

THIAGO FREITAS DE SÁ COIMBRA

AVALIAÇÃO DA MOTILIDADE DE AMOSTRAS DE  
*Staphylococcus* SPP. EM MEIO SEMISSÓLIDO



**Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
RIO DE JANEIRO  
DEZEMBRO / 2018**

**Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Dra. Rosana Barreto Rocha Ferreira e coorientação da MSc. Thaís Glatthardt.**

Coimbra, Thiago Freitas de Sá

Avaliação da motilidade de amostras de *Staphylococcus* spp. em meio semissólido/ Thiago Freitas de Sá Coimbra. – Rio de Janeiro: UFRJ, 2018.

x; 61f. : il ; 30cm

Orientadora: Rosana Barreto Rocha Ferreira

Coorientadora: Thaís Glatthardt

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, 2015.

Bibliografia: f.48-61

1. *Staphylococcus* spp. 2. Motilidade. I. Ferreira, Rosana Barreto Rocha II. Glatthardt, Thaís. III. UFRJ. Instituto de Microbiologia Paulo de Góes. IV. Título

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ  
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO  
NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,  
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E  
IMUNOLOGIA

ALUNO: **Thiago Freitas de Sá Coimbra**  
DRE: 115034201

BANCA EXAMINADORA: Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho (Presidente)  
Prof. Bruno de Araújo Penna  
MSc. Wesley de Paiva Santos  
Profa. Tatiana de Castro Abreu Pinto (Suplente)

Título da Monografia: "Avaliação da motilidade de amostras de *Staphylococcus*  
spp. em meio semissólido"

Local: Sala de Reunião do Departamento de Microbiologia Geral / Instituto de  
Microbiologia Paulo de Góes / CCS / UFRJ

Data e hora de início: 6 de dezembro de 2018 às 10:00h


Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos  
membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de  
sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,0 neste requisito  
do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi  
lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador  
(e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 06 de dezembro de 2018.

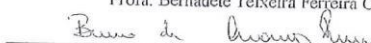
NOTA

Banca Examinadora:

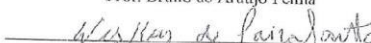
10,0

  
Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

10,0

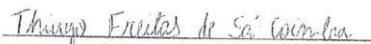
  
Prof. Bruno de Araújo Penna

10,0

  
MSc. Wesley de Paiva Santos

Profa. Tatiana de Castro Abreu Pinto

Aluno:

  
Thiago Freitas de Sá Coimbra

Orientador:

  
Profa. Rosana Barreto Rocha Ferreira

Coorientador:

  
MSc. Thais Glatthardt da Silva dos Santos

Coordenador  
de TCC

  
Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

## Agradecimentos

Primeiramente, agradeço ao meu Pai Oxalá e a todos os meus orixás por estarem sempre ao meu lado nos momentos que eu mais preciso, dentro e fora da universidade, até mesmo nos momentos que nem eu mesmo pensava que vocês estariam ao meu lado.

Agradeço também aos meus pais, Erika e Marco, e aos meus avós maternos, Graça e Sérgio. Sem todo o amor que vocês sempre me deram e continuam me dando, tudo seria muitíssimo mais difícil. Sem contar todo o ânimo que vocês me deram diariamente em relação à faculdade. Saber do quão vocês são orgulhosos por verem onde seu único filho e único neto está chegando é uma responsabilidade muito grande, mas é um sentimento gratificante e que me injeta cada vez mais forças para seguir em frente na minha jornada. Tenho que agradecer também a tia Dinha, mãe de minha afilhada Beatriz, que, desde sempre, torce por todas as minhas conquistas tanto quanto uma mãe vibra pelas vitórias de um filho. Agradeço também aos meus amigos Jhonatan, Thiago, Rafael, Diego e, principalmente, minha *best* Larissa, por toda a torcida, apoio, e até mesmo por me alegrarem fora da faculdade, aliviando meus estresses típicos de um universitário.

Me sinto na obrigação de agradecer também à Associação Vencer, entidade que custeou meus estudos no Ensino Médio sem os quais provavelmente eu não teria ingressado na universidade tão facilmente. Foram vocês que tornaram esse sonho possível e serei eternamente grato pelo trabalho que vocês fizeram por mim e por tantos outros jovens pelo Rio de Janeiro.

Gostaria de mandar meu muito obrigado a todos os professores do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da UFRJ sem os quais eu não teria adquirido todos os conhecimentos necessários para a concretização desta monografia.

Não posso deixar de agradecer ao meu *squad* sem o qual esses 4 anos de graduação não seriam os mesmos. Julianna, Roberto e Sarah, saibam que vocês foram muitíssimo especiais nessa jornada. Nossos momentos de alegrias, altas risadas, até mesmo os de desespero com as provas e disciplinas mais temidas, sem falar nas centenas de almoços no bandeirão e tortinhas que comemos juntos, vão ficar guardados na minha memória. Muito obrigado por tudo!

Gratidão também ao Laboratório de Microbiologia Molecular do IMPG-UFRJ e ao Laboratório Cocos de Gram Positivos do Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense por cederem algumas amostras para realização deste trabalho. Agradeço também ao Laboratório de Infecção Hospitalar (IMPG-UFRJ) e todos os seus membros que, além de também me cederem algumas amostras, cederam também o pouco de seu espaço para o início do desenvolvimento deste projeto, além de contribuir significativamente para minha formação profissional e pessoal. E claro, agradeço também ao Laboratório de Cocos Patogênicos e Microbiota (IMPG-UFRJ), que acabou virando minha segunda casa, onde meu projeto se consolidou, onde amadureci como profissional.

Agradeço aos membros do LCPM por me ensinarem, independente de qualquer coisa, a importância de um convívio minimamente amigável no ambiente de trabalho. Um agradecimento especial às sobrinhas da tia Rô, Andressa, Gabrielle, Giulia, Jéssica, Juliana Curityba, Juliana Reviello e Rayssa, minhas irmãs de laboratório, por toda a convivência, as risadas e os ensinamentos trocados. Um agradecimento ainda mais especial à minha co-orientadora, Thaís não só por me co-orientar, mas me oferecer todo o seu conhecimento, generosidade e, acima de tudo, sua amizade. Provavelmente, minha formação seria completamente diferente sem seu auxílio.

E claro, um agradecimento muito mais que especial à mulher por trás deste trabalho, que tornou tudo isso possível. Mais que uma pesquisadora, uma professora, uma chefe de laboratório

ou uma orientadora, uma verdadeira mãe científica. Rosana, muito obrigado por me abrir as portas de seu laboratório. Por depositar sua confiança em mim, o que foi realmente importante para minha autoconfiança. Por me deixar à cargo de realizar um trabalho que tanto gosto. Muito obrigado por ser essa orientadora incrível que nos guia na nossa busca por conhecimento, sempre nos dando uma palavra de sabedoria sem deixar de ouvir nossos pontos de vista e necessidades. Você vai ficar eternamente guardada em meu coração.

E um muito obrigado às agências de fomento que ajudaram no suporte financeiro desta pesquisa, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e a Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

## RESUMO

Thiago Freitas de Sá Coimbra

Avaliação da motilidade de amostras de *Staphylococcus* spp. em meio semissólido

Orientadora: Rosana Barreto Rocha Ferreira

**Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

A motilidade de muitas espécies bacterianas é crítica para a sua sobrevivência em diversos ambientes, assim como para a sua patogenicidade. *Staphylococcus* spp. é um gênero que engloba importantes patógenos que podem causar diversos tipos de infecções, desde abscessos cutâneos até infecções invasivas. Estes microrganismos são historicamente considerados imóveis, entretanto três formas de motilidade já foram descritas para *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus xylosus*. A primeira é chamada de espalhamento (*spreading*), um tipo de motilidade por deslizamento passivo (*sliding*). A segunda forma envolve formação de cometas, característica associada com deslizamento ativo (*gliding*). Já a terceira, envolve a ejeção, ainda não tão elucidada, de algumas células do agregado bacteriano (*darting*). O *sliding* resulta do crescimento radial a partir do inóculo bacteriano em um ágar semissólido utilizando somente o crescimento celular e a produção de surfactantes. Em *S. aureus*, este fenômeno é dependente do sistema *agr* de *quorum sensing* que também regula diversos processos relacionados à virulência bacteriana. A formação de cometas foi descrita recentemente em *S. aureus* e envolve a presença de ramificações de agregados celulares a partir do crescimento bacteriano envoltas por uma camada de *slime*. O objetivo deste estudo foi verificar a presença de motilidade em amostras de *Staphylococcus* spp. Para isso, 59 amostras de *Staphylococcus* spp. foram selecionadas, cultivadas e inoculadas em meio TSB suplementado com 0,24% de ágar. As amostras de *S. aureus*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* e *Staphylococcus schleiferi* subsp. *schleiferi*, *Staphylococcus lugdunensis* e *Staphylococcus capitis* exibiram diâmetros de colônia significativamente diferentes do controle negativo. Porém somente as amostras de *S. aureus*, *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans* e *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* apresentaram motilidade compatível com a amostra controle positiva de modo semelhante aos processos descritos na literatura. As colônias de algumas cepas de *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus warneri* e *Staphylococcus saprophyticus* exibiram traços morfológicos que podem ser indícios de motilidade. Já todas as amostras das espécies *Staphylococcus epidermidis* e *S. hominis* não exibiram nenhum indício de motilidade. A motilidade apresentada foi dependente das mudanças experimentais avaliadas, sugerindo que as condições de cultivo, assim como de preparo da placa são fatores importantes na motilidade em superfície destas amostras. O fenótipo de motilidade ainda não havia sido

descrito para a maior parte das espécies aqui descritas e estudos futuros devem continuar a desvendar os mecanismos envolvidos na motilidade deste gênero bacteriano.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Staphylococcus* spp., motilidade.



## ABSTRACT

Thiago Freitas de Sá Coimbra

Evaluation of *Staphylococcus* spp. strains motility on soft agar

Advisor: Rosana Barreto Rocha Ferreira

**Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

In many bacterial species, motility is critical for survival in lots of environments, as well as for its pathogenicity. *Staphylococcus* spp. is a genus that includes important pathogens which cause many types of infectious diseases ranging to cutaneous abscess until invasive infections. These microorganisms have historically been regarded as non-motile. However, three forms of motility were already described for *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus xylosum*. The first one is called spreading, a type of motility by sliding, a passive form of moving. The second form involves comets formation, characteristic associated with gliding, a type of active moving. The third one involves the ejecting, not so elucidated yet, of few cells from the bacterial aggregate (darting). Sliding results of radial growing from bacterial spots on soft agar surfaces using only the cellular growth and surfactant production. In *S. aureus*, this phenomenon is dependent on *agr* quorum sensing system that regulates many virulence bacterial processes. Comets formation was recently described in *S. aureus* and involves the presence of cellular aggregates ramifications from the bacterial growth covered by slime. The aim of this study was to verify the presence of motility in staphylococcal strains. 59 *Staphylococci* strains were selected, grown and spotted in TSB supplemented with 0,24% of agar. *S. aureus*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* and *Staphylococcus schleiferi* subsp. *schleiferi* strains showed colony diameters significantly different from negative control. However, only *S. aureus*, *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans* and *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* strains showed motility compatible with positive control strain as process described on literature. The colonies of some *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus* and *Staphylococcus warneri* strains showed morphologic traces that might be motility signs. Neither *Staphylococcus epidermidis* nor *Staphylococcus hominis* species strains showed any motility signs. The motility presented was dependent on experimental changes assessed, suggesting that conditions of culture, as well as of plates preparing are important factors on these strains surface motility. Motility phenotype was not described yet for major of species described here, and future studies must continue to unravel the mechanisms around this bacterial genus motility.

Key-words: *Staphylococcus* spp., motility.

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. O gênero <i>Staphylococcus</i> .....	1
1.1.1. <i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva.....	2
1.1.2. <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa.....	5
1.2. Gene acessório regulador ( <i>agr</i> ).....	8
1.3. Motilidade bacteriana.....	9
1.3.1. Motilidade em <i>Staphylococcus</i> spp.....	11
2. JUSTIFICATIVA .....	14
3. OBJETIVOS .....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	16
4.1. Amostras bacterianas.....	16
4.2. Confirmação da identificação das amostras bacterianas pelo MALDI-TOF MS.....	19
4.3. Ensaio de motilidade em meio semissólido.....	20
4.4. Análise estatística dos resultados.....	21
5. RESULTADOS.....	21
5.1. Confirmação da identificação das amostras utilizadas no estudo.....	21
5.2. Avaliação da motilidade das amostras de <i>Staphylococcus</i> .....	21
5.2.1. <i>S. aureus</i> .....	22
5.2.2. <i>S. capitis</i> .....	24
5.2.3. <i>S. epidermidis</i> .....	26
5.2.4. <i>S. haemolyticus</i> .....	27
5.2.5. <i>S. hominis</i> .....	28

5.2.6. <i>S. lugdunensis</i> .....	30
5.2.7. <i>S. pseudintermedius</i> .....	31
5.2.8. <i>S. saprophyticus</i> .....	34
5.2.9. <i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i> .....	35
5.2.10. <i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i> .....	37
5.2.11. <i>S. warneri</i> .....	39
6. DISCUSSÃO.....	42
7. CONCLUSÕES.....	47
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	48

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. O gênero *Staphylococcus*

*Staphylococcus* spp. foi descrito pela primeira vez em 1880 pelo cirurgião escocês Alexander Ogston, que posteriormente demonstrou que este grupo bacteriano causa a formação de abscessos em animais infectados (apud Cheng *et al.*, 2011). Este gênero pertence à família *Staphylococcaceae* e engloba 53 espécies e 28 subespécies (LPSN, 2018). *Staphylococcus* spp. são cocos Gram-positivos que geralmente crescem como agrupamentos semelhantes a cachos de uva, além de serem bactérias anaeróbias facultativas. Ademais, são incapazes de formar esporos, tolerantes à altas concentrações de cloreto de sódio (Becker e Von Eiff, 2011; Madigan *et al.*, 2016) e, em geral, produzem a catalase, enzima responsável pela degradação do peróxido de hidrogênio (Loew, 1900), com exceção de *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* e *Staphylococcus saccharolyticus*. O gênero é dividido de acordo com a capacidade de produção de uma proteína extracelular, a coagulase, capaz de converter o fibrinogênio sanguíneo em fibrina, o que viabiliza a coagulação do plasma por amostras produtoras desta proteína. Sendo assim, há a divisão deste gênero em *Staphylococcus* coagulase-negativa (SCN) e coagulase-positiva (SCP) (Kloos e Bannerman, 1999; Archer, 2000). Contudo, algumas espécies podem ser englobadas em ambos os grupos, como *Staphylococcus schleiferi*, pois agrupam subespécies que possuem atividade coagulase, nesse caso, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, e outros no qual essa atividade é ausente, como *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* (Vandenesch *et al.*, 1994).

Espécies de *Staphylococcus*, assim como *Propionibacterium* spp., *Micrococcus* spp. e *Corynebacterium* spp., são os principais componentes da microbiota anfibiôntica da pele e da mucosa nasal de humanos e de outros animais (Cogen, Nizet e Gallo, 2008; Gao *et al.*, 2010; Weese e van Duijkeren, 2010; Cain, Morris e Rankin, 2011; van Duijkeren *et al.*, 2011). Apesar disso, são considerados patógenos oportunistas, pois podem causar quadros patológicos variados, como infecções cutâneas, endocardites, osteomielites, pneumonia e septicemia, além de poderem estar relacionados a casos de intoxicação alimentar (Lowy, 1998; Le Loir, Baron e Gautier, 2003; Fournier e Philpott, 2005).

### 1.1.1. *Staphylococcus* coagulase-positiva

A maior parte dos *Staphylococcus* coagulase-positiva (SCP) é frequentemente associada à microbiota comensal de mamíferos não humanos e também pode estar relacionada a casos de infecções nesses animais (Freney *et al.*, 1999; Devriese *et al.*, 2005, LPSN, 2018). Já a principal espécie de SCP de importância em humanos, *Staphylococcus aureus* é frequentemente isolado da mucosa nasal e da pele de seres humanos (von Eiff *et al.*, 2001), podendo ser encontrado também colonizando outros animais (Peton e Le Loir, 2014). Esta espécie pode crescer de forma ótima em temperaturas que variam entre 30 e 37 °C e em faixas de pH entre 7 e 7,5 (Bergdoll, 1989). As colônias formadas por *S. aureus* são relativamente grandes e exibem coloração acinzentada ou amarelo-dourada intensas e, frequentemente, exibem β-hemólise em ágar contendo 5% de sangue desfibrinado de carneiro (Becker e Von Eiff, 2011; Madigan *et al.*, 2016).

Embora seja uma bactéria comensal da pele e da mucosa nasal de cerca de um terço da população humana, *S. aureus* é frequentemente associado a diversas infecções, que podem variar de abscessos cutâneos e celulites purulentas até bacteremias e endocardites, podendo também ser associado a casos de intoxicação por produtos alimentícios (Weidenmaier, Goerke e Wolz, 2012; Chessa, Ganau e Mazzarello, 2015; Tong *et al.*, 2015). Na maioria dos casos, essas infecções ocorrem quando o patógeno consegue transpassar a barreira cutâneo-mucosa e alcançar os tecidos adjacentes (Iwatsuki *et al.*, 2006). A variedade de infecções causadas por esta espécie está associada ao fato deste microrganismo possuir uma ampla gama de fatores de virulência que viabilizam sua adesão, invasão, agressão e evasão ao sistema imunológico do hospedeiro (Kubica *et al.*, 2008; Lambris, Ricklin e Geisbrecht, 2008; Zecconi e Scali, 2013).

Um desses fatores são as adesinas conhecidas como *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules* (MSCRAMMs). Estas são proteínas superficiais que medeiam a adesão de *S. aureus* a proteínas da matriz extracelular do hospedeiro e são encontradas covalentemente ancoradas ao peptidoglicano da parede celular desta bactéria (Navarre e Schneewind, 1994; Mazmanian *et al.*, 1999; Foster *et al.*, 2014).

*S. aureus* também apresenta alguns mecanismos para evadir o sistema imunológico do hospedeiro, como a presença de cápsula polissacarídica que tem ação antifagocítica, permitindo a persistência do microrganismo no sangue ou em outros tecidos do hospedeiro (Sutra, Rainard e

Poutrel, 1990; Thakker *et al.*, 1998). Os tipos de polissacarídeo capsular CP5 e CP8 são os mais encontrados neste microrganismo (Murphy *et al.*, 2011). Outro mecanismo de evasão importante em *S. aureus* é a sua capacidade de secretar a proteína inibidora de quimiotaxia de estafilococos (CHIPS) e a proteína de adesão extracelular (Eap), que inibe o recrutamento de neutrófilos e reduz a expressão endotelial de moléculas recrutadoras de neutrófilos, respectivamente (Foster, 2005; Ythier *et al.*, 2010; Krishna e Miller, 2012). Outra proteína, a proteína A, presente na superfície celular, apresenta grande afinidade pela porção Fc de imunoglobulinas, de modo que quando ligada a essa porção, inibe a atividade de opsonização da imunoglobulina, conferindo a *S. aureus* a capacidade de evadir à fagocitose e à ação do sistema complemento. (Thammavongsa *et al.*, 2015). Além disso, cepas de *S. aureus* também podem secretar toxinas capazes de lisar células hospedeiras importantes para a resposta do sistema imunológico, como  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -hemolisinas, leucocidina de Panton-Valentine (PVL) e modulinas solúveis em fenol (Otto, 2014).

