



Identificação e quantificação de *Staphylococcus aureus* MRSA em pacientes com dermatite atópica antes e após tratamento com uma emulsão de sinvastatina

Palavras-Chave: *Staphylococcus aureus* resistente à metilina, dermatite atópica, sinvastatina, protocolos clínicos

Autores/as:

Ana Carolina Silveira Risk, FCF, UNICAMP

Sindy Magri Roque (doutoranda) 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 condição imuno-inflamatória crônica cujos sintomas são pruridos, xerose cutânea e lesões eczematosas (Laurent et al., 2017). Entre as doenças recorrentes na pele a DA é uma das mais prevalentes e a maioria dos casos se inicia na infância, podendo ser persistente ou não na fase adulta (Guttman-Yassky et al., 2011; Ständer, 2021).

Um dos principais desafios no manejo da DA, são as cepas de *S. aureus* resistente à metilina (MRSA), pois estas podem estar presente em até 55% dos casos de colonização por *S. aureus* (Cavalcanti et al., 2021). Um estudo de coorte relatou que pacientes com DA infectados com MRSA possuem uma diversidade microbiana inferior em comparação com a pele de indivíduos MSSA (*Staphylococcus aureus* sensível à metilina), ainda nesse estudo foi possível compreender que a colonização por MRSA da pele com DA está intimamente relacionada com a disbiose na microbiota da pele com DA, o que pode levar a uma inflamação cutânea nestes pacientes é mais grave (Kim et al., 2019).

A sinvastatina, um importante agente hipolipemiante demonstrou efeitos contra *S. aureus*, inclusive para MRSA (GRAZIANO et al., 2015). Além disso, exibiu excelente atividade antibiofilme contra biofilmes estafilocócicos estabelecidos e demonstrou a capacidade de ser combinada com antimicrobianos tópicos atualmente usados para tratar infecções MRSA (Tangamani et al., 2015).

Sendo assim, a colonização por MRSA pode agravar a DA e os fatores de virulência produzidos por este patógeno podem desempenhar um papel significativo nas manifestações da doença. A identificação deste agente pode ser importante tanto para o manejo de tratamentos futuros como na prevenção da resistência a antibióticos. Para esse fim, a utilização de uma emulsão de sinvastatina poderia oferecer muitas vantagens tanto no controle microbiológico da doença como na possível redução da inflamação e controle da disbiose causada por MRSA.

2. MATERIAS E MÉTODOS:

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). Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP (CEP) sob parecer nº 36550820.6.0000.5404.

2.2 Desenvolvimento formulações F_{sinv} e F_{placebo}

As formulações foram desenvolvidas de acordo com as proporções descritas na tabela 1. As fases aquosas e oleosas foram aquecidas separadamente à temperatura de 75 °C aproximadamente. Atingida a temperatura a fase aquosa foi vertida lentamente sobre a fase oleosa sob agitação com auxílio de agitador mecânico a 600 rpm. Depois, quando a temperatura atingiu cerca de 40 °C, foi adicionado o conservante (proteg SL). E após a redução

da temperatura para 30 °C a sinvastatina foi adicionada lentamente e foi mantida em agitação constante por 10 minutos. Da mesma maneira, e proporções a Fplacebo foi desenvolvida, mas não foi adicionado a sinvastatina. As formulações passaram por testes de estabilidades em centrifugação, verificação do pH e características organolépticas, por 90 dias.

Tabela 1. Composição das formulações desenvolvidas com sinvastatina 1% e sem sinvastatina (placebo).

| Componentes | Fsinv (%) | Fplacebo (%) |
|------------------|-----------|--------------|
| Xalifin | 20 | 20 |
| BHT | 0,05 | 0,05 |
| Água | qsp | qsp |
| Propileno glicol | 7 | 7 |
| Transcutol P | 10 | 10 |
| sinvastatina | 1 | 0 |
| Proteg SL | 0,5 | 0,5 |

2.3 Utilização da emulsão de sinvastatina e coleta da amostra

Os pacientes foram instruídos a não usar corticoides, hidratantes e antibióticos tópicos por 14 dias nas lesões tratadas com emulsão de sinvastatina e nas lesões que receberam somente a base da emulsão (placebo) por 14 dias. No momento das coletas (dia 0 e dia 28), amostras das lesões tratadas foram coletadas com esfregaços com auxílio de swabs estéreis previamente mergulhados em uma solução de NaCl 0,9 % e- Tween 0,1% (área 4 cm²) (NIEMEYER-VAN DER KOLK 2020).

