

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

Karine Lena Meneghetti

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE PELE ALÓGENA: PROPOSTA DE  
NOVOS MÉTODOS DE TRATAMENTO ANTIMICROBIANO PARA SUA  
UTILIZAÇÃO COMO ALOENXERTO**

Porto Alegre

2018



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

Karine Lena Meneghetti

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE PELE ALÓGENA: PROPOSTA DE  
NOVOS MÉTODOS DE TRATAMENTO ANTIMICROBIANO PARA SUA  
UTILIZAÇÃO COMO ALOENXERTO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.  
Gertrudes Corção.

Porto Alegre

2018

### CIP - Catalogação na Publicação

Meneghetti, Karine Lena

CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE PELE ALÓGENA:  
PROPOSTA DE NOVOS MÉTODOS DE TRATAMENTO ANTIMICROBIANO  
PARA SUA UTILIZAÇÃO COMO ALOENXERTO / Karine Lena  
Meneghetti. -- 2018.

169 f.

Orientadora: Gertrudes Corção.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e  
do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Banco de Pele. 2. Aloenxertos. 3. Contaminação  
microbiana. 4. Resistência antimicrobiana. 5.  
Biofilmes. I. Corção, Gertrudes, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

## **AGRADECIMENTOS**

A Dra. Gertrudes Corção, pela oportunidade de realizar o doutorado sob sua orientação e pelos ensinamentos ao longo destes anos que contribuíram para meu crescimento profissional. Foi uma honra tê-la como orientadora e agradeço pela confiança depositada em mim.

A Dra. Mercedes Passos Geimba, por todo auxílio prestado, sempre disposta a colaborar e com palavras de incentivo que muitas vezes foram essenciais para me encorajar nos dias difíceis.

Ao Banco de Pele Dr. Roberto Corrêa Chem da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre pela parceria na realização deste trabalho.

As ex colegas do laboratório 222F (eterno 166) Dra. Letícia Otton pela ajuda a qualquer hora e conhecimentos transmitidos; e a Biomédica Micaela Canabarro que contribuiu com seu desempenho e dedicação, tornando-se meu braço direito desde o início da realização deste trabalho. Além da companhia e auxílio profissional, recebi dessas duas pessoas o carinho diário, força para superar qualquer dificuldade e amizade verdadeira, indispensáveis para manter o equilíbrio físico e emocional dentro da área acadêmica.

As demais colegas que também passaram pelo laboratório, Magda Antunes Chaves, Thaís dos Santos Hain, Belize Leite pela convivência, parceria e risos diários. E também as bolsistas Jéssica Araujo de Souza e Alexandra da Silva Nunes por auxiliarem na realização dos experimentos e ajuda diária.

A Amanda Domingues e Juciana Cazarolli meu agradecimento infinito e reconhecimento pelas pessoas maravilhosas que são, como profissionais e amigas, que não mediram esforços para me ajudar sempre que necessário.

A Dra. Marisa da Costa pelo empréstimo de seu laboratório e sua compreensão em nos apoiar na realização dos experimentos. E aos demais professores do PPGMAA que de alguma forma contribuíram para minha formação.

Aos colegas mestrandos e doutorandos do PPGMAA por todos momentos compartilhados, desde trocas de meios de cultura a trocas de conhecimentos.

A minha amiga Francine Melise dos Santos, por sempre estar ao meu lado, acompanhando de perto e incentivando para que eu concretizasse mais esta etapa de minha vida.

Ao meu amor Luiz Felipe Montanari, por todo carinho e compreensão. Obrigada por fazer parte da minha vida e ter aguentado tantas turbulências e horas de estrada.

Aos meus pais Fátima Lena Meneghetti e João Carlos Meneghetti, por todo incentivo, amor e confiança; as melhores pessoas que eu conheço, verdadeiros exemplos para mim.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa

# CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE PELE ALÓGENA: PROPOSTA DE NOVOS MÉTODOS DE TRATAMENTO ANTIMICROBIANO PARA SUA UTILIZAÇÃO COMO ALOENXERTO<sup>1</sup>

Autor(a): Karine Lena Meneghetti  
Orientador(a): Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Gertrudes Corção

## RESUMO

A disponibilidade de aloenxertos de pele é comprometida devido à contaminação microbiana que persiste às práticas de descontaminação e aos tratamentos antimicrobianos mais comumente utilizados pelos bancos de pele. Com o objetivo de obter melhor compreensão sobre os contaminantes bacterianos e fúngicos de aloenxertos de pele e a padronização de um tratamento antimicrobiano mais eficaz, o presente estudo avaliou 32 amostras de peles alógenas humanas disponibilizadas pelo Banco de Pele Dr. Roberto Corrêa Chem da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, que já haviam sido descartadas devido contaminação microbiana. Após isolamento, a identificação por espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser - tempo de vôo (MALDI-TOF) revelou que os principais contaminantes foram bactérias Gram-positivas incluindo os gêneros *Bacillus*, *Staphylococcus* e *Paenibacillus* sp. A partir dos resultados do perfil de susceptibilidade a seis diferentes classes de antimicrobianos observou-se vários perfis de resistência, incluindo de multirresistência entre os isolados. Surpreendentemente a maioria dos isolados foi susceptível a pelo menos um dos antimicrobianos usados no banco de pele (estreptomicina e/ou penicilina). Todos os isolados foram susceptíveis à amicacina, gentamicina e tetraciclina, que também mostraram melhor potencial inibitório com base nos resultados de concentração inibitória mínima (CIM). Detectou-se através da técnica de cristal violeta que vários isolados eram formadores de diferentes níveis de biofilme. No intuito de ampliar o estudo, alguns desses isolados e isolados de peles não alógenas (incluindo bactérias Gram-negativas) foram avaliadas, no estado planctônico, quanto ao efeito bactericida de seis diferentes coquetéis antimicrobianos, sendo que as combinações de penicilina, gentamicina, ceftazidima e penicilina, gentamicina, ceftazidima, tetraciclina apresentaram os melhores resultados. Contudo, através da análise por microscopia eletrônica de varredura, observou-se que nenhum desses dois coquetéis foi capaz de eliminar por completo a contaminação por bactérias em estado de biofilme sobre peles alógenas. Através da análise por agrupamento foi identificada a espécie de isolados de *Bacillus* que não haviam sido identificados por MALDI-TOF, além de terem sido encontrados grupos de *Bacillus* sp. que se distribuíram de acordo com as a origem, sugerindo populações distintas em peles alógenas e não alógenas. Foram isolados os fungos filamentosos *Paecilomyces* sp., *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp, com CIMs a anfotericina B que variaram de 0,0625 a 4 µg/mL, sendo que 68.4% dos isolados fúngicos apresentaram valores de CIM >1 µg/mL. Diversos fatores não relacionados a expressão de resistência a antimicrobianos podem estar contribuindo para a persistência da contaminação bacteriana. Contudo, a observação de isolados multirresistentes evidencia a necessidade de um monitoramento da resistência dentro dos bancos de tecidos.

<sup>1</sup>Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (169 p.) Agosto, 2018.

**MICROBIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF ALLOGENOUS SKIN:  
PROPOSAL OF NEW METHODS OF ANTIMICROBIAL TREATMENT FOR ITS  
USE AS ALLOGRAFT<sup>1</sup>**

Autor(a): Karine Lena Meneghetti  
Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gertrudes Corção

**ABSTRACT**

The availability of skin allografts is compromised due to the microbial contamination that persists to the decontamination practices and the antimicrobial treatments most commonly used by skin banks. In order to obtain a better understanding of the bacterial and fungal contaminants of skin allografts and the standardization of a more effective antimicrobial treatment, the present study evaluated 32 samples of human allogeneous skins available by the skin bank of Dr. Roberto Corrêa Chem from the Hospital Complex Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, which had already been discarded due to microbial contamination. After isolation, identification by matrix assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF) revealed that the main contaminants were Gram-positive bacteria including the genera of *Bacillus*, *Staphylococcus* and *Paenibacillus* sp. From the results of the susceptibility profile to six different classes of antimicrobials, several resistance profiles were observed, including multiresistance among the isolates. Surprisingly, most of the isolates were susceptible to at least one of the antimicrobials used in the skin bank (streptomycin and/or penicillin). All isolates were susceptible to amikacin, gentamicin and tetracycline, which also showed a better inhibitory potential based on the results of minimal inhibitory concentration (MIC). It was detected by the crystal violet technique that several isolates formed different levels of biofilm. In order to expand the study, some of these isolates and isolates of non-allogeneic skins (including Gram-negative bacteria) were evaluated in the planktonic state for the bactericidal effect of six different antimicrobial cocktails. The combinations of penicillin, gentamycin, ceftazidime and penicillin, gentamicin, ceftazidime, tetracycline presented the best results. However, by scanning electron microscopy, it was observed that none of these two cocktails was able to completely eliminate the contamination by bacteria in biofilm on allogeneous skin. Through group analysis it was identified the species of some *Bacillus* isolates that had not been identified by MALDI-TOF, moreover, it was observed *Bacillus* sp. groups which were distributed according to their origin, suggesting distinct populations in allogeneic and non-allogeneic skin. Were isolated the filamentous fungi *Paecilomyces* sp., *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp, with MICs to amphotericin B ranging from 0.0625 to 4 µg/mL, and 68.4% of the fungal isolates showed MIC values >1 µg / mL. Several factors not related to antimicrobial resistance expression may be contributing to the persistence of bacterial contamination. However, the observation of multiresistant isolates highlights the need for resistance monitoring in tissue banks.

<sup>1</sup>Doctoral Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (169 p.) August, 2018.

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	2
2.1	Objetivo Geral.....	3
2.2	Objetivos Específicos .....	3
2.2.1	Objetivo Específico 1 .....	3
2.2.2	Objetivo Específico 2 .....	3
2.2.3	Objetivo Específico 3 .....	3
2.2.4	Objetivo Específico 4 .....	3
2.2.5	Objetivo Específico 5 .....	3
<b>3.</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	4
3.1	Aloenxertos de pele e bancos de pele.....	4
3.2	Banco de Tecidos Dr. Roberto Corrêa Chem – dados e funcionamento.....	9
3.3	Demandas e descartes dos bancos de pele no Brasil .....	13
3.4	Contaminação microbiana de peles alógenas.....	14
3.5	Antissepsia, tratamento antimicrobiano de peles alógenas e persistência de contaminação.....	17
3.6	Biofilmes bacterianos e peles alógenas.....	23
3.7	Análise da relação entre os isolados bacterianos tendo como ferramenta MALDI-TOF MS.....	26
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	29
4.1	Aspectos éticos.....	29
4.2	Amostras de peles alógenas.....	29
4.3	Cultura, isolamento e identificação bacteriana e fúngica.....	30
4.4	Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	31
4.5	Análise de formação de biofilme.....	32
4.6	Avaliação dos coquetéis antimicrobianos.....	34
4.7	Formação de biofilme sobre as peles alógenas e tratamento com coquetéis antimicrobianos.....	35
4.8	Avaliação da diversidade das espécies e a similaridade dos isolados de <i>Bacillus</i> sp. obtidos de amostras de peles alógenas e não alógenas.....	36
<b>5.</b>	<b>ARTIGOS</b> .....	38

5.1	Artigo 1 - Bacterial contamination of human skin allografts and antimicrobial resistance: a skin bank problem .....	38
5.2	Artito 2 - Ação inibitória de coquetéis antimicrobianos sobre bactérias isoladas de peles alógenas e não alógenas.....	72
5.3	Artigo 3 - Ação de combinações de antibióticos sobre biofilme bacteriano em peles alógenas.....	90
5.4	Artigo 4 - Fungal contamination of human skin allografts.....	105
5.5	Capítulo 5 - Dados não apresentados na forma de artigo .....	114
5.5.1	<i>Bacillus sp.</i> de amostras de pele alógena e não alógena: diversidade de espécies e similaridade entre isolados.....	114
6.	<b>DISCUSSÃO GERAL</b> .....	138
7.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	144
8.	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	146

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Coquetéis antimicrobianos avaliados.....	Página 34
--	--------------

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Formas de utilização de aloenxerto cutâneo.....	5
Figura 2. Lâmina de pele humana expandida .....	6
Figura 3. Coxa esquerda de um doador após a retirada da pele .....	10
Figura 4. Gráfico da evolução de produção e fornecimento de pele para transplante no Brasil.....	14

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AATB	Associação Americana de Bancos de Tecidos
ABTO	Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos
AMI	Amicacina
AZM	Azitromicina
aw	Atividade de água
BHI	Caldo infusão cérebro coração
CAZ	Ceftazidima
CFO	Cefoxitina
CIM	Concentração inibitória mínima
CIP	Ciprofloxacina
CMM	Centro de Microscopia e Microanálise
CNS	Estafilococos coagulase-negativos
ECV	Valores de corte epidemiológicos
EPS	Substâncias poliméricas extracelulares
EST	Streptomina
GEN	Gentamicina
HBV	Vírus da hepatite B
HCV	Vírus da hepatite C
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HTLV	Vírus T-linfotrófico humano
MALDI-TOF	Espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser - tempo de voo
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MHA	Ágar Mueller Hinton
MS	Espectro de massa
MSP	Projeção média de espectros
OD	Densidade óptica
ODc	Densidade óptica ponto de corte
PDA	Ágar dextrose batata
PEN	Penicilina
PMF	Impressão de massa peptídica

RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SDA	Ágar dextrose sabouraud
SDB	Caldo dextrose sabouraud
SNT	Sistema Nacional de Transplantes
SUS	Sistema Único de Saúde
TET	Tetraciclina
TGB	Caldo tioglicolato
TOF	Analisadores de tempo de vôo
TSA	Ágar de triptona de soja
TSB	Caldo de soja triptona
UFC	Unidade formadora de colônia
UTI	Unidade de terapia intensiva
VAN	Vancomicina

## 1. INTRODUÇÃO

Aloenxertos de peles humanas, são peles obtidas de doadores falecidos, utilizadas como curativos temporários em pacientes com feridas crônicas ou queimaduras severas, com importantes funções na recuperação dessas lesões. É responsabilidade dos bancos de tecidos realizar a triagem do doador e o processamento da pele, desde o momento da coleta até sua disponibilidade para enxertia, garantindo que o tecido esteja livre de qualquer fonte de infecção viral e microbiana para o receptor, que geralmente encontra-se com o sistema imunológico debilitado devido à gravidade de suas lesões.

A pele humana saudável é colonizada por uma população mista comensal de microrganismos, que vivem sobre o tecido cutâneo, pêlos e folículos sebáceos, sendo a maioria não patogênica. Além disso, populações transitórias, como bactérias contaminantes, podem naturalmente estar presentes ou serem resultado de contaminação durante o processo de captação do tecido do doador. Diversos são os fatores que contribuem para a contaminação da pele alógena. Portanto, vários cuidados devem ser realizados pelos operadores de bancos de tecidos para minimizar o risco de transmissão de doenças infecciosas, como seleção cuidadosa de doadores, processamento adequado e descontaminação eficiente do tecido antes de ser liberado para a enxertia.

Contudo, mesmo sendo aplicados protocolos de descontaminação sobre aloenxertos de pele, a contaminação microbiana persiste e é o fator responsável pelas altas taxas de descartes em bancos de tecidos em todo o mundo. As contaminações bacterianas seguidas de fúngicas, representam os principais problemas. As práticas e diretrizes adotadas pelos bancos de tecidos são extremamente variáveis, como: a classificação de quais microrganismos devem ser aceitos na triagem pré-tratamento (que é a fase que libera o tecido para as etapas seguintes de processamento); quais métodos de desinfecção melhor reduzem a contaminação; e que combinações de antimicrobianos e concentrações devem ser utilizadas na esterilização dos tecidos.

Dessa forma, não existe um método completamente padrão que seja comum a todos os bancos de tecidos, sendo cada um responsável pela padronização de algumas etapas do processamento e posterior comprovação de segurança e eficiência. Estudos sobre quais microrganismos são os principais contaminantes, sua

relação epidemiológica, susceptibilidade a antimicrobianos e características de sua disposição sobre o tecido cutâneo, são essenciais para a otimização das metodologias já aplicadas.

Em 2005, foi inaugurado o Banco de pele Dr. Roberto Corrêa Chem da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, e desde então vem exercendo papel fundamental e de referência na disponibilização de enxertos de pele, sendo que por muito tempo foi o único banco de pele em funcionamento no país. Assim como os bancos de tecidos ao redor do mundo, o Banco de Pele de Porto Alegre enfrenta problemas devido à baixa frequência de doações e às taxas de descartes de tecidos por contaminação microbiana. Os protocolos utilizados no processamento da pele alógena, baseiam-se principalmente em diretrizes de bancos de peles internacionais, sendo necessário um estudo local, que reflita suas características e problemas, principalmente àqueles relacionados aos tratamentos de eliminação de microrganismos, de maneira que possam ser posteriormente melhor discutidos e as soluções sejam elaboradas.

Prezando o papel do pesquisador na realização de estudos que contribuam e tenham impacto direto na saúde da comunidade, considerando que muito pouco é descrito na literatura sobre a microbiologia de pele alógena e que a maioria das referências encontradas são internacionais e não trazem um estudo amplo, justifica-se a realização deste trabalho que teve como objetivo a melhor compreensão sobre os contaminantes bacterianos e fúngicos de peles alógenas disponibilizadas pelo Banco de pele Dr. Roberto Corrêa Chem da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, que já haviam sido descartadas devido contaminação microbiana.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Caracterizar a contaminação microbiológica de peles alógenas, já descartadas pelo Banco de pele Dr. Roberto Corrêa Chem da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, e padronizar um tratamento antimicrobiano mais eficiente, que elimine a contaminação bacteriana, torne as peles alógenas adequadas para enxertia e que contribua para a diminuição das taxas de descartes.

## 2.2 Objetivos Específicos

### 2.2.1 Objetivo específico 1

Caracterizar a contaminação de amostras de peles alógenas através do isolamento e identificação de bactérias e fungos presentes nestes tecidos;

### 2.2.2 Objetivo específico 2

Estabelecer o antimicrobiano e concentração a ser utilizada nos testes de tratamento dos tecidos a partir dos resultados do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados bacterianos e fúngicos pelos métodos de disco difusão em ágar e concentração inibitória mínima;

### 2.2.3 Objetivo específico 3

Testar diferentes combinações de coquetéis antimicrobianos sobre os isolados bacterianos no estado planctônico *in vitro*;

### 2.2.4 Objetivo específico 4

Realizar experimentos com os coquetéis com melhor ação inibitória sobre amostras de peles alógenas contaminadas com os isolados bacterianos formadores de biofilme e avaliar por microscopia eletrônica de varredura a ação dos antimicrobianos sobre a estrutura do biofilme formado;

### 2.2.5 Objetivo específico 5

Avaliar a diversidade das espécies e a similaridade dos isolados de *Bacillus* sp. obtidos de amostras de peles alógenas e não alógenas.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Aloenxertos de pele e bancos de pele

Aloenxertos, também chamados de homoenxertos ou enxertos alógenos, são tecidos ou órgãos que são transplantados de um doador a um receptor da mesma espécie, mas que possuem características genéticas diferentes (Hermans, 2011). Peles alógenas têm sido eficientemente utilizadas no tratamento de diversas lesões cutâneas e feridas crônicas (Kearney, 1998), sendo principalmente indicadas para a cobertura e/ou fechamento de queimaduras extensas severas (Pianigiani et al., 2006; Britton-Byrd et al., 2008). Assim, o uso de pele de doador cadáver é considerado o padrão ouro para o cuidado de pacientes queimados (Obeng et al., 2001).

Define-se queimadura, as lesões ocasionadas por traumas decorrentes de calor, congelamento, eletricidade, substâncias químicas ou irradiação (Carreirão et al., 2005). Em crianças, se a queimadura atingir 10% do corpo, há risco de morte. Em adultos, o risco existe se a área atingida for superior a 15% (Portal Brasil, 2017a).

A pele humana é constituída da epiderme na parte mais superficial e a derme. Abaixo da derme encontra-se a hipoderme ou tecido subcutâneo que fixa a pele às estruturas subjacentes. Há também as estruturas anexas da pele que consistem nas unhas, os folículos pilosos e as glândulas sudoríparas e sebáceas com seus respectivos ductos. Essas características são importantes para a classificação das queimaduras que estão relacionadas com a profundidade da lesão. O uso de aloenxerto de pele é indicado para queimaduras de segundo e terceiro grau, não sendo indicado para queimaduras de primeiro grau por se tratar de uma lesão superficial, na epiderme, na qual não ocorrem alterações hidroeletrólíticas ou clínicas importantes (Clotilde et al., 2015).

As queimaduras de segundo grau, atingem a epiderme e parcialmente ou totalmente a derme. São muito dolorosas e também podem se aprofundar com trocas equivocadas de curativos aderidos à derme em estado de regeneração. Com a quebra da integridade da derme, o indivíduo fica muito vulnerável ao simples toque, calor e frio, e pode haver colonização e infecção por microrganismos (Khoo et al., 2010; Leon-Villapalos et al., 2010).

As queimaduras de segundo grau apresentam reepitelização a partir das células das estruturas anexas (glândulas sebáceas e sudoríparas e, principalmente,

folículo piloso) com resolução da lesão em um período de 15 a 20 dias após o trauma (Carreirão et al., 2005). Porém, pode haver uma estase no fluxo normal capilar no leito da queimadura nas primeiras 48 horas, o que pode resultar na sua secagem e consequente aprofundamento da queimadura para camadas mais internas. Isso pode ser prevenido com a colocação de enxerto de pele alógena sobre a pele queimada (Figura 1-A) nas primeiras 6 horas após a queimadura (Clotilde et al., 2015).

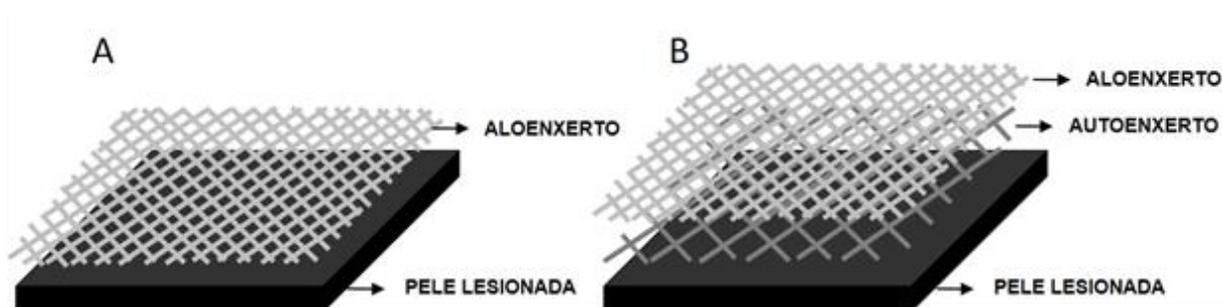


Figura 1. Formas de utilização de aloenxerto cutâneo. A: Sobreposição do aloenxerto diretamente sobre a pele lesionada para promover sua reepitelização e também para prepará-la para posterior recebimento de autoenxerto quando necessário. B: Sobreposição do aloenxerto sobre o autoenxerto expandido, fornecendo cobertura para as áreas expostas para o melhor fechamento da ferida. (Autoria própria)

Nas lesões de terceiro grau, ocorre necrose da epiderme e da derme, com destruição de todas as estruturas anexas. A hipoderme pode ser atingida em níveis variados, bem como os tecidos muscular e ósseo. Nesse nível de lesão também há destruição das terminações nervosas, com consequente anestesia nas áreas queimadas. A resolução dessas queimaduras é muito mais demorada e quase sempre necessita de desbridamento (retirada do tecido necrótico), enxerto de pele ou até mesmo amputação (Carreirão et al., 2005). Após o tecido necrótico ser removido cirurgicamente, a ferida pode ser coberta com enxerto autólogo (ou autoenxerto, que é o transplante de tecido do indivíduo para si mesmo), mas isso irá depender da superfície doadora disponível e as condições clínicas do paciente (Clotilde et al., 2015).

Nessas situações de queimaduras de terceiro grau mais graves, os aloenxertos de pele podem ser utilizados de diferentes formas: podem preparar o leito da ferida para um posterior autoenxerto definitivo (Figura 1-A), inclusive sobre áreas avasculares, como defeitos sobre ossos e cartilagem, nos quais a pele alógena

aumenta a formação de tecido de granulação e conseqüentemente a possibilidade da integração do enxerto autólogo (Lofêgo Filho et al., 2006). Também nos casos em que as lesões são demasiadamente extensas e as lâminas de tecidos autólogos precisam ser expandidas numa razão de 1:4 ou mais, ficando com aspecto de uma rede deixando áreas expostas no leito da ferida, passíveis de infecções e desidratação (Figura 2). O aloenxerto é então usado para cobrir o enxerto autólogo, fornecendo cobertura flexível temporária para as áreas expostas. O curativo temporário começa a ser rejeitado por pontos, os quais são utilizados pela “rede” formada pelo enxerto autólogo para promover sua reepitelização (Figura 1-B). O fechamento total do ferimento ocorre em quatro a cinco semanas (Clotilde et al., 2015).

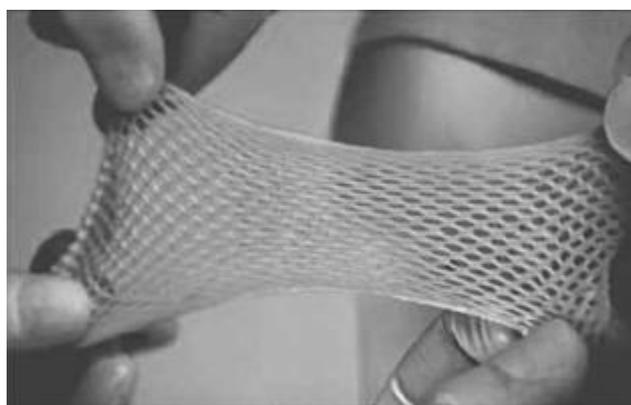


Figura 2. Lâmina de pele humana expandida (Clotilde et al., 2015).

Desta forma, a colocação da pele alógena sobre a queimadura de segundo ou terceiro grau promove a oclusão da ferida, deixando o ambiente úmido, o que acelera a sua granulação, neovascularização e cicatrização (Lofêgo Filho et al., 2006). Age como uma barreira mecânica e biológica, reduzindo a perda de água, proteínas, eletrólitos e de calor através da ferida e conseqüentemente diminuindo o risco de infecção, a dor e a frequência das trocas de curativos (Britton-Byrd et al., 2008). O uso de pele alógena têm a característica de apresentar rápida aderência e menor potencial de antigenicidade, além de ser economicamente mais viável em comparação com outros tipos de coberturas biológicas temporárias, como xenoenxerto porcino, membrana amniótica e outros produtos cultiváveis (Obeng et al., 2001).

Contudo, o transplante de pele não foi adotado clinicamente para fechar feridas até o ano de 1869 quando Reverdin introduziu “*split-thickness skin graft*”,

enxertos de pele de espessura fina (Reverdin, 1869), contendo epiderme e cerca de 1/4 de espessura de derme (Clotilde et al., 2015). Em 1881, John H. Girdner foi o primeiro a descrever o uso do aloenxerto de pele cadavérica, quando coletou a pele da coxa interna de um jovem menino alemão falecido, dividiu em pedaços e enxertou em um menino de 10 anos que havia perdido tecido do braço esquerdo e região da escápula por ter sido atingido por um raio (Girdner, 1881).

A conservação de pele humana foi descrita no início do século XX por Wentscher, que relatou a enxertia de pele refrigerada por até 14 dias, mas em 1944, Webster relatou o sucesso da utilização de enxertos de pele autólogos que estiveram conservados por 3 semanas a 7°C. Porém, os estudos em relação à refrigeração prolongada da pele demonstravam perda gradual de viabilidade celular e degeneração das características biológicas (Webster, 1944).

Em 1949, o transplante de pele se tornou aceito com o estabelecimento do banco de tecidos da Marinha dos Estados Unidos em Bethesda, Maryland, o primeiro banco de pele no mundo (McCauley, 1996). Desde então, o uso de enxertos de pele de espessura fina tornou-se um suporte fundamental no tratamento de grandes queimaduras na área de superfície total do corpo, com o uso rotineiro datado nos anos de 1950 (Brown et al., 1953; Artz et al., 1955; Zaroff et al., 1966).

Lovelock (1953) demonstrou que o glicerol protegia os tecidos contra os efeitos nocivos do congelamento, agindo como um tampão em relação ao aumento da concentração salina no citoplasma. Pigossi (1967) foi quem iniciou estudos sobre o uso de altas concentrações de glicerol (acima de 85%), para a conservação de tecidos com os trabalhos de conservação de dura-máter canina em glicerol a 98%. E finalmente em 1989, Kreis e colaboradores desenvolveram e utilizaram este método para pele humana, trabalho do qual originou um dos maiores bancos de pele do mundo, o Euro Skin Bank, estabelecido na Holanda (Kreis et al., 1989).

A Associação Americana de Bancos de Tecidos (AATB) publicou as primeiras normas para bancos de tecidos em 1984 e manuais técnicos específicos para tecido (incluindo a pele) foram desenvolvidos em 1987. Desde então, as normas foram modificadas e refinadas com base no consenso e pesquisas científicas de suporte (Kagan et al., 2005). Cabe aos bancos de pele a função de captar, preservar e disponibilizar lâminas de pele humana alógena com a finalidade de transplante (Clotilde et al., 2015).

No Brasil, o primeiro banco de pele foi criado em 1956, na Unidade de Queimaduras do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Contudo, a disponibilidade era limitada pois a pele era armazenada por refrigeração por curtos períodos tendo sua qualidade variável. Não havia normatização específica nem recursos disponíveis para expansão desses serviços (Schiozer, 2012).

Somente 41 anos depois, em 1997, que o transplante de órgãos e tecidos humanos foi regulamentado no Brasil por meio da Lei nº 9434, estabelecendo que a retirada de tecidos, órgãos ou partes do corpo humano post-mortem é permitido apenas após diagnóstico de morte encefálica, que deve ser realizado por dois médicos não pertencentes à equipe de remoção e transplante, baseado-se em critérios clínicos e tecnológicos pré-definidos (Schiozer, 2012).

Também em 1997, a Lei nº 2268 estabeleceu que o Sistema Nacional de Transplantes (SNT) gerenciasse em nível nacional a captação e distribuição de órgãos, tecidos e partes do corpo humano para finalidades terapêuticas (exceto sangue, espermatozoides e óvulos). Desde a captação até o transplante, são procedimentos que só podem ser realizados por equipes e instituições médico hospitalares especializadas e cadastradas nas Secretarias de Saúde estaduais e no SNT (Schiozer, 2012).

Em 2000, com a publicação da Portaria 2600 do Ministério da Saúde, foram estabelecidas indicações e obrigatoriedades relacionadas aos transplantes de pele e ao funcionamento dos Bancos de Tecidos e normas para instalações físicas, equipamentos, triagem, retirada, processamento, armazenamento, transporte e disponibilização seguindo padrões técnicos e de qualidade que o procedimento requer. E em 2001, a Lei nº 10211 definiu a doação com consentimento informado, ou seja, com consulta familiar para autorização da doação (Schiozer, 2012).

O novo banco de tecidos do Instituto Central do Hospital das Clínicas de São Paulo foi inaugurado oficialmente em outubro de 2000, com instalações próprias de acordo com as normas do SNT (Schiozer, 2012). Em 2005 foi inaugurado o Banco de Tecidos Dr. Roberto Corrêa Chem da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Em 2011 foi inaugurado o banco de tecidos do Instituto Materno Infantil de Pernambuco, no Recife mas que atualmente encontra-se desativado para reforma; em 2013 foi oficialmente aberto o Banco de pele do Hospital Universitário

Evangélico de Curitiba, no Paraná (Schiozer, 2012; Matoski et al., 2015; Lima Júnior et al., 2017) e em 2017 foi inaugurado o Banco de Pele do Estado do Rio de Janeiro no Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad (Portal Brasil, 2017b).

### 3.2 Banco de Tecidos Dr. Roberto Corrêa Chem – dados e funcionamento

No Rio Grande do Sul, em 2005, foi inaugurado o Banco de Tecidos Humanos da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, que em 2010 passou a se chamar Banco de Tecidos Dr. Roberto Corrêa Chem. Recebeu autorização para o funcionamento conforme a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC 220 (2006), é regulamentado pela Portaria 101 (2007), e seu funcionamento dentro da irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre para o transplante de pele alógena segue a Portaria 128 (2006). Foi o primeiro banco de pele a ser criado no Rio Grande do Sul e o segundo no Brasil, sendo que por muito tempo, foi o único em funcionamento efetivo (Silveira et al., 2013).

Desde o início das captações de pele de doador falecido em 2008 até junho de 2016, o banco de pele realizou 270 captações de pele e 214 envios de pele para diversas localidades do Brasil. Liberando 207.502,80 cm<sup>2</sup> de pele dos quais doou 205.136,39 cm<sup>2</sup> para transplante. Além do RS, já enviou pele alógena para 12 estados. Porém o pequeno número de doadores ainda é um problema (Bernhard, 2016).

O Banco de Tecidos Dr. Roberto Corrêa Chem segue as diretrizes da AATB, conferindo padrões internacionais de qualidade aos tecidos disponibilizados (Martins et al., 2012). Quanto à captação do tecido, entre os doadores falecidos, são aceitos os que sofreram morte encefálica (doadores de múltiplos órgãos) e aqueles que sofreram parada cardiorrespiratória, podendo doar apenas tecidos. A doação ocorre apenas com o consentimento familiar (Clotilde et al., 2015).

A captação de lâminas de espessura parcial fina (5 x 20 cm) é feita em centro cirúrgico sob condições assépticas por equipe constituída por um médico-cirurgião plástico e um biomédico ou biólogo. A retirada da pele é realizada com um dermatomo elétrico ou faca de Blair. As zonas de coletas são tronco, coxas e para doadores do sexo masculino também as pernas. As coletas de cada doador são divididas em dois lotes sendo que as lâminas de tecido coletadas da parte anterior do corpo constituem o lote 1 e a parte posterior consiste no lote 2. A partir desse

momento, todas etapas do processamento são realizadas individualmente para cada lote. Esse procedimento é realizado para evitar contaminações cruzadas, assim a contaminação de uma parte (lote) não significa a contaminação de outra, evitando que todo o tecido de um doador seja descartado (Clotilde 2015, dados dos manuais banco de pele).

No momento da retirada da pele, já não há mais circulação sanguínea no doador, mesmo quando se trata de doadores com morte encefálica, uma vez que a retirada dos tecidos (pele e córneas) é realizada depois da retirada dos outros órgãos. Com isso, praticamente não há sangramento da região doadora como pode ser observado na Figura 3 (Clotilde et al., 2015).

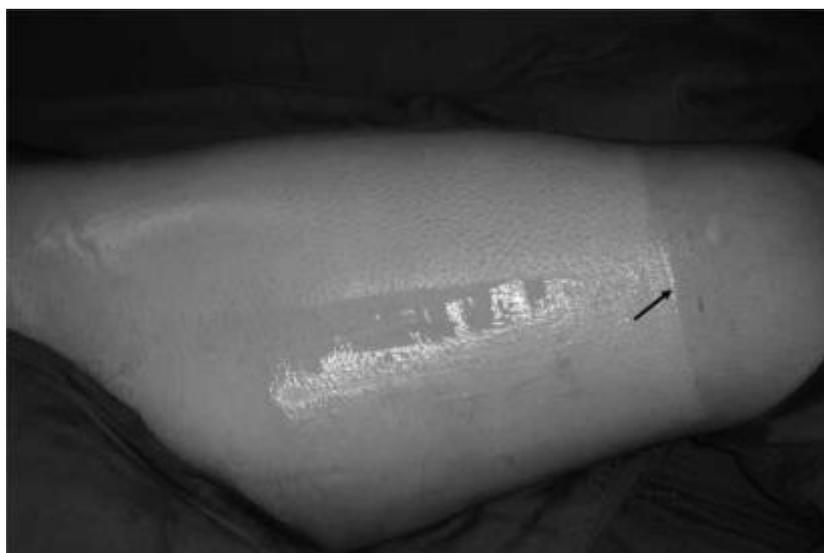


Figura 3. Coxa esquerda de um doador após a retirada da pele. A seta indica a transição entre a parte da coxa em que a pele já foi retirada (à esquerda) e a coxa com pele intacta (à direita) (Clotilde et al., 2015).

Para evitar infecções provenientes do enxerto alógeno no paciente transplantado, são realizadas análises sorológicas no doador para detecção de HIV (vírus da imunodeficiência humana), HTLV (vírus T-linfotrófico humano) I e II, HCV (vírus da hepatite C), HBV (vírus da hepatite B), citomegalovírus (IgM e IgG), sífilis, doença de Chagas e toxoplasmose (IgM e IgG). Antes da coleta do tecido, são realizadas técnicas assépticas com clorexidina degermante e alcoólica sobre o mesmo. Uma amostragem do tecido é encaminhado para testes microbiológicos antes e após qualquer processamento para pesquisa de patógenos aeróbios, anaeróbios e

fungos. Somente após os resultados microbiológicos e sorológicos negativos, os tecidos são liberados para a preservação (Clotilde et al., 2015; Passos, 2011).

A presença de microrganismos considerados patogênicos e muito virulentos ocasiona o descarte do tecido, pois estes microrganismos têm em suas estruturas celulares ou substâncias, produtos que podem atuar como atributos de virulência como, por exemplo, exotoxinas produzidas tanto por bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas, e que podem ser liberadas nos locais que esses microrganismos são encontrados (Vicentino et al., 2009).

Em relação aos microrganismos saprófitos, apesar de não terem sua virulência esclarecida, a possibilidade de se tornarem agentes infecciosos depende da utilização clínica da pele e do estado imunológico do receptor. Estes critérios interpretativos levaram à criação de uma lista de microrganismos aceitáveis e não aceitáveis na triagem inicial de processamento de pele utilizada para enxerto. Se nesta fase são encontrados apenas microrganismos considerados aceitáveis, então a pele segue sendo processada, recebe tratamento antimicrobiano até estar livre de microrganismos e poder ser liberada para enxertia. Do contrário, se são encontrados microrganismos considerados não aceitáveis, a pele é imediatamente descartada. Os microrganismos descritos como aceitáveis são: *Staphylococcus* coagulase-negativa, *Propionibacterium* sp., *Micrococcus* sp., *Corynebacterium* sp., *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* alfa hemolítico, cocos Gram-positivos anaeróbios e *Bacillus* sp. (não *B. anthracis*); e os microrganismos não aceitáveis são: bacilos Gram-negativos aeróbios ou anaeróbios, cocos Gram-negativos, *Clostridium* sp., *B. anthracis* (Vicentino et al., 2009) e também *Streptococcus pyogenes* (beta hemolítico); *Staphylococcus aureus*; *Enterococcus* sp. e fungos filamentosos ou leveduras (Passos, 2011).

O tratamento de esterilização utilizado no Banco de Tecidos Dr. Roberto Corrêa Chem, quando isolados microrganismos aceitáveis, é com o uso de antimicrobianos, no qual os tecidos são submetidos a um primeiro ciclo de tratamento com penicilina (1000 U/mL) e estreptomicina (200 mg/mL). Se observado crescimento microbiano após o primeiro ciclo, é realizado um segundo ciclo de tratamento com vancomicina (50 mg/mL). Em ambos os ciclos, o tratamento é realizado com imersão das lâminas de pele em solução fisiológica estéril contendo os antimicrobianos por um período de 3 horas a 37°C, na forma estática (dados dos manuais do banco de pele).

Quanto à preservação das peles alógenas, o método utilizado é a

glicerolização, que consiste em imobilizar a água intracelular com o aumento da concentração de glicerol de 50 até 85% com manutenção da pele em baixas temperaturas (Kreis et al., 1989). Ao desidratar o tecido, esse método minimiza as reações de degradação do tecido, como a digestão enzimática, a peroxidação lipídica e as alterações hidrolíticas dentro da pele, o que possibilita o seu armazenamento a longo prazo (Van Baare et al., 1998; Kearney, 2005). A pele conservada em altas concentrações de glicerol torna-se inviável, ou seja, ela perde a capacidade fornecer sinais organizacionais ou fatores de crescimento, porém a estrutura anatômica é mantida intacta (Richters et al., 1996). Outra vantagem, é que a glicerolização atenua a antigenicidade do aloenxerto, o que resulta em sua rejeição mais tardia (Hettich et al. 1994; Richters et al. 1997). Em glicerol a 85%, a pele pode ser estocada de 4 a 8°C por até dois anos (Pianigiani et al., 2005). Antes de seu uso clínico, o glicerol, que é tóxico para as células vivas do receptor, é removido através de lavagens repetidas com solução fisiológica, reidratando e permitindo assim a recuperação da pliability da pele (Huang et al., 2004).

Uma vez comprovada a esterilidade do tecido ele torna-se disponível para enxertia. Conforme a extensão das feridas ou queimaduras, o peso e altura do receptor, é que é definida a quantidade de pele a ser transplantada. Da mesma forma que ocorre a enxertia autóloga, a pele alógena passa por uma fase de integração onde há a aderência por meio de coágulos de fibrina, seguida por uma fase vascular em que ocorre inosculação (união dos vasos sanguíneos) a partir de vasos do leito do receptor (Carreirão et al., 2005). Ocorre neovascularização e ao mesmo tempo as células de defesa do receptor entram em contato com as células do enxerto, que passam a ser reconhecidas como não próprias (Richters et al., 2005). Dessa forma, inicia-se um processo de rejeição na qual ocorre a morte do enxerto e seu desprendimento cerca de 21 dias após a enxertia (Clotilde et al., 2015).

De forma comprovada o uso de aloenxerto é bastante eficiente na recuperação de queimados e conforme descrito por Mátioski et al. (2015) a pele de um único doador pode beneficiar até cinco pacientes, demonstrando o quanto é importante o papel dos bancos de pele para o fornecimento desses tecidos de forma segura. Contudo, o Brasil possui pequeno número de bancos de pele. Além disso, os bancos existentes recebem poucos doadores diante da demanda e enfrentam problemas de descartes de peles devido contaminação microbiana (Martins et al.,

2012; Clotilde et al., 2015).

### 3.3 Demandas e descartes dos bancos de pele no Brasil

Segundo o Ministério da Saúde, cerca de um milhão de pessoas sofrem queimaduras no Brasil a cada ano. As principais vítimas são crianças e pessoas de baixa renda. Entre 2013 e 2014, o Sistema Único de Saúde (SUS), registrou mais de 15 mil casos de internações por queimadura em crianças com idade entre 0 e 10 anos (Portal Brasil, 2018). Os principais fatores de riscos para estes acidentes são manejo de álcool, fogos de artifícios, fogueiras, balões, fatores socioeconômicos desfavoráveis e a violência (Castro et al., 2013).

No documento de Avaliação dos Dados de Produção dos Bancos de Tecidos do ano de 2016, publicado pela Anvisa em 2017 (última versão completa), estão os dados fornecidos pelos bancos de pele de Porto Alegre, Curitiba e São Paulo. Em 2016 o número de doadores efetivos (que tiveram a pele coletada) foi de 83. Quanto a quantidade de pele obtida e a quantidade de pele desqualificada observou-se um descarte de 7% na triagem inicial laboratorial por resultados reagentes para HCV, Toxoplasmose e Citomegalovírus. Em relação as fases de processamento, no banco de pele de São Paulo, dos 6.659,3 cm<sup>2</sup> de pele coletados, 4.564,5 cm<sup>2</sup> foram descartados na fase de pré processamento e 4.660,8 cm<sup>2</sup> no pós processamento; o banco de pele de Curitiba, dos 36 lotes de tecido coletados, 12 foram descartados na fase de pré processamento; e no banco de pele de Porto Alegre dos 88 lotes coletados foram descartados 11 e 13 nas fases de pré e pós processamento, respectivamente. Contudo, o relatório não expõe os fatores que determinaram esses descartes nessas fases. Foi produzido um total de 83.966 cm<sup>2</sup> de pele. Pode-se observar na Figura 5, que a produção e o fornecimento de pele para transplante está aumentando ao longo dos últimos anos (ANVISA, 2017).

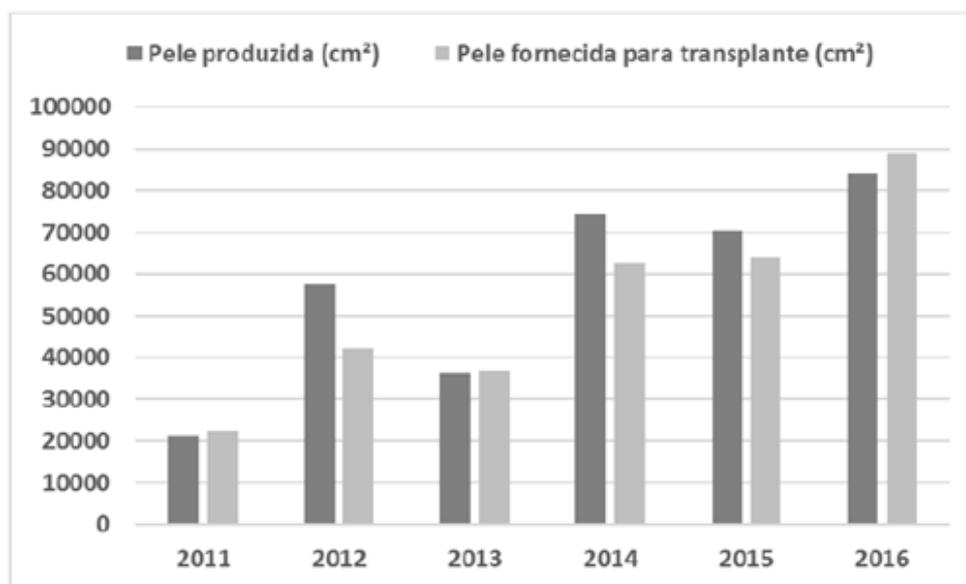


Figura 5. Gráfico da evolução de produção e fornecimento de pele para transplante no Brasil (ANVISA, 2017).

Segundo dados do Registro Brasileiro de Transplantes, fornecidos pela Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos, em 2016 foram realizados 49 enxertias de pele no Brasil. Apesar de parecer um número baixo, até então o maior número havia sido em 2012, de 30 transplantes de pele. Ou seja, é um procedimento que está se aprimorando ao longo dos últimos anos, com aumento do número de bancos de pele atendendo um maior número de casos (ABTO, 2017).

Apesar de os relatórios brasileiros não fornecerem dados completos quanto aos motivos de descartes de peles alógenas, conforme artigos publicados pelos bancos de pele do Brasil, observa-se que as principais razões de descartes são devido contaminação microbiana (Martins et al., 2012; Mátioski et al., 2015). Destacando dados publicados pelo Banco de Tecidos Dr. Roberto Corrêa Chem, de 2009 a 2012, dos 184 lotes obtidos, 57 (31%) foram descartados, tendo como principal motivo a contaminação por bactérias (Martins et al., 2012).

### 3.4 Contaminação microbiana de peles alógenas

A maior preocupação a respeito do uso de pele alógena é o risco de transmissão de doenças por potenciais patógenos (Kearney, 1998; Pianigiani et al.,

2006), visto que os receptores de transplantes de pele, geralmente são mais susceptíveis a infecções devido à depressão imunológica, como no caso de pacientes com queimaduras graves (Pianigiani et al., 2006). Conforme descrito por Monafo et al. (1976), uma menina de 5 anos que recebeu aloenxertos de pele de doador cadáver preservados em glicerol, para a cobertura de uma queimadura profunda, apresentou aumento da temperatura corporal (39,4°C) duas horas após o transplante. No 55º dia ela foi a óbito por uma infecção causada pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, isolada da ferida e do aloenxerto da pele (Monafo et al., 1976).

Em um estudo realizado no período de 2001 a 2004 no Estados Unidos, foram pesquisados diversos casos de infecções que poderiam estar associados a transplantes de diferentes tipos de tecidos. Entre os casos estudados, 83 estavam associados à contaminação do tecido transplantado sendo que 11 evoluíram para morte. Em 78% dos casos, a infecção foi causada por bactérias e muitas vezes associada a fungos. A maioria (90%) das bactérias era aeróbia e Gram-positiva (63%), sendo que 79% foram identificadas como pertencentes aos gêneros *Staphylococcus* ou *Enterococcus*. Dentre os tecidos identificados, 4% correspondiam ao tecido cutâneo (Wang et al., 2007).

A contaminação por bactérias, seguida por fungos, são as principais causas de descartes de aloenxertos (Pianigiani et al., 2006; Lindford et al., 2010; Pirnay et al., 2012; Matisoski et al., 2015; Gaucher et al., 2016). Entre as principais bactérias descritas na literatura isoladas de peles alógenas estão os *Staphylococcus* coagulase-negativos, os bacilos Gram-positivos (principalmente do gênero *Bacillus*), os *Staphylococcus* coagulase-positivos e *Enterococcus* sp. (Matisoski et al., 2015; Lindford et al., 2010). Também são descritas bactérias Gram-negativas em menor frequência, entre elas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* sp., *Acinetobacter baumannii* e *Enterobacter cloacae* (Pianigiani et al., 2006; Lindford et al., 2010; Pirnay et al., 2012; Gaucher et al., 2016). Em relação aos fungos, espécies de *Candida* são mais predominantemente isoladas de peles alógenas, mas também são descritos fungos filamentosos sendo os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* os mais comumente isolados (Pianigiani et al., 2010; Lindford et al., 2010; Gaucher et al., 2016).

A contaminação da pele alógena por microrganismos deve-se a diversos fatores e alguns trabalhos têm avaliado àqueles associados ao momento da coleta da

pele. May et al. (1985), focaram-se em oito parâmetros nos quais incluíam idade, sexo, causa da morte, tempo transcorrido pós-morte antes da coleta, tempo de refrigeração antes da criopreservação (método de estocagem em glicerol a temperaturas de congelamento) e área do corpo do doador da qual foi coletada a pele. Em uma avaliação prospectiva de 300 doadores cadáveres por 5 anos, concluíram que o parâmetro que mais se correlacionou com aumento da taxa de contaminação foi a competência do cirurgião e da equipe profissional de coleta. Mathur et al. (2009), também ressaltaram em seu estudo que os membros da equipe de coleta não eram constantes, o que pode ter levado à inconsistência na prática de desinfecção e no protocolo de coleta da pele.

Gaucher et al. (2016) não observaram relação estatisticamente significativa entre o descarte de peles alógenas devido à contaminação microbiana com os fatores sexo, idade ou causa da morte. O que se destacou foi o tempo de permanência em unidade de terapia intensiva (UTI), que foi significativamente maior nos doadores contaminados do que nos não contaminados (média de 4.4 e 2.3 dias, respectivamente). Da mesma forma Mathur et al. (2009) também atribuíram as taxas de descarte por contaminação microbiana devido à permanência prolongada dos doadores no hospital. Sabe-se que o ambiente hospitalar possui características microbianas próprias, tanto em relação à composição quanto à susceptibilidade a antimicrobianos, inclusive em salas de cirurgia (Silva et al., 2002), e esses microrganismos podem vir a colonizar a pele de pacientes que permanecem por período prolongado hospitalizados (Kearney, 1998; Mathur et al., 2009).

O tempo entre a morte do doador e a coleta do tecido também pode contribuir para a contaminação (Mathur et al., 2009). Quando se trata de um doador de multiórgãos, a ordem da coleta se inicia geralmente pela retirada de órgãos, depois tecidos moles, e então a pele, antes apenas da retirada de ossos (Gaucher et al., 2016). Esse tempo pode variar muito, dependendo dos órgãos a serem doados, e pode chegar até a cinco horas envolvendo excessiva manipulação do corpo do doador (Passos, 2011). A remoção tardia pode resultar em um aumento de patógenos bacterianos anaeróbios e esporos que são mais resistentes aos procedimentos de desinfecção e esterilização. Além disso, em muitos casos uma autopsia cirúrgica é realizada no doador antes da remoção dos tecidos, o que também pode contribuir para a contaminação bacteriana devido a intensa manipulação do cadáver (Eastlund,

2006).

