

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Stefani Elisabete Pereira Corrêa

**HEMÓLISE, CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME E PRESENÇA DOS  
GENES *LUK-PV* E *HLG* EM *STAPHYLOCOCCUS SP. MECA* POSITIVO DE  
ISOLADOS DE PELE**

Porto Alegre

2021

Stefani Elisabete Pereira Corrêa

**HEMÓLISE, CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME E PRESENÇA DOS  
GENES *LUK-PV* E *HLG* EM *STAPHYLOCOCCUS SP. MECA* POSITIVO DE  
ISOLADOS DE PELE**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Orientadora: Prof Dr<sup>a</sup> Gertrudes Corção

Co-orientadora: Prof Dr<sup>a</sup> Mercedes Geimba

Porto Alegre

2021

### CIP - Catalogação na Publicação

Corrêa, Stefani  
HEMÓLISE, CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME E  
PRESENÇA DOS GENES LUK-PV E HLG EM STAPHYLOCOCCUS SP.  
MECA POSITIVO DE ISOLADOS DE PELE / Stefani Corrêa. --  
2021.

50 f.

Orientadora: Gertrudes Corção.

Coorientadora: Mercedes Geimba.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto  
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,  
Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. staphylococcus sp.. 2. biofilme. 3. hemólise. 4.  
resistência bacteriana. 5. pele alógena. I. Corção,  
Gertrudes, orient. II. Geimba, Mercedes, coorient.  
III. Título.

Stefani Elisabete Pereira Corrêa

**HEMÓLISE, CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME E PRESENÇA DOS  
GENES *LUK-PV* E *HLG* EM *STAPHYLOCOCCUS SP. MECA* POSITIVO DE  
ISOLADOS DE PELE**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Aprovado em: \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Me. Alexandre Kleber Silveira - UFRGS

---

Me. Aline Reis Müller - UFRGS

---

Prof. Dr<sup>a</sup> Gertrudes Corção – ICBS, UFRGS

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender.”

Marie Curie

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela presença e companhia em minha vida.

Aos meus pais, Carla e Osni pelo apoio e confiança sempre. Por acreditarem em mim e dar o suporte necessário para que meus objetivos sejam alcançados. São aqueles que recebem de braços abertos sempre e não medem esforços para que tudo fique bem. Sem eles ao meu lado em cada passo, com todo amor e afeto que possuem, tudo seria mais difícil e não teria o mesmo sentido, somente gratidão por tudo que são e que representam em minha vida.

Ao meu irmão Fernando, por me ensinar a sempre ter coragem de enfrentar a tudo e a todos. Por segurar a barra quando as coisas pareciam desmoronar e ao mesmo tempo a me tornar tão protetora quando o assunto é família.

A minha sobrinha Antonella, que mesmo tão pequena me dá forças quando atendo a uma ligação e recebo um beijo e uma gargalhada. Gestos simples que dão ânimo para seguir a rotina.

A orientadora Gertrudes Corção e Co-orientadora Mercedes Geimba pelo espaço cedido e confiança no trabalho em que realizei.

As colegas de faculdade Cíntia, Débora, Gabriela, Mila, Natasha e Thaisla por poder compartilhar meu sofrimento diário com matérias complicadas. O apoio emocional, as risadas, os choros, as noites mal dormidas estudando e os ensinamentos que recebi apenas engrandeceram o sonho que compartilhamos, de nos formar em Biomedicina numa Universidade Federal.

As colegas de laboratório pela companhia e parceria acadêmica que quero levar para vida. A Laura que me ensinou tudo desde o básico quando entrei para fazer iniciação científica e não sabia nem pipetar, agradeço a paciência e compreensão de sempre. Alexandra, Aline, Ana e Belize por cada ensinamento, cada experimento compartilhado, a troca de materiais, a troca de ideias e os laços que criamos vai além da vida profissional. A Jéssica que começou como colega de faculdade, depois colega de laboratório e sempre teve muito cuidado comigo, desde que era uma recém-chegada do interior, foste essencial para que eu não desistisse dos meus sonhos e projetos. A Camila que mesmo compartilhando pouco tempo de laboratório foi apoio nessa reta final de TCC, tirando dúvidas, emprestando materiais e me encorajando que tudo daria certo.

Aos primos Cleiton, Gabrielle e Liziane por serem inspiração e me incentivarem a ser cada vez melhor como ser humano.

Aos colegas da ação covid, projeto que sou muito grata de ter participado. Conhecer pessoas maravilhosas num período pandêmico onde um grupo de pessoas se reúne para ajudar a comunidade é de enorme satisfação. Esse é o papel do cientista, ajudar e compartilhar conhecimento em prol da comunidade. Ajudamos não somente a comunidade com a realização de testes, mas nos ajudamos mutuamente. Em especial agradeço ao Alexandre, Alexia, Carol, Gabriel Berbigier, Gabriel Ferri, João, Júlia, Simone, Thaís e Wesley pelos turnos de risadas e de muito trabalho. Ao pessoal do setor do PCR por me ceder espaço nos experimentos finais deste trabalho.

A Amanda Domingues que sempre me acolheu e foi essencial no meu trabalho. Acreditou que eu podia e daria conta de um trabalho tão audacioso em pouco tempo. Os intensivos de PCR foram melhores do que qualquer matéria em sala de aula, mas obrigada por ser essa mulher tão batalhadora e que encoraja outras pessoas, mostrou que ciência não se faz sozinha, precisamos de uma equipe que dialoga e que não mede esforços para que as coisas saiam da melhor forma. Foi minha inspiração como mulher, como profissional e como cientista.

A personal trainer Greyce Kelly por aguentar a minha cara de ranço três vezes por semana e fazer com que eu saísse relaxada após cada aula, agradeço também as massagens que foram importantes nas contraturas causadas pelo stress de final de TCC.

As amigas Priscila e Tatieli que me apoiaram incondicionalmente e que são a família que escolhi, que estão presente nos momentos de festa e também nos momentos de choro.

## RESUMO

A pele funciona como uma barreira física contra microrganismos patogênicos e quando há uma falha nessa barreira, os microrganismos ali residentes se tornam patógenos potenciais. Dentre os membros mais abundantes da comunidade bacteriana estão os *Staphylococcus sp.* que possuem uma alta capacidade de adquirir genes de resistência, formação de biofilme e produção de hemolisinas como estratégias de persistência e evasão da imunidade inata e adaptativa, aumentando a gravidade das infecções. Devido a isso, os tecidos de pele destinados a enxertos passam por tratamento com coquetéis antimicrobianos a fim de evitar a transmissão desses patógenos, mas a taxa de descarte ainda é alta por contaminação bacteriana persistente ou com microrganismos não aceitáveis, como o *Staphylococcus aureus*. O presente trabalho buscou caracterizar a capacidade de formação de biofilme em 23 cepas de *Staphylococcus mecA* positivos coagulase positivos e coagulase negativos de amostras de pele alógenas e da comunidade sadia, analisá-los fenotipicamente, classificar o padrão de hemólise dos genes das leucotoxinas Pantón-Valentine Leucocidin (PVL) e gama-toxina (HLG), que juntos tem a capacidade de lisar leucócitos e eritrócitos pela formação de poros transmembrana aumentando a toxicidade das bactérias e gravidade das infecções. 91.3% dos 23 isolados apresentou capacidade de formação de biofilme, apenas 3 (13,04%) apresentaram hemólise total (beta-hemólise) em ágar sangue, enquanto o restante apresentou ausência de lise, caracterizando uma gama-hemólise. Não foi possível realizar a detecção dos genes *Luk-PV* (PVL) e *hlg* nas cepas analisadas. Os resultados fenotípicos encontrados corroboram com a hipótese de que microrganismos no estado de biofilme contribuem para a persistência da contaminação microbiana e que *Staphylococcus coagulase-negativa* também podem apresentar padrão beta-hemolítico, promovendo a evasão do microrganismo do sistema imune do hospedeiro, e assim, permitindo a sobrevivência do patógeno ou gama hemólise, que pode contribuir para a gravidade das infecções. Tais informações são importantes pois indivíduos da comunidade sadia são potenciais doadores e os pacientes receptores de peles alógenas são considerados imunocomprometidos assim, a presença de características como formação de biofilme e produção de gama hemólise entre bactérias da microbiota da pele podem contribuir para infecções graves.

Palavras chaves: *Staphylococcus sp.*; biofilme; hemólise; resistência bacteriana; pele alógena;



## ABSTRACT

The skin tissue acts as a physical barrier against pathogenic microorganisms, and when this barrier fails, the microorganisms residing there become potential pathogens. Among the most abundant members of the bacterial community are *Staphylococcus sp.* which have a high capacity to acquire resistance genes, biofilm formation and hemolysin production as strategies for persistence and evasion of innate and adaptive immunity, increasing the severity of infections. Because of this, skin tissues destined for grafts undergo treatment with antimicrobial cocktails in order to prevent the transmission of these pathogens, but the discard rate is still high due to persistent bacterial contamination or with unacceptable microorganisms, such as *Staphylococcus aureus*. The present study aimed to characterize the capacity of biofilm formation in 23 coagulase positive and coagulase negative *Staphylococcus mecA* positive strains from skin allograft and from healthy community, to analyze them phenotypically, classify the hemolysis pattern of the Pantone-Valentine Leucocidin (PVL) and gamma-toxin (Hlg) leukotoxin genes, which together have the ability to lyse leukocytes and erythrocytes by forming transmembrane pores, increasing bacterial toxicity and severity of infections. 91.3% of the 23 isolates showed the ability to form biofilm, only 3 (13.04%) showed total hemolysis (beta-hemolysis) on blood agar, while the rest showed no lysis, characterizing a gamma-hemolysis. It was not possible to detect the Luk-PV (PVL) and hlg genes in the analyzed strains. The phenotypic results found corroborate the hypothesis that microorganisms in the contribute to the persistence of microbial contamination and that coagulase-negative *Staphylococcus* can also present a beta-hemolytic pattern, promoting the evasion of the microorganism from the host's immune system, and thus, allowing survival of the pathogen or gamma hemolysis, which can contribute to the severity of infections. Such information is important because individuals from the healthy community are potential donors and patients receiving allogeneic skin are considered immunocompromised, the presence of characteristics such as biofilm formation and production of gamma hemolysis among skin microbiota bacteria can contribute to serious infections.

Keywords: *Staphylococcus sp.*; biofilm; hemolysis; microbial resistance; skin allograft;

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Microrganismos aceitáveis e não aceitáveis durante o processamento inicial em banco de pele .....	11
--	----

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO COMPREENSIVA.....</b>	<b>11</b>
1.1	MICROBIOMA DE PELE HUMANA E BANCO DE PELE.....	11
1.2	BIOFILME.....	15
1.3	LEUCOTOXINAS.....	16
<b>1.3.1</b>	<b>Panton-Valentine Leucocidina (PVL).....</b>	<b>16</b>
<b>1.3.2</b>	<b>Gama-toxina (<math>\gamma</math>-hemolisina) .....</b>	<b>17</b>
1.4	ESPÉCIES DE <i>STAPHYLOCOCCUS</i> UTILIZADAS NESTE ESTUDO.....	18
1.5	JUSTIFICATIVA .....	20
1.6	OBJETIVOS.....	21
<b>1.6.1</b>	<b>Objetivo geral .....</b>	<b>21</b>
<b>1.6.2</b>	<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>40</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>41</b>
	<b>ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA DA SOCIEDADE</b>	
	<b>BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL .....</b>	<b>45</b>

# 1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA

## 1.1. MICROBIOMA DE PELE HUMANA E BANCO DE PELE

A pele é o maior órgão e o mais exposto do corpo humano, funcionando como uma barreira física na proteção contra microrganismos patogênicos (SANFORD; GALLO, 2013). Este órgão é colonizado por uma população mista comensal de maioria não patogênica, que em condições predisponentes do indivíduo ou do meio externo podem atuar como patógenos oportunistas. A composição dos microrganismos presentes na pele humana difere de acordo com a fisiologia do local a ser estudado, de modo que os microambientes úmidos possuem uma taxa bacteriana maior das espécies de *Staphylococcus* (MADIGAN, et al., 2016).