A secreção de outras toxinas por *S. aureus* mostra-se como um importante fator de patogenicidade por afetar diretamente o metabolismo de células eucarióticas (Otto, 2012). Como exemplos, podem ser citadas as enterotoxinas, as toxinas esfoliativas e a toxina da síndrome do choque tóxico 1 (TSST-1) (Dinges, Orwin e Schlievert, 2000; Alonzo e Torres, 2014). TSST-1 pode atuar como um superantígeno, pois ativa a proliferação exacerbada dos linfócitos T, além de provocar a liberação maciça dos mediadores pró-inflamatórios responsáveis pelas manifestações clínicas da síndrome do choque tóxico (Proft e Fraser, 2003; Thomas *et al.*, 2009; Salgado-Pabón *et al.*, 2013; Nowrouzian *et al.*, 2015). A regulação dessas exoproteínas é realizada pelo gene acessório regulador (*agr*, do inglês *accessory gene regulator*) (Novick e Geisinger, 2008). Outros reguladores também envolvidos na regulação das toxinas são o *sarA* (Cheung *et al.*, 1992) e o *sae* (*S. aureus* exoprotein expression) (Giraud, Cheung e Nagel, 1997), que agem de forma coordenada ou independente.

A habilidade de formação de biofilme tem sido apontada como um fator de virulência importante para infecções crônicas e recorrentes causadas por *S. aureus* (Parsek e Singh, 2003; Barrett e Atkins, 2014; Chatterjee *et al.*, 2014). O biofilme é definido como uma comunidade microbiana sésil, no qual as células estão conectadas a uma superfície e/ou a outras células e incorporadas em uma matriz polimérica extracelular. Essa forma de crescimento, que pode ocorrer sobre superfícies bióticas (como ossos e válvulas cardíacas) e também sobre superfícies

abióticas (como cateteres, próteses e outros dispositivos médicos), resulta de alterações fisiológicas, no que se refere à expressão gênica e à produção de proteínas pelo microrganismo (Parsek e Singh, 2003; Archer *et al.*, 2011). O biofilme funciona como barreira física à ação do sistema imunológico do hospedeiro e é um grave problema na área de saúde, pois está intrinsecamente associado ao aumento da tolerância dos microrganismos aos antimicrobianos, além de atuar como um ponto central de disseminação do patógeno (Fey e Olson, 2010; Otto, 2012). Além disso, está associado a infecções relacionadas a dispositivos médicos e a dificuldade de tratamento destas, uma vez que células embebidas no biofilme são menos expostas aos antimicrobianos (Donlan, 2001; Otto, 2008; Kiedrowski e Horswill, 2011). O biofilme pode também contribuir para a aquisição de resistência a antimicrobianos por permitir o contato célula-célula e assim, aumentar as taxas de transferência horizontal gênica (Savage Chopra e O'Neill, 2013).

Além de expressar uma ampla gama de fatores de virulência, *S. aureus* apresenta capacidade de adquirir resistência contra antimicrobianos o que dificulta o tratamento de infecções causadas por estes microrganismos. A resistência à meticilina é um grave problema de saúde pública que inclui a resistência não só a este fármaco, como também a todos os outros antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos (Fuda, Fischer e Mobashery, 2005). Essa resistência acontece devido a presença do cassete cromossômico estafilocócico (*SCCmec*), um elemento genético móvel no qual se encontram genes responsáveis por este fenômeno (Chambers e DeLeo, 2009). Baseado na sua susceptibilidade à meticilina, as amostras de *S. aureus* podem ser classificadas como sensíveis à meticilina (MSSA) ou resistentes (MRSA), e no que diz respeito ao tratamento de infecções por estes últimos atualmente há uma limitação de antimicrobianos disponíveis (Hiramatsu *et al.*, 1997; Brooks *et al.*, 2014; Chamon, 2017).

Das espécies de SCP que costumam colonizar outros mamíferos em detrimento de humanos, *Staphylococcus pseudintermedius* é frequentemente isolado da pele e das mucosas nasais e orais de gatos e cachorros saudáveis, sendo considerado o principal causador de infecções cutâneas e otites em cães (Devriese *et al.*, 2005), além de já ter sido relacionado a casos de infecção urinária, infecção pós-cirúrgica e de pele nesses animais (Richards *et al.*, 2018). Embora seja uma bactéria normalmente associada a quadros patológicos caninos, *S. pseudintermedius* já foi relatado como patógeno humano e, desde então, casos esporádicos de

infecções nosocomiais e adquiridas na comunidade têm sido descritos (Somayaji *et al.*, 2016), principalmente quando há contato direto entre humanos e cães (Robb *et al.*, 2017). O aparecimento e a disseminação de cepas de *S. pseudintermedius* resistentes à meticilina (MRSP), associado ao uso contínuo de antimicrobianos em pacientes com pioderma recorrente, dificulta o tratamento de infecções causadas por esse patógeno (Richards *et al.*, 2018).

Outra espécie de SCP também comumente isolada do canal auditivo de cães diagnosticados com otite e que pode também estar associado a casos de pioderma nesses animais é *S. schleiferi* subsp. *coagulans* (Igimi, Takahasi e Mitsuoka, 1990; Frank *et al.*, 2003; Zdovic *et al.*, 2004). Alguns casos relatados em humanos estão associados ao contato com cães colonizados (Thibodeau *et al.*, 2012; Swe *et al.*, 2016). A resistência à meticilina é uma característica também já descrita em algumas cepas dessa subespécie (Frank *et al.*, 2003; Kania *et al.*, 2004).

### 1.1.2. *Staphylococcus coagulase-negativa*

*Staphylococcus coagulase-negativa* (SCN) são encontrados na microbiota da pele humana (Piette e Verschraegen, 2009), mas também são considerados os patógenos mais relacionados a infecções hospitalares de corrente sanguínea e associados ao uso de catéteres vasculares e outros dispositivos médicos (Rogers, Fey e Rupp, 2009). Além disso, em casos mais raros, são isolados de infecções cutâneas e de tecidos moles (Natsis e Cohen, 2018). Algumas espécies deste grupo têm maior importância clínica em infecções humanas, incluindo *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*, *Staphylococcus warneri* e *Staphylococcus capitis* (Huebner e Goldmann, 1999; Becker, Heilmann e Peters, 2014).

Considerado o principal patógeno humano entre os SCN, *S. epidermidis* é também a espécie bacteriana mais abundante na microbiota da pele humana (Christensen e Brüggemann, 2014). Estudos apontaram sua presença tanto neste órgão como na cavidade nasal atuando como um importante inibidor de crescimento de patógenos como *S. aureus* e *Streptococcus pyogenes* devido à produção de compostos antimicrobianos (Bastos *et al.*, 2009; Cogen *et al.*, 2010a; Cogen *et al.*, 2010b; Gallo e Nakatsuji, 2011). Estudos recentes do nosso grupo reportaram que moléculas secretadas por amostras de *S. epidermidis* isoladas da microbiota cutânea são capazes



de atuar sobre a virulência de amostras clínicas de *S. aureus*, reduzindo a capacidade destas amostras de formar biofilme (Glatthardt, 2016). Como patógeno, porém, *S. epidermidis* é frequentemente associado a casos de endocardite e infecções em implantes cirúrgicos nas quais a formação de biofilme apresenta-se como importante fator de virulência (Rogers, Fey e Rupp, 2009).

Outra espécie de SCN importante na clínica humana e frequentemente encontrada nas áreas axilares e inguinais da pele humana é *S. haemolyticus*. Esta espécie é comumente encontrada em infecções sanguíneas após o uso de dispositivos médicos, sendo também isolada de infecções cutâneas e de tecidos moles (Czekaj, Ciszewski e Szewczyk, 2015; Natsis e Cohen, 2018). Igualmente capaz de formar biofilme, *S. haemolyticus* é uma bactéria capaz de produzir biosurfactantes, moléculas que podem diminuir a tensão superficial e interfacial entre líquidos e que podem contribuir de forma significativa na competição por nicho contra outras bactérias (Banat *et al.*, 2010; Barros *et al.*, 2015; Rossi *et al.*, 2016). A plasticidade genômica também se mostra como um importante mecanismo da virulência dessa espécie que apresenta as maiores taxas de resistência aos antimicrobianos entre os SCN (Barros *et al.*, 2012).

*S. lugdunensis* é uma bactéria comumente associada a casos de infecções cutâneas e de tecidos moles, osteomielites, infecções sanguíneas e relacionadas a dispositivos médicos, entre outras (Babu e Oropello, 2011). Para auxiliar em sua virulência, *S. lugdunensis* expressa adesinas, entre elas a proteína de ligação ao fator von Willebrand, que contribuem para a patogênese das infecções por este patógeno ligando-se a proteínas do hospedeiro (Babu e Oropello, 2011). Assim como outros SCN, cepas de *S. lugdunensis* também demonstram capacidade de produzir biofilme, o que dificulta o tratamento de infecções causadas por esse microrganismo.

*S. hominis* também compõe a microbiota anfibiótica da pele humana e é um patógeno oportunista isolado principalmente de pacientes com deficiências imunológicas e neonatos, associado a casos de bacteremia, endocardite e septicemia (Chaves *et al.*, 2005; Sunbul *et al.*, 2006; Cunha, Esrick e Larusso, 2007; Palazzo *et al.*, 2008; Al Wohoush *et al.*, 2011). Além de comumente carrear genes de resistência a vários antimicrobianos, *S. hominis* é uma espécie capaz de formar biofilme (Mendoza-Olazarán *et al.*, 2013). Ademais de sua capacidade infecciosa, um

estudo recente sugeriu que essa espécie pode ser um comensal na pele humana saudável mais abundante que *S. epidermidis* (Gautam *et al.*, 2017).

Normalmente associado a infecções do sistema urinário, *S. saprophyticus* é um microrganismo produtor da enzima urease e incapaz de produzir hemolisinas, o que pode ser utilizado como base para sua identificação (Nicolle, Hoban e Harding, 1983; Raz, Colodner e Kunin, 2005). O trato gastrointestinal humano e a região perineal são os sítios onde *S. saprophyticus* reside de forma comensal, e as colonizações retal, uretral e vaginal por esse microrganismo estão associadas a infecções urinárias em humanos (Soge *et al.*, 2009; Becker, Heilmann e Peters, 2014). A expressão de determinadas proteínas de superfície é importante na patogenicidade desta espécie, pois auxiliam na adesão celular no trato urinário (Gatermann, 1986; Gatermann *et al.*, 1988). Além disso, essa espécie também se mostra capaz de formar biofilme (de Allori *et al.*, 2006).

Infecções por *S. warneri* podem causar sepse sanguínea, especialmente em neonatos prematuros (Kropp *et al.*, 2014). *S. warneri* também é capaz de formar biofilme (Szczuka, Krzyminska e Kaznowski, 2016), porém raramente esta espécie é reportada como causa de infecções em indivíduos saudáveis (Wood, Sewell e Strausbaugh, 1989).

Mais um colonizador da microbiota cutânea, *S. capitis* é encontrado principalmente no couro cabeludo e na face (Natsis e Cohen, 2018). Porém, já foi encontrado em casos de cistos infectados, foliculites e osteomielites (Akiyama *et al.*, 1998). Hábil em formar biofilme, *S. capitis* é também associado a casos de sepse em pacientes neonatais e a casos de endocardite (Bandres e Daroiche, 1992; Van Der Zwet *et al.*, 2002).

*S. schleiferi* subsp. *schleiferi* foi primariamente isolado de humanos (Freney *et al.*, 1988), podendo também ser encontrado colonizando a pele, as narinas, os ouvidos e o reto de cães, o que pode ser um fator desencadeador de infecções cutâneas e otites nesses animais (Igimi, Takahasi e Mitsuoka, 1990; Griffeth *et al.*, 2008; Briscoe *et al.*, 2009). A produção de proteína ligadora de fibronectina e de  $\beta$ -hemolisina são alguns dos poucos fatores de virulência descritos para esta subespécie (Peacock *et al.*, 1999; Linehan, Etienne e Sheehan, 2003).

## 1.2. Gene acessório regulador (*agr*)

Primeiramente relatado em *S. aureus*, o gene acessório regulador (*agr*) já foi descrito em diversas espécies de *Staphylococcus* (Vandenesch *et al.*, 1993; Van Wamel *et al.*, 1998; Dufour *et al.*, 2002; Sakinc *et al.*, 2004; Chitra, Jayanthi e Nagarajan, 2015; Canovas *et al.*, 2016). É um sistema de *quorum sensing* de regulação, ou seja, se baseia na densidade celular para controlar a expressão gênica (Waters e Bassler, 2005; Madigan *et al.*, 2016), e, em *Staphylococcus spp.*, é um importante regulador de genes de virulência, sendo em *S. aureus* responsável por controlar a produção e a secreção de exoproteínas relativas à virulência, simultaneamente reprimindo a expressão de proteínas associadas à parede celular (Recsei *et al.*, 1986; Peng *et al.*, 1988; Janzon e Arvidson, 1990; Le e Otto, 2015). Mais bem elucidado em *S. aureus*, esse sistema é composto por dois operons, RNA II e RNA III, cujas transcrições são iniciadas pelos promotores P2 e P3, respectivamente (Peng *et al.*, 1988; Kornblum *et al.*, 1990; Le e Otto, 2015).

O operon RNA II apresenta os genes *agrB*, *agrD*, *agrC* e *agrA*. O *agrD* codifica AgrD, um precursor do peptídeo autoindutor (AIP), molécula que funciona como um sinal extracelular de densidade populacional (Ji, Beavis e Novick, 1995). O *agrB* codifica uma endopeptidase transmembrana responsável por modificações estruturais e posterior liberação do AIP no meio extracelular (Saenz *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2002; Zhang and Ji, 2004). Os genes *agrC* e *agrA* codificam um sistema de dois componentes que inclui AgrC, uma proteína transmembrana do tipo histidina-quinase que funciona como sensor para moléculas de AIP, sendo fosforilada quando estas se ligam à proteína, e AgrA, um regulador de resposta associado ao AgrC (Novick *et al.*, 1995; Lina *et al.*, 1998; Queck *et al.*, 2008). Após ser ativado por fosforilação pelo AgrC, AgrA liga-se aos promotores P2 e P3, assim como também se liga aos promotores que regulam a expressão das modulinas solúveis em fenol  $\alpha$  e  $\beta$  (Novick *et al.*, 1995; Koenig *et al.*, 2004; Queck *et al.*, 2008).

Já o operon RNA III codifica o principal efetor intracelular na resposta mediada pelo *agr*, o *rnaIII* (Balaban e Novick, 1995), que atua inibindo a produção de algumas proteínas de superfície, como a proteína A (Le e Otto, 2015). Esse efetor bloqueia a transcrição de Rot, uma proteína que bloqueia a transcrição de várias exoproteínas e toxinas ao se ligar à região promotora destas (McNamara *et al.*, 2000; Saïd-Salim *et al.*, 2003; Boisset *et al.*, 2007). Dessa

forma, esse mecanismo auxilia na amplificação da produção densidade-dependente de enterotoxinas,  $\alpha$ -toxina, leucocidinas e exoenzimas degradativas e na redução da produção de proteínas de superfície (Le e Otto, 2015). O gene *hld*, que codifica a produção  $\delta$ -hemolisina, uma modulina solúvel em fenol, também está localizado no RNA III (Janzon, Löfdahl e Arvidson, 1989).

Entre diferentes cepas de *S. aureus*, é possível observar a existência de quatro tipos diferentes de *agr*, do I ao IV, fenômeno conhecido como polimorfismo (Ji, Beavis e Novick, 1997; Jarraud *et al.*, 2000). Isso ocorre devido a variações nas sequências de *agrB*, *agrC* e *agrD*, acarretando na variação da produção de AIPs de acordo com o tipo de *agr* expresso pela cepa (Ji, Beavis e Novick, 1997). O estímulo à expressão do sistema *agr* em um grupo bacteriano é dependente da presença de AIPs derivados do mesmo *agr* expresso por esse grupo; do contrário, AIPs de outros grupos ou até de outras espécies podem inibir a expressão desse *agr* (Ji, Beavis e Novick, 1997; Jarraud *et al.*, 2000; Otto *et al.*, 2001). Em outras espécies do gênero *Staphylococcus* spp., como *S. epidermidis* e *S. pseudintermedius*, o fenômeno de polimorfismo do *agr* também pode ser observado (Dufour *et al.*, 2002; Chitra, Jayanthi e Nagarajan, 2015).

### 1.3. Motilidade bacteriana

A motilidade é uma característica que pode ser crucial para a sobrevivência de determinados microrganismos, pois permite o alcance de diferentes sítios ou ambientes para obtenção de recursos vitais (Madigan *et al.*, 2016). Além de sua relação com a capacidade de colonização de superfícies, a motilidade pode também estar ligada com a resistência a antibióticos (Lai, Tremblay e Déziel, 2009; Butler, Wang e Harshey, 2010) e à virulência de várias espécies bacterianas (Josenhans e Suerbaum, 2002; Jarrell e McBride, 2008; Pollitt e Diggle, 2017), o que torna essa característica importante no contexto de diferentes infecções.

O movimento bacteriano pode acontecer de forma ativa ou passiva. A forma ativa ocorre por mecanismos celulares dependentes de energia nos quais a bactéria consegue controlar, via aparatos físicos, a direção de seu deslocamento. Já a forma passiva de motilidade ocorre a partir de modificações ambientais geradas ao longo da multiplicação celular a fim de gerar forças que auxiliem no impulso celular (Henrichsen, 1972; Pollitt e Diggle, 2017). Até o momento, seis

tipos de motilidade bacteriana foram descritos, baseados em análises do deslocamento de diferentes espécies bacterianas em superfícies. De acordo com essas análises, a motilidade pode ser classificada como *swimming*, *swarming*, *twitching*, e *gliding*, ambas estratégias ativas de locomoção, além de *sliding* e *darting*, sendo estes modos de locomoção passivos (Henrichsen, 1972).

*Swimming*, que pode ser observado, por exemplo, em *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, é um tipo de motilidade no qual cada célula desloca-se individualmente; ocorre de forma aleatória e desorganizada em superfícies úmidas. Para esta motilidade, é necessária a presença de flagelo ancorado à superfície celular (Henrichsen, 1972). Em *Archaea*, esse flagelo é substituído por pili tipo IV, uma estrutura celular também importante na adesão a superfícies (Pollitt e Diggle, 2017). Além do mais, para a realização desta motilidade é necessária uma resposta a um gradiente químico, processo denominado de quimiotaxia (Madigan *et al.*, 2016; Pollitt e Diggle, 2017). A quimiotaxia exibe um mecanismo complexo, dependente de proteínas sensoriais presentes na membrana plasmática, que conferem à bactéria a capacidade de monitoramento da presença de substâncias químicas no ambiente, fazendo com que a célula se aproxime ou se afaste das substâncias (Madigan *et al.*, 2016).

*Swarming* é uma forma de deslocamento que, assim como *swimming*, depende da presença de flagelos na superfície celular, nesse caso uma hiperflagelação. No *swarming*, as bactérias movem-se em grupos agregados, e o movimento ocorre de forma contínua e regulada, seguindo o eixo celular, podendo ou não depender de quimiotaxia (Henrichsen, 1972; Kearns, 2010; Pollitt e Diggle, 2017). Outros fatores associados à essa motilidade são a produção de surfactantes, substâncias que reduzem tensão superficial de um líquido, e de *slime*, uma camada de material extracelular. O *quorum sensing* controla a produção de biosurfactantes durante o *swarming*. Alguns exemplos de bactérias que realizam esse tipo de motilidade são *Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa* e *Bacillus subtilis* (Henrichsen, 1972; Pollitt e Diggle, 2017).

Observado em *P. aeruginosa* e *Neisseria spp.*, *twitching* é uma via de motilidade dependente da extensão e retração do pili tipo IV (Kaiser, 2000; Pollitt e Diggle, 2017). Geralmente, esse movimento ocorre de forma individual, embora às vezes haja o deslocamento de pequenos agregados celulares. *Twitching* manifesta-se de forma intermitente e irregular, não seguindo o eixo das células (Henrichsen, 1972).