2.4. Avaliação microbiológica das amostras

Após a coleta das amostras, elas foram submetidas a métodos de cultura para quantificação total de microrganismos utilizando meio ágar sangue, bem como para a determinação de *S. aureus* MSSA e MRSA.

2.4.1. Processamento das amostras

Após a coleta, os swabs foram cortados com uma tesoura e vortexados por 1 minuto em solução de NaCl 0,9% e tween 20 0,01%. Após esse processo, uma alíquota de 50 µL foi semeada em placas de petri contendo meio manitol-sal (seleção de *S. aureus*) e 50 µL em meio TSA ágar com 5% de sangue de carneiro (contagem total de microrganismos aeróbios) e posteriormente, incubadas por até 48 h em aerobiose a 37 °C.

2.5. Testes bioquímica

Para a identificação das cepas *S. aureus* foram realizados testes de fermentação em manitol, DNase, catalase, coagulase e aglutinação em látex (DrySpot)

2.6. Método de Difusão em Disco (cefotaxima)

Para verificar a resistência à oxacilina mediada pelo *gene mecA* deve-se testar a cefotaxima e reportar o resultado para oxacilina. Para controle na qualidade de execução, foram utilizadas cepas padrão de *S. aureus* ATCC 25923 e foram testados sobre as mesmas condições de meio de cultivo e incubação. Para confirmação do gênero *Staphylococcus spp*, foram utilizados discos de Bacitracina. O teste com disco de Novobiocina foi realizado para diferenciar *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus saprophyticus*.

A realização deste teste foi baseada nas recomendações do CLSI/NCCLS (2005). Para a interpretação dos resultados foi utilizado as condições de testes padrão de disco difusão de oxacilina e incubação durante 24 horas; ou após 18 horas quando resistente. *S. aureus* cujos halos de inibição da cefotaxima forem ≤ 21 mm serão relatados como resistentes à oxacilina. Aqueles cujos halos de inibição da cefotaxima forem ≥ 22 mm serão relatados como sensíveis à oxacilina. Para interpretação do resultado de bacitracina, caso não haja presença de halo, tendo resultado resistente e identificação do gênero *Staphylococcus spp*. Por fim, para a interpretação do antibiótico de novobiocina para halos < 16 mm são sensíveis, identificando *Staphylococcus epidermidis* e ≥ 16 são considerados resistentes identificados como *Staphylococcus saprophyticus* (CLSI/2020).

2.7. Reação da polimerase em cadeia quantitativo em tempo real qRT-PCR para identificação de gene *mecA*

As amostras de swab da pele foram descongeladas e centrifugadas a 12000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram então ressuspensas em tampão Tris-EDTA pH 7,0. A extração do DNA genômico das amostras foi realizada por meio do kit PureLink™ Genomic DNA Purification Kit

(Thermo Fischer - Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizados pares de primers para a quantificação de *S. aureus* MRSA. Os primers já foram utilizados anteriormente; *mecA* - forward 5' ACTGCTATCCACCCTCAAAC-3' *mecA* - reverse CTGGTGAAGTTGTAATCTGG-3' (Mehotra et al., 2000).

A PCR foi realizada em termociclador em tempo real (StepOne®, Applied Biosystems, Grand Island, NY, EUA), utilizando o Sybrgreen™ Universal PCR Master Mix (ThermoFischer), segundo as recomendações do fabricante. As condições iniciais dos ciclos são: 50°C por 2 min; 95°C por 2 min; e 40 ciclos de 95°C, 15 s; 60°C, 30 s. Foi realizada quantificação absoluta através da comparação do Ct (ciclo no qual a fluorescência se torna detectável acima da fluorescência de fundo (background), e é inversamente proporcional ao logaritmo do número de moléculas iniciais alvo obtido das amostras com os valores de Ct determinados de uma curva padrão (101 – 108 ufc/ml, a partir da comparação com curva padrão obtida com as cepas padrões para cada espécie analisada).

O controle negativo para especificidade do gene foi realizado com *S.aureus* (MSSA) ATCC 29213 não portador do gene *mec-A*.

2.8. Análise dos dados

A análise estatística será realizada posteriormente, com um número maior de pacientes incluídos. Os dados da análise de cultura serão comparados com os dados da qRT-PCR e serão correlacionados. Os dados serão reportados utilizando estatística descritiva (média, desvio padrão, frequência). A comparação dos desfechos antes e após a intervenção (droga vs placebo) será feita com teste t de Student pareado ou Wilcoxon-signed rank test a depender da distribuição dos dados (normal ou não normal). Em todas as análises valores de $p < 0.05$ serão considerados significativos. O software SYSTAT.v13.0 será utilizado para análise dos dados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

3.1 Quantificação Bacteriana

Até o momento, foram selecionados 12 pacientes entre 2 e 24 anos. Os testes de quantificação foram realizados em meio ágar sangue para contagem bacteriana total e em meio manitol para contagem de *Staphylococcus aureus*. A análise estatística dos dados não foi realizada. No entanto, os resultados apontam para uma não diferença entre os grupos placebo e sinvastatina na quantidade total de bactérias e da espécie *S. aureus*.

