

Identificação e determinação de formação de biofilme de *S. aureus* e *S. epidermidis* em pacientes com dermatite atópica em tratamento tópico com emulsão de sinvastatina

Palavras-Chave: DERMATITE ATÓPICA, BIOFILMES, SINVASTATINA

Autores(as):

Matheus Augusto Germano, FCF, UNICAMP

Sindy Magri Roque (Co-orientadora) FCF, UNICAMP

Profa. Dra. Andréa Fernandes Eloy da Costa, FCM, UNICAMP

Profa. Dra. Gislaine Ricci Leonardi, FCF, UNICAMP

Profa. Dra. Karina Cogo Müller (orientadora), FCF, UNICAMP

1. INTRODUÇÃO:

A Dermatite Atópica (DA) é uma doença crônica inflamatória da pele caracterizada por apresentar prurido intenso, eritema, lesões eczematosas (BLICHARZ et al., 2020). Além disso, os pacientes apresentam problemas de sono, sofrimento psicossocial, que representam impactos significativos na redução da qualidade de vida (THYSSEN et al., 2023; WOLLENBERG et al., 2023). A fisiopatologia da doença é multifatorial e está relacionada a fatores genéticos, disbiose microbiana, desequilíbrio da resposta imunológica e comprometimento da função de barreira da pele (WEIDINGER et al., 2018).

Se tratando da dermatite, *Staphylococcus aureus* cresce rapidamente na epiderme induzindo hipóxia e danos na barreira, além de que, a presença de biofilme em lesões de DA são responsáveis pela oclusão dos ductos sudoríparos (Di Domenico et al., 2019). A formação de uma estrutura protetora nos biofilmes os torna mais resistentes aos tratamentos e ao sistema imunológico, levando a uma persistência da infecção e a uma maior dificuldade no seu tratamento em relação às formas planctônicas. (GONZALEZ et al., 2021).

Estudos vêm demonstrando a presença de biofilme de *Staphylococcus sp*, especialmente *S. aureus* na pele de pacientes com dermatite atópica e sua relação com a severidade da doença (GONZALEZ et al, 2017; GONZALEZ et al., 2021). Porém, poucos estudos verificaram a relação entre as espécies *S. aureus* e *S. epidermidis* e a capacidade de formação de biofilme, em pacientes em tratamento tópico na dermatite atópica.

2. METODOLOGIA:

2.1 Desenho experimental e Considerações éticas

Trata-se de um ensaio clínico, randomizado, duplo cego do tipo cruzado em um único centro (ambulatório de dermatologia do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP). Os pacientes selecionados utilizaram os tratamentos em lesões de dermatite atópica e a base, mesma formulação sem a presença da sinvastatina (placebo) foi utilizada em regiões contralaterais. O tratamento foi realizado nas regiões

antecubitais e poplíteas. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP (CEP) sob parecer nº 36550820.6.0000.5404. Esse estudo está relacionado ao projeto de doutorado da aluna Sindy Magri Roque, que pretende, realizar o desenvolvimento da formulação testada e a avaliação a eficácia terapêutica da emulsão de sinvastatina no tratamento da DA.

Foram selecionados pacientes pediátricos e adultos com o diagnóstico de DA em seguimento no ambulatório de Dermatologia do Hospital de Clínicas da Unicamp, sendo os principais critérios de inclusão: diagnóstico de DA segundo os critérios de Hanifin e Rajka, comprovado por revisão de prontuário, gravidade da avaliada por médico através da aferição do Eczema Activity Severity Index superior a 7 e através da aferição do escore Atopic Dermatitis Antecubital Severity (ADAS). Em paralelo, os principais critérios de exclusão foram Quadro cutâneo instável definido por pelo menos um dos seguintes critérios nos últimos 3 meses: troca de medicação sistêmica, uso de antibiótico oral, internação devido à DA. Anti-histamínicos orais foram permitidos, desde que sejam mantidos na dose anterior ao início do estudo e não ter realizado a mudança no tratamento tópico no mês anterior ao início do estudo.

