

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Staphylococcus* sp. E
DIVERSIDADE GENÉTICA DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE-
NEGATIVOS**

FERNANDA CRISTINA POSSAMAI ROSSATTO

Bacharel em Biomedicina

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Março de 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Staphylococcus* sp. E
DIVERSIDADE GENÉTICA DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE-
NEGATIVOS**

FERNANDA CRISTINA POSSAMAI ROSSATTO

Bacharel em Biomedicina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente como um dos requisitos para a obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Março de 2015

CIP - Catalogação na Publicação

Rossatto, Fernanda Cristina Possamai
Avaliação da formação de biofilme por
Staphylococcus sp. e diversidade genética de
estafilococos coagulase-negativos / Fernanda
Cristina Possamai Rossatto. -- 2015.
100 f.

Orientador: Ana Paula Guedes Frazzon.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Estafilococos. 2. Biofilme. 3. Diversidade
genética. I. Frazzon, Ana Paula Guedes, orient. II.
Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades e mostrar o caminho nas horas incertas.

À minha família, que tanto me orgulho e é meu porto seguro, pelo amor, incentivo e carinho sem medida. Pela educação, direcionamento e suporte para que eu trilhasse o meu caminho.

Ao meu noivo Guilherme, por acreditar em mim, pela paciência e compreensão, sempre ao meu lado. Pelo auxílio nas situações não tão fáceis. Por ter sido uma voz sensata e incentivadora em todos os momentos.

À UFRGS, CAPES e PPGMAA por possibilitarem o desenvolvimento deste trabalho.

Um agradecimento muito especial à minha orientadora Ana Paula Frazzon, pela confiança e oportunidade de aprendizado. Obrigada pela dedicação e sabedoria que me foram proporcionados. Pela paciência, suporte e compreensão. Sou muito grata, não só pelo incentivo na construção do alicerce científico, mas também pela forma carinhosa e agradável que compartilhaste estes dois anos.

A todos os colegas que passaram pelos laboratórios 164 e 209, Aline, Gabriel, Daniele, Kim, Letícia, Mica, Marcela, Ana, Marciele, Janira, Rebeca, pela convivência e apoio. Em especial à Jaqueline, Tiane, Francielle e Naiara pelo acolhimento, cooperação e empenho sem medidas em me auxiliar. Aos colegas da Virologia e Parasitologia.

Às minhas amigas Gabi Puccinelli, Ju Coelho, Camila Romero e Vanessa Feistauer. Um agradecimento particular à Caroles e Géssica, que contribuíram sobremaneira na execução da pesquisa e durante as disciplinas. Foram verdadeiras companheiras e fizeram meus dias mais felizes e divertidos.

Enfim, a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a minha formação profissional. Muito obrigada!

AValiação DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Staphylococcus* sp. E DIVERSIDADE GENÉTICA DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE-NEGATIVOS¹

Autor: Fernanda Cristina Possamai Rossatto

Orientadora: Ana Paula Guedes Frazzon

RESUMO

Staphylococcus sp. é reconhecidamente causador de infecções humanas e considerado um dos principais patógenos alimentares. O objetivo deste estudo foi comparar isolados de *Staphylococcus* sp. quanto à formação de biofilme sob diferentes suplementações (1 %, 5 % e 10 % de glicose, 0,9 % de NaCl, 5 % de glicose com 0,9 % de NaCl e 12,5 % de plasma) e temperaturas (25 °C, 35 °C e 40 °C), bem como avaliar isolados provenientes de morcilha quanto à caracterização molecular por meio da tipagem epidemiológica e produção de proteases e lipases. Um total de 102 *Staphylococcus* sp. (34 *S. aureus* clínicos, 26 estafilococos coagulase-positivos (ECP) de carne de frango, e 42 estafilococos coagulase-negativos (ECN) de morcilha) foram selecionados. Os isolados clínicos apresentaram maior formação de biofilme com adição de plasma a 35 °C, já os alimentares com suplementação combinada de glicose e cloreto de sódio a 40 °C. Não houve correlação entre os métodos de tipagem molecular, sendo o RAPD-PCR mais discriminatório que o rep-PCR, na análise dos ECN. Dentre os 42 isolados de morcilha, 57,14 % e 28,57 % apresentaram atividades lipolítica e proteolítica, respectivamente. Conclui-se que cada isolado apresentou um comportamento individualizado sob determinado suplemento ou temperatura de incubação, mas, de modo geral, o aumento da temperatura e a adição de glicose e NaCl favorecem a formação de biofilme, bem como a utilização de componentes da matriz do hospedeiro em isolados clínicos. A análise molecular mostrou uma elevada diversidade genética entre os isolados de morcilha.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Microbiologia de Alimentos. Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (100 p.) Março, 2015.

EVALUATION OF BIOFILM FORMATION BY *Staphylococcus* sp. AND GENETIC DIVERSITY OF COAGULASE-NEGATIVE STAPHYLOCOCCI²

Author: Fernanda Cristina Possamai Rossatto

Supervisor: Ana Paula Guedes Frazzon

ABSTRACT

Staphylococcus sp. is known to cause human infections and considered one of the main food pathogens. The objective of this study was to compare isolates of *Staphylococcus* sp. as the biofilm formation in different supplements (1 %, 5 % and 10 % glucose, 0.9 % NaCl, 5 % glucose and 0.9 % NaCl, 12.5 % plasma) and temperatures (25 °C, 35 °C and 40 °C) and isolated from black pudding evaluate their molecular characterization by epidemiological typing and production of proteases and lipases. A total of 102 *Staphylococcus* sp. (34 clinical *S. aureus*, 26 coagulase-positive staphylococci (ECP) from poultry, and 42 coagulase-negative staphylococci (ECN) from black pudding) were selected. Clinical isolates showed greater biofilm formation with the addition of plasma at 35 °C, as food isolates with combined supplementation of glucose and sodium chloride at 40 °C. There was no correlation between the molecular typing methods, RAPD-PCR was more discriminatory than rep-PCR. Among the 42 isolates from black pudding, 57.14 % and 28.57 % had lipolytic and proteolytic activities, respectively. We conclude that each strain had an individualized behavior under specific supplement or temperature, but generally, the increase of temperature and the addition of glucose and NaCl favor the formation of biofilm, as well as the use of components of the host matrix from clinical isolates. Molecular analysis showed a high genetic diversity among the isolates from black pudding.

²Master of Science dissertation in Agricultural Microbiology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (100 p.) March, 2015.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	ix
1 INTRODUÇÃO	1
Objetivo Geral.....	2
Objetivos Específicos	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Gênero <i>Staphylococcus</i> sp.	4
2.2 <i>Staphylococcus</i> coagulase-positivos.....	5
2.3 <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos	7
2.4 Mecanismos de virulência.....	8
2.5 Biofilme.....	12
2.5.1 Formação do biofilme	14
2.5.2 Regulação do biofilme	17
2.6 Amostras clínicas.....	21
2.7 Amostras alimentares	24
2.7.1 Morcilha.....	25
2.7.2 Frango.....	26
2.8 Análise da diversidade pela tipagem molecular	28
2.9 Atividade antimicrobiana.....	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1 Isolados de <i>Staphylococcus</i> sp.....	34

3.1.1 ECP isolados de cateter venoso central	34
3.1.2 ECP isolados de carne de frango	34
3.1.3 ECN isolados de morcilha	35
3.2 Detecção da formação de biofilme pelo teste da microplaca	35
3.2.1 Análise estatística.....	37
3.3 Análise da diversidade genética dos ECN	38
3.3.1 Extração de DNA total	38
3.3.2 Amplificação da região 16S rRNA	39
3.3.3 Análise molecular por RAPD-PCR.....	40
3.3.4 Análise molecular pelo rep-PCR.....	41
3.3.5 Análise dos resultados de tipagem dos isolados.....	41
3.4 Caracterização fenotípica de fatores de virulência.....	42
3.4.1 Atividade das proteases	42
3.4.2 Atividade das lipases	43
3.5 Atividade antimicrobiana.....	43
4 RESULTADOS	45
4.1 Isolados bacterianos	45
4.2 Determinação da capacidade de produção de biofilme dos isolados sob diferentes suplementos e temperaturas.....	45
4.3 Análise da diversidade genética dos isolados de estafilococos coagulase-negativos	50
4.3.1 RAPD-PCR.....	51
4.3.2 rep-PCR	53
4.4 Verificação da atividade das enzimas proteases e lipases nos ECN	56
4.5 Avaliação da capacidade dos ECN de inibir o crescimento de outros microrganismos	57

5 DISCUSSÃO	58
5.1 Determinação da capacidade de produção de biofilme	58
5.2 Diversidade genética entre os ECN isolados de morcilha	70
5.3 Análise da atividade das proteases e lipases nos ECN	73
5.4 Capacidade de ECN de inibir outras bactérias	75
6 CONCLUSÕES.....	76
7 PERSPECTIVAS	78
8. REFERÊNCIAS	80

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1. Classificação quanto à capacidade de formação de biofilme em estafilococos coagulase negativos e positivos sob diferentes suplementações.....	46
TABELA 2. Classificação quanto à capacidade de formação de biofilme em estafilococos coagulase negativos e positivos crescendo em meio TSB suplementado com 5 % de glicose e 0,9 % de NaCl sob diferentes temperaturas de incubação.....	47
TABELA 3. Atividade proteolítica e lipolítica de estafilococos coagulase-negativos isolados de morcilha.....	56

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Etapas da formação do biofilme.....	15
FIGURA 2. Sistema <i>quorum sensing agr</i> em <i>Staphylococcus</i> sp.....	19
FIGURA 3. Média dos valores de densidade óptica na formação de biofilme em <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de morcilha, carne de frango e cateter venoso central inoculados em meio TSB e suplementados com diferentes compostos e incubados sob diferentes temperaturas.....	50
FIGURA 4. Gel de agarose a 1,5 % demonstrando os 8 perfis de bandas (A, B, C, D, E, F, G, H) dos isolados de ECN provenientes de morcilha gerados pela técnica de RAPD-PCR com o oligonucleotídeo iniciador D11344.....	51
FIGURA 5. Dendograma gerado da análise da RAPD-PCR dos 42 ECN isolados de morcilha preta e branca.....	52
FIGURA 6. Gel de agarose a 1,5 % demonstrando os 12 perfis de fragmentos de DNA (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L) amplificados pela técnica de rep-PCR com o oligonucleotídeo iniciador RW3A dos ECN isolados de morcilha.....	54
FIGURA 7. Dendograma gerado pelos fragmentos de DNA amplificados pela técnica de rep-PCR empregando o oligonucleotídeo iniciador RW3A dos 42 ECN isolados de morcilha preta e branca.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Aap: Proteína associada à acumulação
Agr: Regulador gene acessório
AgrA: Proteína reguladora de resposta AgrA
AgrB: Proteína AgrB
AgrC: Proteína sensor de resposta AgrC
AgrD: Proteína AgrD
AI: Auto inductor
APPCC: Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
ATCC: *American Type Culture Collection*
Aur: Proteína aureolisina
B: Média da leitura do branco
BHI: *Brain Heart Infusion*
BOX-PCR: PCR da região BOX
BPF: Boas Práticas de Fabricação
ClfA: Fatores de aglomeração A
ClfB: Fatores de aglomeração B
CVC: Cateter venoso central
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
DO: Densidade óptica
DOc: Ponto de corte
ECP: Estafilococos coagulase-positivo
ECN: Estafilococos coagulase-negativo
EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EPS: Substância polimérica extracelular
ERIC-PCR: PCR de sequências repetitivas intergênicas de enterobactérias
Esp: Proteína Esp
FnBPA: Proteína de ligação a fibronectina A
FnBPB: Proteína de ligação a fibronectina B
gene *agrA*: Gene da proteína AgrA
gene *agrB*: Gene da proteína AgrB
gene *agrC*: Gene da proteína AgrC
gene *agrD*: Gene da proteína AgrD
gene *coa*: Gene da coagulase
gene *fsr*: Gene regulatório em *E. faecalis*
gene *gbaAB*: *Glucose induced biofilm accessory gene*
gene *icaR*: Gene repressor do operon *icaADBC*
gene *rbf*: Gene da proteína Rbf
gene *sarA*: Gene regulatório acessório estafilocócico
gene 16S rRNA: Gene da subunidade 16S do RNA ribossômico
HAI: Infecções Associadas à Saúde
HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Hla: Hemolisina α
Hlb: Hemolisina β
Hlg: Hemolisina γ
icaADBC: Operon *ica*

IgG: Imunoglobulina G
LukED: Leucocidina subunidade E e subunidade D
LukGH/AB: Leucocidina subunidade G e subunidade H/ subunidade A e subunidade B
LuxS: Proteína LuxS
MgCl₂: Cloreto de magnésio
MHC: Complexo principal de histocompatibilidade
mL: Mililitro
MLST: Tipagem da sequência multilocos
mM: Milimolar
MM: Marcador de peso molecular
MRSA: *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina
MSCRAMM: Moléculas de adesão a superfície da matriz adesiva
NaCl: cloreto de sódio
ng: Nanograma
nm: Nanômetro
NTSYS: *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*
PAI: Peptídeo autoindutor
pb: Pares de bases
PCR: Reação em cadeia da polimerase
PFGE: Eletroforese em gel de campo pulsado
PFT: Toxinas formadoras de poros
pH: Potencial de Hidrogênio Iônico
PIA: Adesina intercelular polissacarídea
PNAG: Poli-N-acetil-b-1,6-glicosamina
PSM: Modulinas solúveis em fenol
PVL: *Panton Valentine Leukocidin*
QS: *Quorum sensing*
RAPD-PCR: PCR do DNA polimórfico randômico amplificado
RFLP: PCR do polimorfismo do fragmento de restrição
REP-PCR: PCR do elemento repetitivo
RNA: Ácido ribonucleico
RNAIII: Molécula de RNA efetora de resposta
RPM: Rotações por minuto
rRNA: Ácido Ribonucleico Ribossomal
s: Desvio padrão
SasG: Proteína G de superfície
ScpA: Proteinase relacionada com a cisteína
SDS: Dodecil Sulfato de Sódio
SE: Enterotoxinas estafilocócicas
SspA: Protease serina A
SspB: Protease cisteína B
TAE: Tampão Tris-Acetato-EDTA
Taq polimerase: Enzima polimerase extraída da bactéria *Thermus aquaticus*
TE: Tampão Tris-EDTA
TEN: Tampão Tris-EDTA-NaCl
TNF: Fator de necrose tumoral
TSA: Ágar triptona de soja

TSB: Caldo triptona de soja
UFC: Unidade Formadora de Colônia
UPGMA: *Un Weighted Pair Group* com Média Aritmética
UTI: Unidade de Terapia Intensiva
UV: Ultra-violeta
δ-toxina: Delta toxina
°C: Graus Celsius
μL: Microlitro
μm: Micrômetro
%: Porcentagem
σ^B: Fator sigma alternativo

1 INTRODUÇÃO

Staphylococcus sp. é um microrganismo ubiqüitário que pode compor a microbiota humana e animal e, sob determinadas condições, atuar como patógeno causador de infecções humanas no ambiente hospitalar ou adquiridas na comunidade e de intoxicações alimentares. Esta bactéria conta com uma série de fatores de virulência, dentre eles a produção de enzimas como proteases, lipases, catalase e coagulase, proteínas de superfície celular, além da capacidade de formação de biofilme.

A formação de biofilme em superfícies abióticas de alimentos e dispositivos médicos constitui uma problemática de difícil controle e de grande relevância na saúde pública, uma vez que pode representar uma fonte persistente de patógenos, dentre eles diversas espécies pertencentes ao gênero *Staphylococcus*. A produção de biofilme pode ocorrer em qualquer estágio do processamento do alimento: seja pela escassez de condições hígidas no ambiente, pela inadequada manipulação do produto ou pela contaminação de equipamentos e superfícies. No ambiente hospitalar, a maioria das infecções se deve à presença de biofilme decorrente da contaminação de instrumentos como cateteres, agulhas, próteses, válvulas e outros aparelhos de longa permanência.

A partir do momento em que um biofilme é estabelecido, torna-se complexo seu controle, visto que os microrganismos que vivem no estado sésil do biofilme são fenotipicamente distintos dos seus homólogos de vida planctônica, apresentando uma alta tolerância contra agentes antimicrobianos, sanitizantes e ao sistema imune do hospedeiro. Condições ambientais, tais como, disponibilidade de nutrientes, temperatura, tipo de superfície, pH e umidade, podem influenciar na formação de biofilmes microbianos, aumentando ou inibindo sua produção.

A tipagem epidemiológica de *Staphylococcus* sp. por meio da caracterização molecular permite, por exemplo, a investigação de surtos de intoxicações alimentares, com o objetivo de sugerir a fonte da contaminação, seja ela humana ou animal. Vários métodos podem ser empregados para rastrear a propagação da disseminação clonal, diferindo entre si em efetividade e praticidade.

Desta forma, este estudo visa analisar a capacidade de formação de biofilme de isolados clínicos e alimentares de *Staphylococcus* sp. sob diferentes condições ambientais, bem como analisar a diversidade genética e a presença de fatores de virulência, como produção de proteases e lipases de estafilococos coagulase-negativos isolados de alimentos.

Objetivo Geral

Caracterizar isolados clínicos e alimentares de *Staphylococcus* sp. pela formação de biofilme e analisar a diversidade fenotípica e genotípica de estafilococos coagulase-negativos isolados de alimentos.

Objetivos Específicos

A. Determinar a capacidade de formação de biofilme de estafilococos coagulase-positivos e estafilococos coagulase-negativos isolados de amostras clínicas e alimentares quando submetidos a diferentes condições ambientais, como diversas temperaturas e suplementação de componentes do meio com glicose, cloreto de sódio e fibrinogênio.

B. Caracterizar os estafilococos coagulase-negativos isolados de morcilhas quanto à biodiversidade genética através das técnicas de RAPD-PCR e rep-PCR.

C. Analisar fenotipicamente os estafilococos coagulase-negativos isolados de morcilhas quanto à produção de fatores de virulência, como proteases e lipases.

D. Avaliar a atividade antimicrobiana dos estafilococos coagulase-negativos isolados de morcilhas contra microrganismos de importância em uma indústria de alimentos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Gênero *Staphylococcus* sp.

O gênero *Staphylococcus* compreende cocos Gram-positivos pertencentes à família *Staphylococcaceae*. São encontrados geralmente na forma de aglomerados, mas também podem estar dispostos como células isoladas, aos pares ou cadeias curtas. Esses microrganismos possuem de 0,5 a 1,5 μm de diâmetro, são catalase-positivos, não formadores de esporos, imóveis e anaeróbios facultativos (Bannerman, 2003; Murray et al., 2006; Tortora et al., 2007). Os *Staphylococcus* sp. são capazes de sobreviver a diversas condições ambientais; por exemplo, crescem em meios contendo alta concentração de NaCl (até 10 %), numa faixa de pH de 4,2 a 9,3 (com pH ideal de 7 a 7,5) e em um intervalo de temperatura entre 7 °C e 48 °C (temperatura ótima de 35 °C a 37 °C) (Bergdoll, 1989; Schmidt et al., 1990).

Existem aproximadamente 49 espécies e 26 subespécies de estafilococos descritos, sendo mais de 30 espécies reconhecidamente patogênicas para o ser humano. O gênero é classificado em dois grupos, conforme a capacidade de coagular o plasma: em *Staphylococcus* coagulase-negativos (ECN) e *Staphylococcus* coagulase-positivos (ECP) (Lowy, 1998; Murray et al., 2006; Euzéby, 2015). A atividade da coagulase permite ao

microrganismo evadir da fagocitose pelas células do hospedeiro, uma vez que o coágulo impede a passagem dos leucócitos pela área infectada (Mcadow et al., 2012).

Os *Staphylococcus* sp. possuem uma distribuição ubiquitária, sendo seu reservatório primário a pele e membranas mucosas de mamíferos e aves, principalmente a região nasofaríngea (Atanassova et al., 2001). Este gênero é responsável pela produção de uma série de fatores de virulência, dentre eles a presença de cápsula (em alguns isolados); capacidade de formação de biofilme; a secreção de enzimas como catalase, nucleases, proteases, lipases, hialuronidases, fibrinolisinases, coagulase (em algumas espécies) e quatro hemolisinas (alfa, beta, delta e gama). Também, são responsáveis pela produção de um grupo de superantígenos tóxicos pirogênicos constituído pela toxina da síndrome do choque tóxico (*toxic shock syndrome toxin* – TSST-1) e pelas enterotoxinas estafilocócicas (*staphylococcal enterotoxin* – SE), que podem causar intoxicações alimentares (Dinges et al., 2000; Spicer, 2002; Gordon & Lowy, 2008).

2.2 *Staphylococcus* coagulase-positivos

Dentre os ECP, o *Staphylococcus aureus* é o principal representante em decorrência de sua patogenicidade e é assim denominado devido à coloração dourada de suas colônias, como resultado de pigmentos carotenoides que se formam durante o crescimento. É o mais virulento microrganismo dentre as espécies de estafilococos, considerado um importante patógeno relacionado a intoxicações alimentares, infecções hospitalares e

comunitárias, sendo associado a elevados índices de morbi-mortalidade (Lowy, 1998).

Cerca de 30 % da população humana é portadora assintomática deste microrganismo, que coloniza principalmente a pele e regiões mucosas, como nasofaringe, faringe e períneo (Gorwitz et al., 2008). Praticamente todos os animais de sangue quente são portadores de *S. aureus*, por exemplo, o índice de colonização em aves é de 90 %, em suínos de 42 % e em torno de 20 % em bovinos (Roberson et al., 1994; Nagase et al., 2002; Sung et al., 2008).

Sua disseminação é comum e possivelmente responsável por muitas das infecções adquiridas no ambiente hospitalar, podendo ser transferido para um indivíduo suscetível através do contato direto ou por meio de fômites. Os *S. aureus* são suscetíveis à alta temperatura e às soluções desinfetantes e antissépticas; no entanto, podem sobreviver em superfícies secas por longos períodos, fato este que contribui para a permanência e disseminação dessas bactérias no ambiente hospitalar (Murray et al., 2006).

Sendo um patógeno oportunista, geralmente requer a quebra da barreira cutânea ou a diminuição da imunidade para dar início a um processo infeccioso. As cepas causadoras de infecções podem ser originárias do próprio indivíduo, transferidas a partir de outras pessoas ou do próprio ambiente. Infecções recorrentes por *S. aureus* são comuns, principalmente devido à capacidade deste microrganismo sobreviver em um estado de repouso em vários tecidos do hospedeiro e então causar uma reinfecção quando houver condições apropriadas (Lowy, 1998).

As principais manifestações clínicas relacionadas a este patógeno abrangem desde uma simples infecção localizada de pele até doenças graves e disseminadas como meningite, pneumonia, empiema, osteomielite, endocardite e bacteremia. Está também associado a impetigo, foliculite, abscesso, carbúnculo, síndrome da pele escaldada, síndrome do choque tóxico e intoxicação alimentar estafilocócica (Tortora et al., 2007). Além de *S. aureus*, outras espécies produtoras de coagulase, como *S. intermedius*, *S. schleiferi* e *S. hyicus*, também possuem enterotoxinas e podem estar envolvidas em alguns surtos (Borges et al., 2008; Moura et al., 2012).

Outros SCP, como *S. delphini*, *S. schleiferi* e *S. hyicus*, podem estar relacionados com infecções e intoxicações alimentares, apesar de serem menos prevalentes (Martins, 2012).

2.3 *Staphylococcus* coagulase-negativos

Os ECN pertencem à microbiota normal da pele e mucosas de humanos, sendo, por muito tempo, considerados como contaminantes em amostras clínicas e alimentares. Entretanto, estão atualmente emergindo como patógenos em potencial devido ao aumento do número de pacientes severamente debilitados e da utilização de implantes em hospitais. Geralmente, os ECN estão associados ao uso de válvulas protéticas, próteses ortopédicas, cateteres intravasculares, urinários e de diálises (Da Cunha et al., 2007). Os principais sintomas relacionados aos ECN incluem endocardite, septicemia e infecções do trato urinário (Murray et al., 2006; Rogers et al., 2009).

Dentre as espécies de ECN, *S. epidermidis* e *S. hominis* são as mais frequentemente encontradas como integrantes da microbiota humana e *S. saccharolyticus* é a única espécie anaeróbia estrita residente da pele e membranas mucosas. Também podem ser evidenciados como população transitória *S. cohnii*, *S. xylosus*, *S. haemolyticus*, *S. simulans* e *S. lugdunensis*. Algumas espécies são mais relacionadas com determinados sítios corporais, como *S. capitis* com a região da cabeça, *S. auricularis* com o canal auditivo e *S. saprophyticus* com o trato genitourinário (Cordeiro, 2007).