Os microrganismos comensais presentes na pele humana podem atuar inibindo o crescimento de patógenos através da competição por nutrientes e espaço, produzindo compostos antimicrobianos, como as bacteriocinas, que interferem no crescimento do patógeno, mas não nos microrganismos que as produzem. Assim, mantém-se a homeostase local (SANFORD; GALLO, 2013). Quando há um distúrbio na homeostase entre comensais e patógenos ou há uma falha na barreira física, podem ocorrer doenças de pele ou sistêmicas causadas por microrganismos residentes da pele que agem oportunamente (BYRD; BELKAID; SEGRE, 2018). Dos membros mais abundantes da comunidade bacteriana oportunista estão os *Staphylococcus coagulase-negativa* (CoNS), as duas espécies mais relevantes na clínica atualmente, por serem os principais causadores de sepse são: *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus haemolyticus* (CHEUNG et al., 2014), mas as espécies *Staphylococcus capitis* e *Staphylococcus saprophyticus* também vêm surgindo como patógenos oportunistas significativos (ARGEMI et al., 2019; FERNANDES et al., 2020). Já o grupo dos *Staphylococcus coagulase-positiva* (CoPS) com influência na microbiota de pele humana tem como representante o *Staphylococcus aureus* (LIMA et al., 2015).

*Staphylococcus aureus* coloniza persistentemente a cavidade nasal de 20% da população e aparece ocasionalmente em cerca de 60% (CRUZ et al., 2021; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017). É a espécie mais patogênica dos *Staphylococcus* e está frequentemente associada com infecções de pele (CHEUNG et al., 2014). Classificado em um grupo capaz de apresentar a enzima coagulase (MADIGAN et al., 2016), uma enzima de coagulação do sangue, o *S. aureus* apresenta diversos mecanismos de resistência (CHEUNG; DUONG; OTTO, 2012; CROSBY; KWIECINSKI; HORSWILL, 2016; CRUZ et al., 2021), como a produção de toxinas e formação de biofilme. A maioria das cepas apresenta

multirresistência pela aquisição de elementos genéticos móveis, a exemplo da resistência à meticilina (MRSA) e aos antimicrobianos beta-lactâmicos que são causadas principalmente pelos genes *mecA* (KITTI et al., 2019) e *blaZ*. Estes dois genes possuem mecanismos genéticos distintos, mas podem interagir entre si (OLSEN; CHRISTENSEN; AARESTRUP, 2006). Inicialmente *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina adquirido no hospital (HA-MRSA) estava restrito a esse ambiente, mas nas últimas duas décadas, novas cepas surgiram fora desse limite e foram chamadas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina adquirido na comunidade (CA-MRSA), (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014; CHEUNG et al., 2014).

Os *Staphylococcus coagulase-negativa* (CoNS) são os principais colonizadores da pele e muito conhecidos pelo papel benéfico que desempenham na prevenção da expansão de potenciais patógenos na pele, através da competição (AHLE et al., 2021). Esses organismos podem agir como patógenos oportunistas mesmo com menos fatores de virulência do que o *S. aureus* e podem vir a causar infecções. Estão principalmente associados ao uso de cateteres e corpos estranhos devido a capacidade de formação de biofilme, estratégias de persistência e evasão da imunidade inata e adaptativa (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014). Os CoNS são patógenos multirresistentes emergentes (SOUMYA et al., 2017), com capacidade de adquirir genes de resistência a antibióticos (HEILMANN; ZIEBUHR; BECKER, 2019) como à meticilina, beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e macrolídeos, trazendo dificuldades ao tratamento dessas infecções (SOUMYA et al., 2017).

*Staphylococcus epidermidis* é o colonizador de pele mais frequente em humanos (OTTO, 2009), pode ser isolado de todos os microambientes deste órgão (BROWN; HORSWILL, 2020) e é o CoNS mais prevalente em amostras de infecções relacionadas a próteses e dispositivos médicos. Alguns autores sugerem que o arsenal de mecanismo de resistência de *S. epidermidis* aumenta devido a transferência horizontal de genes entre esta espécie e de *S. aureus* (ARGEMI et al., 2019). O *S. epidermidis* possui capacidade de produção de biofilme e desta forma, dificulta a resposta imune e a estimulação de uma resposta por citocinas anti-inflamatórias (NATSIS; COHEN, 2018).

*Staphylococcus haemolyticus* é frequentemente encontrado nas axilas e áreas inguinais (NATSIS; COHEN, 2018), é o segundo CoNS mais relacionado a infecções e sepse (CHEUNG et al., 2014). Possui algumas enzimas, citolisinas e substâncias de superfície que contribuem com a sua virulência embora nenhuma delas seja um fator determinante, a facilidade de adquirir multirresistência contra os agentes antimicrobianos disponíveis é o mais importante (CZEKAJ; CISZEWSKI; SZEWCZYK, 2015). Além disso, contém cepas com

alto grau de resistência à meticilina, presença de citotoxinas, enterotoxinas e modulinas solúveis em fenol (PSMs) (ARGEMI et al., 2019).

*Staphylococcus capitis* é visto principalmente na cabeça (VON EIFF; PETERS; HEILMANN, 2002), sendo um CoNS encontrado em infecções relacionadas a dispositivos médicos implantados e várias situações clínicas importantes como sepse neonatal. Já foi identificado genes reguladores de virulência relacionados à produção de biofilme, exoenzimas, PSMs e multirresistência a antimicrobianos (ARGEMI et al., 2019).

O *Staphylococcus saprophyticus* é frequentemente encontrado na região perineal. Mulheres jovens têm mais susceptibilidade à colonização do trato urinário inferior por *S. saprophyticus*, que pode levar ao desenvolvimento de uma infecção (ARGEMI et al., 2019), e esta pode estar associada a influências hormonais relacionadas ao período menstrual (RAZ; COLODNER; KUNIN, 2005). Como membro dos CoNS, o *S. saprophyticus* possui capacidade de produção de biofilme e carrega genes de resistência à meticilina e outros antibióticos adquiridos por transferência horizontal de genes (SOUMYA et al., 2017).

Visto que os *Staphylococcus* da microbiota de pele humana representam perigo em situações já apontadas, como em pacientes que utilizam próteses e dispositivos médicos, eles também apresentam risco em enxertos de pele alógena humana (FORSELL; LIESMAN, 2000). No Brasil, a pele alógena humana é obtida através de doadores falecidos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021) e seu uso para enxertia tem como objetivo o fechamento temporário de feridas crônicas e queimaduras de segundo e terceiro grau (GAUCHER et al., 2016; GUPTA et al., 2019; PIRNAY et al., 2012). O aloenxerto apresenta benefícios como a diminuição da perda de água, eletrólitos e proteínas ajudando a manter a homeostase, proteção temporária contra infecções, redução da dor, acelera a reepitelização e proporciona um maior bem-estar psicológico do paciente receptor além de ser economicamente viável (MATHUR; DE; GORE, 2009; OBENG et al., 2001; PIANIGIANI et al., 2016; PIRNAY et al., 2012). A falta de doadores e o potencial risco de infecções por patógenos no tecido são limitações ao uso desse procedimento (GAUCHER et al., 2016; GUPTA et al., 2019).

Os bancos de pele foram criados com intuito de garantir um maior controle de qualidade e segurança, bem como o armazenamento desses tecidos (JOHNSTON et al., 2016). As normas e diretrizes adotadas diferem em cada país, no Brasil são regulamentadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e Ministério da Saúde (MATHUR et al., 2006). Desta forma, os bancos de pele ao redor do mundo possuem uma variedade de critérios para seleção dos tecidos aceitos e métodos de processamento (GAUCHER et al., 2016). A contaminação microbiana representa um dos principais motivos de descartes de tecidos dos

bancos de pele alógenas (GAUCHER et al., 2015), pois ainda que sejam aplicados protocolos de descontaminação eles nem sempre são eficazes na desinfecção desses tecidos. Para que haja uma diminuição na taxa de descarte, mas mantendo a segurança do enxerto, foi desenvolvido estratégias de triagem microbiológica na etapa inicial que analisa e discrimina os organismos aceitáveis dos não aceitáveis (tabela 1). Peles com organismos classificados como não aceitáveis são descartadas, já aquelas com organismos classificados como aceitáveis são submetidas a um tratamento com antimicrobianos, com o objetivo de eliminar todos os microrganismos e, assim, a enxertia possa ser realizada (VICENTINO *et al.*, 2009).

**Tabela 1. Microrganismos aceitáveis e não aceitáveis durante o processamento inicial em banco de pele.**

<b>Microrganismos Aceitáveis</b>	<b>Microrganismos Não Aceitáveis</b>
<i>Staphylococcus coagulase-negativa</i>	Bacilos Gram-negativos aeróbicos ou anaeróbicos
<i>Propionibacterium</i> sp.	Cocos Gram-negativos
<i>Corynebacterium</i> sp.	<i>Clostridium</i> sp.
<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Bacillus anthracis</i>
<i>Streptococcus</i> alfa hemolíticos	<i>Streptococcus pyogenes</i> beta hemolítico
Cocos Gram-positivos anaeróbicos	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Bacillus</i> sp. (não <i>B. anthracis</i> )	<i>Enterococcus</i> sp.
	Fungos Filamentosos
	Leveduras

Fonte: VICENTINO et al., 2009

Localizado no Complexo Hospitalar Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, o Banco de pele Dr. Roberto Corrêa Chem foi o segundo a ser criado no Brasil, embora o único em funcionamento até o ano de 2012 (SILVEIRA *et al.*, 2013). Assim como os demais bancos de pele ao redor do mundo, o número baixo de doações faz com que o máximo possível de pele captada seja aproveitada e uma vez que a contaminação microbiana persistente é uma grande preocupação, faz-se necessária pensar em metodologias capazes de reduzir a taxa de descarte (MENEGETTI, 2018).

## 1.2. BIOFILME

A persistência da contaminação bacteriana na pele alógena que passou por um tratamento inicial com os protocolos de descontaminação, assim como aqueles aderidos a implantes e dispositivos médicos deve-se a apresentação desses microrganismos no estado de biofilme. Biofilmes são compostos multicelulares que se fixam em superfícies bióticas ou abióticas, onde as células bacterianas aderem-se umas nas outras, sendo embebidas por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS); formam agregados e estes, por sua vez, uma estrutura 3D (FRANÇA *et al.*, 2021). Sua composição depende de fatores como temperatura, pressão, pH, oxigênio e composição dos nutrientes (GOMES, 2011).

O desenvolvimento do biofilme ocorre em três estágios principais: (I) adesão ou fixação a uma superfície, (II) maturação em uma estrutura multicelular complexa e (III) dispersão de células no ambiente circundante (FRANÇA *et al.*, 2021).

