fosfatásica neutra extracelular em biofilme de 24 horas, mas não obtiveram resultados detectáveis pela técnica. O mesmo protocolo foi reproduzido com o dobro do tempo de atividade enzimática utilizando os isolados V1, V5, V26, V32, V37, V48 e BP10B, que também não tiveram atividade detectável. As atividades detectáveis foram apenas de BP2A e BP3B, que obtiveram uma atividade 400x e 10x menor que o controle *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

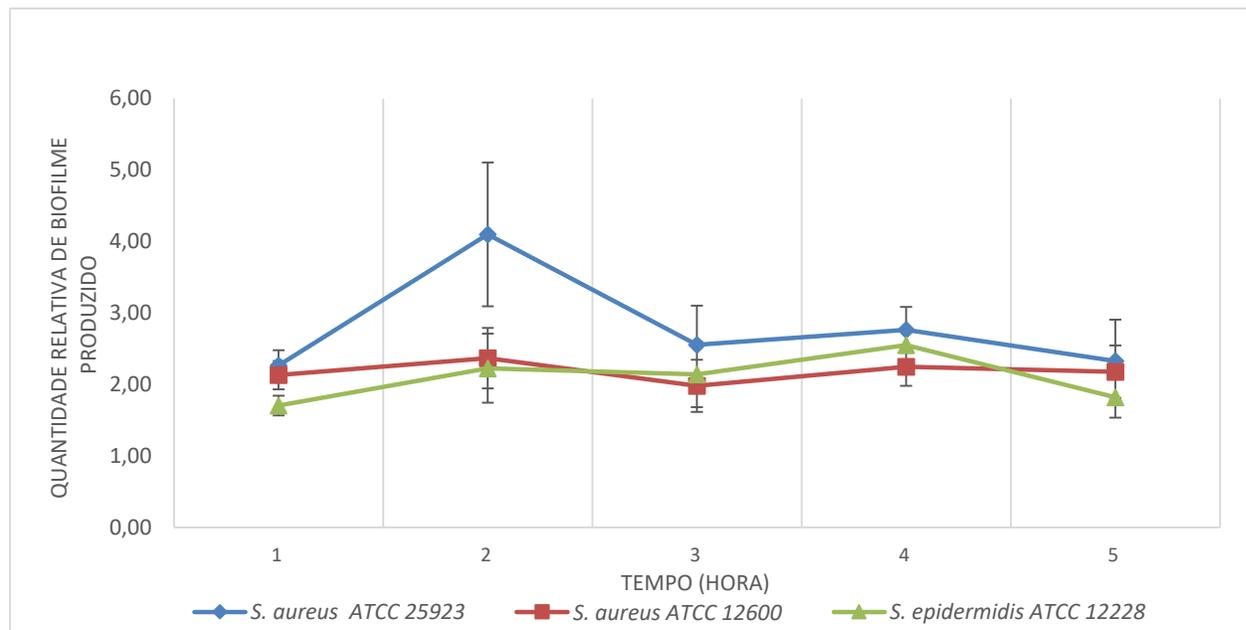
A atividade fosfatásica neutra extracelular de alguns isolados foi, também, testada em suspensão, sem crescimento do biofilme, porém os isolados V1, V3, V5, V6, V8, V11, V16, V26, BP3A, BP11A e BP14A não tiveram atividade detectável para o método utilizado. Apenas a atividade das cepas comerciais *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e 12600 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 foi detectável, com média \pm erro padrão de $12,3 \pm 0,9$, $5,8 \pm 2,4$ e $20,8 \pm 9,3$, nmol de *p*-NP/h produzidos respectivamente ($n = 2$). Para esses experimentos apenas os isolados citados foram testados.

Figura 9 – Atividade fosfatásica neutra extracelular observada após a formação do biofilme



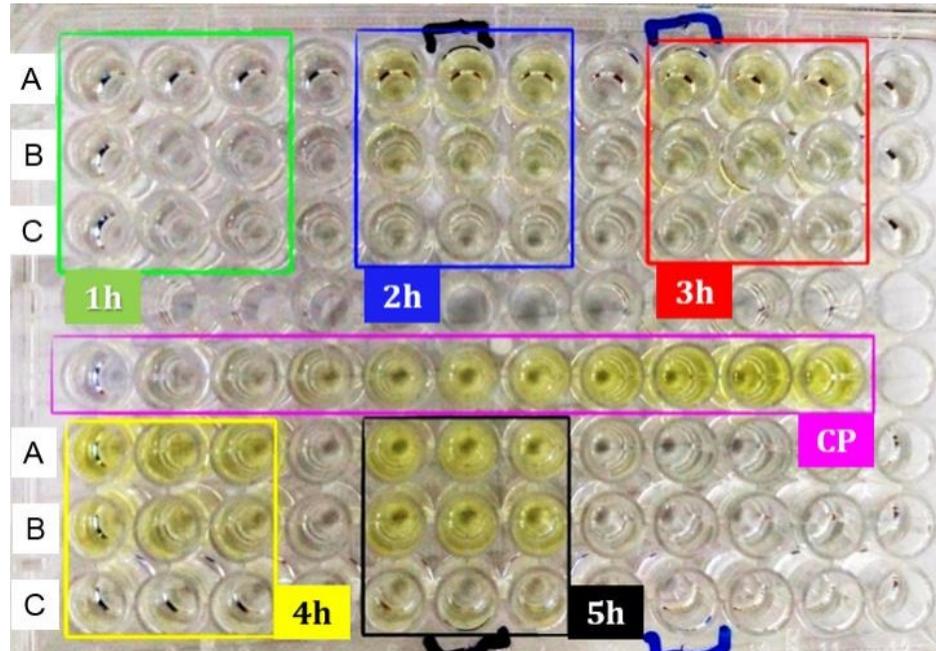
Atividade fosfatásica neutra extracelular de biofilmes de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* obtidos em 4 experimentos. Erro padrão indicado na imagem.