O deslocamento por *gliding* mostra-se como o modo de motilidade ativa mais variado, pois pode acontecer de diversas maneiras a partir de diversos mecanismos diferentes. Este movimento pode sobrevir via pili tipo IV, complexos de adesão focal, produção de *slime*, deformação da membrana celular externa, ou mesmo utilizando mais de um destes mecanismos ao mesmo tempo (Pollitt e Diggle, 2017). As células podem deslocar-se individualmente ou em grupos, podendo locomover-se também na forma de agregados filamentosos de forma regulada e contínua, seguindo seus eixos. (Burchard, 1981; Reichenbach, 1981; Hoiczyk, 2000; McBride, 2001; Jarrel e McBride, 2008; Pollitt e Diggle, 2017). *Myxococcus xanthus*, *Beggiatoa* spp., *Cyanobacteria* spp., *Mycoplasma* spp. e *S. aureus* são exemplos de bactérias que realizam *gliding* (Henrichsen, 1972; Pollitt, Cruzes e Diggle, 2015; Pollitt e Diggle, 2017).

O *sliding* pode ser observado em *Legionella pneumophila*, *Serratia marcescens* e *Streptococcus* spp. (Matsuyama *et al.*, 1992; Stewart, Rossier e Cianciotto, 2009; Pollitt e Diggle, 2017). Esta motilidade passiva é uma forma de translocação superficial produzida por forças expansivas geradas durante o crescimento da colônia, dependente da produção de surfactantes, que podem ser liberados no meio ou estar incorporados na superfície celular. Toda a colônia expande-se de forma lenta e uniforme a partir de um ponto central como uma monocamada bacteriana (Henrichsen, 1972; Lin *et al.*, 2016; Pollitt e Diggle, 2017).

Finalmente, *darting* é um tipo de translocação superficial no qual há a ejeção de uma bactéria devido a forças expansivas geradas em um agregado onde as células compartilham de uma mesma cápsula. Por ter sido pouco estudado, não se sabe exatamente quais fatores estão associados ao *darting*. Esta forma de motilidade foi relatada em *S. epidermidis* (Henrichsen, 1972; Pollitt e Diggle, 2017).

### **1.3.1. Motilidade em *Staphylococcus* spp.**

Membros do gênero *Staphylococcus* são historicamente classificados como bactérias incapazes de se moverem (Brooks *et al.*, 2014). Entretanto, estudos já mostraram que a motilidade é uma característica que também pode ser associada a algumas espécies deste grupo bacteriano (Pollitt e Diggle, 2017).

A capacidade de deslocamento de membros do gênero *Staphylococcus* foi primeiramente descrita em *S. epidermidis*, no qual foi reportada uma motilidade passiva do tipo *darting* (Henrichsen, 1972) em meios de cultura com 1% de ágar. A velocidade de deslocamento reportada foi de 6  $\mu\text{m}/\text{min}$ . Todavia, os mecanismos por trás desta característica ainda se encontram pouco elucidados na literatura.

Após mais de três décadas, foi relatada a capacidade de *S. aureus* de realizar *spreading*, um mecanismo de motilidade passiva similar ao *sliding* (Kaito e Sekimizu, 2007). O que diferencia essas duas formas é que múltiplas camadas de bactérias realizam o deslocamento simultaneamente no *spreading*, enquanto no *sliding* há o deslocamento de uma monocamada bacteriana (Henrichsen, 1972; Pollitt e Diggle, 2017). Além disso, ácidos teicoicos presentes na parede celular poderiam ter alguma função no *spreading*, visto que deleções do operon *dltABCD* e dos genes *tagO* e *ypfP*, essenciais na síntese dessas moléculas (Kiriukhin *et al.*, 2001; Weidenmaier *et al.*, 2004), impactaram negativamente nesse fenômeno. As amostras testadas neste estudo exibiram motilidade de até 100  $\mu\text{m}/\text{min}$ .

Posteriormente, foi relatada que a presença de um gene até então desconhecido, denominado *fudoh*, era responsável pela supressão do *spreading* em *S. aureus* (Kaito *et al.*, 2008). Esse novo gene está presente nos tipos II e III de *SCCmec*. Entretanto, foi descoberto que o *agr* era mais importante na regulação deste fenômeno, visto que amostras que expressavam este elemento genético exibiam visíveis espalhamentos em meio semissólido, independente da presença ou não do gene *fudoh* (Peng *et al.*, 1988; Ueda *et al.*, 2011; Tsompanidou *et al.*, 2013). Descobriu-se também uma possível relação com a expressão *agr*-dependente de modulinas solúveis em fenol, já que estas poderiam atuar como biosurfactantes durante o processo de *spreading* em *S. aureus*. Foi descoberto que a secreção de diferentes modulinas solúveis em fenol pode aumentar o diâmetro do *spreading* de *S. aureus* em diferentes proporções (Chatterjee *et al.*, 2011; Tsompanidou *et al.*, 2013). Os destaques vão para PSM $\alpha$ 3 e PSM $\gamma$ , que exibiram maior influência na ativação do *spreading* por atrelarem alta atividade surfactante e baixa hidropaticidade. Esses resultados reforçam a importância do sistema *agr* de *quorum sensing* na regulação do deslocamento de *S. aureus*. No entanto, a secreção de  $\delta$ -hemolisina, uma modulina solúvel em fenol codificada por um gene localizado no locus *agr*, regula negativamente o

*spreading* sem interferir no crescimento microbiano (Omae, Sekimizu e Kaito, 2012). Esse foi o primeiro exemplo de inibição da motilidade em *S. aureus* por uma molécula de origem endógena.

Outra importante descoberta associada à regulação da motilidade em *S. aureus* foi a importância da digestão de DNA extracelular para a realização do *spreading* (Kaito *et al.*, 2011). A deleção dos genes *nuc1* e *nuc2*, que codificam nucleases extracelulares (Tang *et al.*, 2008), causou redução do diâmetro de espalhamento das colônias. Além disso, a adição de uma DNase ou nuclease ao meio semissólido no qual as cepas mutantes foram inoculadas foi o suficiente para restabelecer a capacidade de realização de *spreading* nessas amostras. Os autores também descreveram que *nuc1* e *nuc2* eram expressos mais intensamente nas regiões periféricas das colônias gigantes (móveis).

A expressão de sortase A (SrtA), uma transpeptidase que liga covalentemente proteínas exportadas à parede celular, promove uma regulação negativa no *spreading* em *S. aureus* (Frankel *et al.*, 2005; Naik *et al.*, 2006; Suree *et al.*, 2009; Tsompanidou *et al.*, 2012). Assim, acredita-se que fatores associados à parede celular e que promovem o modo de vida sésil em *S. aureus* e *S. epidermidis* podem atuar como antagonistas no *spreading* de *S. aureus*.

Outro estudo mostrou que, além de apresentar uma forma de motilidade passiva em meios com baixa concentração de ágar, *S. aureus* também pode exibir motilidade pela formação de *comets*, estruturas que se movem para fora do centro da colônia, semeando células atrás delas, que então crescem em dendritos observáveis (Pollitt, Cruzs e Diggle, 2015). No entanto, o mecanismo por trás da formação destas estruturas exibia maior grau de similaridade com *gliding*, uma forma de translocação ativa. Este estudo relatou, também, a capacidade das colônias móveis de *S. aureus* evitarem umas às outras, e que essas colônias eram cercadas por surfactantes.

Além de *S. epidermidis* e *S. aureus*, outro membro do mesmo gênero foi relatado como hábil de realizar motilidade. As colônias de *Staphylococcus xylosus* foram capazes de deslocamento passivo em meios semissólidos (Dordet-Frisoni *et al.*, 2008). Aparentemente, o *sliding* realizado pelas amostras dessa espécie independe da produção de surfactantes. Por outro lado, a digestão de DNA extracelular, assim como em *S. aureus*, mostrou-se um importante modulador da motilidade, visto que a adição de uma DNase ao meio aumentou o diâmetro das colônias.



## 2. JUSTIFICATIVA

Embora *Staphylococcus* spp. sejam historicamente classificados como microrganismos imóveis, estudos demonstraram que *S. epidermidis*, *S. aureus* e *S. xylosum* podem apresentar diferentes formas de motilidade (Henrichsen, 1972; Kaito e Sekimizu, 2007; Dordet-Frisoni *et al.*, 2008). Visto que essa característica pode ser um importante ponto em relação à virulência das amostras que a realizam, neste trabalho analisamos a presença de motilidade em diferentes espécies de *Staphylococcus*, incluindo *S. aureus*, *S. capitis*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. pseudintermedius*, *S. saprophyticus*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* e *S. warneri* a fim de melhor compreender a biologia destas espécies tão importantes e recorrentes nas clínicas médica e veterinária. Um maior conhecimento em torno de características fenotípicas de espécies bacterianas pode auxiliar na busca por mais informações sobre a patogênese das infecções por essas espécies, o que pode ser um grande auxílio nos estudos em torno do combate dessas infecções.

### 3. OBJETIVOS

Neste estudo, buscamos avaliar a capacidade de motilidade de amostras de diferentes espécies de *Staphylococcus*, incluindo *S. aureus*, *S. capitis*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. pseudintermedius*, *S. saprophyticus*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* e *S. warneri* de origem clínica e comensal isoladas de humanos e de cachorros.

#### Objetivos específicos

1. Confirmar a identificação das diferentes espécies de *Staphylococcus* através do MALDI-TOF MS (espectrometria de massas).
2. Avaliar a capacidade de motilidade de 10 espécies diferentes de *Staphylococcus* utilizando meio semissólido através de técnica padronizada no laboratório.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Amostras bacterianas

As amostras de *Staphylococcus* spp. que foram utilizadas neste estudo fazem parte das coleções do Laboratório de Cocos Patogênicos e Microbiota, do Laboratório de Infecção Hospitalar e do Laboratório de Microbiologia Molecular, pertencentes ao departamento de Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), e do Laboratório de Cocos Gram Positivos do Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense (UFF). No total, foram utilizadas 59 amostras previamente identificadas, sendo 8 amostras de *S. aureus*, 5 de *S. capitis*, 5 de *S. epidermidis*, 4 de *S. haemolyticus*, 4 de *S. hominis*, 4 de *S. lugdunensis*, 12 de *S. pseudintermedius*, 4 de *S. saprophyticus*, 4 de *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, 4 de *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* e 5 de *S. warneri*. Estas amostras foram originalmente isoladas tanto de colonização quanto de infecção, de humanos e animais, como descrito na Tabela 1.

Além das amostras já citadas, os experimentos incluíram a amostra de *S. aureus* MU50. Esta amostra é *agr*-deficiente (Kuroda *et al.*, 2001; Tsompanidou *et al.*, 2011) e, por conta desta característica, foi utilizada como controle negativo de motilidade neste estudo.

**Tabela 1** - Amostras de *Staphylococcus* spp. utilizadas neste estudo

<b>Amostra</b>	<b>Espécie</b>	<b>Sítio de isolamento</b>	<b>Origem clínica</b>	<b>Referência</b>
MU50	<i>S. aureus</i>	Pele (FC)	Infecção	Hiramatsu <i>et al.</i> (1997)
10a2	<i>S. aureus</i>	Pele (DA)	Infecção	Glatthardt (2016)
74a2	<i>S. aureus</i>	Pele (DA)	Infecção	Glatthardt (2016)
112a2	<i>S. aureus</i>	Pele (DA)	Infecção	-
833	<i>S. aureus</i>	Urina	Infecção	de Matos <i>et al.</i> (2016)
1349	<i>S. aureus</i>	Sangue	Infecção	Chamon (2017)
1602	<i>S. aureus</i>	Sangue	Infecção	Glatthardt (2016)
RF40	<i>S. aureus</i>	Narina	Colonização	-
RF41	<i>S. aureus</i>	Narina	Colonização	-
95s	<i>S. capitis</i>	ND	ND	-
505s	<i>S. capitis</i>	ND	ND	-
506s	<i>S. capitis</i>	ND	ND	-
508s	<i>S. capitis</i>	ND	ND	-
RF10	<i>S. capitis</i>	Pele	Colonização	Glatthardt (2016)
ATCC 12228	<i>S. epidermidis</i>	ND	Colonização	-
ATCC 35984	<i>S. epidermidis</i>	Sangue	Infecção	Christensen <i>et al.</i> (1982)
RF1	<i>S. epidermidis</i>	Pele	Colonização	Glatthardt (2016)
RF3	<i>S. epidermidis</i>	Pele	Colonização	Glatthardt (2016)
RF5	<i>S. epidermidis</i>	Pele	Colonização	Glatthardt (2016)
9s	<i>S. haemolyticus</i>	Sangue	Infecção	Barros <i>et al.</i> (2011)
24s	<i>S. haemolyticus</i>	Sangue	Infecção	Barros <i>et al.</i> (2011)
43s	<i>S. haemolyticus</i>	Sangue	Infecção	Barros <i>et al.</i> (2011)

70s	<i>S. haemolyticus</i>	Sangue	Infecção	-
1001	<i>S. hominis</i>	Sangue	Infecção	Campos (2017)
1003	<i>S. hominis</i>	Sangue	Infecção	Campos (2017)
RF2	<i>S. hominis</i>	Pele	Colonização	Glatthardt (2016)
RF15	<i>S. hominis</i>	Pele	Colonização	Glatthardt (2016)
97s	<i>S. lugdunensis</i>	Sangue	Infecção	Pereira <i>et al.</i> (2009)
541	<i>S. lugdunensis</i>	Sangue	Infecção	Pereira <i>et al.</i> (2009)
546	<i>S. lugdunensis</i>	Sangue	Infecção	Pereira <i>et al.</i> (2009)
LCP-Beta	<i>S. lugdunensis</i>	Prótese	Infecção	Lima (2018)
RF28 (PA40)	<i>S. pseudintermedius</i>	Narina *	Colonização	-
RF29 (PA01)	<i>S. pseudintermedius</i>	Narina *	Colonização	-
RF30 (SD11)	<i>S. pseudintermedius</i>	Pele *	Infecção	-
RF31 (SD02)	<i>S. pseudintermedius</i>	Pele *	Infecção	-
RF32 (SD01)	<i>S. pseudintermedius</i>	Pele (LC) *	Infecção	-
RF33 (SD03)	<i>S. pseudintermedius</i>	Pele (LC) *	Infecção	-
RF34 (SD34)	<i>S. pseudintermedius</i>	Pele (LC) *	Infecção	-
RF35 (SD35)	<i>S. pseudintermedius</i>	Pele (LC) *	Infecção	-
RF36 (SD06)	<i>S. pseudintermedius</i>	Pele (LC) *	Infecção	-
RF37 (SD09)	<i>S. pseudintermedius</i>	Pele (LC) *	Infecção	-
RF38 (SD10)	<i>S. pseudintermedius</i>	Pele (LC) *	Infecção	-
RF39 (SD27)	<i>S. pseudintermedius</i>	Pele (LC) *	Infecção	-
MD03	<i>S. saprophyticus</i>	Urina	Infecção	Paiva-Santos <i>et al.</i> (2016)
MD06	<i>S. saprophyticus</i>	Urina	Infecção	Paiva-Santos <i>et al.</i> (2016)
MD09	<i>S. saprophyticus</i>	Urina	Infecção	Paiva-Santos <i>et al.</i> (2016)

MD28	<i>S. saprophyticus</i>	Urina	Infecção	Paiva-Santos <i>et al.</i> (2016)
RF42 (SCM09)	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	Pele (LC) *	Infecção	-
RF43 (SCM21)	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	Pele (LC) *	Infecção	-
RF44 (SD07)	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	Pele (LC) *	Infecção	-
RF45 (SD84)	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	Pele (LC) *	Infecção	-
RF46 (SD04)	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	Pele (LC) *	Infecção	-
RF47 (SD05)	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	Pele (LC) *	Infecção	-
RF48 (SD08)	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	Pele (LC) *	Infecção	-
RF49 (SD28)	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	Pele (LC) *	Infecção	-
RF4	<i>S. warneri</i>	Pele	Colonização	Glatthardt (2016)
RF14	<i>S. warneri</i>	Pele	Colonização	Glatthardt (2016)
RF16	<i>S. warneri</i>	Pele	Colonização	Glatthardt (2016)
RF17	<i>S. warneri</i>	Pele	Colonização	Glatthardt (2016)
RF19	<i>S. warneri</i>	Pele	Colonização	Glatthardt (2016)

---

DA: dermatite atópica; FC: ferida cirúrgica; ND: não determinado.; LC: lesão cutânea; \* amostras caninas.

#### 4.2. Confirmação da identificação bacteriana pelo MALDI-TOF MS

Após identificação de gênero, para discriminação das espécies, as amostras foram submetidas à técnica de MALDI-TOF MS (Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz – Tempo de Voo). Uma colônia de *Staphylococcus* spp. crescida em base de ágar sangue (Kasvi, Itália) suplementada com 5% de sangue desfibrinado de carneiro foi depositada sobre uma placa de metal, e 1 µL de ácido fórmico 70% foi aplicado sobre a colônia. Após secagem à temperatura ambiente, foi aplicado 1 µL da matriz, composta pelo ácido alfa-ciano 4-hidroxicinâmico (HCCA). Após secagem à temperatura ambiente, esta placa foi submetida ao aparelho MALDI-TOF Microflex LT (Bruker Daltonics, Leipzig, Alemanha). A identificação foi realizada pelo

próprio aparelho, de acordo com o *score* obtido pela amostra ao ser comparado com os presentes em seu banco de dados. De acordo com os parâmetros do fabricante, *scores* entre 3,0 e 2,3 são necessários para que a identificação de espécie seja considerada “segura”; *scores* entre 2,29 e 2,0 são considerados seguros para identificação do gênero, e provável identificação da espécie; *scores* obtidos entre 1,999 e 1,7 são considerados prováveis para identificação de gênero; *scores* menores que 1,7 não são considerados confiáveis para identificação.

### 4.3. Ensaio de motilidade em meio semissólido

As amostras de *Staphylococcus* spp. utilizadas neste estudo foram semeadas em base de ágar sangue (Kasvi, Itália) suplementada com 5% de sangue desfibrinado de carneiro e incubadas a 37 °C por 24 h. Uma colônia de cada amostra foi inoculada em um tubo de ensaio contendo 3 mL de caldo TSB (*Tryptic Soy Broth*; Kasvi, Itália) e incubada *overnight* a 37 °C.

Os ensaios de motilidade foram realizados de acordo com Kaito e Sekimizu (2007) com modificações. Foram utilizados dois tipos de meio: TSB acrescido de 1,5% de ágar (Becton, Dickinson & Company, EUA) e TSB suplementado com 0,24% de ágar. Os meios de crescimento foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos e, em seguida, mantidos a 55 °C. Após 30 minutos, foram vertidos 8 mL do TSB acrescido de 1,5% de ágar em placas de Petri pequenas (50 x 10 mm). A solidificação do meio foi feita durante 10 minutos em fluxo laminar e, em seguida, foram vertidos, sobre o meio solidificado, 2 mL do TSB suplementado com 0,24% de ágar, que também solidificou em fluxo laminar por 10 minutos.

O inóculo foi padronizado em relação ao tubo 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) utilizando 2 mL de solução salina estéril 0,85% para obtenção de uma suspensão bacteriana. Foram inoculados 2 µL da suspensão bacteriana ao centro da placa de Petri, com cuidado para a pipeta não tocar o ágar. Após o inóculo, as placas foram mantidas por 5 minutos em fluxo laminar e, em seguida, seladas com parafilme e incubadas a 37 °C por 18 h. Após a incubação, as colônias foram fotografadas, e seus diâmetros mensurados com o auxílio de uma régua. O experimento foi realizado ao menos duas vezes para cada amostra.

#### 4.4. Análise estatística dos resultados

Os resultados foram analisados através do teste t de Student, não pareado, não paramétrico (Mann-Whitney), utilizando o programa GraphPad Prism 6.0 para calcular o valor p, sendo considerada a significância estatística quando p **MENOR OU IGUAL** 0,05.