Além disso, algumas espécies de ECN, como *S. carnosus* e *S. equorum*, são relevantes na indústria alimentícia, uma vez que são empregados nos processos de fabricação de diversos derivados de carnes. Estes microrganismos podem ser utilizados como culturas *starter*, ou seja, como iniciadores da fermentação em vários embutidos, de modo a garantir a qualidade e segurança do produto (Place et al., 2003; Leroy et al., 2010).

2.4 Mecanismos de virulência

A capacidade deste gênero microbiano em causar doenças está relacionada a um grande número de fatores de virulência, que permitem a colonização, persistência, disseminação pelo hospedeiro e evasão do sistema imune. Historicamente, o principal representante dos estafilococos, o *S. aureus*, tem sido majoritariamente associado com infecções hospitalares; todavia, nas últimas décadas, tem-se observado um aumento de infecções por *S. aureus* relacionadas com resistência aos antimicrobianos na comunidade (Langley et al., 2003; Anderson et al., 2012).

A virulência nos *Staphylococcus* sp. é multifatorial, dependente de uma série de toxinas, moléculas de adesão e outros determinantes de virulência (Otto, 2012). Particularmente, *S. aureus* secreta numerosas exotoxinas, incluindo um grupo de polipeptídios capazes de causar dano à membrana celular do hospedeiro, como as toxinas formadoras de poros (*pore-forming* toxins – PFT), beta-hemolisinas (Hlb) e modulinas solúveis em fenol (*phenol soluble modulins* – PSM). Dentre as PFT, destacam-se a alfa-hemolisina (Hla), gama-hemolisina (Hlg), leucocidinas LukED, LukGH/AB e de Panton Valentine (*Panton Valentine Leukocidin* – PVL). Em contraste com as PFT, as beta-hemolisinas não formam poros na membrana plasmática, mas são esfingomielinases que hidrolisam a esfingomielina, um lipídio presente na membrana de células animais. As PSM, por sua vez, são uma família de pequenos peptídios anfipáticos helicoidais com propriedades citolíticas e pró-inflamatórias (Vandenesch et al., 2012; Perret et al., 2012; Grumann et al., 2013).

A aderência da bactéria ao tecido do hospedeiro é um passo primordial para o processo de colonização e infecção. Os estafilococos carregam também numerosas proteínas de superfície caracterizadas como componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas de matriz adesiva ou MSCRAMM (do inglês: *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*), que são adesinas que reconhecem especificamente componentes da matriz do hospedeiro (Patti et al., 1994). Fazem parte desta família os fatores de aglomeração A e B (ClfA e ClfB), a proteína A e as proteínas de ligação à fibronectina A e B (FnBPA e FnBPB),

que apresentam um domínio de ancoragem à parede da célula bacteriana (Navarra & Schneewind, 1999; Mazmanian et al., 2001). A proteína A está envolvida na ligação com o domínio Fc da imunoglobulina G (IgG), interrompendo a opsonização e fagocitose; além disso, possui a capacidade de ligar-se ao fator de Von Willebrand e atuar no desenvolvimento de doenças endovasculares (Hartleib et al., 2000).

Os superantígenos tóxicos pirogênicos (SE e TSST-1) produzidos pelos *Staphylococcus* sp. são proteínas estruturalmente relacionadas que compartilham homologia na sequência de seus aminoácidos. Eles se ligam diretamente ao complexo principal de histocompatibilidade (*major histocompatibility complex* – MHC) de classe II e aos receptores de células T, resultando em um aumento desordenado de células T e, portanto, numa intensa resposta inflamatória. Os superantígenos ativam cerca de 20 a 30 % de todas as células T, enquanto que os antígenos convencionais estimulam aproximadamente 0,001 % das células T. Há liberação do fator de necrose tumoral (*Tumor Necrosis Fator* - TNF) e outras citocinas que induzem o choque cardiovascular associado com a formação de microtrombos nos capilares (Lowy, 1998; Le Loir et al., 2003; Paulin et al., 2011; Kadariya et al., 2014).

Os estafilococos produzem uma série de proteases extracelulares, que são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas em polipeptídios (Wladyka & Pustelny, 2007). As principais enzimas proteolíticas secretadas consistem de metaloproteinases (como a aureolisina, Aur), endopeptidases (como a protease serina, SspA) e duas proteinases relacionadas com a cisteína (SspB e ScpA). Sua virulência decorre da sua

insensibilidade à maioria dos inibidores de protease presentes no plasma humano e, além disso, da sua habilidade de inativar alguns destes inibidores. Da mesma forma, o papel das proteases na dispersão do biofilme foi caracterizado, demonstrando que o fenótipo de dispersão de biofilme está relacionado com elevados níveis de atividade das proteases. Em acréscimo às proteases nativas produzidas por uma determinada espécie, a produção de proteases não-nativas podem impactar o crescimento na comunidade bacteriana, visto que a protease Esp produzida por *S. epidermidis* pode dispersar o biofilme de *S. aureus* (Dubin, 2002; Shaw et al., 2004; Lister & Horswill, 2014).

Estudos demonstram que há uma relação entre microrganismos que possuam forte atividade proteolítica com indivíduos apresentando lesões de pele e frangos com dermatite necrótica. Na indústria alimentícia, a atividade das proteases é importante para o desenvolvimento do sabor em queijos e carnes, todavia, pode levar à deterioração de alimentos, principalmente em produtos estocados por longos períodos em temperatura de refrigeração (Gündogan et al., 2013).

As lipases são enzimas que hidrolisam emulsões lipídicas de acilgliceróis constituídos de ácidos graxos de cadeia longa. Igualmente, são capazes de hidrolisar substratos com ácidos graxos de cadeia curta, tais como tributirina e Tween, sendo, portanto, também denominadas de esterases (Rosenstein & Götz, 2000; Messias et al., 2011; Krishnaveni, 2013). As lipases produzidas por *Staphylococcus* sp. são capazes de interferir na função granulocítica do hospedeiro e de elevar a taxa de sobrevivência do

microrganismo durante a resposta imune por meio da inativação de lipídios bacteriocidas. Isolados clínicos de *S. aureus* provenientes de infecções profundas, como septicemia, comumente exibem maior atividade lipolítica do que isolados originários de infecções superficiais, como um abscesso. Assim como em relação às proteases, o papel das lipases na formação de biofilmes foi estabelecido, uma vez que genes codificadores destas enzimas podem estar relacionados com genes reguladores que estimulem o desenvolvimento de biofilmes. Além disso, o uso de inibidores de lipases, como o farnesol, pode levar à redução da formação de biofilme (Hu et al., 2012; Rodrigues et al., 2014).

As lipases também influenciam na qualidade dos produtos na indústria alimentícia, devido à habilidade em hidrolisar componentes lipídicos dos alimentos. Microrganismos com elevada atividade lipolítica podem aumentar a taxa de deterioração do alimento, por sua ação em lipídios e como resultado da acumulação de produtos finais e intermediários que modificam as características sensoriais do alimento (Gündogan & Devren, 2010; Rodrigues et al., 2014).

2.5 Biofilme

Outro mecanismo de virulência em *Staphylococcus* sp. é a capacidade de formação de biofilme, visto que os biofilmes representam uma fonte persistente de patógenos. O controle dos biofilmes resulta em um desafio crítico, pois, muitas vezes, as superfícies e equipamentos de indústrias e ambientes hospitalares fornecem um ambiente favorável para sua formação. Além do mais, os microrganismos presentes em um biofilme são distintos

fenotipicamente de seus homólogos de vida livre, apresentando, geralmente, maior tolerância a agentes antimicrobianos, sanitizantes e ao sistema imune do hospedeiro (Otto, 2013; Giaouris et al., 2014; Abdallah et al., 2014).

Biofilmes são conceitualmente definidos como uma comunidade complexa e estruturada de microrganismos envoltos por uma matriz extracelular, aderidos entre si a uma superfície biótica ou abiótica (Costerton et al., 1995). A habilidade dos microrganismos em aderir a superfícies fornece uma vantagem evolucionária que permite a maturação, aumento da taxa de sobrevivência e o estabelecimento de relações simbióticas por meio do microambiente do biofilme. Além do mais, o modo de vida em comunidade provê resistência contra condições ambientais hostis, como privação de nutrientes, temperatura e pH extremos, excesso de salinidade, entre outros (Laverty et al., 2013; Otto, 2013; Giaouris et al., 2014).

A espessura de um biofilme pode variar de uma simples camada de células, até múltiplas camadas envoltas por um meio polimérico viscoso (Archer et al., 2011). Os microrganismos em um biofilme apresentam diferentes níveis metabólicos e de expressão gênica ao longo de suas camadas e estabelecem uma série de processos de comunicação celular (Donlan, 2002).

Diversos mecanismos podem estar envolvidos com a maior resistência das células em biofilme do que as células planctônicas. Um mecanismo é a baixa penetração de agentes químicos no biofilme, uma vez que as substâncias poliméricas agem como barreira impedindo a entrada, ou ainda, interagindo com os antimicrobianos. Uma segunda hipótese é que muitas células em um biofilme sobrevivem em limitação nutricional e, portanto,

vivem em um estado metabólico mais lento. Esta heterogenicidade de estados fisiológicos significa que pelo menos algumas células serão resistentes, devido ao fato de muitos antibióticos atuarem sobre a fase de crescimento microbiano, agindo especificamente sobre a síntese protéica, de ácidos nucleicos e da parede celular. Um terceiro mecanismo ocorre por meio da transferência de genes de resistência, por exemplo, por meio de plasmídios, os quais podem codificar resistência para múltiplos agentes antimicrobianos. Uma quarta proposição sugere que a resistência ocorra por falha no reconhecimento dos biofilmes pela defesa imunológica, seja pela substância polimérica exercer uma barreira física, seja pela produção de substâncias que inibam os sinais quimiostáticos do sistema imune (Costerton et al., 1999; Hall-Stoodley et al., 2004; Trentin et al., 2013).

2.5.1 Formação do biofilme

Um biofilme é constituído tipicamente pelas células microbianas e pela matriz ou substância polimérica extracelular (*exopolymeric substance* – EPS). A matriz, por sua vez, é composta basicamente por polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular, e corresponde a aproximadamente 50 a 90 % da matéria orgânica do biofilme. As substâncias poliméricas produzidas pelos microrganismos servem para manter as células sésseis unidas, bem como propiciam um ambiente de troca de material genético e formam a estrutura tridimensional do biofilme (Czaczyk & Myszka, 2007; Abdallah et al., 2014; Giaouris et al., 2014).

A formação do biofilme é um processo dinâmico e envolve fundamentalmente as seguintes etapas (Figura 1): adesão inicial reversível,

adesão irreversível com início do desenvolvimento da arquitetura do biofilme, maturação e dispersão (Lavery et al., 2013; Otto, 2013; Srey et al., 2013; Abdallah et al., 2014).

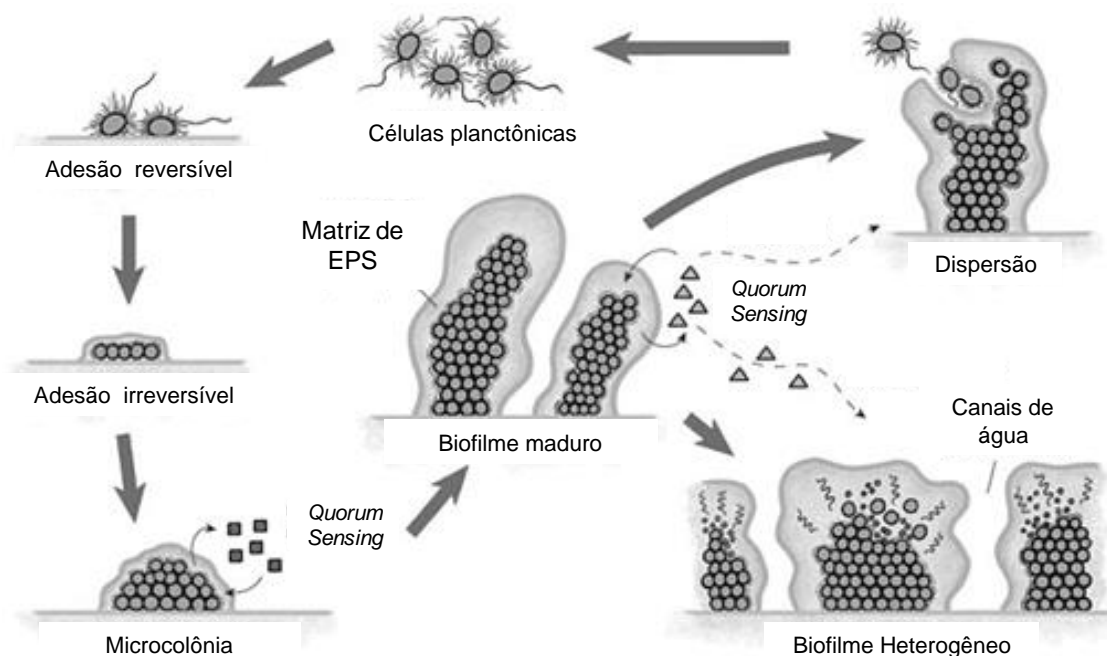


FIGURA 1. Etapas da formação do biofilme (adaptado de: <http://www.becscreen.com/about/about-biofilms>).

A adesão inicial pode ocorrer em superfícies bióticas, como o tecido humano, ou abióticas, como dispositivos médicos e superfícies metálicas e plásticas de indústrias de alimentos. Nesta etapa, a adesão é mediada por fatores inespecíficos, como interações eletrostáticas e hidrofóbicas, e específicos, como moléculas de superfícies, por exemplo, MSCRAMM. O depósito de material orgânico proveniente de alimentos, também favorece a formação de um filme condicionante que facilita a adesão microbiana (Dufour et al., 2012; Otto, 2013). Em acréscimo, a presença de apêndices nos

microrganismos, como fímbrias e flagelos, também promove maior aderência (Abdallah et al., 2014).

A superfície é outro fator que desempenha um importante papel na adesão bacteriana. De forma geral, qualquer superfície é vulnerável à adesão por microrganismos, incluindo plástico, vidro, metal, madeira e produtos alimentícios. Algumas propriedades físico-químicas da superfície, como textura, carga, pH, temperatura, composição nutricional e hidrofobicidade, influenciam na adesão (Srey et al., 2013; Giaouris et al., 2014).

Após a adesão inicial, as células começam a replicar em microcolônias. Então, a adesão reversível torna-se irreversível principalmente por causa da secreção de EPS, que forma a matriz do biofilme (Abdallah et al., 2014). Posteriormente à ligação irreversível, torna-se bastante complexa a remoção do biofilme, uma vez que os microrganismos fixam-se fortemente à superfície e ligações químicas muito fortes são estabelecidas (Palmer et al., 2007; Srey et al., 2013).

Na terceira etapa de formação do biofilme ocorre a maturação, que é caracterizada pela presença de macrocolônias circundadas por canais de água, que auxiliam a distribuir nutrientes e moléculas sinalizadoras (Dufour et al., 2012). Nesta fase são produzidas as adesinas, que medeiam o contato célula-célula, resultando na proliferação dos microrganismos em agrupamentos e na produção das multicamadas do biofilme (O’Gara, 2007). Em *Staphylococcus*, uma das mais importantes moléculas adesivas é a adesina intercelular polissacarídica (do inglês: *polysaccharide intercellular adhesin* – PIA), também designada de PNAG (do inglês: *poly-N-acetyl glucosamine*) em decorrência de

sua composição química. A PIA é sintetizada, exportada e modificada pelos produtos do operon *icaADBC*, com quatro regiões codificantes. Outras moléculas adesivas também participam do processo, como a proteína associada à acumulação (*accumulation-associated protein* – Aap), proteína G de superfície (*surface protein G* – SasG), proteína A, ácidos teicóicos, entre outros (Otto, 2013).

A dispersão constitui a última etapa e permite que as células – individualmente ou em aglomerados – revertam-se para a forma de vida planctônica. Esta mudança geralmente ocorre quando a disponibilidade de nutrientes é limitada ou simplesmente para propagar-se e colonizar outros nichos (Dufour et al., 2012; Srey et al., 2013). Por meio da dispersão, microrganismos podem contaminar outras superfícies e repetir o ciclo de formação do biofilme. Este processo é resultado de diversas condições ambientais, que promovem a expressão de genes envolvidos na dispersão (Abdallah et al., 2014). Em *Staphylococcus* sp., a dispersão é realizada primordialmente por pequenos peptídios anfipáticos denominados modulinas solúveis em fenol (*phenol-soluble modulins* – PSM) e por outras proteases extracelulares. Estas substâncias desfazem a estrutura do biofilme pela degradação de proteínas, como adesinas e exopolímeros, componentes estruturais essenciais do biofilme (Periasamy et al., 2012; Lavery et al., 2013; Otto, 2013).

2.5.2 Regulação do biofilme

Importantes mecanismos de sobrevivência bacteriana, tais como simbiose, formação de biofilme, produção de substâncias antibióticas e de

virulência, são controlados por sistemas regulatórios, que adaptam a expressão de genes de virulência conforme alterações nas condições ambientais. Em *Staphylococcus* sp. já foi demonstrado, por exemplo, a presença dos sistemas *agr* (*accessory gene regulator*) e *luxS*. Estes sistemas são reconhecidos como *quorum sensing* (QS), isto é, um mecanismo de comunicação célula-célula. O QS confere à bactéria a capacidade de reconhecer a densidade populacional pela mensuração da acumulação de pequenas moléculas sinalizadoras específicas, denominadas autoindutoras (AI). Somente quando a densidade populacional é alta, a acumulação do sinal no meio extracelular é suficiente para ativar a resposta transcricional (Kong et al., 2006; Laverty et al., 2013; Solano et al., 2014).

Um dos mecanismos de regulação mais elucidados, o sistema *agr*, é responsável pela diminuição da expressão de diversas proteínas de superfície celular e pelo aumento da expressão de muitos fatores de virulência, principalmente na transição da fase exponencial para estacionária. Além disso, está envolvido na atividade pró-inflamatória e na invasão e apoptose de células epiteliais (Yarwood et al., 2003; Lazzarotto, 2010).

O *locus agr* é composto por dois operons divergentes expressos pelos promotores P2 e P3. O operon P2 contém os genes *agrA*, *agrB*, *agrC* e *agrD*. A ação combinada dos produtos dos genes *agrD* e *agrB* é responsável pela síntese do peptídeo autoindutor (PAI). O *agrD* codifica a sequência do PAI, e *agrB*, uma endopeptidase transmembrana, que atua no processamento e excreção do PAI. Quando o peptídeo autoindutor atinge uma concentração limiar em uma determinada densidade celular, há a ligação deste com uma

histidina-quinase transmembrana, codificada pelo gene *agrC*. A proteína AgrC ativa, por sua vez, a resposta da proteína reguladora AgrA, codificada pelo gene *agrA*, que se liga a dois promotores, ativando a transcrição do operon *agr* em um processo de retroalimentação, e do RNAIII, o efetor intracelular do sistema. Em adição, o AgrA pode ativar diretamente a expressão de operons que codificam as PSM (Novick & Geisinger, 2008; Otto, 2013) (Figura 2).

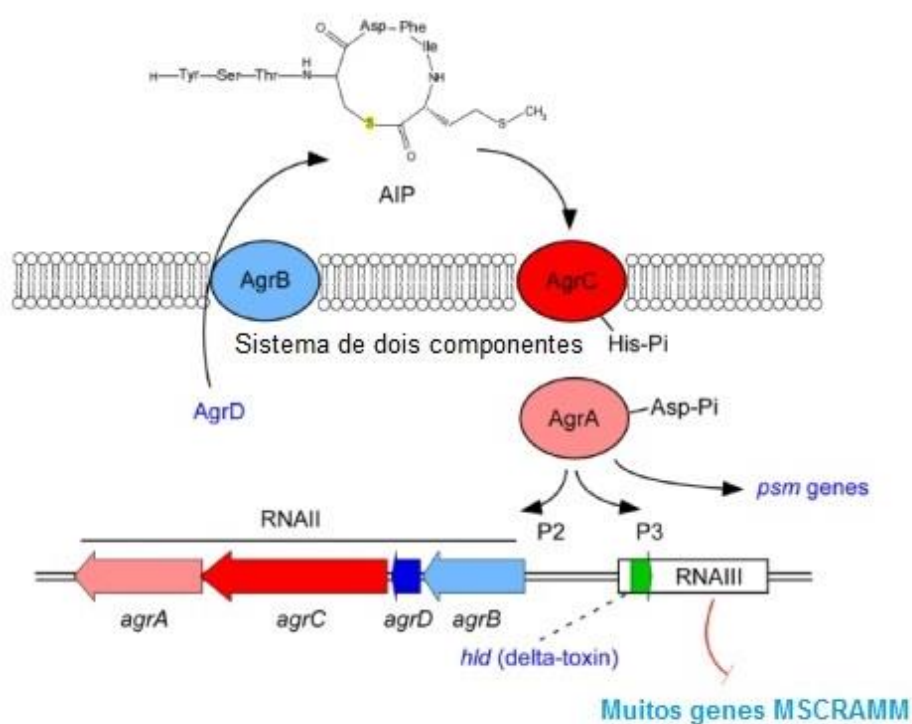


FIGURA 2. Sistema *quorum sensing agr* em *Staphylococcus* sp. (adaptado de Joo & Otto, 2012).

O sistema *agr* está intrinsicamente relacionado com biofilmes, principalmente durante a fase de dispersão das células microbianas. Estudos reportam que *Staphylococcus* sp. que utilizam o sistema *agr* na forma de vida sésil possuem camadas de biofilme mais finas do que mutantes *agr*-negativos, devido à habilidade de se destacar do biofilme maduro (Vuong et al., 2004). A dispersão ocorre pela ativação das PSM, como a δ -toxina, codificada pelo

RNAIII e mediada pelo sistema regulatório *agr*. Alguns produtos da regulação pelo sistema QS, como proteases e DNases, também participam da dispersão microbiana (Lavery et al., 2013). Existem dados na literatura que demonstram que a repressão do sistema *agr* é necessária para a adesão e desenvolvimento do biofilme (Boles & Horswill, 2008).

Diversas condições ambientais influenciam na formação do biofilme, tais como concentração de nutrientes, de oxigênio, osmolaridade, temperatura, pH, entre outros (Lim et al., 2004). Estresses ambientais podem mediar a expressão do fator sigma alternativo (σ^B) e do gene regulatório acessório estafilocócico (do inglês: *staphylococcal accessory regulator – sarA*), que estimulam a formação do biofilme por meio da regulação positiva sobre a produção de proteínas e polissacarídeos que formam o EPS (Arciola et al., 2012).

Vários estudos demonstram que diferentes temperaturas afetam a formação do biofilme de modo distinto. A biomassa de *Pseudomonas aeruginosa* cresce com o aumento da temperatura de incubação (Hostacka et al., 2010), todavia o efeito da temperatura ainda permanece obscuro sobre a formação de biofilme em *Staphylococcus* sp. (Abdallah et al., 2014).

Em relação à composição nutricional, relatos da literatura evidenciam que meios ricos em nutrientes podem elevar a formação de biofilme. A presença de glicose, cloreto de sódio, ferro, íons cálcio e etanol estão relacionados com o aumento da biomassa bacteriana (Conlon et al., 2002; Herrera et al., 2007; Rode et al., 2007; Lin et al., 2012; Agarwal & Jain, 2013; Shukla & Rao, 2013). Componentes sanguíneos, como o fibrinogênio e a

fibrina, também estão associados com o aumento da formação de biofilmes, impactando sobremaneira o desfecho clínico do paciente, uma vez que o tratamento torna-se mais complexo (Akiyama et al., 1997).

O metabolismo dos carboidratos regula a produção de biofilme em muitos microrganismos. Múltiplas espécies de *Enterobacteriaceae* reprimem a formação do biofilme na presença de glicose. Em contrapartida, em algumas espécies de *Enterococcus* sp., a suplementação com este monossacarídeo aumenta a produção de biomassa. O locus QS *fsr* em *Enterococcus faecalis*, que regula a transcrição de fatores de virulência e aumenta a produção de biofilme nesta espécie, compartilha homologia significativa com o locus *agr* em *Staphylococcus* sp. e está relacionado com a presença de glicose no meio (Pillai et al., 2004; Diani et al., 2014). Todavia, em *S. aureus*, a presença de glicose reprime o sistema *agr*, ou seja, impede a dispersão das células microbianas (Croes et al., 2009). Um recente estudo demonstrou a existência de um operon, que influencia no desenvolvimento do biofilme através da indução pela glicose: *gbaAB* (*glucose induced biofilm accessory gene*) (You et al., 2014).