Figura 10 – Desenvolvimento do biofilme durante o curso temporal



Produção de biofilme pelas cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e 12600 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 quantificados com intervalos de um hora e tempo máximo de cinco horas em 4 experimentos distintos. Erro padrão indicado na imagem.

Figura 11 – Atividade fosfatásica após 1 h de reação nos 5 pontos de análise



Após as 5 horas de análise, a quantidade de produto pode ser observada pela intensidade da cor durante os pontos de 1 hora (caixa verde), 2 h (caixa azul), 3 h (caixa vermelha), 4 h (caixa amarela) e 5 h (caixa preta), e curva padrão de *p*-NP (CP, caixa roxa). As cepas foram analisadas em triplicata ($n = 4$), sendo distribuídas em colunas, e as linhas A correspondem a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, as linhas B correspondem a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 e as linhas C correspondem a cepa *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. O poço imediatamente a direita de cada triplicata, em cada tempo, corresponde ao branco experimental da cepa em questão (indicada de acordo com as linhas)

2.3. DISCUSSÃO

A partir dos isolados de alimentos, podemos observar a presença de *Staphylococcus* coagulase positivos em alimentos cárneos salgados em circulação no Rio de Janeiro. Na área médica, apesar dessas bactérias não apresentarem perigo na maioria dos casos, uma lesão na pele pode acarretar em uma infecção oportunista, mediada por esses microrganismos. Da mesma forma, pacientes hospitalizados que venham a entrar em contato com essas bactérias também podem sofrer com infecções, que podem ser difíceis de combater, uma vez que a grande maioria dos *Staphylococcus spp.* é capaz de produzir biofilme.

Essas bactérias também têm grande importância na área de alimentos, uma vez que a sua presença em queijos e carnes salgadas é comum, como observado. Como esses produtos são muito consumidos durante todo o ano, é de extrema importância garantir que não haja uma grande quantidade de *Staphylococcus* nesses alimentos, seguindo os padrões determinados pela resolução 12 da ANVISA (2001). O consumo de carnes mal refrigeradas pode, por exemplo, facilitar a proliferação desses microrganismos e causar intoxicação alimentar após sua ingestão. Essa intoxicação alimentar pode estar tanto relacionada a ingestão dos microrganismos quanto a ingestão das toxinas produzidas por eles (KADARIYA *et al*, 2014), e os sintomas geralmente desaparecem após dois dias. Portanto, a presença dessas bactérias em alimentos distribuídos em mercados do estado do Rio de Janeiro é preocupante e requer vigilância constante.

Através da coloração de Gram pudemos sustentar a identificação do gênero dessas bactérias, além de verificar a presença de contaminantes em algumas amostras criopreservadas. O teste da coagulase nos permitiu diferenciar os SCN dos SCP, sendo esses últimos utilizados nos demais testes. A análise em ágar Baird-Parker identificou apenas um isolado como *S. aureus* (BP3B), diferente do esperado, que seria uma maior quantidade de isolados pertencentes a espécie *S. aureus*. Em um estudo feito por Mello *et al* (2014) de 121 isolados, provindos de alimentos, profissionais que manuseiam esses alimentos e equipamentos, foram encontrados 16 SCP e apenas um *S. aureus*, isolado do nariz de um dos profissionais. Apenas SCN foram isolados de amostras de

alimentos, resultado contrastante com o obtido nesse trabalho, onde 32 isolados de alimentos foram identificados como SCP.

A maioria desses microrganismos é capaz de formar biofilme de maneira forte, munindo a bactéria com uma proteção importante contra antibióticos e as células do sistema imune do hospedeiro. Contudo, uma minoria se mostrou produtora moderada ou fraca de biofilme, fato que também gera preocupações quanto a viabilidade daquele alimento, uma vez que essas bactérias também são capazes de causar intoxicação alimentar.

Tal resultado foi diferente do obtido por Antunes *et al.* (2011), aonde 82 isolados de *Staphylococcus* coagulase positivos e negativos foram testados quanto a produção de biofilme utilizando o mesmo método abordado nesse trabalho. No estudo, a única espécie de SCP presente foi *S. aureus*, e dentre os 20 isolados testados, 5% (1) era forte produtor de biofilme, 10% (2) eram moderados produtores de biofilme, 50% (10) eram fracos produtores de biofilme e 35% (7) não eram produtores de biofilme. Todavia, Darwish e Asfour (2013) obtiveram um resultado semelhante ao obtido nesse trabalho, onde de 40 *S. aureus* 52,5% foram fortes, 27,5% moderados e 20% fracos produtores de biofilme, também apresentando uma maioria forte e quantidades semelhantes de moderados e fracos produtores de biofilme.

Apesar de nos estágios iniciais de formação do biofilme a Eap se ancorar à uma fosfatase, e essa enzima não perder sua capacidade catalítica mesmo após a ligação, a maioria das bactérias isoladas de alimentos que foram analisadas não possuíam uma atividade fosfatásica neutra extracelular detectável aos métodos utilizados. Tal resultado pode ter sido consequência da utilização de um método que não possui a sensibilidade necessária para a detecção dessa atividade enzimática. Caso tal premissa seja verdadeira, é necessária a elaboração de um método confiável, reprodutível e sensível para analisar esses microrganismos.