### 5. RESULTADOS

#### 5.1. Confirmação da identificação das amostras utilizadas no estudo

A identificação das amostras de *Staphylococcus* spp. foi confirmada conforme listado na Tabela 1. Como já citado anteriormente, as cepas em questão dividem-se em: 8 amostras de *S. aureus*, 5 de *S. capitis*, 5 de *S. epidermidis*, 4 de *S. haemolyticus*, 4 de *S. hominis*, 4 de *S. lugdunensis*, 12 de *S. pseudintermedius*, 4 de *S. saprophyticus*, 4 de *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, 4 de *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* e 5 de *S. warneri*.

#### 5.2. Avaliação da motilidade das amostras de *Staphylococcus*

As amostras de *Staphylococcus* spp. foram analisadas quanto a capacidade de realizar deslocamento em meio de cultura semissólido. A avaliação dos resultados ocorreu de forma visual e também mensurando a região de maior diâmetro da colônia em comparação com o diâmetro exibido pela amostra de *S. aureus* MU50 utilizada como controle negativo para motilidade (Figura 1A). Como explicado anteriormente, esta amostra apresenta um sistema *agr* defectivo e não possui capacidade de se mover no meio semissólido (Kuroda *et al.*, 2001; Tsompanidou *et al.*, 2011). A amostra 74a2 de *S. aureus* foi padronizada ao longo do estudo como controle positivo de motilidade devido à motilidade em meio semissólido apresentada por esta amostra ser consistente e reprodutível ao longo dos experimentos realizados (Figura 1B). A média do diâmetro destas amostras expressa nas tabelas de cada uma das espécies foi realizada com o resultado obtido em 15 experimentos independentes.



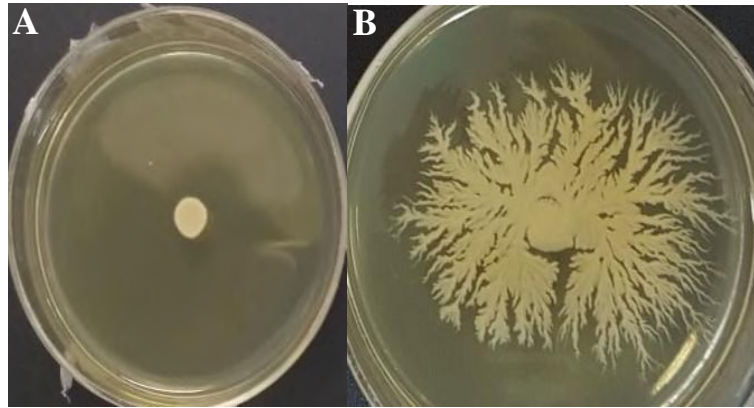


Figura 1 - Controles de motilidade A: *S. aureus* MU50 (controle negativo); B: *S. aureus* 74a2 (controle positivo).

### 5.2.1. *S. aureus*

As oito amostras de *S. aureus* testadas exibiram colônias com morfologias variadas, algumas com formação de dendritos (Figura 2B e D) e cometas (Figura 2A, C, E e F), como pode ser observado nas imagens representativas das colônias das amostras (Figura 2). Em geral, foram observadas estruturas espalhadas na superfície do meio semissólido (Figura 2A, B, C, D e E), porém, em algumas amostras, foram observados crescimentos que penetravam o ágar (Figura 2 F).

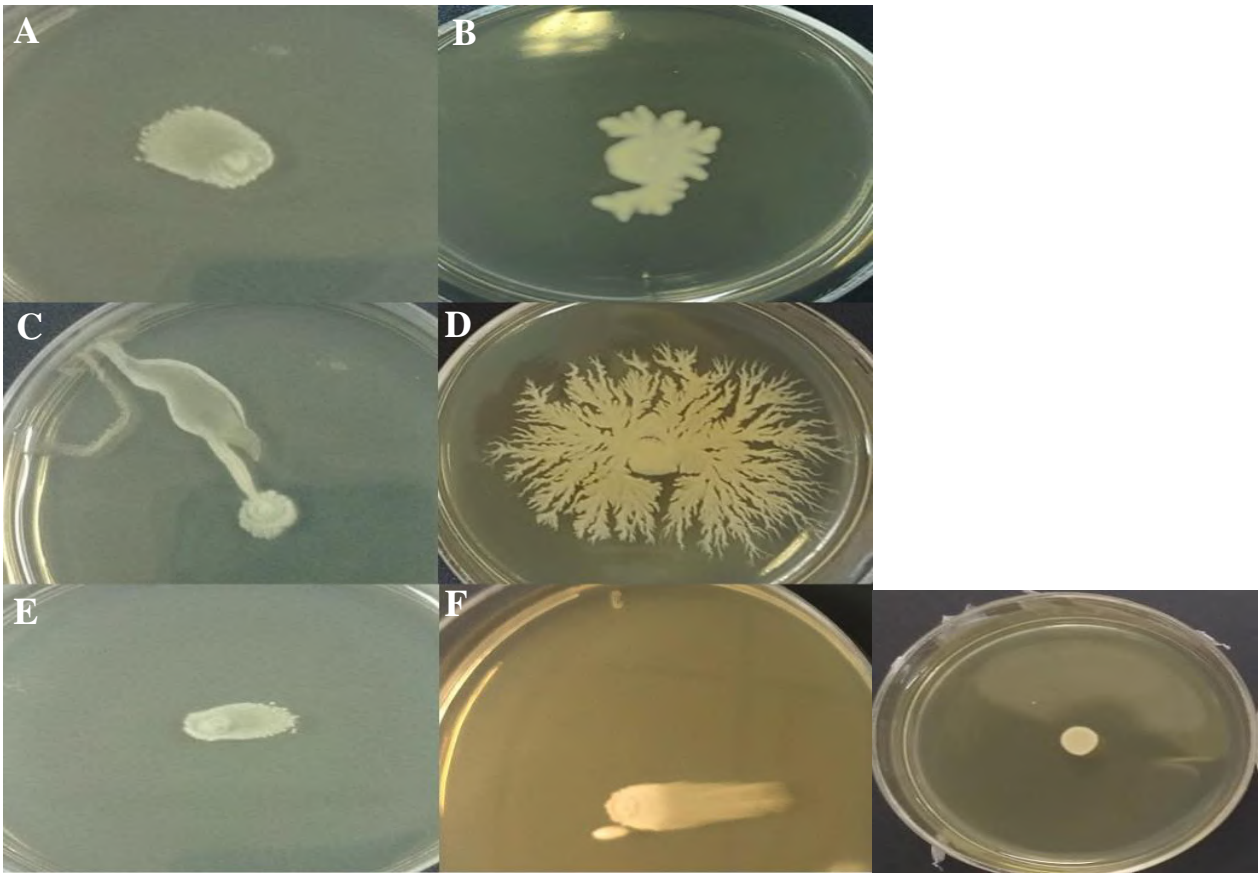


Figura 2 – Variações morfológicas de colônias representativas de *S. aureus* em meio semissólido. A: formação de cometa superficial pela amostra de *S. aureus* 10a2; B: *S. aureus* 1602 exibiu espalhamento com formação de dendritos arredondados; C: *S. aureus* 10a2 também exibiu espalhamento oriundo de um único ponto; D: maior espalhamento com formação de dendritos mais pontudos pela amostra de *S. aureus* 74a2; E: formação de cometa superficial pela amostra de *S. aureus* 833; F: *S. aureus* RF40 formou cometa por dentro do ágar; G: controle negativo.

Quanto ao diâmetro dessas colônias, todas as amostras exibiram colônias maiores que o controle negativo (Tabela 2). De todas as espécies avaliadas, *S. aureus* foi a espécie que obteve os maiores valores de diâmetro médio das colônias, que variou de 9,5 a 32 mm, com 87,5% das amostras com diâmetro maior que 16 mm (valor médio do controle positivo), que é 2,8 vezes maior do que o controle negativo defectivo em *agr.*

**Tabela 2** – Diâmetros das colônias das amostras de *S. aureus* e do controle negativo (*S. aureus* MU50), a amostra de *S. aureus* MU50, em meio semissólido

<b>Amostra</b>	<b>Média dos diâmetros das colônias (mm)</b>	<b>Desvio Padrão</b>
MU50 (cont. neg.)	5,7	±1,3
74a2 (cont. pos.)	16,1	±1,8
10a2	23,5	±6,4
112a2	25	±7,1
833	32	0
1349	30	±2,8
1602	9,5	±0,7
RF40	27	±9,9
RF41	23,8	±4,6

cont. neg: controle negativo; cont. pos.: controle positivo

### 5.2.2. *S. capitis*

Das cinco amostras de *S. capitis* testadas, quatro exibiram colônias com motilidade e morfologia variadas (Figura 3), algumas formando dendritos, enquanto uma amostra exibiu colônias arredondadas similares ao controle negativo (Figura 3E). Todas as colônias se deslocaram na superfície do ágar semissólido. (Figura 3).

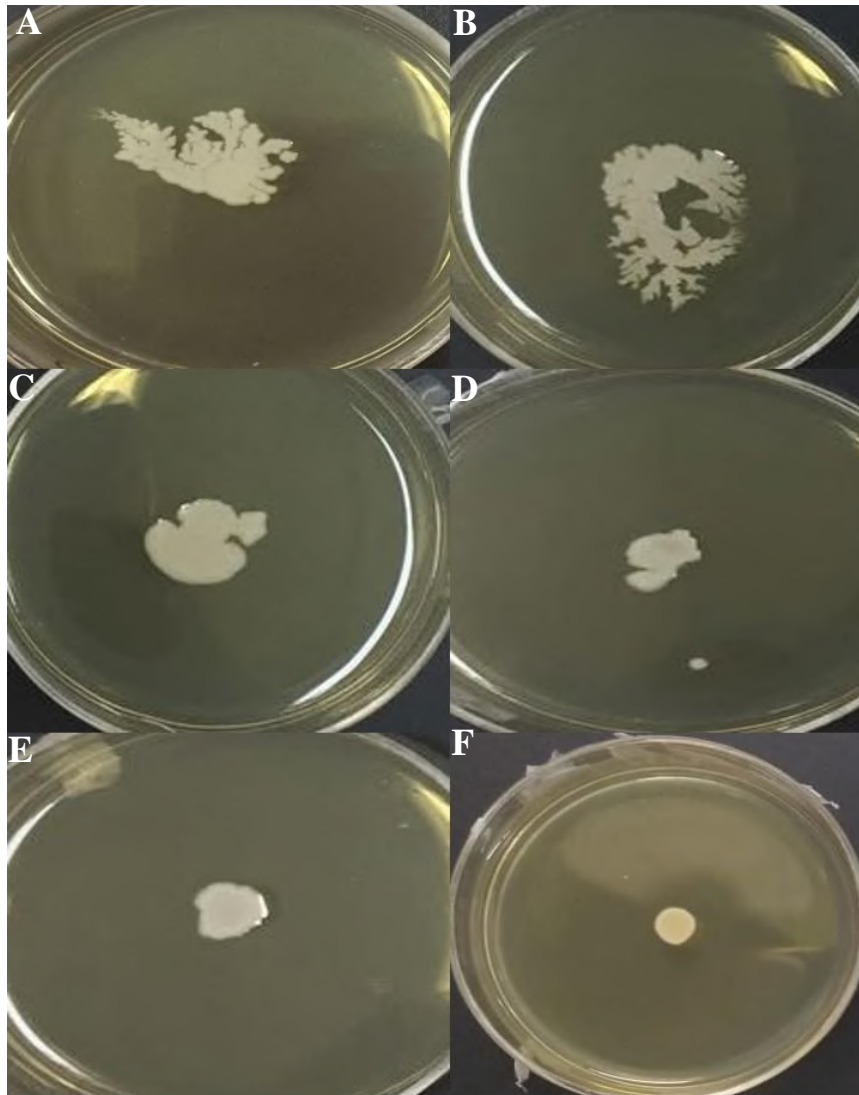


Figura 2 – Variações morfológicas de colônias representativas de *S. capitis* em meio ágar semissólido. A e B: *S. capitis* 505s formando colônias espalhadas com formação de dendritos; C: *S. capitis* 506s formando colônia espalhada com poucos dendritos arredondados; D: *S. capitis* 508s formando espalhamento mais discreto; E: *S. capitis* 508s formando colônia muito pouco espalhada; F: controle negativo.

No que diz respeito aos diâmetros observados, comente a amostra 505s exibiu colônias bem maiores que o controle negativo (21,5 mm). Já as outras 4 amostras (RF10, 95s, 506s e 508s) formaram colônias com diâmetros similares a média do controle negativo dos experimentos (Tabela 3).

**Tabela 3** – Diâmetros das colônias das amostras de *S. capitis* e dos controles negativo (*S. aureus* MU50) e positivo (*S. aureus* 74a2) em meio semissólido

Amostra	Média dos diâmetros das colônias (mm)	Desvio padrão
MU50 (cont. neg.)	5,7	±1,3
74a2 (cont. pos.)	16,1	±1,8
RF10	6,2	±0,8
95s	9	±1
505s	21,5	±0,7
506s	8	±2,8
508s	7,7	±1,2

cont. neg: controle negativo; cont. pos.: controle positivo

### 5.2.3. *S. epidermidis*

As cinco amostras de *S. epidermidis* exibiram colônias superficiais e concentradas, semelhantes com o controle negativo, tanto em sua morfologia (Figura 4) quanto em seu diâmetro (Tabela 4), que variou de 6,3 a 7,5 mm.

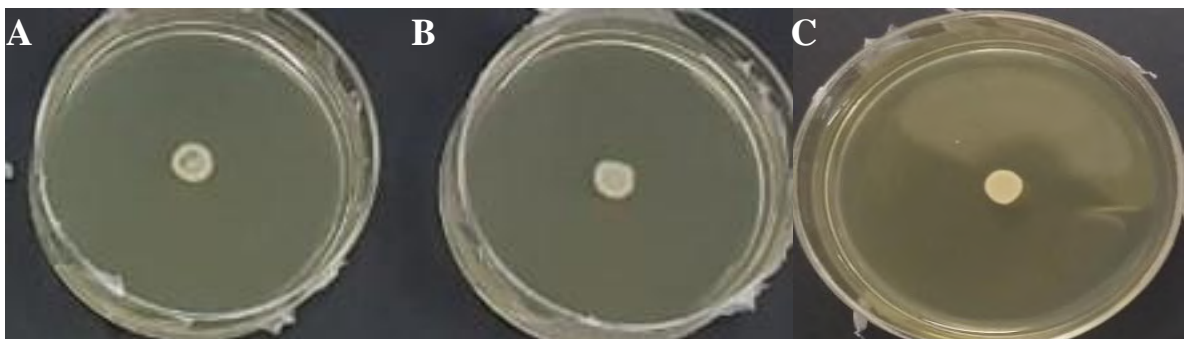


Figura 4 - Variações morfológicas de colônias representativas de *S. epidermidis*. A: *S. epidermidis* RF3; B: *S. epidermidis* ATCC 35984; C: controle negativo.

**Tabela 4** – Diâmetros das colônias das amostras de *S. epidermidis* e dos controles negativo (*S. aureus* MU50) e positivo (*S. aureus* 74a2) em meio semissólido

Amostra	Média dos diâmetros das colônias (mm)	Desvio Padrão
MU50 (cont. neg.)	5,7	±1,3
74a2 (cont. pos.)	16,1	±1,8
RF1	7,5	±0,7
RF3	6,3	±0,6
RF5	6,8	±0,3
ATCC 12228	7	±1,4
ATCC 35984	6,3	±0,6

cont. neg: controle negativo; cont. pos.: controle positivo

#### 5.2.4. *S. haemolyticus*

Apenas uma amostra de *S. haemolyticus* exibiu crescimento por dentro do meio (Figura 5A), enquanto todas as outras só cresceram superficialmente (Figura 5).

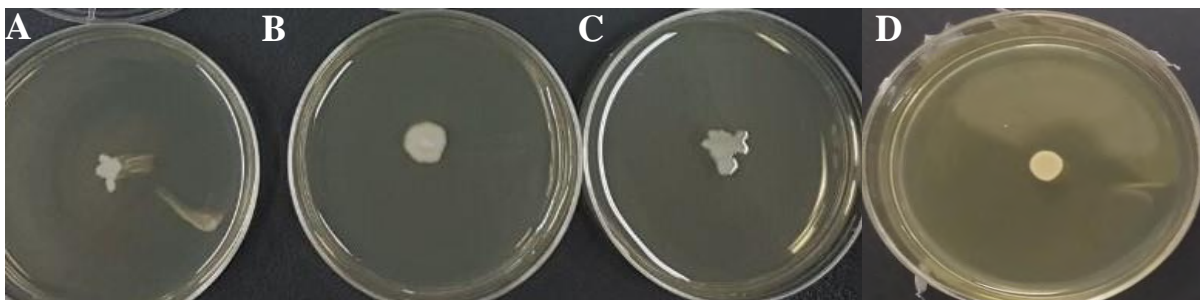


Figura 5 - Variações morfológicas de colônias selecionadas de *S. haemolyticus*. A: *S. haemolyticus* 24s formou crescimento por dentro do meio semissólido, além de discretos dendritos superficiais; B: *S. haemolyticus* 70s formou colônia similar ao controle negativo; C: *S. haemolyticus* 43s formou dendritos superficiais; D: controle negativo.

Quanto ao diâmetro das colônias, três amostras (9s, 24s e 70s) apresentaram valores próximos ao controle negativo levando em consideração o desvio padrão. A amostra 43s exibiu colônias ligeiramente maiores que o controle negativo, com 10 mm de diâmetro médio (Tabela 5).

**Tabela 5** – Diâmetros das colônias das amostras de *S. haemolyticus* e do controle negativo, a amostra de *S. aureus* MU50, em meio semissólido

Amostra	Média dos diâmetros das colônias (mm)	Desvio Padrão
MU50 (cont. neg.)	5,7	±1,3
74a2 (cont. pos.)	16,1	±1,8
9s	6	0
24s	8,5	±3,5
43s	10	±1,4
70s	8	±1,4

cont. neg: controle negativo; cont. pos.: controle positivo

### 5.2.5. *S. hominis*

Todas as amostras de *S. hominis* apresentaram morfologia e diâmetro de colônias em meio semissólido semelhantes ao controle negativo (Figura 6 e Tabela 6).

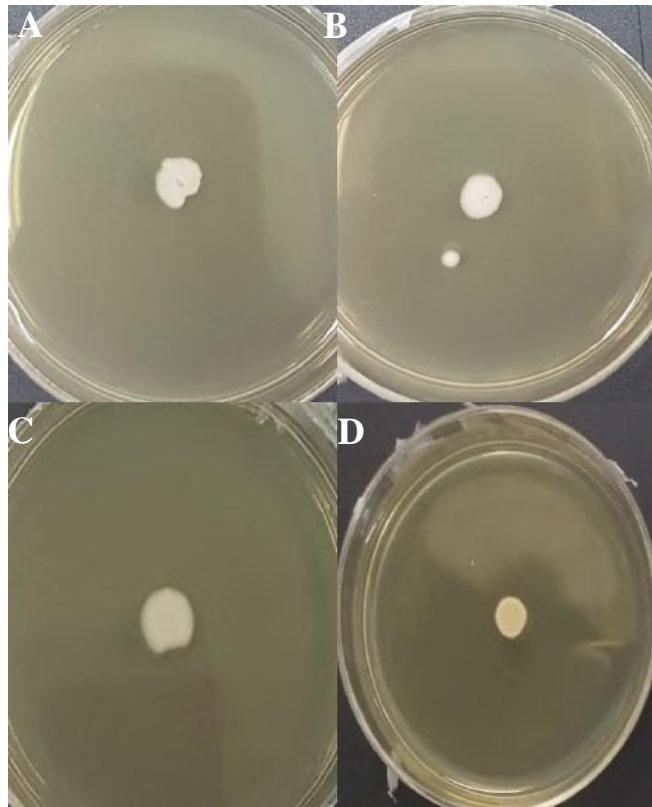


Figura 6 - Variações morfológicas de colônias representativas de *S. hominis*. A: *S. hominis* 1001; B: *S. hominis* 1003; C: *S. hominis* RF15; D: controle negativo.