A microbiota normal do doador é outro aspecto importante. Sabe-se que a pele humana é colonizada por uma comunidade diversificada de microrganismos constituídos por bactérias, fungos, vírus e parasitas. Quanto às bactérias e fungos da microbiota cutânea, pesquisas demonstram que bloqueiam a colonização ou invasão por organismos oportunistas e patogênicos (Hannigan e Grice, 2013). Também exercem importantes funções relacionadas à regulação de respostas imunes inatas e adaptativas na pele (Stephen et al., 2010; Belkaid e Segre, 2014).

Em adultos, a pele apresenta níveis estimados de até 2 milhões de bactérias por centímetro quadrado (Percival et al., 2012). Os filos bacterianos mais abundantemente encontrados no tecido cutâneo saudável são Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria e Bacteroidetes. Entre os fungos, os principais componentes são leveduras do gênero *Malassezia* (Delwart, 2007). Essa diversidade de espécies microbianas, cultiváveis e não cultiváveis, varia entre os indivíduos (Cosseau et al., 2016), influenciada por vários fatores como etnia, idade, estilo de vida e/ou geografia (Blaser et al., 2013). O uso de produtos de higiene pessoal, roupas e alimentos consumidos, podem modificar a composição química da pele e conseqüentemente a distribuição dos microrganismos no tecido (Stingley et al., 2010; Grice e Segre, 2011).

Sendo assim, em contraste com alguns outros tipos de tecidos como ossos, tendões e válvulas cardíacas, a pele é inerentemente colonizada por microrganismos associados à ela, portanto, não é estéril no momento da coleta (Kearney, 2005). Apesar dos rigorosos padrões estabelecidos na aquisição de pele cadavérica, os descartes por contaminação microbiana ainda ocorrem (Pirnay et al., 2012). E mesmo sendo aplicados protocolos de tratamentos com antimicrobianos nos tecidos após a coleta, bancos de pele de vários países relatam a persistência de contaminação microbiana (Pianigiani et al., 2006; Lindford et al., 2010; Pirnay et al., 2012; Matisoski et al., 2015; Gaucher et al., 2016).

### 3.5 Antissepsia, tratamento antimicrobiano de peles alógenas e persistência de contaminação

Aloenxertos de pele devem ser tratados com métodos de desinfecção e esterilização para prevenir a transmissão de patógenos do doador para o receptor

(Singh et al., 2006). Como já citado, é função dos bancos de pele fazer todo o processamento e análises microbiológicas da pele para disponibilizá-la de forma segura (Pianigiani et al., 2010).

As normas e regulamentações relativas à liberação de tecidos contaminados não são universais entre os bancos de tecidos em todo o mundo. As organizações reguladoras, como a AATB, definiram que os aloenxertos contaminados com agentes patogênicos não devem ser liberados para enxertia. No entanto, a classificação dos agentes patogênicos pode diferir entre os países (Germain et al., 2016). O que se destaca, é que em alguns bancos de pele a presença de fungos na análise de pré-descontaminação é um critério de exclusão para o tecido, mesmo aqueles considerados parte normal da microbiota da pele (Lindford et al., 2010; Matoski et al., 2015; Gaucher et al., 2016; Serafini et al., 2016). Enquanto que, outros bancos de pele aceitam a presença de alguns fungos na triagem inicial e tentam eliminar a contaminação pela adição de agentes antifúngicos aos coquetéis antimicrobianos utilizados no tratamento da pele (Mathur et al., 2009; Pianigiani et al., 2010; Pirnay et al., 2012).

Várias práticas são adotadas para minimizar a carga microbiana encontrada na superfície da pele do doador antes da obtenção do enxerto por meio de procedimentos, como isolar o corpo das fontes de contaminação usando lençóis estéreis, reduzindo o tempo entre a morte e a retirada da pele, refrigeração do corpo, bem como descontaminando a superfície da pele com antissépticos (Kearney, 1998).

As técnicas de desinfecção utilizadas antes da coleta do tecido têm como propósito prevenir a proliferação das bactérias que permanecem no tecido após sua coleta (Kearney, 1998). Entre os métodos descritos, observa-se que em Gaucher et al. (2016), são realizadas quatro lavagens sucessivas da pele, três com povidona-iodo (uma com a solução a 4% e outra a 10%) e a última lavagem com etanol 70%. Pianigiani et al. (2010) também fazem uma limpeza da pele com povidona-iodo a 10%, enxaguam com solução salina estéril e seguem com a desinfecção com tintura de clorexidina. Pirnay et al. (2012), lavam a pele com sabão de povidona-iodo a 7,5%, enxaguam com água de torneira e desinfectam com soluções de clorexidina a 0,5% e isopropanol a 70%. No Banco de pele de Porto Alegre, primeiramente é feita a limpeza da pele com clorexidina degermante e em seguida é feita a desinfecção com tintura de clorexidina alcoólica (dados dos manuais do banco de pele). Todavia, infelizmente

os métodos de antissepsia não são capazes de eliminar por completo os microrganismos (Verbeken et al., 2012). O uso de clorexidina, por exemplo, pode reduzir a contaminação superficial de 13 a 5.6%, com diminuição drástica de bactérias Gram-positivas, mas não é cem por cento eficiente (Pianigiani et al., 2010).

Além de exercer função de conservar a pele, o glicerol também tem efeitos antimicrobianos. Em altas concentrações, seu efeito inibidor é explicado pelo fato que a permanência prolongada em uma atividade de água ( $a_w$ ) específica não é suportada pelas bactérias (Poirier et al., 1997). Em ambientes com baixa  $a_w$ , maioria dos organismos não consegue viver normalmente e acaba morrendo ou ficando desidratado e latente. As soluções de glicerol a 85%, utilizadas pela maioria dos bancos de tecidos para o armazenamento das peles, diminuem o teor de água disponível para as células microbianas, ficando em uma  $a_w$  de 0.3 (Mille et al., 2002; Ross e Kearney, 2004). Quando um organismo cresce em um meio com baixa atividade da água, ele só pode obter água do meio ambiente, aumentando a concentração interna de soluto. Este aumento pode ser realizado, por exemplo, acumulando solutos compatíveis, que não são inibitórios para os processos bioquímicos e o glicerol é um desses solutos compatíveis (Madigan et al., 1991).

Além disso, em cada organismo, a quantidade máxima de soluto compatível acumulado é geneticamente dirigida. Isso resulta em diferentes organismos que requerem uma  $a_w$  mínima diferentes para o crescimento (Madigan et al., 1991; Ross e Kearney, 2004). As espécies de *Pseudomonas* (1.00-0.95) e os bacilos Gram-positivas, como as espécies de *Bacillus* (1.00-0.95), precisam de um  $a_w$  maior de crescimento, enquanto que os cocos Gram-positivos, como os *Staphylococcus* sp., precisam de pelo menos 0,87-0,80 (Kearney, 1998). O glicerol penetra nas células bacterianas por difusão facilitada e não pode provocar um efluxo de água da célula (Plug et al., 2000). Como resultado, a pressão osmótica aumenta (glicerol 85% corresponde a 27 MPa) e provoca enfraquecimento da membrana e lise celular dependendo da resistência da parede celular (Saegeman et al., 2008).

Desta forma, bactérias Gram-negativas são mais susceptíveis a altas concentrações de glicerol (Van Baare et al., 1998), pois possuem a camada de peptidoglicano mais fina (10% da parede celular) em comparação com a camada de peptidoglicano Gram-positivas (90% da parede celular). Isso também confirma porque os *Staphylococcus* sp. são relativamente mais resistentes à desidratação

(Reimer e Carroll, 2003). Outros estudos também verificaram que bactérias Gram-negativas, como *P. aeruginosa* e *Proteus mirabilis*, e fungos são mais susceptíveis ao glicerol do que organismos Gram-positivos, como *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* (Dziedzic-Goclawka e Stachowicz, 1997; Van Baare et al., 1998).

Van Baare et al. (1998) demonstraram que bactérias ainda podem ser recuperadas de aloenxertos cutâneos após a preservação em glicerol por vários meses. Principalmente bactérias formadoras de esporos como espécies de *Bacillus* e *Clostridium*, cujos os esporos persistem no glicerol após a eliminação das formas vegetativas.

Existem vários métodos de esterilização de peles alógenas após sua coleta que já vêm sendo aplicados ou que estão em estudo, como o uso de irradiação (Rooney et al. 2008; Kairiyama et al. 2009), uso de agentes químicos como ácido peracético (Lomas et al. 2003) e hipoclorito de sódio (Paolin et al., 2016). Mas a estratégia mais comumente usada nos bancos de tecidos, por questões principalmente econômicas, é a combinação de antibióticos de amplo espectro com agentes antifúngicos (Johnston et al., 2016).

Contudo, a descontaminação de pele é um desafio para os bancos de tecidos, e atualmente há pouco consenso sobre a combinação e concentração de antibióticos a serem utilizados, o que ressalta a necessidade de mais pesquisas sobre este assunto (Pitt et al., 2014; Johnston et al., 2016). Existe uma ampla gama de formulações de antibióticos, temperaturas e tempos de exposição atualmente adotados para esse fim (Germain et al., 2010; De By et al., 2012; Heng et al. 2013).

A combinação de penicilina e estreptomicina é a mais comumente sugerida na literatura e utilizada em bancos de pele (Csonge, 1995; Mathur et al., 2009; Johnston et al., 2016), ainda pode ser feita a combinação com anfotericina B, para o controle de contaminação fúngica (Mathur et al., 2009; Pirnay et al., 2012). É também prática de rotina em alguns bancos de pele ser realizado mais de um ciclo de tratamento, sendo no primeiro aplicados antimicrobianos com espectro menor, e no caso desse falhar, é aplicado um segundo tratamento com antimicrobianos com maior espectro (Pianigiani et al., 2010).

O tempo e temperatura de incubação no tratamento de peles alógenas também são fatores muito importantes. Estudos demonstram melhor redução no

número de culturas positivas quando usada a temperatura de 37°C em um período de 3 horas (Ireland e Spelman 2005; Lindford et al. 2010). Apesar de alguns bancos de pele terem usado, e talvez ainda usem, temperaturas de refrigeração durante o tratamento com antimicrobianos, já é bem descrita como uma prática pouco eficiente. Isso porque os antimicrobianos, dependendo do seu alvo de ação, requerem que as bactérias estejam em crescimento, como por exemplo a gentamicina, que se liga ao ribossomo e tem que atravessar a membrana citoplasmática interna por meio de transporte ativo, e também as penicilinas que atuam na inibição da síntese da parede celular bacteriana. Em baixas temperaturas as bactérias não se multiplicam e conseqüentemente alguns antimicrobianos não conseguem atuar sobre seus alvos (Csonge, 1995; Pitt et al., 2014).

A concentração dos antimicrobianos também é um fator crítico, uma vez que concentrações muito elevadas diminuem a viabilidade da pele devido a um pH muito baixo (pH 5) (Csonge, 1995). Em revisão da literatura de trabalhos que testaram diferentes coquetéis de antimicrobianos para o tratamento de peles alógenas, Johnston et al. (2016) descreveram que os tratamentos que apresentaram a maior redução de contaminação da pele alógena foram três combinações: (1) penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 U/mL), e anfotericina B (1.25 Ig/mL) (Pirnay et al., 2012); (2) penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 U/mL) em 85 % glicerol (Pianigiani et al., 2010); e (3) penicilina, estreptomicina, canamicina, gentamicina, e nistatina (Neely et al. 2008). Essas combinações de antimicrobianos resultaram na redução da taxa de descarte de aloenxerto a 1,4, 1,2 e 0%, respectivamente.

O que se observa é que mesmo após aplicados os tratamentos com antimicrobianos, a contaminação microbiana persiste (Rooney et al., 2008) devido à resistência aos antimicrobianos usados (Pianigiani et al., 2010; Atique e Khalil., 2014) ou por outros motivos, visto que, estudos relatam que bactérias que persistiram ao tratamento eram sensíveis a pelo menos um dos antimicrobianos presentes nos coquetéis usados, ou seja, outros fatores não relacionados a expressão de resistência estão contribuindo para a persistência desses microrganismos nas peles alógenas (Pirnay et al., 2012; Gaucher et al., 2016).

Atique e Khalil (2014) descreveram bactérias multirresistentes isoladas de aloenxertos ósseos, levantando o problema da emergência de cepas com essas características em bancos de tecidos. Pianigiani et al. (2010) reportaram espécies de

*Staphylococcus* multirresistentes isoladas de peles alógenas que precisaram ser submetidos a um segundo tratamento com vancomicina, após o primeiro tratamento com penicilina e estreptomicina não ter eliminado a contaminação. Como já citado, o ambiente hospitalar, em específico a UTI, é colonizada por microrganismos resistentes a antimicrobianos que podem colonizar a pele do doador quando o mesmo permanece hospitalizado por tempo prolongado (Mathur et al., 2009).

Cepas resistentes de *Propionibacterium acnes*, renomeada como *Cutibacterium acnes* (Scholz e Kilian, 2016), que compõem a microbiota normal da pele, também já foram isoladas (Bojar e Holland, 2004). Além disso, estudos já demonstram que a resistência a antimicrobianos tem aumentado em isolados da pele, que pode ser reflexo do uso indiscriminado de antibióticos nos últimos anos (Tarale et al., 2015). O uso de produtos cosméticos contendo antimicrobianos e desinfetantes também podem estar associados a essa resistência (Horner et al., 2012).

Outro motivo que pode justificar a persistência de contaminação na pele alógena, é que as bactérias podem estar dentro dos poros e folículos capilares onde estão protegidas da ação dos tratamentos tópicos com antimicrobianos, que não conseguem atingir no devido tempo essas camadas mais profundas (Kearney, 2005; Gaucher et al., 2016).

A presença de bactérias esporuladoras é um dos principais problemas nos bancos de tecidos, sendo que a persistência de *Bacillus* sp. é o mais relatado (Pianigiani et al., 2006; Pirnay et al., 2012; Matisoski et al., 2015; Gaucher et al., 2016). Quando as células de certas bactérias Gram-positivas, como *Bacillus* e *Clostridium* sp., encontram condições ambientais adversas elas formam uma estrutura denominada esporo (ou endósporo) que pode permanecer dormente por longos períodos (Leggett et al., 2012). A estrutura dos esporos e a sua composição química desempenham papéis importantes que lhes conferem resistência a uma variedade de compostos antimicrobianos e biocidas, temperaturas extremas e pH, radiação UV e ionizante e podem sobreviver por períodos extremos de tempo sem água ou nutrientes (Setlow, 2006; Leggett et al., 2012). Diante de uma estrutura tão resistente e em estado dormente, nem o glicerol nem os antimicrobianos conseguem atuar (Saegeman et al., 2008).

Ao contrário dos esporos bacterianos, os esporos fúngicos fazem parte do ciclo de vida normal dos fungos e, portanto, são menos resistentes a compostos

químicos e condições ambientais adversas, mas são mais resistentes do que as células vegetativas (Clontz, 2008). Os antimicrobianos utilizados nos bancos de pele, citados pela maioria dos trabalhos, não têm ação sobre esporos bacterianos nem fúngicos. A eliminação dos esporos requer o uso de agentes mais potentes (Eissa et al., 2014) mas que ao mesmo tempo não danifiquem a estrutura do tecido cutâneo, o que é um desafio. Contudo, alguns estudos já demonstram a destruição de esporos com irradiação e o uso de diferentes compostos como genipin e ácido peracético, e sua possível aplicação na esterilização de aloenxertos (Lomas et al., 2003; Rooney et al. 2008; Reich e Akkus, 2013).

Outra possível causa da persistência de contaminação em peles alógenas, é que os microrganismos, principalmente as bactérias, estejam dispostos sobre ela na forma de biofilme. Porém não há estudos que tenham avaliado especificamente essa questão sobre peles alógenas. O que se sabe, é que várias espécies bacterianas isoladas da pele humana têm demonstrado habilidade em formar biofilme tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Em estado de biofilme, essas bactérias apresentam funções metabólicas e fisiológicas diferenciadas tornando-as mais virulentas e tolerantes a antimicrobianos (Coenye et al., 2007; Smith et al., 2008; Brandwein et al; 2016).

### 3.6 Biofilmes bacterianos e peles alógenas

Os biofilmes são comunidades de microrganismos organizadas em uma estrutura complexa que cresce embebida em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) e que se aderem a superfícies bióticas e abióticas (Donlan e Costerton, 2002). No que diz respeito à patogênese, o desenvolvimento do biofilme é um processo que inclui a formação inicial de biofilme no tempo de 3 horas e o desenvolvimento de um biofilme maduro após 24 horas (podendo variar) contendo EPS com canais de nutrição e comunicação por *quorum sensing* (Mackintosh et al., 2006; Patel et al., 2007).

Os microrganismos inseridos em um biofilme possuem mecanismos específicos que permitem a aderência inicial à superfície, o desenvolvimento de uma estrutura e ecossistema em comunidade e subsequente desprendimento do biofilme. A aderência a uma superfície pode ser facilitada por fatores como aumento das forças de cisalhamento, motilidade bacteriana e interações eletrostáticas entre o microrganismo e a superfície. Em um estado de "aderência reversível", há um

equilíbrio entre microrganismos aderidos e livres/em dispersão. Existem também características da superfície celular microbiana que promovem o processo de fixação na superfície, incluindo flagelos, pili, fímbrias e glicocálice (Donlan, 2001).

À medida que a densidade populacional celular do biofilme em desenvolvimento flutua, a expressão gênica das células dentro do biofilme é regulada pelo *quorum sensing*. Através deste sistema, as bactérias liberam sinais químicos chamados autoindutores, que são constitutivamente produzidos e aumentam a concentração à medida que a densidade do biofilme aumenta. Quando a concentração desses autoindutores atinge um limiar crítico, ocorrem alterações na expressão gênica, levando a uma série de processos fisiológicos, incluindo motilidade, esporulação e liberação de fatores de virulência necessários para a sobrevivência (Lindsay e von Holy, 2006; Mangwani et al., 2012).

A dispersão do biofilme é um processo do último ciclo de vida do biofilme, pelo qual as células que faziam parte de uma microcomunidade, relativamente estática e de crescimento lento dentro do biofilme, tornam-se microrganismos diferenciados, muitas vezes altamente móveis (McDougald et al., 2011). Esse processo promove a disseminação no hospedeiro ou ambiente, já que parte do biofilme se desloca e é capaz de colonizar novas superfícies e iniciar o crescimento de um novo biofilme (Donelli, 2006).

Quando um biofilme se desenvolve em tecidos vivos ou dispositivos médicos, é possível que células isoladas causem infecção sistêmica, particularmente se a resposta imune do hospedeiro estiver comprometida (Donlan, 2001). Diante disso, o mesmo deve ser considerado se o biofilme estiver sobre aloenxertos de pele, podendo penetrar na ferida do receptor e causar uma infecção sistêmica. A presença de biofilme já foi descrita em outros tipos de enxertos (Trampuz et al., 2006; Russu et al., 2011), o que ressalta a possibilidade de as bactérias presentes em enxertos de pele, também estarem distribuídas dessa forma visto que, *Staphylococcus aureus* e *Propionibacterium acnes* (*Cutibacterium acnes*) são conhecidos por formar biofilmes na pele (Achermann et al., 2014; Shin et al., 2013), assim como *Staphylococcus epidermidis* (Otto, 2008).

Tipicamente quando as células bacterianas estão organizadas na forma de biofilme podem ser 10 a 1000 vezes mais resistentes aos efeitos dos agentes antimicrobianos (Mah e O'Toole, 2001). Mesmo bactérias que não possuem uma base

genética para resistência podem ter sua susceptibilidade reduzida quando formam biofilme (Anderl et al., 2000). Isto porque os mecanismos de resistência a antimicrobianos amplamente distribuídos entre células planctônicas (como bombas de efluxo, enzimas modificadoras e mutações de alvo) parecem não ser os responsáveis pela resistência quando as células encontram-se em biofilme (Bagge et al., 2000).

Os mecanismos de resistência a antimicrobianos no biofilme incluem: (i) barreira de difusão físico ou químico conferida pela EPS que resulta na lenta ou incompleta penetração do antimicrobiano no biofilme; ii) crescimento lento do biofilme devido à limitação de nutrientes, cuja resistência é atribuída a transição de um crescimento exponencial para um crescimento lento que tem como característica ser acompanhada do aumento de resistência antimicrobiana; iii) ativação da resposta geral de estresse que resulta em alterações fisiológicas que protegem a célula de diferentes tipos de estresses ambientais; e iv) emergência de um fenótipo específico do biofilme, as *persistor cells*, que correspondem a uma subpopulação de microrganismos no biofilme que se encontram em um estado altamente protegido devido sua diferenciação fenotípica (Stewart, 1996, Mah e O'Toole, 2001; Lewis, 2010).

Uma vez que o biofilme encontra-se maduro, é muito difícil eliminá-lo. É importante destacar também que, a maioria dos antimicrobianos utilizados na clínica, têm como alvos apenas células no estado planctônico. Ainda, alguns agentes antimicrobianos podem estimular a produção de biofilmes por alguns microrganismos (Rachid et al., 2000; Costa et al., 2012). Logo, a eliminação de biofilme requer procedimentos mais elaborados (Percival et al., 2015).

Outro fator relevante, é que o biofilme pode ser um problema mesmo na fase de triagem microbiológica, em que os isolados aderidos à pele podem não passar para o meio de cultura que é então cultivado. Isso pode resultar em falso negativo ou subestimação dos microrganismos presentes na amostra. Sabe-se que a análise microbiológica de biofilme em dispositivos médicos como próteses, necessita de uma técnica mais sensível e precisa, na qual os dispositivos são submetidos a agitação e/ou sonicação para que ocorra o desprendimento do biofilme do dispositivo e em seguida as células sejam cultivadas em meios de cultura. Caso contrário, o biofilme permanece aderido ao dispositivo, conseqüentemente não há crescimento bacteriano nos meios de cultivo ou os isolados que crescem, não são representativos de todos

microrganismos presentes na amostra (Trampuz et al., 2006; Monsen et al., 2009; Portillo et al., 2013). Além disso, resultados negativos podem não implicar necessariamente na ausência de contaminação, mas podem ser devido à taxa de crescimento lento dentro do biofilme de espécies que não podem ser detectadas dentro do intervalo de tempo de detecção usual (Lindsay e von Holy, 2006).

A metodologia utilizada na análise microbiológica de peles alógenas na maioria dos bancos de pele, cujo cultivo em meio de cultura líquido ocorre na forma estática, sem pré agitação ou sonicação antes do cultivo em meios de cultura sólidos, levanta o questionamento quanto à sensibilidade desta fase caso os microrganismos estejam aderidos à pele na forma de biofilme. A utilização de agitação e sonicação antes do cultivo pode destruir esses biofilmes e liberar as bactérias permitindo sua detecção (Kobayashi et al. 2009; Portillo et al. 2014). O que seria ideal tanto na fase de detecção de contaminação das peles alógenas, quanto na fase anterior ao tratamento, o que facilitaria o acesso dos antimicrobianos às células bacterianas.

### 3.7 Análise da relação entre os isolados bacterianos tendo como ferramenta MALDI-TOF MS

Análises epidemiológicas são úteis na determinação da extensão da disseminação dos microrganismos e na elucidação das fontes de infecções (Berrazeg et al., 2013). A epidemiologia hospitalar de infecções é muitas vezes complexa, porque múltiplas cepas clonais, que causam surtos focais, podem coexistir com estirpes esporádicas que também possuem um reservatório na comunidade (Falagas e Karageorgopoulos, 2009). Da mesma forma, este conhecimento pode ser importante quando se trata de peles alógenas (aquelas coletadas de doadores cadáveres) e não alógenas (pele de indivíduos vivos sadios da comunidade). Pouco se discute na literatura do quanto essas duas condições influenciam a colonização de bactérias sobre o tecido cutâneo.

Considerando o Banco de Pele de Porto Alegre, apesar de a coleta da pele ser extremamente padronizada, ela é por vezes realizada no centro cirúrgico de diferentes hospitais. Logo, um rastreamento da contaminação de pele alógena é muito difícil. Não se sabe se a contaminação observada em algumas amostras está relacionada. Além disso, é importante elucidar possíveis diferenças quanto à composição de espécies bacterianas isoladas de peles alógenas e não alógenas, isto

porque, por um lado a microbiota da pele sadia é diversa e pode ser influenciada pelos mais diversos fatores anteriormente citados (Rosenthal et al., 2011) enquanto que peles alógenas, além desses mesmos fatores, podem ter a contaminação influenciada pelas condições de armazenamento do corpo do doador cadáver antes da remoção do tecido, a manipulação física, exposição ambiental hospitalar e o processamento do tecido antes e após ser coletado (Saegeman et al., 2007). Essas observações podem levantar questionamentos sobre diferentes fases da aquisição e processamento do tecido que podem ser otimizadas pelos bancos de pele.

Nos últimos anos, vários estudos mostraram a viabilidade de utilizar a espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser - tempo de voo (MALDI-TOF) para identificar microrganismos de forma mais rápida (Sauer e Kliem, 2010). E alguns estudos já avaliaram sua utilização como uma ferramenta para a tipificação de espécies bacterianas (Seng et al., 2010; Murray, 2010). A proteômica representa o aspecto funcional da genômica, uma vez que as proteínas analisadas refletem produtos genéticos e funções metabólicas, podem então ser usadas como ferramenta taxonômica (Singhal et al., 2015).

A espectrometria de massa é uma técnica analítica em que os compostos químicos são ionizados em moléculas carregadas e a proporção de sua massa e carga ( $m/z$ ) é medida. Para a análise, a amostra é preparada misturando-a com solução de um composto orgânico absorvente de energia, denominado matriz. Quando a matriz cristaliza durante a secagem, a amostra aprisionada dentro da matriz também é co-cristalizada. Uma vez dentro do equipamento, a amostra com a matriz é ionizada em um modo automatizado com um raio laser. A dessorção e a ionização com o raio laser geram íons soltos protonados de analitos na amostra que são então acelerados em um potencial fixo, onde estes se separam um do outro com base em sua relação massa-carga ( $m/z$ ). Os analitos carregados são detectados e medidos usando diferentes tipos de medidores de massa, como analisadores de tempo de voo (TOF), que são os mais utilizados para aplicações microbiológicas (Singhal et al., 2015).

Durante a análise MALDI-TOF, a razão  $m/z$  de um íon é medida determinando o tempo necessário para que ele percorra o comprimento do tubo de voo. Alguns analisadores TOF incorporam um espelho iônico na extremidade do tubo de voo, que serve para refletir os íons para um detector. Com base na informação TOF, um espectro característico chamado impressão de massa peptídica é gerado

por amostra (Yates, 1998; Singhal et al., 2015).

A identificação de microrganismos pelo MALDI-TOF MS é feita comparando a impressão de massa peptídica (PMF) do organismo desconhecido com as impressões contidas no banco de dados. Na combinação de PMF, o espectro de massa (MS) de isolados microbianos desconhecidos é comparado com os espectros de isolados microbianos conhecidos contidos no banco de dados. Para a identificação dos microrganismos a nível de espécie, é utilizada uma faixa de massa de  $m/z$  de 2-20 kDa, que representa principalmente proteínas ribossômicas, juntamente com algumas proteínas *housekeeping*. As proteínas ribossômicas altamente abundantes, representam cerca de 60-70% do peso seco de uma célula microbiana. Assim, a identidade de um microrganismo pode ser estabelecida até o gênero, e até mesmo a nível de espécie (Fagerquist et al., 2010, Murray, 2012).

O espectro MALDI-TOF MS de um determinado microrganismo é a propriedade taxonômica específica desse organismo, que é independente da sua localização geográfica, condições de cultura (que não devem ser drasticamente diferentes) ou metodologia de preparação das amostras. Com essa abordagem, é possível identificar novos isolados como membros de espécies existentes, se suas cepas tipificadas já foram previamente estudadas (Ruelle et al., 2004).

Também é possível o reconhecimento de padrões fenotípicos coerentes que refletem identidades taxonômicas. Sendo assim, de maneira prática e rápida, além de realizar a identificação de um grande número de isolados pode-se estudar sua diversidade taxonômica intra e inter-específica (Feli e Dellaglio, 2007).

Quando os espectros brutos gerados pela leitura no MALDI TOF são carregados no programa Biotyper 4.0, eles são préprocessados para construir espectros principais ou projeção média de espectros (MSPs), que inclui várias etapas de normalização de dados, criando um MSP para cada microrganismo avaliado. Os espectros MSP podem ser então utilizados para montagem de árvores taxonômicas nos quais são atribuídos a nós taxonômicos ordenados hierarquicamente. O agrupamento hierárquico usa um algoritmo baseado em dendrogramas que mede a distância e proximidade entre os microrganismos avaliados (dados dos manuais Microflex Biotyper 4.0, Bruker). Com a análise de dendrogramas do perfil MSP a proximidade das relações dos organismos entre si é refletida por um nível de distância arbitrário no qual pode-se observar como os organismos estão relacionados uns aos

outros (Berrazeg et al., 2013).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Aspectos éticos

Essa pesquisa foi aprovada pelos Comitês de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (protocolo CAAE 36949514.8.0000.5347) e da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (protocolo CAAE 45100215.1.0000.5335).

### 4.2 Amostras de peles alógenas

Um total de 32 lotes de amostras de pele humana adquiridas de doadores cadáveres entre julho de 2012 e novembro de 2014 foram disponibilizadas pelo banco de pele do Dr. Roberto Corrêa Chem, do Complexo Hospitalar Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. Seguindo as especificações da RDC 220 (2006), equipes médicas e do banco de pele realizaram a coleta das amostras de pele de doadores com morte encefálica (doadores de múltiplos órgãos) ou que sofreram parada cardiorrespiratória. Os doadores só foram aceitos após consentimento informado da família para a coleta, sorologia e uso da pele para fins de pesquisa; história social e médica do doador e exame físico. Resumidamente, a pele alógena foi adquirida em condições assépticas, em sala de cirurgia, seguindo padrões e diretrizes pré estabelecidas. A remoção dos tecidos foi realizada até 12 horas após a interrupção da circulação sanguínea, se o cadáver foi mantido à temperatura ambiente, ou até 24 horas se o cadáver foi refrigerado a  $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  dentro de 6 horas após interrupção da circulação sanguínea. As áreas de coleta foram o tronco, as coxas e também as pernas, no caso de doadores do sexo masculino. Cada doador foi dividido em dois lotes: lote 1 (tecidos colhidos da região anterior do corpo) e lote 2 (locais da região posterior do corpo), sendo que todas as etapas de processamento são realizadas individualmente para cada lote. Após a tricotomia das áreas doadoras, foi realizada a desinfecção com clorexidina, seguida do tingimento com clorexidina alcoólica. Lâminas de pele de 5 x 20 cm foram coletadas com um dermatômetro elétrico. Uma triagem microbiológica foi realizada através da cultura do suabe e dos fragmentos das

extremidades das lâminas de pele coletadas. Em seguida, as amostras de pele foram colocadas em glicerol a 50% para serem transportadas para o banco de pele para os próximos procedimentos de processamento, de acordo com os resultados microbiológicos.

Análises microbiológicas são realizadas em todas as etapas do processamento no banco de pele. Se houver crescimento de microrganismos considerados não aceitáveis (bacilos Gram-negativos aeróbicos ou anaeróbicos, cocos Gram-negativos, *Clostridium* sp., *Bacillus anthracis*, *Streptococcus pyogenes* (beta hemolítico); *Staphylococcus aureus*; *Enterococcus* sp. e fungos filamentosos ou leveduras), o tecido é descartado. Em caso de contaminação por outros microrganismos, a pele deve ser submetida ao tratamento antimicrobiano com um primeiro ciclo com penicilina (1000 U/mL) e estreptomicina (200 mg/mL) e segundo ciclo de vancomicina (50 mg/mL), se o primeiro ciclo falhar. As peles livres de contaminação são armazenadas em 85% de glicerol e mantidas a  $+4 \pm 2$  °C até dois anos, estando disponíveis para enxertia.

Os 32 lotes de pele foram coletados de 28 doadores, 17 correspondendo ao lote 1 e 15 ao lote 2. A idade dos doadores variou de 10 a 72 anos (média 35,56 anos), 16 do sexo feminino e 12 do sexo masculino. Todos os lotes já haviam sido descartados devido à contaminação microbiana com microrganismos inaceitáveis ou devido à persistência da contaminação bacteriana após o primeiro ou segundo ciclo de tratamento realizados no banco de pele.

#### 4.3 Cultura, isolamento e identificação bacteriana e fúngica

Após uma etapa de lavagem com solução de cloreto de sódio estéril a 0,85% em cabine de fluxo laminar, 1 cm<sup>2</sup> de cada lâmina de pele (representando a totalidade da amostra) foram transferidos para 80 mL de caldo triptona de soja (TSB) incubado a 37°C 24 h em condições aeróbicas, e em 80 mL de caldo tioglicolato (TGB) incubado a 37°C por 48 h em condições anaeróbicas, ambos para cultura bacteriana. Para o cultivo fúngico, os fragmentos de pele foram transferidos para 80 mL de caldo dextrose sabouraud (SDB) incubado à temperatura ambiente durante 7 dias. Se nenhuma turvação foi detectada dentro deste período, as amostras foram mantidas por até 14 dias sob as condições descritas acima (Pirnay et al., 2012).

Para o isolamento bacteriano, uma alíquota da cultura de pele em TSB e

TGB foi inoculada em ágar sangue, ágar sal manitol, ágar MacConkey e ágar eosina azul de metileno, em duplicata. Meios de cultura inoculados a partir do TSB foram incubados em aerobiose e os inoculados a partir do TGB foram incubados em anaerobiose, ambos a 37°C por 24 e 48 h, respectivamente. Foram escolhidas cinco colônias de cada morfotipo presente nos meios de cultura. Todas as colônias isoladas foram armazenadas em caldo infusão cérebro coração (BHI) com 15% de glicerol a -20°C. Para cocos Gram-positivos, testes de coagulase e DNase em tubo foram realizados para diferenciar *Staphylococcus aureus* de estafilococos coagulase-negativos (CNS). Para o isolamento fúngico, uma alíquota a partir do SDB foi inoculada em duplicata em ágar dextrose sabouraud (SDA) e ágar dextrose batata (PDA) incubados por até 7 dias a 37 °C e temperatura ambiente, respectivamente. As morfologias fúngicas foram analisadas por observação microscópica após microcultivo e coloração com o corante algodão azul de lactofenol.

Os isolados bacterianos e fúngicos foram identificados utilizando MALDI-TOF (Microflex Biotyper 4.0, Bruker) de acordo com as especificações do fabricante. Uma colônia de cultura recente, ou 1 µL de sobrenadante do procedimento de extração, foi diretamente localizada na placa MALDI. Este foi coberto com 1 µl de ácido hidroxianocinâmico e deixado secar. A placa carregada foi colocada no instrumento para leitura. Os espectros foram analisados usando o software MALDI Biotyper 4.0 na qual a identificação é dada a partir de uma correlação dos scores dos espectros obtidos com scores do banco de dados. Os escores > 2 foram indicativos de identificação a nível de espécie, enquanto os escores de 1,70 a 1,99 identificação a nível de gênero. Scores abaixo de 1,70 não foram indicativos de semelhança significativa dos espectros com qualquer entrada na base de dados.

#### 4.4 Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos

A susceptibilidade dos isolados bacterianos aos antimicrobianos (Discos Oxoid™) benzil penicilina G 10U (PEN), cefoxitina 30 µg (CFO), ciprofloxacina 5 µg (CIP), amicacina 30 µg (AMI), gentamicina 10 µg (GEN), tetraciclina 30 µg (TET), estreptomicina 10 µg (EST) e azitromicina 15 µg (AZM) foram determinados pelo método de disco-difusão.

Colônias cultivadas a partir de ágar de tripton de soja (TSA) foram suspensas em solução salina estéril, ajustadas à turbidez 0,5 da escala de McFarland

e aplicadas em ágar Mueller Hinton (MHA). Após 10-15 min, os discos antimicrobianos foram colocados em MHA, incubados a 35°C por 24h. Os halos de inibição foram lidos seguindo os critérios interpretativos da zona de diâmetro para os *Staphylococcus* sp. (Habrun et al., 2011; CLSI M100-S25, 2015; Owusu-Kwarteng et al., 2017), com exceção de EST, para qual foi utilizada a zona de diâmetro dos critérios interpretativos de *Enterococcus* sp. (EUCAST, 2017). *S. aureus* ATCC 29213 foi utilizada como controle.

A concentração inibitória mínima (CIM) dos antimicrobianos aos quais os isolados foram susceptíveis no método de disco-difusão (AMI, GEN e TET) e àqueles usados no banco de pele (PEN, EST e vancomicina (VAN)) foram avaliados através de tiras de gradiente CIM (M.I.C. Evaluators™, Oxoid). As colônias foram suspensas em solução salina estéril (turbidez equivalente a 0,5 da escala de McFarland) e semeadas por espalhamento na superfície do MHA. As tiras foram colocadas sobre o MHA após 10-15 min, incubadas a 35°C por 24h e lidas de acordo com as especificações do fabricante. Para descrever a eficácia dos antimicrobianos, foram calculados os valores de CIM<sub>50</sub> (valor de CIM na qual ≥50% dos isolados foram inibidos) e CIM<sub>90</sub> (valor de CIM na qual ≥90% dos isolados foram inibidos). Com exceção da EST, que não possui um valor de ponto de corte definido, todos os pontos de corte de CIM foram interpretados segundo o CLSI M100-S25 (2015) para cocos Gram-positivos e CLSI M45-A2 (2010) para bacilos Gram-positivos.

A CIM dos isolados fúngicos à anfotericina B foi realizada pelo método de microdiluição em caldo seguindo o CLSI M38-A29 (2008), com uma modificação na qual a densidade da suspensão foi ajustada através da contagem dos esporos no hemocítmetro. Os experimentos foram realizados em duplicata e duas cepas controles *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258 foram incluídas. A interpretação dos valores de CIM seguiu o CLSI M38-A29 (2008) e os valores de corte epidemiológicos (ECV) de *Aspergillus fumigatus* (Espinel-Ingroff et al., 2011).

#### 4.5 Análise de formação de biofilme

Um total de 40 isolados bacterianos foi avaliado incluindo espécies Gram-positivas e Gram-negativas. Destes, 20 isolados bacterianos foram obtidos das amostras de peles alógenas (de doadores cadáveres) disponibilizadas pelo Banco de Pele Dr. Roberto Corrêa Chem. Os demais 20 isolados bacterianos foram obtidos de

amostras de peles não alógenas (provenientes de indivíduos vivos saudáveis), cujo isolamento e identificação por MALDI-TOF e avaliação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, pelo método de disco-difusão em Mueller Hinton, foram realizados em trabalhos anteriores por este mesmo grupo de pesquisa (dados não publicados). Previamente também foi realizada uma triagem dos isolados de peles alógenas quanto a sua capacidade de formação de biofilme pelo método de Stepanovic et al. (2000), com modificações (dados não publicados). Para o presente teste, portanto, foram selecionados isolados com diferentes perfis de susceptibilidade a antimicrobianos e com diferentes níveis ou ausência de formação de biofilme. Os isolados encontravam-se devidamente armazenados em glicerol a 15% e mantidos a -20°C.

Os isolados obtidos de peles não alógenas foram avaliados quanto sua capacidade de formação de biofilme através do método de Stepanovic et al. (2000), com modificações. Os isolados bacterianos, foram recuperados em TSA e incubados a 37°C durante 24h. A partir do TSA, os isolados foram ajustados à turbidez 0,5 da escala de McFarland em salina 0,9% estéril. Vinte µL destas suspensões foram adicionadas em octoplicata juntamente com 180 µL de caldo TSB em placas de cultura de tecidos de poliestireno de 96 poços, de fundo plano. No controle positivo foram adicionados 20 µL da suspensão em salina de *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35984) e 180 µL de caldo TSB. No controle negativo foram adicionados 200 µL de caldo TSB. As placas foram então incubadas a 37°C por 24h. Em seguida os poços foram aspirados e lavados três vezes com 300 µL de solução salina estéril. As placas foram levemente agitadas, a fim de remover todas as bactérias não aderentes. As células que permaneceram aderidas ao fundo do poço e às paredes da placa foram fixadas com 200 µL de metanol 99%. Após 15 minutos, as placas foram esvaziadas e deixadas secar para posterior coloração dos poços com 200 µL do corante cristal violeta a 2% por 5 min. O excesso de corante foi retirado com lavagem dos poços com água corrente. Após deixar secar as placas, as células coradas aderidas foram solubilizadas com 160 µL de etanol a 100%. Ao final, realizou-se a leitura da densidade óptica (OD) de cada poço em espectrofotômetro em comprimento de onda de 570 nm.

Os isolados foram classificados em quatro categorias de acordo com os valores de OD obtidos. A OD ponto de corte (OD<sub>c</sub>) para o teste é definido como três desvios padrão acima da média da OD do controle negativo cujo poço da placa

continha apenas o caldo TSB. A classificação foi interpretada da seguinte maneira:  $OD \leq OD_c$  não aderente;  $OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$  fracamente aderente;  $2 \times OD_c < OD < 4 \times OD_c$  moderadamente aderente;  $4 \times OD_c < OD$  fortemente aderente (Stepanovic et al., 2000).

#### 4.6 Avaliação dos coquetéis antimicrobianos

Os mesmos 40 isolados citados anteriormente no item 4.5, foram os isolados submetidos aos testes com os coquetéis antimicrobianos.

Os antimicrobianos escolhidos e respectivas concentrações basearam-se na literatura e resultados prévios do presente grupo de pesquisa. Foram selecionados os antimicrobianos PEN (amplamente utilizado em bancos de pele), CAZ (descrita em outros trabalhos, Mathur et al., 2009; Johnston et al., 2016) e GEN e TET (que apresentaram elevado poder inibitório sobre os isolados), que foram testados sobre os isolados bacterianos (no estado planctônico) obtidos de peles alógenas e não alógenas em seis diferentes combinações como pode-se observar na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos coquetéis antimicrobianos avaliados.

Antimicrobiano	Coquetel ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	A	B	C	D	E	F
Penicilina (PEN)	600	600	600	600	-	600
Gentamicina (GEN)	80	-	80	80	80	80
Tetraciclina (TET)	-	160	160	-	160	160
Ceftazidima (CAZ)	-	-	-	240	240	240

A avaliação da atividade bactericida dos coquetéis antimicrobianos foi realizada baseando-se na metodologia descrita por Serafini et al. (2016), com adaptações. Os isolados bacterianos foram cultivados em TSA por 24h a 37°C. As colônias foram suspensas em solução salina 0,9% a uma turbidez de 0,5 da escala de McFarland. O inóculo foi então diluído 1:100 no tubo sem tratamento contendo solução salina estéril 0,9% e 0,5% de soro fetal bovino, e nos tubos de tratamento contendo também solução salina estéril 0,9% e os coquetéis antimicrobianos, resultando em um volume final de 2,5 mL. Os tubos sem tratamento foram imediatamente submetidos à centrifugação a 10.000g por 5 min e suspensos em 2,5

mL de solução salina estéril 0,9% para em seguida ser realizada a contagem de viabilidade celular (UFC/mL). Os tubos com coquetéis foram incubados a 37°C por 3 horas (temperatura e tempo utilizados pelo Banco Pele Dr. Roberto Corrêa Chem). Para evitar o carregamento dos antimicrobianos, após período de incubação, os tubos foram submetidos a centrifugação a 10.000g por 5 min e suspensos em 2,5 mL de solução salina estéril 0,9% nova. A contagem de viabilidade celular (UFC/mL) foi determinada através do plaqueamento de diluições seriadas (1:10) em solução salina estéril 0,9% das suspensões bacterianas, em meio sólido de TSA que foi incubado durante 24 horas a 37°C. A atividade bactericida foi calculada da seguinte maneira:  $\{(CFU/mL \text{ depois do tratamento}) / (CFU/mL \text{ antes do tratamento})\} \times 100$ .

#### 4.7 Formação de biofilme sobre as peles alógenas e tratamento com coquetéis antimicrobianos

Foram avaliados quatro isolados bacterianos obtidos de amostras de peles alógenas e um isolado obtido de amostra de pele não alógena, selecionados entre os 40 isolados citados no item 4.5 por apresentarem diferentes perfis de susceptibilidade a antimicrobianos e com diferentes níveis de formação de biofilme. Os isolados encontravam-se devidamente armazenados em glicerol a 15% e mantidos a -20°C.

Foram selecionados os dois coquetéis antimicrobianos que apresentaram o melhor poder inibitório sobre as células bacterianas no estado planctônico (resultado do teste do item 4.6). As amostras de peles utilizadas para esse experimento foram submetidas a cultura bacteriana e avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para garantir que estavam sem contaminação prévia.

O ensaio para a formação de biofilme sobre as amostras de peles alógenas foi adaptado de Clauss et al. (2013). O inóculo bacteriano foi preparado a partir de colônias puras dos isolados cultivados em TSA a 37°C por 24h. As colônias foram suspensas em solução salina 0,9% a uma turbidez de 0,5 da escala de McFarland. Em um tubo contendo caldo TSB, com pinça estéril, foram colocados seis fragmentos de peles alógenas estéreis de 1cm<sup>2</sup> e adicionado o inóculo bacteriano (1x10<sup>5</sup> UFC/mL), em um volume final de 6 mL. Primeiramente o tubo foi incubado por 24h a 37°C na forma estática para avaliar a formação de biofilme nesse período (apenas dois isolados testados), em seguida o período de incubação foi de 7 dias (para todas isolados). De forma asséptica os seis fragmentos, foram lavados com solução

fisiológica estéril para a remoção das células não aderidas e foram distribuídos dois fragmentos por tubo (todos contendo o volume final de 5 mL): tubo sem tratamento, contendo solução fisiológica estéril 0,9%; tratamento 1, contendo solução fisiológica estéril 0,9%, penicilina (600 µg/mL), gentamicina (80 µg/mL) e ceftazidima (240 µg/mL); e tratamento 2, contendo solução fisiológica estéril 0,9%, os mesmo antimicrobianos do tratamento 1 mais a adição de tetraciclina (160 µg/mL). Os três tubos foram incubados a 37°C por 3h de forma estática. Os fragmentos foram lavados com solução fisiológica 0,9% de forma asséptica e um fragmento de cada tubo seguiu para o preparo para a microscopia e os demais fragmentos foram submetidos à cultura bacteriana.

Para tanto, os fragmentos de pele foram cultivados em tubos separadamente contendo caldo TSB, incubados a 37°C por 24h, se nesse período nenhum crescimento fosse observado (turbidez do meio) foram mantidos incubados por até 14 dias. Uma alíquota do caldo foi semeada em TSA para o isolamento e observação da pureza do crescimento bacteriano. Seguindo Pianigiani et al. (2010), foi considerada cultura negativa no TSA apenas se nenhum crescimento bacteriano fosse observado após 48h, 72h e 30 dias, sendo que a presença de uma única colônia definia a cultura como positiva.

Para o preparo das amostras para a MEV, adaptado de Silva et al. (2014), as peles foram fixadas por imersão em solução de glutaraldeído 3% e tampão fosfato 0,1M (pH 7.2) durante 1 semana. As peles passaram por três lavagens de 30 min cada uma em tampão fosfato 100mM e desidratadas de forma gradual em concentrações crescentes de acetona (30 a 100%). A dessecação foi realizada pela técnica de ponto crítico CO<sub>2</sub> (CPD 030 Balzers, Liechtenstein). As amostras foram fixadas em *stubs* de alumínio e metalizadas com ouro (SCD050 Balzers, Liechtenstein) para a visualização em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM 6060), usando o modo de emissão de elétrons secundários com tensões de aceleração de 15 kV e ampliações de 3.000x e 10.000x.

#### 4.8 Determinação da relação dos isolados bacterianos de peles alógenas e não alógenas através da ferramenta MALDI-TOF

Os espectros principais ou projeção média de espectros (MSPs) foram os componentes fundamentais sobre os quais se baseou a identificação do espectro no

MALDI Biotyper. Para construção dos MSPs, os espectros brutos foram carregados no programa Biotyper 4.0, e foram submetidos a etapas de ajuste de massa, suavização, subtração da linha de base, normalização e seleção de pico. Os métodos escolhidos para cada etapa foram: 1) A etapa de ajuste de massa aplicou o método compressão de espectro por um fator de 10; 2) A etapa de suavização aplicou o algoritmo de Savitsky-Golay com um tamanho de estrutura de 25 Da para os dados de ajustes de massa; 3) A etapa de correção da linha de base aplicou o método multipolígono para encontrar o linha de base com janela de procura de 5 Da; 4) A etapa de normalização aplicou o método de modelo máximo para normalizar os dados subtraídos da linha de base; e 5) A etapa de seleção de pico aplicou um algoritmo de diferenciação de espectros para encontrar os picos.

Para auxílio na identificação, os MSPs foram comparados com espectros de referência armazenados no banco de dados Biotyper 4.0 com base em um algoritmo de reconhecimento de padrões usando posições de pico, distribuições de intensidade de pico e frequências de pico.

Nas árvores taxonômicas, os MSPs foram atribuídos a nós taxonômicos ordenados hierarquicamente. No agrupamento hierárquico, usou-se um algoritmo baseado em dendrogramas a partir da distância das espécies e um algoritmo de ligação que os unia. A medida de distância utilizada para a montagem dos dendrogramas foi de correlação com ligação média gerando um dendrograma orientado pelos valores de escores, com valor limite de escore de 300 para um único organismo e valor limite de escore de 0, para os organismos relacionados.

## 5. ARTIGOS

### 5.1 Artigo 1

**Bacterial contamination of human skin allografts and antimicrobial resistance:  
a skin bank problem**

Karine Lena Meneghetti, Micaela do Canto Canabarro, Letícia Muner Otton,  
Thaís dos Santos Hain, Mercedes Passos Geimba, Gertrudes Corção\*

Aceito para publicação pela revista BioMed Central Microbiology – fator de impacto  
2.829

## **Bacterial contamination of human skin allografts and antimicrobial resistance: a skin bank problem**

Karine Lena Meneghetti, Micaela do Canto Canabarro, Letícia Muner Otton,  
Thaís dos Santos Hain, Mercedes Passos Geimba, Gertrudes Corção\*

\* Correspondence: corcao@ufrgs.br

Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Institute of Basic Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Sarmento Leite 500, 90050-170, Porto Alegre, Brazil.

### **Abstract**

**Background:** Bacterial contamination remains the major problem in skin banks, even after antimicrobial treatment, and results in high rates of tissue discarding. This study aimed to analyze bacterial contamination in 32 human skin allografts from the skin bank of Dr. Roberto Corrêa Chem from the Hospital Complex Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. These samples were already discarded due to microbial contamination. The identification of the bacteria isolated from skin allografts was performed by matrix assisted laser desorption ionization–time of flight. The antimicrobial susceptibility of the isolates to six different classes of antimicrobials was determined using the disk-diffusion agar method, and the evaluation of the inhibitory potential was determined by the minimal inhibitory concentration (50/90) of antimicrobials already used in the skin bank and those that most isolates were susceptible to.

**Results:** A total of 21 (65.6%) skin samples were contaminated with Gram-positive bacteria: 1 (4.7%) with *Paenibacillus* sp., 12 (61.9%) with *Bacillus* sp., 6 (28.5%) with *Staphylococcus* sp., and 2 (9.5%) with *Bacillus* sp. and *Staphylococcus* sp. Several resistance profiles, including multiresistance, were found among the isolates. Most of the isolates were susceptible to at least one of the antimicrobials used in the skin bank. All isolates were susceptible to

amikacin, gentamicin, and tetracycline, which demonstrated the best inhibitory activities against the isolates and were considered as potential candidates for new antimicrobial treatments.

**Conclusions:** *Bacillus*, *Paenibacillus*, and *Staphylococcus* were isolated from the skin allografts, thus demonstrating the predominance of Gram-positive bacteria contamination. Other factors not related to the resistance phenotype may also be involved in the persistence of bacterial isolates in the skin allografts after antibiotic treatment. Gentamicin, amikacin, and tetracycline can be considered as an option for a more effective treatment cocktail.