2.2. Testes de Cultura (Identificação Bioquímica *S. aureus* e *S. epidermidis*)

Um dia antes da coleta da amostra, os pacientes foram instruídos a não lavar a região ou aplicar a emulsão de sinvastatina, ou placebo na lesão alvo por 24 h. No momento da coleta referente ao dia 01 de tratamento, as amostras de pele foram retiradas com swabs estéreis previamente mergulhados em uma solução de NaCl 0,9% e Tween 0,1% (swabs com aplicadores com ponta de poliéster estéril, e Swab, Copan), antes de serem esfregados firmemente na lesão alvo por 10 vezes (área 8 cm²) adultos (área 4 cm²) crianças (NIEMEYER-VAN DER KOLK 2020). Após o esfregado os swabs foram acondicionadas em seus devidos tubos originais imersos na solução referida (BLANCHET-RÉTHORÉ et al., 2017).

Após a coleta, em um período de 6 h as amostras foram inoculadas em placas de Petri contendo meio seletivo ágar manitol-sal e ágar sangue e incubadas por até 48 h em aerobiose à 37°C. As colônias retiradas da placa de ágar seletivo (manitol-sal) foram avaliadas quanto a presença de mudança de coloração (halos amarelos), presuntivo de *S. aureus* enquanto coloração inalterada ao redor das colônias foram consideradas crescimento presuntivo de espécies de *Staphylococcus* coagulase negativo (CoNS). Para a confirmação da identificação de *S. aureus* e *S. epidermidis* a partir do meio de cultura sal manitol, colônias foram crescidas em caldo TSB e em meio TSA por 24 h a 37°C. A partir desse crescimento, foram realizados os testes a seguir para confirmação das espécies:

Tabela 01: Testes bioquímicos para caracterização dos microrganismos encontrados nos isolados clínicos pré e pós-tratamento com a emulsão estudada.

Teste	Procedimento	Resultado esperado
Catalase	As colônias selecionadas foram colocadas em uma lâmina de vidro, adicionando 1 gota de peróxido de hidrogênio a 3% e em seguida foi verificado a formação de bolhas de oxigênio	Reação positiva confirmação do gênero <i>Staphylococcus</i> spp.
Coagulase em tubo	As colônias selecionadas foram colocadas em 200 µL de plasma de coelho com EDTA e posteriormente os tubos foram incubados por 4 h a 37 °C.	Coagulase Positiva → <i>S. aureus</i> ; Negativa → <i>CoNS</i>
DNase	As culturas foram crescidas por 24h e semeadas em formato de risco em placas de ágar DNase. Após incubação a 37 °C por 24 h, foi	Positivo para DNase → <i>S. aureus</i>

	adicionado nas placas 2 mL de uma solução de HCl 1M. Após 1 minuto, a formação de uma zona clara ao redor das colônias foi considerada positiva para DNase.	Negativo → presuntivo de <i>S. epidermidis</i> .
Aglutinação em látex	Aglutinação em látex foi utilizado para detectar a coagulase livre e uma imunoglobulina antiproteína A presente da parede do <i>S. aureus</i> . O teste foi realizado segundo instruções dadas pelo fabricante.	Positivo → <i>S. aureus</i> . Sem aglutinação → <i>S. epidermidis</i>
Teste de Novobiocina	As cepas foram semeadas com auxílio de um swab em placa de Mueller Hinton e após foi acrescido um disco teste de novobiocina (5 mcg). Por fim, as placas foram incubadas à 35°C por 24h. A formação de halos ao redor da colônia foram quantificados por meio de um paquímetro.	Sensível → <i>S. epidermidis</i> Resistentes → <i>S. saprophyticus</i>
Teste da Bacitracina	A cepa será semeada com auxílio de um swab em placa de Mueller Hinton e após será acrescido um disco teste de bacitracina contendo (0,4U). Em seguida as placas foram incubadas por 24h à 35°C e a formação de halo foi verificada com auxílio de um paquímetro.	A ausência de halo será positiva para a espécie <i>Staphylococcus spp</i> e presença de halo <i>Micrococcus</i> .