**Tabela 6** – Diâmetros das colônias das amostras de *S. hominis* e dos controles negativo (*S. aureus* MU50) e positivo (*S. aureus* 74a2) em meio semissólido

Amostra	Média dos diâmetros das colônias (mm)	Desvio Padrão
MU50 (cont. neg)	5,7	±1,3
74a2 (cont. pos.)	16,1	±1,8
RF2	7,2	±0,8
RF15	7,3	±1
1001	6,5	±0,7
1003	6	0

cont. neg: controle negativo; cont. pos.: controle positivo

### 5.2.6. *S. lugdunensis*

Todas as quatro amostras de *S. lugdunensis* testadas cresceram tanto na superfície do meio semissólido quanto de forma profunda, por dentro do ágar, lembrando a formação de uma cauda de cometa (Figura 7).

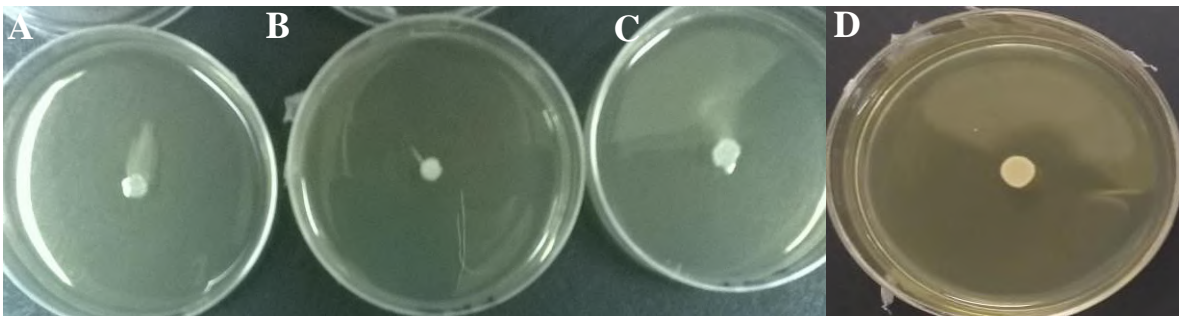


Figura 7 - Variações morfológicas de colônias representativas de *S. lugdunensis*. A: *S. lugdunensis* 546 formando crescimento profundo no ágar; B: *S. lugdunensis* 541, formando também um leve crescimento profundo no ágar; C: *S. lugdunensis* 97s, igualmente formando discreto crescimento profundo no ágar; D: controle negativo.

Apesar da morfologia diferente e levando em conta o desvio padrão das repetições, as amostras testadas formaram colônias similares ao controle negativo (entre 7 e 13,5 mm), e somente duas amostras (541 e 546) apresentaram diâmetro ligeiramente maior que o controle (Tabela 7).

**Tabela 7** – Diâmetros das colônias das amostras de *S. lugdunensis* e dos controles negativo (*S. aureus* MU50) e positivo (*S. aureus* 74a2) em meio semissólido

<b>Amostra</b>	<b>Média dos diâmetros das colônias (mm)</b>	<b>Desvio padrão</b>
MU50 (cont. neg)	5,7	±1,3
74a2 (cont. pos)	16,1	±1,8
LCP-Beta	7	±1,4
97s	13,5	±6,4
541	9	±1,4
546	9,5	±6,4

cont. neg: controle negativo; cont. pos.: controle positivo

### 5.2.7. *S. pseudintermedius*

Todas as 12 amostras de *S. pseudintermedius* formaram colônias com morfologias bem variadas espalhadas na superfície do meio semissólido com formação de dendritos (Figura 8).

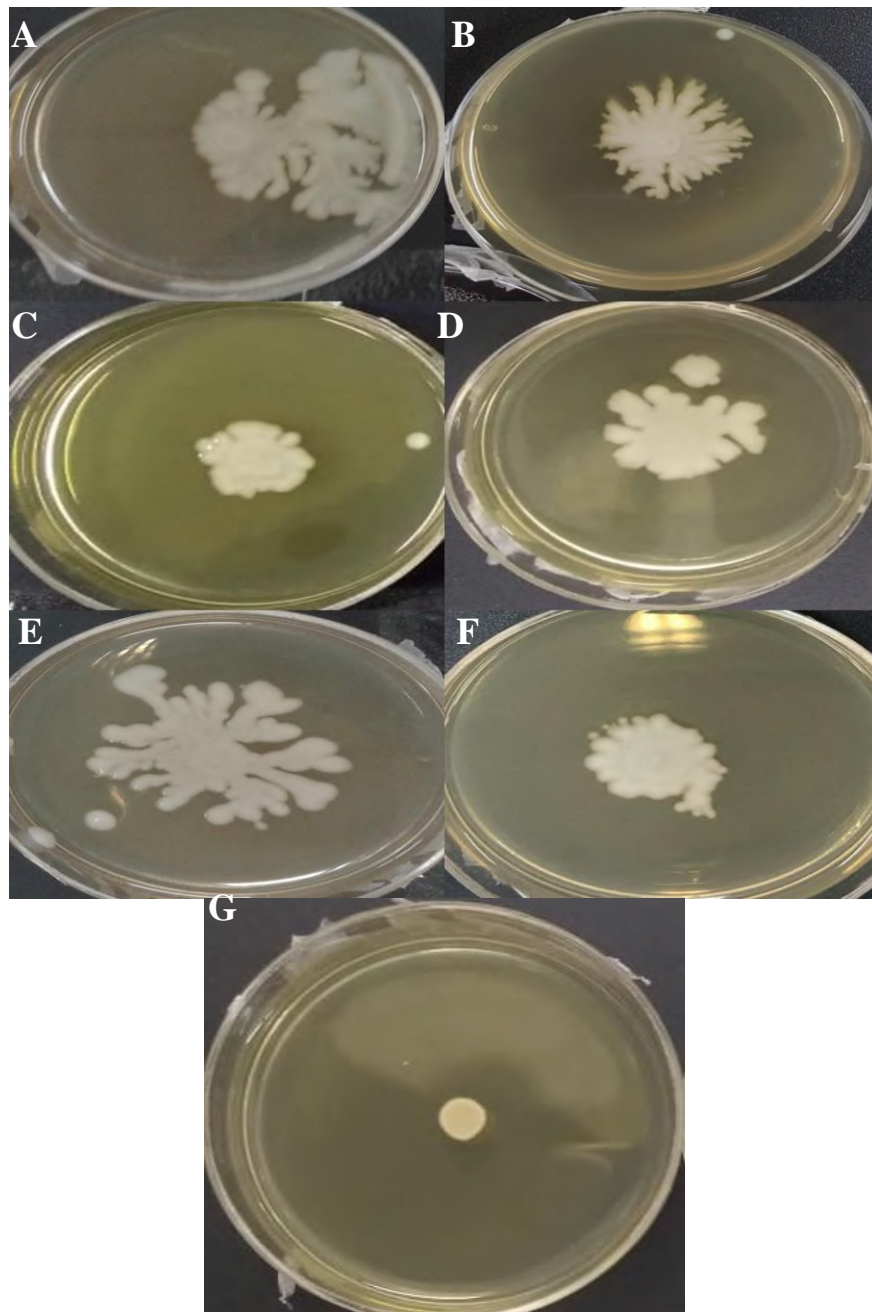


Figura 8 - Variações morfológicas de colônias representativas de *S. pseudintermedius*. A: *S. pseudintermedius* RF29 com espalhamento lateral; B: *S. pseudintermedius* RF36 com dendritos mais pontudos; C: *S. pseudintermedius* RF31 com espalhamento mais contido; D: *S. pseudintermedius* RF31 com dendritos bem arredondados; E: *S. pseudintermedius* RF30 com colônia mais espalhada e dendritos bem arredondados; F: *S. pseudintermedius* RF28 com espalhamento mais contido; G: controle negativo.

Quanto ao diâmetro das colônias, as 12 amostras testadas exibiram diâmetros maiores que o controle negativo (Tabela 8). Neste estudo, as amostras de *S. pseudintermedius* tiveram um dos maiores valores de diâmetro médio encontrados, semelhantes aos valores para *S. aureus*, e variaram entre 10 e 36 mm, com 9 (75%) das amostras apresentando diâmetro maior ou igual a 16 mm (valor do controle positivo de *S. aureus*), demonstrando grande capacidade de motilidade em meio semissólido.

**Tabela 8** – Diâmetros das colônias das amostras de *S. pseudintermedius* e dos controles negativo (*S. aureus* MU50) e positivo (*S. aureus* 74a2) em meio semissólido

<b>Amostra</b>	<b>Média dos diâmetros das colônias (mm)</b>	<b>Desvio Padrão</b>
MU50 (cont. neg.)	5,7	±1,3
74a2 (cont. pos)	16,1	±1,8
RF28	16	±2,8
RF29	24	±7,1
RF30	36	±5,7
RF31	13,5	±0,7
RF32	10	0
RF33	20	0
RF34	20,5	±13,4
RF35	16	0
RF36	14,5	0,7
RF37	25,3	±3,9
RF38	19	0
RF39	30,5	±7,8

cont. neg: controle negativo; cont. pos.: controle positivo

### 5.2.8. *S. saprophyticus*

Nas amostras de *S. saprophyticus*, houve a formação de colônias ligeiramente espalhadas na superfície do meio semissólido em três amostras, enquanto a quarta amostra tinha morfologia mais circular e concentrada, semelhante ao controle negativo (Figura 9).

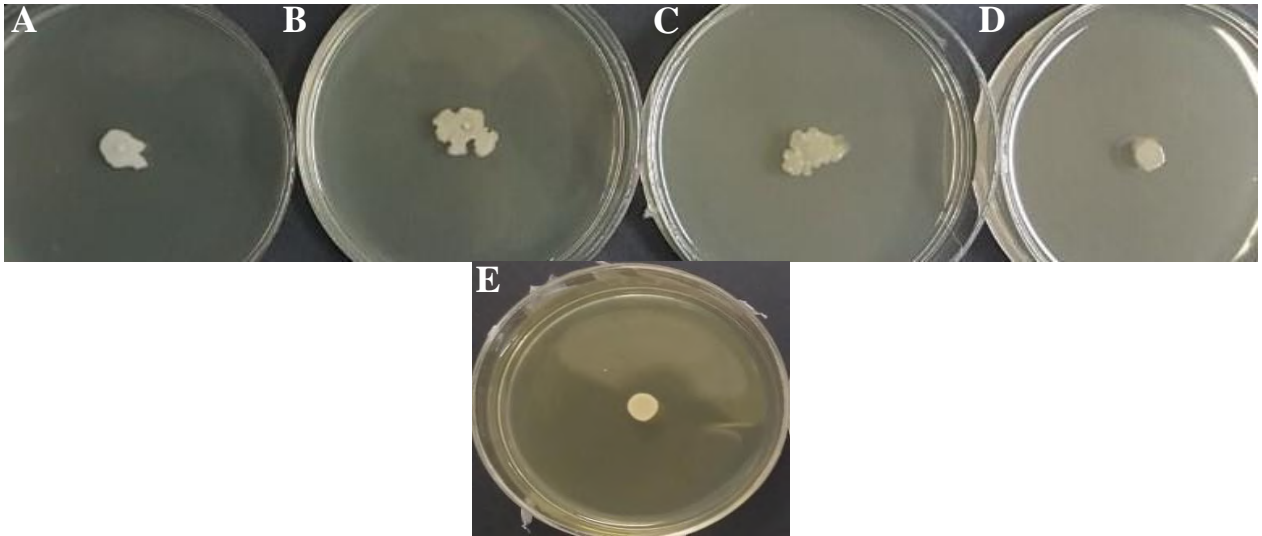


Figura 9- Variações morfológicas de colônias de *S. saprophyticus*. A: *S. saprophyticus* MD03; B: *S. saprophyticus* MD06; C: *S. saprophyticus* MD09; D: *S. saprophyticus* MD28 que, diferente das outras, não exibiu espalhamento, com colônia similar ao controle negativo; E: controle negativo.

Em relação ao diâmetro das colônias, duas amostras (MD03 e MD09) tiveram diâmetro maior em relação ao controle negativo (Tabela 9), mas ainda inferior ao controle positivo, com 9,5 e 11,5 mm de diâmetro médio, respectivamente. As outras duas (MD06 e MD28) tiveram diâmetro semelhante ao do controle negativo (5 e 5,3 mm).

**Tabela 9** – Diâmetros das colônias das amostras de *S. saprophyticus* e dos controles negativo (*S. aureus* MU50) e positivo (*S. aureus* 74a2) em meio semissólido

<b>Amostra</b>	<b>Média dos diâmetros das colônias (mm)</b>	<b>Desvio padrão</b>
MU50 (cont. neg.)	5,7	±1,3
74a2 (cont. pos.)	16,1	±1,8
MD03	9,5	±0,7
MD06	5	±0
MD09	11,5	±0,7
MD28	5,3	±0,3

cont. neg: controle negativo; cont. pos.: controle positivo

### 5.2.9. *S. schleiferi* subsp. *coagulans*

Todas as amostras de *S. schleiferi* subsp. *coagulans* formaram colônias mais espalhadas na superfície do ágar com a formação de dendritos (Figura 10). Uma delas também formou crescimento profundo no meio semissólido (Figura 10B).

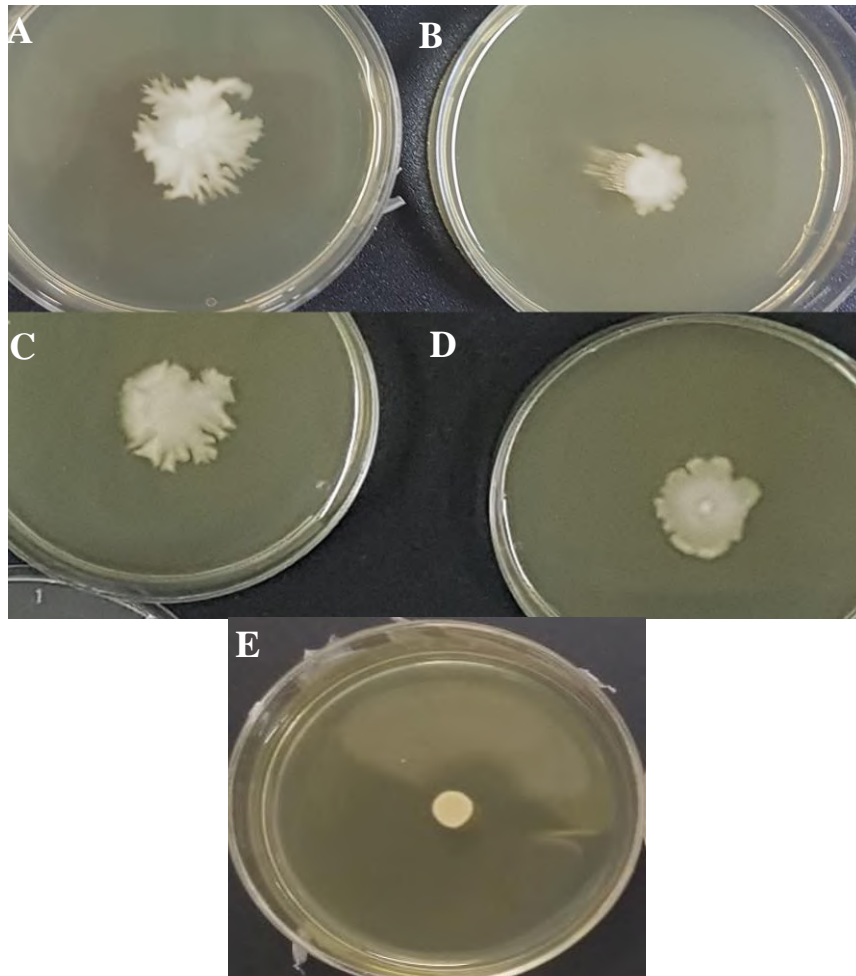


Figura 10 - Variações morfológicas de colônias representativas de *S. schleiferi* subsp. *coagulans*. A: *S. schleiferi* subsp. *coagulans* RF44 formando dendritos pontudos; B: *S. schleiferi* subsp. *coagulans* RF45 com crescimento profundo; C: *S. schleiferi* subsp. *coagulans* RF43 com dendritos pontudos menores; D: *S. schleiferi* subsp. *coagulans* RF42 com espalhamento mais contido; E: controle negativo.

Todas as amostras dessa subespécie tiveram resultados superiores ao controle negativo, em relação ao diâmetro das suas colônias, variando entre 13,5 e 20 mm, com 50% das amostras apresentando valores maiores que o diâmetro médio do controle positivo (Tabela 10).

**Tabela 10** – Diâmetros das colônias das amostras de *S. schleiferi* subsp. *coagulans* e dos controles negativo (*S. aureus* MU50) e positivo (*S. aureus* 74a2) em meio semissólido

<b>Amostra</b>	<b>Média dos diâmetros das colônias (mm)</b>	<b>Desvio Padrão</b>
MU50 (cont. neg.)	5,7	±1,3
74a2 (cont. pos.)	16,1	±1,8
RF42	14,7	±2,1
RF43	17	±4,9
RF44	19,7	±0,5
RF45	12	±2,2

cont. neg: controle negativo; cont. pos.: controle positivo

#### **5.2.10. *S. schleiferi* subsp. *schleiferi***

Com exceção de uma amostra que cresceu mais concentrada e com formato circular, semelhante ao controle negativo, todas as amostras dessa subespécie cresceram de modo espalhado na superfície do ágar semissólido com formação de dendritos (Figura 11). Duas amostras desta espécie se destacaram por seu diâmetro de motilidade e por seu crescimento profundo no ágar (RF48 e RF49) diferente das outras duas amostras (RF46 e RF47).



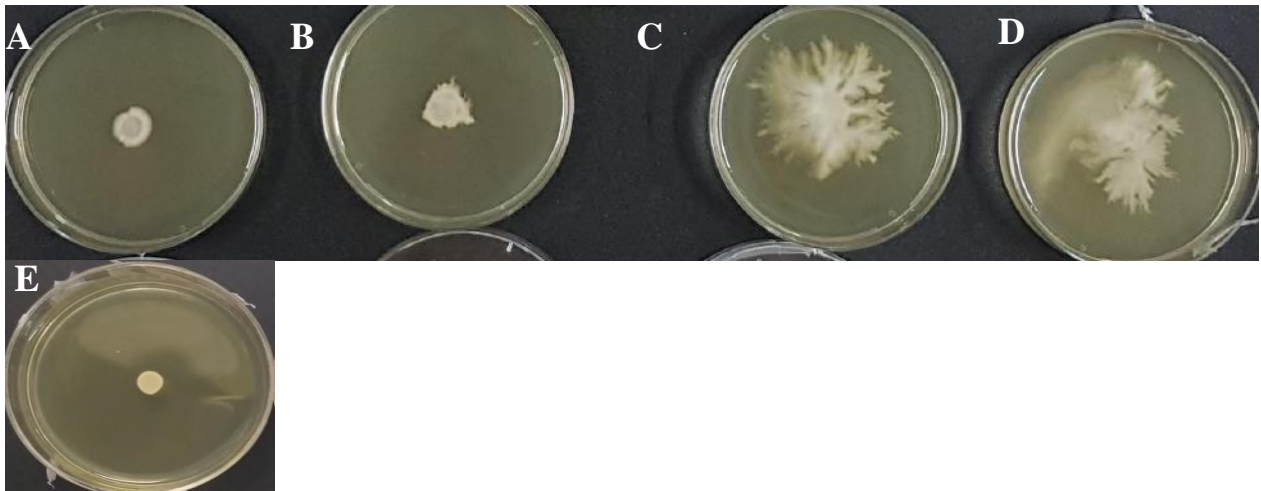


Figura 11 - Variações morfológicas de colônias representativas de *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*. A: *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* RF46 com crescimento similar à amostra MU50; B: *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* RF47 com espalhamento mais discreto; C: *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* RF48 com crescimento mais difuso e espalhado pelo meio; D: *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* RF49; E: controle negativo.