**Keywords:** skin allograft, bacterial contamination, antimicrobial resistance, skin bank, discards

## Background

Skin allografts have been an efficient choice for the treatment of several skin lesions and have mainly been used for the temporary wound coverage of severe extensive burns [1]. The use of homologous skin grafts decreases the risk of infection, wound pain, and the frequency of dressing changes as it acts as a mechanical and biological barrier to reduce the loss of water, proteins, electrolytes, and heat through the wound [2]. The major concern regarding the use of allogeneic skin is the risk of disease transmission by potential pathogens, as skin transplant recipients are often immunologically compromised and are consequently more susceptible to infections, (i.e., patients with severe burns) [1].

Microbial contamination is the main reason for tissue discharge in tissue banks [3]. Unlike other tissues, the skin is colonized by skin-associated microorganisms therefore it cannot be considered sterile at the time of harvesting [4]. In addition to the endogenous microbiota, contamination may also originate from the respiratory tract and bowel, or exogenously from the retrieval staff, mortuary [5], or hospital environment [6]. Although superficial decontamination of the donor's skin with antiseptics is performed before harvesting,

the procedure is not indefectible [4]. Skin banks are therefore responsible for ensuring a safe availability of skin for grafting by performing microbiological screening before and after processing the allogeneic skin.

The skin bank of Dr. Roberto Corrêa Chem from the Hospital Complex Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre was founded in 2005 and was the first skin bank created in Rio Grande do Sul. It was the second skin bank in Brazil, but for a long time it was the only one in effective operation [7]. In the processing of skin allograft, the microbiological screening is at the moment of tissue obtainment. After being harvested, strips of allogeneic skins are sampled by passing a sterile swab over their entire length, on both sides, and by collecting a fragment from each tip of the strips, that are then cultured in appropriate media. Only allogeneic skins that do not present microbial growth or growth of acceptable microorganisms (considered non-pathogenic) proceed to the next phase of processing. Skin samples with nonacceptable microorganisms are immediately discarded. Allogeneic skins with acceptable microorganisms are then submitted to a first cycle of treatment with penicillin and streptomycin and, if necessary, a second cycle of treatment with vancomycin. Therefore only skins with negative microbiological cultures after treatment are released for grafting. However, as in other skin banks [3, 8], the skin bank of Dr. Roberto Corrêa Chem faces the problem of discards due to persistent bacterial contamination.

Tissue decontamination is a challenge for tissue banks, and currently there is little consensus about the combination and concentration of antibiotics to be used, which highlights the need for more research on this subject [9, 10]. Most of the published manuscripts only identify the contaminants from skin grafts or test the different antimicrobial cocktails on skin, they do not assess the bacteria's susceptibility to the antimicrobials used or test these cocktails on nonskin bacteria.

This study aimed to perform a bacteriological analysis by identifying bacteria from human skin allografts and analyzing their antimicrobial susceptibility profile by evaluating the inhibitory potential. The inhibitory potential was calculated from the minimal inhibitory

concentration (MIC) (MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub>) of the antimicrobials already used in the skin bank and those that most isolates were susceptible to. The results should contribute to a better understanding of which factors are contributing to the persistence of bacterial contamination in skin allografts. This initial evaluation of the susceptibility profile should also provide changes in the antimicrobial cocktails used in the treatment of skin allografts.

## **Methods**

### ***Ethics***

This research was approved by the Research Ethics Committees of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (protocol CAAE 36949514.8.0000.5347) and the Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (protocol CAAE 45100215.1.0000.5335).

### ***Skin samples***

A total of 32 batches of human skin samples procured from cadaveric donors between July 2012 to November 2014, were available from the skin bank of Dr. Roberto Corrêa Chem from the Hospital Complex Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. The skin allografts were harvested from donors with encephalic death (multi-organ donors) and those who suffered cardiorespiratory arrest. The donors were only accepted after family informed consent for recovery, serology and the use of the skin for research purposes; social and medical history of the donor and physical examination. Briefly, allogeneic skin is procured in aseptic conditions, in operating room with adherence to standards and guidelines. Removal of tissues is carried out until 12 hours after the interruption of blood circulation, if the cadaver was kept at room temperature, or up to 24 hours if the cadaver was refrigerated at 4°C ± 2°C within 06 (six) hours after disruption of blood circulation. The recovery areas are trunk, thighs and for male donors also the legs. Each donor is divided into two batches: batch 1 (tissue harvested from anterior sites of the body) and batch 2 (back sites of the body), being that all processing steps are performed individually for each batch. After the tricotomy of the donor areas, disinfection with chlorhexidine degermant followed by dyeing with alcoholic chlorhexidine are performed. Skin

strips 5 x 20 cm thick are harvested with an electric dermatome. A microbiological screening is done by culturing the swab and the tip fragments of the skin strips. Then, skin samples are placed in 50% glycerol to be transported to the skin bank to be performed the next processing procedures according to microbiological results. Microbiological analyzes are performed at all stages of the skin bank processing. If the considered nonacceptable microorganisms: aerobic or anaerobic Gram-negative bacilli, Gram-negative cocci, *Clostridium* sp., *Bacillus anthracis*, *Streptococcus pyogenes* (beta hemolytic); *Staphylococcus aureus*; *Enterococcus* sp. and filamentous fungi or yeasts, the tissue is discarded. In case of contamination by other microorganisms, the skin must undergo antibiotic treatment, first cycle with penicillin (1000 U/mL) and streptomycin (200 mg/mL) and second cycle of vancomycin (50 mg/mL), if the first cycle fails. Skins free from contamination are stored in 85% glycerol and maintained at  $+4 \pm 2$  °C up to two years, being available for grafting.

The 32 skin batches were harvested from 28 donors, 17 corresponding to batch 1 and 15 to batch 2. The donors age ranged from 10 to 72 years (mean 35.56 years), 16 females and 12 males. All batches had already been discarded due to microbial contamination with nonacceptable microorganisms or to the persistence of bacterial contamination, after the first or the second cycle of treatment performed in the skin bank.

### ***Bacterial culture, isolation, and identification***

After a sterile washing step with 0.85% sodium chloride solution in a laminar air flow cabinet, 1 cm<sup>2</sup> of each skin strip (representing the totality of the sample) was transferred to 80 mL of tryptone soya broth (TSB) incubated at 37°C for 24 h in aerobic conditions and in 80 mL of thioglycolate broth (TGB) incubated at 37°C for 48 h in anaerobic conditions. If no turbidity was detected within this period, the samples were maintained for up to 14 days under the conditions described above [8].

For bacterial isolation, an aliquot of the skin culture in TSB and TGB was inoculated in blood agar, mannitol salt agar, MacConkey agar, and eosin methylene blue agar in duplicate. Culture mediums inoculated from TSB were incubated in aerobiose and those inoculated from

TGB were incubated in anaerobiosis, both at 37°C for 24 and 48 h, respectively. Five isolates with equal colony morphology were chosen from the agar plates. All isolated colonies were stored in Broth Heart Brain Infusion (BHI) with 15% glycerol at –20°C. For Gram-positive cocci, tube coagulase and DNase tests were performed to differentiate *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci (CNS).

Isolates were identified using matrix assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF) (Microflex Biotyper 4.0, Bruker) according to the manufacturer's specifications. A recent culture colony, or 1 µL of supernatant from the extraction procedure, was directly spotted onto the MALDI plate. This was overlaid with 1 µl of saturated α-cyano-4-hydroxycinnamic acid and allowed to dry. The loaded plate was placed in the instrument for reading. The spectra were analyzed using MALDI Biotyper 4.0 software by standard pattern matching with a default setting. Scores >2 were considered to indicate species identification, while scores of 1.70–1.99 indicated identification at the genus level. Scores under 1.70 indicated no significant similarity of the spectra with any database entry.

### **Antibiotic susceptibility tests**

Susceptibility to the antimicrobials (Oxoid™ Disks), the benzylpenicillin penicillin G 10U (PEN), cefoxitin 30 µg (CFO), ciprofloxacin 5 µg (CIP), amikacin 30 µg (AMI), gentamicin 10 µg (GEN), tetracycline 30 µg (TET), streptomycin 10 µg (EST), and azithromycin 15 µg (AZM) was determined using the disk-diffusion method. Colonies cultured from tryptone soya agar (TSA) were suspended in sterile saline, brought to turbidity 0.5 of the McFarland standard and streaked across Mueller Hinton agar (MHA). After 10–15 min, antimicrobial disks were placed on MHA, incubated at 35°C for 24h. Inhibition halos were read following the interpretative criteria diameter zone for staphylococci [11, 12, 13], with the exception of EST where the interpretative criteria diameter zone for *Enterococcus* sp. was used [14]. *S. aureus* ATCC 29213 was used as a control.

The MIC of the antimicrobials to which the isolates were all susceptible (AMI, GEN, and TET) and those used in the skin bank (PEN, EST, and vancomycin (VAN)) was assessed by

MIC gradient strips (M.I.C.Evaluators™, Oxoid). Colonies were suspended in sterile saline (turbidity equivalent to 0.5 McFarland standard) and streaked across MHA. The strips were placed on MHA after 10–15 min, incubated at 35°C for 24h, and read according to the manufacturer's specifications. To describe the efficacy of the antimicrobials, MIC<sub>50</sub> (MIC value at which ≥50% of the isolates were inhibited) and MIC<sub>90</sub> (MIC value at which ≥90% of the isolates were inhibited) values were calculated. Apart from EST, which does not have a defined breakpoint value, all MIC breakpoints were interpreted following CLSI M100-S25 [11] for Gram-positive cocci and CLSI M45-A2 [15] for Gram-positive bacilli.

## **Results**

### ***Bacterial isolation and identification***

Of the 32 evaluated skin samples, 21 (65.6%) were positive for bacterial culture with Gram-positive bacteria, among which two had previously been submitted to the first cycle of antimicrobial treatment and five to the first and second treatment in the skin bank. Considering the MALDI-TOF score criteria, species of *Bacillus*, *Staphylococcus*, and *Paenibacillus* were identified. Genera whose species were not identified were designated by sp. or by coagulase test result for Gram-positive cocci, as can be seen in Table 1. No Gram-negative bacterium was isolated from the evaluated skin samples. A total of 790 bacterial isolates were obtained, 507 (65%) Gram-positive bacilli and 283 (35%) Gram-positive cocci.

### ***Susceptibility profile to antimicrobials***

The antimicrobial susceptibility profile was evaluated in two isolates with equal colony morphology among those isolated from each medium, totaling in 195 Gram-positive bacilli and 124 Gram-positive cocci analyzed. All Gram-positive bacilli were susceptible to CIP, AMI, GEN, and TET, and 92 (48.7%) of these were susceptible to all other antimicrobials tested (Table 2). They presented seven distinct antimicrobial resistance profiles (Table 2). Twenty-eight (14.3%) isolates were resistant to a single antimicrobial, 64 (51.6 %) were resistant to two antimicrobials, and 11 (5.6%) were resistant to three antimicrobials. The PEN–CFO

resistance profile was the most prevalent, being found in all *Bacillus cereus*. A total of 11 (5.6%) isolates, including *B. cereus* and *Paenibacillus* sp., were resistant to three different classes of antimicrobials and were therefore classified as multidrug resistant (MDR) [16].

Table 1. Identification and prevalence of bacteria isolated from human skin grafts

Isolated bacteria	Prevalence in skin samples (n = 21)
<b>Gram-positive bacilli</b>	
<i>Bacillus cereus</i>	7 (33.3%)
<i>Bacillus subtilis</i>	7 (33.3%)
<i>Bacillus</i> sp.	7 (33.3%)
<i>Bacillus vallismortis</i>	3 (14.2%)
<i>Bacillus pumilus</i>	1 (4.7%)
<i>Bacillus licheniformis</i>	1 (4.7%)
<i>Paenibacillus</i> sp.	1 (4.7%)
<b>Gram-positive cocci</b>	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4 (19%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	2 (9.5%)
<i>Staphylococcus capitis</i>	1 (4.7%)
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1(4.7%)
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1(4.7%)
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1(4.7%)
Coagulase-negative staphylococci	1(4.7%)

Among the 102 (52%) PEN- and EST-resistant bacilli isolates, 59 were isolated from skin samples submitted to the first and second treatment cycles with these antimicrobials and 49 (83%) were susceptible to at least one of them. Another 10 bacilli from treated skin samples were susceptible to both of them (Table 2).

All of the 124 Gram-positive cocci analyzed were susceptible to AMI, GEN, and TET and 19 (15.3%) were susceptible to all other antimicrobials tested (Table 2). Eight antimicrobial resistance profiles were observed, of which PEN–CFO–CIP–AZM was the most prevalent being observed in 54 (43.5%) Gram-positive cocci. A total of 60 (48.3%) isolates were classified as MDR, being resistant to three or more different classes of antimicrobials, including *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis*, and *S. capitis*. In addition, 61 (49.1%)

staphylococci isolates were oxacillin-resistant based on CFO results predicting methicillin resistance (Table 2).

A total of 84 (67.7%) Gram-positive cocci were resistant to PEN and no coccus isolates showed resistance to EST. The two CNS isolated from skin samples submitted to the first treatment in the skin bank were susceptible to both PEN and EST (Table 2).

### ***Antimicrobial inhibitory potential***

The inhibitory potential of the antimicrobials to which all isolates were susceptible by disk-diffusion method (AMI, GEN, and TET) and those used in the skin bank (PEN, EST, and VAN) were evaluated against the isolated bacteria to assess their efficiency (Table 3). For this purpose, 103 Gram-positive cocci and 118 Gram-positive bacilli with different susceptibility profiles were chosen and analyzed using MIC gradient strips.

For Gram-positive bacilli PEN MIC<sub>50</sub> was 1 µg/mL and for Gram-positive cocci PEN MIC<sub>50</sub> was 8 µg/mL, and both presented PEN MIC<sub>90</sub> values of >32 µg/mL. EST MIC<sub>50</sub> was 2 µg/mL and EST MIC<sub>90</sub> was 32 µg/mL for Gram-positive bacilli while for Gram-positive cocci EST MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> was 4 µg/mL and 8 µg/mL, respectively. VAN MIC<sub>50</sub> was 2 µg/mL for Gram-positive bacilli and cocci, and VAN MIC<sub>90</sub> was 8 µg/mL for Gram-positive bacilli and 2 µg/mL for Gram-positive cocci. AMI MIC<sub>50</sub> of 0.5 µg/mL and MIC<sub>90</sub> of 1 µg/mL was showed by Gram-positive bacilli while for Gram-positive cocci was AMI MIC<sub>50</sub> of 2 µg/mL and MIC<sub>90</sub> of 4 µg/mL. GEN MIC<sub>50</sub> of 0.5 µg/mL and MIC<sub>90</sub> of 2 µg/mL was observed for both Gram-positive bacilli and cocci. TET MIC<sub>50</sub> was 0.5 µg/mL and MIC<sub>90</sub> was 8 µg/mL for Gram-positive bacilli. For Gram-positive cocci TET MIC<sub>50</sub> was 1 µg/mL and MIC<sub>90</sub> was 2 µg/mL (Table 3).

Table 2. Susceptibility profile of Gram-positive bacilli and Gram-positive cocci isolated from human skin allografts with and without antimicrobial treatment.

Gram-Positive Bacilli						Gram-Positive Cocci					
Antimicrobial resistance profile	Number of isolates (n = 195)	Isolates	Treatment			Antimicrobial resistance profile	Number of isolates (n = 124)	Isolates	Treatment		
			WT	1ST	1ST/2ND				WT	1ST	1ST/2ND
PEN	27	<i>B. cereus</i>	2	—	12	PEN	20	<i>S. aureus</i>	19	—	—
		<i>B. subtilis</i>	1	—	—			<i>S. lugdunensis</i>	1	—	—
		<i>B. licheniformis</i>	9	—	—	CFO	1	CNS	—	1	—
		<i>Bacillus</i> sp.	3	—	—						
CFO	1	<i>B. vallismortis</i>	1	—	AZM	13	<i>S. haemolyticus</i>	12	—	—	
							CNS	—	1	—	
PEN-CFO	59	<i>B. cereus</i>	28	2	29	PEN-CIP	9	<i>S. aureus</i>	5	—	—
CFO-EST	4	<i>Paenibacillus</i> sp.	—	4	—			<i>S. epidermidis</i>	4	—	—
PEN-AZM	1	<i>B. cereus</i>	—	—	1	PEN-AZM	1	<i>S. epidermidis</i>	1	—	—
						CIP-AZM	1	<i>S. epidermidis</i>	1	—	—
PEN-CFO-EST	10	<i>B. cereus</i>	—	—	8	CFO-CIP-AZM	6	<i>S. epidermidis</i>	5	—	—
		<i>Paenibacillus</i> sp.	—	2	—			<i>S. saprophyticus</i>	1	—	—
PEN-CFO-AZM	1	<i>B. cereus</i>	—	—	1	PEN-CFO-CIP-AZM	54	<i>S. epidermidis</i>	35	—	—
								<i>S. capitis</i>	17	—	—
								<i>S. saprophyticus</i>	1	—	—
								<i>S. aureus</i>	1	—	—
Susceptible to all ATM	92	<i>Bacillus</i> sp.	49	2	4	Susceptible to all ATM	19	<i>S. haemolyticus</i>	4	—	—
		<i>B. subtilis</i>	25	—	4			<i>S. lugdunensis</i>	15	—	—
		<i>B. vallismortis</i>	4	—	—						
		<i>B. pumilus</i>	2	—	—						
		<i>B. licheniformis</i>	1	—	—						
		<i>B. cereus</i>	1	—	—						

1ST, isolates obtained from skin samples previously submitted to the first cycle of treatment with penicillin and streptomycin in the skin bank; 2ND, isolates obtained from skin samples previously submitted to the second cycle of treatment with vancomycin; ATM, antimicrobials; AZM, azithromycin; CFO, cefoxitin; CIP, ciprofloxacin; CNS, coagulase-negative staphylococci; EST, streptomycin; PEN, penicillin; WT, without treatment.

Considering all the 221 Gram-positive bacilli and cocci evaluated, for elimination of 90% of them was observed MIC values of >32 µg/mL for PEN, 16 µg/mL for EST, 8 µg/mL for VAN, 2 µg/mL for AMI and GEN, and 4 µg/mL for TET. Therefore, AMI and GEN presented the highest inhibitory activity, followed by TET. Both AMI, GEN and TET presented MIC<sub>90</sub> values less than the susceptibility breakpoints established by CLSI M45-A2 [15] and CLSI M100-S25 [11], respectively, for *Bacillus* sp. and *Staphylococcus* sp., with exception TET MIC<sub>90</sub> that was equal to the intermediate resistance breakpoint for *Bacillus* sp., indicating the absence of resistance to these antimicrobials. Meanwhile, PEN, EST, and VAN were the least active, requiring higher concentrations to inhibit the growth of the isolates. PEN MIC<sub>90</sub> was 128-fold higher than the breakpoint of resistance (≥0.25 µg/mL, CLSI M45-A2 [15], CLSI M100-S25 [11]) for *Bacillus* sp. and *Staphylococcus* sp., demonstrating high PEN resistance among the isolates. VAN MIC<sub>90</sub> was two-fold higher than the breakpoint of susceptibility (≤4 µg/mL, CLSI M45-A2 [15]) for *Bacillus* sp., suggesting that some bacilli isolates were nonsusceptible to VAN. Moreover VAN MIC<sub>90</sub> presented equal value of the breakpoint of intermediate resistance for *Staphylococcus* sp. (Table 3).

Table 3. MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> values of penicillin, streptomycin, vancomycin, amikacin, gentamicin, and tetracycline for Gram-positive bacilli and cocci

Isolates	µg/mL	PEN	EST	VAN	AMI	GEN	TET
Gram-positive bacilli (n = 118)	MIC <sub>50</sub>	1	2	2	0.5	0.5	0.5
	MIC <sub>90</sub>	>32	32	8	1	2	8
Gram-positive cocci (n = 103)	MIC <sub>50</sub>	8	4	2	2	0.5	1
	MIC <sub>90</sub>	>32	8	4	4	2	2
Gram-positive bacilli and cocci (n = 221)	MIC <sub>50</sub>	8	4	2	0.5	0.5	1
	MIC <sub>90</sub>	>32	16	8	2	2	4

AMI, amikacin; EST, streptomycin; GEN, gentamicin; MIC<sub>50</sub>, MIC value at which ≥50% of the isolates were inhibited; MIC<sub>90</sub>, MIC value at which ≥90% of the isolates were inhibited; PEN, penicillin; TET, tetracycline; VAN, vancomycin.

Regarding the bacteria isolated from skin samples previously submitted to the first treatment with PEN in the skin bank, individual MIC analysis revealed that 43 (93.4%) of the

46 Gram-positive bacilli were PEN resistant, presenting PEN MIC values between 0.25 and  $\geq 32$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Three of the isolates (6.5%) were susceptible to PEN with MIC values between 0.03 and 0.06  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Two of the Gram-positive cocci were susceptible to PEN with MIC values of between 0,06 and 0,12  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (additional supporting files 1).

Of the 39 Gram-positive bacilli submitted to the second cycle of treatment with VAN, 18 (46.1%) were shown to be susceptible and presented MIC values between 0.25 and 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . However, 21 (53.8%) Gram-positive bacilli were resistant to VAN, showing MIC values between 8 and 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (additional supporting files 1). No skin sample, which was submitted to the second cycle of treatment with VAN, presented Gram-positive cocci.

## Discussion

The primary aim of this study was to analyze the bacterial contaminants of allogeneic skin samples from the skin bank of Dr. Roberto Corrêa Chem from the Hospital Complex Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp., and *Paenibacillus* sp. were identified. The most prevalent Gram-positive bacilli was *B. cereus* and the most prevalent Gram-positive cocci was *S. epidermidis*.

Another Brazilian skin bank has also reported skin contamination by Gram-positive bacteria, including CNS (42%), Gram-positive bacilli (not *Clostridium*) (18%), coagulase-positive staphylococci (10%), and *Enterococcus* sp. (7%) [17]. Lindford et al. [18] found that *Staphylococcus* and *Bacillus* were the most prevalent bacteria in skin allografts. Other authors [1, 3, 8] have identified CNS, especially *S. epidermidis*, as the most common bacteria in skin allografts. However, other studies have also detected Gram-negative bacteria such as *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* sp., *Acinetobacter baumannii*, and *Enterobacter cloacae* [1, 3, 8, 18]. The absence of Gram-negative bacilli in the present work may be due to the fact that the analyzed skin samples were immersed in 85% glycerol for long periods of time, the inhibitory action of which is more potent in Gram-negative bacteria. The higher susceptibility of Gram-negative bacteria to high glycerol concentrations is due to the thin layer of peptidoglycan, which constitutes only 10% of the cell

wall. Conversely, the peptidoglycan content in Gram-positive bacteria corresponds to 90% of the cell wall and is therefore more resistant to osmotic lysis [19]. Studies have also shown that glycerol is unable to sterilize skin as it cannot eliminate bacterial spores [4, 19].

*Bacillus* sp. and *Paenibacillus* sp. are noteworthy as they form spores that are resistant to heat, cold, and common disinfectants, which allows them to survive on surfaces for prolonged periods [20]; *Bacillus* sp. have been found even on the skin surface of healthy individuals [21]. There are few methods that reduce skin spore levels in a clinical setting, mainly in hospitalized patients [22]. *Bacillus* sp. and *Paenibacillus* sp. have been isolated in these individuals [23]. In addition to forming spores, these bacteria seem to be sufficiently equipped with virulence properties that allow them to behave as pathogens and opportunistic pathogens in humans [23].

Among the *Staphylococcus* species, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. capitis*, and *S. lugdunensis* can be considered to be an integral part of the normal skin microbiota. However, although less virulent, these coagulase-negative species may cause infections [24]. They are particularly associated with infections caused by the use of implanted devices and they have a high capacity for biofilm formation, which shows significant resistance to antibiotics [25].

Several species detected in this study (i.e., *Paenibacillus* sp. [26], *B. cereus* [27], *B. subtilis* [28], *B. pumilus* [29], *B. licheniformis* [30], *S. aureus* [31], *S. epidermidis* [24], and *S. capitis* [32]) have already been shown to directly cause infections in the skin, open-wounds, or the blood (via skin lesions). With the exception of *S. aureus* and *B. cereus*, most of the bacteria isolated in this study are considered to be of low pathogenicity [3], including normal human skin microbiota and common environmental organisms. However, they should not be underestimated as they are isolated from skin grafts that are usually transplanted into immunocompromised individuals with a high risk of acquiring a serious opportunistic infection [18].

Few articles discuss about susceptible profiles to antimicrobials of bacteria isolated from skin allografts. This is an important tool to guide the choice of an appropriate antibiotic treatment, especially if the applied treatments are not completely efficient. Among the 319

isolates that had their susceptible profiles determined, 71 (22.2%) were multidrug resistant. This is not the first time that MDR bacteria have been reported in tissue bank samples [33]. Pianigiani et al. [34] found MDR Staphylococci isolated from skin allografts, that called for treatment with vancomycin on the basis of antibiograms.

According to MIC values, it was observed high resistance to PEN in a portion of the population of the isolates evaluated, in addition to isolates nonsusceptible and intermediate resistant to VAN. In view of this, the resistance to the antimicrobials applied in the decontamination treatment of the skin allografts, in the skin bank, may be contributing to its inefficiency.

The inhibitory potential of the antimicrobials used in the skin bank showed to be less effective, requiring high concentrations to kill the isolates evaluated. Considering all the 221 isolates of bacilli and cocci, PEN showed MIC90 values higher than their breakpoint of resistance. VAN MIC90 presented equal value of the breakpoint of intermediate resistance for *Staphylococcus* sp. and nonsusceptible breakpoint for *Bacillus* sp. (including *Paenibacillus* sp.). Streptomycin did not have reference values, but among the antimicrobials used in the skin bank, presented the second highest value of MIC90 (16 µg/mL). Interestingly the MIC values of these three antimicrobials were much lower than the concentrations used in the skin bank, whose concentrations must have eliminated at least the bacteria susceptible to them. It is possible that such concentrations were quite ineffective against susceptible bacteria due to the 'Eagle effect', where antibiotics, particularly β-lactams, exhibits reduced potential killing at high drug concentrations [9, 35]. AMI, GEN and TET presented MIC90 values less than the susceptibility breakpoints established for the isolates, being much more effective at lower concentrations than the antimicrobial concentrations already used in the skin bank.

These findings highlights the need to find different alternatives of antimicrobial treatments and a monitoring of resistance within the tissue banks, since broad spectrum antimicrobials are used and can select resistant bacteria, making it even more difficult to eliminate contamination from tissue allografts. In addition, the concentration of antimicrobials should also be better studied, so that an ideal value is reached, which eliminates the greater

amount of bacteria found in the skin allografts, without selecting resistant strains [36] nor a high concentration that loses its effect [35].

Little information is available regarding the treatment of infections caused by *Bacillus* or *Paenibacillus* strains [23]. *B. cereus* are described as potent producers of broad-spectrum  $\beta$ -lactamases, which affect penicillins and cephalosporins [15]. This may explain their high levels of resistance to PEN, CAZ, and CFO. *B. cereus* is known to be susceptible to aminoglycosides, chloramphenicol, clindamycin, erythromycin, TET, and VAN [37], therefore of the antimicrobials tested in this study, AMI, GEN, and TET may be efficient at eliminating vegetative forms of *Bacillus* species.

Methicillin-resistant staphylococci (MRS) is considered to be resistant to all currently-available  $\beta$ -lactam antimicrobial agents except for cephalosporins, which have anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (anti-MRSA) activity [11]. Thus the elaboration of a new treatment cocktail should take this into consideration.

Previous studies have already shown that antibiotic resistance has increased in skin isolates, which may reflect the indiscriminate use of antibiotics over the last few years [21]. Cosmetic products containing antibiotics and disinfectants may also be associated with this resistance [38]. Hospital environments such as intensive care are populated by antibiotic-resistant species [34] and considering that some skin donors might have previously undergone hospitalization, the characteristics of their microbiota may have been modified by the bacteria present in this environment, both in terms of their composition [3, 6] as their resistance to antimicrobials [39].

Although some isolates presented a MDR profile, most of the isolates submitted to the first treatment with PEN and EST were susceptible to one or both of these antimicrobials. This suggests that other factors that are unrelated to antimicrobial resistance may be contributing to the persistence of these bacteria in skin allografts. The inefficiency of EST to eliminate bacteria may be due to the fact that aminoglycosides are indicated in combination with other active agents, (i.e.,  $\beta$ -lactam) [11]. This may explain why EST alone was not able to eliminate PEN-resistant staphylococci isolates.

Pirnay et al. [8] tested a cocktail (TM1) containing penicillin, EST, and amphotericin B and observed that it failed to decontaminate 47.4% of skin grafts tested. Of the seven skin samples that were treated with PEN and EST in this study, the contamination was also shown to persist. Pirnay et al. also tested a second cocktail (TM2) composed of GEN sulfate, imipenem/cilastin, polymyxin B sulfate, VAN HCl, and nystatin and found that it was also unable to decontaminate the skin samples. Disk-diffusion analysis demonstrated that bacteria from samples treated with TM2 were susceptible to at least one of the antibiotics present in the cocktail, as has been observed in this study. Gaucher et al. [3] also reported the persistence of VAN-susceptible bacteria even after skin allografts were treated with a cocktail containing high concentration of this antimicrobial.

Some reasons may cause antimicrobial skin decontamination to be inefficient even if the bacteria are susceptible to them. For example, spore-forming bacteria can remain dormant for long periods and are extremely resistant to the action of antimicrobials [40]. Bacteria may also remain within pores or hair follicles and thus evade the action of antimicrobials that cannot reach such sites [41]. Some bacteria may also form biofilms on the skin [42]. Some studies have already reported biofilm formation in other types of grafts, such as bone [43] and prosthetic vascular grafts [44].

The organization of bacterial cells into a biofilm may cause them to be more tolerant to the effects of antimicrobial agents; even bacteria that do not have a genetic basis for antimicrobial resistance may reduce their susceptibility when they form biofilms [45]. It is important to highlight that most of the antimicrobials used in the clinic only target cells in the planktonic state. Furthermore, some antimicrobial agents may stimulate the production of biofilms by certain microorganisms [46]. For the treatment of allogeneic skin grafts it may therefore be necessary to incorporate not only antibiotics but also other compounds that interfere with other functions of bacterial cells (i.e., biofilm destabilization or spore elimination).

In this study, all Gram-positive cocci and bacilli were susceptible to AMI, GEN, and TET. Therefore one or more of these antimicrobials could be included into a skin treatment cocktail. Adjustments in the concentrations of antimicrobials already used in the skin bank, or

combinations of antimicrobials of different classes, may be more efficient in the process of skin allograft decontamination. Some studies have already tested GEN and AMI in different cocktails for the treatment of skin allografts [6, 47]; however, TET has not yet been tested. This should encourage future studies to combine the antimicrobials with the best inhibitory potential.

## Conclusions

This is the first article to describe a microbiological screening and antimicrobial susceptible profile for bacteria isolated from human skin allografts in a Brazilian skin bank. *Bacillus*, *Paenibacillus*, and *Staphylococcus* were isolated thus demonstrating the predominance of Gram-positive bacteria contamination. Although several isolates presented multiresistance profiles, the persistence of the contamination in the majority of samples was not related to the antimicrobial resistance phenotype. This suggests that other factors may be responsible for the persistence of these bacteria in allogeneic skin. Biofilm formation is one such factor and should be studied further, especially considering that its presence in skin allografts could have a direct influence on the treatment method.

All isolates were susceptible to GEN, AMI, and TET and these antimicrobials showed the best inhibitory potential. Therefore these could be considered as an option for a more effective treatment cocktail.

It is important to share the results of this study to compare and discuss methodologies and findings among different tissue banks. This will help to reduce the rate of discards due to microbial contamination, increase the supply of suitable allogeneic skin, and guarantee greater safety to skin allografts recipients.

**Abbreviations:** AMI, amikacin; ATM, antimicrobials; AZM, azithromycin; BHI, broth heart brain infusion; CFO, cefoxitin; CIP, ciprofloxacin; CNS, coagulase-negative staphylococci; EST, streptomycin; GEN, gentamicin; MALDI-TOF, matrix assisted laser desorption ionization–time of flight; MDR, multidrug resistant; MHA, Mueller Hinton agar; MIC, minimal inhibitory

concentration; PEN, penicillin; TET, tetracycline; TGB, thioglycolate broth; TSA, tryptone soya agar; TSB, tryptone soya broth; VAN, vancomycin; WT, without treatment.

## **Declarations**

**Ethics approval:** This research has been approved by the Research Ethics Committees of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (protocol CAAE 36949514.8.0000.5347) and the Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (protocol CAAE 45100215.1.0000.5335).

**Consent for publication:** Not applicable.

**Availability of data and materials:** All data and materials generated during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

**Competing interests:** The authors declare that they have no competing interests.

**Funding:** This study received a grant from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

**Authors' contributions:** KLM, GC, and MPG designed the experiments; KLM, MC, LMO, and TSH performed the experiments; KLM, GC, and MPG analyzed the data and wrote the manuscript; All authors read and approved the final manuscript.

**Acknowledgements:** We would like to thank Aline Francielle Damo Souza and Luana Pretto from the skin bank of Dr. Roberto Corrêa Chem from the Hospital Complex Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre for preparing the skin allografts samples for this study.

**Authors' Information:** Karine Lena Meneghetti, Micaela do Canto Canabarro, Letícia Muner Otton, Thaís dos Santos Hain, Mercedes Passos Geimba, Gertrudes Corção\*. All members of the Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Institute of Basic Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Sarmiento Leite 500, 90050-170, Porto Alegre, Brazil. \*Correspondence: corcao@ufrgs.br

## References

1. Pianigiani E, Risulo M, Ierardi F, Sbrano P, Andreassi L, Fimiani M, et al. Prevalence of skin allograft discards as a result of serological and molecular microbiological screening in a regional skin bank in Italy. *Burns*. 2006;32:348-51.
2. Britton-Byrd BW, Lynch JP, Williamson S, McCauley RL. Early use of allograft skin: are 3-day microbiologic cultures safe? *J Trauma*. 2008;64:816-18.
3. Gaucher S, Khaznadar Z, Gourevitch JC, Jarraya M. Skin donors and human skin allografts: evaluation of an 11-year practice and discard in a referral tissue bank. *Cell Tissue Bank*. 2016;17:11-9.
4. Verbeken G, Verween G, De Vos D, Pascual B, De Corte P, Richters C, et al. Glycerol treatment as recovery procedure for cryopreserved human skin allografts positive for bacteria and fungi. *Cell Tissue Bank*. 2012;13:1-7.
5. Eastlund T. Bacterial infection transmitted by human tissue allograft transplantation. *Cell Tissue Bank*. 2006;7:147-66.
6. Mathur M, De A, Gore M. Microbiological assessment of cadaver skin grafts received in a skin bank. *Burns*. 2009;35:104-6.
7. Silveira DPM, Rech DL, Neto ASP, Martins ALM, Ely PB, Chem EM. Banco de Pele de Porto Alegre: produtividade e perfil dos doadores. *Rev Bras Cir Plást*. 2013;28:1-103.
8. Pirnay JP, Verween G, Pascual B, Verbeken G, De Corte P, Rose T, et al. Evaluation of a microbiological screening and acceptance procedure for cryopreserved skin allografts based on 14-day cultures. *Cell Tissue Bank*. 2012;13:287-95.
9. Pitt TL, Tidey K, Roy A, Ancliff S, Lomas R, McDonald CP. Activity of four antimicrobial cocktails for tissue allograft decontamination against bacteria and *Candida* spp. of known susceptibility at different temperatures. *Cell Tissue Bank*. 2014;15:119-25.
10. Johnston C, Callum J, Mohr J, Duong A, Garibaldi A, Simunovic N, et al. Disinfection of human skin allografts in tissue banking: a systematic review report. *Cell Tissue Bank*. 2016;17:585-92.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Fifth Informational Supplement M100-S25. Wayne, PA, United States, 2015.
12. Habrun B, Racic I, Kompes G, Spicic S, Benic M, Mihaljevic Z, Cvetnic Z. The antimicrobial susceptibility and virulence factors of *Bacillus anthracis* strains isolated in Croatia. *Vet Med*. 2011;56 Suppl 1:22-7.
13. Owusu-Kwarteng J, Wuni A, Akabanda F, Tano-Debrah K, Jespersen L. Prevalence, virulence factor genes and antibiotic resistance of *Bacillus cereus* sensu lato isolated from dairy farms and traditional dairy products. *BMC Microbiol*. 2017;17:65.
14. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 7.1, 2017. [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_7.1\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_7.1_Breakpoint_Tables.pdf). Accessed 10 May 2017.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria. Approved Guidelines: Second Edition M45-A2. Wayne, PA, United States, 2010.
16. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18:268-81.
17. Matisoski AR, Silva CR, Silva-Cunha DR, Calomeno LH, Bonato FT, Nigro MA. First-year experience of a new skin bank in Brazil. *Plast Aesthet Res*. 2015;2:326-31.
18. Lindford AJ, Frey I, Vuola J, Koljonen V. Evolving practice of the Helsinki Skin Bank. *Int Wound J*. 2010;7:277-81.

19. Saegeman VS, Ectors NL, Lismont D, Verduyck B, Verhaegen J. Short- and long-term bacterial inhibiting effect of high concentrations of glycerol used in the preservation of skin allografts. *Burns*. 2008;34:205-11.
20. Brown KL. Control of bacterial spores. *Br Med Bull*. 2000;56:158-71.
21. Tarale P, Gawande S, Jambhulkar V. Antibiotic susceptibility profile of bacilli isolated from the skin of healthy humans. *Braz J Microbiol*. 2015;46:1111-8.
22. Nerandzic MM, Rackaityte E, Jury LA, Eckart K, Donskey CJ. Novel strategies for enhanced removal of persistent *Bacillus anthracis* surrogates and *Clostridium difficile* spores from skin. *PLoS One* 2013;8:e68706.
23. Celandroni F, Salvetti S, Gueye SA, Mazzantini D, Lupetti A, Senesi S, et al. Identification and pathogenic potential of clinical *Bacillus* and *Paenibacillus* isolates. *PLoS One* 2016;11:e0152831.
24. Von Eiff C, Arciola CR, Montanaro L, Becker K, Campoccia D. Emerging *Staphylococcus* species as new pathogens in implant infections. *Int J Artif Organs* 2006;29:360-7.
25. Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27:870-926.
26. Ferrand J, Hadou T, Selton-Suty C, Goehringer F, Sadoul N, Alauzet C, et al. Cardiac device-related endocarditis caused by *Paenibacillus glucanolyticus*. *J Clin Microbiol*. 2013;51:3439-42.
27. Tatu AL, Ionescu MA, Clatici VG, Cristea VC. *Bacillus cereus* strain isolated from *Demodex folliculorum* in patients with topical steroid-induced rosaceiform facial dermatitis. *An Bras Dermatol*. 2016;91:676-8.
28. Saleh F, Kheirandish F, Azizi H, Azizi M. Molecular diagnosis and characterization of *Bacillus subtilis* isolated from burn wound in Iran. *Res Mol Med*. 2014;2:40-4.
29. Bentur HN, Dalzell AM, Riordan FA. Central venous catheter infection with *Bacillus pumilus* in an immunocompetent child: a case report. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2007;6:12.
30. Yuste JR, Franco SE, Sanders C, Cruz S, Fernández-Rivero ME, Mora G. *Bacillus licheniformis* as a cause of a deep skin abscess in a 5-year-old girl: an exceptional case following a plant thorn injury. *J Microbiol Immunol Infect*. 2016;49:819-21.
31. Lacey KA, Geoghegan JA, McLoughlin RM. The role of *Staphylococcus aureus* virulence factors in skin infection and their potential as vaccine antigens. *Pathogens* 2016;5:22.
32. Petti CA, Simmon KE, Miro JM, Hoen B, Marco F, Chu VH, et al. Genotypic diversity of coagulase-negative staphylococci causing endocarditis: a global perspective. *J Clin Microbiol*. 2008;46:1780-4.
33. Atique FB, Khalil MM. The bacterial contamination of allogeneic bone and emergence of multidrug-resistant bacteria in tissue bank. *Biomed Res Int*. 2014; 430581.
34. Pianigiani E, Ierardi F, Cuciti C, Brignali S, Oggioni M, Fimiani M. Processing efficacy in relation to microbial contamination of skin allografts from 723 donors. *Burns*. 2010; 36:347-51.
35. Eagle H, Musselman AD. The rate of bactericidal action of penicillin in vitro as a function of its concentration, and its paradoxically reduced activity at high concentrations against certain organisms. *J Exp Med*. 1948;88:99-131.
36. Henderson-Begg SK, Livermore DM, Hall LMC. Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on mutation frequency in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother*. 2006;57:849-54.
37. Logan N, Turnbull PCB. *Bacillus* and other aerobic endosporeforming bacteria. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH et al., editors. *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2003. p.445-60.
38. Horner C, Mawer D, Wilcox M. Reduced susceptibility to chlorhexidine in staphylococci: is it increasing and does it matter? *J Antimicrob Chemother*. 2012;67:2547-59.
39. Kwaszewska AK, Sobiś-Glinkowska M, Szewczyk EM. Influence of contact with hospital environment on sensitivity to antibiotics of lipophilic strains of *Corynebacterium* residing on human skin. *Med Dosw Mikrobiol*. 2009;61:359-66.

40. Grady EN, MacDonald J, Liu L, Richman A, Yuan ZC. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microb Cell Fact*. 2016;15:203.
41. Achermann Y, Goldstein EJ, Coenye T, Shirtliff ME. *acnes*: from commensal to opportunistic biofilm-associated implant pathogen. *Clin Microbiol Ver*. 2014;27:419-40.
42. Shin K, Yun Y, Yi S, Lee HG, Cho JC, Suh KD, et al. Biofilm-forming ability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from human skin. *J Dermatol Sci*. 2013;71: 130-7.
43. Trampuz A, Zimmerli W. Diagnosis and treatment of infections associated with fracture-fixation devices. *Injury* 2006;37 Suppl 2:S59-66.
44. Russu E, Mureşan A, Grigorescu B. Vascular graft infections management. *Clin Manage*. 2011;3:16-9.
45. Anderl JN, Franklin MJ, Stewart OS. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Ch*. 2000;44:1818-24.
46. Costa JC, Espescht IF, Pieri FA, Benjamin LA, Moreira MA. Increased production of biofilms by *Escherichia coli* in the presence of enrofloxacin. *Vet Microbiol*. 2012;160:488-90.
47. Neely AN, Plessinger RT, Stamper B, Kagan RJ. Can contamination of a patient's allograft be traced back to the allograft donor? *J Burn Care Res*. 2008;29:73-6.

## Additional Files - Additional file 1

Table S1. Susceptibility profile and antimicrobial MIC values of Gram-positive bacilli isolated from human skin allografts with and without antimicrobial treatment.										
Isolates	Treatment			Antimicrobial resistance profile	MIC values ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	WT	1ST	1ST/2ND		PEN	EST	VAN	AMI	GEN	TET
<i>Bacillus cereus</i>		X	X	PEN	>32	2	4	1	1	0,5
<i>Bacillus cereus</i>		X	X	PEN	>32	4	8	0,5	0,5	0,25
<i>Bacillus cereus</i>		X	X	PEN	>32	2	8	1	1	0,5
<i>Bacillus cereus</i>		X	X	PEN	>32	2	4	1	1	1
<i>Bacillus cereus</i>		X	X	PEN	>32	4	4	0,5	1	0,5
<i>Bacillus cereus</i>		X	X	PEN	>32	4	8	0,5	1	1
<i>Bacillus cereus</i>		X	X	PEN	>32	2	4	0,5	1	0,5
<i>Bacillus cereus</i>		X	X	PEN	>32	8	8	0,5	0,25	0,25
<i>Bacillus cereus</i>		X	X	PEN	>32	16	8	2	1	0,25
<i>Bacillus</i> sp.	X			PEN	0,5	1	0,5	0,25	0,12	0,5
<i>Bacillus</i> sp.	X			PEN	0,03	2	0,25	0,25	0,12	0,25
<i>Bacillus</i> sp.	X			PEN	0,25	2	0,25	0,25	0,12	0,25
<i>Bacillus subtilis</i>	X			PEN	0,03	2	0,5	0,12	<0,06	0,03
<i>Bacillus licheniformis</i>	X			PEN	>32	4	1	1	0,25	0,12
<i>Bacillus licheniformis</i>	X			PEN	>32	4	2	1	0,5	0,5
<i>Bacillus licheniformis</i>	X			PEN	>32	8	0,5	1	0,5	0,25
<i>Bacillus vallismortis</i>	X			PEN	0,5	1	1	0,5	0,5	1
<i>Bacillus licheniformis</i>	X			PEN	>32	16	1	1	0,5	1
<i>Bacillus cereus</i>	X			PEN	>32	2	4	0,5	1	8
<i>Bacillus cereus</i>	X			PEN	4	2	2	0,5	1	2
<i>Bacillus vallismortis</i>	X			CFO	1	1	2	0,25	0,12	0,25

1ST, isolates obtained from skin samples previously submitted to the first cycle of treatment with penicillin and streptomycin in the skin bank; 2ND, isolates obtained from skin samples previously submitted to the second cycle of treatment with vancomycin; AMI, amikacin; ATM, antimicrobials; AZM, azithromycin; CFO, cefoxitin; CIP, ciprofloxacin; CNS, coagulase-negative staphylococci; EST, streptomycin; GEN, gentamicin; MIC, minimal inhibitory concentration; PEN, penicillin; TET, tetracycline; VAN, vancomycin; WT, without treatment.

Isolates	Treatment			Antimicrobial resistance profile	MIC values (µg/mL)					
	WT	1ST	1ST/ 2ND		PEN	EST	VAN	AMI	GEN	TET
<i>Bacillus cereus</i>		X	X	PEN-CFO	>32	4	16	1	2	1
<i>Bacillus cereus</i>		X	X	PEN-CFO	>32	2	16	2	2	1
<i>Bacillus cereus</i>		X	X	PEN-CFO	>32	4	16	2	4	1
<i>Bacillus cereus</i>		X	X	PEN-CFO	>32	4	8	0,5	0,5	0,5
<i>Bacillus cereus</i>		X	X	PEN-CFO	>32	2	4	0,5	0,5	1
<i>Bacillus cereus</i>		X	X	PEN-CFO	>32	4	4	0,5	1	0,5
<i>Bacillus cereus</i>		X	X	PEN-CFO	>32	2	4	0,5	0,5	0,25
<i>Bacillus cereus</i>		X	X	PEN-CFO	>32	4	2	1	2	2
<i>Bacillus cereus</i>		X	X	PEN-CFO	>32	2	2	0,5	1	2
<i>Bacillus cereus</i>		X	X	PEN-CFO	>32	4	16	1	1	0,5
<i>Bacillus cereus</i>		X	X	PEN-CFO	>32	1	8	2	1	0,5
<i>Bacillus cereus</i>		X	X	PEN-CFO	>32	4	16	0,5	0,5	0,25
<i>Bacillus cereus</i>		X	X	PEN-CFO	16	1	8	0,5	0,5	0,5
<i>Bacillus cereus</i>		X	X	PEN-CFO	>32	2	4	0,5	0,5	1
<i>Bacillus cereus</i>		X	X	PEN-CFO	>32	2	8	1	1	0,5
<i>Bacillus cereus</i>		X	X	PEN-CFO	>32	4	8	0,5	0,5	0,5
<i>Bacillus cereus</i>		X	X	PEN-CFO	>32	2	8	0,5	0,25	0,25
<i>Bacillus cereus</i>		X	X	PEN-CFO	>32	16	4	0,5	0,5	0,5
<i>Bacillus cereus</i>		X		PEN-CFO	>32	2	>256	0,5	0,5	4
<i>Bacillus cereus</i>	X			PEN-CFO	>32	4	8	1	2	1
<i>Bacillus cereus</i>	X			PEN-CFO	>32	2	4	1	1	16

1ST, isolates obtained from skin samples previously submitted to the first cycle of treatment with penicillin and streptomycin in the skin bank; 2ND, isolates obtained from skin samples previously submitted to the second cycle of treatment with vancomycin; AMI, amikacin; ATM, antimicrobials; AZM, azithromycin; CFO, cefoxitin; CIP, ciprofloxacin; CNS, coagulase-negative staphylococci; EST, streptomycin; GEN, gentamicin; MIC, minimal inhibitory concentration; PEN, penicillin; TET, tetracycline; VAN, vancomycin; WT, without treatment.

Isolates	Treatment			Antimicrobial resistance profile	MIC values ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	WT	1ST	1ST/ 2ND		PEN	EST	VAN	AMI	GEN	TET
<i>Bacillus cereus</i>	X			PEN-CFO	>32	2	4	1	2	16
<i>Bacillus cereus</i>	X			PEN-CFO	>32	2	8	2	2	16
<i>Bacillus cereus</i>	X			PEN-CFO	>32	4	4	1	1	16
<i>Bacillus cereus</i>	X			PEN-CFO	>32	2	4	1	0,25	8
<i>Bacillus cereus</i>	X			PEN-CFO	>32	16	2	0,25	0,25	2
<i>Bacillus cereus</i>	X			PEN-CFO	>32	4	4	0,5	1	4
<i>Bacillus cereus</i>	X			PEN-CFO	>32	4	2	1	1	4
<i>Bacillus cereus</i>	X			PEN-CFO	16	1	2	1	1	2
<i>Bacillus cereus</i>	X			PEN-CFO	4	1	4	0,5	2	2
<i>Bacillus cereus</i>	X			PEN-CFO	>32	4	2	0,5	1	4
<i>Bacillus cereus</i>	X			PEN-CFO	>32	2	2	0,5	1	4
<i>Bacillus cereus</i>	X			PEN-CFO	>32	1	2	1	1	2
<i>Paenibacillus</i> sp.		X		CFO-EST	1	>512	2	0,12	0,12	0,12
<i>Paenibacillus</i> sp.		X		CFO-EST	1	>512	2	1	1	0,25
<i>Paenibacillus</i> sp.		X		CFO-EST	0,5	>512	1	0,12	<0,06	<0,015
<i>Bacillus cereus</i>		X	X	PEN-AZM	>32	4	8	0,5	1	0,25
<i>Bacillus cereus</i>		X	X	PEN-CFO-EST	8	128	4	1	4	4
<i>Bacillus cereus</i>		X	X	PEN-CFO-EST	16	128	4	0,5	1	8
<i>Bacillus cereus</i>		X	X	PEN-CFO-EST	0,06	128	0,5	0,5	2	0,5
<i>Bacillus cereus</i>		X	X	PEN-CFO-EST	>32	128	8	0,5	0,5	2
<i>Bacillus cereus</i>		X	X	PEN-CFO-EST	>32	128	8	1	1	1

1ST, isolates obtained from skin samples previously submitted to the first cycle of treatment with penicillin and streptomycin in the skin bank; 2ND, isolates obtained from skin samples previously submitted to the second cycle of treatment with vancomycin; AMI, amikacin; ATM, antimicrobials; AZM, azithromycin; CFO, cefoxitin; CIP, ciprofloxacin; CNS, coagulase-negative staphylococci; EST, streptomycin; GEN, gentamicin; MIC, minimal inhibitory concentration; PEN, penicillin; TET, tetracycline; VAN, vancomycin; WT, without treatment.

Table S1. Continued.