Tabela 01: Contagens bacterianas totais e específicas para *S. aureus* (em logaritmo de unidades formadoras de colônias por mL - UFC/mL)

| | Visita 1 | | | | Visita 2 | | | |
|-------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|
| | Sinvastatina | | Placebo | | Sinvastatina | | Placebo | |
| Teste | <i>S.aureus</i> | Bactérias Totais | <i>S.aureus</i> | Bactérias Totais | <i>S.aureus</i> | Bactérias Totais | <i>S.aureus</i> | Bactérias Totais |
| Paciente 01 | 1,89E+06 | 2,31E+06 | 2,10E+06 | 2,04E+06 | 3,00E+04 | 1,00E+00 | 3,00E+05 | 3,00E+05 |
| Paciente 04 | 5,34E+05 | 3,60E+05 | 6,00E+04 | 3,30E+05 | 1,83E+05 | 3,00E+06 | 3,90E+05 | 3,87E+06 |
| Paciente 05 | 4,83E+05 | 6,30E+05 | 1,20E+06 | 9,00E+05 | 1,00E+00 | 1,41E+06 | 3,00E+05 | 1,20E+07 |
| Paciente 07 | 7,44E+04 | 7,65E+04 | 1,80E+05 | 2,40E+05 | 5,01E+04 | 6,69E+04 | 3,00E+04 | 3,00E+04 |
| Paciente 10 | 6,00E+03 | 3,60E+04 | 9,00E+03 | 6,00E+03 | 9,60E+04 | 6,30E+04 | 7,80E+04 | 1,02E+05 |
| Paciente 11 | 4,65E+05 | 7,20E+06 | 2,70E+04 | 4,50E+05 | 2,10E+05 | 3,00E+06 | 1,39E+05 | 1,56E+06 |
| Paciente 12 | 1,23E+07 | 1,35E+07 | 4,50E+05 | 3,90E+05 | 6,00E+05 | 1,20E+06 | 2,13E+06 | 1,35E+06 |
| Paciente 13 | 2,70E+03 | 8,34E+04 | 9,00E+02 | 1,50E+06 | 1,11E+04 | 1,95E+04 | 1,00E+00 | 1,00E+00 |
| Paciente 15 | 1,16E+08 | 2,46E+06 | 1,71E+06 | 2,61E+06 | 6,00E+04 | 1,20E+05 | 0 | 1,20E+05 |
| Paciente 16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3,00E+04 | 3,00E+04 | 6,00E+04 |
| Paciente 17 | 2,40E+05 | 7,50E+05 | 1,80E+05 | 2,10E+05 | 3,00E+04 | 6,00E+04 | 0 | 3,00E+04 |
| Paciente 18 | 0 | 4,20E+05 | 0 | 9,00E+04 | | | | |

3.2 Resultados dos testes de difusão em disco (Cefoxitina e Oxacilina)

Os Métodos de Difusão em Disco de Cefoxitina e Oxacilina tem como resultado halos ≤ 21 mm cepas resistentes (R) e aqueles cujos halos de inibição foram ≥ 22 mm possuem cepas sensíveis (S). Dos 12 pacientes avaliados, 9 pacientes não apresentaram resistência à Cefoxitina e Oxacilina, enquanto 3 pacientes apresentaram resistência aos antibióticos (Tabela 02).

Tabela 02. Resultado dos halos de disco de antibiótico.