Flock e Flock (2001) analisaram a atividade fosfatásica de *S. aureus* utilizando o mesmo substrato artificial e a mesma densidade ótica de leitura, obtendo resultados detectáveis em seus experimentos. Porém, os autores incubaram a bactéria em uma solução com enzimas fosfatases neutras (10 µg/mL) antes de iniciar a reação. Essa incubação pode ter inserido algumas fosfatases na parede bacteriana, fazendo com que

a quantidade de enzimas no sistema seja maior do que o encontrado naturalmente. Tal fato pode ser apoiado pela ausência de atividade detectável em todos os isolados analisados.

As cepas comerciais de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* tiveram atividade fosfatásica neutra extracelular detectável, inclusive nos testes em suspensão, sem o desenvolvimento prévio de biofilme. Portanto, é necessário verificar se a atividade detectada nos demais testes foi consequência de uma fosfatase bacteriana relacionada com a produção de biofilme exclusivamente ou em conjunto com fosfatases não relacionadas com o biofilme. Para isso, seria possível realizar testes que avaliem a atividade fosfatásica de células em suspensão, concomitantemente à análise de células aderidas, sob as mesmas condições de crescimento e tempo de incubação. A comparação entre a atividade poderia indicar se no contexto do biofilme há a participação dessa enzima ligada a Eap e não ligada a Eap.

Além disso, o protocolo utilizado não garante que as enzimas ativas estejam ligadas à Eap, sendo interessante avaliar também se dentro do biofilme essas enzimas estão mais ativas quando ligadas ou não à essa proteína. Portanto, poderia ser desenvolvido um método de comparação entre a atividade fosfatásica neutra extracelular em um biofilme que possua Eap e um biofilme produzido sem essa proteína, silenciando o gene responsável por sua produção ou secreção na bactéria.

O substrato utilizado nos permite garantir que sua conversão em produto seja feita apenas por enzimas extracelulares, uma vez que essa molécula não é permeável à membrana celular. Porém, para garantir que não haja alguma forma de internalização do *p*-NPP, seria interessante avaliar visualmente a atividade enzimática. Tal método pode consistir na utilização de um substrato como o metil-umbeliferona-fosfato que, quando convertido a produto, se deposita e emite fluorescência. Dessa forma, seria possível avaliar se a atividade enzimática é igual para todo o biofilme, ou se há nichos com maior atividade que outros.

Nas condições analisadas, a fosfatase neutra extracelular não se mostrou essencial para a produção de biofilme, mesmo em produtoras moderadas e fracas do mesmo. Contudo, a atividade observada em cepas comerciais foi facilmente detectável, sugerindo que a fonte desses microrganismos seja importante para essa atividade. É

provável que os isolados provindos de presentes em alimentos não sejam dependentes dessa atividade para a formação de seu biofilme, e nem beneficiadas com a mesma, diferente das cepas comerciais, que são isolados clínicos (ATCC, 2014).

Os isolados comerciais, ainda, apresentaram uma diferença de atividade fosfatásica entre as espécies. Como os *S. aureus* são conhecidos por produzirem biofilmes perigosos e difíceis de remediar, e essa espécie também foi a que apresentou a maior atividade fosfatásica, talvez essa enzima esteja envolvida na potencialização da produção de biofilme. Porém, o protocolo utilizado não é o adequado para confirmar ou refutar tal hipótese. Seria necessário avaliar diversas cepas de *Staphylococcus*, de diversas espécies, para verificar se há, de fato, diferença interespecífica.

3. CONCLUSÃO

Os *Staphylococcus* estão presentes no dia-a-dia de toda a população. A sua presença em alimentos cárneos salgados e queijos na cidade do Rio de Janeiro nos mostram o quanto devemos ter cuidado com a viabilidade desses alimentos. A quantidade de SCP encontrados é surpreendente, visto que em outros estudos nenhum ou poucos isolados são SCP. Apenas a fervura de carne contaminada pode não ser suficiente para evitar uma intoxicação alimentar. Assim como muitas medidas profiláticas em hospitais não são o suficiente para evitar a formação de biofilme em instrumentos cirúrgicos.

Os isolados trabalhados são *Staphylococcus* coagulase positivos, devido ao seu crescimento ótimo em ágar manitol salgado, morfologia e coloração característica pelo teste de Gram e aparência típica das colônias, lisas, convexas, com bordas delimitadas e coloração branca a amarelada.

Nesse trabalho foi possível estabelecer uma diferença marcante entre a atividade fosfatásica das cepas comerciais isoladas de pacientes e os isolados provindos de alimentos. Além disso, foi possível verificar que grande parte dos *Staphylococcus* presentes em alimentos é capaz de produzir biofilme fortemente, o que gera uma preocupação extra principalmente em alimentos embalados com plástico, como peças de carne, queijos e linguiças.