2.6 Amostras clínicas

As infecções hospitalares ou associadas à saúde (*healthcare-associated infections* – HAI) referem-se àquelas adquiridas durante o curso dos cuidados de saúde em hospitais ou em outros estabelecimentos médicos. A maioria das HAI são aquelas relacionadas com o uso de dispositivos, principalmente em infecções da corrente sanguínea, do trato urinário e de pneumonia com ventilação mecânica. Em adição ao número de vidas perdidas,

as infecções hospitalares causam um impacto econômico de cerca de 16 bilhões de dólares a cada ano, somente nos Estados Unidos (Hassan et al., 2010; Abdallah et al., 2014).

Cálculos estimam que até 80 % das infecções bacterianas crônicas são associadas a biofilmes (Donlan & Costerton, 2002; Antunes et al., 2011; Srey et al., 2013). Um estudo demonstrou que em uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI) havia presença de biofilme em pias, portas e baldes, e em certos casos, contendo até cepas de *S. aureus* resistente à meticilina (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus* – MRSA) (Vichery et al., 2012).

O biofilme é capaz de evadir à resposta imunológica do hospedeiro, visto que os leucócitos polimorfonucleares cercam o biofilme e se tornam ativados, entretanto eles não conseguem migrar para o interior do biofilme, por causa da falta de sinais quimiostáticos. Além disso, o próprio EPS serve como barreira, impedindo a entrada de células imunológicas. Com a persistência da infecção, os polimorfonucleares, numa tentativa de eliminar os microrganismos, extravasam moléculas citotóxicas e proteolíticas, que acabam danificando o tecido circundante (Arciola et al., 2012).

A maioria das infecções em que biofilmes estão envolvidos são osteomielite, endocardite, periodontite, relacionadas com dispositivos implantáveis, pneumonia em pacientes com fibrose cística e infecções oculares. Dentre estas, as infecções relacionadas com dispositivos médicos implantáveis de longa permanência apresentam grande relevância no cenário clínico, sendo que o gênero *Staphylococcus* é um dos microrganismos mais prevalentes (Donlan & Costerton, 2002; Archer et al., 2011). Esta importância

decorre do fato que estes aparelhos estão correlacionados a um número significativo de complicações, incluindo as infecções de corrente circulatória, que resultam em maior mortalidade, custos hospitalares e aumento no tempo de internação em todo o mundo (Sader et al., 2002; Salomão et al., 2008).

A infecção pode ocorrer no momento da implantação, se a integridade da barreira cutânea for rompida, ou após a implantação, podendo ser por meio de traumas ou pela via hematogênica. Como o dispositivo está em contato direto com a corrente circulatória, a superfície do material polimérico se torna rapidamente revestida por uma película de condicionamento constituída principalmente por componentes do soro e proteínas da matriz extracelular derivados do hospedeiro, tais como a albumina, fibrinogênio, fibronectina e laminina. Este depósito providencia uma superfície rica em nutrientes para a adesão bacteriana (Lowy, 1998; Donlan & Costerton, 2002; Gotz, 2002; Von Eiff et al., 2002; Archer et al., 2011).

O tratamento destas infecções é bastante complexo, visto que as células incorporadas em biofilmes podem destacar-se desta estrutura e se tornarem planctônicas, resultando em infecções da corrente sanguínea, endocardite, embolia e espalhamento metastático. Em muitas ocasiões, o implante deve ser retirado, pois com frequência os antimicrobianos não são eficazes para eliminar a população microbiana no biofilme, pelo contrário, podem exercer pressão seletiva em isolados mais resistentes (Donlan & Costerton, 2002; Fitzpatrick et al., 2005; Archer et al., 2011; Otto, 2013).

2.7 Amostras alimentares

É bem estabelecido que muitas bactérias patogênicas formam biofilmes sobre alimentos e superfícies em contato com alimentos, sob condições ambientais apropriadas. A adesão destes microrganismos conduz a problemas higiênicos potenciais, uma vez que os biofilmes propiciam um reservatório de contaminação. Em acréscimo, a ocorrência de biofilmes pode reduzir a transferência de calor e a eficiência operacional em equipamentos que exigem temperaturas controladas. Em sistemas de distribuição de água, a formação de biofilme pode não ser inibida mesmo em índices elevados de cloro. Além disso, os biofilmes podem levar a um aumento do consumo de energia, bloqueio mecânico e acelerar a corrosão de superfícies metálicas (Rode et al., 2007; Shi & Zhu, 2009; Simões et al., 2010).

Intoxicação alimentar é o termo geral para doenças decorrentes da ingestão de alimentos contaminados com toxinas de microrganismos. Estima-se que os gastos envolvidos com patologias veiculadas por alimentos sejam de aproximadamente 77 bilhões de dólares, anualmente, apenas nos Estados Unidos (Scharff, 2012; Abdallah et al., 2014).

Os biofilmes representam um desafio especialmente nos setores de fabricação de cerveja, laticínios, produtos frescos e de processamento de peixes, aves e carne vermelha. As principais fontes de contaminação são os alimentos crus, água, poeira, equipamentos e as mãos dos manipuladores de alimentos (Moretro et al., 2003; Simões et al., 2010; Srey et al., 2013; Abdallah et al., 2014). Diversos fatores influenciam na contaminação cruzada, como composição do alimento (umidade, teor de gordura, formulação), textura

(homogeneidade, rugosidade), propriedades físico-químicas (hidrofobicidade, carga elétrica da superfície), o microrganismo (fase de crescimento, quantidade de inóculo, capacidade de adesão, habilidade de sobreviver a diferentes estresses), condições ambientais (temperatura, pH, umidade relativa), entre outros (Giaouris et al., 2014).

O controle de biofilmes na indústria de alimentos constitui um amplo desafio, visto que são de difícil eliminação, muitas vezes resistentes à limpeza e desinfecção. Desta forma, medidas como implementação de programas de higienização e controle de qualidade são imprescindíveis, tais como Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) (Ribeiro-Furtini & Abreu, 2006; Simões et al., 2010).

2.7.1 Morcilha

A morcilha, também conhecida como chouriço ou morcela, é uma mistura de gordura de porco e peles, cebola, sal e especiarias, podendo ou não ser adicionada de sangue, embutida em tripa natural ou sintética, amarrada manualmente e imersa em banho de água quente a 90 °C. É uma iguaria bastante comum na Península Ibérica e na América Latina, principalmente no Sul do Brasil, Argentina e Uruguai (Mendonça, 2012; Moura et al., 2012).

Dentre os subtipos de morcilha, destacam-se as morcilhas preta e branca. A morcela preta é uma mistura feita com sangue que é coletado no abate do animal – mais comumente de suínos –, cozida, temperada e embutida, geralmente nas tripas do próprio animal e, em seguida, cozida em água fervente. A morcilha branca é preparada com miúdos de suínos, como coração, rins e fígado, e com outras carnes menos nobres, como cabeça,

língua e pele. Estas carnes são cozidas em água, trituradas, salgadas, temperadas e embutidas (Moura, 2011).

A morcilha é composta nutricionalmente de 15 % de proteínas, 32 % de gordura, 1 % de carboidratos e 52 % de água. O pH varia de 6,2 a 7,0 e a atividade de água entre 0,96 e 0,98. Comparando a morcilha com outros produtos cárneos, ela possui valores de pH mais próximos da neutralidade e atividade de água mais elevada, o que favorece o desenvolvimento de microrganismos e, portanto, conduz a um menor poder de conservação (Guerreiro, 2012). Em relação aos padrões microbiológicos, a legislação brasileira preconiza até 10^3 UFC/g para coliformes termotolerantes, 5×10^2 UFC/g de clostrídios sulfito redutores e ausência de *Salmonella* spp em 25g do alimento (Brasil, 2001).

Os produtos cárneos prontos para consumo, processados e secos, podem representar um risco para a saúde humana, visto que são originariamente contaminados por uma gama de gêneros microbianos e estes patógenos podem crescer ou simplesmente sobreviver no substrato como resultado de uma possível contaminação cruzada que ocorre durante as etapas de processamento, devido às manipulações a que são sujeitos (Mendonça, 2012).

2.7.2 Frango

A carne de aves corresponde à parte muscular comestível de aves abatidas, declaradas aptas à alimentação humana por inspeção veterinária oficial antes e após o abate. A carne de frango é cada vez mais consumida em virtude de seu custo altamente competitivo, sendo a segunda em preferência,

atrás apenas da carne bovina. Apresenta boa digestibilidade, além de ser uma boa fonte de proteínas, vitaminas do complexo B e minerais, como ferro e zinco (Santos, 2009). A carne de frango fornece nutrientes necessários em dietas equilibradas, sendo que proteínas, lipídios, vitaminas e minerais encontrados na composição da carne variam de acordo com a raça, idade e condições higiênicas do animal. A carne possui coloração branca, que varia de espécie para espécie e também está relacionada com a atividade física do animal. O componente que confere cor à carne é a mioglobina e, quanto maior a atividade muscular do animal, maior o teor de mioglobina e, portanto, mais escura a carne (Venturini et al., 2007).

A carne, quando fresca, serve como excelente substrato para o desenvolvimento de microrganismos, portanto, o local de abate e manipulação da carne deve seguir normas higiênicas. A ave chega ao abatedouro com uma carga microbiana própria, que pode ser modificada ou aumentada durante as diferentes etapas do processamento e obtenção da carne. A microbiota contaminante se restringe principalmente à superfície e à pele, pois estas são contaminadas pela água, pelo processamento e pelo manuseio das aves. Entretanto, a etapa de evisceração, que promove o seccionamento do intestino, constitui um ponto crítico durante o abate, pois pode levar à contaminação cruzada. Na carne de frango são frequentemente isolados *Staphylococcus* sp., *Salmonella* sp. e *Escherichia coli*, microrganismos patogênicos, além de bactérias associadas à deterioração, como *Pseudomonas* sp. (Santos, 2009; Penteadó & Esmerino, 2011; Souza et al., 2014).

A carne de frango, devido ao seu alto teor proteico, alta disponibilidade de água e pH próximo ao da neutralidade, favorece a multiplicação bacteriana. E, no caso de *Staphylococcus* sp., pode aumentar a capacidade de produzir enterotoxinas, que são termoestáveis e, portanto, resistem ao aquecimento por várias horas durante o processamento. Soma-se a isto, a capacidade dos microrganismos de suportar estresses osmóticos sobre superfícies, através da forma de vida sésil do biofilme, e que podem ser transferidos para o alimento por contaminação cruzada. A contagem de *Staphylococcus* sp. está relacionada com o controle de qualidade higiênico-sanitário da produção de alimentos, condição em que o microrganismo serve como indicador de contaminação pós-processo ou das condições de sanitização das superfícies destinadas ao contato com os alimentos (Santos, 2009; Martins, 2012; Rodriguez-Caturla et al., 2012).

2.8 Análise da diversidade pela tipagem molecular

A análise da biodiversidade baseada em métodos moleculares tem crescido significativamente nas últimas décadas. Segmentos de genes que, embora polimórficos, apresentam estabilidade suficiente para permitir a discriminação de isolados não relacionados, podem ser amplificados e seus produtos analisados. Nesse sentido, métodos de epidemiologia molecular baseados na heterogeneidade genética têm fornecido resultados promissores (Fabiano, 2007).

A tipagem molecular é utilizada para distinguir cepas de dadas espécies, uma vez que permite reconhecer se determinada cepa é ou não o agente causador de uma infecção ou surto originado de uma fonte (Stepán et

al., 2004). Por meio da tipagem pode-se inferir a dispersão e dinâmica populacional bacteriana, seja na natureza ou no ambiente clínico, numa amplitude que pode variar entre um único hospedeiro a um ecossistema mundial (Mattos, 2005; Krizová et al., 2008).

Os métodos de tipagem epidemiológica de estafilococos têm contribuído significativamente no rastreamento da disseminação destes isolados, principalmente em relação ao surgimento de cepas resistentes e virulentas. Preconiza-se que os métodos moleculares sejam rápidos e acurados em identificar a fonte e avaliar a dispersão da infecção. Atualmente existem diversos sistemas de tipagem molecular disponíveis para avaliar a biodiversidade de *Staphylococcus* sp. (Stepán et al., 2004; Sadoyama et al., 2008; Idil & Aksöz, 2013).

A diferenciação de isolados de *Staphylococcus* sp. em subtipos pode ser obtida por diferentes técnicas (Iacumin et al., 2006; Gandra et al., 2008; Begovic et al., 2013), tais como eletroforese em gel de campo pulsado (Deplano et al., 2000), tipagem da sequência multilocos (Seong et al., 2013), PCR do polimorfismo do fragmento de restrição do gene *coa* (Montesinos et al., 2002), PCR do DNA polimórfico randômico amplificado (Ye et al., 2012), PCR do elemento repetitivo (Wang et al., 2015), entre outros.

A eletroforese em campo pulsado ou PFGE (da sigla em inglês: *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) é uma metodologia de eletroforese apropriada para separar grandes fragmentos de DNA, por meio da reorientação do DNA em gel pela ação de campos elétricos alternados. A técnica de PFGE é considerada padrão-ouro para investigação de surtos por *Staphylococcus* sp.

devido ao seu alto poder discriminatório, no entanto, é um método laborioso, fracamente reprodutível e requer *software* especializado para análise e interpretação (Deplano et al., 2000; Magalhães et al., 2005; Church et al., 2011; Wang et al., 2015).

A tipagem de sequências multilocos ou MLST (da sigla em inglês: *Multilocus Sequence Typing*) envolve o sequenciamento de vários genes *house-keeping* diferentes de um organismo, comparando suas sequências a sequências dos mesmos genes de linhagens diferentes do mesmo organismo. A MLST exibe poder de resolução suficiente, em que as linhagens podem ser discriminadas com base em uma única alteração nucleotídica em somente um dos vários genes analisados, todavia não é útil para comparação de organismos em nível superior ao de espécie. Esta técnica exige alto custo técnico e laboratorial (Madigan et al., 2010; Seong et al., 2013).

O polimorfismo de fragmentos de DNA obtidos por enzimas de restrição ou RFLP (da sigla em inglês: *Restriction Fragment Length Polymorphism*) é um método em que fragmentos amplificados por PCR são submetidos à digestão com uma ou mais endonucleases de restrição específica, seguida de eletroforese para verificação do polimorfismo. Para *S. aureus*, esta técnica pode ser utilizada para o estudo de regiões variáveis do gene da coagulase (*coa*). Apesar de ser um método relativamente simples, é oneroso e apresenta moderada discriminação (Stepán et al., 2004; Gandra et al., 2008; Moura et al., 2012).

A técnica do DNA polimórfico amplificado ao acaso ou RAPD-PCR (da sigla em inglês: *Random Amplified Polymorphic DNA*) é baseado no uso de

um oligonucleotídeo iniciador de sequência curta, geralmente em torno de dez bases, elencadas aleatoriamente, que podem ser designadas sem qualquer informação prévia relativa à sequência de DNA do microrganismo alvo. Deste modo, a sequência compreendida entre os oligonucleotídeos iniciadores hibridizados é amplificada arbitrariamente, ou seja, os produtos de PCR terão peso molecular correspondente à distância entre os oligonucleotídeos iniciadores. O número e a localização destas sequências variam em diferentes cepas de uma espécie bacteriana. Uma substituição de bases, inserção ou deleção de nucleotídeos pode alterar o anelamento do oligonucleotídeo e, portanto, resultar em padrões de fragmentos de DNA de pesos moleculares diferentes (Fabiano, 2007; Gandra et al., 2008; Idil & Aksöz, 2013).

O RAPD apresenta como vantagem a pequena quantidade de DNA necessária, visto que o DNA é amplificado por PCR. O PFGE, por exemplo, requer uma quantidade maior, pois não há amplificação, além de requerer uma pureza maior do DNA. Além disso, o RAPD é um método simples, rápido e não oneroso. Apesar do poder discriminatório do RAPD ser menor do que o do PFGE, a amplificação ao acaso é bastante útil para avaliações epidemiológicas de surtos (Fabiano, 2007; Chiang et al., 2014).

O PCR do elemento repetitivo ou rep-PCR (da sigla em inglês: *Repetitive Element Sequence-Based*) é baseado na utilização de um oligonucleotídeo iniciador que representa uma sequência repetida existente no genoma bacteriano, ou seja, é um oligonucleotídeo dirigido (de sequência complementar), usado em condições de maior estringência do que o RAPD-PCR (Esteves, 2005). Famílias de elementos repetitivos intergênicos têm sido

descritas em diversas espécies bacterianas. Estes elementos são sequências genômicas conhecidas, conservadas, repetitivas e de consenso, denominadas de REP (*Repetitive Extragenic Palindromic Elements*), ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) e BOX. Na técnica do rep-PCR, a distribuição aparentemente aleatória de tais repetições permite aos oligonucleotídeos iniciadores complementares gerarem padrões de fragmentos de DNA que são específicos para cepas individuais. (Mattos, 2005; Gandra et al., 2008; Idil & Aksöz, 2013). O rep-PCR é um método simples, rápido e reprodutível que fornece uma boa resolução taxonômica, com poder discriminatório similar ao do RAPD-PCR (Borges et al., 2003; Stepán et al., 2004).

2.9 Atividade antimicrobiana

A biopreservação é uma técnica utilizada para estender a vida útil e aumentar a segurança dos alimentos, por meio do emprego de microbiota protetora ou de seus peptídeos antimicrobianos, as bacteriocinas. Estes compostos são sintetizados no ribossomo e liberados no meio extracelular, apresentando ação bactericida ou bacteriostática, sendo seu espectro de ação dependente da espécie alvo. Nas últimas décadas, uma grande variedade de bacteriocinas foi identificada e caracterizada, sendo que a nisina e as enterocinas são as mais conhecidas (Deegan et al., 2006; Coelho et al., 2007; Gálvez et al., 2008). Elas são comumente empregadas sobre bactérias Gram-positivas, dentre elas, importantes patógenos de veiculação alimentar como *L. monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *B. cereus*, *E. faecalis* e *S. aureus* (Hernández et al., 2005). Além disso, são efetivas em baixa concentração e não promovem alteração na qualidade sensorial do produto (Rodgers, 2001).

Os *Staphylococcus* sp. também são capazes de produzir substâncias que inibam o crescimento de outros microrganismos (Gagliano & Hinsdill, 1970; Coelho et al., 2007; Brito et al., 2011; Al-Gosha'ah et al., 2013). A atividade antimicrobiana é uma característica desejável, uma vez que os *Staphylococcus* sp. podem compartilhar alguns nichos alimentares com outros microrganismos patógenos (Ruaro et al., 2013). Essid et al. (2007) reportaram a presença de isolados de *S. xylosus* obtidos de carnes com atividade inibitória sobre *S. aureus*. Brito et al. (2011) descreveram sobre a capacidade de isolados de *Staphylococcus* sp. procedentes de leite bovino em produzir bacteriocina ativa contra *S. aureus* e *L. monocytogenes*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Isolados de *Staphylococcus* sp.

3.1.1 ECP isolados de cateter venoso central

Trinta e quatro *S. aureus* obtidos de cateter venoso central (CVC) provenientes de diversos pacientes internados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), no período de janeiro de 2008 a maio de 2009, foram selecionados para o presente estudo. Estes isolados foram previamente identificados e caracterizados por Antunes et al. (2011), que os identificou pelo sequenciamento da região 16S rRNA. Os microrganismos foram reconfirmados quanto à morfologia colonial, testes de coloração de Gram, catalase, coagulase e fermentação do manitol. Os isolados foram estocados em caldo *Skim Milk* (Difco®) com 10 % de glicerol a -20 °C.

3.1.2 ECP isolados de carne de frango

Vinte e seis isolados de ECP obtidos de amostras de carne de frango resfriado e congelado foram utilizados, sendo vinte e três *S. aureus*, um *S. delphini*, um *S. schleiferi* e um *S. hyicus*. As amostras foram obtidas de mercados de Cruz Alta e Porto Alegre, em 2011. Estes isolados foram previamente identificados e caracterizados por Martins (2012), que os identificou pelo sequenciamento da região 16S rRNA. Os microrganismos

foram reconfirmados quanto à morfologia colonial, testes de coloração de Gram, catalase, coagulase e fermentação do manitol. Os isolados foram estocados em caldo Skim Milk (Difco[®]) com 10 % de glicerol a -20 °C.

3.1.3 ECN isolados de morcilha

Quarenta e dois isolados de ECN obtidos de amostras de morcilhas branca e preta provenientes do mercado público de Pelotas, em 2008, foram utilizados, sendo vinte e três *S. saprophyticus*, nove *S. carnosus*, quatro *S. vitulinus*, quatro *S. cohnii*, um *S. equorum* e um *Staphylococcus* spp. Os isolados procedentes de morcilha preta receberam a denominação “P” (25 isolados) e os isolados provenientes de morcilha branca receberam a letra “M” (17 isolados) na sigla. Estes isolados foram previamente identificados e caracterizados por Moura (2011), que os identificou pelo sequenciamento da região 16S rRNA. Os microrganismos foram reconfirmados quanto à morfologia colonial, testes de coloração de Gram, catalase, coagulase e fermentação do manitol. Os isolados foram estocados em caldo *Skim Milk* (Difco[®]) com 10 % de glicerol a -20 °C.

3.2 Detecção da formação de biofilme pelo teste da microplaca

A determinação semiquantitativa da formação de biofilme foi realizada através do ensaio da microplaca, conforme descrito por Stepanovic et al., (2007), com algumas modificações. Todos os isolados ($n = 102$) de estafilococos foram avaliados em diversas suplementações e temperaturas. Os isolados foram testados sob temperatura de 35 °C em meio TSB (Oxoid[®]) contendo as suplementações nas seguintes concentrações: (i) 1 % de glicose (Synth[®]), (ii) 5 % de glicose, (iii) 10 % de glicose, (iv) 0,9 % de NaCl

(Cromato[®]), (v) 5 % de glicose e 0,9 % de NaCl, (vi) 12,5 % de plasma de coelho (Laborclin[®]). Além disso, foi verificada a formação de biofilme em meio TSB na condição de 5 % de glicose e 0,9 % de NaCl nas temperaturas de 25 °C e 40 °C. Todos os experimentos foram conduzidos em oitoplicata.

No nosso estudo também foi testada a formação de biofilme nas temperaturas de 5 °C e 42 °C, que representariam a temperatura de refrigeração e próximo da temperatura limite de sobrevivência da bactéria, respectivamente. Todavia não obtivemos crescimento em nenhuma das temperaturas testadas.

Em uma microplaca de poliestireno de fundo chato (COSTAR 3599[®]), contendo 96 poços (12 x 8), foi adicionado em cada poço 20 µL da suspensão bacteriana (turbidez de 0,5 de McFarland ou $1,5 \times 10^8$ UFC/mL) com 180 µL de meio caldo triptona de soja (TSB) contendo os diferentes suplementos, de acordo com a sua concentração. A placa foi incubada em estufa bacteriológica durante 18 horas na respectiva temperatura (25 °C, 35 °C ou 40 °C). Após este período, descartou-se o líquido e efetuaram-se três lavagens com 200 µL de solução fisiológica estéril, de modo a remover as células bacterianas não aderidas à superfície polimérica (células planctônicas). As células bacterianas aderidas foram fixadas com 200 µL de metanol, durante 20 minutos. Então, a microplaca foi invertida e submetida à secagem por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 200 µL de cristal violeta 0,5 % por 15 minutos, para corar as células bacterianas aderidas à microplaca. Após, procedeu-se lavagem das microplacas em água corrente e, depois de secagem à temperatura ambiente, o biofilme corado foi eluído com

200 μ L de etanol, durante 30 minutos. A absorbância foi medida em um comprimento de onda de 450 nm, em aparelho leitor de microplaca (Behring EL 311-HOECHST®).

Em cada microplaca foi testado um controle positivo, reconhecidamente forte formador de biofilme, *S. epidermidis* ATCC 35984, e um controle negativo (branco), sendo apenas de meio TSB, sem inóculo. Os valores obtidos, assim como os desvios padrões, foram calculados de acordo com Stepanovic et al. (2007). O valor da densidade óptica (DO) utilizado foi o valor médio obtido nas oito leituras para cada isolado, subtraído do valor medido para o controle branco; desta forma foi possível excluir os valores mais discrepantes e controlar a variabilidade. Considerou-se produtor de biofilme as amostras, cuja média de leitura da DO para cada isolado, foi maior ao valor do ponto de corte (DOc), definido pela seguinte fórmula: $[B + 3(s)]$, onde B é a média da leitura do branco e s é o desvio padrão das leituras do branco.