Isolates	Treatment			Antimicrobial resistance profile	MIC values (µg/mL)					
	WT	1ST	1ST/ 2ND		PEN	EST	VAN	AMI	GEN	TET
<i>Bacillus cereus</i>		X	X	PEN-CFO-EST	>32	256	8	2	4	1
<i>Paenibacillus</i> sp.		X		PEN-CFO-EST	1	>512	1	0,12	<0,06	0,015
<i>Paenibacillus</i> sp.		X		PEN-CFO-EST	1	>512	1	0,25	0,06	0,03
<i>Bacillus cereus</i>		X	X	PEN-CFO-AZM	>32	64	8	0,5	0,5	0,5
<i>Bacillus</i> sp.		X	X	Susceptible to all ATM	0,25	1	1	0,25	0,5	0,25
<i>Bacillus subtilis</i>		X	X	Susceptible to all ATM	0,03	2	2	0,25	0,12	0,12
<i>Bacillus subtilis</i>		X	X	Susceptible to all ATM	1	1	0,5	0,25	0,12	0,25
<i>Bacillus</i> sp.		X	X	Susceptible to all ATM	4	1	2	0,25	0,06	2
<i>Bacillus</i> sp.		X		Susceptible to all ATM	0,03	4	1	0,12	0,5	2
<i>Bacillus</i> sp.	X			Susceptible to all ATM	0,03	1	0,5	0,25	0,25	8
<i>Bacillus</i> sp.	X			Susceptible to all ATM	0,5	4	0,25	0,5	1	8
<i>Bacillus</i> sp.	X			Susceptible to all ATM	0,12	2	1	0,5	0,25	8
<i>Bacillus</i> sp.	X			Susceptible to all ATM	0,25	1	64	1	1	8
<i>Bacillus</i> sp.	X			Susceptible to all ATM	0,25	2	1	1	0,5	16
<i>Bacillus</i> sp.	X			Susceptible to all ATM	0,12	1	2	0,5	0,5	16
<i>Bacillus</i> sp.	X			Susceptible to all ATM	0,12	1	2	0,25	0,5	8
<i>Bacillus</i> sp.	X			Susceptible to all ATM	0,5	4	1	0,25	1	8
<i>Bacillus</i> sp.	X			Susceptible to all ATM	0,015	4	0,5	0,25	0,25	2
<i>Bacillus</i> sp.	X			Susceptible to all ATM	0,25	1	0,25	0,25	0,12	0,25
<i>Bacillus</i> sp.	X			Susceptible to all ATM	1	1	1	0,5	0,12	0,25
<i>Bacillus</i> sp.	X			Susceptible to all ATM	0,015	1	0,5	0,12	0,5	0,12

1ST, isolates obtained from skin samples previously submitted to the first cycle of treatment with penicillin and streptomycin in the skin bank; 2ND, isolates obtained from skin samples previously submitted to the second cycle of treatment with vancomycin; AMI, amikacin; ATM, antimicrobials; AZM, azithromycin; CFO, cefoxitin; CIP, ciprofloxacin; CNS, coagulase-negative staphylococci; EST, streptomycin; GEN, gentamicin; MIC, minimal inhibitory concentration; PEN, penicillin; TET, tetracycline; VAN, vancomycin; WT, without treatment.

Isolates	Treatment			Antimicrobial resistance profile	MIC values (µg/mL)					
	WT	1ST	1ST/ 2ND		PEN	EST	VAN	AMI	GEN	TET
<i>Bacillus</i> sp.	X			Susceptible to all ATM	0.015	1	0,25	0,25	0,25	0,12
<i>Bacillus</i> sp.	X			Susceptible to all ATM	0.03	1	0,25	0,25	2	0,12
<i>Bacillus</i> sp.	X			Susceptible to all ATM	0.12	1	1	0,5	0,5	0,5
<i>Bacillus</i> sp.	X			Susceptible to all ATM	0.25	1	128	8	0,12	64
<i>Bacillus</i> sp.	X			Susceptible to all ATM	0.25	2	1	1	0,5	0,12
<i>Bacillus</i> sp.	X			Susceptible to all ATM	0.06	1	0,12	0,25	1	0,25
<i>Bacillus</i> sp.	X			Susceptible to all ATM	0.015	1	0,5	0,25	1	0,12
<i>Bacillus</i> sp.	X			Susceptible to all ATM	0.06	1	0,25	0,25	1	0,5
<i>Bacillus</i> sp.	X			Susceptible to all ATM	0.03	1	1	0,25	0,12	0,12
<i>Bacillus</i> sp.	X			Susceptible to all ATM	0.25	1	0,5	0,5	0,5	2
<i>Bacillus</i> sp.	X			Susceptible to all ATM	0.06	1	0,5	0,5	0,5	0,25
<i>Bacillus</i> sp.	X			Susceptible to all ATM	0.03	1	1	0,5	1	0,12
<i>Bacillus</i> sp.	X			Susceptible to all ATM	0.015	2	0,5	0,015	0,06	0,015
<i>Bacillus</i> sp.	X			Susceptible to all ATM	0,5	1	1	0,5	0,12	0,5
<i>Bacillus</i> sp.	X			Susceptible to all ATM	1	4	0,5	0,25	0,12	0,5
<i>Bacillus subtilis</i>	X			Susceptible to all ATM	0,015	1	0,5	0,25	0,06	0,12
<i>Bacillus subtilis</i>	X			Susceptible to all ATM	0,015	4	2	0,5	1	8
<i>Bacillus subtilis</i>	X			Susceptible to all ATM	0,5	1	0,5	0,25	0,12	0,12
<i>Bacillus subtilis</i>	X			Susceptible to all ATM	0.06	1	0,25	0,25	0,12	0,12
<i>Bacillus subtilis</i>	X			Susceptible to all ATM	0.25	1	16	0,25	0,12	1
<i>Bacillus subtilis</i>	X			Susceptible to all ATM	0.25	1	2	0,12	<0,06	0,06

1ST, isolates obtained from skin samples previously submitted to the first cycle of treatment with penicillin and streptomycin in the skin bank; 2ND, isolates obtained from skin samples previously submitted to the second cycle of treatment with vancomycin; AMI, amikacin; ATM, antimicrobials; AZM, azithromycin; CFO, cefoxitin; CIP, ciprofloxacin; CNS, coagulase-negative staphylococci; EST, streptomycin; GEN, gentamicin; MIC, minimal inhibitory concentration; PEN, penicillin; TET, tetracycline; VAN, vancomycin; WT, without treatment.

Isolates	Treatment			Antimicrobial resistance profile	MIC values ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	WT	1ST	1ST/ 2ND		PEN	EST	VAN	AMI	GEN	TET
<i>Bacillus subtilis</i>	X			Susceptible to all ATM	0,03	32	4	0,5	0,5	16
<i>Bacillus subtilis</i>	X			Susceptible to all ATM	0,03	32	0,5	0,12	<0,06	4
<i>Bacillus subtilis</i>	X			Susceptible to all ATM	0,03	32	0,5	0,12	0,06	4
<i>Bacillus subtilis</i>	X			Susceptible to all ATM	0,015	4	0,5	0,12	0,06	4
<i>Bacillus subtilis</i>	X			Susceptible to all ATM	0,12	16	0,5	0,5	0,12	4
<i>Bacillus subtilis</i>	X			Susceptible to all ATM	0,06	8	2	0,5	0,25	16
<i>Bacillus subtilis</i>	X			Susceptible to all ATM	0,25	2	1	0,25	0,12	4
<i>Bacillus subtilis</i>	X			Susceptible to all ATM	0,25	32	0,5	0,5	0,12	8
<i>Bacillus cereus</i>	X			Susceptible to all ATM	>32	2	8	1	2	16
<i>Bacillus cereus</i>	X			Susceptible to all ATM	8	1	2	0,5	1	4
<i>Bacillus vallismortis</i>	X			Susceptible to all ATM	0.015	1	0,5	0,5	0,25	0,12
<i>Bacillus vallismortis</i>	X			Susceptible to all ATM	0.015	1	1	0,25	<0,06	0,06
<i>Bacillus pumilus</i>	X			Susceptible to all ATM	0.03	2	2	0,25	1	2

1ST, isolates obtained from skin samples previously submitted to the first cycle of treatment with penicillin and streptomycin in the skin bank; 2ND, isolates obtained from skin samples previously submitted to the second cycle of treatment with vancomycin; AMI, amikacin; ATM, antimicrobials; AZM, azithromycin; CFO, cefoxitin; CIP, ciprofloxacin; CNS, coagulase-negative staphylococci; EST, streptomycin; GEN, gentamicin; MIC, minimal inhibitory concentration; PEN, penicillin; TET, tetracycline; VAN, vancomycin; WT, without treatment.

Table S2. Susceptibility profile and antimicrobial MIC values of Gram-positive cocci isolated from human skin allografts with and without antimicrobial treatment.

Isolates	Treatment			Antimicrobial resistance profile	MIC values (µg/mL)					
	WT	1ST	1ST/2ND		PEN	EST	VAN	AMI	GEN	TET
<i>Staphylococcus aureus</i>	X			PEN	>32	8	2	1	1	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	X			PEN	>32	8	2	2	1	0,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	X			PEN	>32	2	2	1	0,25	0,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	X			PEN	>32	8	2	0,25	1	0,25
<i>Staphylococcus aureus</i>	X			PEN	>32	8	2	1	2	0,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	X			PEN	>32	8	2	1	0,06	0,12
<i>Staphylococcus aureus</i>	X			PEN	4	4	2	2	1	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	X			PEN	>32	4	2	2	1	0,25
<i>Staphylococcus aureus</i>	X			PEN	2	4	2	1	0,25	0,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	X			PEN	>32	8	2	2	2	0,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	X			PEN	>32	16	2	1	2	0,5
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	X			PEN	0,12	4	2	1	1	1
Coagulase-negative staphylococci		X		CFO	0,06	4	4	0,5	0,25	1
Coagulase-negative staphylococci		X		AZM	0,12	4	2	0,25	0,25	1
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	X			AZM	0,03	2	4	0,5	0,5	0,25
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	X			AZM	0,03	2	2	1	<0,06	0,12
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	X			AZM	0,06	1	2	0,25	<0,06	0,06
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	X			AZM	0,25	1	2	0,5	0,25	0,12
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	X			AZM	0,06	2	2	0,25	<0,06	0,06
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	X			AZM	0,06	2	2	0,5	0,12	0,25
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	X			AZM	0,06	4	2	0,25	0,25	0,5

1ST, isolates obtained from skin samples previously submitted to the first cycle of treatment with penicillin and streptomycin in the skin bank; 2ND, isolates obtained from skin samples previously submitted to the second cycle of treatment with vancomycin; AMI, amikacin; ATM, antimicrobials; AZM, azithromycin; CFO, cefoxitin; CIP, ciprofloxacin; CNS, coagulase-negative staphylococci; EST, streptomycin; GEN, gentamicin; MIC, minimal inhibitory concentration; PEN, penicillin; TET, tetracycline; VAN, vancomycin; WT, without treatment.

Isolates	Treatment			Antimicrobial resistance profile	MIC values ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	WT	1ST	1ST/ 2ND		PEN	EST	VAN	AMI	GEN	TET
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	X			AZM	0,12	1	4	0,12	<0,06	0,12
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	X			AZM	0,12	2	2	0,12	<0,06	0,12
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	X			AZM	0,12	1	2	0,12	<0,06	0,12
<i>Staphylococcus aureus</i>	X			PEN-CIP	2	4	1	1	1	0,25
<i>Staphylococcus aureus</i>	X			PEN-CIP	>32	16	2	2	2	0,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	X			PEN-CIP	4	4	1	1	0,25	0,25
<i>Staphylococcus aureus</i>	X			PEN-CIP	>32	8	2	2	2	0,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	X			PEN-CIP	>32	8	2	0,5	0,25	0,25
<i>Staphylococcus aureus</i>	X			PEN-CIP	0,12	8	0,25	0,12	<0,06	0,12
<i>Staphylococcus aureus</i>	X			PEN-CIP	8	4	2	2	0,5	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			PEN-CIP	>32	16	2	2	2	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			PEN-CIP	>32	8	4	1	2	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			PEN-CIP	2	16	2	1	2	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			PEN-AZM	0,12	2	2	0,5	0,5	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			CIP-AZM	>32	8	2	2	0,25	4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			CFO-CIP-AZM	2	2	4	2	0,5	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			CFO-CIP-AZM	>32	4	2	2	2	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			CFO-CIP-AZM	>32	4	2	1	0,5	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			CFO-CIP-AZM	>32	2	2	2	0,5	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			CFO-CIP-AZM	8	8	2	2	1	2
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	X			CFO-CIP-AZM	2	2	2	2	0,5	1

1ST, isolates obtained from skin samples previously submitted to the first cycle of treatment with penicillin and streptomycin in the skin bank; 2ND, isolates obtained from skin samples previously submitted to the second cycle of treatment with vancomycin; AMI, amikacin; ATM, antimicrobials; AZM, azithromycin; CFO, cefoxitin; CIP, ciprofloxacin; CNS, coagulase-negative staphylococci; EST, streptomycin; GEN, gentamicin; MIC, minimal inhibitory concentration; PEN, penicillin; TET, tetracycline; VAN, vancomycin; WT, without treatment.

Isolates	Treatment			Antimicrobial resistance profile	MIC values ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	WT	1ST	1ST/ 2ND		PEN	EST	VAN	AMI	GEN	TET
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	X			AZM	0,12	1	4	0,12	<0,06	0,12
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	X			AZM	0,12	2	2	0,12	<0,06	0,12
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	X			AZM	0,12	1	2	0,12	<0,06	0,12
<i>Staphylococcus aureus</i>	X			PEN-CIP	2	4	1	1	1	0,25
<i>Staphylococcus aureus</i>	X			PEN-CIP	>32	16	2	2	2	0,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	X			PEN-CIP	4	4	1	1	0,25	0,25
<i>Staphylococcus aureus</i>	X			PEN-CIP	>32	8	2	2	2	0,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	X			PEN-CIP	>32	8	2	0,5	0,25	0,25
<i>Staphylococcus aureus</i>	X			PEN-CIP	0,12	8	0,25	0,12	<0,06	0,12
<i>Staphylococcus aureus</i>	X			PEN-CIP	8	4	2	2	0,5	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			PEN-CIP	>32	16	2	2	2	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			PEN-CIP	>32	8	4	1	2	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			PEN-CIP	2	16	2	1	2	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			PEN-AZM	0,12	2	2	0,5	0,5	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			CIP-AZM	>32	8	2	2	0,25	4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			CFO-CIP-AZM	2	2	4	2	0,5	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			CFO-CIP-AZM	>32	4	2	2	2	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			CFO-CIP-AZM	>32	4	2	1	0,5	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			CFO-CIP-AZM	>32	2	2	2	0,5	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			CFO-CIP-AZM	8	8	2	2	1	2
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	X			CFO-CIP-AZM	2	2	2	2	0,5	1

1ST, isolates obtained from skin samples previously submitted to the first cycle of treatment with penicillin and streptomycin in the skin bank; 2ND, isolates obtained from skin samples previously submitted to the second cycle of treatment with vancomycin; AMI, amikacin; ATM, antimicrobials; AZM, azithromycin; CFO, cefoxitin; CIP, ciprofloxacin; CNS, coagulase-negative staphylococci; EST, streptomycin; GEN, gentamicin; MIC, minimal inhibitory concentration; PEN, penicillin; TET, tetracycline; VAN, vancomycin; WT, without treatment.

Isolates	Treatment			Antimicrobial resistance profile	MIC values ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	WT	1ST	1ST/ 2ND		PEN	EST	VAN	AMI	GEN	TET
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	8	8	4	2	0,5	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	8	8	2	2	0,5	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	>32	8	2	2	1	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	>32	4	4	1	1	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	8	4	2	1	0,5	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	>32	8	2	0,5	0,5	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	1	2	2	1	0,25	0,5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	>32	2	2	2	4	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	8	2	2	2	0,5	4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	16	2	2	2	0,5	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	2	2	2	1	0,5	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	8	2	2	2	0,5	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	16	2	2	2	0,5	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	8	4	2	0,25	0,12	0,5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	8	2	2	2	0,5	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	>32	2	2	4	0,5	4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	>32	2	2	2	0,5	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	>32	4	2	2	0,5	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	8	4	4	2	0,5	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	16	4	2	2	0,25	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	1	8	2	1	0,25	1

1ST, isolates obtained from skin samples previously submitted to the first cycle of treatment with penicillin and streptomycin in the skin bank; 2ND, isolates obtained from skin samples previously submitted to the second cycle of treatment with vancomycin; AMI, amikacin; ATM, antimicrobials; AZM, azithromycin; CFO, cefoxitin; CIP, ciprofloxacin; CNS, coagulase-negative staphylococci; EST, streptomycin; GEN, gentamicin; MIC, minimal inhibitory concentration; PEN, penicillin; TET, tetracycline; VAN, vancomycin; WT, without treatment.

Isolates	Treatment			Antimicrobial resistance profile	MIC values ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	WT	1ST	1ST/ 2ND		PEN	EST	VAN	AMI	GEN	TET
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	2	4	4	2	0,25	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	>32	4	4	2	0,25	0,25
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	4	2	2	2	0,5	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	8	4	2	2	0,25	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	8	2	2	2	0,5	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	>32	1	2	2	0,25	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	>32	4	4	2	0,5	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	4	4	2	2	0,5	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	8	2	2	1	0,25	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	2	2	2	2	0,5	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	0,5	4	2	1	0,12	0,5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	0,25	4	2	2	0,5	0,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	>32	2	2	2	0,5	2
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	8	2	2	2	0,5	2
<i>Staphylococcus capitis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	>32	2	2	8	8	0,5
<i>Staphylococcus capitis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	>32	4	2	4	16	1
<i>Staphylococcus capitis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	>32	4	2	2	8	0,5
<i>Staphylococcus capitis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	>32	4	2	8	32	0,5
<i>Staphylococcus capitis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	>32	4	2	4	16	1
<i>Staphylococcus capitis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	>32	4	2	4	1	0,25
<i>Staphylococcus capitis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	>32	2	2	4	8	0,5

1ST, isolates obtained from skin samples previously submitted to the first cycle of treatment with penicillin and streptomycin in the skin bank; 2ND, isolates obtained from skin samples previously submitted to the second cycle of treatment with vancomycin; AMI, amikacin; ATM, antimicrobials; AZM, azithromycin; CFO, cefoxitin; CIP, ciprofloxacin; CNS, coagulase-negative staphylococci; EST, streptomycin; GEN, gentamicin; MIC, minimal inhibitory concentration; PEN, penicillin; TET, tetracycline; VAN, vancomycin; WT, without treatment.

Isolates	Treatment			Antimicrobial resistance profile	MIC values (µg/mL)					
	WT	1ST	1ST/ 2ND		PEN	EST	VAN	AMI	GEN	TET
<i>Staphylococcus capitis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	>32	2	4	4	8	0,5
<i>Staphylococcus capitis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	>32	2	2	4	4	0,5
<i>Staphylococcus capitis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	>32	2	2	4	4	0,25
<i>Staphylococcus capitis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	>32	2	4	8	16	2
<i>Staphylococcus capitis</i>	X			PEN-CFO-CIP-AZM	>32	4	2	8	4	0,25
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	X			Susceptible to all ATM	0,06	2	2	0,5	0,25	0,5
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	X			Susceptible to all ATM	0,03	1	2	0,25	<0,06	0,06
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	X			Susceptible to all ATM	0,03	1	4	0,5	0,12	0,5
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	X			Susceptible to all ATM	0,06	4	2	1	0,25	0,5
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	X			Susceptible to all ATM	2	4	1	0,25	0,12	2
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	X			Susceptible to all ATM	0,03	2	2	0,5	<0,06	0,25
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	X			Susceptible to all ATM	0,03	4	2	0,5	0,5	0,5
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	X			Susceptible to all ATM	0,06	16	2	0,5	<0,06	0,25
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	X			Susceptible to all ATM	0,015	4	2	4	2	0,25
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	X			Susceptible to all ATM	0,015	2	2	2	1	1
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	X			Susceptible to all ATM	0,06	4	2	1	1	0,5
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	X			Susceptible to all ATM	0,06	4	1	1	1	1
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	X			Susceptible to all ATM	0,06	2	2	1	1	1
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	X			Susceptible to all ATM	0,06	4	2	0,25	0,06	0,12
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	X			Susceptible to all ATM	0,06	4	2	0,5	0,5	0,5

1ST, isolates obtained from skin samples previously submitted to the first cycle of treatment with penicillin and streptomycin in the skin bank; 2ND, isolates obtained from skin samples previously submitted to the second cycle of treatment with vancomycin; AMI, amikacin; ATM, antimicrobials; AZM, azithromycin; CFO, cefoxitin; CIP, ciprofloxacin; CNS, coagulase-negative staphylococci; EST, streptomycin; GEN, gentamicin; MIC, minimal inhibitory concentration; PEN, penicillin; TET, tetracycline; VAN, vancomycin; WT, without treatment.

## 5.2 Artigo 2

### **Ação inibitória de coquetéis antimicrobianos sobre bactérias isoladas de peles alógenas e não alógenas.**

Karine Lena Meneghetti, Micaela do Canto Canabarro, Jéssica Araujo de Souza,

Alexandra da Silva Nunes, Mercedes Passos Geimba, Gertrudes Corção\*

## **Ação inibitória de coquetéis antimicrobianos sobre bactérias isoladas de peles alógenas e não alógenas.**

Karine Lena Meneghetti, Micaela do Canto Canabarro, Jéssica Araujo de Souza, Alexandra da Silva Nunes, Mercedes Passos Geimba, Gertrudes Corção\*

\* Correspondência: [corcao@ufrgs.br](mailto:corcao@ufrgs.br)

Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Sarmiento Leite 500, 90050-170, Porto Alegre, Brasil.

### **Resumo**

As práticas e diretrizes adotadas para o tratamento antimicrobiano de aloenxertos de pele pelos diferentes bancos de pele ao redor do mundo são muito variadas, incluindo diferentes composições, temperaturas e tempos de exposição o que torna o processo de descontaminação uma etapa crítica e de ampla discussão. Entre os principais coquetéis utilizados está o uso de um primeiro ciclo de tratamento com penicilina e estreptomicina, e como segunda opção o uso de antimicrobianos de amplo espectro, caso o primeiro ciclo de tratamento não elimine a contaminação. Contudo, há a preocupação com os descartes devido a contaminação bacteriana que persiste após os tratamentos aplicados. Diante disso, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade bactericida de diferentes coquetéis antimicrobianos sobre bactérias isoladas de peles alógenas e não alógenas, com diferentes perfis de susceptibilidade a antimicrobianos e com diferentes níveis ou ausência de formação de biofilme, no intuito de avaliar e propor um tratamento mais eficiente na eliminação de contaminação bacteriana de peles alógenas. Foram utilizados os antimicrobianos penicilina (PEN), Ceftazidima (CAZ), gentamicina (GEN) e tetraciclina (TET) em seis diferentes combinações que foram testados sobre 40 isolados bacterianos (no estado planctônico) incluindo os gêneros *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Stenotrophomonas* e cocobacilos Gram-negativos. Conforme os resultados obtidos, pode-se sugerir a utilização da combinação de PEN e GEN associadas a CAZ ou não, como um primeiro ciclo de tratamento na descontaminação de peles alógenas. Destaca-se a persistência de alguns isolados que não foram eliminados por nenhum dos coquetéis antimicrobianos, podendo ser atribuída à elevada resistência ou devido a formação de esporos.

**Palavras-chaves:** aloenxerto de pele, contaminação bacteriana de aloenxertos, resistência a antimicrobianos, biofilmes bacterianos

### **Introdução**

A transmissão de microrganismos infecciosos através de aloenxertos de pele humana representa um risco potencial para os receptores uma vez que estes são geralmente indivíduos imunologicamente deprimidos em consequência de lesões cutâneas graves, como queimaduras extensas severas ou feridas crônicas (Eastlund 2006; Pianigiani et al., 2006; Singh et al., 2016).

A presença de microrganismos em aloenxertos de pele é praticamente inevitável (Singh et al., 2016). Além de a microbiota da pele sadia ser diversa e influenciada pelos mais variados fatores ambientais e pelas características individuais de cada um (Rosenthal et al., 2011), a contaminação pode também ser influenciada pelas condições de armazenamento do corpo do doador cadáver antes da remoção do tecido, a manipulação física e o processamento do tecido antes e após ser coletado (Saegeman et al., 2007; Mathur et al., 2009). Ou seja, a exposição ao ambiente hospitalar pode influenciar sobre as características de composição e de susceptibilidade a antimicrobianos das bactérias isoladas de indivíduos que permaneceram hospitalizados (Silva et al., 2002; Kearney, 1998; Mathur et al., 2009).

A contaminação bacteriana ainda é a maior causa de descartes de aloenxertos em bancos de tecidos (Pianigiani et al., 2006; Lindford et al., 2010; Pirnay et al., 2012; Pitt et al., 2014; Mátioski et al., 2015; Gaucher et al., 2016). Embora a desinfecção da pele na fase de pré coleta seja eficaz na redução da carga microbiana, é improvável que elimine totalmente as bactérias (Lomas et al., 2003), sendo essencial evitar a proliferação de qualquer bactéria residual após a coleta do tecido e a eliminação de eventuais contaminantes durante o processamento subsequente (Ge et al., 2011).

O procedimento mais comumente utilizado pelos bancos de pele para a descontaminação de peles alógenas depois de coletadas, é o tratamento com coquetéis antimicrobianos. Contudo, as práticas e diretrizes adotadas pelos diferentes bancos de pele ao redor do mundo são muito variadas, incluindo uma vasta gama de composições de antimicrobianos, com diferentes temperaturas e tempos de exposição, o que torna o processo de descontaminação uma etapa crítica e de ampla discussão (Pianigiani et al., 2006; Lindford et al., 2010; Pirnay et al., 2012; Mátioski et al., 2015; Gaucher et al., 2016).

A combinação de penicilina e estreptomicina é a mais comumente sugerida na literatura e utilizada em bancos de pele (Csonge, 1995; Mathur et al., 2009; Johnston et al., 2016). É também prática de rotina em alguns bancos de pele ser realizado mais de um ciclo de tratamento, sendo no primeiro aplicados antimicrobianos com espectro menor, e no caso desse falhar, é aplicado um segundo tratamento com antimicrobianos com amplo espectro (Pianigiani et al., 2010).

O que vem sendo descrito na literatura é que mesmo após aplicados os tratamentos com antimicrobianos sobre as peles alógenas, a contaminação bacteriana persiste (Rooney et al., 2008) devido à resistência aos antimicrobianos usados (Pianigiani et al., 2010; Atique e Khalil., 2014) ou por outros motivos, visto que, estudos relatam que bactérias que persistiram ao tratamento eram susceptíveis *in vitro* a pelo menos um dos antimicrobianos presentes nos coquetéis usados, ou seja, outros fatores não relacionados a expressão de resistência como a formação de biofilme, presença de bactérias esporuladoras e a distribuição dos isolados nos folículos pilosos, podem estar contribuindo para a

persistência desses microrganismos nas peles alógenas (Pirnay et al., 2012; Verbeken et al., 2012; Gaucher et al., 2016). Esta contaminação resulta em altas taxas de descartes de tecidos o que representa um grave problema para os bancos de peles visto que a frequência de doações é bastante baixa (Matoski et al., 2015; Gaucher et al., 2016).

Considerando que as fontes de contaminação da pele alógena são diversas, em estudos que avaliem a ação inibitória de antimicrobianos para tratamentos de peles alógenas, é importante inserir uma gama diversificada de bactérias. Deste modo, este trabalho teve como objetivo testar seis combinações de diferentes coquetéis antimicrobianos sobre bactérias isoladas de peles alógenas e não alógenas com diferentes perfis de susceptibilidade a antimicrobianos e com diferentes níveis ou ausência de formação de biofilme, no intuito de avaliar e propor um tratamento mais eficiente na eliminação da contaminação bacteriana de peles alógenas.

## **Métodos**

### ***Ética***

Essa pesquisa foi aprovada pelos Comitês de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (protocolo CAAE 36949514.8.0000.5347) e da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (protocolo CAAE 45100215.1.0000.5335).

### ***Isolados bacterianos***

Um total de 40 isolados bacterianos foram avaliados incluindo espécies Gram-positivas e Gram-negativas. Destes, 20 isolados bacterianos foram obtidos de 21 amostras de peles alógenas (de doadores cadáveres) disponibilizadas pelo Banco de Pele Dr. Roberto Corrêa Chem, que foram previamente descartadas na triagem inicial e/ou pós processamento por cultura positiva com microrganismos não aceitáveis e/ou pela persistência de contaminação do tecido após primeiro tratamento com penicilina e estreptomicina e/ou segundo tratamento com vancomicina. Os demais 20 isolados bacterianos foram obtidos de amostras de peles não alógenas provenientes de indivíduos vivos saudáveis (coletados em trabalho anterior desde mesmo grupo de pesquisa). Bactérias Gram-negativas, *Enterococcus* sp. e *Staphylococcus aureus*, foram mantidos no estudo, mesmo sendo critério de exclusão nos bancos de pele, afim de poder avaliar o poder inibitório dos coquetéis de forma mais ampla.

O isolamento e identificação por espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser - tempo de voo (MALDI-TOF) foram realizados em trabalhos anteriores (dados não publicados; Meneghetti et al., 2018). A susceptibilidade dos isolados bacterianos aos antimicrobianos (Discos Oxoid™) benzil penicilina G 10U (PEN), cefoxitina 30 µg (CFO),

ciprofloxacina 5 µg (CIP), amicacina 30 µg (AMI), gentamicina 10 µg (GEN), tetraciclina 30 µg (TET), estreptomicina 10 µg (EST) e azitromicina 15 µg (AZM) foram determinados pelo método de disco-difusão em ágar Mueller Hinton. Para as bactérias Gram-positivas, os halos de inibição foram lidos seguindo os critérios interpretativos da zona de diâmetro para os *Staphylococcus* sp. (Habrun et al., 2011; CLSI M100-S25, 2015; Owusu-Kwarteng et al., 2017), com exceção de EST, para qual foi utilizada a zona de diâmetro dos critérios interpretativos de *Enterococcus* sp. (EUCAST, 2017). Para as bactérias Gram-negativas foram utilizados os critérios interpretativos do CLSI M100-S25 (2015). *S. aureus* ATCC 29213 foi utilizada como controle. Isolados não sensíveis a mais de três antimicrobianos de classes diferentes foram considerados multiresistentes (MDR) (Magiorakos et al., 2012).

### **Análise de formação de biofilme**

A detecção e avaliação da formação de biofilme dos isolados foi realizada pelo método de Stepanovic et al. (2000), com modificações. Os isolados bacterianos, foram recuperados em ágar triptona de soja (TSA) e incubados a 37°C durante 24 h. A partir do TSA, os isolados foram ajustados a turbidez 0,5 da escala de McFarland em salina 0,9% estéril. Em uma diluição de 1:10 as suspensões foram adicionadas ao caldo triptona de soja (TSB) em placas de cultura de tecidos de poliestireno de 96 poços, de fundo plano, em octoplicata. Como controle positivo foi utilizado *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35984) e no controle negativo apenas caldo TSB. As placas foram então incubadas a 37°C por 24 h. Em seguida os poços foram aspirados e lavados três vezes com 300 µL de solução salina estéril. As placas foram levemente agitadas, a fim de remover todas as bactérias não aderentes. As células que permaneceram aderidas ao fundo do poço e às paredes da placa foram fixadas com 200 µL de metanol 99%. Após 15 minutos, as placas foram esvaziadas e deixadas secar para posterior coloração dos poços com 200 µL do corante cristal violeta a 2% por 5 minutos. O excesso de corante foi retirado com lavagem dos poços com água corrente. Após deixar secar as placas, as células coradas aderidas foram solubilizadas com 160 µL de etanol a 100%. Ao final, realizou-se a leitura da densidade óptica (OD) de cada poço em espectrofotômetro em comprimento de onda de 570 nm.

Os isolados foram classificados em quatro categorias de acordo com os valores de OD obtidos. A OD ponto de corte (OD<sub>c</sub>) para o teste é definido como três desvios padrão acima da média da OD do controle negativo cujo poço da placa continha apenas o caldo TSB. A classificação foi interpretada da seguinte maneira: OD ≤ OD<sub>c</sub> não aderente; OD<sub>c</sub> < OD ≤ 2 x OD<sub>c</sub> fracamente aderente; 2 x OD<sub>c</sub> < OD < 4 x OD<sub>c</sub> moderadamente aderente; 4 x OD<sub>c</sub> < OD fortemente aderente (Stepanovic et al., 2000).

### **Coquetéis antimicrobianos**

Os antimicrobianos escolhidos e respectivas concentrações basearam-se na literatura (Mathur et al., 2009; Johnston et al., 2016; Serafini et al., 2016) e resultados prévios com os mesmos isolados (Meneghetti, 2018). Foram selecionados os antimicrobianos PEN (amplamente utilizado em bancos de pele), CAZ (descrita em outros trabalhos) e GEN e TET (que apresentaram elevado poder inibitório sobre os isolados) que foram testados em seis diferentes combinações sobre isolados bacterianos (no estado planctônico) obtidos de peles alógenas e não alógenas (Tabela 1).

Tabela 1. Coquetéis antimicrobianos avaliados sobre isolados bacterianos de pele alógena e não alógena.

Antimicrobiano	Coquetel (µg/mL)					
	A	B	C	D	E	F
Penicilina (PEN)	600	600	600	600	-	600
Gentamicina (GEN)	80	-	80	80	80	80
Tetraciclina (TET)	-	160	160	-	160	160
Ceftazidima (CAZ)	-	-	-	240	240	240

### **Avaliação dos coquetéis antimicrobianos**

A avaliação da atividade bactericida dos coquetéis antimicrobianos foi realizada baseando-se na metodologia descrita por Serafini et al. (2016), com adaptações. Os isolados bacterianos foram cultivados em TSA por 24 horas a 37°C. As colônias foram suspensas em solução salina 0,9% a uma turbidez de 0,5 da escala de McFarland. O inóculo foi então diluído 1:100 no tubo sem tratamento contendo solução salina estéril 0,9% e 0,5% de soro fetal bovino, e nos tubos de tratamento contendo também solução salina estéril 0,9% e os coquetéis antimicrobianos, resultando em um volume final de 2,5 mL. Os tubos sem tratamento foram imediatamente submetidos à centrifugação a 10.000g por 5 min e suspensos em 2,5 mL de solução salina estéril 0,9% para em seguida ser realizada a contagem de viabilidade celular (UFC/mL). Os tubos com coquetéis foram incubados a 37°C por 3 horas (temperatura e tempo utilizados pelo Banco Pele Dr. Roberto Corrêa Chem). Para evitar o carregamento dos antimicrobianos, após período de incubação, os tubos foram submetidos a centrifugação a 10.000g por 5 min e suspensos em 2,5 mL de solução salina estéril 0,9% nova. A contagem de viabilidade celular (UFC/mL) foi determinada através do plaqueamento de diluições seriadas (1:10) em solução salina estéril 0,9% das suspensões bacterianas, em meio sólido de TSA que foi incubado durante 24 h a 37°C. A atividade bactericida foi calculada da seguinte maneira:  $\{(CFU/mL \text{ depois do tratamento}) / (CFU/mL \text{ antes do tratamento})\} \times 100$ .

## Resultados

Nas peles alógenas foram observadas apenas bactérias Gram positivas (*Staphylococcus*, *Bacillus* e *Paenibacillus*) e nas peles não alógenas Gram positivas e Gram negativas (*Staphylococcus*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Pantoea* e *Stenotrophomonas*). Os gêneros não identificados a nível de espécie pelo MALDI-TOF são descritos por sp. ou pelas características da coloração de Gram. Os isolados foram selecionados para este estudo com base na identificação, nos perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos e com diferentes níveis ou ausência de formação de biofilme. Foram avaliados 40 isolados bacterianos incluindo os gêneros *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Pantoea* e *Stenotrophomonas*. Totalizando em 18 espécies diferentes identificadas por MALDI-TOF (Tabelas 2 e 3).

Nas Tabelas 2 e 3 estão descritas as atividades bactericidas dos seis coquetéis antimicrobianos avaliados para cada isolado. Observou-se que os coquetéis D e F apresentaram atividade bactericida maior que os demais coquetéis, seguidos do coquetel A. Com uma taxa de inibição  $\geq 95\%$ , o coquetel D inibiu 33 (82.5%), o coquetel F inibiu 32 (80%) e o coquetel A inibiu 29 (72.5%) dos 40 isolados avaliados, enquanto que os coquetéis C e E inibiram cada um 27 (67.5%) e B inibiu 21 (52.5%) isolados (Figura 1).

Avaliando os resultados em relação à classificação pela coloração de Gram, dos 35 isolados Gram-positivos, com uma taxa de inibição de  $\geq 95\%$ , o coquetel D inibiu 29 (82.8%) isolados, F 28 (80%), A 26 (74.2%), C e E 23 cada um (65.7%) e B 19 (54.2%). Dos 5 isolados Gram-negativos, os coquetéis A, C, D e F inibiram cada um 4 (80%) isolados e B inibiu 2 (40%). Destacando os dois gêneros mais isolados da superfície da pele humana (*Staphylococcus* e *Bacillus*), dos 16 isolados do gênero *Staphylococcus*, os coquetéis D, E e F inibiram 15 (93.7%) isolados a uma taxa de  $\geq 95\%$ , enquanto A, C e B inibiram 14 (87.5%), 13 (81.2%) e 9 (56.2%), respectivamente. Dos 16 isolados do gênero *Bacillus*, os coquetéis D e F inibiram 11 (68.7%), enquanto que A, B e C inibiram cada um 9 (56.2%) isolados e E inibiu apenas 7 (43.7%) (Tabelas 2 e 3).

Dos 6 isolados Gram-positivos obtidos de peles alógenas que já haviam sido submetidos ao tratamento antimicrobiano prévio no banco de pele, todos coquetéis foram capazes de inibir em uma taxa  $\geq 95\%$  pelo menos 4 isolados (Tabela 2).

Tabela 2. Perfil de resistência, formação de biofilme, recebimento de tratamento prévio e percentual de inibição de seis coquetéis antimicrobianos testados sobre bactérias isoladas de peles alógenas.

ISOLADO	IDENTIFICAÇÃO	PERFIL DE RESISTÊNCIA	BIOFILME	TRAT. PRÉVIO*	COQUETÉIS (% inibição)					
					A	B	C	D	E	F
					PEN GEN	PEN TET	PEN GEN TET	PEN GEN CAZ	GEN TET CAZ	PEN GEN TET CAZ
25.4.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	PEN	FRACO	-	94.97	63.38	97.95	99.89	95,82	99.47
41.3.2	<i>Staphylococcus sp.</i>	CFO	MOD.	1°	100	100	100	100	100	100
15.7.2	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	AZM	NÃO PROD.	-	100	100	100	100	100	100
18.7.2	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	CFO-CIP-AZM	FORTE	-	94.73	12.28	85.26	99.94	85.96	96.57
14.8.2	<i>Staphylococcus capitis</i>	PEN-CFO-CIP-AZM	FORTE	-	85.57	52.16	38.70	91.93	98.85	70.19
27.13.4	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	PEN-CFO-CIP-AZM	MOD.	-	100	95.97	99.68	100	97.80	99.59
18.1.2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	PEN-CFO-CIP-AZM	FORTE	-	100	100	100	100	100	100
27.12.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	PEN-CFO-CIP-AZM	MOD.	-	100	100	100	100	99.99	100
15.6.2	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	SENSÍVEL A TODOS ATM	FRACO	-	100	93.72	99.86	99.98	99.98	99.96
32.5.2	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	SENSÍVEL A TODOS ATM	FRACO	-	100	100	100	100	100	100
16.7.2	<i>Bacillus sp.</i>	PEN	MOD.	-	26.19	38.09	78.57	97.38	0	96.66
36.1.2	<i>Bacillus licheniformis</i>	PEN	FORTE	-	96.34	90.19	92.30	96.15	46.73	97.30
7.9.4	<i>Bacillus cereus</i>	PEN	FRACO	1° e 2°	59.33	54.00	65.33	66.66	67.33	72.00
8.4.2	<i>Bacillus cereus</i>	PEN-CFO	MOD.	1° e 2°	100	100	100	100	100	100
31.1.2	<i>Bacillus cereus</i>	PEN-CFO-EST	FRACO	1° e 2°	91.96	92.29	95.90	89.83	91.47	91.31
34.1.2	<i>Paenibacillus sp.</i>	PEN-CFO-EST	FRACO	1°	100	100	100	100	89.74	100
23.1.2	<i>Bacillus pumilus</i>	SENSÍVEL A TODOS ATM	FRACO	-	99.91	78.83	88.60	67.67	90.69	59.30
3.12.2	<i>Bacillus subtilis</i>	SENSÍVEL A TODOS ATM	FORTE	-	99.76	99.90	99.76	99.96	97.96	99.80
17.11.2	<i>Bacillus vallismortis</i>	SENSÍVEL A TODOS ATM	FORTE	-	96.66	97.29	96.66	96.04	90.20	97.29
1.2.2	<i>Bacillus sp.</i>	SENSÍVEL A TODOS ATM	FORTE	1° e 2°	100	99.00	99.93	99.90	99.93	100

PEN, penicilina; CFO, cefoxitina; CIP, ciprofloxacina, AMI, amicacina, GEN, gentamicina; TET, tetraciclina; EST, estreptomicina, AZM, azitromicina. ATM, antimicrobiano.

Tabela 3. Perfil de resistência, formação de biofilme, recebimento de tratamento prévio e percentual de inibição de seis coquetéis antimicrobianos testados sobre bactérias isoladas de peles não alógenas.

ISOLADO	IDENTIFICAÇÃO	PERFIL DE RESISTÊNCIA	BIOFILME	TRAT. PRÉVIO*	COQUETÉIS (% inibição)					
					A	B	C	D	E	F
					PEN GEN	PEN TET	PEN GEN TET	PEN GEN CAZ	GEN TET CAZ	PEN GEN TET CAZ
44.1.2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	TET	FRACO	-	99.99	78.72	99.96	100	99.81	99.99
88.2.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	AZM	NÃO PROD.	-	99.14	100	100	100	100	100
99.2.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	PEN-EST	FRACO	-	100	100	100	100	100	100
71.1.2	<i>Staphylococcus</i> sp.	PEN-CFO-CIP-GEN	NÃO PROD.	-	99.91	61.11	90.83	99.58	96.38	98.16
100.2.4	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	SENSÍVEL A TODOS ATM	FRACO	-	99.95	99.95	99.99	99.33	100	99.99
98.1.4	<i>Staphylococcus condimentii</i>	SENSÍVEL A TODOS ATM	MOD.	-	96.87	88.32	98.68	99.51	95.19	99.13
98.4.2	<i>Enterococcus faecalis</i>	PEN-CFO-TET-AMI-GEN-EST-AZM	FRACO	-	99.89	8.97	92.94	100	89.10	92.69
99.4.2	<i>Enterococcus faecalis</i>	PEN-CFO-TET-AMI-GEN-EST-AZM	FRACO	-	99.99	94.75	99.52	98.83	99.57	99.45
80.2.4	<i>Bacillus pumilus</i>	PEN	NÃO PROD.	-	61.29	95.87	94.80	96.00	95.16	95.38
80.3.2	<i>Bacillus cereus</i>	PEN-CFO-AZM	FRACO	-	48.00	60.00	73.42	68.00	68.85	68.00
79.3.2	<i>Bacillus</i> sp.	SENSÍVEL A TODOS ATM	FORTE	-	99.11	98.82	99.70	98.82	90.29	98.82
97.3.2	<i>Bacillus altitudinis</i>	SENSÍVEL A TODOS ATM	FORTE	-	80.00	81.33	77.33	80.00	84.00	37.33
79.6.2	<i>Bacillus vallismortis</i>	SENSÍVEL A TODOS ATM	FORTE	-	99.04	98.93	98.75	98.75	99.15	99.02
86.4.2	<i>Bacillus megaterium</i>	SENSÍVEL A TODOS ATM	NÃO PROD.	-	99.71	99.08	99.51	99.60	99.77	99.68
66.2.4	<i>Bacillus</i> sp.	SENSÍVEL A TODOS ATM	MOD.	-	65.26	96.00	91.68	97.15	97.36	97.26
82.5.2	<i>Klebsiella variicola</i>	PEN-AZM	FRACO	-	100	91.78	100	100	97.10	100
59.1.2	<i>Pantoea agglomerans</i>	PEN-CFO-AZM	FORTE	-	100	88.90	100	100	100	100
81.2.2	Cocobacilos Gram-negativos	PEN-CFO-AZM	FRACO	-	99.75	99.52	99.09	98.90	99.78	99.06
82.5.4	Cocobacilos Gram-negativos	PEN-CFO-AMI-EST	MOD.	-	71.15	68.84	69.23	74.42	30.76	11.53
84.3.4	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	PEN-CFO-TET-GEN-EST	MOD.	-	100	100	100	100	100	100

PEN, penicilina; CFO, cefoxitina; CIP, ciprofloxacina, AMI, amicacina, GEN, gentamicina; TET, tetraciclina; EST, estreptomicina, AZM, azitromicina. ATM, antimicrobiano.

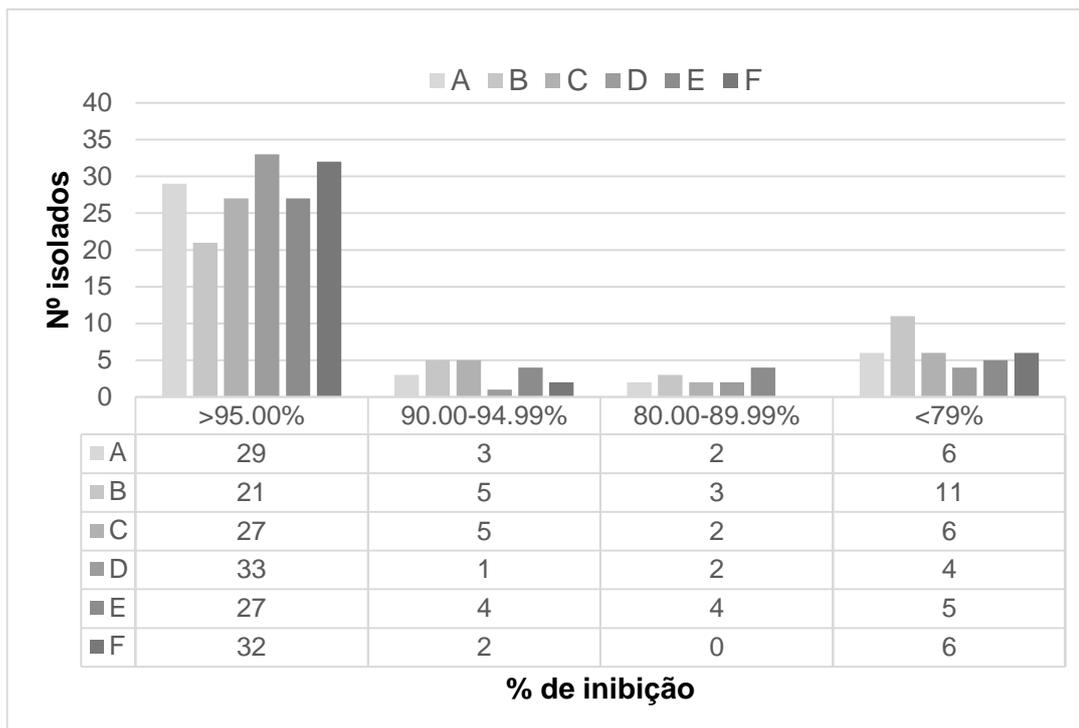


Figura 1. Número de isolados inibidos em diferentes taxas de inibição para cada coquetel antimicrobiano testado. Coquetel *A*, composto por gentamicina e penicilina; *B*, penicilina e tetraciclina; *C*, penicilina, gentamicina e tetraciclina; *D*, penicilina, gentamicina e ceftazidima; *E*, gentamicina, tetraciclina e ceftazidima; *F*, penicilina, gentamicina, tetraciclina e ceftazidima.

Analisando de forma isolada a capacidade inibitória dos coquetéis a uma taxa de inibição  $\geq 95\%$  em relação a cada uma das características avaliadas (Figura 2), dos 13 isolados sensíveis a todos antimicrobianos testados previamente por disco-difusão, o coquetel *A*, *D* e *F* inibiram cada um 11 (84.6%) isolados, *C* 10 (76.9%) *B* e *E* 9 cada um (69.2%). Dos 12 isolados resistentes a um ou dois antimicrobianos, os coquetéis *D* e *F* inibiram 11 (91.6%) isolados cada um, *A* e *E* inibiram 9 (75%) isolados cada um, *C* inibiu 8 (66.6%) e *B* inibiu 6 (50%). Quanto aos 15 isolados classificados como multirresistentes (MDR), o coquetel *D* inibiu 11 (73.3%) isolados, *A* e *F* inibiram cada um 10 (66.6%), *C* e *E* inibiram cada um 9 (60%) e *B* inibiu 6 (40%). Sobre os isolados não formadores de biofilme, os coquetéis *D*, *E* e *F* inibiram os 5 (100%) isolados avaliados, os coquetéis *A* e *B* inibiram 4 (80%) e *C* inibiu 3 (60%). Em relação aos isolados formadores de biofilme em nível fraco e moderado, dos 24 avaliados, o coquetel *D* inibiu 19 (79.1%) isolados, *A* e *F* inibiram cada um 18 (75%), *C* 17 (70.8%), *E* 16 (66.6%) e *B* inibiu 11 (45.8%) isolados. E quanto aos fortes formadores de biofilme, de 11 isolados, os coquetéis *D* e *F* foram capazes de inibir 9 (81.8%), *A* (72.7%), *C* 7 (63.3%) e *B* e *E* inibiram apenas 6 (54.4%) isolados.

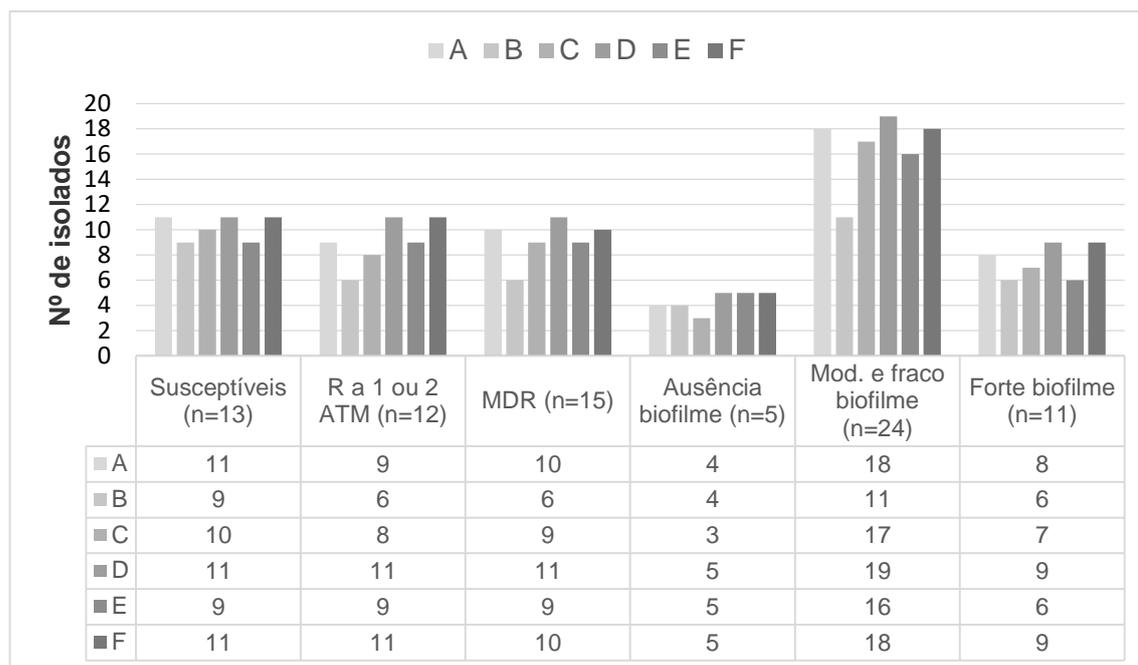


Figura 2. Número de isolados inibidos a uma taxa de inibição de  $\geq 95\%$  dos seis coquetéis antimicrobianos testados (A a F) em relação às diferentes características de susceptibilidade a antimicrobianos e de formação de biofilme. *R*, resistente; *ATM*, antimicrobianos; *MDR*, multirresistente; *Mod.*, moderado. Coquetel *A*, composto por gentamicina e penicilina; *B*, penicilina e tetraciclina; *C*, penicilina, gentamicina e tetraciclina; *D*, penicilina, gentamicina e ceftazidima; *E*, gentamicina, tetraciclina e ceftazidima; *F*, penicilina, gentamicina, tetraciclina e ceftazidima.