As amostras em sua totalidade formaram colônias com diâmetros maiores que o controle negativo que variaram entre 10,5 a 28,3 mm (Tabela 11), onde 2 (50%) amostras (RF48 e RF49) apresentaram valores médios maiores que o diâmetro do controle positivo, porém com grande variabilidade no tamanho das colônias entre experimentos.

**Tabela 11** – Diâmetros das colônias das amostras de *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* e dos controles negativo (*S. aureus* MU50) e positivo (*S. aureus* 74a2) em meio semissólido

Amostra	Média dos diâmetros das colônias (mm)	Desvio Padrão
MU50 (cont. neg.)	5,7	±1,3
74a2 (cont. pos.)	16,1	±1,8
RF46	10,5	±2,2
RF47	14,5	±3,5
RF48	20	±16,5
RF49	28,3	±14,6

cont. neg: controle negativo; cont. pos.: controle positivo

### 5.2.11. *S. warneri*

As cinco amostras de *S. warneri* analisadas formaram colônias levemente espalhadas na superfície do meio (Figura 12). Uma amostra, a RF19, conseguiu formar crescimento mais profundo no ágar (Figura 12B).

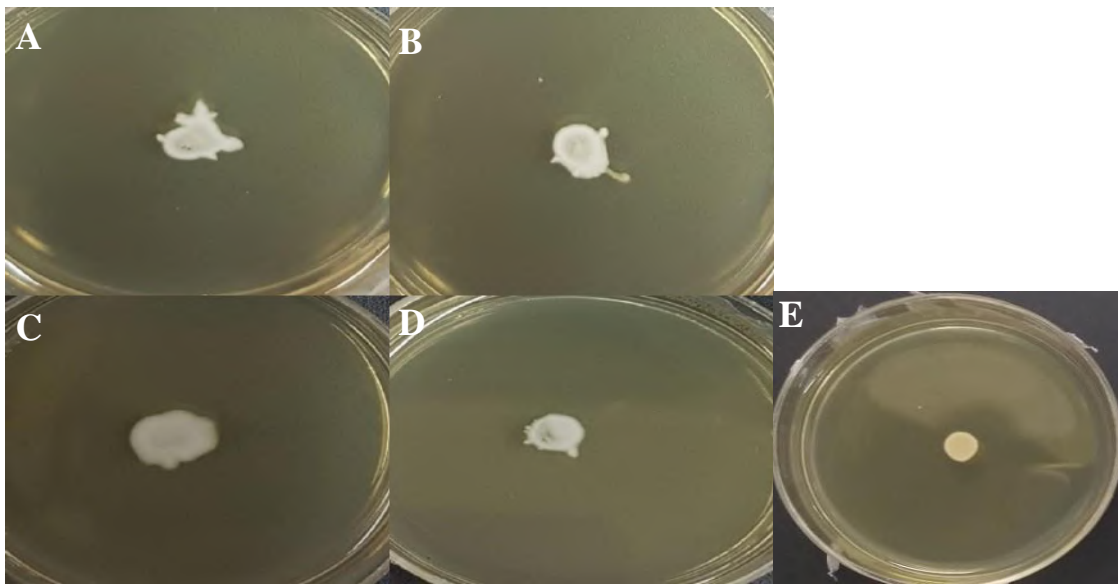


Figura 12 - Variações morfológicas em colônias selecionadas de *S. warneri*. A: *S. warneri* RF17 exibiu espalhamento levemente acentuado; B: *S. warneri* RF19 crescimento discreto no fundo do ágar; C: *S. warneri* RF16 exibiu espalhamento mais discreto; D: *S. warneri* RF4 exibiu pequenos pontos que lembram espalhamento; E: controle negativo.

Quanto ao diâmetro das colônias, duas amostras (RF4 e RF14) apresentaram diâmetro semelhante ao controle negativo, enquanto as outras três amostras (RF16, RF17 e RF19) formaram colônias ligeiramente maiores que o controle negativo, porém inferiores ao controle positivo, variando entre 9 e 9,3 mm (Tabela 12).

**Tabela 12** – Diâmetros das colônias das amostras de *S. warneri* e dos controles negativo (*S. aureus* MU50) e positivo (*S. aureus* 74a2) em meio semissólido

<b>Amostra</b>	<b>Média dos diâmetros das colônias (mm)</b>	<b>Desvio Padrão</b>
MU50 (cont. neg)	5,7	±1,3
74a2 (cont. pos.)	16,1	±1,8
RF4	6,3	±1,2
RF14	6,3	±0,4
RF16	9,3	±1,2
RF17	9	0
RF19	9	±1,4

cont. neg: controle negativo; cont. pos.: controle positivo

O diâmetro médio em cada espécie avaliada foi descrito na Figura 13, juntamente com os valores médios para o controle positivo (*S. aureus* 74a2) e o controle negativo (*S. aureus* Mu50). Dentre as espécies, *S. aureus*, *S. pseudintermedius*, *S. capitis*, *S. lugdunensis*, *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* e *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, além da própria amostra de *S. aureus* 74a2 que usamos como controle positivo, apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle negativo. Podemos observar também que, como esperado, a espécie *S. aureus* apresentou diâmetro médio da colônia maior que o controle positivo indicando capacidade de motilidade na superfície do meio semissólido. Além disso, as espécies de origem canina *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* e *S. schleiferi* subsp. *coagulans* também apresentaram diâmetro médio maior que a amostra controle positivo, indicando motilidade no meio de cultura utilizado. Dentre as demais espécies de *Staphylococcus* avaliadas, *S. lugdunensis* e *S. capitis* apresentaram diâmetros menores que o controle positivo, porém maiores que o controle negativo. As espécies *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis* e *S. hominis* foram similares ao controle negativo não apresentando diferenças significativas.

Algumas espécies apresentaram grande variação no diâmetro médio de cada amostra, o que pode ser evidenciado pelo desvio padrão, como por exemplo, as amostras de *S. aureus*, *S. pseudintermedius*, *S. capitis* e *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*.

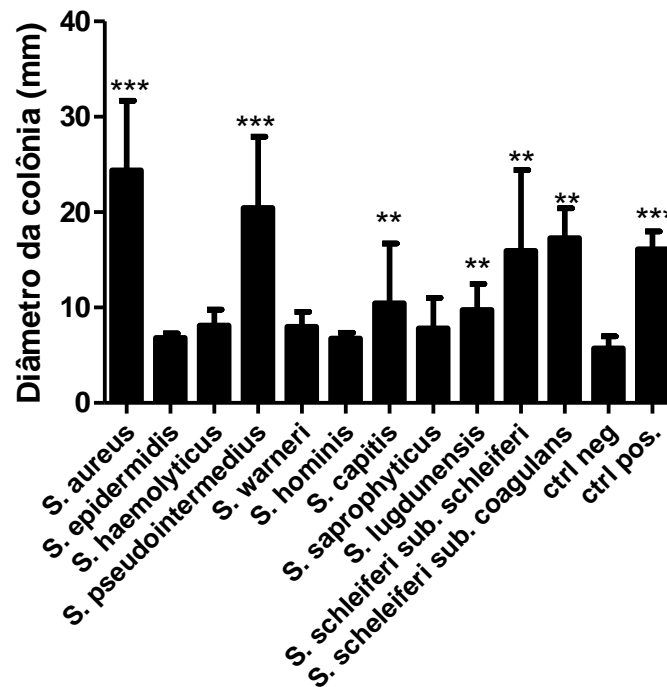


Figura 13. Diâmetro médio da colônia em meio semissólido de cada espécie de *Staphylococcus* avaliada. ctrl neg.: controle negativo *S. aureus* Mu50; ctrl pos.: controle positivo *S. aureus* 74a2; \*\*:  $p \leq 0,01$ . \*\*\*:  $p \leq 0,001$ .

## 6. DISCUSSÃO

A motilidade é uma característica adaptativa relacionada à colonização microbiana de diversos hospedeiros e superfícies, estando, portanto, intimamente ligada à sobrevivência e disseminação de determinadas espécies (Pollitt e Diggle, 2017). Embora *Staphylococcus* spp. normalmente sejam classificados como imóveis, estudos já relataram a capacidade de algumas cepas de *S. epidermidis*, *S. aureus* e *S. xylosus* de realizarem diferentes formas de motilidade (Henrichsen, 1972; Kaito e Sekimizu, 2007; Dordet-Frisoni *et al.*, 2008). Os resultados do nosso estudo confirmaram a motilidade de *S. aureus* já relatada na literatura. Além disso, os resultados mostraram que cepas de *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans* e *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* possuem capacidade semelhante a espécie *S. aureus*, fato nunca antes descrito para essas espécies e refutando a classificação destas espécies como bactérias imóveis.

Como um todo, as cepas de *S. capitis* e *S. lugdunensis* também foram capazes de se deslocar em meio semissólido, e seus resultados foram significativamente diferentes do controle negativo, embora abaixo dos níveis de deslocamento do controle positivo. Por outro lado, apesar de não haver diferenças significativas entre as espécies *S. haemolyticus*, *S. warneri* e *S. saprophyticus* e o controle negativo de motilidade, algumas cepas destas espécies apresentaram pequena capacidade de motilidade no meio semissólido. Como só foram utilizadas entre 4 e 5 amostras de cada uma destas espécies, faz-se necessária a análise de mais amostras para confirmarmos a capacidade destas espécies de se deslocar em meio semissólido como um todo. Novamente, a motilidade das espécies *S. capitis*, *S. lugdunensis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri* e *S. saprophyticus* não havia sido relatada na literatura.

Embora ainda sejam necessários mais estudos para descrever de forma cuidadosa que tipos de motilidade cada uma dessas espécies analisadas é capaz de realizar, é possível afirmar que, com exceção de *S. lugdunensis*, a maior parte das cepas das espécies testadas exibiu, em diferentes proporções, colônias gigantes similares com as colônias de *S. aureus* e *S. xylosus* já descritas na literatura, direcionando a classificação de suas motilidades como *spreading* (Kaito e Sekimizu, 2007; Dordet-Frisoni *et al.*, 2008). As amostras de *S. lugdunensis* exibiram algo

semelhante aos *comets*, ou cometas, previamente descritos em *S. aureus*, indicando motilidade do tipo *gliding* pela primeira vez nesta espécie (Pollitt, Cruzs e Diggle, 2015). As amostras de *S. aureus* utilizadas neste estudo exibiram tanto colônias similares às capazes de realizar *spreading* quanto estruturas semelhantes aos *comets*. Como mencionado acima, as amostras de origem canina, *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans* e *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*, destacam-se junto com as amostras de *S. aureus* pelos maiores diâmetros das colônias em relação às outras espécies. Estas espécies colonizam e causam infecções principalmente em animais, mas também já foram isoladas ocasionalmente de infecções em humanos (Freney, *et al.*, 1988; Thibodeau *et al.*, 2012; Somayaji *et al.*, 2016; Swe *et al.*, 2016).

O gene *agr* é considerado o principal modulador da motilidade em *S. aureus* (Ueda *et al.*, 2011). As modulinas solúveis em fenol, moléculas cuja produção é dependente do *agr*, atuam como surfactantes, diminuindo a tensão superficial do meio semissólido e propiciando, então, o fenômeno de *spreading* em *S. aureus*. Logo, amostras que apresentam ausência ou qualquer outro tipo de disfunção na expressão desse gene poderia não realizar motilidade assim como ocorre em *S. aureus*. Estudos de avaliação da presença desse gene foram realizados previamente por outros integrantes do nosso grupo em apenas seis amostras de *S. aureus* utilizadas neste trabalho. A maioria destas possuíam o *agr* do tipo 3 e não observamos relação entre o diâmetro das colônias e o tipo de *agr*, como indicado na Tabela 13 (Glatthardt, 2016). Assim, faz-se necessário a extensão dos estudos, incluindo mais amostras de cada tipo de *agr* e de outras espécies para podermos determinar a relação entre a presença e funcionalidade do sistema *agr* com a capacidade de motilidade, e investigar uma possível correlação do tipo de *agr* com a habilidade de determinadas amostras de se deslocar em superfície. Além de *S. aureus*, *S. capitis*, *S. epidermidis*, *S. lugdunensis*, *S. saprophyticus*, *S. pseudintermedius* e *S. schleiferi* entre outras espécies, já foram relatadas por carregarem esse gene em seu material genético (Van Wamel *et al.*, 1998; Vandenesch *et al.*, 1993; Dufour *et al.*, 2002; Sakinc *et al.*, 2004; Chitra, Jayanthi e Nagarajan, 2015; Canovas *et al.*, 2015). Em contrapartida, dentre as espécies citadas, apenas *S. capitis*, *S. lugdunensis* e *S. pseudintermedius* exibiram motilidade em meio semissólido, e ainda sim, em proporções menores que as amostras de *S. aureus*, fato questiona a importância do *agr* no processo de motilidade de *Staphylococcus* spp.

**Tabela 13** – Tipos de gene *agr* encontrado nas amostras de *S. aureus* já tipadas

<b>Amostra</b>	<b>Tipo de <i>agr</i></b>	<b>Diâmetro médio das colônias (mm)</b>
10a2	1	23,5
112a2	2	25
74a2	3	16,1
833	3	32
1349	3	30
1602	3	9,5

A literatura já descreveu que *S. epidermidis* é capaz de realizar motilidade do tipo *darting*, que consiste, basicamente, na ejeção de bactérias individuais para fora da colônia inicial, gerando novas colônias (Henrichsen, 1972). Entretanto, devido aos diâmetros e às morfologias das colônias das amostras de *S. epidermidis* utilizadas, nesta análise, não foram observados indícios de motilidade das cepas em comparação ao controle negativo. O que também chama a atenção nesse contexto é que *S. epidermidis* carrega o *agr* em seu material genético (Van Wamel *et al.*, 1998), além de ser capaz de produzir modulinas solúveis em fenol (Periasamy *et al.*, 2012). Como não houve nenhum estudo para avaliar a integridade e/ou funcionalidade do *agr* nessas amostras, esses resultados dão margem para dúvidas quanto à proporção da importância desse gene nesse fenômeno, visto que sabe-se que outros fatores como a presença dos ácidos teicoicos na parede celular e a digestão de DNA extracelular também atuam na regulação da motilidade em *S. aureus* (Kaito e Sekimizu, 2007; Kaito *et al.*, 2011; Ueda *et al.*, 2011).

Dentre as quatro amostras de *S. haemolyticus* analisadas, uma demonstrou indício de motilidade em meio semissólido. Essa espécie é capaz de produzir modulinas solúveis em fenol, moléculas que, em *S. aureus*, aumentam o fenômeno de motilidade por *spreading* devido à sua atuação como moléculas surfactantes (Chatterjee *et al.*, 2011; Tsompanidou *et al.*, 2013; Da *et*

*al.*, 2017). Essas informações questionam o papel destas moléculas no fenômeno de motilidade desta espécie, que pode ter um efeito antagônico à motilidade. Em *S. aureus*, outra molécula a  $\delta$ -hemolisina que é capaz de reprimir o *spreading* nesta espécie (Omae, Sekimizu e Kaito, 2012).

As amostras de *S. lugdunensis* exibiram motilidade a partir de colônias de forma similar ao descrito para algumas cepas de *S. aureus* capazes de formar estruturas que lembram cometas, fenômeno associado ao *gliding*, um tipo de motilidade ativa (Pollitt, Crusz e Diggle, 2015). As amostras de *S. lugdunensis* formaram crescimento profundo no meio de cultura, formando uma espécie de arraste bacteriano por dentro desse meio. Essa espécie também possui o gene *agr* em seu material genético (Vandenesch *et al.*, 1993), e estudos mais aprofundados precisariam ser realizados para definir se este sistema está também associado à motilidade ativa em *Staphylococcus* spp.

Fenômeno já descrito em *S. epidermidis*, *darting* é um tipo de motilidade baseado na ejeção, devido a forças expansivas, de bactérias para fora do inóculo principal, formando novas colônias (Henrichsen, 1972). Neste estudo, todas as amostras analisadas, em algum momento de seus respectivos experimentos, exibiram crescimento de colônias além da colônia principal, como pode ser observado na Figura 8E na amostra de *S. pseudintermedius* RF30. Esse fato ocorreu independente de a amostra ser capaz ou não de realizar motilidade e de forma variável entre diferentes dias de experimentos. Assim, não foi possível afirmar a ocorrência desse fenômeno neste estudo, devido à ausência de reprodutibilidade neste fenômeno que poderia facilmente estar associado à respingos durante a pipetagem.

Dentre as dificuldades encontradas neste estudo estão, principalmente, o pequeno número de estudos publicados em espécies de *Staphylococcus* e a grande variabilidade observadas na motilidade em meio semissólido das amostras, que se mostraram altamente dependente às condições de cultivo. Assim, uma padronização minuciosa da técnica precisou ser realizada com a inclusão de controle negativo e positivos a cada experimento. A motilidade destas espécies em meio semissólido foi dependente das condições de umidade, temperatura e tempo de crescimento, o que refletiu na necessidade de testes com variáveis como o tamanho da placa de Petri utilizada, a vedação com parafilme das placas e a localização destas na estufa.



Devido a emergência de bactérias resistentes aos antimicrobianos utilizados na medicina humana e veterinária, cresce cada vez mais a procura por terapias alternativas ao uso destes fármacos. Um exemplo disso são os estudos que têm como alvos principais biomoléculas secretadas por outros microrganismos e que atuam na virulência de patógenos bacterianos, inviabilizando a persistência destes em infecções. Um estudo anterior de nosso grupo mostrou que moléculas secretadas por uma amostra de *S. epidermidis* isolada de microbiota de pele humana apresentaram atividade antibiofilme em cepas clínicas de *S. aureus* (Glatthardt, 2016). Outro estudo mostrou que AIPs secretados por outras espécies de *Staphylococcus* são capazes de inibir o *agr* de *S. aureus*, com destaque para *S. schleiferi*, uma bactéria comensal de cães e gatos, cujos AIPs exibiram a maior atividade inibitória do estudo (Canovas *et al.*, 2016). Diante disso, visto que o *agr* é considerado o principal gene responsável pelo fenótipo de motilidade em *S. aureus*, era nosso objetivo utilizar moléculas obtidas de sobrenadantes de outros *Staphylococcus* no intuito de analisar uma possível influência nesse fenótipo. Porém, devido à variabilidade observada, e já descrita acima, na realização dos experimentos, não foi possível até o momento determinar o impacto destas moléculas na motilidade de *Staphylococcus* spp. móveis. Estudos futuros irão focar na determinação da interação entre as espécies, no que diz respeito a produção de moléculas que afetam sua motilidade.

O papel da motilidade recém descrita em espécies de *Staphylococcus* é uma questão importante ainda não avaliada e que precisa ser investigada. Em outras espécies bacterianas, a motilidade é considerada fundamental para a sobrevivência e virulência dos microrganismos no hospedeiro (Josenhans e Suerbaum, 2002; Jarrell e McBride, 2008; Pollitt e Diggle, 2017). Tendo em vista a habilidade deste gênero bacteriano de colonizar a microbiota de seres humanos e animais, assim como causar diversos tipos de infecções, é provável que a motilidade possua um papel importante na biologia deste microrganismo. Estudos futuros continuarão avaliando esta nova característica aumentando nosso conhecimento sobre este gênero bacteriano.