O primeiro estágio é a aderência de células de flutuação livre a uma superfície, esta ligação pode ser auxiliada por flagelos, pílís e proteínas de superfície (MACIA; ROJO-MOLINERO; OLIVER, 2014), mas também pode ocorrer através de forças físicas como as forças de van der Waal e interações eletrostáticas (JAMAL *et al.*, 2018). Nos *Staphylococcus*, há o estabelecimento de interações não covalentes das proteínas ligadas à superfície com as proteínas do hospedeiro, que podem revestir a superfície de dispositivos médicos (LE *et al.*, 2014).

Para que aconteça uma diferenciação das bactérias do estado planctônico em comunidades complexas como o biofilme é preciso uma sinalização célula-célula, que é regulada pelo sistema *quorum-sensing*. Este sistema tem por função regular a densidade populacional celular e induzir mudanças na transcrição gênica (MACIA; ROJO-MOLINERO; OLIVER, 2014). Sendo assim, os microrganismos presentes no biofilme apresentam fisiologia e transcrição de genes diferente de quando estavam no estado planctônico (LINDSAY; VON HOLY, 2006), juntamente com uma taxa de crescimento alterado (GOMES, 2011). O comportamento adotado por essa comunidade estruturada de células, serve como uma estratégia de adaptação mais eficiente na sobrevivência em ambientes hostis (MACIA; ROJO-MOLINERO; OLIVER, 2014) e oferece proteção contra defesas do organismo (OTTO, 2009).

Após a fixação das células bacterianas a uma superfície, o biofilme se multiplica e há a agregação de estruturas multicelulares. A maturação ocorre com a produção de uma matriz de



substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que envolve os agregados e forma uma estrutura 3D (FRANÇA *et al.*, 2021; LE *et al.*, 2014; OTTO, 2009). Desta forma, a matriz extracelular é composta por polissacarídeos, proteínas, fosfolipídios, ácidos nucleicos, água e microrganismos, principalmente bactérias (SUTHERLAND, 2001). A matriz EPS tem como função a manutenção do biofilme, impedindo ou retardando a ação de biocidas e outros agentes antimicrobianos, fazendo com que estes não atinjam os microrganismos presentes no interior do biofilme (GOMES, 2011). A espessura e a composição da matriz EPS dificultam a penetração e difusão dos antibióticos. Para que a estrutura do biofilme seja formada são necessárias forças adesivas e disruptivas. As forças adesivas atuam na interação célula-célula e na aderência a superfícies; as forças disruptivas são responsáveis pela formação de canais, por onde serão entregues nutrientes às células presentes nas camadas do interior do biofilme (FRANÇA, A. *et al.*, 2021).

A última etapa do desenvolvimento do biofilme é determinada pelo desprendimento de aglomerados que entram na circulação e levam a disseminação da infecção com o início de um novo ciclo (LE *et al.*, 2014). As forças disruptivas também atuam nessa etapa em que ocorre o desprendimento do biofilme (FRANÇA *et al.*, 2021).

As comunidades que compõem o biofilme são representadas por células heterogêneas e com estados fisiológicos diferentes. Aquelas dispostas nas camadas superiores tem mais acesso a nutrientes e oxigênio, em comparação com aquelas presentes nas camadas mais profundas. Por isso, surgem subpopulações variantes de células, as camadas externas são aeróbicas e metabolicamente ativas, as internas se tornam anaeróbicas e com uma taxa de crescimento reduzido devido a deficiência de nutrientes. Essas variantes dormentes que surgem, são denominadas “persistentes” e são altamente tolerantes a antibióticos, pois fluoroquinolonas,  $\beta$ -lactâmicos e aminoglicosídeos não são ativos em condições anaeróbicas e a maioria dos antibióticos se mostra mais eficaz nas células que se dividem rapidamente. Quando o estresse é removido as células persistentes retomam o crescimento e podem causar uma recaída da infecção (FRANÇA *et al.*, 2021; MACIA; ROJO-MOLINERO; OLIVER, 2014).

### 1.3 LEUCOTOXINAS

#### 1.3.1 Panton-Valentine Leukocidin (PVL)

Panton-Valentine Leukocidin é uma toxina constituída por dois genes, LukS-PV e LukF-PV, que são carregados em bacteriófagos lisogênicos. Cada um desses dois genes

codifica uma proteína que é co-transcrita e secretada, para que depois, essas duas proteínas formem uma leucocidina heptavalente completa (DARBOE *et al.*, 2019; SHALLCROSS *et al.*, 2013).

A PVL causa danos nas membranas das células de leucócitos polimorfonucleares humanas (PMN) e macrófagos, e por essa razão, é conhecida por ser uma toxina formadora de poros nas membranas dos leucócitos e necrose tecidual. Em consequência da formação de poros, há um aumento da permeabilidade da membrana que resulta na lise celular. Quando em altas concentrações, essa leucotoxina leva a lise dos PMN, já em baixas concentrações uma nova via de apoptose dos PMN é ativada decorrente de uma ligação direta a membrana mitocondrial. A necrose tecidual pode ser desencadeada de duas formas, como resultado da liberação de espécies reativas de oxigênio pelos PMN lisados ou pela liberação de grânulos que ativam a resposta inflamatória, que também são liberados pelos PMN lisados (DARBOE *et al.*, 2019; FAVILLA, 2017; PARK *et al.*, 2008; ZHANG; GUO; CHU, 2018).

A toxina PVL foi inicialmente associada à *S. aureus* resistente à meticilina adquirido na comunidade (CA-MRSA), mas algumas dessas cepas não carregam os genes de PVL. Além disso, carregar o gene de virulência não indica que a toxina vai ser expressa. Sabendo que o gene normalmente está contido no genoma de bacteriófagos, o fago pode inserir o seu DNA na bactéria e, desta forma, uma bactéria que não carregava o gene passa a ter e ser capaz de produzir a toxina. Alguns lugares como Grã-Bretanha e França possuem regimes terapêuticos regulamentados com base na existência ou não de PVL, já que muitos estudos relatam a existência de uma associação entre PVL e doença invasiva, tratando a toxina como um marcador epidemiológico de uma síndrome de infecção grave (FAVILLA, 2017; SHALLCROSS *et al.*, 2013; ZHANG; GUO; CHU, 2018).

Como se sabe, pode ocorrer a transferência horizontal de genes entre cepas estafilocócicas, resultando na capacidade de adquirir resistência à ação de múltiplos antibióticos. No caso da transferência dos genes de PVL, as cepas estafilocócicas podem adquirir a capacidade de causar danos aos glóbulos brancos que são responsáveis pelas respostas de defesa contra substâncias estranhas ou agentes infecciosos (IGBINOSA *et al.*, 2016).

### **1.3.2 Gama-toxina ( $\gamma$ -hemolisina)**

As hemolisinas são classificadas em quatro tipos, sendo elas do tipo: alfa, beta, gama e delta. A gama-hemolisina é a menos documentada pois é inibida pelo ágar e, assim, quando o teste para hemólise em placas de sangue é realizado, sua presença é perdida. Desta forma, a

ideia de que esta toxina seja um possível determinante de virulência em doenças causadas por *Staphylococcus* foi ignorada (CLYNE; BIRKBECK; ARBUTHNOTT, 1992, 1992; COONEY *et al.*, 1993).

A gama-hemolisina é uma toxina produzida por 99% das cepas de *S. aureus* em contraste com a PVL que é produzida por aproximadamente 3%. Codificada pelo gene *hlg*, tem ação pró-inflamatória apresentando capacidade de lisar eritrócitos e leucócitos pela formação de poros transmembrana, o que pode aumentar a toxicidade e resistência das bactérias, e desta forma, a gravidade das infecções (BIERDEMAN *et al.*, 2017; DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000).

O locus da toxina  $\gamma$  expressa três proteínas, duas delas são componentes da classe S (HlgA e HlgC) e uma é componente da classe F (HlgB). Assim sendo, esse locus permite que dois pares funcionais de proteínas seja formado, com um componente da classe S e outro da classe F: (HlgA + HlgB) e (HlgC + HlgB). Além desses dois pares funcionais, as proteínas expressas pelo locus da toxina  $\gamma$  podem interagir com as proteínas da PVL e ter uma ação sinérgica, as três combinações possíveis são: (LukS-PV + HlgB), (LukF-PV + HlgA) e (LukF-PV + HlgC). Contando os cinco pares aqui mencionados juntamente com o par das proteínas da PVL (LukS-PV + LukF-PV), são seis combinações possíveis e capazes de lisar leucócitos. Dentre elas: (LukF-PV + HlgA), (HlgA + HlgB) e (HlgC + HlgB) têm alta atividade hemolítica, as demais até apresentam atividade hemolítica mas muito mais baixa (BIERDEMAN *et al.*, 2017; DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000; FERRERAS *et al.*, 1998; MESRATI *et al.*, 2010; SUPERSAC *et al.*, 1998).

#### 1.4 ESPÉCIES DE *STAPHYLOCOCCUS* UTILIZADAS NESTE ESTUDO

As cepas de *Staphylococcus* utilizadas neste trabalho foram isolados em dois estudos anteriores. O primeiro estudo isolou bactérias a partir de peles alógenas que foram descartadas, devido a contaminação microbiana por microrganismos persistentes ou considerados inaceitáveis, pelo Banco de Pele Dr. Roberto Corrêa Chem do Complexo Hospitalar Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre – RS. Este estudo foi analisado e aprovado 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) (MENEGETTI, 2018). O segundo estudo isolou bactérias de pessoas sadias da comunidade, com coletas realizadas em regiões similares

aquelas de onde são retiradas as peles alógenas de doadores falecidos, compreendidas pela região média do abdome e região superior das costas (HAIN, 2017).

No presente estudo foram incluídas espécies do gênero *Staphylococcus* que apresentassem o gene *mecA*, identificadas e tipificadas previamente para SCCmec (*Staphylococcal cassette chromosome mec*) e com perfil de resistência determinado. As espécies foram: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. capitis* e *S. saprophyticus*. provenientes de isolados das amostras coletadas de peles alógenas e da comunidade.

O gene *mecA* codifica uma proteína de ligação à penicilinase (PBP2a) de parede celular e que não possui afinidade pelo anel  $\beta$ -lactâmico, causando uma alteração no sítio de ligação do antibiótico. Sendo assim, a presença do gene *mecA* confere aos microrganismos resistência a todos os tipos de  $\beta$ -lactâmicos: penicilinas, penicilinas semi-sintéticas e resistentes a penicilinases, aztreonam, carbapenens e cefalosporinas (HARKINS *et al.*, 2017).

SCCmec é um elemento genético móvel no qual o gene *mecA* está inserido, confere resistência à meticilina e carrega recombinases local-específicas (complexo *ccr*) que são responsáveis pela mobilidade deste elemento. Existem cinco alotipos do complexo *ccr* (1, 2, 3, 4 e 5), as diferentes combinações desses alotipos geram vários tipos de SCCmec que são classificadas por algoritmos romanos (tipos I, II, III, IV, V, VI, VII e VIII), resultando em diferentes graus de susceptibilidade (REITER, 2009). Os tipos I, II e III estão mais associados com cepas HA-MRSA, possuem os maiores cassetes e são caracterizados por apresentar outros genes de resistência, como para antibióticos não  $\beta$ -lactâmicos e metais pesados. Os tipos IV e V são mais encontrados em cepas CA-MRSA, que carregam somente o gene *mecA* (GHAZNAVI-RAD *et al.*, 2010; GOMEZ *et al.*, 2014; HAJIAHMADI *et al.*, 2017).