Separando os isolados conforme origem de pele alógena ou não alógena e as características de susceptibilidade (sem incluir os isolados que foram expostos aos tratamentos antimicrobianos no banco de pele), observou-se que para as peles alógenas, dos 5 isolados sensíveis a todos antimicrobianos pelo teste de disco-difusão, com uma taxa  $\geq 95\%$  de inibição o coquetel *A* inibiu os 5 (100%) isolados, *B*, *C* e *F* inibiram 4 (80%) isolados cada um, e *B* e *E* inibiram apenas 3 (60%) isolados cada um. Para os 4 isolados resistentes a ou dois antimicrobianos, os coquetéis *D* e *F* inibiram 100%, *A*, *C* e *E* inibiram 2 (50%) dos isolados cada um, e o coquetel *B* inibiu apenas 1 isolado. Dos 5 isolados *MDR*, os coquetéis *D*, *E* e *F* inibiram 4 (80%) isolados cada um, e os coquetéis *A*, *B* e *C* inibiram 3 (60%) isolados cada um. Em relação aos isolados provenientes de peles não alógenas, dos 7 isolados sensíveis a todos antimicrobianos, os coquetéis *D* e *F* inibiram 6 (85.7%) isolados cada um enquanto os coquetéis, *A*, *B*, *C* e *E* inibiram 5 (71.4%) isolados cada um. Para os 5 isolados resistentes a ou dois antimicrobianos, os coquetéis *D*, *E* e *F* inibiram 100% dos isolados, *A* e *C* inibiram 4 (80%) cada um e *B* inibiu apenas 3 (60%) isolados. Quanto aos 8 isolados *MDR*, os coquetéis *A* e *D* inibiram 6 (75%) isolados cada um, *E* e *F* inibiram 5 (62.5%) isolados cada um, *C* inibiu 4 (50%) e *B* apenas 2 (25%).

Tabela 4. Comparação da atividade inibitória dos coquetéis em isolados de peles alógenas (com exceção dos isolados submetidos aos tratamentos no banco de pele) e não alógenas.

		COQUETÉIS (% inibição $\geq 95\%$ ) n (%)					
		A	B	C	D	E	F
Peles alógenas	S a todos ATM (n=5)	5 (100)	3 (60)	4 (80)	4 (80)	3 (60)	4 (80)
	R a 1 ou 2 ATM (n=4)	2 (50)	1 (25)	2 (50)	4 (100)	2 (50)	4 (100)
	MDR (n=5)	3 (60)	3 (60)	3 (60)	4 (80)	4 (80)	4 (80)
Peles não alógenas	S a todos ATM (n=7)	5 (71.4)	5 (71.4)	5 (71.4)	6 (85.7)	5 (71.4)	6 (85.7)
	R a 1 ou 2 ATM (n=5)	4 (80)	3 (60)	4 (80)	5 (100)	5 (100)	5 (100)
	MDR (n=8)	6 (75)	2 (25)	4 (50)	6 (75)	5 (62.5)	5 (62.5)

S, *sensíveis*; R, *resistente*; ATM, *antimicrobianos*; MDR, *multirresistente*. Coquetel A, composto por gentamicina e penicilina; B, penicilina e tetraciclina; C, penicilina, gentamicina e tetraciclina; D, penicilina, gentamicina e ceftazidima; E, gentamicina, tetraciclina e ceftazidima; F, penicilina, gentamicina, tetraciclina e ceftazidima.

Sete isolados mostraram-se bastante persistentes aos tratamentos testados. Três isolados apenas um dos coquetéis conseguiu inibir na taxa de  $\geq 95\%$ , isolado 23.1.2 inibido apenas pelo coquetel A, 31.1.2 inibido apenas pelo coquetel C e o isolado 14.8.2 inibido apenas pelo coquetel E. Os isolados 7.9.4, 80.3.2, 97.3.2 e 82.5.4 não foram inibidos na taxa  $\geq 95\%$  por nenhum dos coquetéis.

Conforme a Tabela 5 pode-se observar que dos 35 isolados produtores de algum nível de biofilme 14 (40%) foram classificados como MDR, enquanto 9 (25.7%) foram resistentes a um ou dois ATM e 12 (34.2%) foram susceptíveis a todos antimicrobianos testados por disco-difusão. Dos 5 isolados não produtores de biofilme 1 (20%) foi classificado como MDR e 3 (60%) não-MDR e 1 susceptível a todos ATM testados.

Tabela 5. Comparação entre resistência em isolados produtores e não produtores de biofilme.

	MDR n (%)	Não-MDR n (%)	Susceptíveis a todos ATM n (%)
Produtores de biofilme (n=35)	14 (40)	9 (25.7)	12 (34.2)
Não produtores de Biofilme (n=5)	1 (20)	3 (60)	1 (20)
Total (n=40)	15 (37.5)	12 (30)	13 (32.5)

ATM, *antimicrobianos*; MDR, *multirresistente*.

## Discussão

Os fatores que influenciam a composição bacteriana da peles alógenas são muito diversos e como resultado são encontradas bactérias de diferentes espécies e principalmente com características fenotípicas variadas, o que demonstra que os coquetéis antimicrobianos de tratamento precisam incluir componentes com amplo espectro de ação (Johnston et al.,

2016). Além disso, combinações de antimicrobianos oferecem estratégias potenciais para perturbar múltiplas funções celulares e para controlar a evolução da resistência bacteriana a antimicrobianos, uma vez que a antibioticoterapia combinada demonstrou atrasar a surgimento de resistência bacteriana (Olajuyigbe et al., 2012)

No presente estudo optou-se pela utilização dos antimicrobianos em baixa a moderadas concentrações. Mesmo que o antimicrobiano perca potência por se ligar ao tecido, um excesso destes agentes num coquetel não resultaria numa morte mais eficaz das células alvo (Pitt et al., 2014). Concentrações demasiadamente elevadas podem ser ineficazes contra bactérias susceptíveis, devido ao "*Eagle effect*" no qual um antimicrobiano, particularmente os  $\beta$ -lactâmicos, exibem menor capacidade inibitória em altas concentrações da droga (Eagle and Musselman, 1948). Além disso, altas concentrações de antibióticos danificam a estrutura da pele (Csonge et al., 1995).

Foram avaliadas bactérias Gram-negativas e *Enterococcus* sp. e *S. aureus*, mesmo sendo estas critério de descarte de tecido no Banco de Pele Dr. Roberto Corrêa Chem. Isto porque sua presença na pele humana também foi descrita em diferentes trabalhos (Pianigiani et al., 2006; Lindford et al., 2010; Pirnay et al., 2012; Matoski et al., 2015; Gaucher et al., 2016). Sendo assim, esses microrganismos foram mantidos a fim de nivelar a eficiência dos antimicrobianos escolhidos para esta análise, quanto a sua capacidade de inibir o maior número de bactérias com as mais variadas características.

Os coquetéis D e F apresentaram os melhores resultados inibindo 82.5% e 80%, dos isolados a uma taxa de inibição  $\geq 95\%$ , respectivamente. Seguidos do coquetel A que inibiu 72.5%. Da mesma forma, os três coqueteis destacaram-se quando avaliada a taxa de inibição de  $\geq 95\%$  em relação às características de susceptibilidade aos antimicrobianos e de formação de biofilme. Destaca-se a combinação da penicilina, gentamicina e ceftazidima, observando que a presença da ceftazidima pode ter a função de atuar sobre as bactérias resistentes a PEN, produtoras de  $\beta$ -lactamases, enquanto que nas bactérias susceptíveis a PEN, a CAZ potencializou sua ação inibitória. Esta característica percebe-se ao compararmos o resultado do coquetel D com o A, que teve um resultado um pouco inferior, cuja diferença entre ambos era a presença da CAZ. Com isso conclui-se que a CAZ teve efeito de sinergismo. Pertencente à classe das cefalosporinas, a CAZ tem mecanismo de ação semelhante ao das penicilinas. No entanto, tem um espectro antibacteriano mais amplo, com maior estabilidade para muitos tipos de  $\beta$ -lactamases e tem propriedades farmacocinéticas melhoradas (Kuriyama et al., 2014).

Observou-se também que a GEN atuou de forma sinérgica com a PEN. O sinergismo entre  $\beta$ -lactâmicos em combinação com aminoglicosídeos já é bem descrita e historicamente utilizada na clínica (Baddour et al., 2015). Embora os aminoglicosídeos sejam bactericidas, quando usados como monoterapia, concentrações extracelulares muito altas são

necessárias para que a droga atinja o local do alvo, que são os ribossomos, e essas concentrações não podem ser alcançadas com segurança em pacientes. No entanto, tendo um cenário em que um agente atue sobre a parede celular como a penicilina, sua permeabilidade é aumentada, permitindo que os aminoglicosídeos atinjam seus alvos ribossômicos em concentrações muito mais baixas (Baddour et al., 2015).

Sugere-se a substituição da estreptomicina, atualmente utilizada no banco de pele, pela gentamicina devido ao baixo número de isolados que foram resistentes a mesma e por poder ter um efeito inibitório maior por apresentar dois sítios de ligação aos ribossomos (subunidades 30S e 50S), em comparação a estreptomicina que se liga apenas a um sítio (subunidade 30S) (Borovinskaya et al., 2007, Maddison et al., 2008, Demirci et al., 2013).

Os coquetéis com potencial inibitório menores foram C e E (67.5%) seguidos do coquetel B 52.5%. Tais resultados devem-se a presença da TET que é um antimicrobiano com efeito bacteriostático, e que no momento que impede a multiplicação e crescimento celular, pode acabar interferindo na ação dos  $\beta$ -lactâmicos, que atuam apenas sobre células em multiplicação. Os coquetéis C e E apresentaram resultados um pouco melhores que A pois tinham a presença de dois  $\beta$ -lactâmicos (PEN e CAZ). O coquetel F mesmo tendo a presença da TET teve o melhor resultado, possivelmente porque o efeito de sinergismo dos demais antimicrobianos se sobrepôs ao seu efeito antagonista.

Considerando os resultados do efeito inibitório sobre bactérias Gram-positivas e negativas, destacam-se com os melhores resultados os coquetéis D e F. Da mesma forma em relação aos gêneros *Staphylococcus* e *Bacillus*. Dos 6 isolados Gram-positivos obtidos de peles alógenas que já haviam sido submetidos ao tratamento antimicrobiano prévio no banco de pele, todos coquetéis foram capazes de inibir em uma taxa  $\geq 95\%$  pelo menos 4 isolados (Tabela 2).

Avaliando proporcionalmente a inibição de  $\geq 95\%$ , os coquetéis inibiram em maior percentual os isolados sensíveis e resistentes (a um ou dois antimicrobianos) das peles não alógenas, porém considerando os isolados MDR, o maior percentual de inibição foi observado nos isolados de peles alógenas. Contudo vale ressaltar que os isolados MDR de peles alógenas são resistentes a CFO, CIP e AZM, antibióticos diferentes dos inseridos nos coquetéis, logo nada impede que sejam sensíveis aos coquetéis por apresentarem perfil de resistência a antibióticos diferentes.

Três isolados mostraram maior persistência aos tratamentos aplicados, 23.1.2 (*B. pumilus*), 31.1.2 (*B. cereus*) e 14.8.2 (*S. capitis*). E os isolados 7.9.4, 80.3.2, 97.3.2 e 82.5.4, todos do gênero *Bacillus*, não foram inibidos na taxa  $\geq 95\%$  por nenhum dos coquetéis. A ineficiência na eliminação de bactérias esporuladoras, no caso dos *Bacillus* sp., em aloenxertos cutâneos já foi descrita na literatura (Van Baare et al., 1998; Verbeken et al., 2012). A característica do endósporo bacteriano é manter a célula em estado de dormência,

em baixo metabolismo e sem crescimento ativo, conseqüentemente tornando a célula tolerante a ação dos antimicrobianos (Tan e Ramamurthi, 2014).

Nenhum coquetel antimicrobiano avaliado foi capaz de inibir todas espécies, em concordância com outros trabalhos (Rooney et al., 2008; Mathur et al., 2009). Vários fatores podem influenciar a eficácia dos antimicrobianos usados na descontaminação de tecidos e dependem da interação entre o tamanho da população bacteriana, a potência do agente para diferentes espécies, as taxas de morte e recrescimento de organismos não suscetíveis (Pitt et al., 2014). Além da característica de existir dentro das populações bacterianas, subpopulações das "*persisters cells*", que modificam-se fenotipicamente tornando-se tolerantes aos tratamentos antimicrobianos (Gelens et al., 2013; Lewis, 2010).

Segundo a revisão realizada por Johnston et al., (2015) sobre os tratamentos de aloenxertos com antimicrobianos testados sobre amostras de pele, levando em consideração apenas a composição dos coqueteis, e não a temperatura e tempo de incubação, os resultados que mostraram menores taxas de descartes de aloenxertos por contaminação microbiana foram: (1) penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 units (U)/ml), e anfotericina B (1.25 lg/ml) (Pirnay et al.2012); (2) penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 U/ml) em 85 % glycerol (Pianigiani et al. 2010); e (3) penicilina, streptomina, canamicina, gentamicina e nistatina (Neely et al. 2008).

Serafini et al. (2016) avaliaram diferentes coqueteis que foram testados sobre painéis de espécies bacterianas representativas das mais frequentemente recuperadas de tecidos humanos, e descreveram que os melhores resultados obtidos foram com os coquetéis ciprofloxacina 200 µg/mL, gentamicina 200 µg/mL e vancomicina 100 µg/mL; e gentamicina 200 µg/mL, meropenem 200 µg/mL e vancomicina 100 µg/mL, com atividade bactericida de 29 (85%) e 28 (82%) do total de 34 isolados avaliados a uma taxa de inibição ≥95%, respectivamente.

Apesar dos ótimos resultados apresentados por Serafini et al. (2016), optou-se por manter a penicilina que acaba sendo um antimicrobiano de custo menor e com funções semelhantes na atuação de potencializar a ação de combinações com antimicrobianos que tenham alvos intracelulares; e utilizar a gentamicina e/ou a ceftazidima como agentes de amplo espectro, que conforme os resultados apresentados foram combinações com elevado potencial inibitório. Também optou-se por manter o que já vem sendo realizado no Banco de Pele Dr. Roberto Corrêa Chem e também descrita por Pianigiani et al. (2010), que é reservar a utilização da vancomicina apenas nos casos em que um primeiro ciclo de tratamento não for eficiente, principalmente para evitar a seleção e disseminação de cepas resistentes, utilizando-o somente em casos necessários.

No presente estudo observou-se que dos 35 isolados produtores de algum nível de biofilme, 23 (65.7%) apresentaram resistência a pelo menos um dos antimicrobianos

testados por disco-difusão, sendo que 14 destes eram MDR. Alguns estudos descrevem os desafios encontrados na clínica em realizar tratamentos sobre bactérias formadoras de biofilme devido a sua associação com maior resistência a terapias antimicrobianas (Percival et al., 2015; Seng et al. 2017; Neopane et al., 2018). O mecanismo de resistência a múltiplos fármacos em organismos formadores de biofilme é descrito como um resultado direto do contato célula-célula dentro do biofilme, o que facilita a transferência de genes de resistência entre si (Neopane et al., 2018). Isto indica que a formação de biofilme pode ser um dos fatores cruciais para aumentar a resistência aos antimicrobianos comumente usados.

É importante destacar que outros estudos avançam em descrever diferentes estratégias de esterilização de aloenxertos cutâneos através do uso de compostos desinfetantes, apresentando resultados superiores à ação de antimicrobianos, principalmente por atuarem sobre esporos bacterianos (Lomas et al. 2003; Paolin et al., 2016).

## Conclusão

Em conclusão, este trabalho caracterizou a utilização de três coquetéis antimicrobianos (A, D e F) que apresentaram maior efeito inibitório sobre as bactérias isoladas de peles alógenas e não alógenas. Podendo sugerir a utilização da combinação de penicilina e gentamicina associadas a ceftazidima ou não, como um primeiro ciclo de tratamento sobre aloenxertos de pele. Destaca-se a persistência de alguns isolados que não foram eliminados por nenhum dos coquetéis antimicrobianos, podendo ser atribuída à elevada resistência ou devido a formação de esporos.

## Referências

- Atique FB, Khalil MM. 2014. The bacterial contamination of allogeneic bone and emergence of multidrug-resistant bacteria in tissue bank. *Biomed Res Int.* 2014:430581.
- Baddour LM, Wilson WR, Bayer AS, Fowler VG Jr, Tleyjeh IM, Rybak MJ, et al. 2015. Infective Endocarditis in Adults: Diagnosis, Antimicrobial Therapy, and Management of Complications: A Scientific Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association. *Circulation.* 132(15):1435-86.
- Borovinskaya MA, Pai RD, Zhang W, Schuwirth BS, Holton JM, Hirokawa G, et al. 2007. Structural basis for aminoglycoside inhibition of bacterial ribosome recycling. *Nat Struct Mol Biol.* 14(8):727-32.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Fifth Informational Supplement M100-S25. Wayne/PA/United States.
- Csonge L, Pellet S, Szenes A, Istvan J. 1995. Antibiotics in the preservation of allograft and xenograft skin. *Burns.* 21(2):102-5.
- Demirci H, Murphy F, Murphy E, Gregory ST, Dahlberg AE, Jogl G. 2013. A structural basis for streptomycin-induced misreading of the genetic code. *Nat Commun.* 4:1355.
- Eagle H, Musselman AD. 1948. The rate of bactericidal action of penicillin in vitro as a function of its concentration, and its paradoxically reduced activity at high concentrations against certain organisms. *J Exp Med.* 88:99-131.
- Eastlund T. 2006. Bacterial infection transmitted by human tissue allograft transplantation. *Cell*

- Tissue Bank. 7(3):147-66.
- EUCAST - The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2017. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 7.1. Disponível em: <[http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_7.1\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_7.1_Breakpoint_Tables.pdf)>. Acessado em: 10 mai. 2017.
- Gaucher S, Khaznadar Z, Gourevitch JC, Jarraya M. 2016. Skin donors and human skin allografts: evaluation of an 11-year practice and discard in a referral tissue bank. *Cell Tissue Bank*. 17(1):11-9.
- Ge L, Huang Z, Wei H. 2011. Skin Graft Preservation. Em: *Skin Grafts - Indications, Applications and Current Research*. InTech China/ Shanghai-China. 368p.
- Gelens L, Hill L, Vandervelde A, Danckaert J, Loris R. 2013. A General Model for Toxin-Antitoxin Module Dynamics Can Explain Persister Cell Formation in *E. coli*. *PLoS Comput Biol*. 9(8):e1003190.
- Habrun B, Racic I, Kompes G, Spicic S, Benic M, Mihaljevic Z, et al. 2011. The antimicrobial susceptibility and virulence factors of *Bacillus anthracis* strains isolated in Croatia. *Vet Med*. 56(1):22-7.
- Ireland L, Spelman D. 2005. Bacterial contamination of tissue allografts-experiences of the donor tissue bank of Victoria. *Cell Tissue Bank* 6(3):181-9.
- Johnston C, Callum J, Mohr J, Duong A, Garibaldi A, Simunovic N, et al. 2016. Disinfection of human skin allografts in tissue banking: a systematic review report. *Cell Tissue Bank*. 17(4):585-92.
- Kearney JN. 1998. Quality issues in Skin Banking: a review. *Burns*. 24(4):299-305.
- Kuriyama T, Karasawa T, Williams DW. 2014. Antimicrobial Chemotherapy: Significance to Healthcare. Em: *Biofilms in Infection Prevention and Control*. Academic Press. 394p.
- Lindford AJ, Frey I, Vuola J, Koljonen V. 2010. Evolving practice of the Helsinki Skin Bank. *Int Wound J*. 7(4):277-81.
- Lewis, K. 2010. Persister Cells. *Annu Rev Microbiol*. 64:357-72.
- Lomas RJ, Cruse-Sawyer JE, Simpson C, Ingham E, Bojar R, Kearney JN. 2003. Assessment of the biological properties of human split skin allografts disinfected with peracetic acid and preserved in glycerol. *Burns*. 29(6):515-25.
- Maddison JE, Watson ADJ, Elliott J. 2008. Antibacterial drugs. Em: *Small Animal Clinical Pharmacology 2ed*. Saunders Ltd/Hertfordshire-UK.148-85.
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 18:268-81
- Mathur M, De A, Gore M. 2009. Microbiological assessment of cadaver skin grafts received in a skin bank. *Burns*. 35(1):104-6.
- Matioski AR, Silva CR, Silva-Cunha DR, Calomeno LH, Bonato FT, Nigro MA. 2015. First-year experience of a new skin bank in Brazil. *Plast Aesthet Res*. 2(6):326-31.
- Neely AN, Plessinger RT, Stamper B, Kagan RJ. 2008. Can contamination of a patient's allograft be traced back to the allograft donor? *J Burn Care Res*. 29(1):73-76.
- Neopane P, Nepal HP, Shrestha R, Uehara O, Abiko Y. 2018. In vitro biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from wounds of hospital-admitted patients and their association with antimicrobial resistance. *Int J Gen Med*. 11:25-32.
- Olajuyigbe OO. 2012. Synergistic Influence of Tetracycline on the Antibacterial Activities of Amoxicillin Against Resistant Bacteria. *J Pharmacy Allied Health Sci*. 2:12-20.
- Owusu-Kwarteng J, Wuni A, Akabanda F, Tano-Debrah K, Jespersen L. 2017. Prevalence, virulence factor genes and antibiotic resistance of *Bacillus cereus sensu lato* isolated from dairy farms and traditional dairy products. *BMC Microbiol*. 17:65.
- Paolin A, Trojan D, Carniato A, Tasca F, Massarin E, Tugnoli A, Cogliati E. 2016. Analysis of the effectiveness of Sodium Hypochlorite decontamination of cadaveric human tissues at retrieval. *Cell Tissue Bank*. 17(4):611-8.
- Pianigiani E, Ierardi F, Cuciti C, Brignali S, Oggioni M, Fimiani M. 2010. Processing efficacy in relation to microbial contamination of skin allografts from 723 donors. *Burns*. 36(3):347-

51.

- Pianigiani E, Risulo M, Ierardi F, Sbano P, Andreassi L, Fimiani M. et al. 2006. Prevalence of skin allograft discards as a result of serological and molecular microbiological screening in a regional skin bank in Italy. *Burns*. 32(3):348-51.
- Pirnay JP, Verween G, Pascual B, Verbeken G, De Corte P, Rose T, et al. 2012. Evaluation of a microbiological screening and acceptance procedure for cryopreserved skin allografts based on 14-day cultures. *Cell Tissue Bank*. 13(2):287-95.
- Pitt TL, Tidey K, Roy A, Ancliff S, Lomas R, McDonald CP. 2014. Activity of four antimicrobial cocktails for tissue allograft decontamination against bacteria and *Candida* spp. of known susceptibility at different temperatures. *Cell Tissue Bank*. 15:119-25.
- Percival SL, Suleman L, Vuotto C, Donelli G. 2015. Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control. *J Med Microbiol*. 64(Pt4):323-34.
- Rooney P, Eagle M, Hogg P, Lomas R, Kearney J. 2008. Sterilisation of skin allograft with gamma irradiation. *Burns*. 34(5):664-73.
- Rosenthal M, Goldberg D, Aiello A, Larson E, Foxmana B. 2011. Skin microbiota: Microbial community structure and its potential association with health and disease. *Infect Genet Evol*. 11(5):839-48.
- Saegeman V, Lismont D, Verduyck B, Ectors N, Stuyck J, Verhaegen J. 2007. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci on tissue allografts and isolates from orthopedic patients. *J Orthop Res*. 25(4):501-7.
- Seng R, Kittit T, Thummeepak R, Kongthai P, Leungtongkam U, Wannalerdsakun S, et al. 2017. Biofilm formation of methicillin-resistant coagulase negative staphylococci (MR-CoNS) isolated from community and hospital environments. *PLoS One*. 12(8):e0184172.
- Serafini A, Riello E, Trojan D, Cogliati E, Palù G, Manganelli R, et al. 2016. Evaluation of new antibiotic cocktails against contaminating bacteria found in allograft tissues. *Cell Tissue Bank*. 17(4):619-28.
- Silva CRM, Borges ML, Watanabe CM, Diogo Filho A, Gontijo Filho PP. 2002. Centros cirúrgicos e microflora ambiental nas salas de cirurgia dos hospitais de Uberlândia, Minas Gerais. *Biosci J*. 18(1):161-74.
- Singh R, Singh D, Singh A. 2016. Radiation sterilization of tissue allografts: A review. *World J Radiol*. 8(4):355-69.
- Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods*. 40(2):175-9.
- Tan IS, Ramamurthi KS. 2014. Spore formation in *Bacillus subtilis*. *Environ Microbiol Rep*. 6(3):212-25.
- Van Baare J, Ligtoet EJ, Middlekoop E. 1998. Microbiological evaluation of glycerolized cadaveric donor skin. *Transplantation*. 65(7):966-70.
- Verbeken G, Verween G, De Vos D, Pascual B, De Corte P, Richters C, et al. 2012. Glycerol treatment as recovery procedure for cryopreserved human skin allografts positive for bacteria and fungi. *Cell Tissue Bank*. 13(1):1-7.

### 5.3 Artigo 3

#### **Ação de combinações de antibióticos sobre biofilme bacteriano em peles alógenas**

Karine Lena Meneghetti, Micaela do Canto Canabarro, Jéssica Araujo de Souza,  
Alexandra da Silva Nunes, Mercedes Passos Geimba, Gertrudes Corção\*

## **Ação de combinações de antibióticos sobre biofilme bacteriano em peles alógenas**

Karine Lena Meneghetti, Micaela do Canto Canabarro, Jéssica Araujo de Souza, Alexandra da Silva Nunes, Mercedes Passos Geimba, Gertrudes Corção\*

\* Correspondência: corcao@ufrgs.br

Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Sarmiento Leite 500, 90050-170, Porto Alegre, Brasil.

### **Resumo**

A contaminação de aloenxertos de pele por bactérias formadoras de biofilmes pode representar um problema para os bancos de pele, pois tal característica faz com que elas tornem mais tolerantes aos antimicrobianos, o que acaba tendo impacto direto nos protocolos de descontaminação desses tecidos. Diversos bancos de pele descrevem a ineficiência de tratamentos aplicados mesmo sobre bactérias susceptíveis a pelo menos um dos antimicrobianos presentes em seus coquetéis. O que levanta uma ampla discussão sobre os motivos que levam a persistência de contaminação sobre aloenxertos e o papel dos biofilmes nessa questão. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar a formação de biofilme sobre amostras de peles alógenas, utilizando isolados bacterianos previamente obtidos de peles alógenas e não alógenas, com diferentes níveis de formação de biofilme *in vitro*. Além disso, avaliar dois coquetéis antimicrobianos quanto seu efeito sobre a estrutura do biofilme formado através de análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV), e sua capacidade em eliminar este biofilme através do cultivo dos tecidos. Cinco isolados bacterianos das espécies *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Klebsiella variicola* foram avaliados. Todos isolados apresentaram capacidade em se aderir à superfície das peles alógenas, com formação de biofilme em diferentes níveis, com exceção de *S. aureus* que apresentou um crescimento individualizado sem formação de matriz extracelular. Quando submetidos aos tratamentos, o biofilme de *S. epidermidis* e de *B. cereus* bem como as células isoladas de *S. aureus* foram danificados, enquanto que o biofilme denso de *K. variicola* e o biofilme discreto de *Staphylococcus saprophyticus* não foram morfológicamente afetados. O cultivo dos tecidos após os tratamentos apresentou crescimento bacteriano, logo, nenhum dos coquetéis foi capaz de eliminar por completo a contaminação bacteriana. Esses resultados levantam a necessidade em se reconsiderar os protocolos utilizados para o tratamento desses tecidos, quando há persistência de contaminação, levando-se em consideração métodos direcionados a combater bactérias formadoras de biofilme.

**Palavras-chave:** peles alógenas, aloenxertos de pele, biofilmes bacterianos, tolerância a antimicrobianos, bancos de pele.

## Introdução

Os biofilmes são comunidades multicelulares estruturadas de microrganismos embebidos em uma matriz extracelular rica em substâncias poliméricas extracelulares (EPS) (Hall-Stoodley et al., 2004; Hoiby et al., 2011). Adaptam-se a uma vida na qual se aderem a uma determinada superfície, interface ou a outras células (Donlan e Costerton, 2002). Quando estão na forma de biofilme, as bactérias apresentam um estado fisiológico distinto, na qual ocorrem mudanças nos seus perfis de expressão gênica, que lhes conferem um fenótipo vantajoso em comparação de quando estão na forma de vida livre (planctônica). O aspecto mais alarmante, é que inseridas no biofilme as bactérias podem ser de 10 a 1.000 vezes mais tolerantes aos antimicrobianos convencionais que foram desenvolvidos para eliminar as células no estado planctônico (Mah e O'Toole, 2001). O uso de terapias combinadas acaba sendo indicado no caso de biofilmes, já que sua arquitetura complexa requer o direcionamento de células em diferentes estados metabólicos e condições ambientais (Batoni et al., 2016).

Sabe-se que os biofilmes representam um desafio na área clínica no tratamento de infecções associadas aos cuidados de saúde (Percival et al., 2015) pois podem colonizar dispositivos médicos internos, próteses e superfícies corporais como pele, bexiga, pulmão, coração, dando origem a infecções crônicas difíceis de tratar (Costerton et al., 1999; Hall-Stoodley et al., 2004). Além disso, sua presença também tem sido descrita em diferentes tipos de enxertos como ósseos (Trampuz et al., 2006) e vasculares prostéticos (Russu et al., 2011), o que é um grave problema para os indivíduos receptores, pois quando um biofilme se desenvolve em tecidos vivos ou dispositivos médicos, é possível que células isoladas causem infecção sistêmica, particularmente se a resposta imune do hospedeiro estiver comprometida (Donlan, 2001).

No caso de enxertos cutâneos, a presença de biofilmes é pouco discutida. Porém relatos de diferentes bancos de pele ao redor do mundo, descrevem problemas com a persistência de contaminação bacteriana que resiste aos tratamentos antimicrobianos aplicados sobre as peles alógenas, resultando em altas taxas de descartes de tecidos que não podem ser utilizados para enxertia (Pianigiani et al., 2006; Lindford et al., 2010; Pirnay et al., 2012; Mátioski et al., 2015; Gaucher et al., 2016). Dentre os motivos dessa persistência, a presença de bactérias formadoras de biofilme na superfície da pele doadora não pode ser ignorada, visto que a pele humana é conhecidamente colonizada por uma microbiota própria e por microrganismos transitórios de diferentes espécies, incluindo bactérias formadoras de biofilme (Akiyama et al., 2003; Jahns et al., 2012; Allen et al., 2014). Além disso, muitos indivíduos que se tornam doadores de pele, permaneceram por períodos prolongados hospitalizados (Mathur et al., 2009), propiciando a colonização da superfície da pele com bactérias formadoras de biofilmes com características próprias do ambiente hospitalar

(Kearney, 1998; Mathur et al., 2009; Soto-Giron et al., 2016; Seng et al., 2017; Johani et al., 2018).

Um extenso trabalho vem sendo realizado pelo presente grupo de pesquisa, para melhor compreender a microbiologia de aloenxertos de pele, que já haviam sido descartados devido contaminação microbiana, fornecidos pelo Banco de Tecidos Dr. Roberto Corrêa Chem do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre-RS, Brasil. Entre os resultados observados, destacou-se o fato de vários isolados bacterianos obtidos das peles alógenas mostrarem-se susceptíveis *in vitro* a antimicrobianos presentes no coquetel de tratamento aplicado no Banco de Tecidos Dr. Roberto Corrêa Chem, que inclui um primeiro ciclo com penicilina e estreptomicina e um segundo ciclo de tratamento com vancomicina (Meneghetti et al., 2018). Observou-se também que maioria dos isolados apresentou algum nível de capacidade de formação de biofilme *in vitro* (dados não publicados).

Diante do exposto, este trabalho teve o objetivo de avaliar a formação de biofilme sobre amostras de peles alógenas, utilizando isolados bacterianos previamente obtidos de peles alógenas e não alógenas, com diferentes níveis de formação de biofilme *in vitro*. Além disso, avaliar dois coquetéis antimicrobianos quanto ao seu efeito sobre a estrutura do biofilme formado através de análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV), e sua capacidade em eliminar este biofilme através do cultivo dos tecidos após tratamento antimicrobiano.

## **Materiais e métodos**

### ***Ética***

Essa pesquisa foi aprovada pelos Comitês de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (protocolo CAAE 36949514.8.0000.5347) e da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (protocolo CAAE 45100215.1.0000.5335).

### ***Isolados bacterianos***

Foram avaliados cinco isolados com diferentes perfis de susceptibilidade a antimicrobianos e com diferentes níveis de formação de biofilme conforme descrito na Tabela 1. Destes, quatro Gram-positivos (*Staphylococcus epidermidis* 18.1.2, *Staphylococcus saprophyticus* 18.7.2, *Staphylococcus aureus* 27.12.4 e *Bacillus cereus* 8.4.2) foram obtidos de amostras de peles alógenas (de doadores cadáveres) disponibilizadas pelo Banco de Pele Dr. Roberto Corrêa Chem, previamente descartadas na triagem inicial e/ou pós processamento por cultura positiva. E um isolado Gram-negativo *Klebsiella variicola* 82.5.2, obtido de amostra de pele não alógena proveniente de um indivíduo vivo saudável cuja coleta, realizada em um estudo paralelo, foi feita com suabe da superfície da pele das áreas anterior e posterior do tronco. O isolamento e identificação dos isolados por MALDI-TOF e avaliação

do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos (penicilina 10U (PEN), cefoxitina 30 µg (CFO), ciprofloxacina 5 µg (CIP), amicacina 30 µg (AMI), gentamicina 10 µg (GEN), tetraciclina 30 µg (TET), estreptomicina 10 µg (EST) e azitromicina 15 µg (AZM)) pelo método de disco-difusão em Mueller Hinton foram realizados em trabalhos anteriores deste mesmo grupo de pesquisa (Meneghetti et al., 2018; dados não publicados). Previamente também foi realizada uma triagem dos isolados quanto sua capacidade de formação de biofilme pelo método cristal violeta (dados não publicados) Os isolados encontravam-se devidamente armazenados em glicerol a 15% e mantidos a -20°C.

Tabela 1. Identificação, perfil de resistência, capacidade de formação de biofilme e percentual de inibição dos coquetéis antimicrobianos sobre as células no estado planctônico dos isoladas selecionados para o presente estudo.

ISOLADO*	IDENTIFICAÇÃO	PERFIL DE RESISTÊNCIA*	BIOFILME**	% de inibição**	
				Trat. 1	Trat. 2
18.1.2	<i>S. epidermidis</i>	PEN-CFO-CIP-AZM	FORTE	100	100
18.7.2	<i>S. saprophyticus</i>	CFO-CIP-AZM	FORTE	99.94	96.57
27.12.4	<i>S. aureus</i>	PEN-CFO-CIP-AZM	MOD.	100	100
8.4.2	<i>B.cereus</i>	PEN-CFO	MOD.	100	100
82.5.2	<i>K. variicola</i> ***	PEN-AZM**	FRACO	100	100

PEN, penicilina; CFO, cefoxitina; CIP, ciprofloxacina, AZM, azitromicina. MOD., moderado. Tratamento 1, composto por penicilina (600 µg/mL), gentamicina (80 µg/mL) e ceftazidima (240 µg/mL); Tratamento 2, composto por penicilina (600 µg/mL), gentamicina (80 µg/mL), ceftazidima (240 µg/mL) e tetraciclina (160 µg/mL). \*Meneghetti et al., 2018, \*\*dados não publicados trabalhos paralelos.

### **Formação de biofilme sobre as peles alógenas e tratamento com coquetéis antimicrobianos**

Foram selecionados dois coquetéis antimicrobianos que apresentaram o melhor poder inibitório sobre as células bacterianas no estado planctônico, isoladas de peles alógenas e não alógenas (dados não publicados). Amostras dos fragmentos de peles utilizadas para esse experimento foram submetidas à cultura bacteriana e avaliadas por MEV para garantir que estavam sem contaminação prévia (material suplementar Figura S1).

O ensaio para a formação de biofilme sobre as amostras de pele alógena foi adaptado de Clauss et al. (2013). O inóculo bacteriano foi preparado a partir de colônias puras dos isolados cultivados em ágar triptona de soja (TSA) a 37°C por 24 horas. As colônias foram suspensas em solução salina 0,9% a uma turbidez de 0,5 da escala de McFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/mL). Em um tubo contendo caldo triptona de soja (TSB), com pinça estéril, foram colocados seis fragmentos de peles alógenas estéreis de 1cm<sup>2</sup> e adicionado o inóculo bacteriano ( $1 \times 10^5$  UFC/mL), em um volume final de 6 mL. Primeiramente o tubo foi incubado por 24 horas a 37°C na forma estática para avaliar a formação de biofilme nesse período (apenas dois isolados foram testados, *S. epidermidis* e *B. cereus*), em seguida o período de

incubação foi de 7 dias (para todos isolados). De forma asséptica, os seis fragmentos foram lavados em solução fisiológica para remoção das células não aderidas e distribuídos em tres tubos, dois fragmentos por tubo: tubo sem tratamento (5 mL de solução fisiológica 0,9%); tratamento 1, (solução fisiológica 0,9%, penicilina (600 µg/mL), gentamicina (80 µg/mL) e ceftazidima (240 µg/mL) em um volume total de 5 mL); e tratamento 2 (solução fisiológica 0,9%, os mesmo antimicrobianos do tratamento 1 mais a adição de tetraciclina (160 µg/mL), em um volume total de 5 mL). Os três tubos foram incubados a 37°C por 3 horas de forma estática. Os fragmentos foram lavados com solução fisiológica 0,9% de forma asséptica e um fragmento de cada tubo seguiu para análise por MEV e os demais fragmentos foram submetidos a cultura bacteriana. Para tanto, os fragmentos de pele foram cultivados em tubos separadamente contendo caldo TSB, incubados a 37°C por 24 horas. Se nesse período nenhum crescimento fosse observado (Turbidez do meio) seriam mantidos incubados por até 14 dias. Uma alíquota do caldo foi semeada em TSA para o isolamento e observação da pureza do crescimento bacteriano. Seguindo Pianigiani et al. (2010) foi considerada cultura negativa no TSA apenas se nenhum crescimento bacteriano fosse observado após 48 horas, 72 horas e 30 dias, sendo que a presença de uma única colônia definia a cultura como positiva.

### ***Preparo das amostras de pele alógena para a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)***

Para o preparo das amostras para a MEV, adaptado de Silva et al. (2014), as peles foram fixadas por imersão em solução de glutaraldeído 3% e tampão fosfato 0,1M (pH 7.2) durante 1 semana. As peles passaram por três lavagens em tampão fosfato 100mM e desidratadas em concentrações crescentes de acetona. A dessecação foi realizada pela técnica de ponto crítico CO<sub>2</sub> (CPD 030 Balzers, Liechtenstein). As amostras foram fixadas em *stubs* de alumínio e metalizadas com ouro (SCD050 Balzers, Liechtenstein) para a visualização em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 6060, usando o modo de emissão de elétrons secundários com tensões de aceleração de 15 kV e ampliações de 3.000x e 10.000x.

### **Resultados**

Na avaliação de formação de biofilme sobre as peles alógenas no período de incubação de 24 horas, os dois isolados testados *S. epidermidis* 18.1.2 e *B. cereus* 8.4.2 apresentaram poucas células aderidas à superfície da pele sem ocupar toda a extensão do tecido. Conforme pode-se observar pela micrografia da MEV (Fig. 1), entre e sobre o estrato córneo as células de *S. epidermidis* 18.1.2 se associaram na forma de pequenas microcolônias enquanto que as células de *B. cereus* apareceram distribuídas de forma mais

isolada. Ambos isolados apresentaram produção extremamente baixa de matriz, com fibras muito finas (Fig. 1).

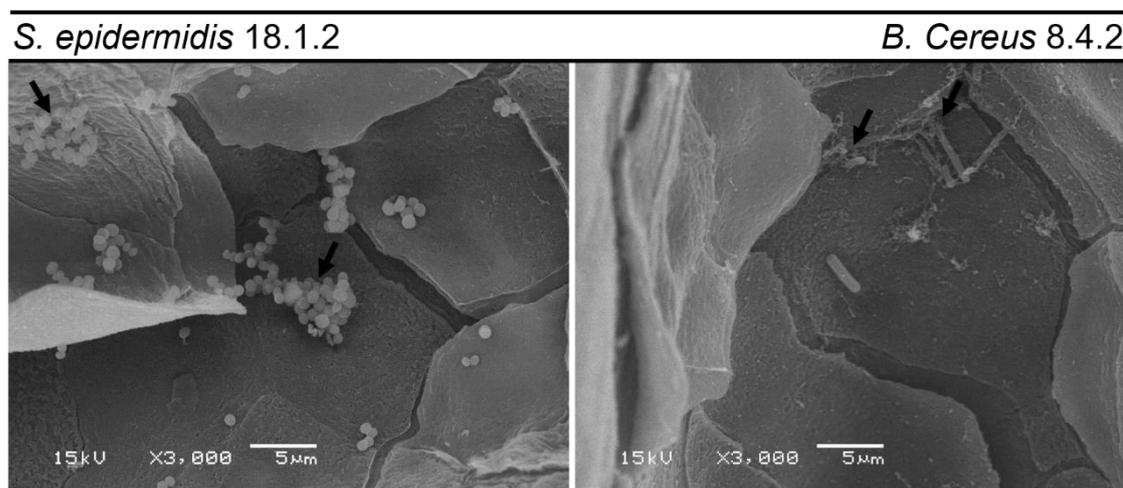


Figure 1: Micrografias eletrônicas de varredura da formação de biofilme de isolados bacterianos sobre estrato córneo de amostras de peles alógenas humanas, após período de incubação de 24 h em caldo triptona de soja. Setas pretas indicando fibras de matriz extracelular. Magnificação 3.000x, escala das barras 5 µm.

No período de incubação de sete dias, observou-se um estágio mais avançado de formação de biofilme onde *S. epidermidis* 18.1.2 e *B. cereus* 8.4.2 aderiram-se a superfície da pele em uma carga microbiana maior, dispostos na forma de agregados envoltos por fibras de matriz (Fig. 2A e D, ST). Diante desses resultados, para promover a maior adesão dos isolados à superfície das peles alógenas, foi escolhido o período de incubação de 7 dias em TSB, para depois então ser realizado o tratamento com os coquetéis antimicrobianos.

*S. epidermidis* 18.1.2 e *K. variicola* 82.5.2 destacaram-se por formar biofilmes densos de células agregadas unidas por matriz, estando dispostos sobre praticamente toda superfície do tecido (Fig. 2A e E ST). *B. cereus* 8.4.2 cresceu na forma de agregados volumosos também envoltos por fibras de matriz extracelular porém sem ocupar toda a superfície do tecido (Fig. 2D ST). *S. saprophyticus* 18.7.2 cresceu formando agregados mais discretos com poucas fibras extracelulares curtas em volta de algumas células e distribuiu-se ao longo da superfície do tecido (Fig. 2B ST). Enquanto que maioria das células de *S. aureus* 27.12.4 aderiram-se de forma individualizada e espaçada, sem formação de matriz extracelular (Fig. 2C ST).

Quando submetidos aos tratamentos com os coquetéis antimicrobianos, diferentes resultados foram observados sobre as estruturas dos biofilmes e sobre as células bacterianas. Contudo, nenhum dos coquetéis foi capaz de eliminar totalmente a contaminação. Comparando a micrografia do biofilme de *S. epidermidis* 18.1.2 sem e com os tratamentos, pode-se visualizar que os tratamentos 1 e 2 foram capazes de danificar a

estrutura morfológica do biofilme, bem como a estrutura celular devido às características irregulares dos cocos que mostraram deformidades após os tratamentos (Fig. 2A). Em *S. aureus* 27.12.4, que teve o crescimento das células de forma individualizada, os tratamentos tiveram ação direta sobre as células, que também apresentaram deformações com formação de poros na parede celular, visualizados nas micrografias MEV (Fig. 2C). Contudo, apesar dos tratamentos apresentarem ação inibitória sobre maior parte das células de *S. epidermidis* 18.1.2 e *S. aureus* 27.12.4, pode-se observar também que algumas permaneceram ilesas, com características iguais às células do controle que não recebeu o tratamento. A ineficiência dos coquetéis em eliminar todas as células bacterianas, foi confirmado pelo cultivo das peles contaminadas por essas duas espécies, cujo resultado foi positivo.

*B. cereus* 8.4.2 também teve sua estrutura do biofilme modificada pela ação dos coquetéis antimicrobianos. Os aglomerados observados no controle sem tratamento não foram encontrados nos tecidos submetidos aos tratamentos 1 e 2 (Fig. 2D). Do contrário, as células estavam distribuídas, com características morfológicas alteradas e restos celulares. Ambos tratamentos não inibiram a contaminação por *B. cereus* 8.4.2, visto que o cultivo das amostras de pele, após serem submetidas aos tratamentos, apresentaram crescimento bacteriano.

*S. saprophyticus* 18.7.2 e *K. variicola* 82.5.2 não foram afetadas por nenhum dos tratamentos (Fig. 2, B e E). Apesar de visualmente ser observado um menor número de células aderidas nas peles submetidas aos tratamentos, em ambas espécies as células estavam intactas, iguais ao controle que não recebeu o tratamento. O cultivo das amostras de peles após serem tratadas, apresentou crescimento tanto para *K. variicola* 82.5.2 quanto para *S. saprophyticus* 18.7.2.

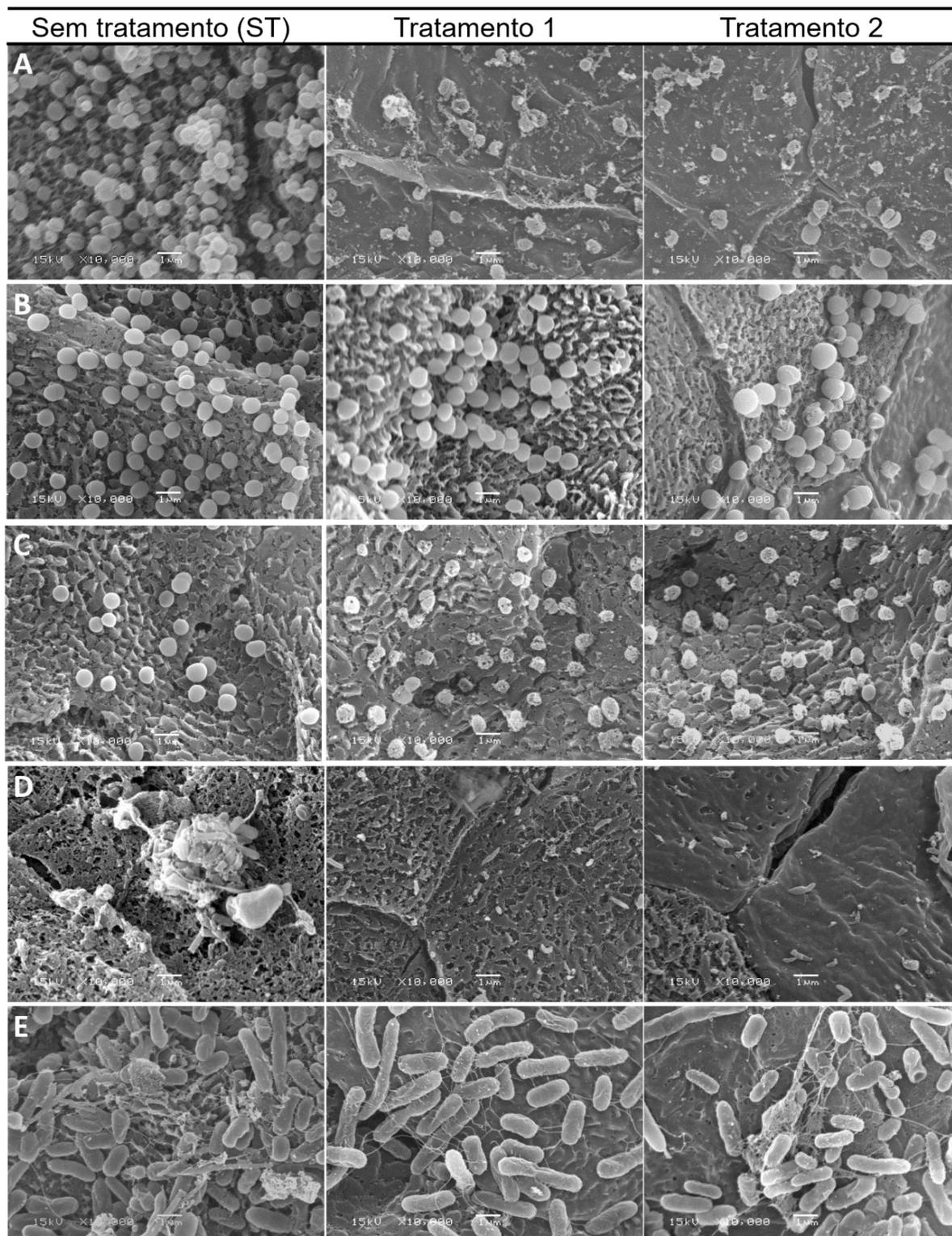


Figure 2: Micrografias eletrônicas de varredura da formação de biofilme de isolados bacterianos sobre estrato córneo de amostras de peles alógenas humanas, após período de incubação de sete dias. (A) *Staphylococcus epidermidis* 18.1.2, (B) *Staphylococcus saprophyticus* 18.7.2, (C) *Staphylococcus aureus* 27.12.4, (D) *Bacillus cereus* 8.4.2 e (E) *Klebsiella variicola* 82.5.2. Tratamento 1, penicilina (600 µg/mL), gentamicina (80 µg/mL) e ceftazidima (240 µg/mL); Tratamento 2, penicilina (600 µg/mL), gentamicina (80 µg/mL), ceftazidima (240 µg/mL) e tetraciclina (160 µg/mL). Magnificação 10.000x, escala das barras 1 µm.

## Discussão

Através das micrografias eletrônicas de varredura é possível observar que o estrato córneo da epiderme apresenta uma superfície áspera a qual as células bacterianas avaliadas aderiram-se fortemente. Tem sido reportado que irregularidades em diferentes tipos de superfícies acabam favorecendo a adesão e formação de biofilme (Scheuerman et al., 1998) por apresentarem maior área de superfície nas quais as depressões acabam proporcionando sítios mais favoráveis a colonização microbiana (An e Friedman, 1998; Katsikogianni e Missirlis, 2004).

Sabe-se que o estrato córneo contém baixos níveis de nutrientes e altos níveis de queratina, a qual um número pequeno de bactérias consegue usar como fonte de nutrição, o que acaba limitando a densidade bacteriana sobre a superfície da pele. Além de diversos outros mecanismos que a pele saudável possui para combater sua contaminação (Percival et al., 2012). Contudo, esses fatores podem não ser um problema para espécies formadoras de biofilme, pois em geral, a capacidade de desenvolver biofilmes em superfícies ou interfaces representa uma estratégia para sobreviver a condições de limitação de nutrientes e outros tipos de condições adversas (Dewanti e Wong, 1995).

Considerando as peles alógenas avaliadas no presente estudo, em 24 horas *S. epidermidis* 18.1.2 e *B. cereus* 8.4.2 já demonstraram capacidade de se aderir sobre sua superfície, em condições ideais de crescimento *in vitro*. Nos experimentos realizados com período de incubação de sete dias, todas espécies avaliadas, aderiram-se a superfície da pele formando aglomerados celulares volumosos ou discretos, com exceção de *S. aureus* que cresceu de forma individualizada. Mesmo a cepa *K. variicola* 82.5.2 sendo classificada como fraca formadora de biofilme pelo teste em microplaca pelo método de cristal violeta, formou um biofilme com elevada densidade celular sobre as peles alógenas, reforçando que a pele pode servir de substrato para a adesão de células formadoras de diferentes níveis de biofilme.