Contudo, não foi possível determinar se essa atividade pode variar de acordo com a espécie de *Staphylococcus*. Nos testes realizados foi possível detectar uma diferença entre a atividade fosfatásica de *S. aureus* e *S. epidermidis*, mas é necessário realizar um *screening* mais abrangente, com mais espécies e mais cepas, para verificar tal hipótese.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM N. M., JEFFERSON K. K. *Staphylococcus aureus* clumping factor B mediates biofilm formation in the absence of calcium. **Microbiology**, vol158, 1504–1512, 2012.
- ALLEN, R. C., POPAT, R., DIGGLE, S. P., BROWN, S. P. Targeting virulence: can we make evolution-proof drugs? **Nature reviews in Microbiology**, vol12, n4, 300-308, 2014.
- ANDERSON, G. G., O'TOOLE, G. A. Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. In: **Bacterial Biofilms**. Springer Berlin Heidelberg, vol322, 85-105, 2008.
- ANTUNES, A. L. S., BONFANTI, J. W., PEREZ, L. R. R., PINTO, C. C. F., FREITAS, A. L. P., MACEDO, A. J., BARTH, A. L. High vancomycin resistance among biofilms produced by *Staphylococcus* species isolated from central venous catheters. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol106, n1, 51-55, 2011.
- ANVISA. Módulo 5: Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos, 2008. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo5/interpretacao3.htm>. Acesso em: 03/01/2016.
- _____. Resolução RDC nº12 de 02 de Janeiro de 2001. Disponível em: <portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 03/01/2016.
- ARCHER, S. K., INCHAUTEGUI, D., QUEIROZ, R., CLAYTON, C. The Cell Cycle Regulated Transcriptome of *Trypanosoma brucei*. **PlosOne**, vol6, n3, 2011.
- ARGUDÍN, M. A., MENDOZA, M. C., RODICIO, M. R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Toxins**, vol2, n7, 1751–1773, 2010
- ARTINI M., PAPA R., SCOARUGHI G. L., GALANO E., BARBATO G., PUCCI P., SELAN, L. Comparison of the action of different proteases on virulence properties related to the staphylococcal surface. **Journal of Applied Microbiology**, vol114, 266–277, 2013.
- ATCC. *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach, 2014. Disponível em: <www.atcc.org/products/all/12600.aspx>. Acesso em: 03/01/2016.
- _____. *Staphylococcus aureus*, 2014. Disponível em: <www.atcc.org/Products/All/25923.aspx>. Acesso em : 03/01/2016.

_____. *Staphylococcus epidermidis*, 2014. Disponível em: <www.atcc.org/Products/All/12228.aspx#generalinformation>. Acesso em: 03/01/2016.

AUNG, M. S., ZI, H., NWE, M. K., MAW, W. W., AUNG, C. T. MIN, W. W., NYEIN, N., KAWAGUCHIYA, M., URUSHIBARA, N., SUMI, A., KOBAYASHI, N. Drug resistance and genetic characteristics of clinical isolates of staphylococci in Myanmar: high prevalence of PVL among methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* belonging to various sequence types. **New Microbes and New Infections**, vol10, 2015.

BALABAN, N., RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, vol61, n1, 1– 10, 2000.

BLAIOTTA, G., FUSCO, V., ERCOLINI, D., PEPE, O., COPPOLA, S. Diversity of *Staphylococcus* Species Strains Based on Partial kat (Catalase) Gene Sequences and Design of a PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Assay for Identification and Differentiation of Coagulase-Positive Species (*S. aureus*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, and *S. schleiferi* subsp. *coagulans*). **Journal of Clinical Microbiology**, vol8, n1, 192-201, 2009.

BOLES, B. R., HORSWILL, A. R. agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. **PLoS Pathogens**, vol4, 2008.

BORGES, J. T. S., FREITAS, A. S. Aplicação do sistema Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) no processamento de carne bovina fresca. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, vol20, n1, 1-18, 2002.

BRASIL, Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento. Decreto nº 6.296, de 11 de Dezembro de 2007.

_____. Ministério de Estado da Agricultura, pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 51, de 18 de Setembro de 2002.

BROOKS, J. L., JEFFERSON, K. K. Phase variation of poly-N-acetylglucosamine expression in *Staphylococcus aureus*. **PLoS Pathogens**, vol10, 2014.

CHAIBENJAWONG, P., FOSTER, S. J. Desiccation tolerance in *Staphylococcus aureus*. **Archives of Microbiology**, vol193, n2, 125–135, 2011.

CHATTERJEE, S., MAITI, P., DEY, R., KUNDU, A., DEY, R. Biofilms on indwelling urologic devices: microbes and antimicrobial management prospect. **Annals of Medical and Health Sciences Research**, vol4, 100–10, 2014.

CHOKR, A., WATIER, D., ELEAUME, H., PANGON, B., GHASSIA, J. C., MACK, D., JABBOURI, S. Correlation between biofilm formation and production of polysaccharide intercellular adhesin in clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. **International Journal of Medical Microbiology**, vol296, 381–388, 2006.

CONLON, B. P., NAKAYASU, E. D., FLECK, L. E., La FLEUR, V. M., ISABELLA, M., COLEMAN, K., LEONARD, S. N., SMITH, R. D., ADKINS, J. N., LEWIS, K. Activated ClpP kills persisters and eradicates a chronic biofilm infection. **Nature**, vol503, 365-370, 2013.

COSTERTON, J.W. LEWANDOWSKI, Z., DEBEER, D., CALDWELL, D., KORBER, D., JAMES, G. Biofilms, the customized microniche. **Journal of Bacteriology**, vol176, 2137–2142, 1994.

_____, J.W., STEWART, P. S., GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, vol284, 1318-1322, 1999.

CUE D., LEI M. G., LEE C. Y. Genetic regulation of the intercellular adhesion locus in staphylococci. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, vol2, 38, 2012.