## 1.5 JUSTIFICATIVA

Considerando que as contaminações bacterianas persistentes ocorrem devido a apresentação de microrganismos no estado de biofilme e que as hemolisinas podem aumentar a toxicidade e resistência das bactérias e, desta forma, a gravidade das infecções, é essencial saber se elas estão presente em amostras de peles alógenas e da comunidade. Ressalta-se que os microrganismos presentes no biofilme podem compartilhar genes de resistência, cepas que inicialmente não apresentavam o gene de transcrição das hemolisinas podem passar a expressar. Por isso torna-se necessário identificar a capacidade de microrganismos formar biofilmes e classificar o padrão de hemólise em amostras de peles alógenas.

## 1.6 OBJETIVOS

### 1.6.1 Objetivo geral

Verificar a capacidade de formação de biofilme, hemólise e identificar a presença dos genes *Luk-PV* (PVL) e *hlg* em espécies de *Staphylococcus* isolados de peles alógenas descartadas do Banco de Pele Dr. Roberto Corrêa Chem do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre – RS e de pele de pessoas sadias da comunidade.

### 1.6.2 Objetivos específicos

Caracterizar a capacidade de aderência à superfície dos isolados, por meio da quantificação de formação de biofilme pelo método do cristal violeta em microplaca.

Avaliar a produção de hemólise em ágar sangue, classificadas em alfa, beta e gama.

Amplificar os genes *Luk-PV* (PVL) e *hlg* nas cepas de *Staphylococcus sp.*

## 2 ARTIGO CIENTÍFICO

### **HEMÓLISE, CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME E PRESENÇA DOS GENES *LUK-PV* E *HLG* EM *STAPHYLOCOCCUS SP.* MECA POSITIVO DE ISOLADOS DE PELE**

Stefani Corrêa<sup>1</sup>, Mercedes Geimba<sup>1</sup>, Gertrudes Corção<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Sarmento Leite 500, 90050-170, Porto Alegre, Brasil

#### RESUMO

#### INTRODUÇÃO

A patogênese de *Staphylococcus sp.* oportunistas é mediada por diversos fatores de virulência, dentre eles a formação de biofilme causando persistência desses organismos e a produção de hemolisinas que são capazes de lesar a membrana externa de células-alvo aumentando a gravidade das infecções. Este estudo tem por objetivo analisar a capacidade de formação de biofilme, a presença de hemólise em isolados de tecidos de pele alógena e de pessoas saudas da comunidade, a presença dos genes *Luk-PV* (Panton-Valentin Leucocidin) e *hlg* (gamma-toxina).

#### MÉTODOS

As 23 cepas de *Staphylococcus* de peles alógenas e de pessoas saudas da comunidade foram previamente isoladas e identificadas por MALDI-TOF. Foi realizado a caracterização dos isolados bacterianos quanto à capacidade de formação de biofilme pelo método do cristal violeta, análise fenotípica da hemólise em ágar sangue e padronização de reações de PCR para amplificação dos genes *Luk-PV* (Panton-Valentin Leucocidin) e *hlg* (gamma-toxina).

#### RESULTADOS

91,3% dos isolados apresentaram capacidade de formação de biofilme e foram classificados. 3 isolados apresentaram hemólise total (beta-hemólise) e 20 apresentaram ausência de lise, caracterizando uma gama-hemólise.

## CONCLUSÃO

Nossos resultados corroboraram com a hipótese de estudos anteriores, que microrganismos no estado de biofilme é um dos fatores contribuintes para a persistência da contaminação microbiana. Os CoNS também podem apresentar padrão beta-hemolítico, promovendo a evasão do microrganismo do sistema imune do hospedeiro, e assim, permitindo a sobrevivência do patógeno.

## INTRODUÇÃO

Colonizada por uma população mista comensal de maioria não patogênica, a pele funciona como uma barreira física contra microrganismos patogênicos<sup>1</sup>. Quando há um distúrbio na homeostase entre comensais e patógenos ou há uma falha na barreira física, podem ocorrer doenças de pele ou sistêmicas causadas por microrganismos residentes da pele que agem oportunamente<sup>2</sup>. Dos membros mais abundantes da comunidade bacteriana oportunista estão os *Staphylococcus coagulase-negativa* (CoNS) como: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus capitis* e *Staphylococcus saprophyticus*<sup>3-4</sup>. Já a espécie mais patogênica dos *Staphylococcus* frequentemente associada com infecções de pele é um *Staphylococcus coagulase positiva* (CoPS), o *Staphylococcus aureus*<sup>5-4</sup>.

As infecções causadas por esses microrganismos estão principalmente associadas ao uso de catéteres e corpos estranhos, devido a capacidade de adquirir genes de resistência, formação de biofilme, estratégias de persistência e evasão da imunidade inata e adaptativa<sup>6-7</sup>.



Diante disso, os *Staphylococcus* da microbiota de pele humana também apresentam risco em enxertos de pele alógena<sup>8</sup>.

No Brasil, a pele alógena humana é obtida através de doadores falecidos<sup>9</sup> e seu uso para enxertia tem como objetivo o fechamento temporário de feridas crônicas e queimaduras de segundo e terceiro grau<sup>10-11-12</sup>. Como limitações ao uso dessa técnica tem a falta de doadores e o potencial risco de infecção por patógenos no tecido<sup>10-11</sup>. A persistência da contaminação bacteriana na pele alógena que passou por um tratamento inicial com os protocolos de descontaminação, assim como aqueles aderidos a implantes e dispositivos médicos deve-se a apresentação desses microrganismos no estado de biofilme<sup>13</sup>. O comportamento adotado por essa comunidade estruturada de células, serve como uma estratégia de adaptação mais eficiente na sobrevivência em ambientes hostis<sup>14</sup> e oferece proteção contra defesas do organismo<sup>15</sup>.

A patogênese desses *Staphylococcus* oportunistas é mediada por diversos fatores de virulência, dentre eles capacidade de formação de biofilme e a produção de hemolisinas que são capazes de lesar a membrana externa de células-alvo aumentando a gravidade das infecções<sup>16</sup>. Este estudo tem por objetivo analisar a capacidade de formação de biofilme, a presença de hemólise e a presença dos genes *Luk-PV* (PVL) e *hlg* em cepas de *Staphylococcus* de tecidos de pele alógena e de pessoas sadias da comunidade.

## MÉTODOS

### Aspectos éticos

As amostras utilizadas neste trabalho são provenientes de dois estudos anteriores. O primeiro estudo, com amostras de pele alógena que seriam descartadas do banco de pele Dr. Roberto Corrêa Chem, da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, foi analisado e

aprovado 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). A remoção e doação da pele dos doadores falecidos foi autorizada por parentes próximos. Os tecidos requisitados para pesquisa foram solicitados e autorizados pela chefia responsável do Banco de Pele Dr. Roberto Corrêa Chem, do Complexo Hospitalar Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre<sup>17</sup>.

O segundo estudo isolou bactérias de pessoas saudáveis da comunidade e essas amostras foram coletadas mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CAAE 52049415.0.0000.5347; número do parecer: 1.455.204)<sup>18</sup>.

#### Cepas bacterianas utilizadas no estudo

No presente estudo foram incluídas espécies do gênero *Staphylococcus* que apresentam o gene *mecA*, previamente identificadas e tipificadas para SCCmec (Staphylococcal cassette chromosome mec) e com perfil de resistência determinado em estudo prévio<sup>18</sup>. As espécies foram: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. capitis* e *S. saprophyticus* provenientes de isolados das amostras coletadas de peles alógenas (n=19) e da comunidade (n=4). Os isolados de amostras de pele alógena foram obtidos a partir de 32 lotes de pele coletados de 28 doadores, estas amostras seriam descartadas devido a contaminação microbiana por microrganismos persistentes ou inaceitáveis. Os isolados de amostras da comunidade foram obtidos a partir de 30 pessoas saudáveis, estas amostras foram coletadas em regiões similares às aquelas de onde são retiradas as peles alógenas de doadores falecidos, compreendidas pela região média do abdome e região superior das costas.

Como controles positivos para identificação das leucotoxinas foram utilizadas as cepas ATCC *S. aureus* 25923 para PVL e ATCC *S. aureus* N315 para  $\gamma$ -toxina, gentilmente

cedidas pelo laboratório de Microbiologia Clínica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Como controle positivo para formação de biofilme foi utilizado a cepa ATCC *S. epidermidis* 35984.

Os isolados selecionados para este estudo foram incubados em caldo BHI (Brain-Heart Infusion - Infusão cérebro-coração) por 24h a 37°C. Posteriormente, os isolados que apresentaram turbidez foram semeados em ágar sal manitol, incubados por 24h a 37°C. Após foi realizado o método de coloração de Gram para verificar a pureza da colônia.

A identificação das cepas foi confirmada através da técnica de MALDI-TOF MS (*Matrix-assisted laser desorption ionization - time of flight mass spectrometry*), utilizando o equipamento Microflex Biotyper 4.0 (Bruker), com reagentes e técnicas de análise, direta ou por extração, de acordo com especificações do fabricante.

#### Caracterização dos isolados bacterianos quanto à capacidade de formação de biofilme

Os 23 isolados bacterianos foram semeados em Ágar Triptona de Soja (TSA) e incubados a 37°C por 24h. Em seguida, cada isolado foi ajustado a turbidez 0,5 da escala McFarland em salina 0,9% estéril, 20 µL destas suspensões foram adicionadas em octoplicata juntamente com 180 µL de Caldo Soja Tripticaseína (TSB) em placas de cultura de tecidos de poliestireno de 96 poços e fundo plano. Como controle positivo foi utilizado 20 µL da cepa ATCC *S. epidermidis* 35984 suspensa em salina e 180 µL de caldo TSB. Já o controle negativo é composto por 200 µL de caldo TSB. Após, a placa de 96 poços foi incubada a 37°C por 24h.

Posteriormente, os poços foram aspirados e lavados três vezes com 300 µL de solução salina estéril e a placa levemente agitada, para que sejam removidas as bactérias não aderentes. As células que permaneceram aderidas ao fundo plano da placa e/ou às paredes, foram fixadas com 200 µL de metanol 99%. Depois de 15 minutos em temperatura ambiente,

as placas foram esvaziadas e deixadas para secar. Logo depois, a coloração dos poços foi realizada com 200  $\mu$ L do corante cristal violeta a 2% por 5 minutos. A placa foi lavada com água destilada corrente para que o excesso de corante fosse retirado e a placa deixada para secar. Ao final, o corante foi solubilizado com 160  $\mu$ L de etanol a 100% e foi realizada a leitura da densidade óptica (OD) de cada poço em espectrofotômetro em comprimento de onda de 570 nm.

Para classificação dos biofilmes foi utilizado 4 categorias de acordo com os valores de OD dos biofilmes bacterianos. A OD ponto de corte (ODc) foi determinada pelo valor resultante de três desvios padrão acima da média da OD do controle negativo, que é composto apenas pelo caldo TSB. A partir daí, a interpretação dos resultados foi classificada como: não aderente  $OD \leq ODc$ ; fracamente aderente  $ODc < OD < 2 \times ODc$ ; moderadamente aderente  $2 \times ODc < OD < 4 \times ODc$ ; fortemente aderente  $4 \times ODc < OD$ .

### Hemólise

Os isolados foram semeados em ágar Sangue e incubados por 24h a 37°C. Após, foi observado o padrão hemolítico e classificado de acordo com o seu comportamento. Classificados como:  $\beta$ -hemolítico quando apresentam hemólise total das células sanguíneas, sendo possível visualizar um halo claro ao redor das colônias;  $\alpha$ -hemolítico quando apresentam hemólise parcial, sendo possível observar um halo esverdeado ao redor das colônias; o padrão  $\gamma$ -hemolítico não apresenta perfil de hemólise.