Os isolados foram classificados como fortes produtores de biofilme quando $4DOc \leq DO$, moderado quando $2DOc \leq DO \leq 4DOc$, fraco quando $DOc \leq DO \leq 2DOc$ e não produtor de biofilme quando o valor obtido foi igual ou menor ao valor de DOc.

3.2.1 Análise estatística

Os testes estatísticos foram desenvolvidos no programa Portable Statistica 12.0. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste *post hoc* de Tukey, considerando significativo quando $p < 0,05$.

3.3 Análise da diversidade genética dos ECN

3.3.1 Extração de DNA total

Para extração do DNA total, uma colônia pura foi inoculada em 5 mL de caldo BHI (Difco[®]) e incubada sob agitação a 37 °C por 18 horas. Após este período, foi pipetado 2 mL da amostra em um eppendorf e centrifugado a 13.000 rpm (rotações por minuto) por 5 minutos. Então, foi descartado o sobrenadante e lavado o *pellet* três vezes com 300 µL de tampão TE-1X [Tris 10 mM (Invitrogen[®]), EDTA 1 mM (Invitrogen[®]) – pH 7,8]. Em seguida, adicionou-se, em cada eppendorf, 100 µL de TEN [20 mM Tris-HCl (Invitrogen[®]), pH 7,4; 10 mM EDTA, pH 8,0 e 200 mM NaCl (Nuclear[®])], 20 µL de SDS 10 % (Promega[®]) e 5 µL de proteinase K (USB Corporation[®]). Incubou-se a 55 °C por uma hora em banho de aquecimento. Posteriormente, procedeu-se a extração padrão com fenol e precipitação com etanol, conforme o protocolo de Sambrook & Russell (2001), em que se pipetou 200 µL de fenol (Invitrogen[®]) e 15 µL de NaCl 5M (Nuclear[®]), sendo que o eppendorf foi homogeneizado no vórtex por um minuto. Centrifugou-se a 13.000 rpm por 20 minutos e, disto, coletou-se a fase aquosa para outro eppendorf. Foi adicionado 1 mL de etanol absoluto (Pró-Análise[®]) e incubado a -20 °C por, pelo menos, uma hora. Então, centrifugou-se a 13.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. Foi realizado um *spin* e, após, retirou-se o excesso de líquido, restando apenas o *pellet*. Em seguida, deixou-se secar o eppendorf invertido por 5 minutos e ressuspendeu-se o *pellet* com 45 µL de TE-1X. O DNA foi tratado com 5 µL de RNase (Vivantis Technologies[®]) e incubado em banho de

aquecimento a 37 °C por 30 minutos. O DNA foi quantificado em gel de agarose 1,5 % (Invitrogen) e comparado com quantidades conhecidas de lambda DNA (Fermentas[®]). Para a realização das técnicas de PCR foram utilizadas quantidades aproximadas de 20ng de DNA.

3.3.2 Amplificação da região 16S rRNA

A amplificação do gene 16S rRNA, a partir do DNA genômico, foi realizada para verificar se a extração do DNA dos 42 ECN foi bem-sucedida. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram: F-C27 (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) e R-530 (CCGCGGCTGCTGGCACGTA) (Gontang et al., 2007).

As reações foram otimizadas em 25 µL e continham 2 mM MgCl₂ (Invitrogen[®]), 5 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (IDT – Integrated DNA Technologies[®]), 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen[®]), 1x de tampão (Invitrogen[®]), 300 µM de desoxinucleotídeos (ABgene[®]) e água deionizada estéril (Milli Q plus, Millipore[®]). As reações foram amplificadas em termociclador *Amplitherm Thermal Cyclers* nas seguintes condições: 5 minutos a 94°C; seguido por 35 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 58°C e 45 segundos a 72°C; e 5 minutos a 72°C. O produto de PCR esperado de 530 pb foi analisado por eletroforese em gel de agarose.

Os produtos de amplificação por PCR foram analisados por eletroforese em tampão TAE pH 8,0 (40 mM Tris-HCl, 20 mM acetato de sódio, 1 mM EDTA) em gel de agarose 1,5 % (Invitrogen[®]) corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL (Promega[®]), comparando-se com marcador molecular de 100 pb (Invitrogen[®]).

3.3.3 Análise molecular por RAPD-PCR

A tipagem molecular pela técnica de RAPD-PCR dos 42 estafilococos coagulase-negativos foi realizada empregando dois oligonucleotídeos iniciadores: D11344 (AGTGAATTCGCGGTGAGATGCCA) (Akopyanz et al., 1992) e M13 (GAGGGTGGCGGTTCT) (Huey & Hall, 1989). Apenas os isolados provenientes de morcilha foram avaliados quanto à diversidade genética, pois os microrganismos dos demais grupos já foram testados por estes métodos (Pinto, 2014).

Para a técnica de RAPD-PCR para o oligonucleotídeo iniciador D11344 as reações de PCR foram otimizadas em 25 µL de volume total e continham 3 mM MgCl₂ (Invitrogen), 20 pmol do oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen[®]), 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen[®]), 1x de tampão (Invitrogen[®]), 250 µM de desoxinucleotídeos (ABgene[®]), 100 ng de DNA e água deionizada estéril (Milli Q plus, Millipore[®]). As reações foram amplificadas no termociclador *Amplitherm Thermal Cyclers*, nas seguintes condições: 2 minutos a 94 °C; seguido por 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 42 °C e 1 minuto e 30 segundos a 72 °C; e 10 minutos a 72 °C (Andrighetto et al., 2002).

Para a técnica de RAPD-PCR para o oligonucleotídeo iniciador M13, o volume final da reação foi de 25 µL, contendo: 1x de tampão (Invitrogen[®]), 3 mM de MgCl₂ (Invitrogen[®]), 200 µM de desoxinucleotídeos (ABgene[®]), 2,4 µM de oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen[®]), 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen[®]), 100 ng de DNA e água deionizada estéril para completar o volume (MilliQPlus, Millipore[®]). Os produtos foram amplificados em

termociclador *Amplitherm Thermal Cyclers* nas seguintes condições: 5 minutos a 94 °C; seguido por 40 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 30 segundos a 37 °C e 1 minuto a 72 °C; e 5 minutos a 72 °C. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5 % e corados com brometo de etídio. O gel foi fotografado sob luz UV utilizando o software Kodak Digital Science™ DC120.

3.3.4 Análise molecular pelo rep-PCR

A tipagem molecular pelo método de rep-PCR para os 42 estafilococos coagulase-negativos isolados de morcilha foi realizada com o oligonucleotídeo iniciador RW3A, conforme descrito por Santos et al. (2001), com algumas modificações. Perfis genéticos foram gerados utilizando o oligonucleotídeo iniciador RW3A (TCGCTAAAACAACGACACC) da sequência repetitiva RepMP3 do *M. pneumoniae* (Wenzel & Herrmann, 1988). As reações da PCR foram otimizadas em 25 µL e continham 3 mM MgCl₂ (Invitrogen®), 37,5 pmol do oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen®), 1,25 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®), 1x de tampão (Invitrogen®), 250 µM de desoxinucleotídeos (ABgene®), 100 ng de DNA e água deionizada estéril (Milli Q plus, Millipore®). As reações foram amplificadas no termociclador *Amplitherm Thermal Cyclers*, nas seguintes condições: 3 minutos a 95 °C; seguido por 40 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto e 30 segundos a 54 °C e 2 minutos a 72 °C; e 10 minutos a 72 °C.

3.3.5 Análise dos resultados de tipagem dos isolados

Os quarenta e dois isolados de ECN foram avaliados quanto à tipagem molecular. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em

gel de agarose a 1,5 % e corados com brometo de etídio. O gel foi fotografado sob luz UV utilizando o software Kodak Digital Science™ DC120. Os perfis de bandas gerados pelo RAPD-PCR e rep-PCR foram analisados com o software Gel-Pro Analyzer 32 após a normalização com marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen®). Para assegurar a acurácia do método de PCR, cada isolado foi tipado pelo menos duas vezes para cada método. Isolados com diferença de um ou mais fragmentos de bandas foram considerados clones diferentes.

A análise de similaridade entre os isolados foi baseada na presença ou ausência de bandas específicas nas análises do RAPD-PCR e rep-PCR. A matriz de similaridade foi obtida por meio de comparações entre pares de cepas utilizando o coeficiente de similaridade de Dice. Para essas análises, foi utilizado o pacote de software NTSYS-pc (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis Sistem*), versão 2.01. Um dendrograma foi construído usando o método de *un weighted pair group* com média aritmética (UPGMA).

3.4 Caracterização fenotípica de fatores de virulência

3.4.1 Atividade das proteases

Os quarenta e dois isolados de ECN foram avaliados quanto à atividade das proteases, que foi determinada conforme Ruaro et al. (2013). As amostras foram inoculadas por picada em ágar *Skim Milk* e incubadas a 37 °C por 48 horas. Os testes foram conduzidos em duplicata e foi utilizada uma cepa de *Bacillus* sp. reconhecidamente produtora de proteases como controle positivo. A atividade proteolítica foi evidenciada pelo aparecimento de um halo

de clarificação ao redor da colônia, devido à degradação das caseínas presentes no leite.

3.4.2 Atividade das lipases

Os quarenta e dois isolados de ECN foram avaliados quanto à atividade das lipases, que foi determinada conforme Ruaro et al. (2013). As amostras foram inoculadas por picada em ágar tributirina e incubadas a 37 °C por 72 horas. O meio continha 5 g/L de peptona (Synth[®]), 3 g/L de extrato de levedura (Synth[®]), 10 g/L de tributirina (Sigma-Aldrich[®]) e 12 g/L de ágar (Kasvi[®]). Os testes foram conduzidos em duplicata e foi utilizada uma cepa de *Candida parapsilosis* reconhecidamente produtora de lipases como controle positivo. A atividade lipolítica foi evidenciada pelo aparecimento de um halo de clarificação ao redor da colônia, devido à degradação da tributirina presente no meio de cultura.

3.5 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos quarenta e dois isolados de ECN foi determinada pelo ensaio de dupla camada, de acordo com Tagg & McGiven (1971), em que foi testado contra microrganismos relevantes na indústria de alimentos: *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* e *Listeria monocytogenes*.

Nesta metodologia, as cepas de ECN foram semeadas em picada em uma placa contendo ágar TSA (triptona de soja) (Kasvi[®]) e incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 24 horas. Após o período de incubação, foi vertida uma segunda camada de caldo BHI (infusão de cérebro e coração) (Himedia[®]) semi-sólido (0,7 % de ágar) previamente inoculado com o microrganismo indicador, na concentração de 10⁶ células/mL. A placa foi

novamente incubada em estufa a 35 °C por 24 horas e, em seguida, verificada quanto à presença de halos de inibição ao redor da colônia de ECN, que indicam a atividade antimicrobiana deste sobre o microrganismo indicador.

4 RESULTADOS

4.1 Isolados bacterianos

Os 102 estafilococos selecionados, 34 provenientes de CVC, 26 de amostras de carne de frango e 42 de amostras de morcilha confirmaram pertencentes ao gênero *Staphylococcus* sp., pelo ensaio de coloração de Gram, prova da atividade da enzima catalase, ensaio da atividade da enzima coagulase e fermentação do açúcar manitol.

4.2 Determinação da capacidade de produção de biofilme dos isolados sob diferentes suplementos e temperaturas

A detecção fenotípica da capacidade de formação de biofilme dos 102 isolados de *Staphylococcus* sp. provenientes de CVC, carne de frango e morcilha foi realizada por ensaio semiquantitativo em microplaca através de dois testes: o primeiro foi empregando o meio TSB suplementado com diferentes compostos a 35 °C (Tabela 1) e o segundo avaliando a capacidade de formação de biofilme dos isolados quando inoculados em meio TSB suplementado com glicose e NaCl e incubados a diferentes temperaturas (Tabela 2).

TABELA 1. Classificação quanto à capacidade de formação de biofilme em estafilococos coagulase negativos e positivos sob diferentes suplementações.

Suplementação a 35 °C	Capacidade de formação de biofilme	M ¹ (%)	CF ² (%)	Total de alimentos (M + CF) (%)	CVC ³ (%)	Total (%)
1 % de glicose ^b	Não formador	7 (16,67)	0	7 (10,29)	0	7 (6,86)
	Fraco	21 (50)	2 (7,69)	23 (33,82)	26 (76,47)	49 (48,04)
	Moderado	13 (30,95)	1 (3,85)	14 (20,59)	8 (23,53)	22 (21,57)
	Forte	1 (2,38)	23 (88,46)	24 (35,29)	0	24 (23,53)
5 % de glicose ^{a,b}	Não formador	8 (19,05)	0	8 (11,76)	0	8 (7,84)
	Fraco	20 (47,62)	4 (7,69)	24 (35,29)	13 (38,24)	37 (36,27)
	Moderado	13 (30,95)	0	13 (19,12)	16 (47,06)	29 (28,43)
	Forte	1 (2,38)	22 (84,62)	23 (33,82)	5 (14,71)	28 (27,45)
10 % de glicose ^{a,b}	Não formador	8 (19,05)	0	8 (11,76)	0	8 (7,84)
	Fraco	14 (33,33)	1 (3,85)	15 (22,06)	16 (47,06)	31 (30,39)
	Moderado	18 (42,86)	1 (3,85)	19 (27,94)	18 (52,94)	37 (36,27)
	Forte	2 (4,76)	24 (92,31)	26 (38,24)	0	26 (25,49)
0,9 % de NaCl ^b	Não formador	10 (23,81)	0	10 (14,71)	3 (8,82)	13 (12,75)
	Fraco	23 (54,76)	3 (11,54)	26 (38,24)	21 (61,76)	47 (46,08)
	Moderado	7 (16,67)	3 (11,54)	10 (14,71)	6 (17,65)	16 (15,69)
	Forte	2 (4,76)	20 (76,92)	22 (32,35)	4 (11,76)	26 (25,49)
12,5 % de plasma ^a	Não formador	3 (7,14)	0	3 (4,41)	0	3 (2,94)
	Fraco	17 (40,48)	1 (3,85)	18 (26,47)	1 (2,94)	19 (18,63)
	Moderado	18 (42,86)	7 (26,92)	25 (36,76)	15 (44,12)	40 (39,22)
	Forte	4 (9,52)	18 (69,23)	22 (32,35)	18 (52,94)	40 (39,22)

¹ M: Morcilha; ² CF: Carne de Frango; ³ CVC: Cateter Venoso Central (p<0,05).

TABELA 2. Classificação quanto à capacidade de formação de biofilme em estafilococos coagulase negativos e positivos crescendo em meio TSB suplementado com 5 % de glicose e 0,9 % de NaCl sob diferentes temperaturas de incubação.

Temperatura de incubação	Capacidade de formação de biofilme	M ¹ (%)	CF ² (%)	Total de alimentos (M + CF) (%)	CVC ³ (%)	Total (%)
5 % de glicose + 0,9 % de NaCl a 25 °C ^b	Não formador	15 (35,71)	1 (3,85)	16 (23,53)	1 (2,94)	17 (16,67)
	Fraco	17 (40,48)	1 (3,85)	18 (26,47)	17 (50)	35 (34,31)
	Moderado	8 (19,05)	0	8 (11,76)	12 (35,29)	20 (19,61)
	Forte	2 (4,76)	24 (92,31)	26 (38,24)	4 (11,76)	30 (29,41)
5 % de glicose + 0,9 % de NaCl a 35 °C ^{a,b}	Não formador	4 (9,52)	0	4 (5,88)	0	4 (3,92)
	Fraco	21 (50)	2 (7,69)	23 (33,82)	9 (26,47)	32 (31,37)
	Moderado	15 (35,71)	3 (11,54)	18 (26,47)	14 (41,18)	32 (31,37)
	Forte	2 (4,76)	21 (80,77)	23 (33,82)	11 (32,35)	34 (33,33)
5 % de glicose + 0,9 % de NaCl a 40 °C ^b	Não formador	9 (21,43)	0	9 (13,24)	0	9 (8,82)
	Fraco	16 (38,1)	1 (3,85)	17 (25)	21 (61,76)	38 (37,25)
	Moderado	13 (30,95)	1 (3,85)	14 (20,59)	12 (35,29)	26 (25,49)
	Forte	4 (9,52)	24 (92,31)	28 (41,18)	1 (2,94)	29 (28,43)

¹ M: Morcilha; ² CF: Carne de Frango; ³ CVC: Cateter Venoso Central (p<0,05).

Quando analisados os suplementos adicionados ao meio TSB, observou-se que a adição de 1 % de glicose apresentou diferenças entre os grupos de estafilococos testados. No grupo de isolados provenientes de CVC, todos apresentaram capacidade de formar biofilme, sendo 76,47 % fracos formadores e 23,53 % moderados formadores. Já nos isolados de carne de frango, igualmente todos formaram biofilme, todavia, a maioria foi forte formadora (88,46 %). Em relação aos isolados de morcilha, 16,67 % dos

isolados não formaram biofilme, enquanto que, dentre os produtores de biofilme, a maioria apresentou fraca formação.

Com a adição de 5 % de glicose no meio TSB, no grupo de CVC, houve um aumento no número de isolados com produção moderada e forte de biofilme, 47,06 % e 14,71 %, respectivamente. Entretanto, não houve mudança significativa nos grupos de carne de frango e morcilha. Já a 10% de glicose, houve um aumento da produção de biofilme nos grupos de isolados alimentares, quanto a ser moderado ou forte formador, que não foi refletido da mesma maneira nos isolados clínicos.

Na análise com apenas 0,9 % de NaCl, o índice de não formadores aumentou para o grupo de isolados de morcilha (23,81 %) e CVC (8,82 %), bem como houve uma diminuição da intensidade de formação de biofilme para todos os grupos. Dentre os isolados provenientes de morcilha, a maioria foi fraca formadora (54,76 %), superando os 50 % da classificação equivalente para o teste com 1 % de glicose. No grupo de isolados de carne de frango, houve um decréscimo dos fortes formadores (76,92 %), quando comparado a todas as suplementações com glicose.

A adição de 12,5 % de plasma de coelho causou um aumento significativo na intensidade de produção de biofilme nos isolados clínicos. Enquanto que nas avaliações com NaCl e em diversas concentrações de glicose, a maioria dos isolados encaixou-se nos grupos de fracos ou moderados formadores; com a adição do plasma, 52,94 % dos isolados apresentaram forte formação de biofilme. Além do mais, todos os isolados foram capazes de formar biofilme neste grupo. Em contrapartida, para os

isolados alimentares, houve apenas um discreto aumento, principalmente em relação aos isolados que não foram capazes de formar biofilme em outras suplementações e, com o uso de plasma, apresentaram capacidade de produção.

No segundo teste, avaliando diferentes temperaturas de incubação, utilizou-se o meio TSB suplementado com 5 % de glicose e 0,9 % de NaCl sob três diferentes temperaturas: 25 °C, 35 °C e 40 °C. Na temperatura de incubação de 25 °C, apenas 64,29 % dos isolados de morcilha foram capazes de formar biofilme, enquanto que a 35 °C e 40 °C, este número aumentou para 90,48 % e 78,57 %, respectivamente. Em relação aos isolados clínicos, na temperatura de 35 °C encontrou-se a maior porcentagem de fortes formadores (32,35 %). Para os isolados alimentares, a maior porcentagem de forte formação de biofilme foi a 40 °C (41,18 %).

Comparando os cento e dois isolados de estafilococos quanto à formação de biofilme em diferentes suplementações e temperaturas, houve diferença significativa em relação ao uso de plasma, com os grupos 1 % de glicose, 0,9 % de NaCl, combinação de glicose e NaCl a 25 °C e a 40 °C ($p < 0,05$). O plasma teve desempenho semelhante aos grupos 5 % de glicose ($p = 0,06$), 10 % de glicose ($p = 0,13$) e glicose e NaCl a 35 °C ($p = 0,78$).

Quando analisados separadamente, os isolados provenientes de frango não apresentaram diferença significativa quanto à produção de biofilme em diferentes suplementações e temperaturas. Já os isolados procedentes de morcilha apresentaram diferença entre o uso de plasma e glicose com NaCl a 25 °C ($p < 0,01$). Em contrapartida, em relação aos isolados clínicos, o plasma

apresentou desempenho equivalente apenas a NaCl e glicose a 35 °C ($p=0,09$).

A influência da glicose, NaCl, plasma e diferentes temperaturas na formação de biofilme foi também verificada quanto ao valor da densidade óptica a 450 nm (Figura 3). Os três grupos apresentaram perfis heterogêneos, uma vez que os isolados de frango foram maiores produtores de biofilme do que os isolados de CVC e morcilha.

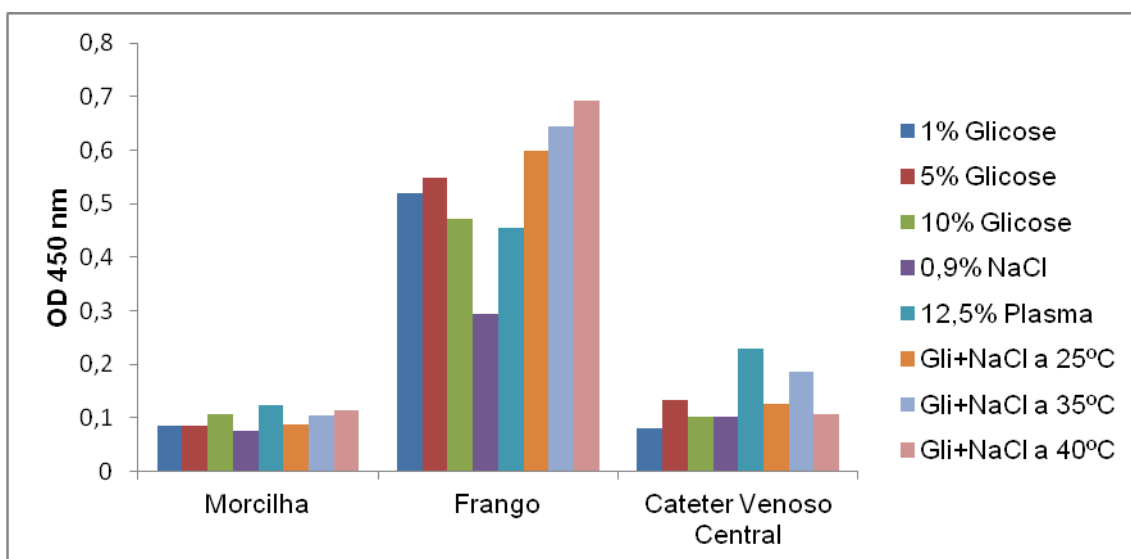


FIGURA 3. Média dos valores de densidade óptica na formação de biofilme em *Staphylococcus* sp. isolados de morcilha, carne de frango e cateter venoso central inoculados em meio TSB e suplementados com diferentes compostos e incubados sob diferentes temperaturas.

4.3 Análise da diversidade genética dos isolados de estafilococos coagulase-negativos

A análise da diversidade genética dos quarenta e dois isolados de ECN provenientes de morcilhas pretas e brancas foi realizada por meio da comparação visual dos perfis de amplificação gerados pelas técnicas de RAPD-PCR e rep-PCR.

4.3.1 RAPD-PCR

A RAPD-PCR foi testada com os oligonucleotídeos iniciadores D11344 e M13, sendo que o M13 não revelou fragmentos de DNA. Este resultado foi considerado após uma série de testes sob diferentes condições, tais como diversas concentrações de cloreto de magnésio, várias temperaturas de anelamento, quantidades distintas de DNA, entre outros. Além do mais, foram também utilizados controles positivos.

O oligonucleotídeo iniciador D11344 revelou fragmentos de DNA de pesos moleculares entre 150 a 2000 pares de bases no gel de agarose a 1,5 % e um total de 8 perfis genotípicos. Para cada um dos padrões de amplificação gerados foi dado uma letra de A a H (Figura 4).

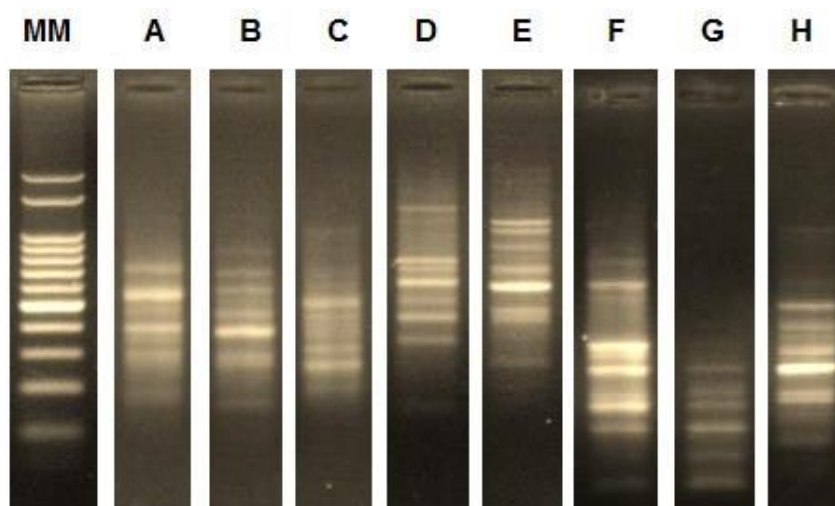


FIGURA 4. Gel de agarose a 1,5 % demonstrando os 8 perfis de bandas (A, B, C, D, E, F, G, H) dos isolados de ECN provenientes de morchilha gerados pela técnica de RAPD-PCR com o oligonucleotídeo iniciador D11344 (MM: marcador de peso molecular *ladder* 100 pb, Ludwig).