DALL'ANTONIA M., COEN P. G., WILKS M., WHILEY A., MILLAR M. Competition between methicillin-sensitive and resistant *Staphylococcus aureus* in the anterior nares. **Journal of Hospital Infection**, vol61, 62–67, 2005.

DAMACENO, Q., NICOLI, J. R., OLIVEIRA, A. Variability of cutaneous and nasal population levels between patients colonized and infected by multidrug-resistant bacteria in two Brazilian intensive care units. **SAGE open medicine**, 2015. Disponível online:

<www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4679221/pdf/10.1177_2050312114566668.pdf>. Acesso em: 03/01/2016.

DAROUICHE, R. O. Treatment of infections associated with surgical implants. **The New England Journal of Medicine**, vol350, n14, 1422-1429, 2004.

DARWISH, S. F., ASFOUR, H. A., Investigation of biofilm forming ability in Staphylococci causing bovine mastitis using phenotypic and genotypic assays. **The Scientific World Journal**, vol2013, 2013.

de la FUENTE-NUNEZ, C., REFFUVEILLE, F., FERNANDEZ, L., HANCOCK, R. E. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. **Current Opinion in Microbiology**, vol16, 580–589, 2013.

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, vol8, 881–890, 2002.

DOS SANTOS, A. L. A., DICK, C. F., ALVES-BEZERRA, M., SILVEIRA, T. S., PAES, L. S., GONDIM, K. C., MEYER-FERNANDES, J. R. Interaction between *Trypanosoma rangeli* and the *Rhodnius prolixus* salivary gland depends on the phosphotyrosine ecto-phosphatase activity of the parasite. **International Journal for Parasitology**, vol42, 819- 827, 2012.

EBERT, T., SMITH, S., PANCARI, G., WU, X., ZORMAN, J., CLARK, D., COOK, J., BURNS, C., ANTONELLO, J. M., COPE, L., NAGY, E., MEINKE, A., McNEELY, T. Development of a rat central venous catheter model for evaluation of vaccines to prevent *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* early biofilms. **Human Vaccines**, vol7, n6, 630-638, 2011.

ELLIS, M. W., SCHLETT, C. D., MILLAR, E. V., CRAWFORD, K. B., CUI, T, LANIER, J. B., TRIBBLE, D. R. Prevalence of nasal colonization and strain concordance in patients with community-associated *Staphylococcus aureus* skin and soft-tissue infections. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, vol35, 1251–1256, 2014.

EUZEBY, J. P. List of prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN). Disponível em: <www.bacterio.net/staphylococcus.html>. Acesso em: 03/01/2016

FLOCK, M., FLOCK, J. I. Rebinding of Extracellular Adherence Protein Eap to *Staphylococcus aureus* can occur through a surface-bound neutral phosphatase. **Journal of bacteriology**, vol183, n13, 3999-4003, 2001.

FOSTER, T. J., GEOGHEGAN, J. A., GANESH, V. K., HOOK, M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Microbiology**, vol12, 49–62, 2014.

FOULSTON, L., ELSHOLZ, A. K., DEFRANCESCO, A. S., LOSICK, R. The extracellular matrix of *Staphylococcus aureus* biofilms comprises cytoplasmic proteins that associate with the cell surface in response to decreasing pH. **mBio**, vol5, e01667–e01614, 2014.

FRANÇOIS, P., VAUDAUX P., FOSTER, T. J., LEW, D. P. Host-bacteria interactions in foreign body infections. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, vol17, 514–520, 1996.

GANESHNARAYAN, K., SHAH, S. M., LIBERA, M. R., SANTOSTEFANO, A., KAPLAN, J. B. Poly-N-acetylglucosamine matrix polysaccharide impedes fluid convection and transport of the cationic surfactant cetylpyridinium chloride through bacterial biofilms. **Applied Environmental Microbiology**, vol75, 1308–1314, 2009.

GARCIA, L. S. Clinical microbiology procedures handbook, 3ª edição, Washington, DC: The American Society for Microbiology, 1459-1462, 2010.

GÖTZ, F. *Staphylococcus* and biofilms. **Molecular Microbiology**, vol43, n6, 1367–1378, 2002.

GRIMBLE, S. A., MAGEE, T. R., GALLAND, R. B. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in patients undergoing major amputation. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**, vol22, 215–218, 2001.

HEILMANN, C., HUSSAIN, M., PETERS, G., GOTZ, F. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. **Molecular Microbiology**. vol24, 1013–1024, 1997.

_____, SCHWEITZER, O., GERKE, C., VANITTANAKOM, N., MACK, D. e GÖTZ, F. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. **Molecular Microbiology**, vol20, n5 1083–1091, 1996.

HENNEKINNE, J.-A., DEBUYSER, M.-L., DRAGACCI, S., *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Reviews**, vol36, 815–836, 2012.

HENNIG, S., NYUNT, W. S., ZIEBUHR, W. Spontaneous switch to PIA-independent biofilm formation in an *ica*-positive *Staphylococcus epidermidis* isolate. **International Journal of Medical Microbiology**, vol297, 117–122, 2007.

HOCHBAUM, A. I., KOLODKIN-GAL, I., FOULSTON, L., KOLTER, R., AIZENBERG, J., LOSICK, R. Inhibitory effects of D-amino acids on *Staphylococcus aureus* biofilm development. **Journal of Bacteriology**, vol193, 5616–5622, 2011.