### Extração de DNA

Foram testados três métodos distintos de extração de DNA. No primeiro método a extração ocorreu com a utilização de Chelex-100 (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) e Proteinase K (Sigma-Aldrich, Poole, UK). Os isolados foram semeados em Ágar TSA e

incubados por 24h a 37°C. A partir do TSA, uma alçada (aproximadamente 1µL) do crescimento bacteriano foi suspensa em uma solução de Chelex-100 a 5% em 200µL de água ultra-pura juntamente com 2 µL de proteinase K (20 mg/mL) em microtubos de 1,5mL. Após, essa suspensão foi incubada a 56°C por 1h, homogeneizada em vórtex por 10 segundos, seguindo para uma incubação em banho seco por 10 minutos a 95°C, homogeneizadas novamente por 10 segundos e centrifugadas a 12.000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante onde está contido o DNA, foi coletado e transferido para um novo eppendorf, o qual foi armazenado a -20°C para ser analisado posteriormente pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).

A segunda metodologia foi baseada na metodologia descrita por Reyes-Escogido *et al.* (2010)<sup>19</sup> com modificações. Os isolados foram semeados em meio BHI a 37°C por 24 horas, em seguida foi separado 1,5mL da cultura bacteriana e centrifugado a 12000 rpm por 5 minutos. Retirou-se o sobrenadante e os pellets formados foram lavados com 500µL de tampão TE (10mM TRIS-Base, pH 7,5; 1mM EDTA, pH 8,0), após foi centrifugado novamente a 12000 rpm por 5 minutos. As células foram ressuspensas em 50µL de tampão de lise TES (10mM TRIS-Base, pH 7,5; 1mM EDTA; 0,5% SDS) e levadas ao microondas em potência alta por 10 segundos. Adicionou-se 150µg de proteinase K (Macherey-Nagel) e 10µg de RNase (Macherey-Nagel) na suspensão e esta foi incubada a 56°C por 10 minutos. Logo depois, as suspensões foram incubadas em temperatura ambiente por 2 minutos, adicionou-se 150µL de tampão TE juntamente com 25mg de Chelex-100 e colocadas no microondas em potência alta por 10 segundos. Depois disso, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante que continha o DNA foi transferido para um novo microtubo e centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos. O novo sobrenadante contendo DNA foi utilizado para quantificação e armazenado a -20°C para posterior análise.

Como terceiro método foi realizada a extração de DNA por lise térmica (SAMBROOK, Joseph et al, 1989)<sup>20</sup>. Os isolados foram semeados em Ágar TSA e incubados a 37°C por 24 horas. Em um microtubo estéril contendo 700µL de tampão TE, as colônias foram ressuspensas até obter uma densidade óptica equivalente ao padrão de turbidez 0,5 da escala McFarland. Os microtubos foram incubados em banho seco a 80°C por 20 minutos e após incubados a -20°C em gelo por pelo menos 20 minutos antes da utilização.

Os isolados com extração de DNA dos três métodos foram quantificados em espectrofotômetro (Thermo Scientific Nanodrop) ou fluorômetro Quantum (Promega QuantiFluor Dye Systems).

#### Padronização da reação de PCR para o gene Luk-PV

As ATCCs *S. aureus* 25923 e *S. aureus* N315 foram submetidas a amplificação por PCR para o gene Luk-PV, servindo como controle positivo e controle negativo respectivamente. A reação de PCR ocorreu com os oligonucleotídeos iniciadores Luk-PV-1 5'-ATCATTAGGTTAAAATGTCTGGACATGATCCA-3' e Luk-PV-2 5' - GCATCAAGTGTATTGGATAGCAAAAAGC-3' (433bp).

Foram testados dois métodos de detecção previamente descritos. O primeiro método testado foi realizado de acordo com Hoseini *et al.* (2014)<sup>21</sup>, com modificações. O mix de PCR continha 2.75mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), Tampão de reação 1x, Taq DNA polimerase 1.25U, 0.5µM de cada primer, 12.87µL de água ultrapura e 5µL de DNA, totalizando um volume final de 25µL. O programa do termociclador usado teve uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 53°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Para padronização da PCR e testagem das melhores condições dos reagentes, foram testadas diferentes temperaturas (53°C, 54°C, 55°C, 56°C e 57°C), o

MgCl<sub>2</sub> foi testado a 1,5mM, a Taq polimerase em 1U e os primers em 1mM, cada um sendo testado em reações separadas.

O segundo método testado foi uma PCR uniplex de acordo com Lina *et al.* (1999)<sup>22</sup>. O mix de PCR continha Tampão de reação 1x, 1μM de MgCl<sub>2</sub>, 2μM de cada dNTP, 0,5U de Taq polimerase, 1μM de cada primer, 5μL de DNA e para completar 25μL foi adicionado água ultrapura. O programa do termociclador usado teve uma desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

Todas as reações foram testadas com e sem albumina de soro bovino (BSA), foi adicionado 1μL de BSA naquelas que continham este componente e diminuído 1μL de água ultrapura.

#### Eletroforese

Os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%. A corrida foi realizada em tampão TAE 1x, a 80mV, por aproximadamente duas horas, no equipamento Electrophoresis Power Supply (Loccus Biotecnologia) e como corante foi utilizado o GelRed (Biotium). Os géis foram visualizados em luz ultravioleta e as imagens capturadas com o equipamento TransIlluminator (Loccus Biotecnologia).

## RESULTADOS

As 23 cepas analisadas pela coloração de gram onde apresentaram a forma de cocos gram positivos (coloração roxa/azulada) dispostos em grupos, com uma organização semelhante a cachos de uva ou tétrades. As cepas foram identificadas no equipamento MALDI-TOF MS, totalizando a identificação de 18 *S. epidermidis*, dois *S. capitis*, um *S. aureus*, um *S. haemolyticus* e um *S. saprophyticus*. Sendo que, nos isolados de pessoas sadias

da comunidade foram encontrados três *S. epidermidis* e um *S. haemolyticus*. Já nas peles alógenas foram encontrados 15 *S. epidermidis*, dois *S. capitis*, um *S. aureus* e um *S. saprophyticus*.

A capacidade de formação de biofilme foi observada e classificada de acordo com os valores de densidade óptica lida em comprimento de onda de 570nm do espectrofotômetro. Os resultados são apresentados na tabela 1 para peles alógenas e tabela 2 para os isolados de pessoas sadias da comunidade.

**Tabela 1. Capacidade de formação de biofilme e hemólise dos isolados de pele alógena.**

Isolado	Identificação	Perfil de Resistência*	SCCmec*	Biofilme	Hemólise
18.1.2	<i>S. epidermidis</i>	CFO-PEN-CIP-AZM	IV	Forte	gama-hemólise
18.1.4	<i>S. epidermidis</i>	CFO-PEN-CIP-AZM	IV	Fraco	gama-hemólise
18.2.2	<i>S. epidermidis</i>	CFO-PEN-CIP-AZM	IV	Não aderente	gama-hemólise
18.3.2	<i>S. epidermidis</i>	CFO-PEN-CIP-AZM	III	Fraco	gama-hemólise
18.4.2	<i>S. epidermidis</i>	CFO-PEN-CIP-AZM	IV	Fraco	gama-hemólise
18.4.4	<i>S. epidermidis</i>	CIP-AZM	IV	Fraco	gama-hemólise
18.5.1	<i>S. epidermidis</i>	PEN-CIP-AZM	IV	Fraco	gama-hemólise
18.6.1	<i>S. epidermidis</i>	CFO-PEN-CIP-AZM	IV	Fraco	gama-hemólise
18.6.3	<i>S. epidermidis</i>	CFO-PEN-CIP-AZM	IV	Fraco	gama-hemólise
18.10.2	<i>S. epidermidis</i>	PEN-CIP-AZM	IV	Fraco	gama-hemólise
18.10.4	<i>S. epidermidis</i>	PEN-CIP-AZM	IV	Fraco	gama-hemólise
27.1.2	<i>S. epidermidis</i>	CFO-PEN-CIP-AZM	IV	Fraco	gama-hemólise
27.1.4	<i>S. epidermidis</i>	CFO-CIP-AZM	IV	Fraco	beta-hemólise
27.3.2	<i>S. epidermidis</i>	CFO-PEN-CIP-AZM	IV	Fraco	beta-hemólise
27.6.2	<i>S. epidermidis</i>	CFO-PEN-CIP-AZM	IV	Fraco	gama-hemólise
14.5.1	<i>S. capitis</i>	CFO-PEN-CIP-AZM	III	Fraco	gama-hemólise
14.10.2	<i>S. capitis</i>	CFO-PEN-CIP-AZM	III	Fraco	gama-hemólise
18.7.4	<i>S. saprophyticus</i>	CFO-PEN-CIP-AZM	IV	Fraco	gama-hemólise
27.12.4	<i>S. aureus</i>	CFO-PEN-CIP-AZM	IV	Moderado	gama-hemólise

\*Resultados de estudos prévios (HAIN, 2017)<sup>18</sup>. SCCmec, *Staphylococcal cassette chromosome mec*;

CFO,cefotaxima; PEN, penicilina; CIP,ciprofloxacina; AZM, azitromicina.

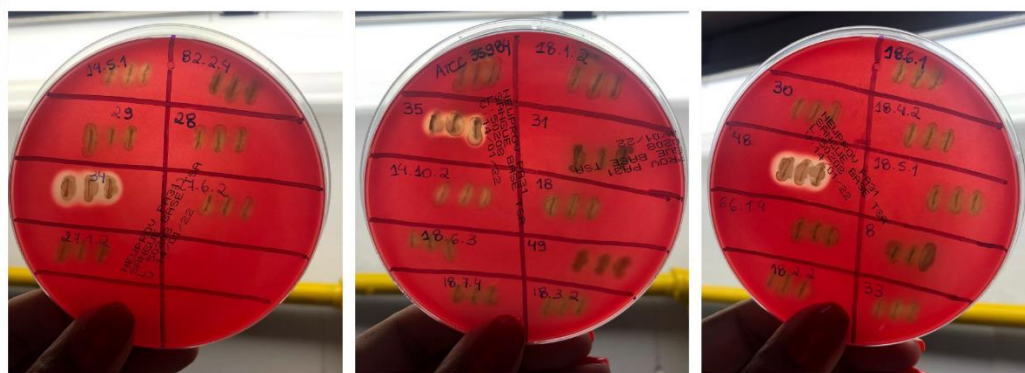


**Tabela 2. Capacidade de formação de biofilme e hemólise dos isolados de pessoas sadias da comunidade**

Isolado	Identificação	Perfil de Resistência*	SCCmec*	Biofilme	Hemólise
66.1.4	<i>S. epidermidis</i>	-	V	Não aderente	gama-hemólise
74.1.2	<i>S. epidermidis</i>	PEN-AZM	V	Moderado	gama-hemólise
82.2.4	<i>S. epidermidis</i>	CFO-PEN-CIP-AZM	V	Moderado	gama-hemólise
72.1.4	<i>S. haemolyticus</i>	CFO-PEN-GEN	V	Fraco	beta-hemólise

\*Resultados de estudos prévios (HAIN, 2017)<sup>18</sup>. SCCmec, *Staphylococcal cassette chromosome mec*; CFO,cefotixina; PEN, penicilina; CIP,ciprofloxacina; AZM, azitromicina.