Os perfis de fragmentos de DNA gerados pela técnica de RAPD-PCR dos 42 isolados foram submetidos à análise de grupamento para avaliar a diversidade ou similaridade genética entre os isolados de ECN e explorar sua relação com as suas diferentes origens, preta (P) ou branca (M) (Figura 5). Como observado, oito clones foram identificados e denominados de A, B, C, D, E, F, G e H. Avaliando os grupamentos formados com 75 % de similaridade, cinco grupamentos foram determinados (I, II, III, IV, V).

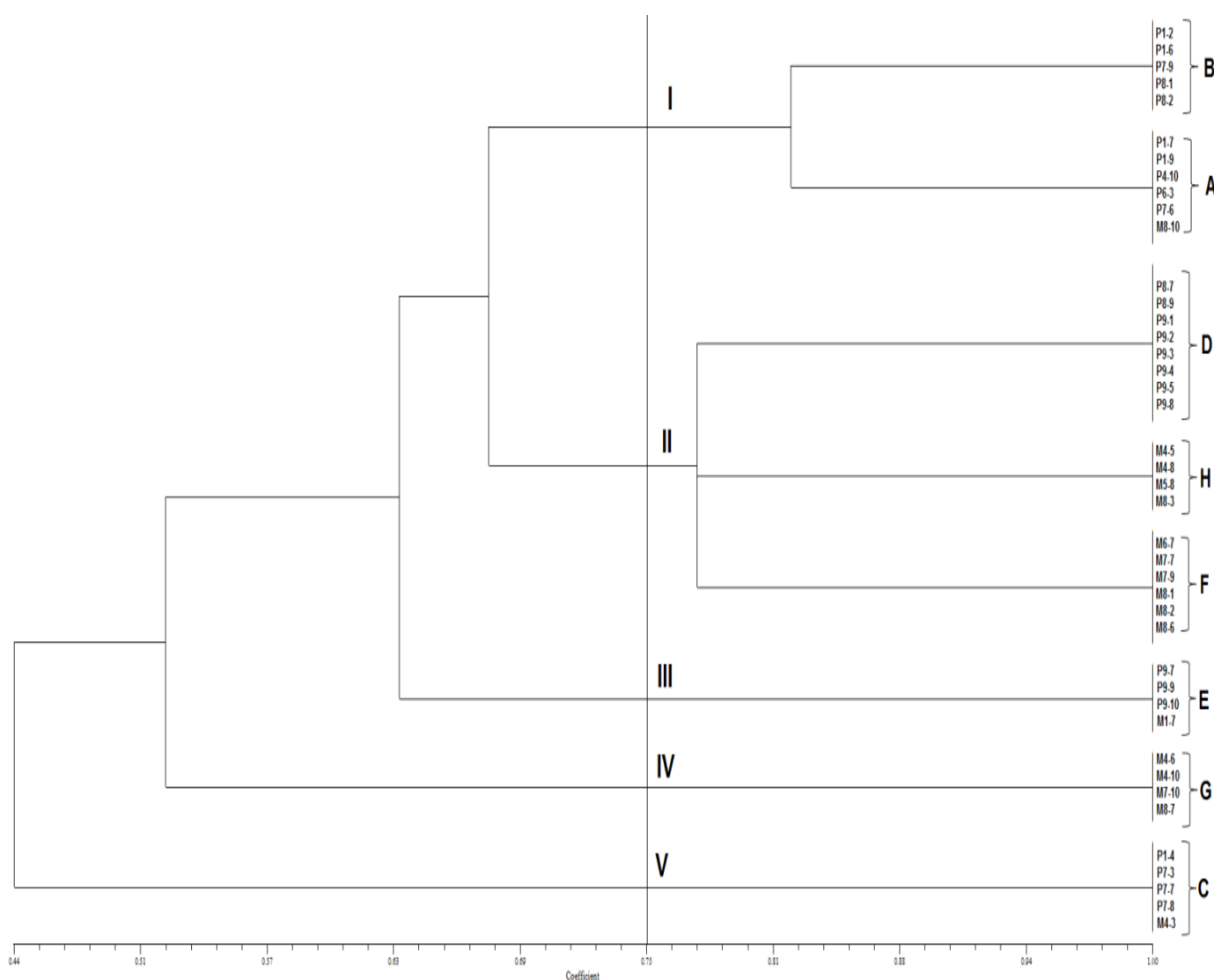


FIGURA 5. Dendrograma gerado da análise da RAPD-PCR dos 42 ECN isolados de morcilha preta e branca. Oito clones foram identificados (A, B, C, D, E, F, G, H). Avaliando os grupamentos formados com 75 % de similaridade, cinco grupamentos foram determinados (I, II, III, IV, V).

O clone do tipo D foi encontrado em 19,05 % (8/42) e correspondeu à maioria dos isolados. Os outros clones mais prevalentes foram os tipos A e F, com 14,28 % (6/42) cada. Os tipos B e C obtiveram 11,9 % (5/42) e os clones menos prevalentes foram os dos tipos E, G e H, com apenas 9,53 % (4/42) cada. Foi possível verificar uma maior diversidade entre os isolados de morcilha, uma vez que o nível de dissimilaridade chegou a 44 %.

Estabeleceu-se um ponto de corte de 75 % de similaridade, que dividiu os isolados em cinco grupos (I, II, III, IV e V). No grupo I, 26,19 % (11/42) dos isolados estiveram presentes, correspondendo a dois clones. O grupo mais prevalente foi o grupo II, em que pertenciam 42,85 % (18/42) dos isolados, referentes a três clones. Os demais grupos, III, IV e V, abrangeram apenas um clone cada, correspondendo a 9,53 % (4/42) nos dois primeiros e 11,9 % (5/42) no último.

4.3.2 rep-PCR

A amplificação dos isolados utilizando o oligonucleotídeo iniciador RW3A revelou um total de 12 perfis de fragmentos de DNA de diferentes tamanhos no gel de agarose a 1,5 %. O peso molecular dos fragmentos de DNA variou entre 180 a 1880 pares de bases. Para cada um dos padrões de amplificação gerados foi dado uma letra de A a L (Figura 6).

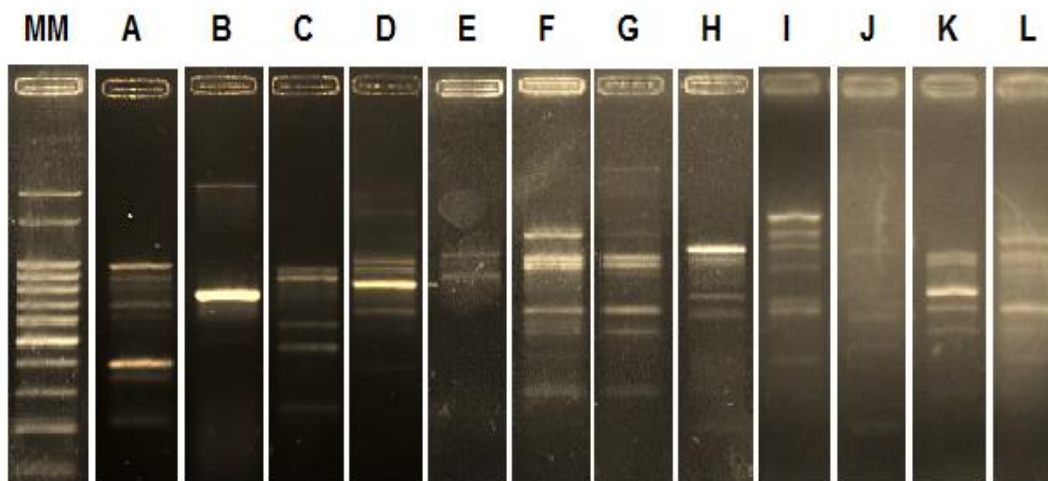


Figura 6. Gel de agarose a 1,5 % demonstrando os 12 perfis de fragmentos de DNA (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L) amplificados pela técnica de rep-PCR com o oligonucleotídeo iniciador RW3A dos ECN isolados de morcilha (MM: marcador de peso molecular *ladder* 100 pb, Ludwig).

Os perfis foram submetidos à análise de agrupamento para avaliar a diversidade ou similaridade genética dos isolados de ECN e explorar sua relação com as suas diferentes origens (Figura 7). Doze clones foram identificados e nomeados de A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K e L. Avaliando os agrupamentos formados com 69% de similaridade, cinco agrupamentos foram determinados (I, II, III, IV, V).

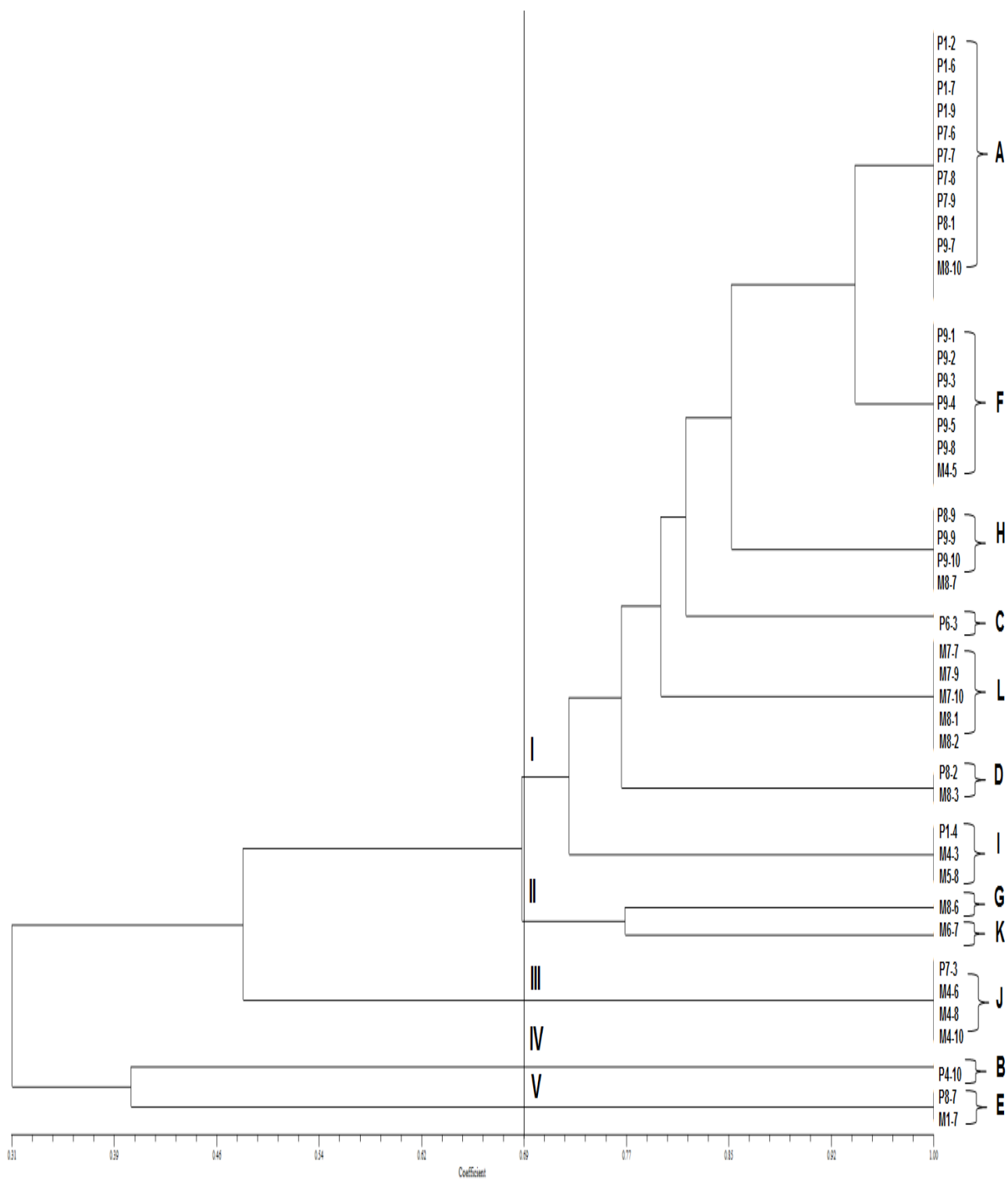


FIGURA 7. Dendrograma gerado pelos fragmentos de DNA amplificados pela técnica de rep-PCR empregando o oligonucleotídeo iniciador RW3A dos 42 ECN isolados de morcilha preta e branca. Doze clones foram identificados (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L). Avaliando os grupamentos formados com 69% de similaridade, cinco grupamentos foram determinados (I, II, III, IV, V).

O clone tipo A foi encontrado em 26,2 % (11/42) e correspondeu à maioria dos isolados. O clone tipo F foi o segundo mais prevalente, com 16,67 % dos isolados (7/42), seguido pelo tipo L, com 11,9 % (5/42). Quatro isolados apresentaram perfis únicos, pertencentes aos tipos B, C, G e K. O nível de dissimilaridade foi de 31 %, inferior ao encontrado na metodologia RAPD-PCR.

Estabeleceu-se um ponto de corte de 69 % de similaridade, que dividiu os isolados em cinco grupos (I, II, III, IV e V). O grupo I foi o que abrangeu o maior número de isolados, 78,58 % (33/42), correspondendo a sete clones. O grupo II compreendeu 4,76 % (2/42) dos isolados, referentes a dois clones. Os demais grupos, III, IV e V, abrangeram apenas um clone cada, correspondendo a 9,52 % (4/42), 2,38 % (1/42) e 4,76 % (2/42) dos isolados, respectivamente.

4.4 Verificação da atividade das enzimas proteases e lipases nos ECN

As atividades proteolítica e lipolítica dos quarenta e dois isolados de ECN provenientes de morcilhas brancas e pretas foram verificadas por meio da visualização dos halos em ágar *Skim Milk* e tributirina a 37 °C, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Atividade proteolítica e lipolítica de estafilococos coagulase-negativos isolados de morcilha.

Resultado	Protease (%)	Lipase (%)
Positivo	12 (28,57)	24 (57,14)
Negativo	25 (59,52)	12 (28,57)
Indeterminado	5 (11,91)	6 (14,29)

Em relação à atividade das proteases, a maioria dos isolados (59,52 %) não expressou enzimas que degradam proteínas presentes no leite. Cinco isolados (11,91 %) não foram capazes de crescer em ágar *Skim Milk*, portanto, a expressão das proteases foi considerada indeterminada.

Quanto à atividade das lipases, a maioria dos isolados (57,14 %) foi capaz de degradar a tributirina e, por conseguinte, expressar enzimas que degradam lipídios. Seis isolados (14,29 %) não foram capazes de crescer em ágar tributirina, sendo considerados indeterminados com relação à atividade das lipases.

Nove isolados apresentaram atividades proteolítica e lipolítica simultaneamente. Dentre os isolados que foram classificados como indeterminados, cinco não foram capazes de crescer em ambos os meios testados.

4.5 Avaliação da capacidade dos ECN de inibir o crescimento de outros microrganismos

Todos os quarenta e dois isolados de ECN provenientes de morcilha foram incapazes de inibir os microrganismos indicadores *B. cereus*, *E. faecalis* e *L. monocytogenes*.

5 DISCUSSÃO

5.1 Determinação da capacidade de produção de biofilme

Os cento e dois isolados de *Staphylococcus* sp. – provenientes de amostras de morcilha, carne de frango e cateter venoso central – apresentaram desempenhos heterogêneos com relação à produção de biofilme. De forma geral, os isolados alimentares apresentaram um perfil de formação de biofilme mais expressivo, quando comparados aos isolados clínicos. Dentre os isolados alimentares, as amostras de carne de frango obtiveram maior porcentagem de produção de biofilme do que os isolados de morcilha.

Na metodologia padrão com 1 % de glicose, todos os isolados clínicos foram produtores de biofilme, todavia sendo fracos formadores (76,47 %). A detecção da formação de biofilme em amostras clínicas de *S. aureus* tem variado entre 29,7 % a 100 % em diversos tipos de materiais (Knobloch et al., 2002; Rode et al., 2007; Reiter et al., 2011; Cakir et al., 2013; Jo et al., 2013). Rode et al. (2007) demonstraram que todos os isolados provenientes de dispositivos médicos foram formadores de biofilme, resultado concordante com o encontrado em nosso estudo.

A metodologia mais amplamente empregada para detecção de biofilmes *in vitro* de *Staphylococcus* sp. é o ensaio semiquantitativo em microplacas. Entretanto, no caso de isolados hospitalares, há a necessidade de

se utilizar algumas modificações específicas, tais como, incluir o pré-revestimento das cavidades da placa de microtitulação com moléculas da matriz humana ou adição de soro humano e suplementação do meio com sal e glicose, de modo a simular o máximo possível a conjuntura *in vivo* durante o processo infeccioso. Isto decorre do alto índice de sub-deteção de biofilmes *in vitro* como resultado da perda de interação que ocorre *in vivo*, como a adesão das moléculas de superfície da bactéria com os componentes da matriz do hospedeiro (Götz, 2002; Cassat et al., 2007; Archer et al., 2011; Otto, 2013; Lebeaux et al., 2013).

Pinto (2014) testou os mesmos estafilococos coagulase-positivos isolados de CVC com relação à formação de biofilme em TSB suplementado com 1 % de glicose e obteve um alto índice de não formadores (94,12 %). Em contrapartida a esse resultado, nosso estudo demonstrou que o uso de plasma conduziu a uma deteção mais acurada da formação de biofilme (100 % de formadores).

O plasma é o maior componente do sangue e é composto por uma série de fatores de coagulação, albumina, globulinas, fibrinogênio, entre outros componentes que favorecem a aderência de microrganismos (Herrmann et al., 1988). A suplementação de meios com o plasma, bem como a de superfícies de revestimento, pode facilitar a adesão de *S. aureus*, além de promover a formação de biofilme *in vitro* (Chen et al., 2012; Walker & Horswill, 2012).

A suplementação de meios com plasma em uma concentração entre 10 a 25 % tem sido observada como a melhor condição para desenvolvimento de biofilmes (Chen et al., 2012; Bedran et al., 2013; Cardile et al., 2014).

Consistente a estes estudos, nosso trabalho utilizou uma suplementação de caldo triptona de soja contendo plasma em uma concentração de 12,5 %.

O plasma apresentou diferença estatística em relação à suplementação padrão de 1 % de glicose, concordante com os resultados encontrados por Bedran et al. (2013) e Cardile et al. (2014), bem como proporcionou um aumento superior a 50 % dentre os fortes produtores de biofilme. Portanto, preconiza-se que a detecção laboratorial de biofilme em isolados clínicos seja realizada com a adição no meio de componentes da matriz do hospedeiro, tais como o plasma, conduzindo a resultados mais condizentes com a situação *in vivo*.

Nos isolados de cateter venoso central, além do plasma, apenas a adição de 5 % de glicose e de glicose a 5 % com NaCl a 0,9 % no meio TSB na temperatura de 35 °C apresentaram diferença estatística em relação à 1 % de glicose. O estudo de Agarwal & Jain (2011) demonstrou que isolados clínicos aumentam a produção de biofilme quando expostos a concentrações crescentes de glicose e cloreto de sódio, principalmente quando combinados, exercendo um efeito sinérgico. Outros estudos demonstram que a adição de 0,2 % de glicose em caldo triptona de soja já é suficiente para induzir a formação de biofilme e que um aumento na concentração de glicose em até 1 % aumenta a produção de biofilme significativamente (Knobloch et al., 2002; Seidl et al., 2008).

A suplementação de 10 % de glicose e 0,9 % de cloreto de sódio para produção de biofilme nos isolados de CVC não apresentaram diferença estatística com relação à 1 % de glicose, corroborando os estudos de Rode et

al., (2007), Croes et al. (2009), Cirkovic et al. (2006) e Pan et al. (2010). Croes et al. (2009) demonstraram que a presença de glicose reprime o sistema *agr*, por meio da diminuição do pH, e acarreta uma maior formação de biofilme em isolados clínicos quando em concentrações próximas às dos níveis sanguíneos (0,1 %).

O'Neill et al. (2007) verificaram que isolados clínicos de *S. aureus* sensíveis à metilina tinham maior propensão a formar biofilmes em meios suplementados apenas com cloreto de sódio, enquanto que isolados resistentes à metilina eram capazes de produzir biofilme tanto em meios com glicose, quanto com NaCl. As adesinas presentes em um biofilme têm um papel mais relevante nos isolados sensíveis à metilina do que nos resistentes, e tiveram sua expressão aumentada quando induzidas apenas pelo NaCl. Isto significa que uma concentração mais elevada de glicose pode não influenciar algumas cepas bacterianas, visto que o microrganismo utiliza rotas metabólicas alternativas, que conduzem à modulação de genes responsáveis pela formação de biofilme.

Cirkovic et al. (2006) evidenciaram que concentrações mais elevadas de cloreto de sódio (acima de 5 %) não acarretam um aumento na produção de biofilme em *Salmonella* sp., pelo contrário, inibiam a formação. Resultados semelhantes foram encontrados por Martinez (2011) em *Pseudomonas aeruginosa* e *Stenotrophomonas maltophilia* e por Pan et al. (2010) em *L. monocytogenes* a 37 °C.

A presença de nutrientes no microambiente de um biofilme desempenha um papel importante na regulação do sistema *sarA* e na estimulação da produção de ácidos teicóicos e de componentes da PIA, uma adesina extracelular. Rachid et al. (2000) evidenciaram um aumento na produção de biofilme e da indução da expressão do locus *ica* em *S. aureus* e *S. epidermidis* na presença de glicose e cloreto de sódio; todavia, Dobinsky et al. (2003) demonstraram que a glicose estimula a expressão do *ica* apenas durante a fase exponencial de crescimento bacteriano e que a produção da PIA é inibida pela presença de glicose durante a fase estacionária. Também, especula-se que o gene *rbf* esteja envolvido na regulação do biofilme durante a etapa de agregação em múltiplas camadas em resposta à presença de glicose e cloreto de sódio no meio, por meio da repressão do *icaR*, um regulador negativo do *icaADBC* (Lim et al., 2003; Rode et al., 2007; Seidl et al., 2008; Cue et al., 2009).

Jackson et al. (2002) observaram que múltiplas espécie de *Enterobacteriaceae* reprimem a formação de biofilme na presença de glicose. Resultados similares foram documentados em microrganismos Gram-positivos, visto que Stanley et al. (2002) evidenciaram que a glicose inibia a agregação bacteriana em biofilmes em *Bacillus subtilis* pelo controle da proteína CcpA, indicando que a formação de biofilme é inibida pela presença de uma fonte de carbono metabolizável rapidamente. Kristich et al. (2004) demonstraram que a suplementação com glicose causa diminuição da produção de biofilme em *E. faecalis*, enquanto Baldassarri et al. (2001) e Pillai et al. (2004) evidenciaram o oposto. De acordo com estes autores, a glicose é responsável pela mediação

da expressão do sistema *fsr* em *Enterococcus* sp., análogo ao sistema *quorum sensing agr* em *Staphylococcus* sp.

Divergências em relatos da literatura quanto à influência de suplementos na formação de biofilmes pode caracterizar um comportamento bastante individualizado de cada cepa com relação ao nutriente, o que significa que a ação de um composto possa ser bactéria-dependente, levando à modulação da expressão de certos genes em detrimento de outros. Portanto, torna-se necessário identificar se estas diferenças entre os isolados possam ser atribuídas a linhagens clonais distintas (O'Neill et al., 2008; Croes et al., 2009; Choi et al., 2013).

Com relação ao efeito da temperatura, a formação de biofilme em isolados de CVC foi significativa somente na temperatura de 35 °C, em comparação às temperaturas de 25 °C e 40 °C, também suplementadas em um meio rico – TSB contendo 5 % de glicose e 0,9 % de cloreto de sódio. Esta condição foi a que melhor reproduziu as condições fisiológicas, portanto este resultado pode dever-se em decorrência da proximidade com a temperatura corporal humana de 36,5 °C, em detrimento das demais temperaturas. Fitzpatrick et al. (2005) encontraram que temperaturas mais baixas (30 °C, quando comparado com 37 °C e 42 °C) foram responsáveis pelo aumento da produção de biofilme em *S. epidermidis*, especulando que isto se deva pela temperatura da pele ser próxima de 33 °C e indicando que os isolados eram contaminantes, possivelmente veiculados da pele de pacientes ou de profissionais da saúde.