*S. aureus* 27.12.4 cresceu de forma isolada sobre o tecido, mesmo sendo classificado como moderado formador de biofilme no teste em microplaca. Essas características podem ser justificadas pelo fato de que muitos microrganismos podem utilizar múltiplas vias genéticas para iniciar o desenvolvimento do biofilme e isso varia entre as diferentes espécies e também de acordo com o tipo de superfície, ou seja, a bactéria pode utilizar diferentes caminhos para sua fixação inicial, resultando em diferentes capacidades de formação de biofilme conforme a superfície que está aderida (Pratt e Kolter, 1998; Watnick e Kolter, 1999).

Embora os isolados bacterianos avaliados não tenham formado biofilmes com as células completamente embebidas em EPS, quatro isolados (*S. epidermidis* 18.1.2, *S. saprophyticus* 18.7.2, *B. cereus* 8.4.2 e *K. variicola* 82.5.2) apresentaram fibras extracelulares

de diferentes tamanhos que se distribuíram em volta das células conectando-as umas as outras. Entre as várias funções que a matriz tem, uma das mais importantes é proteger as células bacterianas da ação de antimicrobianos, criando uma barreira que restringe a difusão desses compostos através dos biofilmes (Sousa et al., 2009).

Embora as observações por MEV por si só não permitam uma análise preditiva da eficácia dos antimicrobianos, elas são uma ferramenta valiosa para estudar em detalhe o efeito dos agentes antimicrobianos na morfologia celular de populações bacterianas e sobre a estrutura dos biofilmes (Gomes e Mergulhão, 2017). Os coquetéis antimicrobianos testados tiveram diferentes efeitos sobre os isolados avaliados. *S. epidermidis* 18.1.2 teve o biofilme totalmente desestruturado pelos dois coquetéis testados, bem como as células de *S. aureus* 27.12.4, tiveram sua morfologia celular danificada tomando formas irregulares, com poros na parede celular após exposição aos dois tratamentos. Os tratamentos sobre *B. cereus* 8.4.2 além de desestabelecerem a estrutura do biofilme, alteraram a morfologia celular. Enquanto que os pequenos aglomerados de *S. saprophyticus* 18.7.2 e o denso biofilme de *K. variicola* 82.5.2 praticamente não foram morfologicamente afetados pelos tratamentos.

É importante ressaltar que o cultivo das peles alógenas após receberem os tratamentos com os coquetéis antimicrobianos apresentaram resultado positivo para os cinco isolados avaliados, mesmo que com um número bem menor de células comparado ao crescimento observado no controle. Sendo assim, independente do grau de adesão e formação de biofilme, todos isolados persistiram aos tratamentos aplicados, ao contrário do que foi observado quando os mesmos tratamentos foram aplicados sobre estes isolados na forma planctônica e tiveram percentual de inibição de 100%. Com exceção de *S. saprophyticus* 18.7.2 que o percentual de inibição foi de 99.94 e 96.57% para os tratamentos 1 e 2, respectivamente. Além disso, os cinco isolados apresentaram resultados de susceptibilidade a GEN e TET pelo método de disco-difusão, sendo assim os coquetéis deveriam ser eficientes sobre essas células (Meneghetti et al 2018).

Os biofilmes têm sido associados à emergência de bactérias resistentes (Chadha, 2014) porém a natureza molecular do aumento da tolerância aos antimicrobianos nos biofilmes ainda não foi bem elucidada. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a suscetibilidade reduzida das bactérias quando estão na forma de biofilmes, como penetração restrita dos antibióticos (Stewart, 1996), diminuição das taxas de crescimento e metabolismo (Brown et al., 1988; Xu et al., 1998), quorum sensing e indução de um fenótipo específico de biofilme (Mah e O'Toole, 2001; Olson et al., 2002) ativação da resposta ao estresse (Xu et al., 1998) e aumento da expressão de bombas de efluxo (Drenkard, 2003).

Mas o que vem se destacando nas pesquisas, é que avaliando a expressão gênica global em diferentes estágios de formação de biofilme os estudos sugerem que a formação de subpopulações resistentes são auxiliadas pela indução de fenótipos específicos de

biofilme, incluindo crescimento lento ou ausência de crescimento, e respostas de estresse que resultam em alterações fisiológicas nas células. Sendo assim, certas características que aumentam a tolerância aos antimicrobianos passam a ser expressas apenas quando as células adotam o fenótipo de biofilme (Ito et al., 2009).

Por este motivo mesmo as bactérias susceptíveis, que não têm uma base genética conhecida para resistência, podem exibir uma susceptibilidade profundamente reduzida quando formam biofilmes (Stewart e Costerton, 2001). Um desses fenótipos altamente protetor, consiste nas "*persisters cells*". Embora a maioria das bactérias em biofilmes sejam rapidamente mortas por antibióticos, essas subpopulações, que podem consistir em 1% ou menos da população original, não crescem nem morrem na presença de antibióticos e persistem apesar da exposição contínua a antibióticos, por adotarem um estado fisiológico dormente, semelhante aos esporos bacterianos (Stewart e Costerton, 2001). Essas observações podem explicar porque os isolados do presente estudo foram inibidos pelos coquetéis no estado planctônico e persistiram aos tratamentos após serem induzidos a formar biofilme, mesmo não tendo a estrutura tridimensional de biofilme maduro convencional coberto por EPS e sendo susceptíveis a pelo menos um dos antimicrobianos inseridos nos coquetéis.

Desta forma, observa-se a ineficiência dos coquetéis antimicrobianos em eliminar a contaminação bacteriana de peles alógenas, quando as bactérias estão em processo de formação de biofilme, o que sugere que talvez seja necessário introduzir a esses coquetéis compostos capazes de desagregar a matriz extracelular do biofilme ou inibir a sua stase, inibidores de QS e de outras vias de sinalização implicadas na formação de biofilmes e de adesão celular (Grassi et al., 2017).

## **Conclusão**

A pele é a única entre as superfícies epiteliais com complexas interações ecológicas com o ambiente, portanto o estudo da distribuição dos microrganismos sobre aloenxertos e a sua capacidade em servir como substrato para adesão e desenvolvimento de biofilmes bacterianos tem impacto direto nos protocolos de tratamentos utilizados para a descontaminação desses tecidos nos bancos de pele. No presente estudo observou-se que bactérias com diferentes capacidades de formação de biofilmes aderiram-se a superfície das peles alógenas, e uma vez que adotaram o fenótipo de biofilme, não foram eliminadas pelos coquetéis antimicrobianos testados mesmo sendo utilizadas diferentes classes com alvos distintos sobre as células. Esses resultados enfatizam a necessidade em se reavaliar os protocolos de descontaminação de tecidos, nos casos em que as contaminações persistem, onde a inserção de compostos que atuem no processo de formação de biofilme e de

desestruturação do mesmo podem potencializar a ação dos antimicrobianos, eliminando a contaminação de forma mais eficiente.

## Referências

- Akiyama H, Hamada T, Huh WK, Yamasaki O, Oono T, Fujimoto W, et al. 2003. Confocal laser scanning microscopic observation of glycocalyx production by *Staphylococcus aureus* in skin lesions of bullous impetigo, atopic dermatitis and pemphigus foliaceus. *Br J Dermatol.* 148(3):526-32.
- Allen HB, Vaze ND, Choi C, Hailu T, Tulbert BH, Cusack CA, et al. 2014. The presence and impact of biofilm-producing staphylococci in atopic dermatitis. *JAMA Dermatol.* 150(3):260-5.
- An YH, Friedman RJ. 1998. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res.* 43(3):338-48.
- Batoni G, Maisetta G, Esin S. 2016. Antimicrobial peptides and their interaction with biofilms of medically relevant bacteria. *Biochim Biophys Acta.* 1858(5):1044-60.
- Brown MR, Allison DG, Gilbert P. 1988. Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: a growth-rate related effect? *J Antimicrob Chemother.* 1988 Dec;22(6):777-80.
- Chadha T. 2014. Bacterial biofilms: survival mechanisms and antibiotic resistance. *J Bacteriol Parasitol.* 5(3):190.
- Clauss M, Tafin UF, Bizzini A, Trampuz A, Ilchmann T. 2013. Biofilm formation by staphylococci on fresh, fresh-frozen and processed human and bovine bone grafts. *Eur Cell Mater.* 25:159-66.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 284(5418):1318-22.
- Dewanti R, Wong AC. 1995. Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. *Int J Food Microbiol.* 26(2):147-64.
- Donlan RM. 2001. Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis* 7(2):277-81.
- Donlan RM, Costerton JW. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 15(2):167-93.
- Drenkard E. 2003. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect.* 5(13):1213-9.
- Gaucher S, Khaznadar Z, Gourevitch JC, Jarraya M. 2016. Skin donors and human skin allografts: evaluation of an 11-year practice and discard in a referral tissue bank. *Cell Tissue Bank.* 17(1):11-9.
- Gomes LC, Mergulhão FJ. 2017. SEM Analysis of surface impact on biofilm antibiotic treatment. *Scanning.* 2017(ID 2960194):7.
- Grassi L, Maisetta G, Esin S, Batoni G. 2017. Combination strategies to enhance the efficacy of antimicrobial peptides against bacterial biofilms. *Front Microbiol.* 8:2409.
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.* 2(2):95-108.
- Hoiby N, Ciofu O, Johansen HK, Song ZJ, Moser C, Jensen PO, et al. 2011. The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci.* 3(2):55-65.
- Ito A, Taniuchi A, May T, Kawata K, Okabe S. 2009. Increased antibiotic resistance of *Escherichia coli* in mature biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 75(12):4093-100.
- Jahns AC, Lundskog B, Ganceviciene R, Palmer RH, Golovleva I, Zouboulis CC, et al. 2012. An increased incidence of *Propionibacterium acnes* biofilms in acne vulgaris: a case-control study. *Br J Dermatol.* 167(1):50-8.
- Johani K, Abualsaud D, Costa DM, Hu H, Whiteley G, Deva A, et al. 2018. Characterization of microbial community composition, antimicrobial resistance and biofilm on intensive care surfaces. *J Infect Public Health.* 11(3):418-24.
- Katsikogianni M, Missirlis YF. 2004. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur Cell Mater.* 8:37-57.

- Kearney JN. 1998. Quality issues in Skin Banking: a review. *Burns*. 24(4):299-305.
- Lindford AJ, Frey I, Vuola J, Koljonen V. 2010. Evolving practice of the Helsinki Skin Bank. *Int Wound J*. 7(4):277-81.
- Mah TF, O'Toole GA. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*. 9(1):34-9.
- Mathur M, De A, Gore M. 2009. Microbiological assessment of cadaver skin grafts received in a skin bank. *Burns*. 35(1):104-6.
- Matoski AR, Silva CR, Silva-Cunha DR, Calomeno LH, Bonato FT, Nigro MA. 2015. First-year experience of a new skin bank in Brazil. *Plast Aesthet Res*. 2(6):326-31.
- Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR. 2002. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res*. 66(2):86-92.
- Percival SL, Emanuel C, Cutting KF, Williams DW. 2012. Microbiology of the skin and the role of biofilms in infection. *Int Wound J*. 9(1):14-32.
- Percival SL, Suleman L, Vuotto C, Donelli G. 2015. Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control. *J Med Microbiol*. 64(Pt4):323-34.
- Pianigiani E, Ierardi F, Cuciti C, Brignali S, Oggioni M, Fimiani M. 2010. Processing efficacy in relation to microbial contamination of skin allografts from 723 donors. *Burns*. 36(3):347-51.
- Pianigiani E, Risulo M, Ierardi F, Sbrano P, Andreassi L, Fimiani M. et al. 2006. Prevalence of skin allograft discards as a result of serological and molecular microbiological screening in a regional skin bank in Italy. *Burns*. 32(3):348-51.
- Pirnay JP, Verween G, Pascual B, Verbeken G, De Corte P, Rose T, et al. 2012. Evaluation of a microbiological screening and acceptance procedure for cryopreserved skin allografts based on 14-day cultures. *Cell Tissue Bank*. 13(2):287-95.
- Pratt LA, Kolter R. 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili.
- Russu E, Mureşan A, Grigorescu B. 2011. Vascular graft infections management. *Clin Manage*. 3:16-9.
- Scheuerman TR, Camper AK, Hamilton MA. 1998. Effects of Substratum Topography on Bacterial Adhesion. *J Colloid Interface Sci*. 198 Dec 1;208(1):23-33.
- Seng R, Kittit T, Thummeepak R, Kongthai P, Leungtongkam U, Wannalerdsakun S, et al. 2017. Biofilm formation of methicillin-resistant coagulase negative staphylococci (MR-CoNS) isolated from community and hospital environments. *PLoS One*. 12(8):e0184172.
- Silva VO, Soares LO, Júnior AS, Mantovani HC, Chang Y, Moreiraa MAS. 2014. Biofilm formation on biotic and abiotic surfaces in the presence of antimicrobials by *Escherichia coli* isolates from cases of bovine mastitis. *Appl Environ Microbiol*. 80(19):6136-45.
- Soto-Giron MJ, Rodriguez-R LM, Luo C, Elk M, Ryu H, Hoelle J, et al. 2016. Biofilms on Hospital Shower Hoses: Characterization and Implications for Nosocomial Infections. *Appl Environ Microbiol*. 82(9):2872-83.
- Sousa C, Teixeira P, Oliveira R. 2009. The role of extracellular polymers on *Staphylococcus epidermidis* biofilm biomass and metabolic activity. *J Basic Microbiol*. 49(4):363-70.
- Stewart PS. 1996. Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 40(11): 2517-22.
- Stewart PS, Costerton JW. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*. 358(9276):135-8.
- Trampuz A, Zimmerli W. 2006. Diagnosis and treatment of infections associated with fracture-fixation devices. *Injury*. 37(2):S59-66.
- Watnick PI, Kolter R. 1999. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol Microbiol*. 34(3):586-95.
- Xu KD, Stewart PS, Xia F, Huang CT, McFeters GA. 1998. Spatial physiological heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is determined by oxygen availability. *Appl Environ Microbiol*. 64(10):4035-9.

Material suplementar

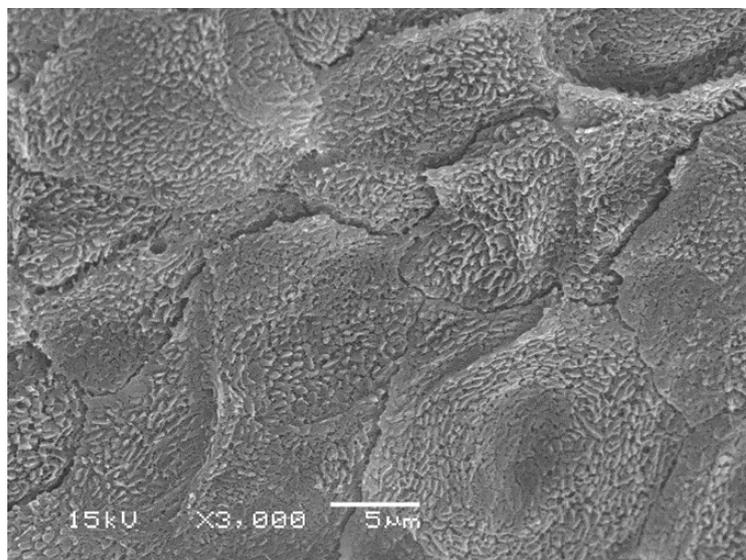


Figura S1: Micrografia eletrônica de varredura de pele alógena humana sem contaminação microbiana. Magnificação 3.000x, escala das barras 5 µm.

## 5.4 Artigo 4

**Fungal contamination of human skin allografts**

Karine Lena Meneghetti, Micaela do Canto Canabarro, Mercedes Passos Geimba,  
Gertrudes Corção

Submetido na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical como short  
communication – fator de impacto 1.13

## Fungal contamination of human skin allografts

Karine Lena Meneghetti, Micaela do Canto Canabarro, Mercedes Passos Geimba, Gertrudes Corção

Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Institute of Basic Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Sarmiento Leite 500, 90050-170, Porto Alegre, Brazil.

Corresponding author: Gertrudes Corção, corcao@ufrgs.br, 55 (51) 33084111

### Abstract

**Introduction:** Knowledge about which fungi are contaminants of skin allografts serves as a basis for studies about necessity and efficacy of antifungal treatments. This work aimed to isolate fungi from 32 skin allografts and analyze their amphotericin B susceptibility. **Methods:** Fungi identification was done by morphological analysis and/or by matrix assisted laser desorption ionization–time of flight. Minimum inhibitory concentration (MIC) was performed by broth microdilution method. **Results:** Nineteen (59.3%) allografts were positive for filamentous fungi including *Paecilomyces*, *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. Amphotericin B MICs ranged from 0,0625 to 4 µg/mL. **Conclusion:** Amphotericin B concentration of 4 µg/mL may be an initial guiding value for allograft treatment tests.

**Keywords:** skin allograft, fungal contamination, antimicrobial fungal susceptibility, skin bank.

Standards and regulations regarding the release of contaminated tissues are not universal among tissue banks worldwide. Regulatory organizations like the American Association of Tissue Banks, defined that allografts contaminated with pathogens should not be released for grafting, but classification of pathogens may differ among countries<sup>1</sup>. In this way, in some skin banks, the presence of fungi in the pre-decontamination analysis is an exclusion criterion for tissue, even those considered normal part of skin microbiota<sup>2,3,4</sup>. Whereas, other skin banks attempts to eliminate the fungal contamination by the addition of antifungal agents to the antimicrobial cocktails used in the skin treatment<sup>5,6,7</sup>. Being that, the most frequently antifungal used is amphotericin B<sup>5,7</sup>.

The safety of using skins allografts previously contaminated by fungi is little discussed in the literature, studies are more concentrated on bacterial contamination. However, it's important to know which fungi are allogeous skin contaminants to serve as a basis for studies about necessity and efficacy of antifungal treatments. Thereby, this work aimed to analyze the presence of fungi and their amphotericin B susceptibility in isolates of human skin allografts to a better understanding about this subject matter. This research was approved by the Research Ethics Committees of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (protocol CAAE 36949514.8.0000.5347) and the Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (protocol CAAE 45100215.1.0000.5335).

A total of 32 human skin samples from cadaveric donors were analyzed. The skin samples were obtained between 2012 and 2014 by the skin bank of Dr. Roberto Corrêa Chem from the Hospital Complex Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Brazil and had already been discarded due to microbial contamination. In this skin bank, only skins with negative microbiological results are available for transplantation while the presence of positive cultures of fungi in the pre- or pos-processing analysis causes the immediate tissue discard.

Skin fragments (strips of 5 x 20 cm) were immersed in 85% glycerol and maintained at  $4 \pm 2$  °C. They were washed with 0.85% sodium chloride solution in a laminar air flow cabinet and 1 cm<sup>2</sup> of each skin strip (representing the totality of the sample) was transferred to 80 mL of sabouraud dextrose broth (SDB) incubated at room temperature for 7 days. For fungal isolation, an aliquot from de SDB was inoculated in duplicate in sabouraud dextrose agar (SDA) and potato dextrose agar (PDA) incubated for up to 7 days at 37°C and room temperature, respectively.

Fungal morphologies were analyzed by microscopic observation after microculturing and staining with blue dye lactophenol cotton. Then, the isolates were subjected to matrix assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF) based identification. For this, the colonies were subcultured in PDA at 30 °C. After 72 h, a sample of the colony was collected and extracted using formic acid/acetonitrile extraction<sup>8</sup>. The MALDI-TOF reading and score criteria of identification was according to the manufacturer's recommendations (MALDI-TOF Microflex Biotyper 4.0, Bruker).

The minimum inhibitory concentration (MIC) to amphotericin B was performed by broth microdilution method following CLSI M38-A2 guidelines<sup>9</sup>, with a modification in which suspension density was adjusted through counting the spores in hemocytometer. The experiments were done in duplicate and two quality control strains *Candida parapsilosis* ATCC22019 and *Candida krusei* ATCC6258 were included. MIC values interpretation followed the CLSI M38-A2<sup>9</sup> and the epidemiological cut-off values (ECV) of *Aspergillus fumigatus*<sup>10</sup>.

Among the 32 skin samples analyzed, 19 (59.3%) were positive for filamentous fungus growth (a single fungus in each sample). According to the MALDI-TOF score criteria and/or the colonial and microscopic characteristics, three genera were identified. As shown on Table 1, eleven (57.8%) skin samples were contaminated with the genus *Paecilomyces* (five of them

were identified as *Paecilomyces variotii*), seven (36.8%) with *Aspergillus* sp. (one of them identified as *Aspergillus niger*) and one (5.2%) with *Penicillium* sp.

Table 1. Identification and amphotericin B susceptibility of fungi isolated from human skin grafts.

Skin sample	Isolated fungus (n = 19)	Amphotericin B MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )
032	<i>Paecilomyces variotii</i>	1
040	<i>Paecilomyces variotii</i>	1
010	<i>Paecilomyces variotii</i>	2
037	<i>Paecilomyces variotii</i>	2
038	<i>Paecilomyces variotii</i>	2
029	<i>Paecilomyces</i> sp.	1
039	<i>Paecilomyces</i> sp.	1
042	<i>Paecilomyces</i> sp.	1
028	<i>Paecilomyces</i> sp.	2
035	<i>Paecilomyces</i> sp.	2
033	<i>Paecilomyces</i> sp.	4
027	<i>Aspergillus niger</i>	2
020	<i>Aspergillus</i> sp.	2
021	<i>Aspergillus</i> sp.	2
025	<i>Aspergillus</i> sp.	2
07	<i>Aspergillus</i> sp.	4
08	<i>Aspergillus</i> sp.	0,0625
023	<i>Aspergillus</i> sp.	4
022	<i>Penicillium</i> sp.	4

MIC (minimum inhibitory concentration).

The three genera found are widely distributed in the environment and may become pathogenic when contaminate immunocompromised individuals<sup>6,11</sup>. It is the first report describing the isolation of *Paecilomyces* sp. from skin allografts. This fungus has been associated to endocarditis by affecting aortic valves allograft. Moreover, it is morphologically related to the genus *Penicillium* and for this reason deserves a more careful microscopic evaluation<sup>11</sup>.

Another Brazilian skin bank reported 15.7% of skin discard due filamentous fungi contamination<sup>3</sup>. Lindford et al.<sup>2</sup> reported 3.4% of non-*albicans* *Candida* contamination among the allografts tested positive for microorganism, whereas Gaucher et al.<sup>4</sup> detected fungal contamination in 10.7 % of skin donors, in which *Candida albicans* was the predominant yeast, followed by *C. parapsilosis*, *C. glabrata* and *Trichosporon inkin*. *Penicillium* sp. was the

predominant filamentous fungus followed by *Rhizopus* sp. and *Scapulariopsis* sp. No antifungal treatment was applied in the skins of these studies.

In Siena skin bank, 5.3% skin samples were contaminated with fungi, which were submitted to antimycotic treatment with terbinafine or amphotericin B and were successful decontaminated. The fungi isolated were predominantly yeasts (73%) with the most prevalent being *Malassezia* spp. followed by *Candida* spp. and *Pseudallescheria boydii*. Filamentous fungi corresponded to 27%, with the most prevalent being *Aspergillus* spp. followed by *Verticillium* spp. and *Penicillium*<sup>6</sup>.

In the present study, no yeast was observed in the skin allografts analyzed, unlike the studies cited above that reported mainly the isolation of *Candida* species.

Some species of fungi are part of the normal skin microbiota<sup>12</sup>. In addition, donors may have been hospitalized for a long period prior to donation, which may contribute to increase the skin bioburden with microorganisms from the hospital environment<sup>4</sup>, including fungi, since studies have reported the presence of fungi in intensive care units<sup>13</sup>. This emphasizes the need to a better characterization of fungi contamination of human skin allografts as its presence is consistent, even being normal skin microbiota since its impact in immunocompromised patients is unknown<sup>14</sup>.

Regarding the susceptibility to amphotericin B, in present work the isolates showed MIC values ranging from 0,0625 to 4 µg/mL. *Paecilomyces variotii* MIC values ranged from 1 to 2 µg/mL, *Paecilomyces* sp. 1 to 4 µg/mL, *Aspergillus niger* 2 µg/mL, *Aspergillus* sp. 0,0625 to 4 µg/mL and *Penicillium* sp. 4 µg/mL. It was observed that 13 (68.4%) of the isolates presented high MIC values (> 1 µg/mL) (Table 1).

It is known that treatment success of an infection with an antifungal drug is best achieved using antifungal susceptibility tests for development of clinical breakpoints in order to predict the therapeutic outcome<sup>15</sup>, but the lack of breakpoints values for most emerging fungi

pathogens is a problem. According to the CLSI M38-A2<sup>9</sup>, a MIC of an opportunistic filamentous fungi for amphotericin B is around 0.5 to 2 µg/mL. MICs above this would be associated with treatment failure in the clinic. Based on MIC results, the majority of the isolates presented MICs up to 2 µg/mL, only 4 isolates had MIC above this value. But considering ECV of *A. fumigatus*<sup>10</sup>, 13 (68.4%) isolates presented MIC values >1 µg/mL, in excess of the ECV for *A. fumigatus*. This may suggest that isolates have reduced amphotericin B susceptibility and may be harboring resistance mechanisms.

The highest MIC value observed was 4 µg/mL, may be an initial guiding value for the skin treatment since it is applied directly to the tissue. Different concentrations should be tested on tissue to assess their potential for epithelial penetration and efficacy. The amphotericin B concentration used in different works, ranged from 0,08 µg/mL<sup>5</sup>, 1.25 µg/mL<sup>7</sup> to 5 µg/mL<sup>6</sup> but no work presented antifungal susceptibility tests results.

Although this is an initial study, it is expected to instigate further studies related to fungal contamination of skin allografts, so that a treatment can be optimized as soon as possible and can be validated in different tissue banks worldwide. Until then, the discarding of allogeneic skins by fungal contaminations is the safest procedure due the lack of a standardized antimicrobial treatment.

**Acknowledgements:** We would like to thank Aline Francielle Damo Souza and Luana Pretto from the skin bank of Dr. Roberto Corrêa Chem from the Hospital Complex Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre for preparing the skin allografts samples for this study.

**Conflict of interest:** The authors declare that they have no competing interests.

**Financial support:** This study received a grant from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Brazilian Federal Government Agency).

## References

1. Germain M, Strong DM, Dowling G, Mohr J, Duong A, Garibaldi A, et al. Disinfection of human cardiac valve allografts in tissue banking: systematic review report. *Cell Tissue Bank*. 2016;17(4):593-601.
2. Lindford AJ, Frey I, Vuola J, Koljonen V. Evolving practice of the Helsinki Skin Bank. *Int Wound J*. 2010;7(4):277-81.
3. Matioski AR, da Silva CR, da Silva-Cunha DR, Calomeno LH, Bonato FT, Nigro MA. First-year experience of a new skin bank in Brazil. *Plast Aesthet Res*. 2015;2(6):326-31.
4. Gaucher S, Khaznadar Z, Gourevitch JC, Jarraya M. Skin donors and human skin allografts: evaluation of an 11-year practice and discard in a referral tissue bank. *Cell Tissue Bank*. 2016;17(1):11-19.
5. Mathur M, De A, Gore M. Microbiological assessment of cadaver skin grafts received in a Skin Bank. *Burns*. 2009;35(1):104-6.
6. Pianigiani E, Ierardi F, Cuciti C, Brignali S, Oggioni M, Fimiani M. Processing efficacy in relation to microbial contamination of skin allografts from 723 donors. *Burns*. 2010;36(3):347-51.
7. Pirnay JP, Verween G, Pascual B, Verbeken G, De Corte P, Rose T, et al. Evaluation of a microbiological screening and acceptance procedure for cryopreserved skin allografts based on 14-day cultures. *Cell Tissue Bank*. 2012;13(2):287-95.
8. Cassagne C, Ranque S, Normand AC, Fourquet P, Thiebault S, Planard C, et al. Mould routine identification in the clinical laboratory by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One*. 2011;6(12):e28425.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard-second edition. CLSI document M38-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

10. Espinel-Ingroff A, Cuenca-Estrella M, Fothergill A, Fuller J, Ghannoum M, Johnson E, et al. Wild-Type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B and *Aspergillus* spp. for the CLSI broth microdilution method (M38-A2 document). *Antimicrob Agents Chemother*, 2011;55(11):5150-4.
11. Senior JM, Saldarriaga C. Endocarditis infecciosa por *Paecilomyces variotii*. *Biomedica*. 2009;29:177-80.
12. Findley K, Oh J, Yang J, Conlan S, Deming C, Meyer JA, et al. Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin. *Nature*. 2013;498(7454):367-70.
13. Gonçalves CL, Mota FV, Ferreira GF, Mendes JF, Pereira EC, Freitas CH. Airborne fungi in an intensive care unit. *Braz J Biol*. 2018;78(2):265-70.
14. Johnston C, Callum J, Mohr J, Duong A, Garibaldi A, Simunovic N, et al. Disinfection of human skin allografts in tissue banking: a systematic review report. *Cell Tissue Bank*. 2016;17(4):585-92.
15. Rex JH, Pfaller MA. Has antifungal susceptibility testing come of age? *Clin Infect Dis*. 2002;35(8):982-9.

## 5.5 Capítulo 5 - Dados não apresentados na forma de artigo

5.5.1 *Bacillus* sp. de amostras de pele alógena e não alógena: diversidade de espécies e similaridade entre isolados.

Através da identificação por MALDI-TOF com escores >2, dos 32 lotes de amostras de peles alógenas avaliadas, foram isolados *B. cereus* e *B. subtilis* de 7 (21.8 %) amostras cada um, *B. vallismortis* de 3 (9.3 %), *B. pumilus* e *B. licheniformis* de 1 (3.1 %) amostra cada um. Enquanto que nas amostras de peles não alógenas, dos 60 lotes avaliados, *B. cereus* foi encontrado em 2 (3.3 %), *B. megaterium* em 5 (8.3 %) e *Bacillus altitudinis* em 1 (1.6 %) amostra. *Bacillus* sp. de 7 (21.8%) peles alógenas e de 8 (13.3 %) não alógenas, não foram identificados a nível de espécie por MALDI-TOF (Tabela 1).

*Bacillus* é um gênero ubíquo, estando presente até mesmo sobre a pele humana saudável (Saleh et al., 2014). Por serem células formadoras de esporos, adaptam-se a condições adversas o que contribui para sua persistência e disseminação em diferentes ambientes. Entre as espécies isoladas, *B. cereus* é a espécie de maior relevância clínica por ser comumente conhecido por causar intoxicações alimentares, infecções locais e sistêmicas (Jeßberger et al., 2015). As outras espécies são geralmente percebidas com pouca significância clínica e são comumente consideradas como contaminantes ambientais. No entanto, relatos recentes indicam que esses organismos podem ser responsáveis por infecções locais ou sistêmicas em humanos, principalmente quando em contato com indivíduos imunocomprometidos (Celandroni et al., 2016).

A maioria dos trabalhos sobre contaminantes de aloenxertos cutâneos, não identificam a nível de espécie os isolados de *Bacillus*, sendo difícil a comparação (Matoski et al., 2015, Gaucher et al., 2016), ou então citam a presença de *B. cereus* e outras espécies do gênero, sem especificá-las (Pianigiani et al., 2010; Lindford et al., 2010). O que se observa é que de fato *B. cereus* é a espécie de *Bacillus* mais frequentemente descrita em aloenxertos de pele, porém foi pouco observada em peles não alógenas avaliadas neste estudo. As características de armazenamentos, de estoque em glicerol, manipulação e tratamentos prévios, podem justificar as diferenças de diversidade de espécies encontradas nos dois tipos de tecidos. Além disso, a remoção tardia de pele do doador, quando doador de múltiplos órgãos, pode resultar em um aumento de patógenos bacterianos e esporos que são mais

resistentes aos procedimentos de desinfecção e esterilização (Eastlund, 2006).

*B. megaterium* e *B. altitudinis* foram encontrados apenas nas peles não alógenas, o que vai ao encontro do que é descrito na literatura que estas espécies são muito raramente relacionadas a infecções (Guo et al., 2015).

Tabela 1. Distribuição de espécies de *Bacillus* isolados e identificados por MALDI – TOF em peles alógenas e não alógenas.

<b>Identificação</b>	<b>Pele alógena (n=32)</b>	<b>Pele não alógena (n=60)</b>
<i>Bacillus cereus</i>	7 (21.8 %)	2 (3.3 %)
<i>Bacillus subtilis</i>	7 (21.8 %)	-
<i>Bacillus vallismortis</i>	3 (9.3 %)	-
<i>Bacillus pumilus</i>	1 (3.1 %)	-
<i>Bacillus licheniformis</i>	1 (3.1 %)	-
<i>Bacillus megaterium</i>	-	5 (8.3 %)
<i>Bacillus altitudinis</i>	-	1 (1.6 %)
<i>Bacillus</i> sp.*	7 (21.8%)	8 (13.3 %)

\*Isolados não identificados a nível de espécie por apresentarem escores 1.70 a 1.99 na identificação por MALDI-TOF.

Foram avaliados 113 isolados de peles alógenas e 26 isolados de peles não alógenas. Destes 139 isolados, 47 (33.8%) com escores de 1.70 a 1.99 não foram identificados a nível de espécie pelo MALDI-TOF MS (Tabela 2).

As inconsistências na identificação de *Bacillus* através de MALDI-TOF MS são principalmente devido à formação de endósporos e condições de cultura (Shu e Yang, 2017). Contudo, no presente estudo esses fatores foram devidamente padronizados antes de ser realizada a identificação. Todos isolados foram cultivados em ágar TSA com incubação a 30°C por 12 h para evitar a formação de esporos. A extração também seguiu metodologias já padronizadas (Shu e Yang, 2017). Sendo assim, a justificativa para a ineficiência de identificação de alguns isolados deve-se a dificuldade em separar os grupos cujas espécies apresentam estreita relação e também porque os bancos de dados comerciais são principalmente orientados para as cepas encontradas na prática clínica, sendo limitado (Starostin et al., 2015).

O método de identificação mais utilizado em bactérias é a taxonomia baseada no gene 16S rRNA, mas algumas espécies de *Bacillus* são altamente similares de acordo com a sequência 16S rRNA, não tendo poder discriminatório suficiente. O grupo *B. subtilis*, o grupo *B. cereus* e o grupo *B. pumilus* possuem

múltiplas espécies altamente relacionadas dentro de seus grupos. No grupo *B. subtilis*, *B. amyloliquifaciens*, *B. atrophaeus*, *B. licheniformis*, *B. mojavensis*, *B. subtilis subsp. spizizenii*, *B. subtilis subsp. subtilis* e *B. vallismortis* estão incluídos. O grupo *B. cereus* compreende *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. pseumicoides*, *B. thuringiensis* e *B. weihenstephaniensis*. E o grupo de *B. pumilus* contém *B. altitudinis*, *B. aerophilus*, *B. safiensis*, *B. pumilus* e *B. stratosphaericus* (Starostin et al., 2015).

Pela análise de agrupamento, nos dendrogramas comparando com espectros do banco de dados do programa Biotyper de cepas padrão de espécies de *Bacillus*, dos 47 isolados pôde-se identificar 26 (55.3%), dos quais 15 isolados de peles alógenas agruparam melhor com *B. vallismortis* e 1 com *B. subtilis*. Seis isolados de peles não alógenas foram agrupados com *B. pumilus*, 2 com *B. megaterium* e 2 com *B. altitudinis* (Tabela 2, Figuras suplementares).

Esta identificação conseguiu resolver um pouco mais da metade dos isolados que não haviam sido identificados por MALDI-TOF. Representando uma ferramenta valiosa para este propósito como já observado por Fernández-No et al. (2013). Além disso, através dela foi possível observar que *B. pumilus* foi isolado de 4 amostras de peles não alógenas, resultado antes não detectado, influenciando na prevalência das espécies isoladas de peles não alógenas.

O maior problema observado foi em separar as espécies do grupo *B. subtilis*. Os isolados cujos escores 1.70 a 1.99 sugeriam a identificação de *B. amyloliquefaciens*, não puderam ser confirmados, pela disposição de forma confusa nos dendrogramas, mesmo quando comparados a perfis espectrais de cepas de referência de *B. amyloliquefaciens* e *B. subtilis*. Diferentemente de Fernández-No et al. (2013) que conseguiu distinguir essas duas espécies.

A determinação de picos de massa conservados a nível de gênero e espécie ajuda a estabelecer uma base mais firme para a abordagem de tipificação microbiana por MALDI-TOF. Proteínas altamente conservadas definem características específicas do metabolismo, sinalização celular e fisiologia para espécies individuais. Ng (2018) em análise de picos de massa conservados entre espécies do gênero *Bacillus* revelou a existência de apenas um pico de massa conservada a 3046 m/z. A falta de picos de massa conservados no gênero corrobora com observações de dificuldade de discriminar diferentes espécies de *Bacillus* por MALDI-TOF (Ng, 2018).

Tabela 2. Isolados de *Bacillus* sp não identificados a nível de espécie, a espécie sugerida nos escores de 1.70 a 1.99 e espécie mais próxima na análise por agrupamento.

<b>Isolado</b>	<b>Espécie sugerida nos escores de 1.70 a 1.99</b>	<b>Espécie mais próxima na análise por agrupamento.</b>
3.1.2	<i>B. vallismortis</i>	-
3.2.2	<i>B. vallismortis</i>	-
3.3.2	<i>B. vallismortis</i>	-
3.4.2	<i>B. vallismortis</i>	<i>B. vallismortis</i>
3.6.2	<i>B. vallismortis</i>	-
3.7.2	<i>B. vallismortis</i>	<i>B. vallismortis</i>
5.2.2	<i>B. vallismortis</i>	-
16.4.2	<i>B. vallismortis</i>	-
16.4.4	<i>B. vallismortis</i>	-
16.17.2	<i>B. vallismortis</i>	-
17.3.2	<i>B. vallismortis</i>	-
17.5.2	<i>B. vallismortis</i>	-
17.7.2	<i>B. vallismortis</i>	-
79.6.2	<i>B. vallismortis</i>	-
96.3.4	<i>B. vallismortis</i>	-
1.2.2	<i>B. subtilis</i>	<i>B. vallismortis</i>
3.5.2	<i>B. subtilis</i>	-
3.8.2	<i>B. subtilis</i>	<i>B. vallismortis</i>
3.11.2	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>
16.7.2	<i>B. subtilis</i>	<i>B. vallismortis</i>
16.13.2	<i>B. subtilis</i>	<i>B. vallismortis</i>
16.20.2	<i>B. subtilis</i>	<i>B. vallismortis</i>
17.2.2	<i>B. subtilis</i>	<i>B. vallismortis</i>
17.9.2	<i>B. subtilis</i>	<i>B. vallismortis</i>
17.14.2	<i>B. subtilis</i>	<i>B. vallismortis</i>
41.2.2	<i>B. subtilis</i>	-
42.6.4	<i>B. subtilis</i>	-
66.2.4	<i>B. pumilus</i>	<i>B. pumilus</i>
81.2.4	<i>B. pumilus</i>	<i>B. pumilus</i>
83.1.2	<i>B. pumilus</i>	<i>B. pumilus</i>
83.1.4	<i>B. pumilus</i>	<i>B. pumilus</i>
97.2.4	<i>B. pumilus</i>	<i>B. pumilus</i>
97.3.4	<i>B. pumilus</i>	<i>B. pumilus</i>
16.1.4	<i>B. mojavensis</i>	<i>B. vallismortis</i>
16.7.4	<i>B. mojavensis</i>	<i>B. vallismortis</i>
16.12.2	<i>B. mojavensis</i>	<i>B. vallismortis</i>
17.3.4	<i>B. mojavensis</i>	<i>B. vallismortis</i>
17.8.2	<i>B. mojavensis</i>	<i>B. vallismortis</i>
16.15.2	<i>B. amyloliquefaciens</i>	-
42.2.1	<i>B. amyloliquefaciens</i>	-
79.1.2	<i>B. amyloliquefaciens</i>	-
79.3.2	<i>B. amyloliquefaciens</i>	-
71.4.4	<i>B. megaterium</i>	<i>B. megaterium</i>
92.2.4	<i>B. megaterium</i>	<i>B. megaterium</i>
97.1.2	<i>B. altitudinis</i>	<i>B. altitudinis</i>
97.2.2	<i>B. altitudinis</i>	<i>B. altitudinis</i>
17.1.2	<i>B. atropheus</i>	-

Avaliando a relação dos isolados de *Bacillus* de peles alógenas e não alógenas, o dendrograma MSP revelou clusters distintos de acordo com limites arbitrário no nível de distância de 500, 200 e 50 (Figura 1).

O limite arbitrário no nível de distância de 200 (Figura 1), representa o melhor ponto para avaliar a separação dos agrupamentos por espécie, podem ser observados 8 clusters distintos bastante relacionados a identificação, nos quais algumas espécies como *B. pumilus* (G2 e G4) e *B. altitudinis* (G3) são separados. Da mesma forma o grupo de *B. subtilis* começa a separar seus componentes de acordo com as diferentes espécies (Tabela S1). Observou-se separação das linhagens pertencentes ao grupo *B. cereus* (G8) em relação a outros *Bacillus* sp. avaliados. Esses resultados estão de acordo com outros trabalhos, cujos clusters dividiram-se da mesma que encontrada no presente estudo (Fernández-No et al., 2013).

Nos grupo G1 foi observada a espécie *B. megaterium* encontrada somente em amostras de pele não alógena. G3 da mesma forma agrupou os isolados de *B. altitudinis* e um *B. pumilus* de peles não alógenas. G2 agrupou *B. pumilus* de peles não alógenas. Os grupo G5 (*B. licheniformis*) e G6 (*B. subtilis*) uniram espécies somente encontradas em peles alógenas. G4 com *B. pumilus* de origem dos dois tipos de peles agruparam porém em distância acima de 100. G7 agrupou diferentes espécies de peles alógenas e não alógenas, destacando-se como o grupo de maior diversidade. Nele também observou-se que isolados de *B. vallismortis* e *B. amyloliquefaciens* de diferentes tipos de peles agruparam-se com distância menor que 100. O grupo G8 uniu *B. cereus* dos dois tipos de peles, representando a espécie com menor diversidade de perfis, agrupando-se com distâncias menores que 50 (Tabela S1).

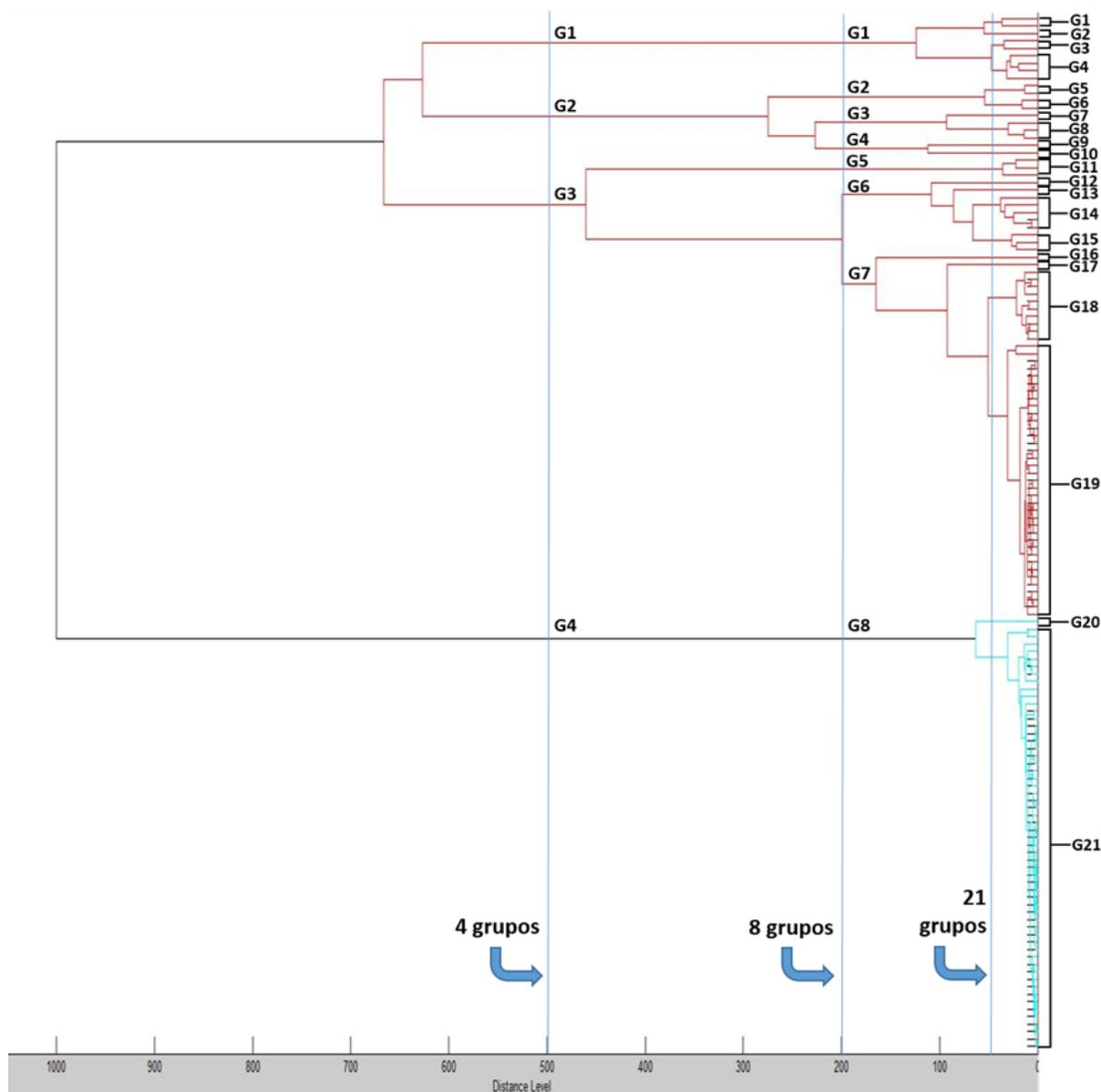


Figura 1. Dendrograma da projeção média de espectros (MSP) dos isolados de *Bacillus* sp. de peles alógenas e não alógenas gerado pelo programa BIOTYPER (versão 4; Bruker Daltonics).

No limite arbitrário no nível de distância de 50 (Figura 1), identificaram-se 21 grupos distintos nos quais as relações de maior similaridade entre os isolados foram reveladas. Entre os isolados de pele não alógena, observa-se relações estreitas entre isolados obtidos de diferentes indivíduos com elevada similaridade como por exemplo o grupo G4. Ao mesmo tempo, observa-se que isolados de mesma espécie obtidos de mesmos indivíduos, por vezes agruparam-se mais distantemente, sugerindo que isolados de mesma espécie e origem apresentam características fenotípicas que as distinguem, como por exemplo isolados de *B. megaterium* obtidos do indivíduo 94 (G1 e G4); *Bacillus* provável *pumilus* do indivíduo 83 (G6 e G7). Da

mesma forma, essas características foram observadas entre os isolados de peles alógenas onde isolados de diferentes indivíduos agruparam-se (G14, G15, G18, G19 e G21). Mesmas espécies obtidas de mesmas amostras também foram separadas em diferentes grupos como isolados de *B. subtilis* da amostra 36 que distribuíram-se nos grupos G13, G14 e G15, o mesmo observa-se para a espécie *B. licheniformis* desta mesma amostra (G11 e G16) (Tabela S2). G2, G7, G9, G10, G12, G13, G16, G17 e G20 foram compostos por apenas um isolado.

Os grupos G18 e G19 foram compostos por maior quantidade de espécies do grupo *subtilis*, isoladas de várias amostras diferentes. Demonstrando a estreita relação entre essas espécies, que inclusive dificulta sua identificação. No grupo 18, onde uniram-se somente prováveis espécies, isolados de peles alógenas e não alógenas agruparam-se, destacando a grande similaridade entre os isolados de pele não alógena 96.3.4 e 79.6.2 com os isolados de pele alógena 17.1.2 e 16.17.2, respectivamente. Todos isolados identificados como *B. cereus* foram agrupados a uma distância inferior a 50, com exceção do isolado 31.1.4 que permaneceu sozinho. Isolados 7 e 8 foram de lotes obtidos de um mesmo indivíduo e conforme os agrupamentos dentro do ramo de *B. cereus*, observa-se que estes isolados permaneceram geralmente muito próximos. Ainda dentro do ramo de *B. cereus*, destaca-se que isolados obtidos de peles não alógenas (80 e 49, em vermelho na Tabela S2) apresentaram maior similaridade em relação aos isolados de peles alógenas.

O MALDI-TOF MS foi utilizado com sucesso como uma ferramenta para biotipificação porque foram encontrados grupos específicos que foram associados as diferentes origens, pele alógena ou não alógena. Além de auxiliar na identificação dos isolados através de análises dos dendrogramas MSP. Contudo, a ineficiência na identificação de alguns isolados, desperta a necessidade de mais estudos avaliando diferentes abordagens da ferramenta MALDI-TOF que possam contribuir para a identificação de espécies estreitamente relacionadas.

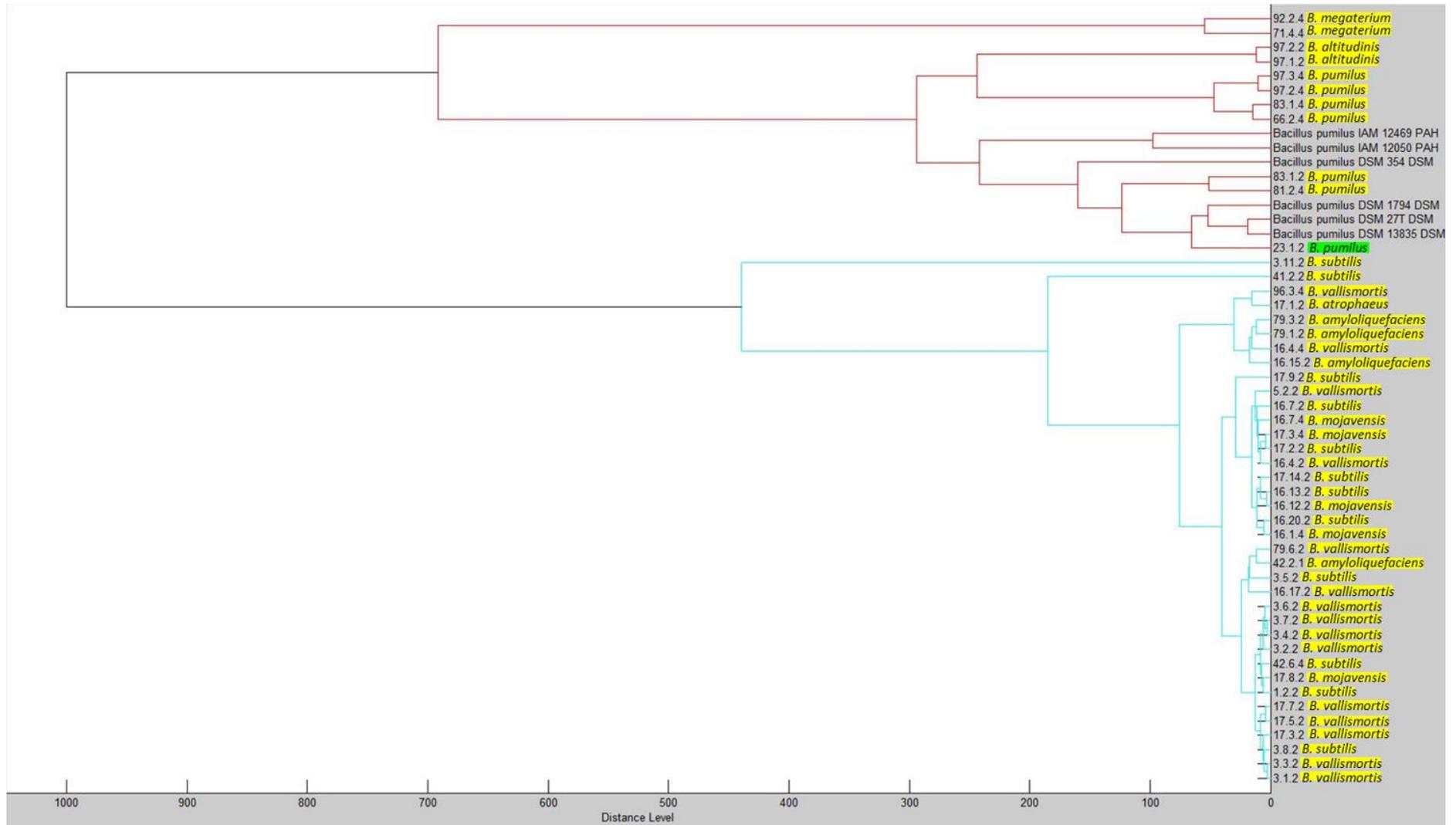


Figura S1. Dendrograma da projeção média de espectros (MSP) dos isolados de *Bacillus* sp. de peles alógenas e não alógenas com cepas padrão de *B. pumilus* gerado pelo programa BIOTYPER (versão 4; Bruker Daltonics). Em verde os isolados que foram identificados por MALDI-TOF a nível de espécie e amarelo apenas a nível de gênero.