Para hemólise em ágar sangue apenas 3 isolados apresentaram hemólise total (beta-hemólise), um *S. haemolyticus* isolado de pessoas sadias da comunidade e dois *S. epidermidis* isolados de peles alógenas (Figura 1). O restante dos isolados apresentaram ausência de lise, caracterizando uma gama-hemólise.

**Figura 1. Hemólise das cepas de *Staphylococcus sp.* em ágar sangue.**

Para extração dos isolados foi utilizado o primeiro método aqui descrito, com a utilização de Chelex-100 e Proteinase K. O DNA de cada um dos isolados foi quantificado no fluorômetro Quantum, a menor concentração encontrada foi de 2.18ng/ $\mu$ L e a maior 144ng/mL. Foi verificada a presença de DNA quando submetidos a eletroforese em gel de agarose. Já para as ATCCs controle (*S. aureus* 25923 e *S. aureus* N315), foram realizadas extrações pelos três métodos apresentados e a quantificação ocorreu por meio do equipamento NanoDrop. A concentração encontrada em cada uma das ATCCs foi alta, acima de 300ng/ $\mu$ L,

mas com uma razão 260/280 em torno de 1.5, um resultado abaixo do ideal 1.8-2.0 que indica pureza.

As tentativas de padronização das reações de PCR foram realizadas com as extrações de DNA das ATCCs controle, mas não houve amplificação de DNA em nenhuma das tentativas. Desta forma, não se pode dar continuidade na pesquisa da existência do gene Luk-PV nos isolados.

## DISCUSSÃO

Um dos principais motivos de descarte de tecidos dos bancos de pele alógenas ocorre devido a contaminação microbiana persistente ou por microrganismos não aceitáveis, como o *S. aureus*<sup>10</sup>. Mesmo depois de passar por tratamentos antimicrobianos, esses tecidos continuam apresentando contaminação, e desta forma, diminui-se o estoque dos bancos de pele que já possuem um número baixo de doações<sup>17</sup>. Sabe-se que a contaminação microbiana persistente se dá devido a microrganismos no estado de biofilme, uma forma de resistência apresentada que deixa essa comunidade mais tolerante aos antimicrobianos, que não conseguem penetrar no seu interior e, por isso, não conseguem eliminar todos os microrganismos ali presentes<sup>23</sup>.

Dentre as espécies de *Staphylococcus coagulase-negativa* (CoNS) presentes neste estudo, *S. epidermidis* foi a mais encontrada, pode ser isolada de todos os microambientes da pele e está frequentemente associada com infecções<sup>15-24</sup>. O *S. aureus* é a espécie mais virulenta deste gênero e apresenta multirresistência pela aquisição de elementos genéticos móveis, mas esta característica de adquirir genes de resistência também está presente nas demais espécies de *Staphylococcus coagulase-negativa*, tornando-os patógenos multirresistentes emergentes<sup>25</sup>. Com o isolamento dessas espécies pode-se observar o

comportamento e o potencial patogênico de cada isolado, como a formação de biofilme e hemólise presente neste estudo, mas também é necessário a busca específica por genes, a exemplo das leucotoxinas Panton-Valentine Leucocidin (PVL) e gama-toxina que podem agravar as infecções causadas por estas bactérias. Estes genes serão analisados posteriormente por este mesmo grupo.

Nas cepas analisadas apenas 8% foram não formadoras de biofilme corroborando com a hipótese de que microrganismos no estado de biofilme pode ser um dos fatores contribuintes para a persistência da contaminação microbiana, muitas vezes ao agravamento das infecções devido a resistência a antimicrobianos<sup>17</sup>. Em contrapartida, 74.78% apresentaram biofilme fracamente aderente, o que pode ser explicado pelo fato de que esses isolados tenham sido cultivados em condições laboratoriais, onde encontram um ambiente rico em nutrientes, temperatura ideal e sem competição, e desta forma, passam a não apresentar algumas características de forma tão acentuada. Era esperado que os isolados apresentassem biofilme moderado ou fortemente aderente, mas existe a dificuldade em mimetizar as condições biológicas em ambiente laboratorial.

O uso indiscriminado de antimicrobianos traz a falta de alternativas de tratamentos para infecções persistentes, podendo ser esse um dos motivos dos *Staphylococcus* obterem sucesso como causadores de infecção, ocorrendo a seleção de cepas resistentes e que possuem a presença de fatores de virulência. Um fator de virulência importante é a produção de hemolisinas classificadas em quatro tipos: alfa, beta, gama e delta<sup>26</sup>. Vários estudos demonstram a presença dessas hemolisinas em *S. aureus* enquanto nos CoNS é pouco estudada, assim como a contribuição de cada uma para a patogenicidade das infecções<sup>27</sup>. A hemólise total (beta-hemólise) encontrada em dois isolados de *S. epidermidis* e um isolado de *S. haemolyticus* já foi observada nestas espécies anteriormente<sup>28-29-30</sup>, promovendo a evasão do microrganismo do sistema imune do hospedeiro, e assim, permitindo a sobrevivência do

patógeno. Sabe-se que a hemolisina beta atua como fosforilase com alta afinidade por membranas plasmáticas de diversos tipos celulares, causando instabilidade<sup>31</sup>.

Dentre as hemolisinas, a gama-hemolisina é a menos documentada pois é inibida pelo ágar e, assim, quando o teste para hemólise em placas de sangue é realizado, sua presença é perdida. Desta forma, a ideia de que esta toxina seja um possível determinante de virulência em doenças causadas por *Staphylococcus* foi ignorada<sup>27</sup>, embora seja produzida por 99% das cepas de *S. aureus* e frequentemente expressa por CoNS isolados de infecções clinicamente importantes. A gama-toxina tem ação pró-inflamatória apresentando capacidade de lisar eritrócitos e leucócitos pela formação de poros transmembrana, o que pode aumentar a toxicidade e resistência das bactérias, e por isso, a gravidade das infecções<sup>32-33</sup>. No presente estudo 87% das cepas apresentaram gama hemólise no teste de ágar-sangue, uma cepa de *S. aureus* e entre as espécies CoNS *S. epidermidis*, *S. capitis* e *S. saprophyticus*. Embora CoNS frequentemente apresentem um padrão gama-hemolítico em ágar sangue, duas cepas de *S. epidermidis* e uma de *S. haemolyticus*, correspondentes a 23%, apresentaram beta-hemólise. O fato de CoNS adquirir a capacidade de apresentar beta-hemólise revela a possibilidade dessas espécies promover evasão do sistema imune do hospedeiro, o que permite sua sobrevivência.

Nas extrações de DNA das ATCCs controle quando quantificadas no equipamento NanoDrop obteve-se uma concentração alta, mas a razão 260/280 foi menor que 1.8, o que indica que há interferentes no DNA e que a extração não foi tão eficiente. A concentração alta pode ter acontecido por conta de restos celulares, uma vez que a extração de DNA não foi eficiente, não houve amplificação nas reações de PCR. Um novo método de extração será proposto para dar continuidade nas pesquisas pela busca de genes das leucotoxinas Pantone-Valentine Leucocidin (PVL) e Gama-toxina.

## REFERÊNCIAS

1. SANFORD, J. A.; GALLO, R. L. Functions of the skin microbiota in health and disease. **Seminars In Immunology**, v. 25, n. 5, p. 370-377, nov. 2013. Elsevier BV.
2. BYRD, A. L.; BELKAID, Y.; SEGRE, J. A. The human skin microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 143-155, 15 jan. 2018. Springer Science and Business Media LLC.
3. CHEUNG, G. Y.C.; JOO, H.; CHATTERJEE, S. S.; OTTO, M. Phenol-soluble modulins – critical determinants of staphylococcal virulence. **Fems Microbiology Reviews**, v. 38, n. 4, p. 698-719, jul. 2014. Oxford University Press (OUP).
4. ARGEMI, X.; HANSMANN, Y.; PROLA, K.; PRÉVOST, G. Coagulase-Negative Staphylococci Pathogenomics. **International Journal of Molecular Sciences**, France, v. 20, n. 5, p. 1-19, mar. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi-nlm-nih.ez45.periodicos.capes.gov.br/pmc/articles/PMC6429511/pdf/ijms-20-01215.pdf>. Acesso em: 03 dez. 2021.
5. LIMA, M. F. P.; *et al.* *Staphylococcus aureus* E AS INFECÇÕES HOSPITALARES – REVISÃO DE LITERATURA. **Revista Uningá Review**, Brasil, v. 21, n. 1, p. 32-39, mar. 2015. Disponível em: [https://www.mastereditora.com.br/periodico/20150101\\_115618.pdf](https://www.mastereditora.com.br/periodico/20150101_115618.pdf). Acesso em: 03 dez. 2021.
6. BECKER, K.; HEILMANN, C.; PETERS, G. Coagulase-Negative Staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 870-926, out. 2014.
7. HEILMANN, C.; ZIEBUHR, W.; BECKER, K.. Are coagulase-negative staphylococci virulent? *Clinical Microbiology And Infection*, [s. l], v. 25, n. 9, p. 1971-1980, nov. 2018.

8. FORSELL, J. H.; LIESMAN, J. Analysis of Potential Causes of Positive Microbiological Cultures in Tissue Donors. *Cell and Tissue Banking*, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 111–115, 2000.
9. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Transplantes de órgãos: saiba a importância de conversar com a família e sobre como é o processo de doação. Brasília, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2021-1/setembro/transplantes-de-orgaos-saiba-a-importancia-de-conversar-com-a-familia-e-sobre-como-e-o-processo-de-doacao>
10. GAUCHER, S.; KHAZNADAR, Z.; GOUREVITCH, J.; JARRAYA, M. Skin donors and human skin allografts: evaluation of an 11-year practice and discard in a referral tissue bank. *Cell And Tissue Banking*, v. 17, n. 1, p. 11-19, mar. 2016.
11. GUPTA, S. et al. Human Skin Allograft: Is it a Viable Option in Management of Burn Patients? *Journal Of Cutaneous And Aesthetic Surgery*, v. 12, n. 2, p. 132-135, jun. 2019.
12. PIRNAY, J. et al Evaluation of a microbiological screening and acceptance procedure for cryopreserved skin allografts based on 14 day cultures. *Cell And Tissue Banking*, v. 2, n. 13, p. 287-295, abr. 2012.
13. FRANÇA, A. et al. Virulence Factors in Coagulase-Negative Staphylococci. *Pathogens*, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 170, 2021.
14. MACIA, M. D.; ROJO-MOLINERO, E.; OLIVER, A. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*, [s. l.], v. 20, n. 10, p. 981–990, 2014.
15. OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* – the “accidental” pathogen. *Nature reviews. Microbiology*, [s. l.], v. 7, n. 8, p. 555–567, 2009.