Conforme Abdallah et al. (2014), o efeito da temperatura sobre a produção de biofilmes em *S. aureus* ainda não está totalmente elucidado. Choi et al. (2013) e Vazquez-Sanchez et al. (2013) observaram que a temperatura de 37 °C levou ao desenvolvimento mais expressivo de biofilme do que a 25 °C, concordantes com nossos resultados. Entretanto, Pagedar et al. (2010) reportaram uma contagem celular elevada em biofilmes de *S. aureus* a 25 °C, em contraste ao obtido em 37 °C. Por outro lado, Meira et al. (2012) mostraram que não há um efeito claro na temperatura de incubação (7 °C e 28 °C) sobre a formação de biofilme em *S. aureus*. Estas discrepâncias podem refletir diferenças nas condições experimentais ou o efeito sinérgico da temperatura com outros fatores ambientais.

Holá et al. (2006) demonstraram que o melhor desempenho de formação de biofilme em isolados clínicos de *S. epidermidis* foi em um meio rico nutricionalmente e na temperatura de 37 °C, consistentes com nossos resultados, que obtiveram, de uma forma geral, maior performance de produção de biofilme a 35 °C, com adição de plasma ou pela glicose combinada com NaCl. Rode et al. (2007) e Agarwal & Jain (2011) também evidenciaram o efeito sinérgico da glicose e cloreto de sódio sobre o aumento da formação de biofilme.

Villanueva et al. (2010) observaram que a temperatura exerce seu efeito principalmente sobre a formação do biofilme, enquanto que a disponibilidade de nutrientes influencia mais sobre a biomassa bacteriana em um biofilme maduro. Isto significa que o binômio temperatura e acessibilidade

de nutrientes deve ser levado em consideração com relação à formação de biofilme.

Os valores médios de densidade óptica a 450 nm dos isolados clínicos foram concordantes com os índices de formação de biofilme nas diversas suplementações e temperaturas. Os maiores valores de OD encontrados foram a 5 % de glicose (0,13), glicose e NaCl a 35 °C (0,19) e plasma (0,23), correspondendo, portanto, aos grupos que obtiveram maior porcentagem de formação de biofilme, principalmente dentre os fortes formadores (14,71 %, 32,35 % e 52,94 %, respectivamente).

Com relação aos isolados alimentares, comportamentos distintos foram observados nos isolados de carne de frango e morcilha quanto a diferentes suplementações e temperaturas. Os isolados provenientes de carne de frango foram, em sua maioria, fortes formadores de biofilme em todas as suplementações e temperaturas, enquanto que os de morcilha exibiram fraca ou moderada produção de biofilme.

Os microrganismos procedentes de carne de frango não apresentaram diferença estatística entre os grupos, quando considerado o número de isolados classificados como não formador, fraco, moderado ou forte formador de biofilme em cada suplemento ou temperatura. Quando verificado o valor médio da densidade óptica, a suplementação com 0,9 % de NaCl e 12,5 % de plasma foram os que formaram menor quantidade de biomassa bacteriana (0,29 e 0,45, respectivamente). Em contrapartida, um meio rico nutricionalmente (5 % de glicose e 0,9 % de cloreto de sódio) exerceu maior

efeito sobre a formação de biofilme, simultaneamente com a elevação da temperatura.

Para os isolados de morcilha, apenas o plasma e a suplementação com glicose e NaCl a 25 °C apresentaram diferença estatística, concordantes com as menores e maiores porcentagens de não formadores entre todos os grupos, respectivamente (7,14 % e 35,71 %). No que concerne ao valor médio da densidade óptica, análogo à carne de frango, a suplementação com 0,9 % de cloreto de sódio obteve a menor biomassa (0,075), entretanto, o plasma obteve a maior densidade média dentre todos os grupos (0,12). Equivalente aos isolados de morcilha, o aumento da temperatura resultou na elevação da biomassa bacteriana, bem como no número de fortes formadores.

Há uma escassez de estudos a respeito da influência do plasma na formação de biofilmes em ECN. Os estafilococos provenientes de morcilha são todos negativos para a produção da enzima coagulase, que degrada o fibrinogênio em fibrina. Entretanto, especula-se que, mesmo sem a formação de fibrina, a superfície bacteriana consiga se aderir sobre outros componentes plasmáticos, como o próprio fibrinogênio. Benson et al. (1996) demonstraram que a afinidade por determinado componente plasmático é específica para cada isolado e, em seu estudo com *S. epidermidis*, a adição de fibrina acarretou uma menor formação de biofilme, ao atuar como barreira para adesão bacteriana.

Alguns estudos demonstram que microrganismos são capazes de se aderirem e se fixarem em fibras de origem animal (Campbell et al, 1987;

Notermans & Kappelcher, 1984). Esta aderência resulta na ineficiência dos procedimentos de lavagem e remoção das células aderidas às carcaças (Giaouris et al., 2014; Zottola & Sasahara, 1994). Marino et al. (2011), encontraram em isolados de alimentos e em mãos de manipuladores a capacidade de formar biofilme em 92 % dos isolados.

Rodrigues et al. (2011) avaliaram a formação de biofilme em *S. aureus* isolados de um abatedouro de aves no sul do Brasil e encontraram que todos os isolados foram capazes de produzir biofilme. Este trabalho foi concordante com o alto percentual de formadores de biofilmes encontrados em nosso estudo de *Staphylococcus* sp. provenientes de carne de frango.

Os comportamentos divergentes das diferentes concentrações de glicose e cloreto de sódio em ambos os tipos de alimentos podem refletir características bactéria-dependentes, de qualquer forma, não houve diferença estatística. A morcilha apresenta teor de carboidratos próximo de 1 % (Brasil, 2001) e o frango não possui carboidratos, logo, hipotetiza-se que o aumento da concentração de glicose não aumentou a formação de biofilme porque não representava a quantidade de substrato que os microrganismos encontravam no alimento.

Com relação à influência da temperatura, nossos resultados foram similares aos encontrados por Marinho et al. (2013), que evidenciaram que *Enterococcus* sp. isolados de alimentos foram capazes de formar biofilme, principalmente na temperatura de 37 °C. Os *Staphylococcus* sp. apresentam temperatura ideal de crescimento próximo a 35 °C e, portanto, esta

temperatura favorece o aumento da biomassa bacteriana, que resulta numa maior sedimentação e adesão a superfícies.

Entretanto, os isolados obtiveram maior produção de biofilme na maior temperatura testada, de 40 °C, que ainda se enquadra na faixa ótima de crescimento. Marinho et al. (2013) avaliaram a capacidade de formação de biofilme a 45 °C, que, tanto para *Enterococcus* sp., quanto para *Staphylococcus* sp., é a temperatura máxima limite de crescimento, de uma forma geral. Acredita-se que altas temperaturas levam a modificações no perfil de ácidos graxos na membrana, influenciando na fluidez e tornando-a menos resiliente, todavia os mecanismos pelo qual isto leva à maior formação de biofilme ainda não estão completamente elucidados (Fisher & Phillips, 2009).

Padegar et al. (2010), contudo, demonstraram que isolados de *S. aureus* foram capazes de formar biofilme em indústrias leiteiras principalmente na temperatura de 25 °C, especialmente quando suplementado com leite desnatado, o que indica que a correta detecção de biofilme preconiza que se aproxime o máximo possível das condições ambientais encontradas.

A temperatura de 25 °C foi alvo de análise em decorrência de ser uma temperatura comumente encontrada em serviços de alimentação. Malheiros et al. (2010) e Souza et al. (2014) notaram maior quantidade de biomassa bacteriana nesta temperatura, que foi a mais elevada dentre as verificadas. Concordantes com nossos resultados em isolados alimentares, o aumento da temperatura causa maior produção de biofilme.

Outro ponto importante a ser considerado é em relação ao meio de cultivo utilizado e o tempo de incubação empregado, uma vez que nosso estudo utilizou caldo triptona de soja e tempo de incubação de 18 horas em todos os testes de formação de biofilme. Nyenje et al. (2013) avaliaram a produção de biofilme em isolados alimentares de *Enterobacter cloacae* utilizando TSB e BHI e sob diferentes tempos de incubação e temperatura. Os autores encontraram que longos tempos de incubação e altas temperaturas influenciam na formação de biofilme, sugerindo que esta elevada produção se deva ao crescimento rápido do microrganismo em temperaturas mais altas. Não houve diferença estatística quanto ao uso de TSB ou BHI, todavia o BHI apresentou porcentagens de formação de biofilme ligeiramente superiores.

De modo distinto das infecções relacionadas com dispositivos médicos, os microrganismos causadores de intoxicações veiculadas por alimentos são expostos a grandes variações de nutrientes, temperaturas e superfícies em contato com alimentos durante processamento, estocagem e transporte em indústrias alimentícias. Uma série de circunstâncias nas indústrias, tais como o contato periódico com líquidos e sólidos alimentares, proporciona um microambiente favorável para a interação célula a célula e célula com superfície, resultando na formação de biofilme mesmo após processamentos térmicos ou sanitização (Jorgensen et al., 2005; Byun et al., 2007).

5.2 Diversidade genética entre os ECN isolados de morcilha

Apenas os isolados provenientes de morcilha foram avaliados quanto à diversidade genética, uma vez que os microrganismos dos demais grupos já foram testados por estes métodos (Pinto, 2014). As análises moleculares dos quarenta e dois *Staphylococcus* sp. isolados de morcilha pelo RAPD-PCR e rep-PCR apresentaram resultados distintos, sendo que o RAPD-PCR gerou apenas oito clones, enquanto que o rep-PCR, doze. Discordâncias foram encontradas com relação aos clones, pois muitos isolados pertencentes a um grupo por um método, não estiveram no mesmo grupo pela outra metodologia.

Seis isolados pertencentes ao clone D pelo RAPD-PCR foram análogos ao clone F pelo rep-PCR e quatro isolados relativos ao clone F pelo RAPD-PCR foram correspondentes ao clone L pelo rep-PCR. Quatro isolados pertencentes aos clones A e quatro do clone B pelo RAPD-PCR foram semelhantes aos clones A pelo rep-PCR. Isto significa que o RAPD-PCR distinguiu os isolados de forma mais precisa e pormenorizada, a despeito de ter obtido um número menor de clones. Dezesesseis isolados (38,09 %) não estabeleceram relação entre os métodos.

Com relação aos grupos, o ponto de corte foi de 75 % e 69 % de similaridade para o RAPD-PCR e rep-PCR, respectivamente, e gerou cinco grupos em cada método. O RAPD-PCR foi mais discriminativo, uma vez que 2, 3, 1, 1 e 1 clones pertenceram aos grupos I, II, III, IV e V, respectivamente, enquanto que 7 clones relacionaram-se ao grupo I no rep-PCR, por exemplo.

O RAPD-PCR segregou mais rigorosamente os isolados procedentes de morcilha em branca ou preta do que o rep-PCR. Pelo RAPD-PCR, dos oito grupos clonais, 3 foram compostos apenas por isolados de morcilha branca, enquanto 2 compreenderam apenas isolados de morcilha preta. Em contrapartida, no rep-PCR, dos doze grupos clonais, apenas um foi composto somente por morcilhas brancas, além daqueles isolados que apresentaram perfil clonal único. A inclusão de morcilhas pretas e brancas no mesmo perfil clonal pode ser um indicativo de um mesmo manipulador na preparação deste alimento ou a existência de um clone bem adaptado às condições de preparação deste alimento. Além disso, pode ser um indicativo de possível contaminação na distribuição, pós cocção.

Não houve associação bem definida entre os perfis gerados pelos dois métodos, resultado este compatível com os de Idil & Aksöz (2013), que apresentaram um índice discriminatório do RAPD-PCR superior ao rep-PCR. lacumin et al. (2006) avaliaram 249 isolados de *S. xylosus* de embutidos fermentados e observaram resultados discrepantes entre os dois métodos moleculares.

Similar ao encontrado em nosso estudo, Ruaro et al. (2013) não obtiveram um resultado uniforme com relação a isolados pertencentes a uma mesma espécie de *Staphylococcus* sp. estarem inseridos em um mesmo perfil clonal. O autor analisou apenas pelo método RAPD-PCR, utilizando a combinação de dois oligonucleotídios iniciadores: M13 e D11344, em acréscimo ao sequenciamento da região V1-V3 do DNA ribossomal 16S. Foi

encontrado um alto índice de diversidade microbiana entre os isolados, em concordância ao nosso estudo.

A ausência de detecção de fragmentos de DNA no RAPD-PCR com o oligonucleotídeo iniciador M13 nos 42 ECN isolados de morcilha foi considerada como resultado após uma série de testes sob diferentes condições, tais como diversas concentrações de cloreto de magnésio, várias temperaturas de anelamento, quantidades distintas de DNA, entre outros. Além do mais, foram também utilizados controles positivos. Portanto, essa região randômica contemplada pelo oligonucleotídeo iniciador M13 não esteve presente nos isolados avaliados por esse estudo, divergente dos resultados encontrados por Ruaro et al. (2013), que obteve perfis de fragmentos de DNA com o mesmo oligonucleotídeo iniciador em ECN obtidos de leite cru e queijo.

Os métodos moleculares utilizados neste estudo foram selecionados por fornecerem a caracterização do isolado baseado em diferentes princípios. O RAPD-PCR faz uso de um oligonucleotídeo iniciador randômico capaz de anelar em várias posições do genoma, permitindo assim a amplificação de sequências aleatórias. O rep-PCR é capaz de produzir perfis relacionados à presença de elementos repetitivos dentro do genoma relacionado. Por isto, divergências nos resultados são esperadas em decorrência do anelamento poder ocorrer em diferentes regiões e gerar produtos de PCR de tamanhos distintos.

Embora se reconheçam as limitações do RAPD-PCR e rep-PCR frente a outras metodologias, tais como MLST e a padrão-ouro PFGE, que permitem diferenciar cepas com perfil de bandas idêntico nas duas primeiras

técnicas (Deplano et al., 2000; Santos et al., 2001; Goerke et al., 2005; Church et al., 2011), a comparação dos isolados de *Staphylococcus* sp. provenientes de morcilha por meio da tipagem molecular pelos métodos RAPD-PCR e rep-PCR mostrou-se útil, rápida, simples e barata para uma avaliação preliminar dos isolados relacionados geneticamente.

5.3 Análise da atividade das proteases e lipases nos ECN

As atividades proteolítica e lipolítica são importantes para o desenvolvimento do sabor e aroma de carnes e queijos e esta função está prioritariamente relacionada a determinadas espécies de *Staphylococcus* sp., tais como, *S. xylosus*, *S. carnosus* e *S. equorum*, que podem ser empregadas como culturas *starter* (Citak et al., 2005; Ruaro et al., 2013). Todavia, as enzimas proteases e lipases também podem ser consideradas fatores de virulência produzidos por *Staphylococcus* sp., além de serem capazes de causar deterioração de alimentos e, conseqüentemente, diminuir a vida de prateleira dos mesmos.

Há uma escassez de estudos a respeito das atividades proteolítica e lipolítica em ECN isolados de morcilha. Dos quarenta e dois isolados provenientes de morcilha, encontramos alta prevalência de produção de lipases (57,14 %), em comparação com a produção de proteases (28,57 %). Nove isolados foram positivos para a expressão de ambas as enzimas. Nossos resultados estão de acordo com os encontrados por Parkash et al. (2007), que demonstraram um índice superior de produção de lipases, em relação às proteases, em isolados de *S. aureus* de leite cru; e de Ruaro et al. (2013), que avaliaram 77 isolados de ECN obtidos de leite cru e queijo e observaram que

15,6 % produziram proteases e 39 % expressaram lipases. Uma hipótese para produção superior de lipases, em detrimento das proteases, em morcilha, é em decorrência de sua composição nutricional, visto que há maior quantidade de lipídios (32 %), do que de proteínas (15 %) (Guerreiro, 2012).

Cinco isolados não foram capazes de crescer em ágar Skim Milk e seis em ágar tributirina, o que indica que outros meios de cultura suplementados com substâncias protéicas e lipídicas poderiam ser utilizados para verificar a prevalência de proteases e lipases. Ruaro et al. (2013) obtiveram nove isolados incapazes de crescer em ágar Skim Milk.

Em um estudo conduzido por Gundogan et al. (2013), 80 % dos isolados de *S. aureus* obtidos de frango, carne, leite e outras fontes de alimentos, mostraram atividade proteolítica. Além disso, em seu estudo, 45 % dos isolados apresentaram atividade lipolítica. Gundogan & Devren (2010) observaram que 96,2 %, 89,1 % e 75 % de isolados de *S. aureus* provenientes de amostras de carne, almôndega e frango, respectivamente, apresentaram atividade proteolítica a 20 °C. No mesmo estudo, poucos isolados obtidos de frango exibiram atividade lipolítica (22,8 %). Iacumin et al. (2006) evidenciaram baixo índice de atividade lipolítica e 100 % de atividade proteolítica em isolados de *S. xylosus* obtidos de embutidos fermentados.

Takeuchi et al. (1999) e Saising et al. (2012) reportaram que os microrganismos positivos para produção de proteases eram frequentemente relacionados com frangos com dermatite necrótica e humanos com lesões acnéicas.

5.4 Capacidade de ECN de inibir outras bactérias

Nenhum isolado, dentre os quarenta e dois ECN provenientes de morcilha, apresentou atividade antimicrobiana contra os microrganismos *B. cereus*, *E. faecalis* e *L. monocytogenes*, consistente com os resultados encontrados por Ruaro et al. (2013), que testaram 77 ECN provenientes de leite cru e queijo contra o indicador *S. aureus*.

O ensaio de dupla camada é uma metodologia de seleção e mais avaliações poderiam ser realizadas para comprovar a existência de peptídios antimicrobianos produzidos por *Staphylococcus* sp., inclusive testando contra outros microrganismos.

6 CONCLUSÕES

O uso de suplementos influencia na formação de biofilmes microbianos. Em isolados clínicos de cateter venoso central, a adição de plasma à temperatura de 35 °C, conduziu a um aumento na produção de biofilmes, indicando que estas condições *in vitro* simulam a conjuntura *in vivo*.

Os isolados alimentares apresentaram comportamentos distintos quanto à formação de biofilme, uma vez que a maioria das cepas provenientes de carne de frango foi forte produtora, enquanto que as de morcilha expressaram mais fracamente.

A elevação da temperatura e a combinação de glicose com o cloreto de sódio demonstraram um efeito sinérgico sobre o aumento da formação de biofilme em *Staphylococcus* sp. isolados de ambos os tipos de alimentos – frango e morcilha.

O desempenho divergente de alguns suplementos na formação de biofilmes nos isolados clínicos e alimentares pode representar um comportamento bastante individualizado de cada cepa com relação ao nutriente, o que significa que a ação de um composto possa ser bactéria-dependente, levando à modulação da expressão de certos genes em detrimento de outros.

A tipagem molecular pelos métodos de RAPD-PCR e rep-PCR exibiu um alto índice de diversidade entre os isolados. Não foi possível determinar

uma correlação entre as metodologias, sendo que a técnica de RAPD-PCR foi mais discriminativa do que o rep-PCR.

A maioria dos isolados de morcilha apresentou atividade lipolítica, enquanto que apenas uma pequena parcela exibiu atividade proteolítica.

Nenhum isolado apresentou atividade antimicrobiana contra indicadores relevantes em uma indústria de alimentos.

7 PERSPECTIVAS

Aumentar a amostragem dos isolados de alimentos e clínicos, de maneira a obter resultados mais representativos.

Avaliar a influência de outros parâmetros na formação de biofilme, tais como, utilizar outros meios de cultura, como o BHI, diferentes tempos de incubação e outros suplementos, de modo a mimetizar o ambiente de origem.

Comparar os resultados fenotípicos de produção de biofilme com a expressão de genes correlacionados com a formação de biofilme.

Testar outras metodologias de tipagem molecular, bem como a combinação de mais de um oligonucleotídeo iniciador na mesma metodologia.

Estabelecer uma correlação entre a produção de biofilme e o perfil de linhagem clonal.

Avaliar a expressão das proteases e lipases em meios de crescimento contendo diferentes substâncias proteicas e lipídicas.

Analisar a capacidade dos isolados em inibir outros microrganismos indicadores relevantes em uma indústria de alimentos, bem como empregar outras metodologias de detecção.

8. REFERÊNCIAS

ABDALLAH, M.; BENOLIEL, C.; DRIDER, D.; DHULSTER, P.; CHIHIB, N. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. **Arch Microbiol**, Germany, v.196, n.7, p.453–472, 2014.

AGARWAL, A. & JAIN, A. Glucose & sodium chloride induced biofilm production & *ica* operon in clinical isolates of staphylococci. **Indian J Med Res**, India, v.138, p.262-266, 2013.

AKIYAMA, H.; UEDA, M.; KANZAKI, H.; TADA, J.; ARATA, J. Biofilm formation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from impetigo and furuncle: role of fibrinogen and fibrin. **J Dermatol Sci**, Netherlands, v.16, n.1, p.2-10, 1997.

AKIYAMA, H.; YAMASAKI, O.; KANZAKI, H.; TADA, J.; ARATA, J. Effects of sucrose and silver on *Staphylococcus aureus* biofilms. **J Antimicrob Chemother**, England, v.42, n.5, p.629-634, 1998.

AKOPYANZ, N.; BUKANOV, N.O.; WESTBLOM, T.U.; KRESOVICH, S.; BERG, D.E. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. **Nucleic Acids Res**, England, v.20, n.19, p.5137–5142, 1992.

AL-GOSHA'AH, F.A.; AL-BAKER, S.M.; AL-HETAR, K.Y. Bacteriocin typing of *Staphylococcus aureus* isolated from different sources in Ibb City, Yemen. **JJBS**, Jordan, v.7, n.1, p.25-29, 2014.

ANDERSON, A.S.; MILLER, A.A.; DONALD, R.G.K.; SCULLY, I.L.; NANRA, J.S.; COOPER, D.; JANSEN, K.U. Development of a multicomponent *Staphylococcus aureus* vaccine designed to counter multiple bacterial virulence factors. **Hum Vaccin Immunother**, United States, v.8, n.11, p.1585–1594, 2012.

ANDRIGHETTO, C.; BORNEY, F.; BARMAZ, A.; STEFANON, B.; LOMBARDI, A. Genetic diversity among *Streptococcus thermophilus* isolated from Italian traditional cheeses **Int. Dairy J**, Netherlands, v.12, p.141–144, 2002.

ANTUNES, A.L.; BONFANTI, J.W.; PEREZ, L.R.; PINTO, C.C.; FREITAS, A.L.; MACEDO, A.J.; BARTH, A.L. High vancomycin resistance among biofilms produced by *Staphylococcus* species isolated from central venous catheters. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Brazil, v.106, n.1, p.51-55, 2011.

ARCHER, N.K.; MAZAITIS, M.J.; COSTERTON, J.W.; LEID, J.G.; POWERS, M.E.; SHIRTLIF, M.E. *Staphylococcus aureus* biofilms: Properties, regulation

and roles in human disease. **Virulence**, United States, v.2, n.5, p.445-459, 2011.

ARCIOLA, C.R.; CAMPOCCIA, D.; SPEZIALE, P.; MONTANARO, L.; COSTERTON, J.W. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. **Biomaterials**, Netherlands, v.33, n.26, p.5967-5982, 2012.

ATANASSOVA, V.; MEINDL, A.; RING, C. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham – a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. **Int J Food Microbiol**, Netherlands, v.68, p.105-113, 2001.

BALDASSARRI, L.; CECCHINI, R.; BERTUCCINI, L.; AMMENDOLIA, M.G.; LOSI, F.; ARCIOLA, C.R.; MONTANARO, L.; DI ROSA, R.; GHERARDI, G.; DICUONZO, G.; OREFICI, G.; CRETI, R. *Enterococcus* spp. produces slime and survives in rat peritoneal macrophages. **Med Microbiol Immunol**, Germany, v.190, n.3, p.113–120, 2001.

BANNERMAN, T.L.; PEACOCK, S.J. ***Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically**. In PR Murray, E.J., Jorgensen, M.A., Jolken (Ed). Manual of Clinical Microbiology. Washington: ASM, v.1, p.384-404, 2003.