2.4 Formação de Biofilme

O potencial das cepas isoladas dos pacientes na formação de biofilme (n=11) cutâneo foram realizados com uma amostra de cada paciente incluindo no estudo, no tempo 0, ou seja, durante a primeira visita do estudo. Além disso, as cepas de microrganismos utilizadas como padrão foram: *S. aureus* ATCC 29213 (MSSA), *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA; gene *mecA* presente) e *S. aureus* ATCC 6538. Esse ensaio foi realizado em placas de microtitulação de poliestireno de 96 poços conforme descrito anteriormente, (Ferreira et al., 2021) com modificações. Vinte microlitros de uma suspensão bacteriana em salina estéril correspondente ao padrão 0,5 de McFarland foram adicionados em triplicata aos poços contendo 180 µl de caldo BHI (Brain Heart Infusion, Difco), suplementado com 1% glicose (Isofar; Duque de Caxias, RJ, Brasil). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após a formação do biofilme a placa foi incubada a 60°C por 1 hora para fixação. Após, o biofilme foi corado com cristal violeta 2% (p/v) por 15 minutos. O cristal violeta foi removido e foi adicionado etanol 95% (v/v) por 15 minutos. A densidade óptica (DO) de cada poço foi medida a 570 nm usando um espectrofotômetro de microplacas. Os resultados foram analisados conforme descrito (Stepanović et al., 2007), sendo considerado Formador fraco (+) de biofilme aquelas cepas que a densidade óptica (DO) foi observada em $\leq 2 \times DO$ controle negativo ($OD_c = DO$ médio do controle negativo + $(3 \times \text{desvios padrão do controle negativo})$), formador de biofilme moderado (++) onde a DO apresentou entre 2 até 4 vezes o valor encontrado para o controle e formador de biofilme forte (+++) aqueles que apresentaram um valor de DO maior que 4 vezes o controle.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

3.2 Identificação dos Isolados.

Os pacientes do estudo foram avaliados no T0 (visita 01) e T28 (visita 02) em lesões nos braços esquerdo e direito, sendo aleatorizado individualmente qual lado foi utilizado a formulação placebo e a formulação teste. Após a coleta foi desenvolvida a caracterização dos isolados, por meio dos testes bioquímicos. Foram selecionados 16 pacientes ao longo da execução do projeto, porém, apenas 11 dos mesmos vieram na visita 01 e visita 02. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela abaixo:

Tabela 02: Caracterização das cepas *S. aureus* e *S. epidermidis* encontradas nos isolados dos paciente no T0 (Visita 01) e T28 (Visita 02).

Teste	Visita 1				Visita 2			
	<i>S. aureus</i>		<i>S epidermidis.</i>		<i>S. aureus</i>		<i>S epidermidis.</i>	
	Esquerda	Direita	Esquerda	Direita	Esquerda	Direita	Esquerda	Direita
P15	+	+	+	+	+	+	+	+
P16	-	-	-	+	+	-	+	+
P17	+	+	+	+	+	+	-	+
P19	-	-	+	+	-	-	+	+
P20	-	-	+	-	-	-	+	+
P21	+	+	-	+	+	+	+	+
P22	+	+	+	+	+	+	+	+
P23	+	+	-	+	+	+	+	+
P27	+	+	+	+	-	+	+	+
P29	+	+	-	-	-	-	-	+
P30	+	+	+	+	+	+	+	+

Legenda: (+) presença desse microrganismo no isolado; (-) ausência do microorganismo isolado

3.2 Quantificação Bacteriana

Os testes de quantificação foram realizados em meio ágar sangue para contagem bacteriana total e em meio manitol para contagem de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Foi possível observar que em 6 pacientes tiveram uma queda nas unidades formadoras de colônias no grupo sinvastatina, enquanto o placebo foi observado uma queda em 5 pacientes. A figura abaixo, traz a análise dos valores da média de UFC/mL, comparando os resultados pré e pós tratamento.