## 7. CONCLUSÕES

- A confirmação da identificação das amostras foi realizada e, ao todo, 8 amostras de *S. aureus*, 5 de *S. capitis*, 5 de *S. epidermidis*, 4 de *S. haemolyticus*, 4 de *S. hominis*, 4 de *S. lugdunensis*, 12 de *S. pseudintermedius*, 4 de *S. saprophyticus*, 4 de *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, 4 de *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* e 5 de *S. warneri* foram analisadas.
- As espécies de *S. aureus*, *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans* e *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* apresentaram motilidade em ágar semissólido compatível com o controle positivo.
- As espécies *S. capitis* e *S. lugdunensis* apresentaram motilidade significativamente maior que o controle negativo, porém menor que o controle positivo.
- Algumas cepas das espécies *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus* e *S. warneri* apresentaram motilidade no meio semissólido, porém não significativamente diferente do controle negativo para cada espécie como um todo.
- As espécies *S. epidermidis* e *S. hominis* não apresentaram indícios de motilidade, apresentando colônias similares ao controle negativo.
- A maioria das amostras que exibiram motilidade apresentou colônias características de *spreading* com colônias se espalhando na superfície do ágar. *S. lugdunensis* apresentou colônias com característica de *gliding* com formação de cometas e adentrando ao ágar.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akiyama, H., Kanzaki, H., Tada, J. e Arata, J. (1998). Coagulase-negative staphylococci isolated from various skin lesions. *J. Dermatol.* 25, 563–568.
- Alonzo, F., e Torres, V. J. (2014). The bicomponent pore-forming leucocidins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78, 199-230.
- Al Wohoush, I., Rivera, J., Cairo, J., Hachem, R. e Raad, I. (2011). Comparing clinical and microbiological methods for the diagnosis of true bacteraemia among patients with multiple blood cultures positive for coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 569–571.
- Archer, G.L. (2000). *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative Staphylococci. In: Principles and practice of infectious diseases – 8th edition. Edited by: Mandall, G.L.; Bennett, J.E. & Dolin, R. New York – NY, Churchill Livingstone, USA.
- Archer, N.K., Mazaitis, M.J., Costerton, J.W., Leid, J.G., Powers, M.E. e Shirtliff, M.E. (2011). *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence* 2, 445-459.
- Babu, E. e Oropello, J. (2011). *Staphylococcus lugdunensis*: the coagulase-negative *Staphylococcus* you don't want to ignore. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 9, 901–907.
- Balaban, N. e Novick, R.P. (1995). Autocrine regulation of toxin synthesis by *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 1619–1623.
- Banat, I.M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M.G., Fracchia, L., Smyth, T.J. e Marchant, R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 427-444.
- Bandres, J.C. e Darouiche, R.O. (1992). *Staphylococcus capitis* endocarditis: a new cause of an old disease. *Clin. Infect. Dis.* 14, 366–367.
- Barrett, L. e Atkins, B. (2014). The clinical presentation of prosthetic joint infection. *J. Antimicrob. Chemother.* 69(Suppl 1) 25-27.
- Barros, E.M., Ceotto, H., Bastos, M.C.F., dos Santos, K.R.N. e Giambiagi-Demarval, M. (2012). *Staphylococcus haemolyticus* as an important hospital pathogen and carrier of methicillin resistance genes. *J. Clin. Microbiol.* 50, 166–168.
- Barros, E.M., Lemos, M., Souto-Padrón, T. e Giambiagi-deMarval, M. (2015). Phenotypic and genotypic characterization of biofilm formation in *Staphylococcus haemolyticus*. *Curr. Microbiol.* 70, 829–834.
- Bastos, M.C., Ceotto, H., Coelho, M.L. e Nascimento, J.S. (2009). Staphylococcal antimicrobial peptides: relevant properties and potential biotechnological applications. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 10, 38-61.
- Becker, K., Heilmann, C. e Peters, G. (2014). Coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 27, 870–926.

- Becker, K. e Von Eiff, C. (2011). *Staphylococcus, Micrococcus*, and Other Catalase-Positive Cocci. In: Manual of Clinical Microbiology – 10th edition, vol 1. Edited by: Versalovic J, Carrol KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW. Washington – DC, ASM Press, USA.
- Bergdoll, M.S. (1989). *Staphylococcus aureus*. In: Foodborne bacterial pathogens. New York: Marcel Dekker, 463-523.
- Boisset, S., Geissmann, T., Huntzinger, E., Fechter, P., Bendridi, N., Possedko, M., Chevalier, C., Helfer, E.C., Benito, Y., Jacquier, A., Gaspin, C., Vandenesch, F. e Romby, P. (2007). *Staphylococcus aureus* RNAIII coordinately represses the synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism. *Genes Dev.* 21, 1353–1366.
- Briscoe, J.A., Morris, D.O., Rosenthal, K.L., Shofer, F.S. e Rankin, S.C. (2009). Evaluation of mucosal and seborrhic sites for staphylococci in two populations of captive psittacines. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 234, 901–905.
- Brooks, G.F., Carroll, K.C., Butel, J.S., Morse, S.A. e Mietzner, T.A. (2014). Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick e Adelberg. In: Estafilococos. Carroll, K.C. 26 ed.. (Porto Alegre: AMGH EDITORA LTDA.), pp. 199-207.
- Burchard, R.P. (1981). Gliding motility of prokaryotes: ultrastructure, physiology, and genetics. *Annu. Rev. Microbiol.* 35, 497–529.
- Butler, M.T., Wang, Q. e Harshey, R.M. (2010). Cell density and mobility protect swarming bacteria against antibiotics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107, 3776–3781.
- Cain, C.L., Morris, D.O. e Rankin, S.C. (2011). Clinical characterization of *Staphylococcus schleiferi* infections and identification of risk factors for acquisition of oxacillin-resistant strains in dogs: 225 cases (2003–2009). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 239, 1566–1573.
- Campos, J.M.C. (2017). Caracterização do perfil de resistência antimicrobiana de amostras hospitalares de *Staphylococcus* spp. isoladas de endocardite e análise do efeito de compostos secretados por *S. epidermidis*. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas: Biotecnologia) – IMPG, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Canovas, J., Baldry, M., Bojer, M.S., Andersen, P.S., Gless, B.H., Grzeskowiak, P.K., Stegger, M., Damborg, P., Olsen, C.A. e Ingmer, H. (2016). Cross-talk between *Staphylococcus aureus* and other staphylococcal species via the *agr* quorum sensing system. *Front. Microbiol.* 7, 1733.
- Chambers, H.F. e DeLeo, F.R. (2009). Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 629-641.
- Chamon, R.C. (2017). Avaliação da expressão fenotípica e genotípica de fatores de virulência e o papel da modulação antimicrobiana no biofilme de amostras de *Staphylococcus aureus* carreadores dos genes *pvl*. Tese (Doutorado em Ciências: Microbiologia) – IMPG, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Chatterjee, S.S., Chen, L., Joo, H.S., Cheung, G.Y., Kreiswirth, B.N. e Otto, M. (2011). Distribution and regulation of the mobile genetic element-encoded phenol-soluble modulín PSM-mec in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 6, 28781.

Chatterjee, S.S., Maiti, P., Dey, R. e Kundu, A. (2014). Biofilms on indwelling urologic devices: microbes and antimicrobial management prospect. *Ann. Med. Health Sci. Res.* 4, 100-104.

Chaves, F., Garcia-Alvarez, M., Sanz, F., Alba, C. e Otero, J.R. (2005). Nosocomial spread of a *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* strain causing sepsis in a neonatal intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* 43, 4877–4879.

Cheng, A.G., DeDent, A.C., Schneewind, O. e Missiakas, D. (2011). A play in four acts: *Staphylococcus aureus* abscess formation. *Trends Microbiol.* 19, 225–232.

Cheung, A.L., Koomey, J.M., Butler, C.A., Projans, S.J. e Fischetti, V.A. (1992). Regulation of exoprotein expression in *Staphylococcus aureus* by a locus (*sar*) distinct from *agr*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6462-6466.

Chessa, D., Ganau, G. e Mazzarello, V. (2015). An overview of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* with a focus on developing countries. *J. Infect. Dev. Ctries.* 9, 547-550.

Chitra, M.A., Jayanthi, C. e Nagarajan, B. (2015). Detection and sequence analysis of accessory gene regulator genes of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates, *Vet. World* 8, 902-907.

Christensen, G.D., Bisno, A.L., Parisi, J.T., McLaughlin, B., Hester, M.G. e Luther, M.W. (1982). Nosocomial septicemia due to multiply antibiotic-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Ann. Intern. Med.* 96, 1-10.

Christensen, G.J. e Brüggemann, H. (2014). Bacterial skin commensals and their role as host guardians. *Benef. Microbes* 5, 201-215.

Cogen, A.L., Nizet, V. e Gallo, R.L. (2008). Skin microbiota: a source of disease or defence? *Br. J. Dermatol.* 158, 442-455.

Cogen, A.L., Yamasaki, K., Muto, J., Sanchez, K.M., Crotty Alexander, L., Tanios, J., Lai, Y., Kim, J.E., Nizet, V. e Gallo, R.L. (2010). *Staphylococcus epidermidis* antimicrobial delta-toxin (phenol-soluble modulins-gamma) cooperates with host antimicrobial peptides to kill group A *Streptococcus*. *PLoS One.* 5, 8557.

Cogen, A.L., Yamasaki, K., Sanchez, K.M., Dorschner, R.A., Lai, Y., Macleod, D.T., Torpey, J.W., Otto, M., Nizet, V., Kim, J.E. e Gallo, R.L. (2010). Selective antimicrobial action is provided by phenol-soluble modulins derived from *Staphylococcus epidermidis*, a normal resident of the skin. *J. Invest. Dermatol.* 130, 192-200.

Cunha, B.A., Esrick, M.D. e Larusso, M. (2007). *Staphylococcus hominis* native mitral valve bacterial endocarditis (SBE) in a patient with hypertrophic obstructive cardiomyopathy. *Heart Lung* 36, 380–382.

Czekaj, T., Ciszewski, M. e Szewczyk, E.M. (2015). *Staphylococcus haemolyticus* – an emerging threat in the twilight of antibiotics age. *Microbiol.* 161, 2061–2068.

Da, F., Joo, H.-S., Cheung, G.Y.C., Villaruz, A.E., Rohde, H., Luo, X. e Otto, M. (2017). Phenol-soluble modulins of *Staphylococcus haemolyticus*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7:206.

de Allori, M.C., Jure, M.A., Romero, C. e de Castillo, M.E. (2006). Antimicrobial resistance and production of biofilms in clinical isolates of coagulase-negative *Staphylococcus* strains. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 1592-1596.

de Matos, P.D.M., de Oliveira, T.L.R., Cavalcante, F.S., Ferreira, D.C., Iorio, N.L.P., Pereira, E.M., Chamon, R.C. e dos Santos, K.R.N. (2016). Molecular markers of antimicrobial resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SCC *mec* IV presenting different genetic backgrounds. *Microbial Drug Resistance*, p. 00-00.

Devriese, L. A., Vancanneyt, M., Baele, M., Vaneechoutte, M., De Graef, E., Snauwaert, C., Cleenwerck, I., Dawyndt, P., Swings, J., Decostere, A. e Haesebrouck, F. (2005). *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov. a coagulase-positive species from animals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 1569–1573.

Dinges, M.M., Orwin, P.M., e Schlievert, P.M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 16-34.

Donlan, R.M. (2001). Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin. Infect. Dis.* 33, 1387-1392.

Dordet-Frisoni, E., Gaillard-Martinie, B., Talon, R. e Leroy, S. (2008). Surface migration of *Staphylococcus xylosus* on low-agar media. *Res. Microbiol.* 159, 263–269.

Dufour, P., Jarraud, S., Vandenesch, F., Greenland, G., Novick, R. P., Bes, M., Etienne, J. e Lina, G. (2002). High genetic variability of the *agr* locus in *Staphylococcus* species. *J. Bacteriol.* 184, 1180–1186.

Fey, P.D. e Olson, M.E. (2010). Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Future Microbiol.* 5, 917-933.

Foster, T.J. (2005). Immune evasion by staphylococci. *Nature.* 3, 948-958.

Foster, T.J., Geoghegan, J.A., Ganesh, V.K. e Höök M. (2014). Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat. Ver. Microbiol.* 12, 49-62.

Fournier, B. e Philpott, D.J. (2005). Recognition of *Staphylococcus aureus* by the Innate Immune System. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 521–540.

Frankel, B.A., Kruger, R.G., Robinson, D.E., Kelleher, N.L. e McCafferty, D.G. (2005). *Staphylococcus aureus* sortase transpeptidase SrtA: Insight into the kinetic mechanism and evidence for a reverse protonation catalytic mechanism. *Biochemistry* 44, 11188–11200.

Frank, L.A., Kania, S.A., Hnilica, K.A., Wilkes, R.P. e Bemis, D.A. (2003). Isolation of *Staphylococcus schleiferi* from dogs with pyoderma. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 222, 451-454.

Freney, J., Brun, Y., Bes, M., Meugnier, H., Grimont, F., Grimont, P.A.D., Nervi, C., Fleurette, J. (1988). *Staphylococcus lugdunensis* sp. nov. and *Staphylococcus schleiferi* sp. nov., two species from human clinical specimens. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 38, 168 –172.

Freney, J., Kloos, W.E., Hajek, V. e Webster, J.A. (1999). Recommended minimal standards for description of new staphylococcal species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 489–502.

Fuda, C.C.S., Fischer, J.F. e Mobashery, S. (2005).  $\beta$ -Lactam resistance in *Staphylococcus aureus*: the adaptive resistance of a plastic genome. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 2617.

Gallo, R.L. e Nakatsuji, T. (2011). Microbial symbiosis with the innate immune defense system of the skin. *J. Invest. Dermatol.* 131, 1974-1980.

Gao, Z., Perez-Perez, G.I., Chen, Y. e Blaser, M.J. (2010). Quantitation of major human cutaneous bacterial and fungal populations. *J. Clin. Microbiol.* 48, 3575-3581.

Gatermann, S.G. (1986). Virulence factors of *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, and enterococci. In: Mobley HLT, Warren JW, eds. *Urinary tract infections: molecular pathogenesis and clinical management*. Washington, DC: ASM Press: 313–340.

Gatermann, S., Marre, R., Heesemann, J. e Henkel, W. (1988) Hemagglutinating and adherence properties of *Staphylococcus saprophyticus*: epidemiology and virulence in experimental urinary tract infection of rats. *FEMS Microbiol. Immunol.* 1, 179–185.

Gautam, V., Sethuraman, N., Kaur, R., Sachdev, S., Marwaha, N. e Ray, P. (2017). Changing epidemiology of coagulase-negative staphylococci in normal flora of skin. *Indian J. Med. Microbiol.* 35, 277–278.

Giraudou, A.T., Cheung, A.L. e Nagel, R. (1997). The *sae* locus of *Staphylococcus aureus* controls exoprotein synthesis at the transcriptional level. *Arch. Microbiol.* 168, 53-58.

Glatthardt, T. (2016). Atividade de compostos secretados por *Staphylococcus epidermidis* isolado de microbiota de pele na produção de biofilme por amostras clínicas de *Staphylococcus aureus*. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Microbiologia) – IMPG, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Griffeth, G.C., Morris, D.O., Abraham, J.L., Shofer, F.S. e Rankin, S.C. (2008). Screening for skin carriage of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* in dogs with healthy and inflamed skin. *Vet. Dermatol.* 19, 142–149.

Henrichsen, J. (1972). Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol. Rev.* 36, 478–503.

Hiramatsu, K., Hanaki, H., Ino, T., Yabuta, K., Oguri, T. e Tenover, F.C. (1997). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother* 40, 135–136.

Hoiczuk, E. (2000). Gliding motility in cyanobacterial: observations and possible explanations. *Arch. Microbiol.* 174, 11–17.

Huebner, J. e Goldmann, D.A.(1999). Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. *Annu. Rev. Med.* 50, 223-236.

Igimi, S., Takahashi, E. e Mitsuoka, T. (1990). *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* subsp. nov., isolated from the external auditory meatus of dogs with external ear otitis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40, 409-411.

- Iwatsuki, K., Yamasaki, O., Morizane, S. e Oono, T. (2006). Staphylococcal cutaneous infections: invasion, evasion and aggression. *J. Dermatol. Sci.* 42, 203-214.
- Janzon, L. e Arvidson, S. (1990). The role of the delta-lysin gene (*hld*) in the regulation of virulence genes by the accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *EMBO J.* 9, 1391–1399.
- Janzon, L., Löfdahl, S. e Arvidson, S. (1989). Identification and nucleotide sequence of the delta-lysin gene, *hld*, adjacent to the accessory gene regulator (*agr*) of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Gen. Genet.* 219, 480–485.
- Jarraud, S., Lyon, G. J., Figueiredo, A. M., Lina, G., Vandenesch, F., Etienne, J., Muir, T. W. e Novick, R. P. (2000). Exfoliatin-producing strains define a fourth *agr* specificity group in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 182, 6517–6522
- Jarrell, K.F. e McBride, M.J. (2008). The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 466–476.
- Ji, G., Beavis, R. C. e Novick, R. P. (1995). Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 12055–12059.
- Ji, G., Beavis, R. C. e Novick, R. P. (1997). Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science* 276, 2027–2030.
- Josenhans, C. e Suerbaum, S. (2002). The role of motility as a virulence factor in bacteria. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 291, 6.
- Kaiser, D. (2000). Bacterial motility: how do pili pull? *Curr. Biol.* 10, 777–780.
- Kaito, C. e Sekimizu, K. (2007). Colony spreading in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 189, 2553–2557.
- Kaito, C., Hirano, T., Omae, Y. e Sekimizu, K. (2011). Digestion of extracellular DNA is required for giant colony formation of *Staphylococcus aureus*. *Microbial Pathogenesis* 51, 142-148.
- Kaito, C., Omae, Y., Matsumoto, Y., Nagata, M., Yamaguchi, H., Aoto, T., Ito, T., Hiramatsu, K. e Sekimizu, K. (2008). A novel gene, *fudoh*, in the SCC*mec* region suppresses the colony spreading ability and virulence of *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 3, 3921.
- Kania, S.H., Williamson, N.H., Frank, L.A., Wilkes, R.P., Jones, R.D., Bemis, D.A., 2004. Methicillin resistance in staphylococci isolated from the skin of dogs with pyoderma. *Am. J. Vet. Res.* 65, 1265–1268.
- Kearns, D.B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 634–664.
- Kiedrowski, M.R. e Horswill, A.R. (2011). New approaches for treating staphylococcal biofilm infections. *Ann. NY Acad. Sci.* 1241, 104-121.