HOUSTON, P., ROWE, S. E., POZZI, C., WATERS, E. M., O'GARA, J. P. Essential role for the major autolysin in the fibronectin-binding protein-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype. **Infection and Immunity**, vol79, 1153–1165, 2011.

HUNTER, T. The role of tyrosine phosphorylation in cell growth and disease. **Harvey Lectures**, vol94, 81–119, 1998.

HUSSIAN, M., HAGGAR, A., PETERS, G., CHHATWAL, G. S., HERRMANN, M., HERRMANN, M., FLOCK, J.-I., SINHA, B. More than one tandem repeat domain of the extracellular adherence protein of *Staphylococcus aureus* is required for aggregation, adherence, and host cell invasion but not for leukocyte activation. **Infection and immunity**, vol76, n12, 5615-5623, 2008.

IBRAHIM, S. O. B. Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* among Hospital Personnel In National Ribat Hospital-Khartoum-Sudan. 2015, Tese (Doutorado em Microbiologia), University of Khartoum, Sudão.

IWATSUKI, K., YAMASAKI, O., MORIZANE, S., OONO, T. Staphylococcal cutaneous infections: invasion, evasion and aggression. **Journal of Dermatological Science**, vol42, n3, 203-14, 2006

JOO, H., CHAN, J. L., CHEUNG, G. Y. C., OTTO, M. Subinhibitory concentrations of protein synthesis-inhibiting antibiotics promote increased expression of the *agr* virulence regulator and production of phenol-soluble modulins and cytolysins in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, vol54, 4942–4944, 2010.

JOSEPH, B., OTTA, S. K., KARUNAGASAR, I., KARINAGASAR, I. Biofilm formation by *Salmonella spp.* on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, vol64, 367–372, 2001.

JOYCE, J. G., ABEYGUNAWARDANA, C., XU, Q., COOK, J. C., HEPLER, R., PRZYSIECKI, C. T., GRIMM, K. M., ROPER, K., IP, C. C., COPE, L., MONTGOMERY, D., CHANG, M., CAMPIE, S., BROWN, M., MCNEELY, T. B., ZORMAN, J., MAIRA-LITRÁN, T., PIER, G. B., KELLER, P. M., JANSEN, K. U., MARK, G. E. Isolation, structural characterization, and immunological evaluation of a high-molecular-weight exopolysaccharide from *Staphylococcus aureus*. **Carbohydrate research**, vol338, 903–922, 2003.

KADARIYA, J., SMITH, T. C., THAPALIYA, D. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. **BioMed research international**, 1-9, 2014.

KAPLAN, J. B., IZANO, E. A., GOPAL, P., KARWACKI, M. T., KIM, S., BOSE, J. L., BAYLES, K. W., HORSWILL, A. R. Low levels of β -lactam antibiotics induce extracellular DNA release and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. **mBio**, vol3, e00198–e00112, 2012.

KARSTEN, B. HEILMANN, C., PETERS, G. Coagulase-Negative Staphylococci. **Clinical Microbiology**, vol27, n4, 2014.

KATAYAMA, Y., ITO, T., HIRAMATSU, K. A New Class of Genetic Element, *Staphylococcus* Cassette Chromosome *mec*, Encodes Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol44, n6, 1549-1555, 2000.

KLOOS W. E., Natural populations of the genus *Staphylococcus*. **Annual Reviews in Microbiology**, vol34, 559–592, 1980

KLOOS, W. E., SCHILEIFER, K. H. Simplified Scheme for Routine Identification of Human *Staphylococcus* Species. **Journal of Clinical microbiology**, USA, vol1, n1, 82-88, 1975.

KLUYTMANS, J., VAN, B. A., VERBRUGH, H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. **Clinical Microbiology Reviews**, vol10, 505–520, 1997.

KOLODKIN-GAL, I., ROMERO, D., CAO, S., CLARDY, J., KOLTER, R., LOSICK, R. D-amino acids trigger biofilm disassembly. **Science**, vol328, 627–629, 2010.

KREIKEMEYER, B, MCDEVITT, D, PODBIELSKI, A. The role of the map protein in *Staphylococcus aureus* matrix protein and eukaryotic cell adherence. **International Journal of Medical Microbiology**, vol292, 283–295, 2002.

LALLY, R. T., EDERER, M. N., WOOLFREY, B. F. Evaluation of mannitol salt agar with Oxacillin as a Screening medium for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Minnesota, vol22, 501-504, n4, 1985.

le LOIR, Y. F. BARON, M. GAUTIER, *Staphylococcus aureus* and food poisoning, **Genetics and Molecular Research**, vol. 2, no. 1, pp. 63–76, 2003.

LEIMAN S. A., MAY J. M., LEBAR M. D., KAHNE D., KOLTER R., LOSICK R. D-amino acids indirectly inhibit biofilm formation in *Bacillus subtilis* by interfering with protein synthesis. **Journal of Bacteriology**, vol195, 5391–5395, 2013.

LEWIS, K. Persister cells. **Annual Review of Microbiology**, vol64, 357–372, 2010.

LISTER, J. L., HORSWILL, A. R. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, vol4, artigo 178, 1-9, 2014.

LONG, M. G., HOFFMAN, P., TURMIDGE, J., ZILM, P. S., KIDD, S. P. Prolonged Growth of a Clinical *Staphylococcus aureus* Strain Selects for a Stable Small-Colony-Variant Cell Type. **Infection and Immunity**, vol83, 470-481, 2014

LOWY, F. D., *Staphylococcus aureus* infections. **New England Journal of Medicine**, vol339, 520–532, 1998.