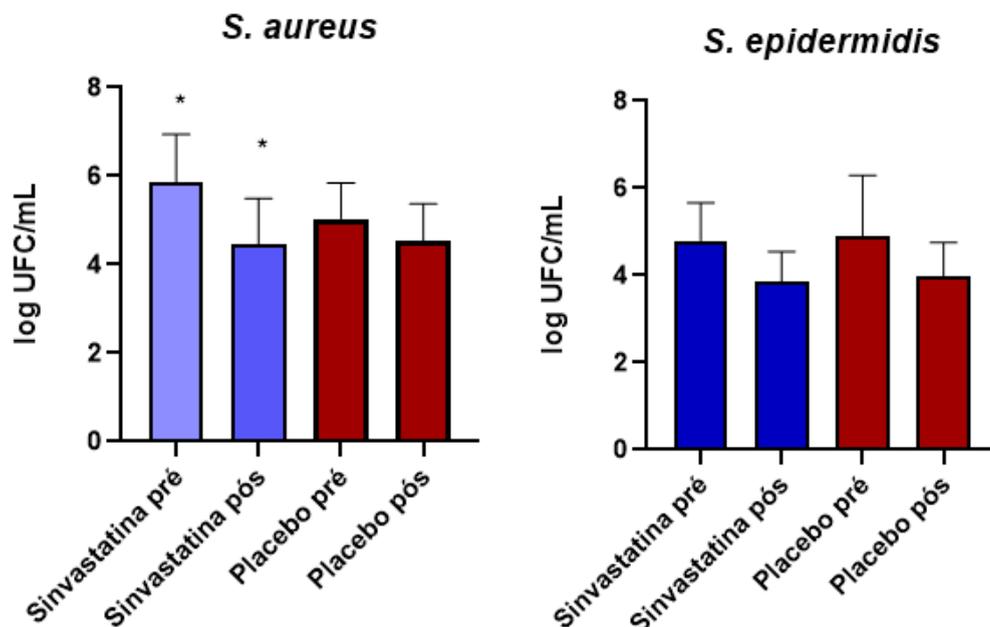


Figura 1 A: Estão representados os valores de média e desvio padrão de log de UFC/mL das contagens de *S. aureus*, selecionados de amostras de lesões de indivíduos com DA. Houve diferença estatisticamente significativa nas contagens de *S. aureus* (ANOVA) $p = 0,034$ no intergrupo sinvastatina e placebo e no intragrupo da sinvastatina antes e após o tratamento $p = 0,037$, mas não no intragrupo do placebo $p = 0,74$.

Na Figura 1 B: Estão representados os valores de média e desvio padrão de log de UFC/mL das contagens de *S. epidermidis* retirados de lesões de DA antes e após o tratamento com emulsão de sinvastatina, não houve diferença

estatística entre os grupos nos períodos avaliados $p = 0,05$ (ANOVA) na análise intergrupo. Não houve diferença estatisticamente significativa antes e após o tratamento com emulsão de sinvastatina $p = 0,158$ e placebo $p = 0,217$.

3.3 Formação de biofilme

Os fenótipos de formação de biofilme encontram-se na Tabela 03 abaixo:

Tabela 03: Fenótipo de formação de biofilme em placas dos isolados clínicos de *S. aureus*

RESULTADOS - Formação de biofilme													
p01	p05	p07	p10	p11	p12	p15	p22	p23	p27	p30	ATCC 29213	ATCC 43300	ATCC 6538
+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	+++

Pode ser observado acima que aproximadamente 90% dos pacientes tiveram cepas com o índice de formação de biofilme caracterizado como forte, dessa forma, o resultado do presente estudo corrobora com estudo em que avaliou a capacidade de formação de biofilme em pacientes com DA e 85% das espécies avaliadas foram fortes produtores de biofilmes, enquanto 15% foram moderadamente formadores (ALLEN et al., 2014).