16. PREDA, M. et al. Phenotypic and genotypic virulence features of staphylococcal strains isolated from difficult-to-treat skin and soft tissue infections. *Plos One*, [s. l.], v. 2, n. 16, p. 1-17, fev. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7853507/pdf/pone.0246478.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2021.
17. MENEGHETTI, K. L. Caracterização microbiológica de pele alógena: proposta de novos métodos de tratamento antimicrobiano para sua utilização como aloenxerto. [s. l.], 2018. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/193000>. Acesso em: 6 nov. 2021.
18. HAIN, T. S. Genes de resistência em *Staphylococcus sp.* isolados de amostras de tecidos de banco de pele e da comunidade. 2017. 69 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.
19. REYES-ESCOGIDO, L. Purification of bacterial genomic DNA in less than 20 min using chelex-100 microwave: examples from strains of lactic acid bacteria isolated from soil samples. *Antonie van Leeuwenhoek Journal Of Microbiology*, v. 98, n. 4, p. 465-474, nov. 2010.
20. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 4th Edition, [www.molecularcloning.org](http://www.molecularcloning.org)  
Cold Spring Harbor Protocols, [www.cshprotocols.org](http://www.cshprotocols.org)
21. HOSEINI ALFATEMI SM, MOTAMEDIFAR M, HADI N, SEDIGH EBRAHIM SARAIE H. Analysis of virulence genes among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Strains. *Jundishapur J Microbiol.* 2014;7(6):e10741.
22. LINA, G.; PIÉMONT, Y.; GODAIL-GAMOT, F.; et al. Involvement of Panton-Valentine Leukocidin—Producing *Staphylococcus aureus* in Primary Skin Infections

- and Pneumonia. *Clinical Infectious Diseases*, v. 29, n. 5, p. 1128– 1132. doi: 10.1086/313461, 1999.
23. GOMES, L. C. Optimization of cultivation conditions for E. coli biofilm formation in microtiter plates, 2011. Department of Chemical Engineering, Porto University.
  24. BROWN, Morgan M; HORSWILL, Alexander R. *Staphylococcus epidermidis*-Skin friend or foe? *Plos Pathogens*, [s. l.], v. 11, n. 16, p. 1-6, nov. 2020
  25. SOUMYA, K. R. et al. Virulence factors associated with Coagulase Negative Staphylococci isolated from human infections. *3 Biotech*, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 140, 2017.
  26. CLYNE, M.; BIRKBECK, T.; ARBUTHNOTT, J. Characterization of staphylococcal -lysin. *Microbiology-sgm*, [s. l.], v. 138, p. 923–930, 1992.
  27. DINGES M.M.; ORWIN P.M.; SCHLIEVERT P.M.: Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clin Microbiol Rev**, 2000, 13:16-34
  28. ZELL C.; RESCH M.; ROSENSTEIN R.; AALBRECHT T.; HERTEL C.; GÖTZ F.: Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures. **Int J Food Microbiol** 2008, 127(3):246-51.
  29. BEDIDI-MADANI N.; GREENLAND T.; RICHARD Y.: Exoprotein and slime production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk. **Vet Microbiol** 1998, 59(2-3):139-45.
  30. NATARO J.P.; CORCORAN L.; ZIRIN S.; SWINK S.; TAICHMAN N.; GOIN J.; HARRIS M.C.: Prospective analysis of coagulase-negative staphylococcal infection in hospitalized infants. **J Pediatr** 1994, 125(5): 798–804.
  31. SABINI L.; TORRES C.; DEMO M.; SUTIL S.; LARA L.: Effect of Staphylococcus toxins isolated from dairy cow milk on vero cell monolayers. **Rev Latinoam Microbiol** 2001, 43:13-18



32. A BIERDEMAN, M. et al. Reactions with Antisera and Pathological Effects of *Staphylococcus aureus* Gamma-Toxin in the Cornea. **Current Eye Research**, v. 42, n. 8, p. 1100-1107, nov. 2016.
33. FERRERAS, M. et al. The interaction of *Staphylococcus aureus* bi-component  $\gamma$ -hemolysins and leucocidins with cells and lipid membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, [s. l.], v. 1414, n. 1, p. 108–126, 1998.

### 3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Nossos resultados corroboraram com a hipótese de estudos anteriores, que microrganismos no estado de biofilme é um dos fatores contribuintes para a persistência da contaminação microbiana e que CoNS também podem apresentar padrão beta-hemolítico, promovendo a evasão do microrganismo do sistema imune do hospedeiro, e assim, permitindo a sobrevivência do patógeno. A maior parte dos isolados apresentou gama-hemólise em ágar sangue, uma leucotoxina que tem a capacidade de lisar eritrócitos e leucócitos pela formação de poros transmembrana. Portanto cepas de *Staphylococcus* tanto de possíveis doadores (cepas isoladas de pessoas saudáveis da comunidade) como de cepas isoladas de pele alógena, podem ter fatores de virulência que agravem infecções causadas por estas espécies.

Como perspectiva deste trabalho está a comparação do padrão hemolítico em sangue humano, a padronização da reação de PCR para a procura de genes de resistência das leucotoxinas Pantón-Valentine Leucocidin (PVL) e gama-toxina.

## REFERÊNCIAS

- ARGEMI, X.; HANSMANN, Y.; PROLA, K.; PRÉVOST, G. Coagulase-Negative Staphylococci Pathogenomics. **International Journal of Molecular Sciences**, France, v. 20, n. 5, p. 1-19, mar. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.ez45.periodicos.capes.gov.br/pmc/articles/PMC6429511/pdf/ijms-20-01215.pdf>. Acesso em: 03 dez. 2021.
- BECKER, K.; HEILMANN, C.; PETERS, G. Coagulase-Negative Staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 870-926, out. 2014.
- BIERDEMAN, M. A. *et al.* Reactions with Antisera and Pathological Effects of *Staphylococcus aureus* Gamma-Toxin in the Cornea. **Current Eye Research**, [s. l.], v. 42, n. 8, p. 1100–1107, 2017.
- BROWN, M. M.; HORSWILL, A. R. *Staphylococcus epidermidis*-Skin friend or foe? **Plos Pathogens**, [s. l.], v. 11, n. 16, p. 1-6, nov. 2020
- BYRD, A. L.; BELKAID, Y.; SEGRE, J. A. The human skin microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 143-155, 15 jan. 2018. Springer Science and Business Media LLC.
- CHEUNG, G. Y.C.; JOO, H.; CHATTERJEE, S. S.; OTTO, M. Phenol-soluble modulins – critical determinants of staphylococcal virulence. **Fems Microbiology Reviews**, v. 38, n. 4, p. 698-719, jul. 2014. Oxford University Press (OUP).
- CLYNE, M.; BIRKBECK, T.; ARBUTHNOTT, J. Characterization of staphylococcal -lysin. **Microbiology-*sgm***, [s. l.], v. 138, p. 923–930, 1992.
- COONEY, J. *et al.* The gamma-hemolysin locus of *Staphylococcus aureus* comprises three linked genes, two of which are identical to the genes for the F and S components of leukocidin. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 61, n. 2, p. 768–771, 1993.
- CRUZ, A. R. *et al.* Virulence Gene Expression of *Staphylococcus aureus* in Human Skin. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 12, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.ez45.periodicos.capes.gov.br/pmc/articles/PMC8231915/>. Acesso em: 23 set. 2021.
- DARBOE, S. *et al.* Prevalence of Pantone-Valentine Leukocidin (PVL) and Antimicrobial Resistance in Community-Acquired Clinical *Staphylococcus aureus* in an Urban Gambian Hospital: A 11-Year Period Retrospective Pilot Study. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 9, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.ez45.periodicos.capes.gov.br/pmc/articles/PMC6540874/>. Acesso em: 23 set. 2021.
- DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 16–34, 2000.

FAVILLA, A. L. C. DETECÇÃO DE GENES QUE CODIFICAM TOXINAS, LEUCOCIDINA DE PANTON-. [s. l.], p. 118, 2017.

FERRERAS, M. *et al.* The interaction of *Staphylococcus aureus* bi-component  $\gamma$ -hemolysins and leucocidins with cells and lipid membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, [s. l.], v. 1414, n. 1, p. 108–126, 1998.

FORSELL, J. H.; LIESMAN, J. Analysis of Potential Causes of Positive Microbiological Cultures in Tissue Donors. **Cell and Tissue Banking**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 111–115, 2000.

FRANÇA, A. *et al.* Virulence Factors in Coagulase-Negative Staphylococci. **Pathogens**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 170, 2021.

GAUCHER, S.; KHAZNADAR, Z.; GOUREVITCH, J.; JARRAYA, M. Skin donors and human skin allografts: evaluation of an 11-year practice and discard in a referral tissue bank. **Cell And Tissue Banking**, v. 17, n. 1, p. 11-19, mar. 2016.

GHAZNAVI-RAD, E. *et al.* A simplified multiplex PCR assay for fast and easy discrimination of globally distributed staphylococcal cassette chromosome mec types in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 59, n. 10, p. 1135–1139,

GOMES, L. C. **Optimization of cultivation conditions for E. coli biofilm formation in microtiter plates**, 2011. Department of Chemical Engineering, Porto University.

GOMEZ, E. *et al.* Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* SCCmec Type and Its Association with Clinical Presentation, Severity, and Length of Stay among Patients with Complicated Skin and Skin Structure Infections. **Advances in Infectious Diseases**, [s. l.], v. 04, n. 02, p. 111–115, 2014.

GUPTA, S. *et al.* Human Skin Allograft: Is it a Viable Option in Management of Burn Patients? **Journal Of Cutaneous And Aesthetic Surgery**, v. 12, n. 2, p. 132-135, jun. 2019.

HAIN, T. S. Genes de resistência em *Staphylococcus sp.* isolados de amostras de tecidos de banco de pele e da comunidade. 2017. 69 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

HAJIAHMADI, F. *et al.* Detection of Integrins and Staphylococcal Cassette Chromosome mec Types in Clinical Methicillin-resistant Coagulase Negative Staphylococci Strains. **Osong Public Health and Research Perspectives**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 47–53, 2017.

HARKINS, C. P. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* emerged long before the introduction of methicillin into clinical practice. **Genome Biology**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 130, 2017.

HEILMANN, C.; ZIEBUHR, W.; BECKER, K.. Are coagulase-negative staphylococci virulent? **Clinical Microbiology And Infection**, [s. l.], v. 25, n. 9, p. 1971-1980, nov. 2018.

IGBINOSA, E. O. *et al.* Detection of Methicillin-Resistant Staphylococci Isolated from Food Producing Animals: A Public Health Implication. **Veterinary Sciences**, [s. l.], v. 3, n. 3, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi-nlm-nih.ez45.periodicos.capes.gov.br/pmc/articles/PMC5606580/>. Acesso em: 28 out. 2021.

JAMAL, M. *et al.* Bacterial biofilm and associated infections. **Journal of the Chinese Medical Association**, [s. l.], v. 81, n. 1, p. 7–11, 2018.

LE, K. Y. *et al.* Molecular determinants of staphylococcal biofilm dispersal and structuring. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 4, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi-nlm-nih.ez45.periodicos.capes.gov.br/pmc/articles/PMC4244807/>. Acesso em: 24 set. 2021.

LIMA, M. F. P.; BORGES, M. A.; PARENTE, R. S.; VICTÓRIA JÚNIOR, R. C.; OLIVEIRA, M. E. *Staphylococcus aureus* E AS INFECÇÕES HOSPITALARES – REVISÃO DE LITERATURA. **Revista Uningá Review**, Brasil, v. 21, n. 1, p. 32-39, mar. 2015. Disponível em: [https://www.mastereditora.com.br/periodico/20150101\\_115618.pdf](https://www.mastereditora.com.br/periodico/20150101_115618.pdf). Acesso em: 03 dez. 2021.

LINDSAY, D.; VON HOLY, A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. **Journal of Hospital Infection**, [s. l.], v. 64, n. 4, p. 313–325, 2006.

MACIA, M. D.; ROJO-MOLINERO, E.; OLIVER, A. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. **Clinical Microbiology and Infection**, [s. l.], v. 20, n. 10, p. 981–990, 2014.