MACK, D., DAVIES, A. P., HARRIS, L. G., KNOBLOCH, J. K., ROHDE, H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: functional molecules, relation to virulence, and vaccine potential. **Topics Current Chemistry**, vol288, 157–182, 2009.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12. ed., Porto Alegre: Artmed, 70-78, 2010.

MANN, E. E., RICE, K. C., BOLES, B. R., ENDRES, J. L., RANJIT, D., CHANDRAMOHAN, L., TSANG, L. H., SMELTZER, M. S., HORSWILL, A. R., BAYLES, K. W. Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. **PLoS ONE**, vol4, e5822, 2009.

MELLO, J. F., ROCHA, L. B., LOPES, E. S., FRAZZON, J., COSTA, M. Sanitary quality, occurrence and identification of *Staphylococcus sp.* in food services. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol43, n3, 2014.

MOORMEIER, D. E., ENDRES, J. L., MANN, E. E., SADYKOV, M. R., HORSWILL, A. R., RICE K. C., FEY, P. D., BAYLES, K. W. Use of microfluidic technology to analyze gene expression during *Staphylococcus aureus* biofilm formation reveals distinct physiological niches. **Applied Environmental Microbiology**, vol79, 3413–3424, 2013.

_____, BOSE, J. L., HORWILL, A. R., BAYLES, K. W. Temporal and stochastic control of *Staphylococcus aureus* biofilm development. **mBio**, vol5, n5, 2014.

MURAKAMI, KM, TOMASZ, A. Involvement of multiple genetic determinants in high-level methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, vol171, n2, 874-879, 1989.

MURRAY, R. J., Recognition and management of *Staphylococcus aureus* toxin-mediated disease. **Internal Medicine Journal**, vol35, suplemento 2, S106–S119, 2005.

MUSTELIN, T. A brief introduction to the protein phosphatase families. **Protein phosphatase protocols**. Clifton: Springer, vol365, 9-22, 2007.

NETO, A. E., JÚNIOR, F. G., SANTOS, J. C. A., SILVA, L. C. A., MATOS, R. A. T. Avaliação de resíduo de antibiótico em amostras de leite de vacas após a terapia de vacas secas. **Arquivos do instituto Biológico**, São Paulo, vol82, 1-4, 2015.

NORMANNO, G., DAMBROSIO, A., LORUSSO, V., SAMOLIS, G., di TARANTO, O., PARISI, A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in slaughtered pigs and abattoir workers in Italy. **Food Microbiology**, vol51, 51-56, 2015.

NOVOTNY, L. A., AMER, A. O., BROCKSON, M. E., GOODMAN, S. D., BAKALETZ, L. O. Structural stability of *Burkholderia cenocepacia* biofilms is reliant on eDNA structure and presence of a bacterial nucleic acid binding protein. **PLoS ONE**, vol8, 1-15, 2013.

O'GARA, J. P. *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiology**, carta 270, 179–188, 2007.

Organização Mundial de Saúde. Estratégia global para conter a resistência antimicrobiana, 2001. Disponível em: <www.who.int/drugresistance/en/WHO_Global_Strategy_English.pdf>. Acesso em: 0/01/2016.

OTTO, M. Staphylococcal biofilms. **Current Topics in Microbiology Immunology**, vol322, 207–228, 2008.

_____. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. **Annual review of Medicine**, vol64, 175-188, 2013.

PALMA, M., HAGGAR, A., FLOCK, J. I. Adherence of *Staphylococcus aureus* is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity. **Journal of bacteriology**, vol181, n9, 2840-2845, 1999.

PATERSON, G. K., HARRISON, E. M., HOLMES, M. A., The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, **Trends in Microbiology**, vol22, n1, 42-47, 2014.

PATHARE, N. A., ASOGAN, H., TEJANI, S., MAHRUQI, G. A., FAKHRIN, S. A., ZAFARULLA, R., PATHARE, A. V. Prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* [MRSA] colonization or carriage among health-care workers. **Journal of Infection and Public Health**, vol12, 159-170, 2015.

PETTI, C. A., SIMMON, K. E., MIRO, J. M., HOEN, B., MARCO, F., CHU, V. H. Genotypic diversity of coagulase-negative staphylococci causing endocarditis: a global perspective. **Journal of Clinical Microbiology**, vol46, 1780–1784, 2008.

POMPERMAYER, D. M. C., GAYLARDE, C. C. The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. **Food Microbiology**, vol17, 361–365, 2000.

PROCTOR, R. A., van LAGEVELDE, P., KRISTJANSSON, M., MASLOW, J., ARBEIT, R. D. Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Infectious Diseases**, vol20, 95–102, 1995

_____, von EIFF, C., KAHL, B. C., McNAMARA, P., HERMANN, M., PETERS, G. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. **Nature reviews microbiology**, vol4, n4, 295-305, 2006.

QIN, Z., OU, Y., YANG, L., ZHU, Y., TOLKER-NIELSEN, T., MOLIN, S., QU, D. Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. **Microbiology**, vol153, 2083–2092, 2007.

REFFUVEILLE, F., de la FUENTE-NUNEZ, C., MANSOUR, S., HANCOCK, R. E. A broad-spectrum anti-biofilm peptide enhances antibiotic action against bacterial biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol58, 5363–5371, 2014.