5. CONCLUSÕES:

Em conclusão, observou-se que a maioria das cepas de *S. aureus* apresentaram alta capacidade de formação de biofilme. Essa característica de virulência pode contribuir com o desenvolvimento e severidade da doença. Ainda, observou-se que o tratamento com sinvastatina foi capaz de reduzir a quantidade de *S. aureus*, sem afetar a quantidade de *S. epidermidis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLEN, Herbert B. et al. The presence and impact of biofilm-producing staphylococci in atopic dermatitis. *JAMA dermatology*, v. 150, n. 3, p. 260-265, 2014.
2. Blanchet-Réthoré S, Bourdès V, Mercenier A, Haddar CH, Verhoeven PO, Andres P. Effect of a lotion containing the heat-treated probiotic strain *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 on *Staphylococcus aureus* colonization in atopic dermatitis. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2017 Jul 3;10:249-257. doi: 10.2147/CCID.S135529. PMID: 28721083; PMCID: PMC5501445.
3. Blicharz L, Usarek P, Młynarczyk G, Skowroński K, Rudnicka L, Samochocki Z. Nasal Colonization by Staphylococci and Severity of Atopic Dermatitis. *Dermatitis*. 2020 May/Jun;31(3):215-222. doi: 10.1097.
4. CLSI, Clinical & Laboratory Standards Institute. Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana: 15o Suplemento Informativo. M100 - S15. ed. [S. l.]: ANVISA, 2005.
5. DI DOMENICO, Enea Gino et al. *Staphylococcus aureus* and the cutaneous microbiota biofilms in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Microorganisms*, v. 7, n. 9, p. 301, 2019.
6. FERREIRA, Magda et al. Liposomes as a nanoplatform to improve the delivery of antibiotics into *Staphylococcus aureus* biofilms. *Pharmaceutics*, v. 13, n. 3, p. 321, 2021.
7. Gonzalez T, Biagini Myers JM, Herr AB, Khurana Hershey GK. Staphylococcal Biofilms in Atopic Dermatitis. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2017 Oct 23;17(12):81. doi: 10.1007/s11882-017-0750-x.
8. Gonzalez T, Stevens ML, Baatyrbek Kyzy A, Alarcon R, He H, Kroner JW, Spagna D, Grashel B, Sidler E, Martin LJ, Biagini Myers JM, Khurana Hershey GK, Herr AB. Biofilm propensity of *Staphylococcus aureus* skin isolates is associated with increased atopic dermatitis severity and barrier dysfunction in the MPAACH.
9. Niemeyer-van der Kolk T, van der Wall H, Hogendoorn G K, Rijnveld R, Luijten S, van Alewijk C J G D, H A van den Munckhof H A H, et al. Pharmacodynamic Effects of Topical Omiganan in Patients With Mild to Moderate Atopic Dermatitis in a Randomized, Placebo-Controlled, Phase II Trial. *Clin Transl Sci* Apr 21. doi: 10.1111/cts.12792.
10. STEPANOVIĆ, Srdjan et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*, v. 115, n. 8, p. 891-899, 2007.
11. THYSSEN, Jacob P. et al. Comorbidities of atopic dermatitis—what does the evidence say?. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 151, n. 5, p. 1155-1162, 2023.
12. WEIDINGER S, et al. Atopic dermatitis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4(1)
13. WOLLENBERG, Andreas et al. Atopic Dermatitis in Children and Adults: Diagnosis and Treatment. *Deutsches Ärzteblatt International*, v. 120, n. 13, p. 224, 2023.