MADIGAN, M. T. *et al.* **Microbiologia de Brock**. 14a. ed. São Paulo: Pearson; 2016

MATHUR, T. *et al.* DETECTION OF BIOFILM FORMATION AMONG THE CLINICAL ISOLATES OF STAPHYLOCOCCI: AN EVALUATION OF THREE DIFFERENT SCREENING METHODS. **Indian Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 5, 2006.

MENEGHETTI, K. L. Caracterização microbiológica de pele alógena: proposta de novos métodos de tratamento antimicrobiano para sua utilização como aloenxerto. [s. l.], 2018. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/193000>. Acesso em: 6 nov. 2021.

MESRATI, I. *et al.* Clinical isolates of Pantone–Valentine leucocidin- and  $\gamma$ -haemolysin-producing *Staphylococcus aureus*: prevalence and association with clinical infections. **Journal of Hospital Infection**, [s. l.], v. 75, n. 4, p. 265–268, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Transplantes de órgãos: saiba a importância de conversar com a família e sobre como é o processo de doação**. Brasília, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2021-1/setembro/transplantes-de-orgaos-saiba-a-importancia-de-conversar-com-a-familia-e-sobre-como-e-o-processo-de-doacao>

OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* – the “accidental” pathogen. **Nature reviews. Microbiology**, [s. l.], v. 7, n. 8, p. 555–567, 2009.

PARK, H.-K. *et al.* Detection of Virulence Genes of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Isolated from Suprapubic Urine from Infants with Fever. **Journal of Bacteriology and Virology**, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 189–196, 2008.

PIRNAY, J. *et al.* Evaluation of a microbiological screening and acceptance procedure for cryopreserved skin allografts based on 14 day cultures. *Cell And Tissue Banking*, v. 2, n. 13, p. 287-295, abr. 2012.

REITER, K. C. Distribuição dos SCCmec tipos I, II, III e IV em *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente isolados de pacientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. [s. l.], 2009. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/18200>. Acesso em: 2 nov. 2021.

SANFORD, J. A.; GALLO, R. L. Functions of the skin microbiota in health and disease. **Seminars In Immunology**, v. 25, n. 5, p. 370-377, nov. 2013. Elsevier BV.

SHALLCROSS, L. J. *et al.* The role of the Pantone-Valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 43–54, 2013.

SILVEIRA, D. *et al.* Banco de Pele de Porto Alegre: produtividade e perfil dos doadores. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 6–6, 1DC.

SOUMYA, K. R. *et al.* Virulence factors associated with Coagulase Negative Staphylococci isolated from human infections. **3 Biotech**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 140, 2017.

SUPERSAC, G. *et al.* Assessment of the role of gamma-toxin in experimental endophthalmitis using a hlg-deficient mutant of *Staphylococcus aureus*. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 241–251, 1998.

SUTHERLAND, I. W. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. **Trends in Microbiology**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 222–227, 2001.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 12a. ed. Porto Alegre: Artmed; 2017.

VICENTINO, W. *et al.* Guidelines to Implement Quality Management Systems in Microbiology Laboratories for Tissue Banking. **Transplantation Proceedings**, [s. l.], v. 41, n. 8, p. 3481–3484, 2009.

ZHANG, C.; GUO, Y.; CHU, X. In Vitro generation of Pantone-Valentine leukocidin (PVL) in clinical Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and its correlation with PVL variant, clonal complex, infection type. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi-nlm-nih.ez45.periodicos.capes.gov.br/pmc/articles/PMC5955980/>. Acesso em: 23 set. 2021.

## **ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL**

Artigos principais: manuscritos de artigos principais devem relatar pesquisas originais, não publicadas anteriormente ou em consideração para publicação em outro lugar. Os artigos principais têm um limite de 3.500 palavras (excluindo resumo, título, referências e ilustrações). Os manuscritos devem incluir um resumo estruturado de no máximo 250 palavras, organizado nos seguintes títulos: Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões.

O texto do manuscrito deve ser organizado nas seguintes seções: título, título corrente, resumo estruturado, palavras-chave (três a seis), texto do manuscrito (introdução, métodos, resultados e discussão), agradecimentos, declaração de conflito de interesses, suporte financeiro, referências, e legendas de figuras. São permitidas cinco ilustrações (tabelas e figuras) no total.

O manuscrito deve ser preparado em um software de processamento de texto e salvo como um arquivo .doc ou .docx. A fonte preferida é Times New Roman, tamanho 12, com espaçamento duplo ao longo do texto, legendas das figuras e referências, com margens de no mínimo 3 cm. Organize o manuscrito nas seguintes seções: Carta de Apresentação (dirigida ao Editor-Chefe), Página de Título, incluindo Título do Manuscrito, Título corrido, Resumo, Palavras-chave, seguido de Texto do Manuscrito, Declaração de Conflito de Interesse, Agradecimentos, Suporte Financeiro, Referências e legendas das figuras. Carta de apresentação, página de rosto, agradecimentos e suporte financeiro devem ser fornecidos como documentos separados. As abreviaturas devem ser usadas com moderação.

### **Modelo de Manuscrito**

O manuscrito deve ser preparado em um software de processamento de texto e salvo como um arquivo .doc ou .docx. A fonte preferida é Times New Roman, tamanho 12, com espaçamento duplo ao longo do texto, legendas das figuras e referências, com margens de no mínimo 3 cm. Organize o manuscrito nas seguintes seções: Carta de Apresentação (dirigida ao Editor-Chefe), Página de Título, incluindo Título do Manuscrito, Título corrido, Resumo, Palavras-chave, seguido de Texto do Manuscrito, Declaração de Conflito de Interesse, Agradecimentos, Suporte Financeiro, Referências e legendas das figuras. Carta de

apresentação, página de rosto, agradecimentos e suporte financeiro devem ser fornecidos como documentos separados. As abreviaturas devem ser usadas com moderação.

Página de rosto: a página de rosto deve incluir os nomes dos autores em ordem direta e sem abreviaturas, juntamente com as afiliações institucionais na seguinte seqüência: instituição do autor, departamento, cidade, estado e país. Para autores brasileiros, por favor, não traduza os nomes de instituições. Deve ser especificado o endereço completo do autor para correspondência, incluindo telefone e e-mail. O número de autores e co-autores por artigo deve ser limitado de acordo com o número de autores que contribuíram para o manuscrito. Exceto para estudos multicêntricos nacionais e internacionais, serão permitidos até 20 autores e coautores. Os demais nomes dos autores serão publicados em nota de rodapé. Forneça o número ORCID do autor para correspondência e de todos os coautores.

Potenciais revisores: os autores devem fornecer nomes e informações de contato (endereço de e-mail e afiliações institucionais) de três potenciais revisores imparciais, de uma instituição diferente da dos autores.

Título: o título deve ser o mais conciso, claro e informativo possível. Não deve conter abreviações e não deve exceder 250 caracteres.

Título de corrida: O título de corrida pode incluir até 100 caracteres.

Resumo estruturado: O resumo estruturado deve resumir os resultados obtidos e as principais conclusões de forma que um leitor ainda não familiarizado com o tema específico do artigo possa compreender as implicações do artigo. O resumo não deve ultrapassar 250 palavras e deve ser estruturado com os seguintes títulos: Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões. O uso de abreviações deve ser evitado.

Palavras-chave: três a seis palavras-chave devem ser listadas imediatamente abaixo do resumo estruturado (Exemplo: Tuberculose. Atenção primária à saúde. Estrutura dos serviços.). Visite o site <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh> para referência.

Introdução: a introdução do artigo deve ser breve e indicar os objetivos para os quais o estudo foi realizado. Estudos anteriores devem ser citados apenas quando essenciais.

Métodos: Os métodos usados no estudo devem ser claros e suficientemente detalhados, para que os leitores e revisores possam entender exatamente o que foi feito e permitir a replicação do estudo por outros. As técnicas padrão precisam apenas ser referenciadas.

Ética: Se o trabalho envolver seres humanos, o autor deve indicar que os procedimentos seguidos estavam de acordo com os padrões éticos do comitê responsável pela experimentação humana (institucional, regional ou nacional) e de acordo com os princípios da Declaração de Helsinque, 1964, conforme revisado em 1975, 1983, 1989, 1996 e 2000. Para



experimentos com animais, o autor deve indicar se um guia do conselho nacional de pesquisa para experimentação com animais ou qualquer lei sobre o cuidado e uso de animais de laboratório foi cumprido. O número de aprovação deve ser enviado ao periódico. No caso de pesquisas em seres humanos, os autores devem incluir na seção de métodos (subseção de considerações éticas), a declaração de que o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Institucional.

**Ensaio clínico:** No caso de ensaios clínicos, o manuscrito deve ser acompanhado do número de registro e órgão de registro do ensaio clínico (plataforma REBEC).

**Resultados:** a seção de resultados deve ser um relato conciso e impessoal das novas informações (todas as descobertas positivas e negativas relevantes) reveladas pelo estudo. Evite repetir no texto os dados apresentados nas tabelas ou ilustrações e use o tempo passado para escrever os resultados.

**Discussão:** A seção de discussão deve ser limitada ao significado das novas informações e bem discutida, considerando a relevância clínica, pontos fortes e limitações do estudo. Não inclua uma revisão geral do tópico. Mantenha a discussão concisa e relevante. As principais conclusões devem ser apresentadas como último parágrafo da seção de discussão.

**Agradecimentos:** Quaisquer agradecimentos devem ser curtos, concisos e restritos aos que sejam necessários e não atendam aos critérios de autoria. No caso de instituições patrocinadoras, não use siglas.

**Conflito de interesse:** Todos os autores são obrigados a divulgar qualquer tipo de conflito de interesse durante o desenvolvimento do estudo.

**Apoio financeiro:** Liste todo o apoio financeiro recebido de agências, instituições e outras organizações que financiaram parte ou a totalidade da pesquisa.

**Referências:** Somente as referências citadas no texto devem ser incluídas na lista ao final do manuscrito. As referências devem ser numeradas consecutivamente em ordem progressiva em algarismos arábicos conforme aparecem no texto. A lista de referências deve ser formatada de acordo com o estilo Vancouver. Todos os autores, até seis, devem ser listados. Para sete ou mais autores, liste os primeiros seis, seguidos de “et al.” Digite a lista de referências em uma página separada no final do manuscrito, usando espaçamento duplo.

Referências numeradas a comunicações pessoais, dados não publicados ou manuscritos “em preparação” ou “submetidos para publicação” não devem ser listados entre as referências. Artigos aceitos para publicação devem ser referidos como “no prelo” e a carta de aceitação da revista deve ser fornecida. Tal material pode ser incorporado em local apropriado no texto de acordo com os seguintes exemplos: (AB Figueiredo: Comunicação Pessoal, 1980), (CD Dias,

EF Oliveira: Dados não publicados). As citações no texto devem ser indicadas usando os números de referência apropriados como sobrescritos para a palavra correspondente, separados por vírgula ou hífen, por exemplo, Mundo<sup>1,2</sup>, Vida<sup>30,42,44-50</sup>. As referências no final do manuscrito devem seguir o sistema usado em ‘requisitos uniformes para manuscritos submetidos a periódicos biomédicos’ (para obter mais informações, visite <http://www.nlm.nih.gov/citingmedicine>). Os títulos dos periódicos referenciados devem ser abreviados de acordo com o estilo usado no Index Medicus (para mais informações, visite <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>).

A responsabilidade pelas citações bibliográficas no texto e na lista de referências é inteiramente dos autores.