- Kiriukhin, M.Y., Debabov, D.V., Shinabarger, D.L. e Neuhaus, F.C. (2001). Biosynthesis of the glycolipid anchor in lipoteichoic acid of *Staphylococcus aureus* RN4220: role of YpfP, the diglucosyldiacylglycerol synthase. *J. Bacteriol.* 183, 3506–3514.
- Koenig, R.L., Ray, J.L., Maleki, S.J., Smeltzer, M.S. e Hurlburt, B.K. (2004). *Staphylococcus aureus* AgrA binding to the RNAlII-*agr* regulatory region. *J. Bacteriol.* 186, 7549–7555.
- Kornblum, J., Kreiswirth, B., Projan, S. J., Ross, H. e Novick, R. P. (1990). *agr*: a polycistronic locus regulating exoprotein synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Biology of the Staphylococci*, 373–401.
- Kropp, K.A., Lucid, A., Carroll, J., Belgradov, V., Walsh, P., Kelly, B., Smith, C., Dickinson, P., O'Driscoll, A., Templeton, K., Ghazal, P. e Sleator, R.D. (2014). Draft genome sequence of a *Staphylococcus warneri* strain isolated from a preterm neonate blood sepsis patient at the Royal Infirmary, Edinburgh, Scotland. *Genome Announc.* 2, e00877-14.
- Kloos, W.E. e Bannerman, T.L. (1999). *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: *Manual of Clinical Microbiology – 7th edition*. 264-282. DC, ASM Press, USA.
- Krishna, S. e Miller, L.S. (2012). Host-pathogen interactions between the skin and *Staphylococcus aureus*. *Curr. Opin. Microbiol.* 15, 28-35.
- Kubica, M., Guzik, K., Koziel, J., Zarebski, M., Richter, W., Gajkowska, B., Golda, A., Maciag-gudowska, A., Brix, K., Shaw, L., Foster, T. e Potempa, J. A. (2008). Potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: the silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. *PLoS ONE* 9, 1-16.
- Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., Cui, L., Oguchi, A., Aoki, K., Nagai, Y., Lian, J., Ito, T., Kanamori, M., Matsumaru, H., Maruyama, A., Murakami, H., Hosoyama, A., Mizutani-Ui, Y., Takahashi, N.K., Sawano, T., Inoue, R., Kaito, C., Sekimizu, K., Hirakawa, H., Kuhara, S., Goto, S., Yabuzaki, J., Kanehisa, M., Yamashita, A., Oshima, K., Furuya, K., Yoshino, C., Shiba, T., Hattori, M., Ogasawara, N., Hayashi, H. e Hiramatsu, K. (2001). Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 357, 1225–1240.
- Lai, S., Tremblay, J. e Déziel, E. (2009). Swarming motility: a multicellular behaviour conferring antimicrobial resistance. *Environmental Microbiol.* 11, 126–136.
- Lambris, J.D., Ricklin, D. e Geisbrecht, B.V. (2008). Complement evasion by human pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 132-142.
- Le, K.Y. e Otto, M. (2015). Quorum-sensing regulation in staphylococci — an overview. *Front. Microbiol.* 6, 1174.
- Le Loir Y., Baron F. e Gautier M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet. Mol. Res.* 2, 63–76.
- Lima, C.O.G.X. (2018). *Cutibacterium (Propionibacterium) acnes*: um patógeno negligenciado em implantes ortopédicos. Dissertação (Mestrado em Ciências: Microbiologia) – IMPG, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

- Lina, G., Jarraud, S., Ji, G., Greenland, T., Pedraza, A., Etienne, J., Novick, R.P. e Vandenesch, F. (1998). Transmembrane topology and histidine protein kinase activity of AgrC, the *agr* signal receptor in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 28, 655–662.
- Linehan, D., Etienne, J. E Sheehan, D. (2003). Relationship between haemolytic and sphingomyelinase activities in a partially purified beta-like toxin from *Staphylococcus schleiferi*. *Fems. Immunol. Med. Microbiol.* 36, 95-102.
- Lin, M.-H., Ke, W.-J., Liu, C.-C. e Yang, M.-W. (2016). Modulation of *Staphylococcus aureus* spreading by water. *Sci. Rep.* 29, 25233.
- Loew, O. (1900). A new enzyme of general occurrence in organisms. *Science* 11, 701-702.
- Lowy, F.D. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* 339, 520–532.
- LPSN, List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature – Genus *Staphylococcus*, 2018. Disponível em: <http://www.bacterio.net/staphylococcus.html>; acesso em: 22/10/2018.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, B.H. e Stahl, D.A. (2016). *Microbiologia de Brock*. 14 ed. (Porto Alegre: Artmed).
- Matsuyama, T., Kaneda, K., Nakagawa, Y., Isa, K., Hara-Hotta, H. e Yano, I. (1992). A novel extracellular cyclic lipopeptide which promotes flagellum-dependent and -independent spreading growth of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 174, 1769–1776.
- Mazmanian, S., Liu, G., Ton-That, H. e Schneewind O. (1999). *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science* 285, 760-763.
- McBride, M.J. (2001). Bacterial gliding motility: multiple mechanisms for cell movement over surfaces. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 49–75.
- McNamara, P.J., Milligan-Monroe, K.C., Khalili, S. E Proctor, R. A. (2000). Identification, cloning, and initial characterization of *rot*, a locus encoding a regulator of virulence factor expression in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 182, 3197–3203.
- Mendoza-Olazarán, S., Morfin-Otero, R., Rodríguez-Noriega, E., Llaca-Díaz, J., Flores-Treviño, S., González-González, G.M., Villarreal-Treviño, L. e Garza-González, E. (2013) Microbiological and molecular characterization of *Staphylococcus hominis* isolates from blood. *PLoS ONE* 8, e61161.
- Murphy, E., Lin, S. L., Nunez, L., Andrew, L., Fink, P. S., Dilts, D. A., e Anderson, A. S. (2011). Challenges for the evaluation of *Staphylococcus aureus* protein based vaccines: monitoring antigenic diversity. *Hum. Vaccin.* 7 Suppl., 51-59.
- Naik, M.T., Suree, N., Ilangovan, U., Liew, C.K., Thieu, W., Campbell, D.O., Clemens, J.J., Jung, M.E. e Clubb, R.T. (2006). *Staphylococcus aureus* sortase A transpeptidase. calcium promotes sorting signal binding by altering the mobility and structure of an active site loop. *J. Biol. Chem.* 281, 1817–1826.

- Natsis, N.E. e Cohen, P.R. (2018). Coagulase-negative *Staphylococcus* skin and soft tissue infections. *Am. J. Clin. Dermatol.*
- Navarre, W. e Schneewind, O. (1994). Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPXTG motif of surface proteins in gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology*, 14, 115-121.
- Nicolle, L.E., Hoban, S.A. e Harding, G.K. (1983). Characterization of coagulase-negative staphylococci from urinary tract specimens. *J. Clin. Microbiol.* 17, 267–271.
- Novick, R.P. e Geisinger, E. (2008). Quorum sensing in staphylococci. *Annu. Rev. Genet.* 42, 541–564.
- Novick, R.P., Projan, S.J., Kornblum, J., Ross, H.F., Ji, G., Kreiswirth, B., Vandenesch, F. e Moghazeh, S. (1995). The *agr* P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Gen. Genet.* 248, 446–458.
- Nowrouzian, F. L., Ali, A., Badiou, C., Dauwalder, O., Lina, G. e Josefsson, E. (2015). Impacts of enterotoxin gene cluster-encoded superantigens on local and systemic experimental *Staphylococcus aureus* infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 34, 1443-1449.
- Omae, Y., Sekimizu, K. e Kaito, C. (2012). Inhibition of colony-spreading activity of *Staphylococcus aureus* by secretion of  $\delta$ -hemolysin. *J. Biol. Chem.* 287, 15570 –15579
- Otto, M. (2008). Staphylococcal biofilms. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 322, 207-228.
- Otto, M. (2012). Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. *Semin. Immunopathol.* 34, 201-214.
- Otto, M. (2014). *Staphylococcus aureus* toxins. *Curr. Opin. Microbiol.* 0, 32–37.
- Otto, M., Echner, H., Voelter, W. e Götz, F. (2001). Pheromone cross-inhibition between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* 69, 1957-1960.
- Paiva-Santos, W., Barros, E.M., Sousa, V.S., Laport, M.S. e Giambiagi-deMarval, M. (2016). Identification of coagulase-negative *Staphylococcus saprophyticus* by polymerase chain reaction based on the heat-shock repressor encoding *hrcA* gene. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 86, 253-256.
- Palazzo, I.C., d’Azevedo, P.A., Secchi, C., Pignatari, A.C. e Darini, A.L. (2008). *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* strains causing nosocomial bloodstream infection in Brazil. *J. Antimicrob. Chemother* 62, 1222–1226.
- Parsek, M.R. e Singh, P.K. (2003). Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 677-701.
- Peacock, S.J., Lina, G., Etienne, J. E Foster, T.J. (1999). *Staphylococcus schleiferi* subsp. *schleiferi* expresses a fibronectin-binding protein. *Infect Immun.* 67, 4272-4275.

- Peng, H. L., Novick, R. P., Kreiswirth, B., Kornblum, J. e Schlievert P. (1988). Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 170, 4365–4372.
- Pereira, E.M., Oliveira, F.L.F., Schuenck, R.P., Zoletti, G.O. e dos Santos, K.R.N. (2009). Detection of *Staphylococcus lugdunensis* by a new species-specific PCR based on the *fbl* gene. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 58, 295-298.
- Periasamy, S., Chatterjee, S.S., Cheung, G.Y.C. e Otto, M. (2012). Phenol-soluble modulins in staphylococci: What are they originally for? *Commun. Integr. Biol.* 5, 275–277.
- Peton, V. e Le Loir, Y. (2014). *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. *Infection, Genetics and Evolution* 21, 602–615.
- Piette, A. e Verschraegen, G. (2009). Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. *Vet. Microbiol.* 134, 45-54.
- Pitcher, D.G., Sauders, N.A. e Owenm, R.J. (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.* 151-156.
- Pollitt, E.J.G., Crusz, S.A. e Diggle, S.P. (2015). *Staphylococcus aureus* forms spreading dendrites that have characteristics of active motility. *Sci. Rep.* 5, 17698.
- Pollitt, E.J.G. e Diggle, S.P. (2017). Defining motility in Staphylococci. *Cell. Mol. Life Sci.* 74, 2943-2958.
- Proft, T. e Fraser, J.D. (2003). Bacterial superantigens. *Clin. Exp. Immunol.* 133, 299-306.
- Queck, S.Y., Jameson-Lee, M., Villaruz, A.E., Bach, T.H., Khan, B.A., Sturdevant, D.E., Ricklefs, S.M., Li, M. e Otto, M. (2008). RNAIII-independent target gene control by the *agr* quorum sensing system: insight into the evolution of virulence regulation in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Cell.* 32, 150–158.
- Raz, R., Colodner, R. e Kunin, C.M. (2005). Who are you—*Staphylococcus saprophyticus*? *Clin. Infect. Dis.* 40, 896–898.
- Recsei, P., Kreiswirth, B., O'Reilly, M., Schlievert, P., Gruss, A. e Novick, R.P. (1986) Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by *agr*. *Mol. Gen. Genet.* 202, 58–61.
- Reichenbach, H. (1981). Taxonomy of the gliding bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 35, 339–364.
- Richards, A.C., O'Shea, M., Beard, P.M., Goncheva, M.I., Tuffs, S.W., Fitzgerald, J.R. e Lengeling, A. (2018). *Staphylococcus pseudintermedius* surface protein L (SpsL) is required for abscess formation in a murine cutaneous infection model. *Infect. Immun.* 86, e00631-18.
- Robb, A.R., Wright, E.D., Foster, A.M.E., Walker, R. e Malone, C. (2017). Skin infection caused by a novel strain of *Staphylococcus pseudintermedius* in a Siberian husky dog owner. *JMM Case Rep.* 4, 1–4.
- Rogers, K.L., Fey, P.D. e Rupp, M.E. (2009). Coagulase-negative staphylococcal infections. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 23, 73–98.

- Rossi, C.C., Santos-Gandelman, J.F., Barros, E.M., Alvarez, V.M., Laport, M.S. e Giambiagi-deMarval, M. (2016). *Staphylococcus haemolyticus* as a potential producer of biosurfactants with antimicrobial, anti-adhesive and synergistic properties. *Applied Microbiology* 63, 215–221.
- Saenz, H. L., Augsburg, V., Vuong, C., Jack, R. W., Götz, F. e Otto, M. (2000). Inducible expression and cellular location of AgrB, a protein involved in the maturation of the staphylococcal quorum-sensing pheromone. *Arch. Microbiol.* 174, 452–455.
- Saïd-Salim, B., Dunman, P.M., McAleese, F.M., Macapagal, D., Murphy, E., McNamara, P.J., Arvidson, S., Foster, T.J., Projan, S.J. e Kreiswirth, B.N. (2003). Global regulation of *Staphylococcus aureus* genes by Rot. *J. Bacteriol.* 185, 610–619.
- Salgado-Pabón, W., Breshears, L., Spaulding, A.R., Merriman, J.A., Stach, C.S., Horswill, A.R. e Schlievert, P.M. (2013). Superantigens are critical for *Staphylococcus aureus* infective endocarditis, sepsis, and acute kidney injury. *MBio*, 4.
- Sakinc, T., Kulczak, P., Henne, K. e Gatermann, S.G. (2004). Cloning of an *agr* homologue of *Staphylococcus saprophyticus*. *FEMS Microbiology Letters* 237, 157–161.
- Savage, V.J., Chopra, I. e O'Neill, A.J. (2013). *Staphylococcus aureus* biofilms promote horizontal transfer of antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother* 57, 1968-1970.
- Soge, O.O., Meschke, J.S., No, D.B. e Roberts, M.C. (2009). Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* spp. isolated from US West Coast public marine beaches. *J. Antimicrob. Chemother* 64, 1148–1155.
- Somayaji, R., Priyantha, M.A., Rubin, J.E. e Church, D. (2016). Human infections due to *Staphylococcus pseudintermedius*, an emerging zoonosis of canine origin: report of 24 cases. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 85, 471–476.
- Stewart, C.R., Rossier, O. e Cianciotto, N.P. (2009). Surface translocation by *Legionella pneumophila*: a form of sliding motility that is dependent upon type II protein secretion. *J. Bacteriol.* 191, 1537–1546.
- Sunbul, M., Demirag, M.K., Yilmaz, O., Yilmaz, H., Ozturk, R. e Leblebicioglu, H. (2006). Pacemaker lead endocarditis caused by *Staphylococcus hominis*. *Pacing Clin. Electrophysiol.* 29, 543–545.
- Suree, N., Liew, C.K., Villareal, V.A., Thieu, W., Fadeev, E.A., Clemens, J.J., Jung, M.E. e Clubb, R.T. (2009). The structure of the *Staphylococcus aureus* sortase-substrate complex reveals how the universally conserved LPXTG sorting signal is recognized. *J. Biol. Chem.* 284, 24465–24477.
- Sutra, L., Rainard, P. e Poutrel, B. (1990). Phagocytosis of mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* and expression of type 5 capsular polysaccharide are influenced by growth in the presence of milk. *J. Clin. Microbiol.*, 28, 2253-2258.
- Szczuka, E., Krzyminska, S. e Kaznowski, A. (2016). Clonality, virulence and the occurrence of genes encoding antibiotic resistance among *Staphylococcus warneri* isolates from bloodstream infections. *J. Med. Microbiol.* 65, 828-836.

- Swe, Thein, Naing, A.T., Baqui A.A.M.A. e Khillan, R. (2016). Methicillin-resistant *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans* infection in a patient with hepatocellular carcinoma. *J. Investig. Med. High Impact Case Rep.* 4, 1-3.
- Tang, J., Zhou, R., Shi, X., Kang, M., Wang, H. e Chen, H. (2008). Two thermostable nucleases coexisted in *Staphylococcus aureus*: evidence from mutagenesis and in vitro expression. *FEMS Microbiol. Lett.* 284, 176-183.
- Thakker, M., Park, J.-S., Carey, V. e Lee, J.C. (1998). *Staphylococcus aureus* serotype 5 capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model. *Infect. Immun.* 66, 5183-5189.
- Thammavongsa, V., Rauch, S., Kim, H. K., Missiakas, D. M. e Schneewind, O. (2015). Protein A-neutralizing monoclonal antibody protects neonatal mice against *Staphylococcus aureus*. *Vaccine* 33, 523-526.
- Thibodeau, E., Boucher, H., DeNofrio, D., Pham, D.T. e Snyderman, D. (2012). First report of a left ventricular assist device infection caused by *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans*: a coagulase positive organism. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 74, 68-69.
- Thomas, D., Dauwalder, O., Brun, V., Badiou, C., Ferry, T., Etienne, J., Vandenesch, F. e Lina, G. (2009). *Staphylococcus aureus* superantigens elicit redundant and extensive human Vbeta patterns. *Infect. Immun.* 77, 2043-2050.
- Tong, S.Y.C., Davis, J.S., Eichenberger, E., Holland, T.L., Fowler, V.G., Jr. (2015). *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* 28, 603-661.
- Tsompanidou, E., Denham, E.L., Becher, B., de Jong, A., Buist, G., van Oosten, M., Manson, W.L., Back, J.W., van Dijl, J.M. e Dreisbach, A. (2013). Distinct roles of phenol-soluble modulins in spreading of *Staphylococcus aureus* on wet surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 886-895.
- Tsompanidou, E., Denham, E.L., Sibbald, M.J.J.B., Yang, X., Seinen, J., Friedrich, A.W., Buist, G. e van Dijl, J.M. (2012). The sortase A substrates FnbpA, FnbpB, ClfA and ClfB antagonize colony spreading of *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* 7, e44646.
- Tsompanidou, E., Sibbald, M.J.J.B., Chlebowicz, M.A., Dreisbach, A., Back, J.W., van Dijl, J.M., Buist, G. e Denham, E.L. (2011). Requirement of the *agr* locus for colony spreading of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 193, 1267-1272.
- Ueda, T., Kaito, C., Omae, Y. e Sekimizu, K. (2011). Sugar-responsive gene expression and the *agr* system are required for colony spreading in *Staphylococcus aureus*. *Microbial Pathogenesis* 51, 178-185.
- Vandenesch, F., Lebeau, C., Bes, M., Lina, G., Lina, B., Greenland, T., Benito, Y., Brun, Y., Fleurette, J. e Etienne, J. (1994). Clotting activity of *Staphylococcus schleiferi* subspecies from human patients. *J. Clin. Microbiol.* 32, 388-392.
- Vandenesch, F., Projan, S.J., Kreiswirth, B., Etienne, J. e Novick, R.P. (1993). *agr*-related sequences in *Staphylococcus lugdunensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 111, 115-122.

Van Der Zwet, W.C., Debets-Ossenkopp, Y.J., Reinders, E., Kapi, M., Savelkoul, P.H., Van Elburg, R.M., Hiramatsu, K. e Vandenbroucke-Grauls, C.M. (2002). Nosocomial spread of a *Staphylococcus capitis* strain with heteroresistance to vancomycin in a neonatal intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2520–2525.

van Duijkeren, E., Catry, B., Greko, C., Moreno, M.A., Pomba, M.C., Pyorala, S., Ruzauskas, M., Sanders, P., Threlfall, E.J., Torren-Edo, J. e Torneke, K. (2011). Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 2705–2714.

Van Wamel, W.J., van Rossum, G., Verhoef, J., Vandenbroucke-Grauls, C.M. e Fluit, A.C. (1998). Cloning and characterization of an accessory gene regulator (*agr*)-like locus from *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 163, 1-9.

von Eiff, C., Becker, K., Machka, K., Stammer, H. e Peters, G. (2001). Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Study Group. N. Engl. J. Med* 344, 11–16.

Waters, C. M. e Bassler, B.L. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 319–346.

Weidenmaier, C., Goerke, C. e Wolz, C. (2012). *Staphylococcus aureus* determinants for nasal colonization. *Trends Microbiol.* 20, 243–250.

Weidenmaier, C., Kokai-Kun, J.F., Kristian, S.A., Chanturiya, T., Kalbacher, H., Gross, M., Nicholson, G., Neumeister, B., Mond, J.J. e Peschel, A. (2004). Role of teichoic acids in *Staphylococcus aureus* nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections. *Nat. Med.* 10, 243–245.

Weese, J.S. e van Duijkeren, E. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Vet. Microbiol.* 140, 418–429.

Wood, C.A., Sewell, D.L. e Strausbaugh, L.J. (1989). Vertebral osteomyelitis and native valve endocarditis caused by *Staphylococcus warneri*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 12, 251-253.

Ythier, M., Entenza, J.M., Bille, J., Vandenesch, F., Bes, M., Moreillon, P. e Sakwinska, O. (2010). Natural variability of in vitro adherence to fibrinogen and fibronectin does not correlate with in vivo infectivity of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 78, 1711–1716.

Zdovic, I., Ocepek, M., Pirs, T., Krt, B. e Pinter, L. (2004). Microbiological features of *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*, isolated from dogs and possible misidentification with other canine coagulase-positive *Staphylococci*. *J. Med. Vet.* 51, 449-454.

Zecconi, A. e Scali, F. (2013). *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. *Immunol. Lett.* 150, 12- 22.

Zhang, L. e Ji, G. (2004). Identification of a staphylococcal AgrB segment(s) responsible for group-specific processing of AgrD by gene swapping. *J. Bacteriol.* 186, 6706–6713.

Zhang, L., Gray, L., Novick, R. P. e Ji, G. (2002). Transmembrane topology of AgrB, the protein involved in the post-translational modification of AgrD in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 277, 34736–34742.