ROHDE, H., FRANKENBERGER, S., ZAEHRINGER, U., MACK, D. Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. **European Journal of cell biology**, vol89, n1, 103-111, 2009.

SADOVSKAYA, I., FAURE, S., WATIER, D., LETERME, D., CHOKR, A., GIRARD, J., MIGAUD, H., JABBOURI, S. Potential use of poly-N-acetyl-beta-(1,6)-glucosamine as an antigen for diagnosis of staphylococcal orthopedic-prosthesis-related infections. **Clinical Vaccine Immunology**, vol14, 1609–1615, 2007.

SADYKOV, M. R., BAYLES, K. W. The control of death and lysis in staphylococcal biofilms: a coordination of physiological signals. **Current Opinion in Microbiology**, vol15, 211–215, 2012.

SALVATORI, R. U., WOLF, G. A. K., DRESCH, F., STROHSCHOEN, A. A. G. Laboratório de microbiologia: normas gerais, instruções de trabalho e procedimentos Operacionais Padrões (POP). Lajeado:Univates, 2013.

SCHERR, T. D., HEIM, C. E., MORRISON, J. M., KIELIAN, T. *Hiding in plain sight: interplay between staphylococcal biofilms and host Immunity*. **Frontiers Immunology**, vol5, artigo 37, 1-7, 2014.

SCHLEIFER, K. H., KLOOS, W. E. Isolation and Characterization of Staphylococci from Human Skin I. Amended Descriptions of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and Descriptions of Three New Species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus*, and *Staphylococcus xylosus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary**, vol25, 50-61, 1975.

SIMSEK, Z., KORUK, I., COPUR, A. C., GÜRSES, G. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and intestinal parasites among food handlers in Sanliurfa, Southeastern Anatolia. **Journal of Public health Management and Practice**, vol15, 6, 518-523, 2009.

SINDE, E., CARBALLO, J. Attachment of *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiology**, vol17, 439–447, 2000.

SINGH, R., RAY, P., DAS, A., SHARMA, M. Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. vol65, 1955–1958, 2010.

_____, RAY, P., DAS, A., SHARMA, M. Role of persisters and small-colony variants in antibiotic resistance of planktonic and biofilm-associated *Staphylococcus aureus*: an *in vitro* study. **Journal of Medical Microbiology**, vol58, 1067–1073, 2009.

SINGHAL, D., FOREMAN, A., BARDY, J. J., WORMALD, P. J. *Staphylococcus aureus* biofilms. **The Laryngoscope**, vol121, 1578–1583, 2011.

STEPANOVIC, S., IRNOVIC, I. C., RANIN, L., SVABIC-VLAHOVIC, M. Biofilm formation by *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Letters in Applied Microbiology**, Serbia, vol38, 428-432, 2004.

_____, VUKOVIC, D., DAKIC, I., SAVIC, B., SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, vol40, 175–179, 2000.

SUGIMOTO, S., IWAMOTO, T., TAKADA, K., OKUDA, K., TAJIMA, A., IWASE, T., MIZUNOE, Y. *Staphylococcus epidermidis* Esp degrades specific proteins associated with *Staphylococcus aureus* biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, vol195, 1645–1655, 2013.

TANG, J., CHEN, J., LI, H., ZENG, P., LI, J. Characterization of adhesin genes, staphylococcal nuclease, hemolysis, and biofilm formation among *Staphylococcus aureus* strains isolated from different sources. **Foodborne Pathogens Disease**, vol10, 757–763, 2013.

THOMAS, V. C., HANCOCK, L. E. Suicide and fratricide in bacterial biofilms. **The International journal of Artificial Organs**, vol32, 537–544, 2009.

THOMPSON, K. M., ABRAHAM, N. e JEFFERSON, K. K. *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein contributes to biofilm formation in the presence of serum. **FEMS Microbiology letters**, vol305, n° 2, p. 143-147, 2010.

TORMO, M. A., KNECHT, E., GÖTZ, F., LASA, I., PENADÉS, J. R. Bap dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? **Microbiology**, vol151, 2465–2475, 2005.

TUEMMERS, C., SALDIVIA, A. Dermatopatías bacterianas de importancia en medicina equina, **Sustainability, Agri, Food and Environmental Research**, Chile, vol3, n4, 30-53, 2015.

TYAGI, P. K., MISHRA, M., KHAN, N., SIROHI, S., TYAGI, S. Beware! pathogenic bacteria share human habitat, India, **The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs**, 619-630, 2015.

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 Pathogens**. vol8, n8, 2012.

van GRIETHUYSEN, A., BES, M., ETIENNE, J., ZBINDEN, R., KLUYTMANS, J. International multicenter evaluation of latex agglutination tests for identification of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, vol39, 86 –89, 2001.

VUONG, C., KELLER, D., PESCHEL, A. Binding of the Map protein of *Staphylococcus aureus* Newman to the cell wall is dependent on the D-alanylation of teichoic acids. **10th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections**, 2002.

WEAVER, W. M., MILISAVJEVIC, M., MILLER, J. F., di CARLO, D. Fluid flow induces biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intracellular adhesin-positive clinical isolates. **Applied and environmental microbiology**, vol78, n16, 5890-5896, 2012.

WERTHEIN, H. F., VOS, M. C., OTT, A., VAN B. A., VOSS, A., KLUYTMANS, J. A., van KEULEN, P. H., VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M., MEESTER, M. H., VERBRUGH, H. A. Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. **Lancet**, vol364, 703–705, 2004.