BEDRAN, T.B.L.; AZELMAT, J.; SPOLIDORIO, D.P.; GRENIER, D. Fibrinogen-induced *Streptococcus mutans* biofilm formation and adherence to endothelial cells. **Biomed Res Int**, United States, v.2013, p.1-8, 2013.

BEGOVIC, J.; JOVCIC, B.; PAPIC-OBRAĐOVIC, M.; VELJOVIC, K.; LUKIC, J.; KOJIC, M.; TOPISIROVIC, L. Genotypic diversity and virulent factors of *Staphylococcus epidermidis* isolated from human breast milk. **Microbiol Res**, Germany, v.168, n.2, p.77-83, 2013.

BENSON, D.E.; BURNS, G.L.; MOHAMMAD, S.F. Effects of plasma on adhesion of biofilm forming *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis* to fibrin substrate. **ASAIO J**, United States, v.42, n.5, p.655-660, 1996.

BERGDOLL, M. S. ***Staphylococcus aureus*. Foodborne Bacterial Pathogens**. In: DOYLE, M. P. (Ed.). New York: Marcel Dekker, p. 463-523, 1989.

BOLES, B.R. & HORSWILL, A.R. Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. **PLoS Pathog**, United States, v.4, n.4, p.e1000052, 2008.

BONIFAIT, L.; GRIGNON, L.; GRENIER, D. Fibrinogen induces biofilm formation by *Streptococcus suis* and enhances its antibiotic resistance. **Appl Environ Microbiol**, United States, v.74, n.15, p.4969-4972, 2008.

BORGES, M.F.; ARCURI, E.F.; PEREIRA, J.L.; FEITOSA, T.; KUAYE, A.Y. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados: revisão. **B Ceppa**, Brazil, v.26, n.1, p.71-86, 2008.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, Resolução RDC n. 12 de 2 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 2001. Disponível on-line em <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm> acesso em 02 de fevereiro de 2015.

BRITO, M.A.V.P.; SOMKUTI, G.A.; RENYE JR, J. Isolation of bacteriocin-producing staphylococci from Brazilian cheese. **J Food Saf**, United States, v.31, p.365-370, 2011.

BYUN, M.W.; KIM, J.H.; KIM, D.H.; KIM, H.J.; JO, C. Effects of irradiation and sodium hypochlorite on the micro-organisms attached to a commercial food container. **Food Microbiol**, England, v.24, n.5, p.544–548, 2007.

CAKIR AKTAS, N.; ERTURAN, Z.; KARATUNA, O.; KARAHASAN YAGCI, A. Panton-Valentine leukocidin and biofilm production of *Staphylococcus aureus* isolated from respiratory tract. **J Infect Dev Ctries**, Italy, v.7, n.11, p.888-891, 2013.

CAMPBELL, S.; DUCKWORTH, S.; THOMAS, C.J.; MCMEEKIN, T.A. A note on adhesion of bacteria to chicken muscle connective tissue. **J Appl Bacteriol**, England, v.63, n.1, p.67-71, 1987.

CARDILE, A.P.; SANCHEZ, C.J.Jr; SAMBERG, M.E.; ROMANO, D.R.; HARDY, S.K.; WENKE, J.C.; MURRAY, C.K.; AKERS, K.S. Human plasma enhances the expression of Staphylococcal microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules promoting biofilm formation and increases antimicrobial tolerance In Vitro. **BMC Res Notes**, England, v.7, p.457, 2014.

CASSAT, J.E.; LEE, C.Y.; SMELTZER, M.S. Investigation of biofilm formation in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Methods Mol Biol**, United States, v.391, p.127-144, 2007.

CERCA, N. & JEFFERSON, K. Effect of growth conditions on poly-N-acetylglucosamine expression and biofilm formation in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol Lett**, England, v.283, n.1, p.36-41, 2008.

CHA, J.O.; YOO, J.I.; YOO, J.S.; CHUNG, H.S.; PARK, S.H.; KIM, H.S.; LEE, Y.S.; CHUNG, G.T. Investigation of Biofilm Formation and its Association with the Molecular and Clinical Characteristics of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Osong Public Health Res Perspect**, South Korea, v.4, n.5, p.225-232, 2013.

CHEN, P.; ABERCROMBIE, J.J.; JEFFREY, N.R.; LEUNG, K.P. An improved medium for growing *Staphylococcus aureus* biofilm. **J Microbiol Methods**, Netherlands, v.90, n.2, p.115–118, 2012.

CHIANG, Y.C.; LAI, C.H.; LIN, C.W.; CHANG, C.Y.; TSEN, H.Y. Improvement of strain discrimination by combination of superantigen profiles, PFGE, and RAPD for *Staphylococcus aureus* isolates from clinical samples and food-poisoning cases. **Foodborne Pathog Dis**, United States, v.11, n.6, p.468-477, 2014.

CHOI, N.Y.; KIM, B.R.; BAE, Y.M.; LEE, S.Y. Biofilm formation, attachment, and cell hydrophobicity of foodborne pathogens under varied environmental conditions. **J Korean Soc Appl Bi**, South Korea, v.56, n.2, p.207-220, 2013.

CHURCH, D.L.; CHOW, B.L.; LLOYD, T.; GREGSON, D.B. Comparison of automated repetitive-sequence based polymerase chain reaction and spa typing versus pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Diagn Microbiol Infect Dis**, United States, v.69, n.1, p.30-37, 2011.

CIRKOVIC, I.; VLAHOVIC, M.S.; OPAVSKI, N.; MIJAC, V.; DJUKIC, S.; STEPANOVIC, S. Influence of the salt concentration on biofilm formation by *Salmonella* spp. **ECCMID**, France, p.832, 2006.

CITAK, S.; MENDI, A.; ORHAN, S. Incidence, antibiotic resistance and some technological properties of *Enterococcus* species isolated from raw milk and white cheese samples. **Arch Lebensmittelhyg**, Germany, v.56, p.73–96, 2005.

COELHO, L.R.; SOUZA, R.R.; FERREIRA, F.A.; GUIMARÃES, M.A.; FERREIRA-CARVALHO, B.T.; FIGUEIREDO, A.M.S. *agr* RNAIII divergently regulates glucose-induced biofilm formation in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Microbiology**, United States, v.154, p.3480-3490, 2008.

COELHO, M.L.V.; NASCIMENTO, J.S.; FAGUNDES, P.C.; MADUREIRA, D.J.; OLIVEIRA, S.S.; BRITO, M.A.V.P.; BASTOS, M.C.F. Activity of staphylococcal bacteriocins against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* involved in bovine mastitis. **Res Microbiol**, France, v.158, n.7, p.625-630, 2007.

CONLON, K.M.; HUMPHREYS, H.; O'GARA, J.P. *icaR* encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of *ica* operon

expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. **J Bacteriol**, United States, v.184, n.16, p.4400–4408, 2002.

CORDEIRO, D.N.G. **Significância clínica da presença de *Staphylococcus coagulase-negativo* isolados de recém-nascidos de uma unidade de terapia intensiva neonatal em Brasília – DF**. Brasília: Universidade de Brasília, 2007. 142 f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina – núcleo de medicina tropical, UNB, Brasília, 2007.

COSTA, A.G.; FRAZZON, A.P.G.; D’AZEVEDO, P.A.; FRAZZON, J.; VAN DER SAND, S.T. Perfil genotípico de *Enterococcus faecalis* isolados de carne de frango e de infecção urinária pela técnica molecular RAPD-PCR. **Rev Bras Biocienc**, Brazil, v.17, n.1, p.74-81, 2009.

COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAPPIN-SCOTT, H.M. Microbial biofilms. **Annu Rev Microbiol**, United States, v.49, p.711-745, 1995.

COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Science**, United States, v.284, n.5418, p.1318-1322, 1999.

CROES, S.; DEURENBERG, R.H.; BOUMANS, M.L.; BEISSER, P.S.; NEEF, C.; STOBBERINGH, E.E. *Staphylococcus aureus* biofilm formation at the physiologic glucose concentration depends on the *S. aureus* lineage. **BMC Microbiol**, England, v.9, p.1-9, 2009.

CUE, D.; LEI, M.G.; LEE, C.Y. Activation of *sarX* by Rbf is required for biofilm formation and *icaADBC* expression in *Staphylococcus aureus*. **J Bacteriol**, United States, v.195, n.7, p.1515-1524, 2013.

CUE, D.; LEI, M.G.; LUONG, T.T.; KUECHENMEISTER, L.; DUNMAN, P.M.; O’DONNELL, S.; ROWE, S.; O’GARA, J.P.; LEE, C.Y. Rbf promotes biofilm formation by *Staphylococcus aureus* via repression of *icaR*, a negative regulator of *icaADBC*. **J Bacteriol**, United States, v.191, n.20, p.6363-6373, 2009.

CZACZYK K. & MYSZKA K. (2007) Biosynthesis of extracellular polymeric substances (EPS) and its role in microbial biofilm formation. **Pol J Environ Stud**, Poland, v.16, n.6, p.799-806, 2007.

DA CUNHA MDE, I.; CALSOLARI, R. A.; JÚNIOR, J. P. Detection of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin 1 genes in *Staphylococcus*, with emphasis on coagulase-negative staphylococci. **Microbiol Immunol**, Austrália, v.51, n.4, p.381-390, 2007.

DEEGAN, L.H.; COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, P. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **Int Dairy J**, Ireland, v.16, n.9, p.1058-1071, 2006.

DEPLANO, A.; SCHUERMANS, A.; VAN ELDERE, J.; WITTE, W.; MEUGNIER, H.; ETIENNE, J.; GRUNDMANN, H.; JONAS, D.; NOORDHOEK, G.T.; DIJKSTRA, J.; VAN BELKUM, A.; VAN LEEUWEN, W.; TASSIOS, P.T.; LEGAKIS, N.J.; VAN DER ZEE, A.; BERGMANS, A.; BLANC, D.S.; TENOVER, F.C.; COOKSON, B.C.; O'NEIL, G.; STRUELENS, M.J. Multicenter evaluation of epidemiological typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains by repetitive-element PCR analysis. The European Study Group on Epidemiological Markers of the ESCMID. **J Clin Microbiol**, United States, v.38, n.10, p.3527-3533, 2000.

DEPLANO, A.; WITTE, W.; VAN LEEUWEN, W.J.; BRUN, Y.; STRUELENS, M.J. Clonal dissemination of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Belgium and neighboring countries. **Clin Microbiol Infect**, England, v.6, n.5, p.239-245, 2000.

DIANI, M.; ESYYOK, O.G.; ARIAFAR, M.N.; YUKSEL, F.N.; ALTUNTAS, E.G.; AKCELIK, N. The interactions between *esp*, *fsr*, *geE* genes and biofilm formation and pfge analysis of clinical *Enterococcus faecium* strains. **African J Microbiol Res**, South Africa, v.8, n.2, p.129-137, 2014.

DINGES, M.M.; ORWIN, P.M.; SCHLIEVERT, P.M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clin Microbiol Rev**, United States, v.13, n.1, p.16-34, 2000.

DOBINSKY, S.; KIEL, K.; ROHDE, H.; BARTSCHT, K.; KNOBLOCH, J.K.; HORSTKOTTE, M.A.; MACK, D. Glucose-related dissociation between *icaADBC* transcription and biofilm expression by *Staphylococcus epidermidis*: Evidence for an additional factor required for polysaccharide adhesin synthesis. **J Bacteriol**, United States, v.185, n.9, p.2879–2886, 2003.

DONLAN, R.M. & COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin Microbiol Rev**, United States, v.15, n.2, p.167–193, 2002.

DONLAN, R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerg Infect Dis**, United States, v.8, n.9, p.881–890, 2002.

DOS ANJOS BORGES, L.G.; DALLA VECHIA, V.; CORÇÃO, G. Characterisation and genetic diversity via REP-PCR of *Escherichia coli* isolates from polluted waters in southern Brazil. **FEMS Microbiol Ecol**, England, v.45, n.2, p.173-180, 2003.

DOUROU, D.; BEAUCHAMP, C.S.; YOON, Y.; GEORNARAS, I.; BELK, K.E.; SMITH, G.C.; NYCHAS, G.J.E.; SOFOS, J.N. Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 at different temperatures, on various food-contact surfaces encountered in beef processing. **Int J Food Microbiol**, Netherlands, v.149, n.3, p.262-268, 2011.

DUBIN, G. Extracellular Proteases of *Staphylococcus* spp. **Biol Chem**, Germany, v.383, n.7-8, p.1075–1086, 2002.

DUFOUR, D.; LEUNG, V.; LÉVESQUE, C.M. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. **Endod Top**, France, v.22, n.1, p.2–16, 2010.

ESSID, I.; ISMAIL, H.B.; AHMED, S.B.H.; GHEDAMSI, R.; HASSOUNA, M. Characterization and technological properties of *Staphylococcus xylosus* strains isolated from a Tunisian traditional salted meat. **Meat Sci**, England, v.77, n.2, p.204-212, 2007.

ESTEVEZ, A.S.M.F. **Perigos microbiológicos em alheira: principais vias de contaminação por *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* e *Salmonella* spp.** Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 2005. 280 f. Tese (Doutorado). UTAD, Vila Real, 2005.

EUZÉBY, J. P. M. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. 2015. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>> Acesso em: 02/02/2015.

FABIANO, T.L.T. **Similaridade genética pelo RAPD-PCR de cepas de *Staphylococcus* sp. isolados de portadores humanos e de camas de uma unidade hospitalar.** São Paulo: Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, 2007. 78 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária). UEP, Jaboticabal, 2007.

FISHER, K. & PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, England, v.155, n.6, p.1749-1757, 2009.

FITZPATRICK, F.; HUMPHREYS, H.; O'GARA, J.P. The genetics of staphylococcal biofilm formation--will a greater understanding of pathogenesis lead to better management of device-related infection? **Clin Microbiol Infect**, England, v.11, n.12, p.967-973, 2005.

FLEMMING, Leonard. **Molecular characterisation of *Flavobacterium* spp. and investigation of their biofilm-forming capacity in the tilapia aquaculture system.** 2006. 210 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – University of Stellenbosch, Stellenbosch, 2006.

GAGLIANO, V.J. & HINS DILL, R.D. Characterization of a *Staphylococcus aureus* bacteriocin. **J Bacteriol**, United States, v.104, n.1, p.117-125, 1970.

GÁLVEZ, A.; LOPEZ, R.L.; ABRIQUEL, H.; VALDIVIA, E.; OMAR, N.B. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. **Crit Rev Biotechnol**, England, v.28, n.2, p.125-152, 2008.

GANDRA, E.A.; GANDRA, T.K.V.; MELLO, W.S.; GODOI, H.S. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Sci Technol**, Brazil, v.30, n.1, p.109-118, 2008.

GEOGHEGAN, J.A.; MONK, I.R.; O'GARA, J.P.; FOSTER, T.J. Subdomains N2N3 of fibronectin binding protein A mediate *Staphylococcus aureus* biofilm formation and adherence to fibrinogen using distinct mechanisms. **J Bacteriol**, United States, v.195, n.11, p.2675-2683, 2013.

GIAOURIS, E.; HEIR, E.; HÉBRAUD, M.; CHORIANOPOULOS, N.; LANGSRUD, S.; MORETRO, T.; HABIMANA, O.; DESVAUX, M.; RENIER, S.; NYCHAS, G.J. Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. **Meat Sci**, England, v.97, n.3, p.298-309, 2014.

GOERKE, C.; ESSER, S.; KÜMMEL, M.; WOLZ, C. *Staphylococcus aureus* strain designation by *agr* and *cap* polymorphism typing and delineation of *agr* diversification by sequence analysis. **Int J Med Microbiol**, Germany, v.295, p.67–75, 2005.

GONTANG, E.A.; FENICAL, W.; JENSEN, P.R. Phylogenetic diversity of Gram-positive bacteria cultured from marine sediments. **Appl Environ Microbiol**, United States, v.73, n.10, p.3272-3282, 2007.

GORDON, R. J.; LOWY, F. D. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. **Clin Infect Dis**, United States, v.46, n.5, p.350-359, 2008.

GORWITZ, R. J.; KRUSZON-MORAN, D.; MCALLISTER, S.K.; MCQUILLAN, G.; MCDUGAL, L.K.; FOSHEIM, G.E.; JENSEN, B.J.; KILLGORE, G.; TENOVER, F.C.; KUEHNERT, M.J. Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001-2004. **J Infect Dis**, United States, v.197, n.9, p.1226-1234, 2008.

GÖTZ, F. & ROSENSTEIN, R. Staphylococcal lipases: Biochemical and molecular characterization. **Biochimie**, France, v.82, n.11, p.1005–1014, 2000.

GÖTZ, F. *Staphylococcus* and biofilms. **Mol Microbiol**, England, v.43, n.6, p.1367-1378, 2002.

GÖTZ, F.; VERHEIJ, H.M.; ROSENSTEIN, R. Staphylococcal lipases: molecular characterisation, secretion, and processing. **Chem Phys Lipids**, Ireland, v.93, n.1, p.15–25, 1998.

GRUMANN, D.; NÜBEL, U.; BRÖKER, B.M. *Staphylococcus aureus* toxins - their functions and genetics. **Infect Genet Evol**, Netherlands, v.21, p.583-592, 2014.

GUERREIRO, M.S.F.B.E. **Aplicação de duas tecnologias de embalagem: vácuo e atmosfera modificada**. Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 83 f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Agronomia, UTL, Lisboa, 2011.

GUNDOGAN, N. & ATAOL, O. Biofilm, protease and lipase properties and antibiotic resistance profiles of staphylococci isolated from various foods. **African J Microbiol Res**, South Africa, v.7, n.28, p.3582-3588, 2013.

GUNDOGAN, N. & DEVREN, A. Protease and lipase activity of *Staphylococcus aureus* obtained from meat, chicken and meatball samples. **GU J Sci**, Turkey, v.23, n.4, p.381-384, 2010.

GUNDOGAN, N.; ATAOL, O.; TORLAK, F.O. Determination of some virulence factors in *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from meat and milk products. **J Food Saf**, United States, v.33, p.387-393, 2013.

GUTIÉRREZ, D.; DELGADO, S.; VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; MARTÍNEZ, B.; CABO, M.L.; RODRÍGUEZ, A; HERRERA, J.J.; GARCÍA, P. Incidence of *Staphylococcus aureus* and analysis of associated bacterial communities on food industry surfaces. **Appl Environ Microbiol**, United States, v.78, n.24, p.8547-8554, 2012.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nat Rev Microbiol**, England, v.2, n.2, p.95-108, 2004.

HARTLEIB, J.; KÖHLER, N.; DICKINSON, R.B.; CHHATWAL, G.S.; SIXMA, J.J.; HARTFORD, O.M.; FOSTER, T.J.; PETERS, G.; KEHREL, B.E.; HERRMANN, M. Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. **Blood**, United States, v.96, n.6, p.2149-2156, 2000.

HASSAN, M.; TUCKMAN, H.P.; PATRICK, R.H.; KOUNTZ, D.S.; KOHN, J.L. Cost of hospital-acquired infection. **Hosp Top**, United States, v.88, n.3, p.82–89, 2010.

HERNÁNDEZ, D.; CARDELLE, E.; ZÁRATE, V. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF 711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF 711. **J Appl Microbiol**, England, v.99, n.1, p.77-84, 2005.

HERRERA, J.J.; CABO, M.L.; GONZALEZ, A.; PAZOS, I.; PASTORIZA, L. Adhesion and detachment kinetics of several strains of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* under three different experimental conditions. **Food Microbiol**, England, v.24, n.6, p.585–591, 2007.

HERRMANN, M.; VAUDAUX, P.E.; PITTET, D.; AUCKENTHALER, R.; LEW, P.D.; SCHUMACHER-PERDREAU, F.; PETERS, G.; WALDVOGEL, F.A.

Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. **J Infect Dis**, United States, v.158, n.4, p.693–701, 1988.

HOLÁ, V.; RUZICKA, F.; VOTAVA, M. The dynamics of *Staphylococcus epidermis* biofilm formation in relation to nutrition, temperature, and time. **Scripta Medica**, United States, v.79, n.3, p.169-174, 2006.

HOSTACKA, A.; CIZNAR, I.; STEFKOVICOVA M. Temperature and pH affect the production of bacterial biofilm. **Folia Microbiol (Praha)**, United States, v.55, n.1, p.75–78, 2010.

HU, C.; XIONG, N.; ZHANG, Y.; RAYNER, S.; CHEN, S. Functional characterization of lipase in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus*. **Biochem Biophys Res Commun**, United States, v.419, n.4, p.617–620, 2012.

HUEY, B. & HALL, J. Hypervariable DNA fingerprinting in *Escherichia coli* minisatellite probe from bacteriophage M13. **J Bacteriol**, United States, v.171, n.5, p.2528-2532, 1989.

IACUMIN, L.; COMI, G.; CANTONI, C.; COCOLIN, L. Molecular and technological characterization of *Staphylococcus xylosus* isolated from naturally fermented Italian sausages by RAPD, Rep-PCR and Sau-PCR analysis. **Meat Sci**, England, v.72, n.2, p.281-288, 2006.

IDIL, N.; AKSÖZ, N. Comparison of two PCR-based methods in typing of clinical staphylococcal strains. **J Biol & Chem**, United States, v.41, n.1, p.43-50, 2013.

JACKSON, D.W.; SIMECKA, J.W.; ROMEO, T. Catabolite repression of *Escherichia coli* biofilm formation. **J Bacteriol**, United States, v.184, n.12, p.3406–3410, 2002.

JOO, H.S.; OTTO, M. Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens. **Chem Biol**, United States, v.19, n.12, p.1503-1513, 2012.

JORGENSEN, H.J.; MORK, T.; HOGASEN, H.R.; ROVIK, L.M. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. **J Appl Microbiol**, England, v.99, n.1, p.158–166, 2005.

KADARIYA, J.; SMITH, T.C.; THAPALIYA, D. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: An ongoing challenge in public health. **Biomed Res Int.**, United States, v.2014, p.1-9, 2014.

KNOBLOCH, J.K.; HORSTKOTTE, M.A.; ROHDE, H.; MACK D. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. **Med Microbiol Immunol**, Germany, v.191, n.2, p.101-106, 2002.

KONGA, K.; VUONGA, C.; OTTO, M. *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. **Int J Med Microbiol**, Germany, v.296, n.2-3, p.133-139, 2006.

KRISHNAVENI, M. Characterization of lipase producing *Staphylococcus aureus* MTCC 10787 from soil sample at Salem, Tamil Nadu, India. **J Pharm Res**, India, v.6, n.2, p.304–308, 2013.

KRISTICH, C.J.; LI, Y.H.; CVITKOVITCH, D.G.; DUNNY, G.M. Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. **J Bacteriol**, United States, v.186, n.1, p.154–163, 2004.

KRIZOVÁ, J.; SPANOVÁ, A.; RITTICH, B. RAPD and rep-PCR fingerprinting for characterization of *Bifidobacterium* species. **Folia Microbiol (Praha)**, United States, v.53, n.2, p.99-104, 2008.

LANGLEY, R.; ARCUS, V.; FRASER, J. Virulence factors from *Staphylococcus aureus*: tools to study innate and adaptive immunity. **ASBMB**, Australia, v.34, n.2, p.11-18, 2003.

LAVERTY, G.; GORMAN, S.P.; GILMORE, B.F. Biomolecular mechanisms of staphylococcal biofilm formation. **Future Microbiol**, England, v.8, n.4, p.509-524, 2013.

LAZZAROTTO, C. **Formação de biofilme de *Staphylococcus epidermidis* isolado de cateter venoso central através de métodos fenotípicos e genotípicos**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grando do Sul, 2010. 75 f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina, UFRGS, Porto Alegre, 2010.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genet Mol Res**, Brazil, v.2, n.1, p.63-76, 2003.

LEBEAUX, D.; CHAUHAN, A.; RENDUELES, O.; BELOIN, C. From in vitro to in vivo Models of Bacterial Biofilm-Related Infections. **Pathogens**, Switzerland, v.2, n.2, p.288-356, 2013.

LEROY, S.; GIAMMARINARO, P.; CHACORNAC, J. P.; LEBERT, I. & TALON, R. Biodiversity of indigenous staphylococci of naturally fermented dry sausages and manufacturing environments of small-scale processing units. **Food Microbiol**, Netherland, v.27, p.294-301, 2010.

LIM, Y.; JANA, M.; LUONG, T.T.; LEE, C.Y. Control of glucose- and NaCl-induced biofilm formation by *rbf* in *Staphylococcus aureus*. **J Bacteriol**, United States, v.186, n.3, p.722-729, 2004.

LIN, M.H.; SHU, J.C.; HUANG, H.Y.; CHENG, Y.C. Involvement of iron in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. **PLoS One**, United States, v.7, n.3, p.1-7, 2012.