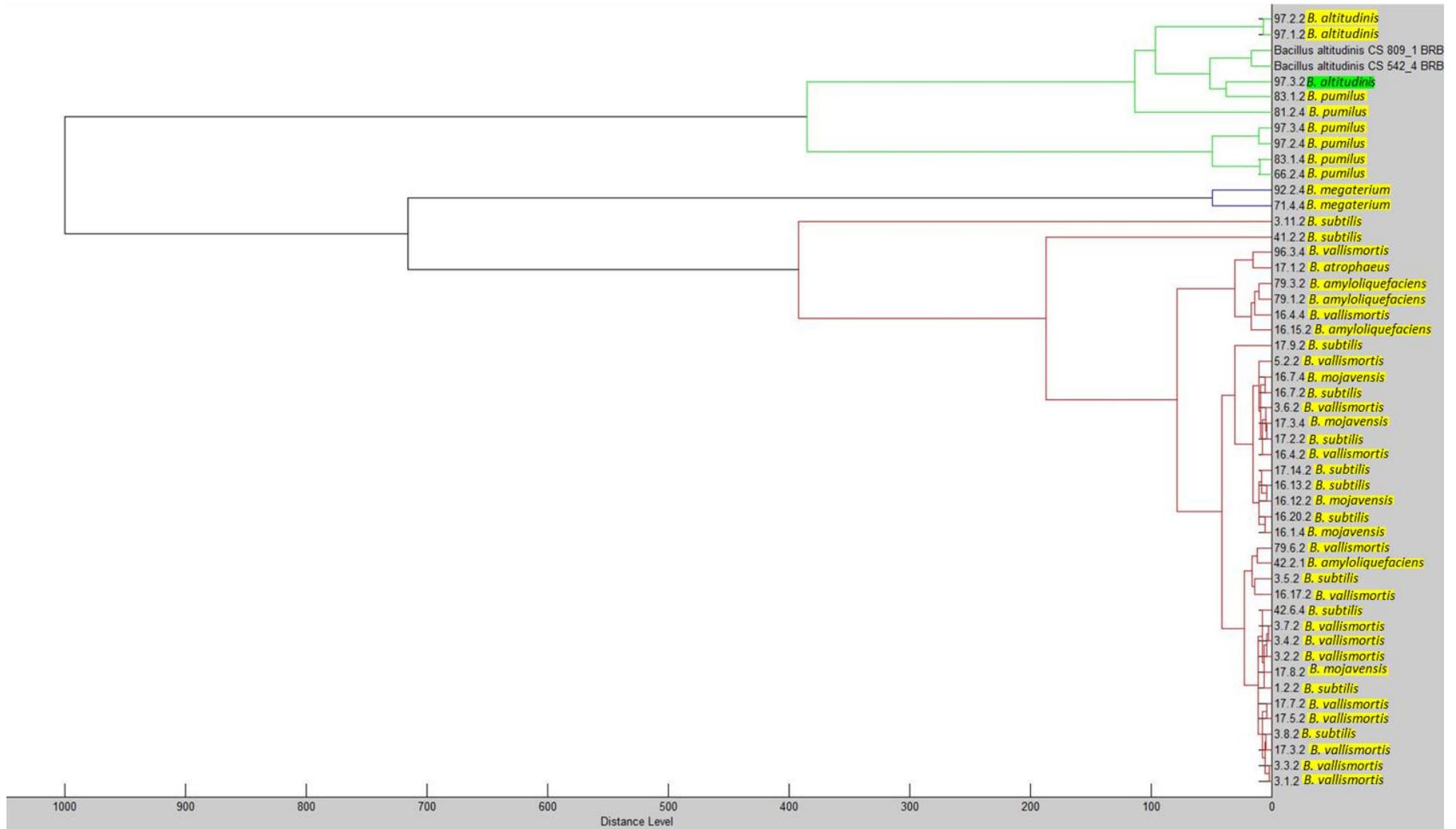


Figura S2. Dendrograma da projeção média de espectros (MSP) dos isolados de *Bacillus* sp. de peles alógenas e não alógenas com cepas padrão de *B. altitudinis* gerado pelo programa BIOTYPER (versão 4; Bruker Daltonics). Em verde os isolados que foram identificados por MALDI-TOF a nível de espécie e amarelo apenas a nível de gênero.

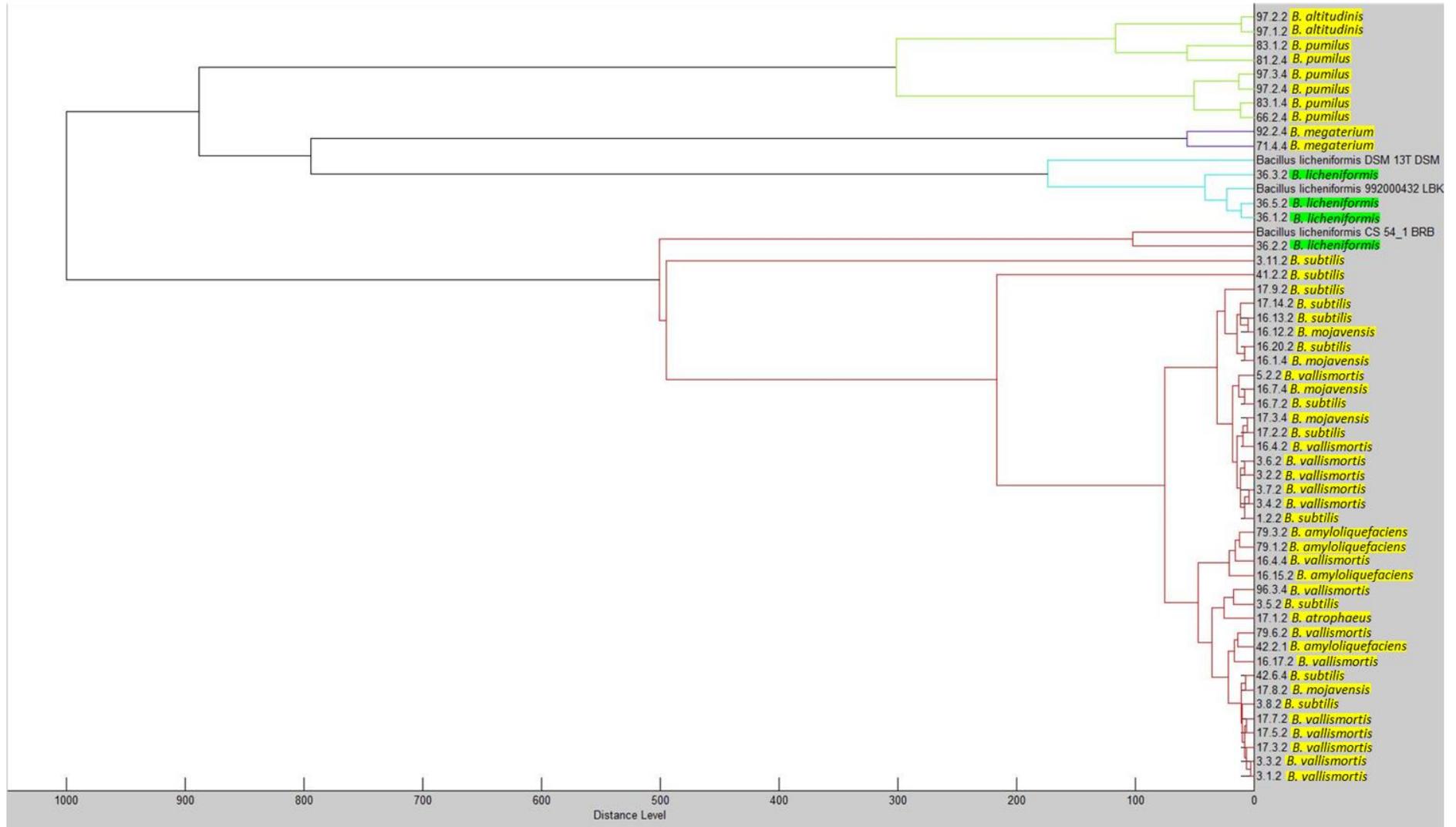


Figura S3. Dendrograma da projeção média de espectros (MSP) dos isolados de *Bacillus* sp. de peles alógenas e não alógenas com cepas padrão de *B. licheniformis* gerado pelo programa BIOTYPER (versão 4; Bruker Daltonics). Em verde os isolados que foram identificados por MALDI-TOF a nível de espécie e amarelo apenas a nível de gênero.

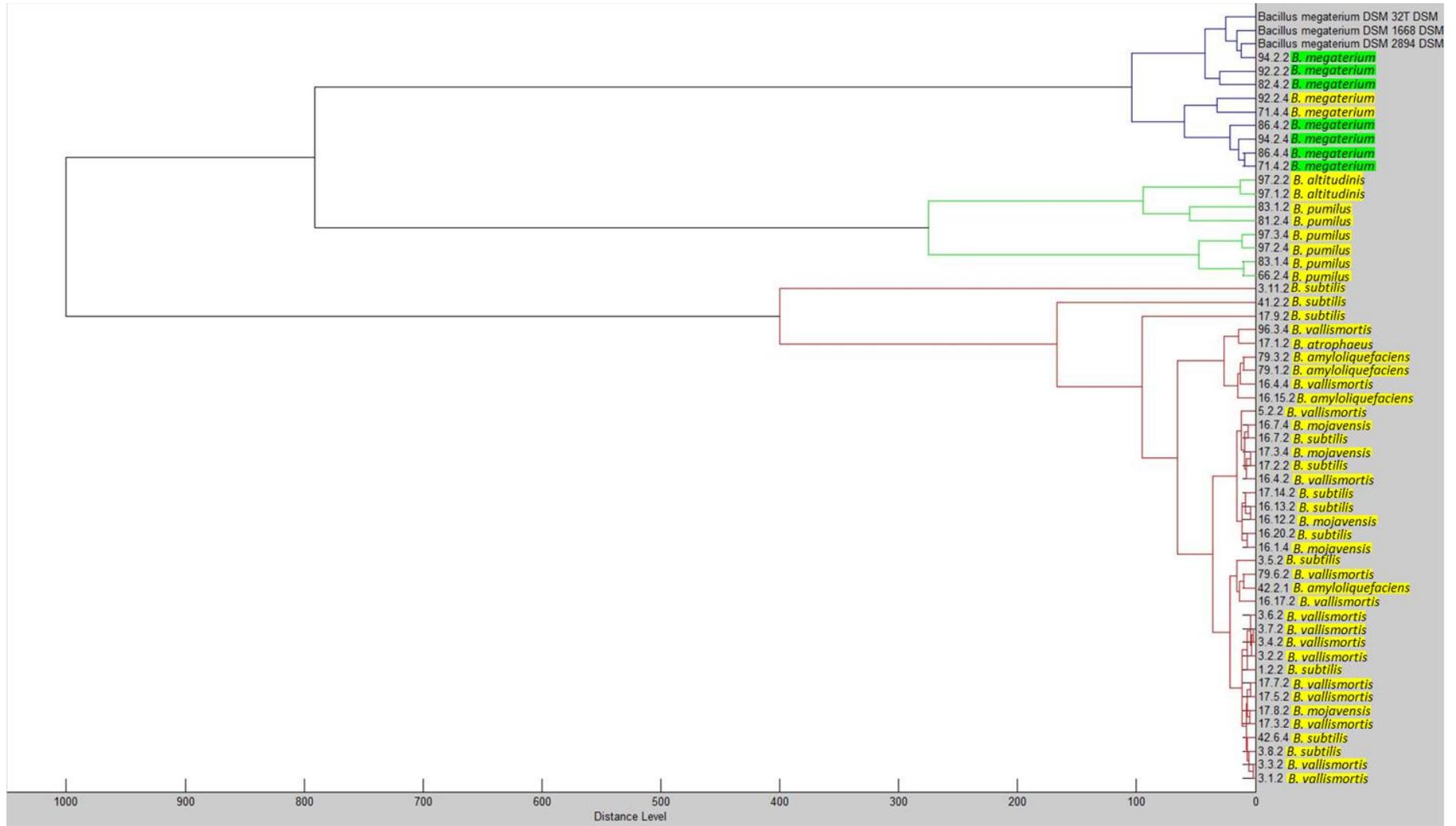


Figura S4. Dendrograma da projeção média de espectros (MSP) dos isolados de *Bacillus* sp. de peles alógenas e não alógenas com cepas padrão de *B. megaterium* gerado pelo programa BIOTYPER (versão 4; Bruker Daltonics). Em verde os isolados que foram identificados por MALDI-TOF a nível de espécie e amarelo apenas a nível de gênero.

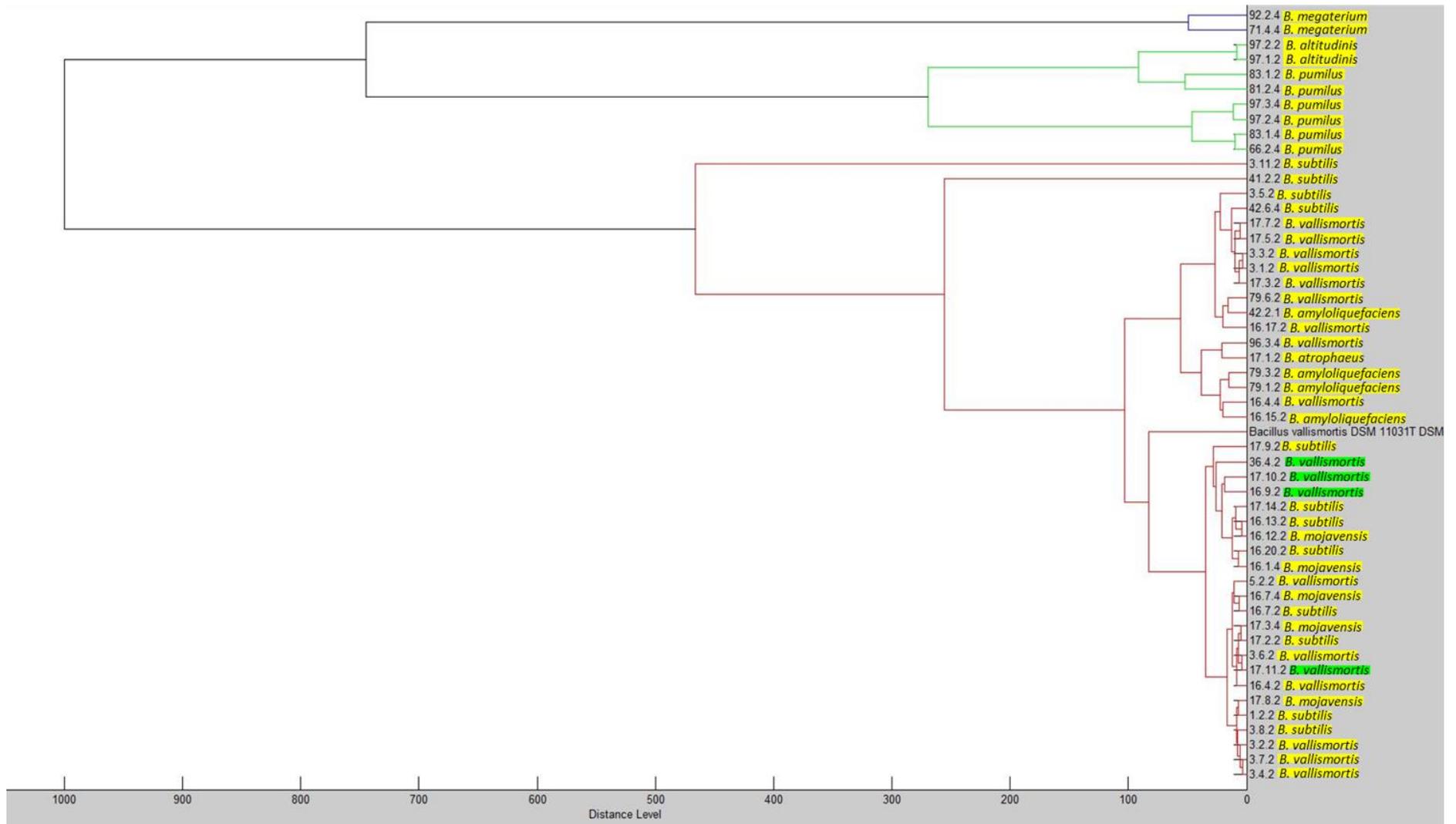


Figura S5. Dendrograma da projeção média de espectros (MSP) dos isolados de *Bacillus* sp. de peles alógenas e não alógenas com cepas padrão de *B. vallismortis* gerado pelo programa BIOTYPER (versão 4; Bruker Daltonics). Em verde os isolados que foram identificados por MALDI-TOF a nível de espécie e amarelo apenas a nível de gênero.

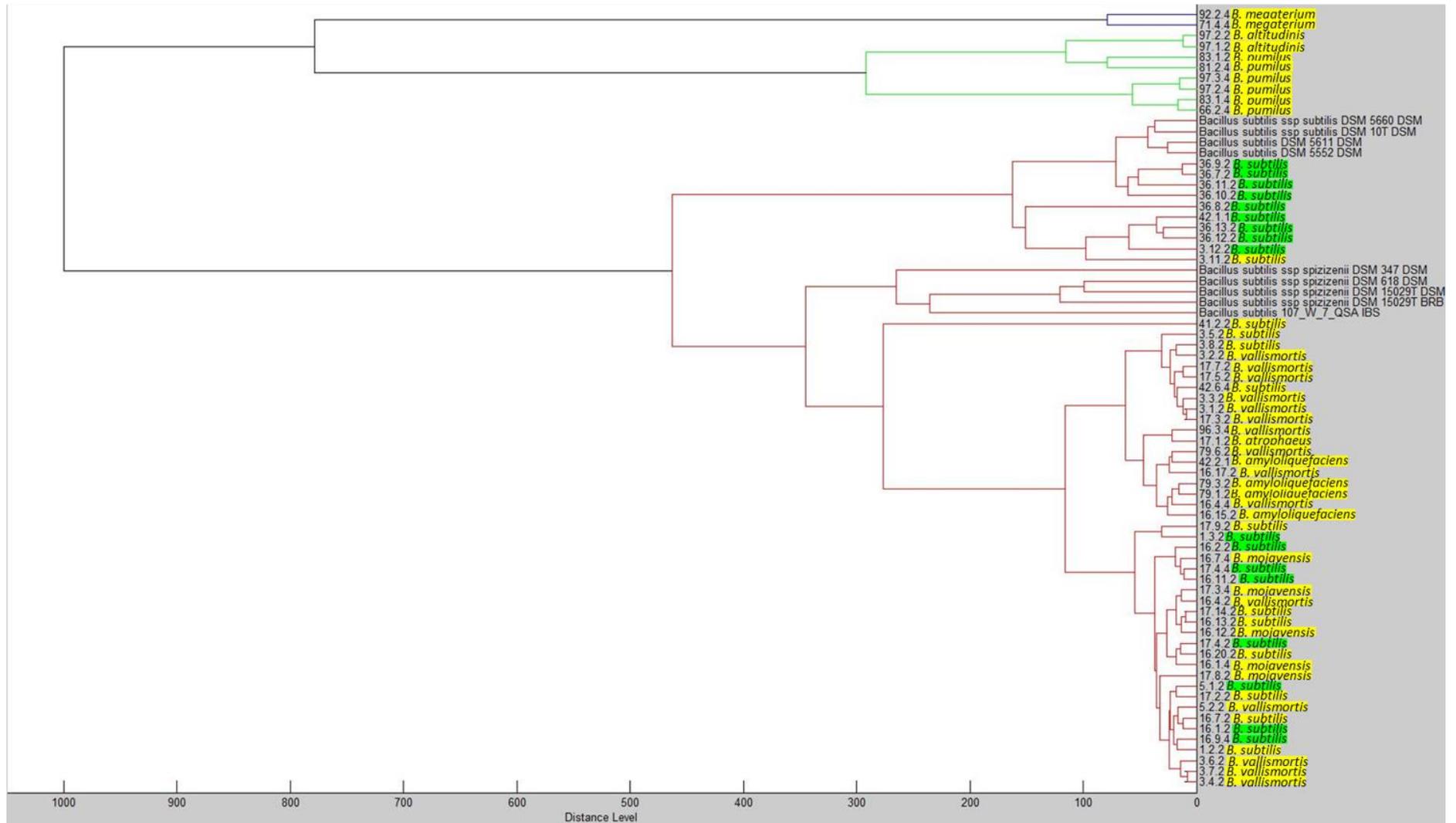


Figura S6. Dendrograma da projeção média de espectros (MSP) dos isolados de *Bacillus* sp. de peles alógenas e não alógenas com cepas padrão de *B. subtilis* gerado pelo programa BIOTYPER (versão 4; Bruker Daltonics). Em verde os isolados que foram identificados por MALDI-TOF a nível de espécie e amarelo apenas a nível de gênero.

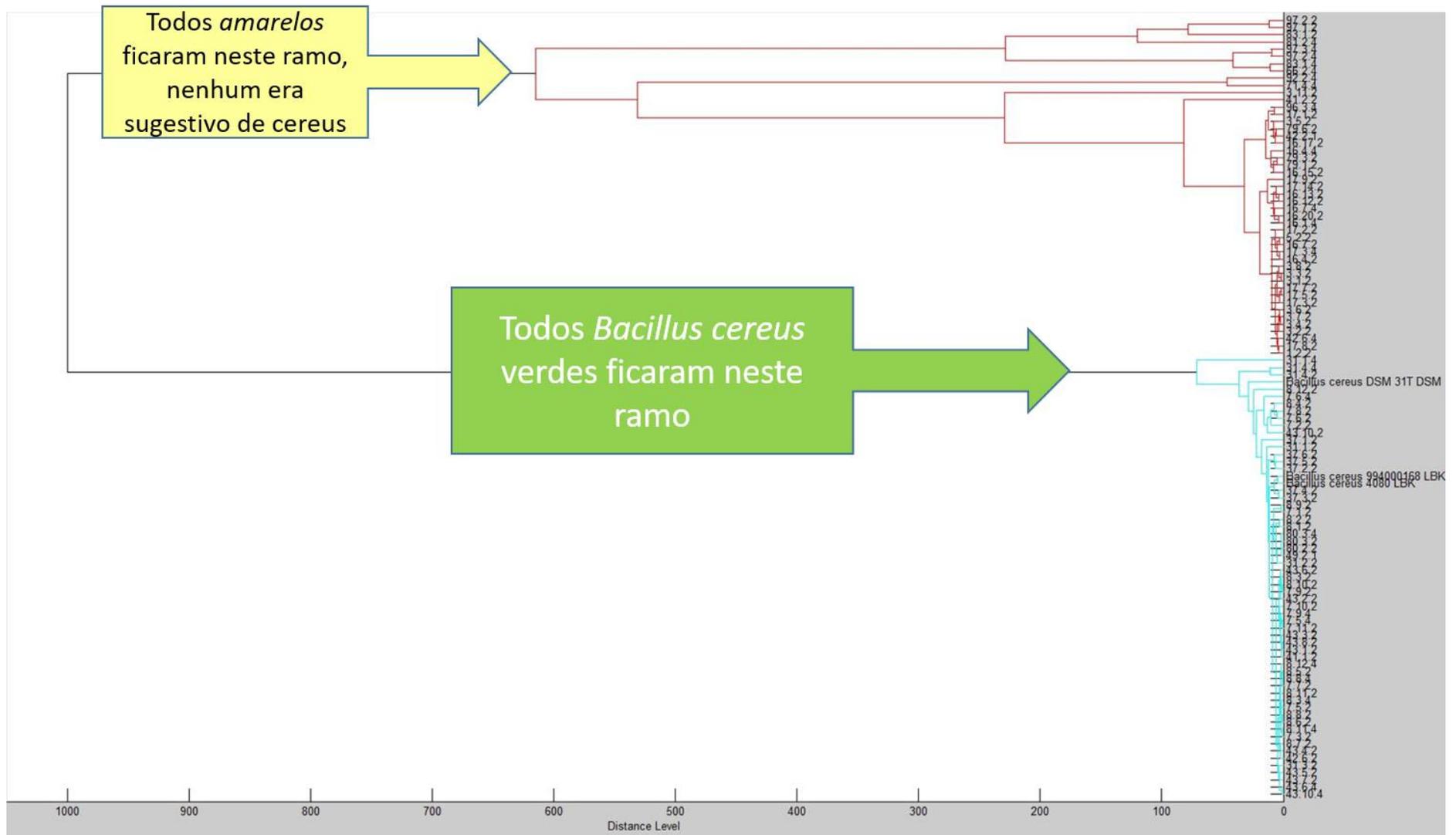


Figura S7. Dendrograma da projeção média de espectros (MSP) dos isolados de *Bacillus* sp. de peles alógenas e não alógenas com cepas padrão de *B. cereus* gerado pelo programa BIOTYPER (versão 4; Bruker Daltonics). Em verde os isolados que foram identificados por MALDI-TOF a nível de espécie e amarelo apenas a nível de gênero.

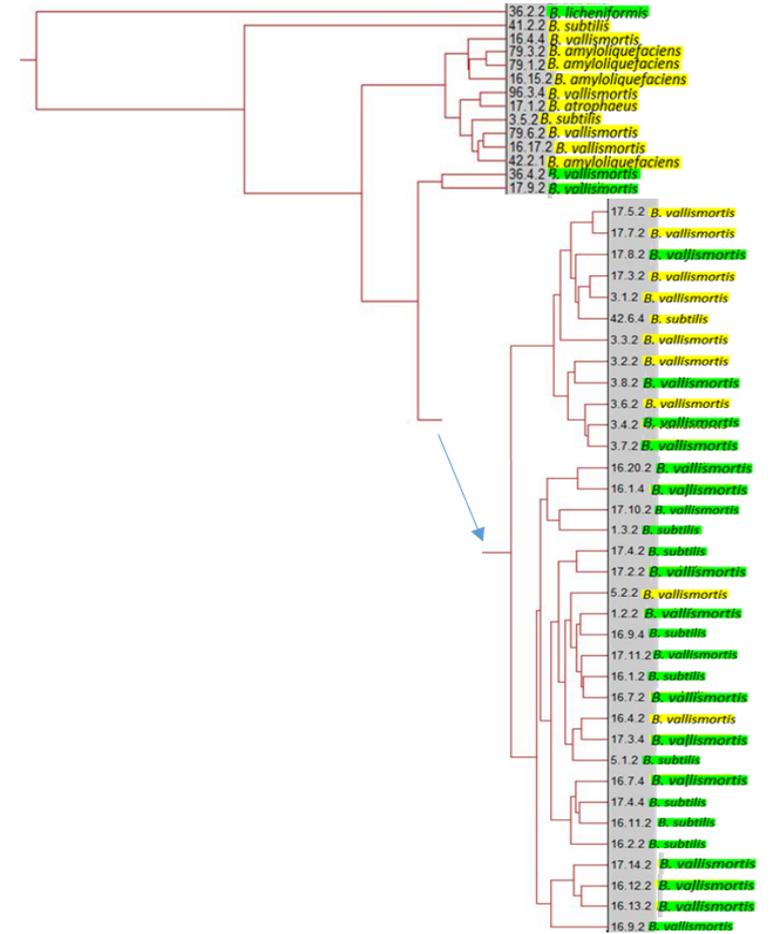
Tabela S1. Distribuição dos isolados de *Bacillus sp.* de peles alógenas e não alógenas de acordo com o dendrograma gerado pelo software BIOTYPER (versão 4, Bruker Daltonics) a um nível de distância de 200.

Grupo	Nº de isolados	Isolado	Identificação	Origem	Hospital origem	Hospital coleta
G1	9	82.4.2	<i>B. megaterium</i>	Não alógena	-	-
		94.2.2	<i>B. megaterium</i>	Não alógena	-	-
		92.2.2	<i>B. megaterium</i>	Não alógena	-	-
		71.4.4	<i>B. megaterium</i>	Não alógena	-	-
		92.2.4	<i>B. megaterium</i>	Não alógena	-	-
		71.4.2	<i>B. megaterium</i>	Não alógena	-	-
		94.2.4	<i>B. megaterium</i>	Não alógena	-	-
		66.4.4	<i>B. megaterium</i>	Não alógena	-	-
		86.4.2	<i>B. megaterium</i>	Não alógena	-	-
G2	4	97.3.4	<i>B. pumilus</i>	Não alógena	-	-
		97.2.4	<i>B. pumilus</i>	Não alógena	-	-
		66.2.4	<i>B. pumilus</i>	Não alógena	-	-
		83.1.4	<i>B. pumilus</i>	Não alógena	-	-
G3	4	83.1.2	<i>B. pumilus</i>	Não alógena	-	-
		97.3.2	<i>B. altitudinis</i>	Não alógena	-	-
		97.2.2	<i>B. altitudinis</i>	Não alógena	-	-
		97.1.2	<i>B. altitudinis</i>	Não alógena	-	-
G4	2	81.2.4	<i>B. pumilus</i>	Não alógena	-	-
		23.1.2	<i>B. pumilus</i>	Alógena	1	2
G5	3	36.5.2	<i>B. licheniformis</i>	Alógena	3	2
		36.1.2	<i>B. licheniformis</i>	Alógena	3	2
		36.3.2	<i>B. licheniformis</i>	Alógena	3	2
G6	10	3.11.2	<i>B. subtilis</i>	Alógena	2	2
		36.8.2	<i>B. subtilis</i>	Alógena	3	2
		36.10.2	<i>B. subtilis</i>	Alógena	3	2
		3.12.2	<i>B. subtilis</i>	Alógena	2	2
		36.11.2	<i>B. subtilis</i>	Alógena	3	2
		36.9.2	<i>B. subtilis</i>	Alógena	3	2
		36.7.2	<i>B. subtilis</i>	Alógena	3	2
		36.12.2	<i>B. subtilis</i>	Alógena	3	2
		36.13.2	<i>B. subtilis</i>	Alógena	3	2
		42.1.1	<i>B. subtilis</i>	Alógena	4	2

Verde: isolados que foram identificados a nível de espécie por MALDI-TOF ou pela análise de agrupamento. Amarelo: isolados identificados apenas a nível de género. Rosa: peles alógenas. Identificação dos hospitais substituída por números.

Continuação Tabela S1. Distribuição dos isolados de *Bacillus sp.* de peles alógenas e não alógenas de acordo com o dendrograma gerado pelo software BIOTYPER (versão 4, Bruker Daltonics) a um nível de distância de 200.

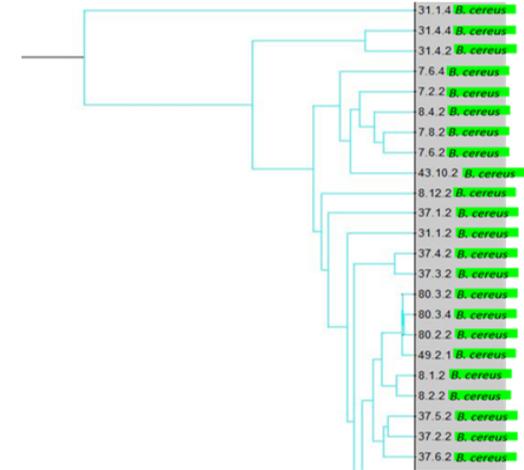
Grupo	Nº de isolados	Isolado	Identificação	Origem	Hospital origem	Hospital coleta
G7	49	36.2.2	<i>B. licheniformis</i>	Alógena	3	2
		41.2.2	<i>B. subtilis</i>	Alógena	5	5
		16.4.4	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	6	6
		79.3.2	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Não alógena	-	-
		79.1.2	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Não alógena	-	-
		16.15.2	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Alógena	6	6
		96.3.4	<i>B. vallismortis</i>	Não alógena	-	-
		17.1.2	<i>B. atrophaeus</i>	Alógena	7	7
		3.5.2	<i>B. subtilis</i>	Alógena	2	2
		79.6.2	<i>B. vallismortis</i>	Não alógena	-	-
		16.17.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	6	6
		42.2.1	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Alógena	4	2
		36.4.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	3	2
		17.9.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	7	7
		17.5.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	7	7
		17.7.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	7	7
		17.8.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	7	7
		17.3.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	7	7
		3.1.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	2	2
		42.6.4	<i>B. subtilis</i>	Alógena	4	2
		3.3.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	2	2
		3.2.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	2	2
		3.8.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	2	2
		3.6.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	2	2
		3.4.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	2	2
		3.7.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	2	2
		16.20.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	6	6
		16.1.4	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	6	6
		17.10.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	7	7
		1.3.2	<i>B. subtilis</i>	Alógena	4	2
		17.4.2	<i>B. subtilis</i>	Alógena	7	7
		17.2.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	7	7



Verde: isolados que foram identificados a nível de espécie por MALDI-TOF ou pela análise de agrupamento. Amarelo: isolados identificados apenas a nível de gênero. Rosa: peles alógenas. Identificação dos hospitais substituída por números.

Continuação Tabela S1. Distribuição dos isolados de *Bacillus sp.* de peles alógenas e não alógenas de acordo com o dendrograma gerado pelo software BIOTYPER (versão 4, Bruker Daltonics) a um nível de distância de 200.

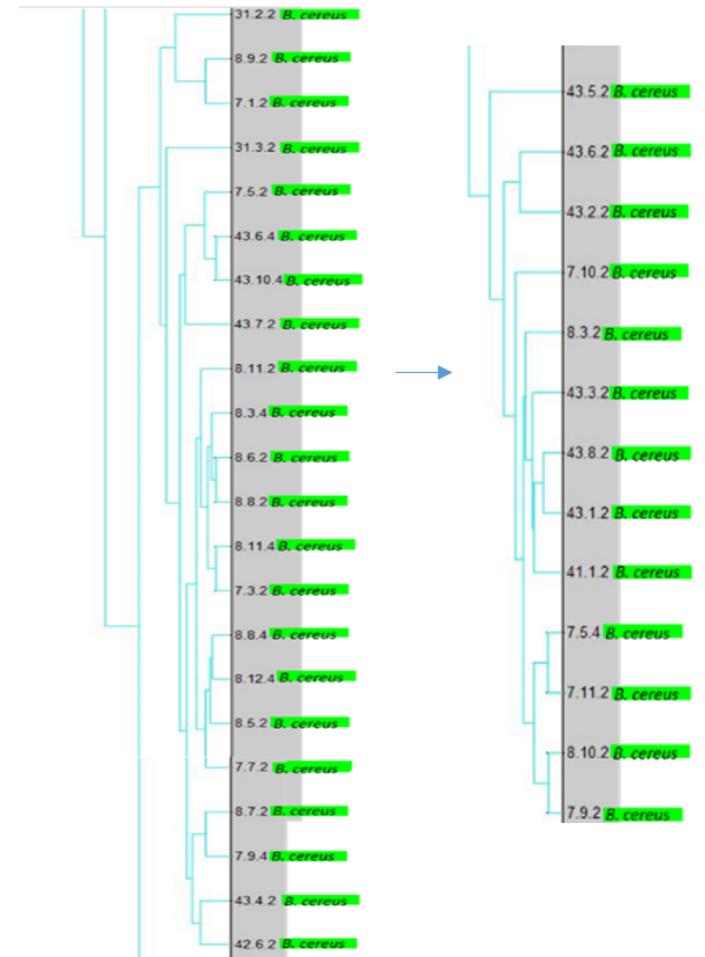
Grupo	Nº de isolados	Isolado	Identificação	Origem	Hospital origem	Hospital coleta
		5.2.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	8	2
		1.2.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	4	2
		16.9.4	<i>B. subtilis</i>	Alógena	6	6
		17.11.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	7	7
		16.1.2	<i>B. subtilis</i>	Alógena	6	6
		16.7.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	6	6
		16.4.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	6	6
		17.3.4	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	7	7
		5.1.2	<i>B. subtilis</i>	Alógena	8	2
		16.7.4	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	6	6
		17.4.4	<i>B. subtilis</i>	Alógena	7	7
		16.11.2	<i>B. subtilis</i>	Alógena	6	6
		16.2.2	<i>B. subtilis</i>	Alógena	6	6
		17.14.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	7	7
		16.12.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	6	6
		16.13.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	6	6
		16.9.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	6	6
G8	69	31.1.4	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		31.4.4	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		31.4.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		7.6.4	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		7.2.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		8.4.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		7.8.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		7.6.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		43.10.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		8.12.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		37.1.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		31.1.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		37.4.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		37.3.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		80.3.2	<i>B. cereus</i>	Não alógena	-	-
		80.3.4	<i>B. cereus</i>	Não alógena	-	-



Verde: isolados que foram identificados a nível de espécie por MALDI-TOF ou pela análise de agrupamento. Amarelo: isolados identificados apenas a nível de gênero. Rosa: peles alógenas. Identificação dos hospitais substituída por números.

Continuação Tabela S1. Distribuição dos isolados de *Bacillus sp.* de peles alógenas e não alógenas de acordo com o dendrograma gerado pelo software BIOTYPER (versão 4, Bruker Daltonics) a um nível de distância de 200.

Grupo	Nº de isolados	Isolado	Identificação	Origem	Hospital origem	Hospital coleta
		80.2.2	<i>B. cereus</i>	Não alógena	-	-
		49.2.1	<i>B. cereus</i>	Não alógena	-	-
		8.1.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		8.2.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		37.5.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		37.2.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		37.6.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		31.2.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		8.9.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		7.1.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		31.3.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		7.5.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		43.6.4	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		43.10.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		43.7.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		8.11.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		8.3.4	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		8.6.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		8.8.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		8.11.4	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		7.3.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		8.8.4	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		8.12.4	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		8.5.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		7.7.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		8.7.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		7.9.4	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		43.4.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		42.6.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	4	2
		43.5.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		43.6.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		43.2.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		7.10.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7



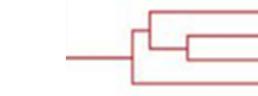
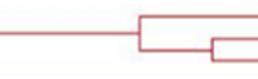
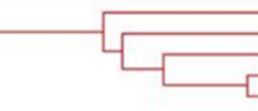
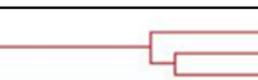
Verde: isolados que foram identificados a nível de espécie por MALDI-TOF ou pela análise de agrupamento. Amarelo: isolados identificados apenas a nível de gênero. Rosa: peles alógenas. Identificação dos hospitais substituída por números.

Continuação Tabela S1. Distribuição dos isolados de *Bacillus sp.* de peles alógenas e não alógenas de acordo com o dendrograma gerado pelo software BIOTYPER (versão 4, Bruker Daltonics) a um nível de distância de 200.

Grupo	Nº de isolados	Isolado	Identificação	Origem	Hospital origem	Hospital coleta
		8.3.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		43.3.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		43.8.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		43.1.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		41.1.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	5	5
		7.5.4	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		7.11.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		8.10.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		7.9.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7

Verde: isolados que foram identificados a nível de espécie por MALDI-TOF ou pela análise de agrupamento. Amarelo: isolados identificados apenas a nível de gênero. Rosa: peles alógenas. Identificação dos hospitais substituída por números.

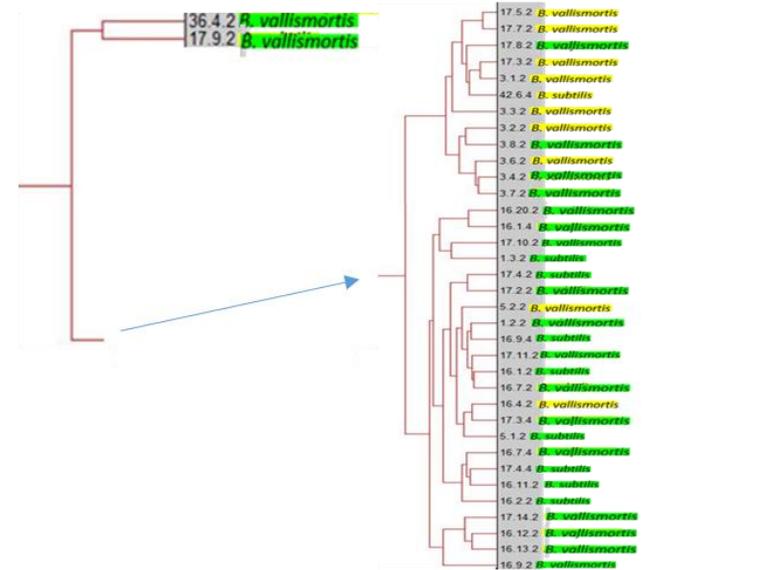
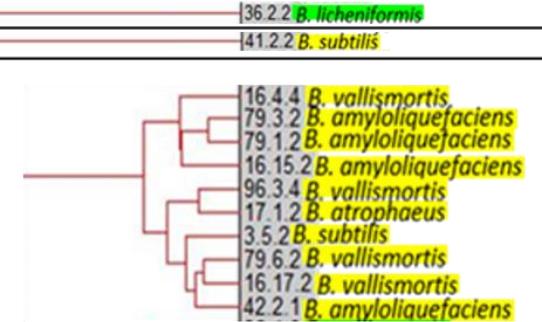
Tabela S2. Distribuição dos isolados de *Bacillus sp.* de peles alógenas e não alógenas de acordo com o dendrograma gerado pelo software BIOTYPER (versão 4, Bruker Daltonics) a um nível de distância de 50.

Grupo	Nº de isolados	Isolado	Identificação	Origem	Hospital origem	Hospital coleta	
G1	2	82.4.2	<i>B. megaterium</i>	Não alógena	-	-	
		94.2.2	<i>B. megaterium</i>	Não alógena	-	-	
G2	1	92.2.2	<i>B. megaterium</i>	Não alógena	-	-	
G3	2	71.4.4	<i>B. megaterium</i>	Não alógena	-	-	
		92.2.4	<i>B. megaterium</i>	Não alógena	-	-	
G4	4	71.4.2	<i>B. megaterium</i>	Não alógena	-	-	
		94.2.4	<i>B. megaterium</i>	Não alógena	-	-	
		66.4.4	<i>B. megaterium</i>	Não alógena	-	-	
		86.4.2	<i>B. megaterium</i>	Não alógena	-	-	
G5	2	97.3.4	<i>B. pumilus</i>	Não alógena	-	-	
		97.2.4	<i>B. pumilus</i>	Não alógena	-	-	
G6	2	66.2.4	<i>B. pumilus</i>	Não alógena	-	-	
		83.1.4	<i>B. pumilus</i>	Não alógena	-	-	
G7	1	83.1.2	<i>B. pumilus</i>	Não alógena	-	-	
G8	3	97.3.2	<i>B. altitudinis</i>	Não alógena	-	-	
		97.2.2	<i>B. altitudinis</i>	Não alógena	-	-	
		97.1.2	<i>B. altitudinis</i>	Não alógena	-	-	
G9	1	81.2.4	<i>B. pumilus</i>	Não alógena	-	-	
G10	1	23.1.2	<i>B. pumilus</i>	Alógena	1	2	
G11	3	36.5.2	<i>B. licheniformis</i>	Alógena	3	2	
		36.1.2	<i>B. licheniformis</i>	Alógena	3	2	
		36.3.2	<i>B. licheniformis</i>	Alógena	3	2	
G12	1	3.11.2	<i>B. subtilis</i>	Alógena	2	2	
G13	1	36.8.2	<i>B. subtilis</i>	Alógena	3	2	
G14	5	36.10.2	<i>B. subtilis</i>	Alógena	3	2	
		3.12.2	<i>B. subtilis</i>	Alógena	2	2	
		36.11.2	<i>B. subtilis</i>	Alógena	3	2	
		36.9.2	<i>B. subtilis</i>	Alógena	3	2	
		36.7.2	<i>B. subtilis</i>	Alógena	3	2	
G15	3	36.12.2	<i>B. subtilis</i>	Alógena	3	2	
		36.13.2	<i>B. subtilis</i>	Alógena	3	2	
		42.1.1	<i>B. subtilis</i>	Alógena	4	2	

Verde: isolados que foram identificados a nível de espécie por MALDI-TOF ou pela análise de agrupamento. Amarelo: isolados identificados apenas a nível de gênero. Rosa: peles alógenas. Identificação dos hospitais substituída por números.

Continuação Tabela S2. Distribuição dos isolados de *Bacillus* sp. de peles alógenas e não alógenas de acordo com o dendrograma gerado pelo software BIOTYPER (versão 4, Bruker Daltonics) a um nível de distância de 50.

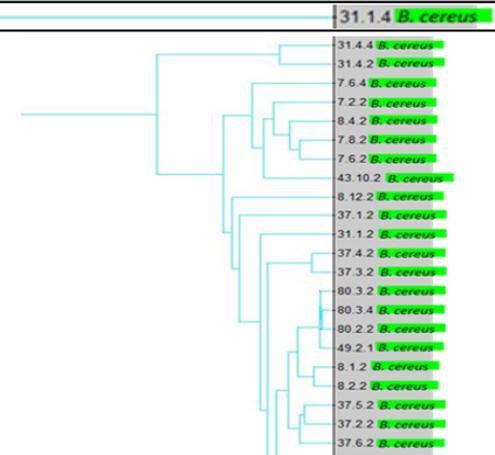
Grupo	Nº de isolados	Isolado	Identificação	Origem	Hospital origem	Hospital coleta
G16	1	36.2.2	<i>B. licheniformis</i>	Alógena	3	2
G17	1	41.2.2	<i>B. subtilis</i>	Alógena	5	5
G18	10	16.4.4	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	6	6
		79.3.2	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Não alógena	-	-
		79.1.2	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Não alógena	-	-
		16.15.2	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Alógena	6	6
		96.3.4	<i>B. vallismortis</i>	Não alógena	-	-
		17.1.2	<i>B. atrophaeus</i>	Alógena	7	7
		3.5.2	<i>B. subtilis</i>	Alógena	2	2
		79.6.2	<i>B. vallismortis</i>	Não alógena	-	-
		16.17.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	6	6
		42.2.1	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Alógena	4	2
G19	37	36.4.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	3	2
		17.9.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	7	7
		17.5.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	7	7
		17.7.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	7	7
		17.8.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	7	7
		17.3.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	7	7
		3.1.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	2	2
		42.6.4	<i>B. subtilis</i>	Alógena	4	2
		3.3.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	2	2
		3.2.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	2	2
		3.8.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	2	2
		3.6.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	2	2
		3.4.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	2	2
		3.7.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	2	2
		16.20.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	6	6
		16.1.4	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	6	6
		17.10.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	7	7
		1.3.2	<i>B. subtilis</i>	Alógena	4	2
17.4.2	<i>B. subtilis</i>	Alógena	7	7		



Verde: isolados que foram identificados a nível de espécie por MALDI-TOF ou pela análise de agrupamento. Amarelo: isolados identificados apenas a nível de gênero. Rosa: peles alógenas. Identificação dos hospitais substituída por números.

Continuação Tabela S2. Distribuição dos isolados de *Bacillus* sp. de peles alógenas e não alógenas de acordo com o dendrograma gerado pelo software BIOTYPER (versão 4, Bruker Daltonics) a um nível de distância de 50.

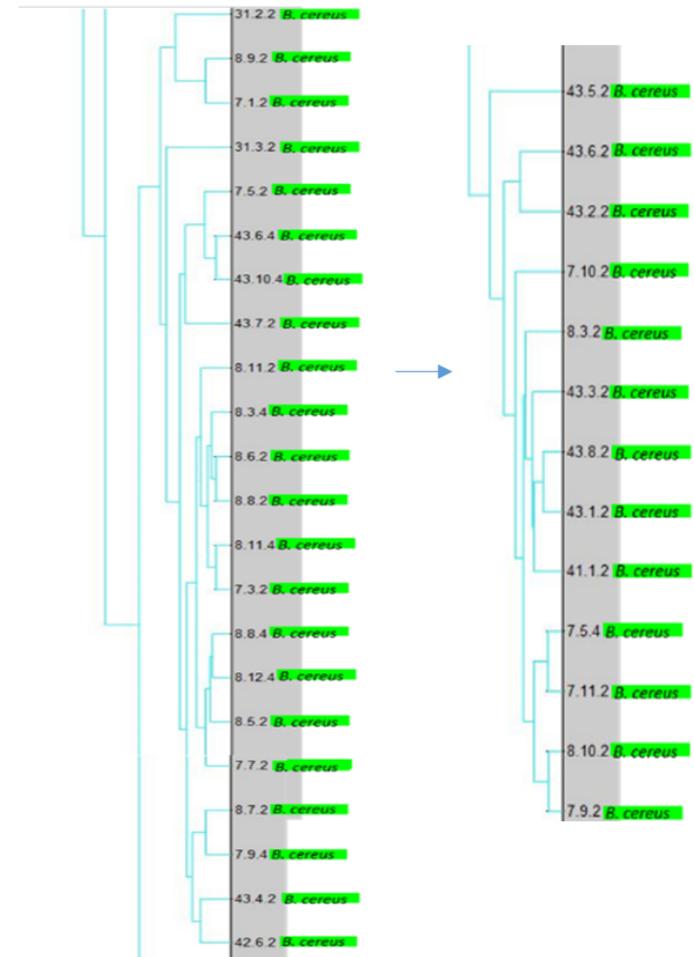
Grupo	Nº de isolados	Isolado	Identificação	Origem	Hospital origem	Hospital coleta
		17.2.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	7	7
		5.2.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	8	2
		1.2.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	4	2
		16.9.4	<i>B. subtilis</i>	Alógena	6	6
		17.11.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	7	7
		16.1.2	<i>B. subtilis</i>	Alógena	6	6
		16.7.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	6	6
		16.4.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	6	6
		17.3.4	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	7	7
		5.1.2	<i>B. subtilis</i>	Alógena	8	2
		16.7.4	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	6	6
		17.4.4	<i>B. subtilis</i>	Alógena	7	7
		16.11.2	<i>B. subtilis</i>	Alógena	6	6
		16.2.2	<i>B. subtilis</i>	Alógena	6	6
		17.14.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	7	7
		16.12.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	6	6
		16.13.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	6	6
		16.9.2	<i>B. vallismortis</i>	Alógena	6	6
G20	1	31.1.4	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
G21	68	31.4.4	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		31.4.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		7.6.4	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		7.2.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		8.4.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		7.8.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		7.6.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		43.10.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		8.12.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		37.1.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		31.1.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		37.4.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		37.3.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		80.3.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		80.3.4	<i>B. cereus</i>	Não alógena	-	-
		80.3.2	<i>B. cereus</i>	Não alógena	-	-
		80.3.4	<i>B. cereus</i>	Não alógena	-	-



Verde: isolados que foram identificados a nível de espécie por MALDI-TOF ou pela análise de agrupamento. Amarelo: isolados identificados apenas a nível de gênero. Rosa: peles alógenas. Identificação dos hospitais substituída por números.

Continuação Tabela S2. Distribuição dos isolados de *Bacillus* sp. de peles alógenas e não alógenas de acordo com o dendrograma gerado pelo software BIOTYPER (versão 4, Bruker Daltonics) a um nível de distância de 50.

Grupo	Nº de isolados	Isolado	Identificação	Origem	Hospital origem	Hospital coleta
		80.2.2	<i>B. cereus</i>	Não alógena	-	-
		49.2.1	<i>B. cereus</i>	Não alógena	-	-
		8.1.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		8.2.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		37.5.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		37.2.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		37.6.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		31.2.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		8.9.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		7.1.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		31.3.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		7.5.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		43.6.4	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		43.10.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		43.7.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		8.11.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		8.3.4	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		8.6.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		8.8.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		8.11.4	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		7.3.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		8.8.4	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		8.12.4	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		8.5.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		7.7.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		8.7.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		7.9.4	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		43.4.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		42.6.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	4	2
		43.5.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		43.6.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		43.2.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		7.10.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7



Verde: isolados que foram identificados a nível de espécie por MALDI-TOF ou pela análise de agrupamento. Amarelo: isolados identificados apenas a nível de gênero. Rosa: peles alógenas. Identificação dos hospitais substituída por números.

Continuação Tabela S2. Distribuição dos isolados de *Bacillus* sp. de peles alógenas e não alógenas de acordo com o dendrograma gerado pelo software BIOTYPER (versão 4, Bruker Daltonics) a um nível de distância de 50.

Grupo	Nº de isolados	Isolado	Identificação	Origem	Hospital origem	Hospital coleta
		8.3.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		43.3.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		43.8.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		43.1.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	3	2
		41.1.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	5	5
		7.5.4	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		7.11.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		8.10.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7
		7.9.2	<i>B. cereus</i>	Alógena	7	7

Verde: isolados que foram identificados a nível de espécie por MALDI-TOF ou pela análise de agrupamento. Amarelo: isolados identificados apenas a nível de gênero. Rosa: peles alógenas. Identificação dos hospitais substituída por número.

## 6. DISCUSSÃO GERAL

O primeiro objetivo deste trabalho foi isolar os contaminantes bacterianos de amostras de peles alógenas do Banco de Tecidos Dr. Roberto Corrêa Chem do Complexo Hospitalar Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. As bactérias Gram-positivas dos gêneros *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp., e *Paenibacillus* sp. foram encontradas, das quais as espécies *B. cereus*, *B. subtilis* e *S. epidermidis* foram as mais prevalentes. Outros estudos também relataram os gêneros *Bacillus* e *Staphylococcus* como os mais comumente isolados de aloenxertos de pele (Pianigiani et al., 2006; Matoski et al., 2015; Gaucher et al., 2016; Pirnay et al., 2012).

*Bacillus* sp. e *Paenibacillus* sp. distribuídos em variados ambientes, inclusive sobre a pele de indivíduos saudáveis (Tarale et al., 2015), são gêneros que representam um grande problema dentro dos bancos de peles por serem formadores de esporos, que são estruturas mais tolerantes aos processos de desinfecção e descontaminação (Pianigiani et al., 2006; Saegeman et al., 2008, Gaucher et al., 2016; Pirnay et al., 2012). Entre as espécies de *Saphylococcus* isolados, os CNS podem ser considerados parte normal da microbiota da pele e de menor virulência. Contudo, os CNS estão associados a infecções relacionadas a dispositivos médicos, devido sua elevada capacidade de formar biofilme mostrando maior resistência aos antimicrobianos (Von et al., 2006; Becker et al., 2014). Sendo assim, independentemente do nível de patogenicidade, nenhuma espécie deve ser subestimada quando se trata de aloenxertos que serão transplantados em indivíduos imunologicamente debilitados e com alto risco de adquirirem infecções oportunistas (Lindford et al., 2010).

Poucos artigos discutem sobre perfis de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas de aloenxertos de pele. Esta é uma ferramenta importante para orientar a escolha de um tratamento antibiótico. No presente estudo, entre os 319 isolados que tiveram seus perfis de susceptibilidade determinados, 71 (22.2%) foram multirresistentes. A presença de bactérias MDR já foi anteriormente relatada em amostras de bancos de tecidos (Pianigiani et al., 2010; Atique et al., 2014). E estudos já mostraram que a resistência aumentou em isolados de pele humana, o que pode refletir o uso de produtos cosméticos (Horner et al., 2012) e o uso indiscriminado de antibióticos nos últimos anos (Tarale et al., 2015). Além disso, em doadores de pele que estiveram hospitalizados por período prolongado, a microbiota da pele pode ter

sido modificada pelas bactérias presentes neste ambiente (Mathur et al., 2009; Kwazewska et al., 2009; Pianigiani et al., 2010; Gaucher et al., 2016).

De acordo com valores de CIM, observou-se alta resistência a PEN em uma parcela da população dos isolados avaliados, além de isolados não sensíveis e intermediários resistentes à VAN. O potencial inibitório de PEN, EST e VAN mostrou-se menos eficaz, exigindo altas concentrações para matar as células, com CIM90 acima ou igual aos pontos de corte para resistência para PEN e VAN. A EST não possui pontos de corte, mas apresentou o segundo maior valor de CIM90 (16 µg/mL). Diante do exposto, fenótipos de MDR e de resistência aos antimicrobianos PEN, EST e VAN podem estar contribuindo para a ineficiência do tratamento que vem sendo aplicado no banco de pele Dr. Roberto Corrêa Chem.

O tratamento de infecções causadas pelos gêneros de *Bacillus* ou *Paenibacillus* é pouco elucidada (Celandroni et al., 2016). *B. cereus* são descritos como produtores potentes de β-lactamases de amplo espectro, que afetam penicilinas e cefalosporinas (CLSI M45-A2, 2010). Isso pode explicar seus altos níveis de resistência ao PEN, CAZ e CFO. *B. cereus* é conhecido por ser suscetível a aminoglicosídeos, cloranfenicol, clindamicina, eritromicina, TET e VAN (Logan et al., 2003). Os estafilococos resistentes à meticilina (MRS) são considerados resistentes a todos os agentes antimicrobianos β-lactâmicos atualmente disponíveis, exceto para as cefalosporinas, que têm atividade anti-*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (anti-MRSA) (CLSI M100-S25, 2015).

Interessantemente, a maioria dos isolados submetidos ao primeiro tratamento com PEN e EST no banco de pele, foi suscetível *in vitro* a um ou ambos os antimicrobianos. Isso sugere que outros fatores, que não estão relacionados à resistência antimicrobiana, também podem estar contribuindo para a persistência dessas bactérias em aloenxertos de pele, entre eles, a formação de esporos (Grady et al., 2016), disposição das bactérias dentro dos poros ou folículos pilosos (Achermann et al., 2014) e formação de biofilme (Shin et al., 2014).

Todos isolados foram susceptíveis a AMI, GEN e TET no teste de disco-difusão, além disso, esses antimicrobianos apresentaram valores de CIM90 inferiores aos pontos de corte de suscetibilidade estabelecidos para os isolados. Alguns estudos já testaram GEN e AMI em diferentes coquetéis para o tratamento de aloenxertos (Neely et al., 2008; Mathur et al., 2009). Devido aos resultados encontrados para GEN e TET juntamente com a PEN e CAZ (baseado na literatura, Mathur et al., 2009;

Serafini et al., 2016), estes foram os antimicrobianos escolhidos para os testes de coquetéis antimicrobianos.

Para a etapa dos testes dos coquetéis, foram inseridos isolados de peles não alógenas no intuito de ampliar a gama de bactérias a serem avaliadas, já que as fontes de contaminação da pele são diversas (Rosenthal et al., 2011). No total foram avaliados 40 isolados com diferentes perfis de susceptibilidade a antimicrobianos e com diferentes capacidades ou ausência de formação de biofilme, para avaliar se este é um fator contribuinte para a resistência dos isolados a antimicrobianos. Das seis combinações avaliadas sobre os isolados no estado planctônico, os coquetéis D (PEN, GEN, CAZ) e F (PEN, GEN, CAZ, TET) apresentaram os melhores resultados inibindo 82.5% e 80%, dos isolados a uma taxa de inibição  $\geq 95\%$ , respectivamente. Seguidos do coquetel A (PEN, GEN) que inibiu 72.5%. Da mesma forma, os três coquetéis destacaram-se quando avaliada a taxa de inibição de  $\geq 95\%$  em relação às características de susceptibilidade aos antimicrobianos e de formação de biofilme.

Observou-se que a presença da CAZ pode ter a função de atuar sobre as bactérias resistentes a PEN, enquanto que nas bactérias susceptíveis a PEN, a CAZ potencializou sua ação inibitória. A CAZ é uma cefalosporina com mecanismo de ação semelhante ao das penicilinas, mas apresenta um espectro antibacteriano mais amplo, com maior estabilidade para muitos tipos de  $\beta$ -lactamases e propriedades farmacocinéticas melhoradas (Kuriyama et al., 2014). Observou-se também que a GEN atuou de forma sinérgica com a PEN. O sinergismo entre  $\beta$ -lactâmicos em combinação com aminoglicosídeos já é bem descrita e historicamente utilizada na clínica (Baddour et al., 2015). Sugere-se a substituição da EST, atualmente utilizada no banco de pele, pela GEN devido ao baixo número de isolados que foram resistentes a mesma e por poder ter um efeito inibitório maior que a estreptomicina (Borovinskaya et al., 2007, Maddison et al., 2008, Demirci et al., 2013).

Nenhum coquetel antimicrobiano avaliado foi capaz de inibir todas espécies, em concordância com outros trabalhos (Rooney et al., 2008; Mathur et al., 2009). Alguns isolados, apresentaram maior persistência aos tratamentos aplicados, sendo que quatro isolados do gênero *Bacillus*, não foram inibidos na taxa  $\geq 95\%$  por nenhum dos coquetéis. Reforçando o problema em eliminar bactérias esporuladoras de aloenxertos (Van Baare et al., 1998; Verbeken et al., 2012), sendo necessário outros tipos de compostos para sua eliminação, como desinfetantes (Lomas et al. 2003; Paolin et al., 2016).

No presente estudo observou-se que dos 35 isolados produtores de algum nível de biofilme, 23 (65.7%) apresentaram resistência a pelo menos um dos antimicrobianos testados por disco-difusão, sendo que 14 destes eram MDR. Alguns estudos descrevem os desafios em realizar tratamentos sobre bactérias formadoras de biofilme devido a sua associação com maior resistência a terapias antimicrobianas (Percival et al., 2015; Seng et al. 2017; Neopane et al., 2018). O mecanismo de resistência a múltiplos fármacos em organismos formadores de biofilme é descrito como um resultado direto do contato célula-célula dentro do biofilme, o que facilita a transferência de genes de resistência entre si (Neopane et al., 2018). Isto indica que a formação de biofilme pode ser um dos fatores cruciais para aumentar a resistência aos antimicrobianos comumente usados.

Além disso, vários mecanismos têm sido propostos para explicar a suscetibilidade reduzida das bactérias quando estão na forma de biofilmes (Brown et al., 1988; Stewart, 1996; Xu et al., 1998; Mah e O'Toole, 2001; Olson et al., 2002; Drenkard, 2003). Mas o que vem se destacando nas pesquisas, é que avaliando a expressão gênica global em diferentes estágios de formação de biofilme, a formação de subpopulações tolerantes são auxiliadas pela indução de fenótipos específicos de biofilme, incluindo crescimento lento ou ausência de crescimento, e respostas de estresse que resultam em alterações fisiológicas nas células. Sendo assim, certas características que aumentam a tolerância aos antimicrobianos passam a ser expressas apenas quando as células adotam o fenótipo de biofilme (Ito et al., 2009). Um desses fenótipos altamente protetor, consiste nas *persisters cells* (Stewart e Costerton, 2001).

Considerando que os biofilmes contribuem de diferentes maneiras para tornar as bactérias mais tolerantes aos antimicrobianos, e que a presença de bactérias formadoras de biofilme entre os isolados de peles alógenas acaba tendo impacto direto nos protocolos de descontaminação desses tecidos, foi avaliada a formação de biofilme sobre amostras de peles alógenas e a ação dos dois coquetéis (PEN, GEN, CAZ e PEN, GEN, CAZ, TET) que apresentaram o melhor poder inibitório pelo teste com as células no estado planctônico, sobre a estrutura de biofilme formado. Foram avaliados cinco isolados com diferentes perfis de susceptibilidade a antimicrobianos e com diferentes níveis de formação de biofilme (*Staphylococcus epidermidis* 18.1.2, *Staphylococcus saprophyticus* 18.7.2, *Staphylococcus aureus* 27.12.4, *Bacillus cereus* 8.4.2 e *Klebsiella variicola* 82.5.2).

Com um período de incubação de sete dias, com exceção de *S. aureus* 27.12.4 que cresceu de forma individualizada, todas as demais espécies avaliadas aderiram-se a superfície da pele formando aglomerados celulares volumosos ou discretos, com fibras extracelulares de diferentes tamanhos que se distribuíram em volta das células conectando-as umas as outras. *K. variicola* 82.5.2, mesmo sendo classificada como fraca formadora de biofilme pelo teste em microplaca, formou um biofilme com elevada densidade celular sobre as peles alógenas, reforçando que a pele pode servir de substrato para a adesão de células formadoras de diferentes níveis de biofilme.

Os coquetéis antimicrobianos testados tiveram diferentes efeitos sobre os isolados avaliados. *S. epidermidis* 18.1.2 teve o biofilme totalmente desestruturado pelos dois coquetéis testados, bem como as células de *S. aureus* 27.12.4, tiveram sua morfologia celular danificada tomando formas irregulares, com poros na parede celular após exposição aos dois tratamentos. Os tratamentos sobre *B. cereus* 8.4.2 além de desestabelecerem a estrutura do biofilme, alteraram a morfologia celular. Enquanto que os pequenos aglomerados de *S. saprophyticus* 18.7.2 e o denso biofilme de *K. variicola* 82.5.2 praticamente não foram morfológicamente afetados pelos tratamentos.

O cultivo das peles alógenas após receberem os tratamentos com os coquetéis antimicrobianos apresentaram resultado positivo para os cinco isolados avaliados, mesmo que com um número bem menor de células comparado ao crescimento observado no controle. Sendo assim, independente do grau de adesão e formação de biofilme, todos isolados persistiram aos tratamentos aplicados, ao contrário do que foi observado quando os mesmos tratamentos foram aplicados sobre estes isolados na forma planctônica e tiveram percentual de inibição de 100%. Com exceção de *S. saprophyticus* 18.7.2 que o percentual de inibição foi de 99.94 e 96.57% para os tratamentos 1 e 2, respectivamente. Além disso, os cinco isolados apresentaram resultados de susceptibilidade a GEN e TET pelo método de disco-difusão, sendo assim os coquetéis deveriam ser eficientes sobre essas células (Meneghetti et al 2018).

Vários fatores podem influenciar a eficácia dos antimicrobianos usados na descontaminação de tecidos (Pitt et al., 2014), além da característica de existir dentro das populações bacterianas, subpopulações das *persisters cells*, principalmente dentro de biofilmes (Gelens et al., 2013; Lewis, 2010). O que justifica o fato de os

isolados com perfis de susceptibilidade ou susceptíveis a pelo menos um dos antimicrobianos inseridos nos coquetéis, não terem sido eliminados por esses tratamentos (Mulcahy et al., 2010). Além disso, talvez seja necessário introduzir a esses coquetéis compostos capazes de desagregar a matriz extracelular de biofilme ou inibir a sua estase, inibidores de QS e de outras vias de sinalização implicadas na formação de biofilmes e de adesão celular, podendo assim potencializar a ação dos antimicrobianos (Grassi et al., 2017).

Em relação a contaminação por fungos das peles alógenas, foram isolados os gêneros *Paecilomyces*, *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. Ambos amplamente distribuídos no ambiente e que podem se tornar patogênicos quando contaminam indivíduos imunocomprometidos (Senior e Saldarriaga, 2009; Pianigiani et al., 2010). É o primeiro relato descrevendo o isolamento de *Paecilomyces* sp. em aloenxertos de pele, já tendo sido associado à endocardite por afetar aloenxertos de válvulas aórticas (Senior e Saldarriaga, 2009).

Quanto a suscetibilidade à anfotericina B, os isolados fúngicos apresentaram valores de CIM variando de 0,0625 a 4 µg / mL. De acordo com o CLSI M38-A29, uma CIM a anfotericina B de fungos filamentosos oportunistas, é de cerca de 0,5 a 2 µg/mL. CIMs acima disso estariam associadas à falha do tratamento na clínica. Com base nos resultados da CIM, a maioria dos isolados apresentou CIMs de até 2 µg/mL, apenas 4 isolados apresentaram CIMs acima deste valor. Porém, considerando o ECV de *A. fumigatus*, 13 (68.4%) isolados apresentaram valores de CIM > 1 µg/mL, em excesso ao ECV para *A. fumigatus*. Isto pode sugerir que os isolados apresentam reduzida susceptibilidade à anfotericina B e possam estar abrigando mecanismos de resistência. O maior valor de CIM observado foi de 4 µg/mL, pode ser um valor inicial de orientação para o tratamento da pele, uma vez que é aplicado diretamente no tecido. Diferentes concentrações devem ser testadas para avaliar seu potencial de penetração e eficácia sobre peles alógenas.

Alguns bancos de pele tratam peles contaminadas por fungos para sua utilização como aloenxerto (Mathur et al., 2009; Pianigiani et al., 2010; Pirnay et al., 2012), porém outros bancos de pele consideram a contaminação fúngica como critério de descarte de tecido (Lindford et al., 2010; Mátioski et al., 2015; Gaucher et al., 2016). Em concordância com estes últimos, sugere-se que o descarte de peles alógenas contaminadas por fungos é o procedimento mais seguro até que um tratamento antimicrobiano seja padronizado.

Não foram identificados a nível de espécie pelo MALDI-TOF, 33.8% dos isolados bacterianos. Isto deve-se a dificuldade em separar os grupos cujas espécies apresentam estreita relação e também porque os bancos de dados comerciais são principalmente orientados para as cepas encontradas na prática clínica, sendo limitado (Starostin et al., 2015). Pela análise de agrupamento, nos dendrogramas comparando com espectros de cepas padrão de espécies de *Bacillus*, pode-se identificar mais da metade dos isolados que não tinham sua espécie definida. Além disso, foi possível observar que *B. pumilus* foi isolado de 4 amostras de peles não alógenas, resultado antes não detectado. A existência de apenas um pico de massa conservada a 3046 m/z entre espécies de *Bacillus*, corrobora com observações de dificuldade de discriminar diferentes espécies de *Bacillus* por MALDI-TOF (Ng, 2018).

Avaliando a relação dos isolados de *Bacillus* de peles alógenas e não alógenas, o dendrograma MSP revelou clusters distintos de acordo com limites arbitrário no nível de distância de 200, pode-se observar a separação dos isolados conforme as espécies, e em distância de 50 pode-se observar a relação estreita entre os isolados. Destacando que vários grupos se distribuíram de acordo com o tipo de pele. Tal observação nos leva a especular que diferentes populações de *Bacillus* sp. estão sendo mantidas nestas peles, provavelmente devido as pressões seletivas dos diferentes ambientes de origem, hospitalar e comunidade. Os tratamentos prévios dos pacientes doadores, dos aloenxertos e do armazenamento estariam contribuindo para diferenças entre estas populações

## 7. CONCLUSÃO

Foram isoladas bactérias Gram-positivas dos gêneros *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp., e *Paenibacillus* sp. demonstrando assim a predominância de contaminação por bactérias Gram-positivas.

A persistência da contaminação na maioria das amostras não foi relacionada ao fenótipo de resistência aos antimicrobianos. Sugerindo que outros fatores podem ser responsáveis pela persistência dessas bactérias na pele alogênica. Contudo, a observação de isolados multirresistentes evidenciam a necessidade de um monitoramento da resistência dentro dos bancos de tecidos, uma vez que antimicrobianos de amplo espectro são utilizados e podem selecionar bactérias resistentes, dificultando ainda mais a contaminação dos aloenxertos teciduais.

Todos os isolados foram susceptíveis a GEN, AMI e TET e estes antimicrobianos mostraram o melhor potencial inibitório nos testes de avaliação da CIM. Por este motivo GEN e TET, juntamente com PEN e CAZ (com base na literatura), foram os antimicrobianos escolhidos para os testes com coquetéis. A combinação de PEN, GEN, CAZ e PEN, GEN, CAZ, TET, foram os dois coquetéis que apresentaram o maior efeito inibitório sobre as bactérias (no estado planctônico) isoladas de peles alógenas e não alógenas, com diferentes perfis de susceptibilidade e de capacidade de formação ou ausência de biofilme. Podendo ser sugeridos como um primeiro ciclo de tratamento sobre aloenxertos de pele.

Destacou-se a ineficiência de todos coquetéis avaliados em eliminar alguns isolados de *Bacillus* sp., mesmo sendo susceptíveis a antimicrobianos, podendo a persistência ser atribuída principalmente ao fato de ser um gênero formador de endosporos, requerendo um tratamento mais especializado.

O resultados de que os isolados das peles alógenas e não alógenas, apresentam diferentes capacidades de formação de biofilme *in vitro*, têm impacto direto nos protocolos de tratamentos utilizados para a descontaminação de aloenxertos cutâneos. Além disso, através das análises por MEV, observou-se que a pele humana de fato pode servir de substrato para o desenvolvimento de biofilme bacteriano.

Os dois coquetéis (PEN, GEN, CAZ e PEN, GEN, CAZ, TET) com elevado potencial inibitório sobre as células planctônicas, quando testados sobre as células em estado de biofilme nas peles alógenas, não conseguiram eliminar a contaminação por completo, apesar de causar danos a estrutura de alguns biofilmes bem como sobre a morfologia celular de alguns isolados. Esses resultados enfatizam a necessidade de aprimorar o processo de descontaminação de tecidos, onde a inserção de compostos que atuem no processo de formação de biofilme e de desestruturação do mesmo possam potencializar a ação dos antimicrobianos.

Em relação aos fungos, foram isolados fungos filamentosos dos gêneros *Paecilomyces*, *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. Considerando o ECV de *A. fumigatus* maioria dos isolados apresentou valores de CIM elevados sugerindo reduzida susceptibilidade à anfotericina B e que os mesmos podem estar abrigando mecanismos de resistência. O maior valor de CIM observado foi de 4 µg/mL, podendo ser um valor inicial de orientação para o tratamento de aloenxertos. Contudo, o descarte de aloenxertos contaminados por fungos ainda é sugerido até que um

tratamento antifúngico seja padronizado de forma mais aprofundada.

Através da análise por MALDI-TOF MS foram encontrados grupos que se distribuíram de acordo com as diferentes origens, pele alógena ou não alógena, sugerindo populações distintas nessas duas condições. A construção dos dendrogramas MSP auxiliou na identificação de isolados que não haviam sido identificados. Contudo, foi ineficiente em separar alguns isolados, principalmente as espécies pertencentes ao grupo *B. subtilis*. Isto desperta a necessidade de mais estudos avaliando diferentes abordagens da ferramenta MALDI-TOF que possam contribuir para a identificação de espécies estreitamente relacionadas.

## 8. REFERÊNCIAS

- ABTO - Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos. 2017. **Registro Brasileiro de Transplantes/ Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado (2010-2017)**. São Paulo/São Paulo.
- Achermann Y, Goldstein EJ, Coenye T, Shirtliff ME. 2014. *Propionibacterium acnes*: from commensal to opportunistic biofilm-associated implant pathogen. Clin Microbiol Ver. 27(3):419-40.
- Anderl JN, Franklin MJ, Stewart OS. 2000. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. Antimicrob Agents Ch. 44(7):1818-24.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2017. **Relatório de Avaliação dos Dados de Produção dos Bancos de Tecidos – Ano 2016**. Brasília/Distrito Federal.
- Atique FB, Khalil MM. 2014. The bacterial contamination of allogeneic bone and emergence of multidrug-resistant bacteria in tissue bank. Biomed Res Int. 2014:430581.
- Artz CP, Becker JM, Sako Y, Bronwell AW. 1955. Postmortem skin homografts in the treatment of extensive burns. Arch Surg. 71(5):682-7.
- Bagge N, Ciofu O, Skovgaard LT, Høiby N. Rapid development in vitro and in vivo of resistance to ceftazidime in biofilm-growing *Pseudomonas aeruginosa* due to chromosomal beta-lactamase. APMIS. 108(9):589-600.
- Belkaid Y, Segre JA. 2014. Dialogue between skin microbiota and immunity. Science. 346(6212):954-9.
- Bernhard, PR. **Banco de Tecidos Humanos – Pele Dr. Roberto Corrêa Chem**. 2016. Case participante do Prêmio Top Cidadania 2016. Disponível em: <[https://updoc.site/download/abrh-rs-5acdc4899f496\\_pdf](https://updoc.site/download/abrh-rs-5acdc4899f496_pdf)>. Acesso em: 31 mar. 2017.
- Berrazeg M, Diene SM, Drissi M, Kempf M, Richet H, Landraud L, et al. 2013. Biotyping of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from France and Algeria using MALDI-TOF MS. PLoS One. 8(4):e61428.
- Blaser MJ, Dominguez-Bello MG, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Estrada I, et al.

2013. Distinct cutaneous bacterial assemblages in a sampling of South American Amerindians and US residents. *ISME J* 7(1):85-95.
- Bojar AR, Holland KT. 2004. Acne and *Propionibacterium acnes*. *Clin Dermatol* 22(5):375-9.
- Brandwein M, Steinberg D, Meshner S. 2016. Microbial biofilms and the human skin microbiome. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2(3).
- Britton-Byrd BW, Lynch JP, Williamson S, McCauley RL. 2008. Early use of allograft skin: are 3-day microbiologic cultures safe? *J Trauma*. 64(3):816-8.
- Brown JB, Fryer MP, Randall P, Lu M. 1953. Postmortem homografts as 'biological dressings' for extensive burns and denuded areas. *Ann Surg*. 138:618-30.
- Carreirão S, Cardim V, Goldenberg D (Eds). 2005. **Cirurgia plástica: Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica**, Atheneu/São Paulo. 904 p.
- Castro ANP, Silva DMA, Vasconcelos VM, Lima Júnior EM, Camurça MNS, Martins MC. 2013. Sentimentos e dúvidas do paciente queimado em uma unidade de referência em Fortaleza – CE. *Rev Bras Queimaduras*. 12(3):159-64.
- Celandroni F, Salvetti S, Gueye SA, Mazzantini D, Lupetti A, Senesi S, et al. 2016. Identification and pathogenic potential of clinical *Bacillus* and *Paenibacillus* isolates. *PLoS One*. 11(3):e0152831.
- Clauss M, Tabin UF, Bizzini A, Trampuz A, Ilchmann T. 2013. Biofilm formation by staphylococci on fresh, fresh-frozen and processed human and bovine bone grafts. *Eur Cell Mater*. 25:159-66.
- Clontz, L (Eds). 2008. **Microbial Limit and Bioburden Tests: Validation approaches and global requirements**. 2 ed. CRC Press/New York .280p.
- Clotilde DG, Japão DP, Valter DG (Eds). 2015. **Doação e transplante de órgãos e tecidos**. Segmento Farma/São Paulo. 560p.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard-second edition. CLSI document M38-A2**. Wayne/PA/United States.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010. **Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria. Approved Guidelines: Second Edition M45-A2**. Wayne/PA/United States.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Fifth Informational Supplement M100-S25**. Wayne/PA/United States.
- Carannante A, De Carolis E, Vacca P, Vella A, Vocale C, De Francesco MA, et al. 2015. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for identification and clustering of *Neisseria gonorrhoeae*. *BMC Microbiol*. 15:142.
- Coenye T, Peeters E, Nelis HJ. 2007. Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* is associated with increased resistance to antimicrobial agents and increased production of putative virulence factors. *Res Microbiol*. 158(4):386-92.
- Cosseau C, Romano-Bertrand S, Duplan H, Lucas O, Ingrassia I, Pigasse C, et al. 2016. Proteobacteria from the human skin microbiota: Species-level diversity and hypotheses. *One Health*. 2:33-41.
- Costa JC, Espeschit IF, Pieri FA, Benjamin LA, Moreira MA. 2012. Increased production of biofilms by *Escherichia coli* in the presence of enrofloxacin. *Vet Microbiol*. 160(3-4):488-90.
- Csonge L, Pellet S, Szenes A, Istvan J. 1995. Antibiotics in the preservation of allograft and xenograft skin. *Burns*. 21(2):102-5.

- De By TM, Parker R, Delmo Walter EM, Hetzer R. 2012. Cardiovascular tissue banking in Europe. *HSR Proc Intensive Care Cardiovasc Anesth.* 4(4):251-60.
- Delwart EL. 2007. Viral metagenomics. *Rev Med Virol.* 17(2):115-31.
- Donelli, G. 2006. Vascular catheter-related infection and sepsis. *Surg Infect (Larchmt).* 7(2):s25-27.
- Donlan RM. 2001. Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis* 7(2):277-81.
- Donlan RM, Costerton JW. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 15(2):167-93.
- Dziedzic-Goclawka A, Stachowicz W. 1997. **Sterilisation of tissue allografts.** Em: *Advances in tissue banking.* World Scientific/Singapore. 272p.
- Eastlund T. 2006. Bacterial infection transmitted by human tissue allograft transplantation. *Cell Tissue Bank.* 7(3):147-66.
- Eissa, ME, El Naby MA, Beshir MM. 2014. Bacterial vs. fungal spore resistance to peroxygen biocide on inanimate surfaces. *Bull Fac Pharm Cairo Univ.* 52(2):219-24.
- Espinel-Ingroff A, Cuenca-Estrella M, Fothergill A, Fuller J, Ghannoum M, Johnson E, et al. 2011. Wild-Type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B and *Aspergillus* spp. for the CLSI broth microdilution method (M38-A2 document). *Antimicrob Agents Chemother.* 55(11):5150-4.
- EUCAST - The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2017. **Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 7.1.** Disponível em: <[http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_7.1\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_7.1_Breakpoint_Tables.pdf). Acessado em: 10 mai. 2017.
- Fagerquist CK, Garbus BR, Miller WG, Williams KE, Yee E, Bates AH, et al. 2010. Rapid identification of protein biomarkers of *Escherichia coli* O157:H7 by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight-time-of-flight mass spectrometry and top-down proteomics. *Anal Chem.* 82(7):2717-25.
- Falagas ME, Karageorgopoulos DE. 2009. Extended-spectrum beta-lactamase producing organisms. *J Hosp Infect.* 73(4):345-54.
- Felis GE, Dellaglio F. 2007. On species descriptions based on a single strain: proposal to introduce the status species proponenda (sp. pr.). *Int J Syst Evol Microbiol.* 57(Pt 9):2185-7.
- Fernández-No IC, Böhme K, Díaz-Bao M, Cepeda A, Barros-Velázquez J, Calo-Mata P. 2013. Characterisation and profiling of *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Food Microbiol.* 33(2):235-42.
- Gaucher S, Khaznadar Z, Gourevitch JC, Jarraya M. 2016. Skin donors and human skin allografts: evaluation of an 11-year practice and discard in a referral tissue bank. *Cell Tissue Bank.* 17(1):11-9.
- Germain M, Strong DM, Dowling G, Mohr J, Duong A, Garibaldi A, et al. 2016. Disinfection of human cardiac valve allografts in tissue banking: systematic review report. *Cell Tissue Bank.* 17(4):593-601.
- Germain M, Thibault L, Jacques A, Tremblay J, Bourgeois R. 2010. Heart valve allograft decontamination with antibiotics: impact of the temperature of incubation on efficacy. *Cell Tissue Bank.* 11(2):197-204.
- Girdner JH. 1881. Skin-grafting with graft taken from the dead subject. *Med Record NY.* 20:119-20.
- Grady EN, MacDonald J, Liu L, Richman A, Yuan ZC. 2016. Current knowledge and

- perspectives of Paenibacillus: a review. *Microb Cell Fact.* 15:203.
- Grassi L, Maisetta G, Esin S, Batoni G. 2017. Combination strategies to enhance the efficacy of antimicrobial peptides against bacterial biofilms. *Front Microbiol.* 8:2409.
- Grice EA, Segre JA. 2011. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol* 9(4):244-53.
- Guo FP, Fan HW, Liu ZY, Yang QW, Li YJ, Li TS. 2015. Brain abscess caused by *Bacillus megaterium* in an adult patient. *Chin Med J (Engl).* 128(11):1552-4.
- Habrun B, Racic I, Kompes G, Spicic S, Benic M, Mihaljevic Z, et al. 2011. The antimicrobial susceptibility and virulence factors of *Bacillus anthracis* strains isolated in Croatia. *Vet Med.* 56(1):22-7.
- Hannigan GD, Grice EA. 2013. Microbial ecology of the skin in the era of metagenomics and molecular microbiology. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 3(12):a015362.
- Heng WL, Albrecht H, Chiappini P, Lim YP, Manning L. 2013. International heart valve bank survey: a review of processing practices and activity outcomes. *J Transplant.* 2013:163150.
- Hermans MH. 2011. Preservation methods of allografts and their (lack of) influence on clinical results in partial thickness burns. *Burns.* 37(5):873-81.
- Hettich R, Ghofrani A, Hafemann B. 1994. The immunogenicity of glycerol-preserved donor skin. *Burns.* 20:S71-6.
- Horner C, Mawer D, Wilcox M. 2012. Reduced susceptibility to chlorhexidine in staphylococci: is it increasing and does it matter? *J Antimicrob Chemother.* 67(11):2547-59.
- Huang Q, Pegg DE, Kearney JN. 2004. Banking of non-viable skin allografts using high concentrations of glycerol or propylene glycol. *Cell Tissue Bank.* 5(1):3-21.
- Ireland L, Spelman D. 2005. Bacterial contamination of tissue allografts-experiences of the donor tissue bank of Victoria. *Cell Tissue Bank* 6(3):181-9.
- Johnston C, Callum J, Mohr J, Duong A, Garibaldi A, Simunovic N, et al. 2016. Disinfection of human skin allografts in tissue banking: a systematic review report. *Cell Tissue Bank.* 17(4):585-92.
- Jeßberger N, Krey VM, Rademacher C, Böhm ME, Mohr AK, Ehling-Schulz M, et al. 2015. From genome to toxicity: a combinatory approach highlights the complexity of enterotoxin production in *Bacillus cereus*. *Front Microbiol.* 6:560.
- Kagan RJ, Robb EC, Plessinger RT. 2005. Human Skin Banking. *Clin Lab Med* 25(3):587-605.
- Kairiyama E, Horak C, Spinosa M, Pachado J, Schwint O. 2009. Radiation sterilization of skin allograft. *Radiat Phys Chem.* 78(7-8):445-8.
- Kearney JN. 1998. Quality issues in Skin Banking: a review. *Burns.* 24(4):299-305.
- Kearney JN. 2005. Guidelines on processing and clinical use of skin allografts. *Clin Dermatol.* 23(4):357-64.
- Khoo TL, Halim AS, Saad AZ, Dorai AA. 2010. The application of glycerol-preserved skin allograft in the treatment of burn injuries: an analysis based on indications. *Burns.* 36(6):897-904.
- Kobayashi H, Oethinger M, Tuohy MJ, Procop GW, Bauer TW. 2009. Improved detection of biofilm-formative bacteria by vortexing and sonication: a pilot study. *Clin Orthop.* 467(5):1360-1364.
- Kreis RW, Vloemans AF, Hoekstra MJ, Mackie DP, Hermans RP. 1989. The use of non-viable glycerol-preserved cadaver skin combined with widely expanded autografts in the treatment of extensive third-degree burns. *J Trauma.* 29(1):51-4.
- Kuriyama T, Karasawa T, Williams DW. 2014. Antimicrobial Chemotherapy:

- Significance to Healthcare. Em: *Biofilms in Infection Prevention and Control*. Academic Press. 394p.
- Kwaszewska AK, Sobiś-Glinkowska M, Szewczyk EM. 2009. Influence of contact with hospital environment on sensitivity to antibiotics of lipophilic strains of *Corynebacterium* residing on human skin. *Med Dosw Mikrobiol*. 61:359-66.
- Leggett MJ, McDonnell G, Denyer SP, Setlow P, Maillard JY. 2012. Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance. *J Appl Microbiol*. 113(3):485-98.
- Leon-Villapalos J, Eldardiri M, Dziewulski P. 2010. The use of human deceased donor skin allograft in burn care. *Cell Tissue Bank*. 11(1):99-104.
- Lewis, K. 2010. Persister Cells. *Annu Rev Microbiol*. 64:357-72.
- Lima-Junior EM, Picollo NS, Miranda MJB, Ribeiro WLC, Alves APNN, Ferreira GE, et al. 2017. Uso da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*), como curativo biológico oclusivo, no tratamento de queimaduras. *Rev Bras Queimaduras*. 16(1):10-7.
- Lindford AJ, Frey I, Vuola J, Koljonen V. 2010. Evolving practice of the Helsinki Skin Bank. *Int Wound J*. 7(4):277-81.
- Lindsay D, von Holy A. 2006. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *J Hosp Infect*. 64(4):313-25.
- Lofêgo Filho JA, Paula D, Diogo CS, Paulo RCS, Marcos ALS, Cristina MT. 2006. Enxertia de pele em oncologia cutânea. *An Bras Dermatol*. 81(5):465-72.
- Logan N, Turnbull PCB. *Bacillus* and other aerobic endosporeforming bacteria. Em: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH et al., editors. *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology. 445-60p.
- Lomas RJ, Cruse-Sawyer JE, Simpson C, Ingham E, Bojar R, Kearney JN. 2003. Assessment of the biological properties of human split skin allografts disinfected with peracetic acid and preserved in glycerol. *Burns*. 29(6):515-25.
- Lovelock JE. 1953. The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta*. 10(3):414-26.
- MacKintosh EE, Patel JD, Marchant RE, Anderson JM. 2006. Effects of biomaterial surface chemistry on the adhesion and biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* *in vitro*. *J Biomed Mater Res A*. 78(4):836-42.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 1991. **Microbial growth**. Em: *Brock biology of microorganisms*. 10 ed. Upper Saddle River: Pearson Education International/Prentice Hall. 137-66p.
- Mah TF, O'Toole GA. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*. 9(1):34-9.
- Mangwani N, Dash HR, Chauhan A, Das S. 2012. Bacterial quorum sensing: functional features and potential applications in biotechnology. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 22(4):215-27.
- Martins ALM, Neto ASP, Milani AR, Minuzzi Filho ACS, Chem EM, Ely PB. 2012. Estatísticas do Banco de Pele do Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre: anos de 2009-2012. *Rev Bras Cir Plást*. 27:1-102
- Mathur M, De A, Gore M. 2009. Microbiological assessment of cadaver skin grafts received in a skin bank. *Burns*. 35(1):104-6.
- Matoski AR, Silva CR, Silva-Cunha DR, Calomeno LH, Bonato FT, Nigro MA. 2015. First-year experience of a new skin bank in Brazil. *Plast Aesthet Res*. 2(6):326-31.
- May SR, Wainwright JF, Declement FA. 1985. Variables determining the amount of microbial contamination in cadaveric allograft skin used as a biological wound dressing. *Burns*. 11(4):242-51.
- McCauley RL. 1996. The skin bank. Em: Herndon, DN (Eds). *Total burn care*, 1ªed.

- Saunders/Philadelphia. 159-163.
- McDougald D, Rice SA, Barraud N, Steinberg PD, Kjelleberg S. 2011. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat Rev Microbiol.* 10(1):39-50.
- Mille Y, Beney L, Gervais P. 2002. Viability of *Escherichia coli* after combined osmotic and thermal treatment: a plasma membrane implication. *Biochim Biophys Acta.* 1567(1-2):41-8.
- Monafo WW, Tandon SN, Bradley RE, Condict C. 1976. Bacterial contamination of skin used as a biological dressing. A potential hazard. *JAMA.* 235(12):1248-9.
- Monsen T, Lövgren E, Widerström M, Wallinder L. 2009. In vitro effect of ultrasound on bacteria and suggested protocol for sonication and diagnosis of prosthetic infections. *J Clin Microbiol.* 47(8):2496-501.
- Mulcahy LR, Burns JL, Lory S, Lewis K. 2010. Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis. *J Bacteriol.* 192(23):6191-9.
- Murray PR. 2010. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. *Clin Microbiol Infect.* 16(11):1626-30.
- Murray PR. 2012. What Is New in Clinical Microbiology—Microbial Identification by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *J Mol Diagn.* 14(5):419-23.
- Neely AN, Plessinger RT, Stamper B, Kagan RJ. 2008. Can contamination of a patient's allograft be traced back to the allograft donor? *J Burn Care Res.* 29(1):73-76.
- Ng W. 2018. Conserved mass peaks in MALDI-TOF mass spectra of bacterial species at the genus and species levels. Disponível em: <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.3524v2>. Acesso em: 10 Jun 2018.
- Obeng MD, McCauley RL, Barnett JR, Heggors JP, Sheridan K, Schutzler SS. 2001. Cadaveric allograft discards as a result of positive skin cultures. *Burns.* 27(3):267-71.
- Otto M. Staphylococcal Biofilms. 2008. *Curr Top Microbiol Immunol.* 322:207-28.
- Owusu-Kwarteng J, Wuni A, Akabanda F, Tano-Debrah K, Jespersen L. 2017. Prevalence, virulence factor genes and antibiotic resistance of *Bacillus cereus* sensu lato isolated from dairy farms and traditional dairy products. *BMC Microbiol.* 17:65.
- Paolin A, Trojan D, Carniato A, Tasca F, Massarin E, Tugnoli A, Cogliati E. 2016. Analysis of the effectiveness of Sodium Hypochlorite decontamination of cadaveric human tissues at retrieval. *Cell Tissue Bank.* 17(4):611-8.
- Passos PRM. 2011. **Controle microbiológico de tecidos humanos utilizados para transplantes.** Monografia (Especialização em Microbiologia aplicada às Ciências da Saúde) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.
- Patel JD, Ebert M, Ward R, Anderson JM. 2007. *S. epidermidis* biofilm formation: effects of biomaterial surface chemistry and serum proteins. *J Biomed Mater Res A.* 80(3):742-51.
- Percival SL, Emanuel C, Cutting KF, Williams DW. 2012. Microbiology of the skin and the role of biofilms in infection. *Int Wound J.* 9(1):14-32.
- Percival SL, Suleman L, Vuotto C, Donelli G. 2015. Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control. *J Med Microbiol.* 64(Pt4):323-34.
- Pianigiani E, Ierardi F, Cherubini Di Simplicio F, Andreassi A. 2005. Skin bank

- organization. Clin Dermatol. 23(4):353-6.
- Pianigiani E, Ierardi F, Cuciti C, Brignali S, Oggioni M, Fimiani M. 2010. Processing efficacy in relation to microbial contamination of skin allografts from 723 donors. Burns. 36(3):347-51.
- Pianigiani E, Risulo M, Ierardi F, Sbrano P, Andreassi L, Fimiani M. et al. 2006. Prevalence of skin allograft discards as a result of serological and molecular microbiological screening in a regional skin bank in Italy. Burns. 32(3):348-51.
- Pigossi N. 1967. **A glicerina na conservação de dura-mater - estudo experimental.** Tese (Livre docência) - Faculdade de Medicina de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Pirnay JP, Verween G, Pascual B, Verbeken G, De Corte P, Rose T, et al. 2012. Evaluation of a microbiological screening and acceptance procedure for cryopreserved skin allografts based on 14-day cultures. Cell Tissue Bank. 13(2):287-95.
- Pitt TL, Tidey K, Roy A, Ancliff S, Lomas R, McDonald CP. 2014. Activity of four antimicrobial cocktails for tissue allograft decontamination against bacteria and *Candida* spp. of known susceptibility at different temperatures. Cell Tissue Bank. 15(1):119-25.
- Plug IJ, Holcomb RG, Gómez MM. 1997. **Principles of the thermal destruction of microorganisms.** Em: Disinfection, sterilization, and preservation. 5 ed. Philadelphia/Williams and Wilkins. 97-100p.
- Poirier I, Maréchal PA, Gervais P. Effects of the kinetics of water potential variation on bacteria viability. J Appl Microbiol. 82(1):101-6.
- Portal Brasil. **Um milhão de brasileiros sofrem queimaduras por ano.** 2017a. Brasil. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2017/06/um-milhao-de-brasileiros-sofrem-queimaduras-por-ano>>. Acesso em: 22 fev. 2018.
- Portal Brasil. **Instituto Nacional de Traumatologia passa a contar com Banco de Pele.** 2017b. Brasil. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2017/04/instituto-nacional-de-traumatologia-passa-a-contar-com-banco-de-pele>>. Acesso em: 27 fev. 2018.
- Portillo ME, Salvadó M, Trampuz A, Plasencia V, Rodriguez-Villasante M, Sorli L, Puig L, et al. Sonication versus vortexing of implants for diagnosis of prosthetic joint infection. J Clin Microbiol. 51(2):591-4.
- Rachid S, Ohlsen K, Witte W, Hacker J, Ziebuhr W. 2000. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob Agents Chemother. 44(12):3357-63.
- RDC 220 - Resolução da Diretoria Colegiada nº 220. 2006. **Regulamento Técnico para o Funcionamento de Bancos de Tecidos Músculoesqueléticos e de Bancos de Pele de origem humana.** Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2006/rdc/220\\_06rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2006/rdc/220_06rdc.htm)>. Acesso em: 3 nov 2014.
- Reich MS, Akkus O. 2013. Sporicidal efficacy of genipin: a potential theoretical alternative for biomaterial and tissue graft sterilization. Cell Tissue Bank. 14(3):381-93.
- Reimer LG, Carroll KC. 2003. **General issues in clinical microbiology. Procedures for the storage of microorganisms.** Em: Manual of clinical microbiology. American Society for Microbiology/Washington, DC. 68-73p.
- Reverdin JL. 1869. Greffe Epidermique. Bull de la Sol Imperiale de Chir de Paris. 493-511.

- Richters CD, Hoekstra MJ, van Baare J, du Pont JS, Kamperdijk EW (1997) Immunogenicity of glycerol-preserved human cadaver skin in vitro. *J Burn Care Rehabil* 18(3):228-33.
- Richters CD, Hoekstra MJ, van Baare J, du Pont JS, Kamperdijk EW. 1996. Morphology of glycerol-preserved human cadaver skin. *Burns*. 22(2):113-6.
- Richters CD, Hoekstra MJ, du Pont JS et al. Immunology of skin transplantation. 2005. *Clin Dermatol*. 23(4):338-42.
- Rooney P, Eagle M, Hogg P, Lomas R, Kearney J. 2008. Sterilisation of skin allograft with gamma irradiation. *Burns*. 34(5):664-73.
- Rosenthal M, Goldberg D, Aiello A, Larson E, Foxmana B. 2011. Skin microbiota: Microbial community structure and its potential association with health and disease. *Infect Genet Evol*. 11(5):839-48.
- Ross A, Kearney J. 2004. The measurement of water activity in allogeneic skin grafts preserved using high concentration glycerol or propylene glycol. *Cell Tissue Bank*. 5(1):37-44.
- Ruelle V, El Moulaj B, Zorzi W, Ledent P, Pauw ED. 2004. Rapid identification of environmental bacterial strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 18(18):2013-9.
- Russu E, Mureşan A, Grigorescu B. 2011. Vascular graft infections management. *Clin Manage*. 3:16-9.
- Saegeman V, Lismont D, Verduyck B, Ectors N, Stuyck J, Verhaegen J. 2007. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci on tissue allografts and isolates from orthopedic patients. *J Orthop Res*. 25(4):501-7.
- Saegeman VS, Ectors NL, Lismont D, Verduyck B, Verhaegen J. 2008. Short- and long-term bacterial inhibiting effect of high concentrations of glycerol used in the preservation of skin allografts. *Burns*. 34(2):205-11.
- Saleh F, Kheirandish F, Azizi H, Azizi M. 2014. Molecular diagnosis and characterization of *Bacillus subtilis* isolated from burn wound in Iran. *Res Mol Med*. 2(2):40-4.
- Sauer S, Kliem M. 2010. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nat Rev Microbiol*. 8(1):74-82.
- Schiozer, W. 2012. Banco de pele no Brasil. *Rev Bras Queimaduras*. 11(2):53-5.
- Scholz CF, Kilian M. 2016. The natural history of cutaneous propionibacteria, and reclassification of selected species within the genus *Propionibacterium* to the proposed novel genera *Acidipropionibacterium* gen. nov., *Cutibacterium* gen. nov. and *Pseudopropionibacterium* gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 66:4422-32.
- Seng P, Rolain JM, Fournier PE, La Scola B, Drancourt M, Raoult D. 2010. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiol*. 5(11):1733-54.
- Serafini A, Riello E, Trojan D, Cogliati E, Palù G, Manganelli R, et al. 2016. Evaluation of new antibiotic cocktails against contaminating bacteria found in allograft tissues. *Cell Tissue Bank*. 17(4):619-28.
- Setlow P. 2006. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J Appl Microbiol*. 101(3):514-25.
- Shin K, Yun Y, Yi S, Lee HG, Cho JC, Suh KD, et al. 2013. Biofilm-forming ability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from human skin. *J Dermatol Sci*. 71(2):130-7.
- Shu L, Yang Y. 2017. *Bacillus* classification based on matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry—effects of culture conditions. *Sci Reports*. 7: 15546.

- Silva CRM, Borges ML, Watanabe CM, Diogo Filho A, Gontijo Filho PP. 2002. Centros cirúrgicos e microflora ambiental nas salas de cirurgia dos hospitais de Uberlândia, Minas Gerais. *Biosci J.* 18(1):161-74.
- Silva VO, Soares LO, Júnior AS, Mantovani HC, Chang Y, Moreiraa MAS. 2014. Biofilm formation on biotic and abiotic surfaces in the presence of antimicrobials by *Escherichia coli* isolates from cases of bovine mastites. *Appl Environ Microbiol.* 80(19):6136-45.
- Silveira DPM, Rech DL, Neto ASP, Martins ALM, Ely PB, Chem EM. 2013. Banco de Pele de Porto Alegre: produtividade e perfil dos doadores. *Rev Bras Cir Plást.* 28(1):1-103.
- Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. 2006. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin Microbiol Rev.* 19(3):512-30.
- Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS. 2015. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol.* 6:791.
- Smith K, Perez A, Ramage G, Lappin D, Gemmell CG, Lang S. 2008. Biofilm formation by Scottish clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol.* 57(Pt 8):1018-23.
- Starostin KV, Demidov EA, Bryanskaya AV, Efimov VM, Rozanov AS, Peltek SE. 2015. Identification of *Bacillus* strains by MALDI TOF MS using geometric approach. *Sci Reports.* 5:16989.
- Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods.* 40(2):175-9.
- Stephen TL, Groneck L, Kalka-Moll WM. 2010. The modulation of adaptive immune responses by bacterial zwitterionic polysaccharides. *Int J Microbiol.* 2010:917075.
- Stewart PS. 1996. Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 40(11): 2517-22.
- Stingley RL, Zou W, Heinze TM, Chen H, Cerniglia CE. 2010. Metabolism of azo dyes by human skin microbiota. *J Med Microbiol* 59(Pt 1):108-14.
- Tarale P, Gawande S, Jambhulkar V. 2015. Antibiotic susceptibility profile of bacilli isolated from the skin of healthy humans. *Braz J Microbiol.* 46(4):1111-8.
- Trampuz A, Zimmerli W. 2006. Diagnosis and treatment of infections associated with fracture-fixation devices. *Injury.* 37(2):S59-66.
- Van Baare J, Ligtoet EJ, Middlekoop E. 1998. Microbiological evaluation of glycerolized cadaveric donor skin. *Transplantation.* 65(7):966-70.
- Verbeken G, Verween G, De Vos D, Pascual B, De Corte P, Richters C, et al. 2012. Glycerol treatment as recovery procedure for cryopreserved human skin allografts positive for bacteria and fungi. *Cell Tissue Bank.* 13(1):1-7.
- Vicentino W, Rodríguez G, Saldías M, Álvarez I. 2009. Guidelines to implement quality management systems in microbiology laboratories for tissue banking. *Transplant Proc.* 41(8):3481-4.
- Wang S, Zinderman C, Wise R, Braun M. 2007. Infections and human tissue transplants: review of FDA MedWatch reports 2001-2004. *Cell Tissue Bank.* 8(3):211-9.
- Webster JP. 1944. Refrigerated skin grafts. *Ann Surg.* 120(4):431-48.
- Yates, J.R. 1998. Mass spectrometry and the age of the proteome. *J. Mass Spectrom* 33(1):1-19.
- Zaroff LI, Mills W, Duckett JW, Switzer WE, Moncrief JA. 1966. Multiple uses of viable cutaneous homografts in the burned patient. *Surgery,* 59(3):368-72.