LISTER, J.L. & HORSWILL, A.R. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. **Front Cell Infect Microbiol**, Switzerland, v.4, p.178, 2014.

LOWY, F.D. *Staphylococcus aureus* infections. **N Engl J Med**, United States, v.339, n.8, p.520-532, 1998.

MACEDO, A.J.; BARTH, A.L. High vancomycin resistance among biofilms produced by *Staphylococcus* species isolated from central venous catheters. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Brazil, v.106, n.1, p.51-55, 2011.

MACK, D.; SIEMSEN, N.; LAUFS, R. Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent *Staphylococcus epidermidis*: evidence for functional relation to intercellular adhesion. **Infect Immun**, United States, v.60, n.5, p.2048-2057, 1992.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10 ed., São Paulo: Prentice Hall, 2004, 608p.

MAGALHÃES, V.D.; FERREIRA, J.C.; BARELLI, C.; DARINI, A.L.C. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica. **Rev Inst Adolfo Lutz**, Brasil, v.64, n.2, p.155-161, 2005.

MALHEIROS, O.S.; PASSOS, C.T.; CASARIN, L.S.; SERRAGLIO, L.; TONDO, E.C. Evaluation of growth and transfer of *Staphylococcus aureus* from poultry meat to surfaces of stainless steel and polyethylene and their disinfection. **Food Cont**, England, v.21, p.298-301, 2010.

MARINHO, A.R.; MARTINS, P.D.; DITMER, E.M.; D'AZEVEDO, P.A.; FRAZZON, J.; VAN DER SAND, S.T.; FRAZZON, A.P.G. Biofilm formation on polystyrene under different temperatures by antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from food. **Braz J Microbiol**, Brazil, v.44, n.2, p.423-426, 2013.

MARINO, M.; FRIGO, F.; BARTOLOMEOLI, I.; MAIFRENI, M. Safety-related properties of staphylococci isolated from food and food environments. **J Appl Microbiol**, England, v.110, n.2, p.550-561, 2011.

MARTINEZ, R.F. **Effect of iron and sodium chloride on biofilm development of *Stenotrophomonas maltophilia***. Chicago: DePaul University, 2011. 52 f. Dissertação (Mestrado), College of liberal arts and social sciences, Chicago, 2011.

MARTINS, P.D. **Análise da distribuição das espécies, da prevalência de genes de enterotoxinas e do perfil de resistência a antibióticos de estafilococos coagulase positivos isolados de carne de frango resfriada e congelada.** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012. 93 f. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, 2012.

MARTINS, P.D.; DE ALMEIDA, T.T.; BASSO, A.P.; DE MOURA, T.M.; FRAZZON, J.; TONDO, E.C.; FRAZZON, A.P. Coagulase-positive staphylococci isolated from chicken meat: pathogenic potential and vancomycin resistance. **Foodborne Pathog Dis**, United States, v.10, n.9, p.771-776, 2013.

MATTOS, E.C. **Caracterização genotípica de cepas de *Staphylococcus aureus* recuperados de alimentos, mãos de manipuladores de alimentos e veiculadas por formigas.** São Paulo: Universidade de São Paulo, 2005. 74 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública), USP, São Paulo, 2005.

MAZMANIAN, S.K.; TON-THAT, H.; SCHNEEWIND, O. Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. **Mol Microbiol**, England, v.40, n.5, p.1049-1057, 2001.

MCADOW, M.; MISSIAKAS, D. M.; SCHNEEWIND, O. *Staphylococcus aureus* secretes coagulase and von Willebrand factor binding protein to modify the coagulation cascade and establish host infections. **J Innate Immun**, Switzerland, v.4, n.2, p.141-148, 2012.

MENDONÇA, J.M.G.T.C. **Aplicação da tecnologia de alta pressão na conservação de um produto cárneo transformado em Portugal.** Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa, 2012. 112 f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária, UTL, Lisboa, 2012.

MESSIAS, J.M.; COSTA, B.Z.; LIMA, V.M.G.; GIESE, E.C.; DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.M. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v.32, n.2, p.213-234, 2011.

MONTESINOS, I.; SALIDO, E.; DELGADO, T.; CUERVO, M.; SIERRA, A. Epidemiologic genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis at a university hospital and comparison with antibiotyping and protein A and coagulase gene polymorphisms. **J Clin Microbiol**, United States, v.40, n.6, p.2119-2125, 2002.

MOREIRA, A.C.M.G.; SANTOS, R.R.; BEDENDO, J. Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* isolados de pacientes e membros da equipe de enfermagem. **Cogitare Enferm**, Brazil, v.17, n.3, p.437-443, 2012.

MORETRO, T.; HERMANSEN, L.; HOLCK, A.L.; SIDHU, M.S.; RUDI, K.; LANGSRUD, S. Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion

locus *ica* among staphylococci from food and food processing environments. **Appl Environ Microbiol**, United States, v.69, n.9, p.5648-5655, 2003.

MOURA, T.M.; CAMPOS, F.S.; D'AZEVEDO, P.A.; VAN DER SAND, S.T.; FRANCO, A.C.; FRAZZON, J.; FRAZZON, A.P.G. Prevalence of enterotoxin-encoding genes and antimicrobial resistance in coagulase-negative and coagulase-positive *Staphylococcus* isolates from black pudding. **Rev Soc Bras Med Trop**, Brazil, v.45, n.5, p.579-585, 2012.

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael. A. **Microbiologia médica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

NAGASE, N.; SASAKI, A.; YAMASHITA, K.; SHIMIZU, A.; WAKITA, Y.; KITAI, S.; KAWANO, J. Isolation and species distribution of staphylococci from animal and human skin. **J Vet. Med Sci**, Japan, v.64, n.3, p.245-250, 2002.

NAVARRE, W. W. & SCHNEEWIND, O. Surface proteins of Gram positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. **Microbiol Mol Biol Rev**, United States, v.63, n.1, p.174-229, 1999.

NOTERMANS, S. & KAMPELCHER, E.H. Attachment of some bacterial strains to the skin of broiler chickens. **Br Poultry Sci**, England, v.15, n.6, p.573-585, 1974.

NOVICK, R.P. & GEISINGER, E. Quorum sensing in staphylococci. **Annu Rev Genet**, United States, v.42, p.541-564, 2008.

NYENJE, M.E.; GREEN, E.; NDIP, R.N. Evaluation of the effect of different growth media and temperature on the suitability of biofilm formation by *Enterobacter cloacae* strains isolated from food samples in South Africa. **Molecules**, Switzerland, v.18, n.8, p.9582-9593, 2013.

O'GARA, J.P. *Ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiol Lett**, England, v.270, n.2, p.179-188, 2007.

O'NEILL, E.; POZZI, C.; HOUSTON, P.; HUMPHREYS, H.; ROBINSON, D.A.; LOUGHMAN, A.; FOSTER, T.J.; O'GARA, J.P. A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB. **J Bacteriol**, United States, v.190, n.11, p.3835-3850, 2008.

O'NEILL, E.; POZZI, C.; HOUSTON, P.; SMYTH, D.; HUMPHREYS, H.; ROBINSON, A.; O'GARA, J.P. Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. **J Clin Microbiol**, United States, v.45, n.5, p.1379-1388, 2007.

OTTO, M. MRSA virulence and spread. **Cell Microbiol**, England, v.14, n.10, p.1513-1521, 2012.

OTTO, M. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. **Annu Rev Med**, United States, v.64, p.175-188, 2013.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H.B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annu Rev Microbiol**, United States, v.54, p.49–79, 2000.

PAGEDAR, A.; SINGH, J.; BATISH, V.K. Surface hydrophobicity, nutritional contents affect *Staphylococcus aureus* biofilms and temperature influences its survival in preformed biofilms. **J Basic Microbiol**, Germany, v.50, p.98-106, 2010.

PALMER, J.; FLINT, S.; BROOKS, J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. **J Ind Microbiol Biotechnol**, England, v.34, n.9, p.577–588, 2007.

PAN, Y.; BREIDT JR, F.; GORSKI, L. Synergistic effects of sodium chloride, glucose, and temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a and 4b strains. **Appl Environ Microbiol**, United States, v.76, n.5, p.1433-1441, 2010.

PARKASH, M.; RAJASEKAR, K.; KARMEGAM, N. Bacterial population of raw milk and their proteolytic and lipolytic activities. **Res J Bas Appl Sci**, India, v.3, n.6, p.848-851, 2007.

PATTI, J. M.; ALLEN, B.L.; MCGAVIN, M.J.; HÖÖK, M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. **Annu Rev Microbiol**, United States, v.48, p. 585-617, 1994.

PENTEADO, F.R. & ESMERINO, L.A. Avaliação da qualidade microbiológica da carne de frango comercializada no município de Ponta Grossa – Paraná. **Biol Health Sci**, Brazil, v.17, n.1, p.37-45, 2011.

PERIASAMY, S.; CHATTERJEE, S.S.; CHEUNG, G.Y.; OTTO, M. Phenol-soluble modulins in staphylococci: What are they originally for? **Commun Integr Biol**, United States, v.5, n.3, p.275-277, 2012.

PERRET, M.; BADIOU, C.; LINA, G.; BURBAUD, S.; BENITO, Y.; BES, M.; COTTIN, V.; COUZON, F.; JURUJ, C.; DAUWALDER, O.; GOUTAGNY, N.; DIEP, B.A.; VANDENESCH, F.; HENRY, T. Cross-talk between *Staphylococcus aureus* leukocidins-intoxicated macrophages and lung epithelial cells triggers chemokine secretion in an inflammasome-dependent manner. **Cell Microbiol**, England, v.14, n.7, p.1019-1036, 2012.

PILLAI, S.K.; SAKOULAS, G.; ELIOPOULOS, G.M.; MOELLERING JR, R.C.; MURRAY, B.E; INOUE, R.T. Effects of glucose on *fsr*-mediated biofilm formation in *Enterococcus faecalis*. **J Infect Dis**, United States, v.190, n.5, p.967-970, 2004.

PINTO, J.B. **Expressão e caracterização do polimorfismo genético do sistema quórum sensing agr; suscetibilidade aos antimicrobianos e fatores de virulência em isolados clínicos e alimentares de *Staphylococcus aureus***. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014. 137 f. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, 2014.

PLACE, R.B.; HIESTAND, D.; GALLMANN, H.R.; TEUBER, M. *Staphylococcus equorum* subsp. *linens*, subsp. *nov.*, a starter culture component for surface ripened semi-hard cheeses. **Syst Appl Microbiol**, Germany, v.26, n.1, p.30-37, 2003.

RACHID, S.; CHO, S.; OHLSEN, K.; HACKER, J.; ZIEBUHR, W. Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by environmental factors: the possible involvement of the alternative transcription factor SigB. **Adv Exp Med Biol**, United States, v.485, p.159–166, 2000.

REINOSO, E.; BETTERA, S.; ODIERNO, L.; BOGNI, C. rep-PCR of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Argentina. **Braz J Vet Res Anim Sci**, Brazil, v.44, p.115-121, 2007.

REITER, K.C.; DA SILVA PAIM, T.G.; DE OLIVEIRA, C.F.; D'AZEVEDO, P.A. High biofilm production by invasive multiresistant staphylococci. **APMIS**, Denmark, v.119, n.11, p.776-781, 2011.

RIBEIRO-FURTINI, L.L; ABREU, L.R. Utilização de APPCC na indústria de alimentos. **Cienc Agrotec**, Brazil, v.30, n.2, p.358-363, 2006.

ROBERSON, J.R.; FOX, L.K.; HANCOCK, D.D.; GAY, J.M.; BESSER, T.E. Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. **J Dairy Sci**, United States, v.77, n.11, p.3354–3364, 1994.

RODE, T.M.; LANGSRUD, S.; HOLCK, A.; MORETRO, T. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. **Int J Food Microbiol**, Netherlands, v.116, n.3, p.372-383, 2007.

RODGERS, S. Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures: a review. **Trends Food Sci Tech**, England, v.12, n.8, p.276-284, 2001.

RODRIGUES, J.B.S.; PINTO, T.S.; OLIVEIRA, C.P.; FREITAS, F.I.S.; PEREIRA, M.S.V.; SOUZA, E.L.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P. Lipolytic activity of *Staphylococcus aureus* from human wounds, animals, foods, and food-contact surfaces in Brazil. **J Infect Dev Ctries**, Italy, v.8, n.8, p.1055-1058, 2014.

RODRIGUES, L.B.; DOS SANTOS, L.R.; TAGLIARI, V.Z.; RIZZO, N.N.; TRENHAGO, G.; DE OLIVEIRA, A.P.; GOETZ, F.; DO NASCIMENTO, V.P.

Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. **Braz J Microbiol**, Brazil, v.41, n.4, p.1082-1085, 2011.

RODRIGUEZ-CATURLA, M.Y.; DÍAZ, A.V.; VALLEJO, J.L.R.; GARCÍA-GIMENO, R.M.; COSANO, G.Z. Effect of pre-incubation conditions on growth and survival of *Staphylococcus aureus* in sliced cooked chicken breast. **Meat Sci**, England, v.92, n.4, p.409–416, 2012.

ROGERS, K.L.; FEY, P.D.; RUPP, M.E. Coagulase-negative staphylococcal infections. **Infect Dis Clin North Am**, United States, v.23, p.73-98, 2009.

RUARO, A.; ANDRIGHETTO, C.; TORRIANI, S.; LOMBARDI, A. Biodiversity and characterization of indigenous coagulase-negative staphylococci isolated from raw milk and cheese of North Italy. **Food Microbiol**, England, v.34, n.1, p.106-111, 2013.

RUTHERFORD, S.T. & BASSLER, B.L. Bacterial quorum sensing: Its role in virulence and possibilities for its control. **Cold Spring Harb Perspect Med**, United States, v.2, n.11, 2012.

SABAT, A.; MALACHOWA, N.; MIEDZOBRODZKI, J.; HRYNIEWICZ, W. Comparison of PCR-based methods for typing *Staphylococcus aureus* isolates. **J Clin Microbiol**, United States, v.44, n.10, p.3804,3807, 2006.

SADER, H.S.; JONES, R.N.; ANDRADE-BAIOCCHI, S.; BIEDENBACH, D.J. Four-year evaluation of frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from bloodstream infections in Latin American medical centers. **Diag Microbiol Infect Dis**, United States, v.44, n.3, p.273-280, 2002.

SADOYAMA, G.; SANTOS, K.R.; BRILHANTE, A.P.; FILHO, P.P. *Staphylococcus aureus* as source of catheter related bloodstream infection evaluated by PFGE and rep-PCR typing in a Brazilian hospital. **APMIS**, Denmark, v.116, n.11, p.953-960, 2008.

SAISING, J.; SINGDAM, S.; ONGSAKUL, M.; VORAVUTHIKUCHAI, S.P. Lipase, protease, and biofilm as the major virulence factors in staphylococci isolated from acne lesions. **Biosci Trends**, Japan, v.6, n.4, p.160–164, 2012.

SALOMAO, R.; ROSENTHAL, V.D.; GRIMBERG, G.; NOUER, S.; BLECHER, S.; BUCHNER-FERREIRA, S.; VIANNA, R.; MARETTI-DA-SILVA, M.A. Device-associated infection rates in intensive care units of Brazilian hospitals: findings of the International Nosocomial Infection Control Consortium. **Rev Panam Salud Publica**, United States, v.24, n.3, p.195-202, 2008.

SAMBROOK, J. & RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANTOS, J.S. **Avaliação da qualidade microbiológica de carnes de frango comercializadas na cidade de Aracaju-SE**. Recife: Universidade Federal Rural do Semi-Árido, 2009. 41 f. Especialização, Curso de Pós-Graduação em Gestão da Qualidade e Vigilância Sanitária em Alimentos, Recife, 2009.

SANTOS, K.R.N.; FONSECA, L.S.; TEIXEIRA, L.M.; GONTIJO FILHO P.P. Typing of *Staphylococcus aureus* from surgical site infections: comparison of pulsed-field gelelectrophoresis (PFGE) and PCR technique using repetitive extragenic palindromic (rep) and Tn916-Shine-Dalgarno (TnSD) target sequences. **Int J Med Microbiol**. V.291, n.3, p.231-6, 2001.

SCHARFF, R.L. Economic burden from health losses due to foodborne illness in the United States. **J Food Prot**, United States, v.75, n.1, p.123–131, 2012.

SCHMIDT, M.; SCHULER-SCHMID, U.; SCMIDT-LORENZ, W. Temperature limits of growth, TNase, and enterotoxin production on of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. **Int J Food Microbiol**, Netherlands, v.11, p.1-19, 1990.

SEIDL, K.; GOERKE, C.; WOLZ, C.; MACK, D.; BERGER-BÄCHI, B.; BISCHOFF, M. *Staphylococcus aureus* CcpA affects biofilm formation. **Infect Immun**, United States, v.76, n.5, p.2044-2050, 2008.

SEONG, W.J.; KIM, J.H.; KWON, H.J. Comparison of complete rpoB gene sequence typing and multi-locus sequence typing for phylogenetic analysis of *Staphylococcus aureus*. **J Gen Appl Microbiol**, Japan, v.59, n.5, p.335-343, 2013.

SHAW, L.; GOLONKA, E.; POTEMPA, J.; FOSTER, S.J. The role and regulation of the extracellular proteases of *Staphylococcus aureus*. **Microbiology**, England, v.150, n.1, p.217–228, 2004.

SHI, X. & ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends Food Sci Tech**, England, v.20, p.407-413, 2009.

SHUKLA, S.K.; RAO, T.S. Effect of calcium on *Staphylococcus aureus* biofilm architecture: a confocal laser scanning microscopic study. **Colloids Surf B Biointerfaces**, Netherlands, v.103, p.448–454, 2013.

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

SOLANO, C.; ECHEVERZ, M.; LASA, I. Biofilm dispersion and quorum sensing. **Curr Opin Microbiol**, England, v.18, p.96–104, 2014.

SOUZA, E.L.; MEIRA, Q.G.; BARBOSA, I.M.; ATHAYDE, A.J.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P. Influence of temperature and surface kind on biofilm formation by

Staphylococcus aureus from food-contact surfaces and sensitivity to sanitizers. **Food Cont**, England, v.25, p.469–475, 2012.

SOUZA, G.C.; GONSALVES, H.R.O.; GONSALVES, H.E.O.; COELHO, J.L.S. Característica microbiológica da carne de frango. **Agrop Cient Semiárido**, Brazil, v.10, n.2, 2014.

SPICER, J.W. **Bacteriologia, micologia e parasitologia clínica**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, 224p.

SREY, S.; JAHID, I.K.; HA, S.D. Biofilm formation in food industries: a food safety concern. **Food Cont**, England, v.31, p.572-585, 2013.

STANLEY, N.R.; BRITTON, R.A.; GROSSMAN, A.D.; LAZZAZZERA, B.A. Identification of catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* by use of DNA microarrays. **J Bacteriol**, United States, v.185, n.6, p.1951-1957, 2003.

STEPÁN, J.; PANTUCEK, R.; DOSKAR, J. Molecular diagnostics of clinically important staphylococci. **Folia Microbiol (Praha)**, United States, v.49, n.4, p.353-386, 2004.

STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; HOLA, V.; BONAVENTURA, G.; DJUKIĆ, S.; ČIRKOVIĆ, I.; RUZICKA, F. Quantification of Biofilm in Microtiter Plates: Overview of testing Conditions and Practical Recommendations for Assessment of Biofilm Production by staphylococci. **APMIS**, Denmark, v.115, n.8, p.891-899, 2007.

SUNG, J.M.L.; LLOYD, D.H.; LINDSAY, J.A. *Staphylococcus aureus* host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multi-strain microarray. **Microbiology**, England, v.154, n.7, p.1949–1959, 2008.

TAGG, J.R. & MCGIVEN, A.R. Assay system for bacteriocins. **Appl Microbiol**, England, v.21, n.5, p.943, 1971.

TAKEUCHI, S.; KINOSHITA, T.; KAIDOH, T.; HASHIZUME, N. Purification and characterization of protease produced by *Staphylococcus aureus* isolated from a diseased chicken. **Vet Microbiol**, Netherlands, v.67, n.3, p.195-202, 1999.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiology: an introduction**. 9. ed. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings, 2007.

TRENTIN, D.S.; GIORDANI, R.B.; MACEDO, A.J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Rev Liberato**, Brazil, v.14, n.22, p.113-238, 2013.

VANDENESCH, F.; LINA, G.; HENRY, T. *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic Peptides: A Redundant Arsenal of

Membrane-Damaging Virulence Factors? **Front Cell Infect Microbiol**, Switzerland, v.2, p.12, 2012.

VAZQUEZ-SANCHEZ, D.; HABIMANA, O.; HOLCK, A. Impact of food-related environmental factors on the adherence and biofilm formation of natural *Staphylococcus aureus* isolates. **Curr Microbiol**, United States, v.66, n.2, p.110–121, 2013.

VENTURINI, K.S.; SARCINELLI, M.F.; SILVA, L.C. Características da carne de frango. UFES Boletim Técnico, 2007.

VICKERY, K.; DEVA, A.; JACOMBS, A.; ALLAN, J.; VALENTE, P.; GOSBELL, I.B. Presence of biofilm containing viable multiresistant organisms despite terminal cleaning on clinical surfaces in an intensive care unit. **J Hosp Infect**, England, v.80, n.1, p.52–55, 2012.

VILLANUEVA, V.D.; FONT, J.; SCHWARTZ, T.; ROMANI, A.M. Biofilm formation at warming temperature: acceleration of microbial colonization and microbial interactive effects. **Biofouling**, England, v.27, n.1, p.59-71, 2010.

VON EIFF, C.; PETERS, G.; HEILMANN, C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. **Lancet Infect Dis**, United States, v.2, n.11, p.677-685, 2002.

VUONG, C.; DURR, M.; CARMODY, A.B.; PESCHEL, A.; KLEBANOFF, S.J.; OTTO, M. Regulated expression of pathogen-associated molecular pattern molecules in *Staphylococcus epidermidis*: quorum-sensing determines pro-inflammatory capacity and production of phenol-soluble modulins. **Cell. Microbiol**, England, v.6, n.8, p.753–759, 2004.

WALDROP, R.; MCLAREN, A.; CALARA, F.; MCLEMORE, R. Biofilm growth has a threshold response to glucose in vitro. **Clin Orthop Relat Res**, United States, v.472, n.11, p.3305-3310, 2014.

WALKER, J.N.; HORSWILL, A.R. A coverslip-based technique for evaluating *Staphylococcus aureus* biofilm formation on human plasma. **Front Cell Infect Microbiol**, Switzerland, v.2, p.39, 2012.

WANG, S.H.; STEVENSON, K.B.; HINES, L.; MEDIAVILLA, J.R.; KHAN, Y.; SONI, R.; DUTCH, W.; BRANDT, E.; BANNERMAN, T.; KREISWIRTH, B.N.; PANCHOLI, P. Evaluation of repetitive element polymerase chain reaction for surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a large academic medical center and community hospitals. **Diagn Microbiol Infect Dis**, United States, v.81, n.1, p.13–17, 2015.

WENZEL, R. & HERRMANN, R. Repetitive DNA sequences in *Mycoplasma pneumoniae*. **Nucleic Acids Res**, England, v.16, n.17, p.8337–8350, 1988.

WIESER, M. & BUSSE, H.J. Rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. **Int J Syst Evol Microbiol**, England, v.50, n.3, p.1087-1093, 2000.

WLADYKA, B. & PUSTELNY, K. Regulation of bacterial protease activity. **Cell Mol Biol Lett**, Poland, v.13, n.2, p.212-229, 2008.

YARWOOD, J.M. & SCHLIEVERT, P.M. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. **J Clin Invest**, United States, v.112, n.11, p.1620–1625, 2003.

YE, Y.; JIANG, Q.; WU, Q.; ZHANG, J.; LU, J.; LIN, L. The characterization and comparison of *Staphylococcus aureus* by antibiotic susceptibility testing, enterobacterial repetitive intergenic consensus–polymerase chain reaction, and random amplified polymorphic DNA–polymerase chain reaction. **Foodborne Pathog Dis**, United States, v.9, n.2, p.168-171, 2012.

YOU, Y.; XUE, T.; CAO, L.; ZHAO, L.; SUN, H.; SUN, B. *Staphylococcus aureus* glucose-induced biofilm accessory proteins, GbaAB, influence biofilm formation in a PIA-dependent manner. **Int J Med Microbiol**, Germany, v.304, n.5-6, p.603-612, 2014.

ZOTTOLA, E.A. & SASAHARA, K.C. Microbial biofilms in the food processing industry--should they be a concern? **Int J Food Microbiol**, Netherlands, v.23, n.2, p.125-148, 1994.