| Teste | Disco de Antibiótico | | | | | | | |
|--------------------|----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|------------|
| | Cefoxitina | | | | Oxacilina | | | |
| Visitas | T0 | | T28 | | T0 | | T28 | |
| Fórmula | Sinv | Placebo | Sinv | Placebo | Sinv | Placebo | Sinv | Placebo |
| Paciente 01 | 27,49 (S) | 27,97 (S) | 28,99 (S) | 30,05 (S) | 18,09 (R) | 20,72 (R) | 23,03 (S) | 23,53 (S) |
| Paciente 04 | 12,74 (R) | 12,82 (R) | 13,21 (R) | 11,95 (R) | 16,95 (R) | 14,80 (R) | 17,13 (R) | 14,97 (R) |
| Paciente 05 | 30,27 (S) | 11,25 (R) | ----- | 10,22 (R) | 11,91 (R) | S/halo (R) | ----- | S/halo (R) |
| Paciente 07 | 35,62 (S) | | 33,73 (S) | 30,50 (S) | 24,62 (S) | 25,15 (S) | 25,76 (S) | 23,53 (S) |
| Paciente 10 | 33,50 (S) | 33,94 (S) | 34,54 (S) | 33,65 (S) | 26,32 (S) | 26,98 (S) | 24,89 (S) | 23,22 (S) |
| Paciente 11 | 34,71 (S) | 35,18 (S) | 28,82 (S) | 28,05 (S) | 24,13 (S) | 25,92 (S) | 23,30 (S) | 23,28 (S) |
| Paciente 12 | 33,62 (S) | 34,77 (S) | 37,68 (S) | 37,32 (S) | 25,36 (S) | 24,88 (S) | 30,34 (S) | 26,62 (S) |
| Paciente 13 | 49,83 (S) | 44,63 (S) | 42,40 (S) | 36,11 (S) | 32,18 (S) | 36,65 (S) | 35,47 (S) | 29,83 (S) |
| Paciente 15 | 39,04 (S) | 33,38 (S) | 31,37 (S) | 30,86 (S) | | | 23,88 (S) | 24,09 (S) |
| Paciente 16 | ----- | 32,32 (S) | 32,32 (S) | 34,76 (S) | ----- | | 26,87 (S) | 28,09 (S) |
| Paciente 17 | 34,78 (S) | 32,00 (S) | | | | | | |
| Paciente 18 | 40,29 (S) | | 26,92 (S) | | | | | |

3.3 Análise de dados para identificação de gene *mec-A* (Controle de especificidade de gene)

Os resultados apresentados na Tabela 04 mostraram a presença de *mec-A* em todos os pacientes, porém, em concentrações pequenas. Os resultados da quantificação foram comparados e confirmados com os testes bioquímicos e difusão em disco realizados neste projeto. A comparação entre eles coincidiu com os dados obtidos do gene *mec-A*. No entanto, o paciente 12 expressou gene *mec-A* embora no teste de difusão em disco com antibiótico não foi detectado resistência.

A análise de dados do gene *mec-A* via qRT-PCR não foi finalizada até o presente momento.

Tabela 04: Resultado da quantificação total de pacientes gene *mec-A*

| | Quantificação total de pacientes gene <i>mec-A</i> | | | |
|--------------------|--|----------|----------|----------|
| | Sinv | | Placebo | |
| | Visita 1 | Visita 2 | Visita 1 | Visita 2 |
| Paciente 01 | 9,26E+03 | 6,69E+02 | 1,03E+03 | 2,77E+03 |
| Paciente 04 | 3,44E+04 | 2,30E+04 | 2,46E+04 | 4,52E+04 |
| Paciente 05 | 3,04E+04 | 1,68E+01 | 2,53E+04 | 6,94E+03 |
| Paciente 07 | 8,54E+02 | 2,15E+02 | 3,49E+02 | 6,59E+01 |
| Paciente 10 | 7,17E+01 | 3,75E+00 | 3,15E+01 | 1,05E+01 |
| Paciente 11 | 1,62E+01 | 4,80E+01 | 3,50E+01 | 3,75E+01 |
| Paciente 12 | 4,26E+05 | 1,46E+02 | 4,47E+03 | 1,04E+03 |
| Paciente 13 | 2,47E+01 | 1,77E+01 | 0 | 9,40E+00 |

4. CONCLUSÕES:

Os pacientes, em sua maioria, tiveram a presença de *Staphylococcus aureus* confirmada em região experimental e controle pelos testes bioquímicos. Ainda não foi possível concluir se houve redução de *S. aureus* MSSA e MRSA nas áreas tratadas com sinvastatina em comparação com as tratadas com placebo. No entanto,

pode-se observar presença de MRSA, em menor proporção nos pacientes com dermatite atópica, mostrando uma leve tendência da diminuição de MRSA em pacientes tratados com sinvastatina.

5. BIBLIOGRAFIA

CLSI, Clinical & Laboratory Standards Institute. Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana: 15o Suplemento Informativo. M100 - S15. ed. [S. l.]: ANVISA, 2005.

CLSI, Clinical & Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: . M100 - 30th Edition, 2020.

KIM J, et al. Interações entre dermatite atópica e infecção por *Staphylococcus aureus* : implicações clínicas. *Alergia Asma Immunol Res* . 2019;11(5):593-603.

NIEBUHR M, MAI U, KAPP A, WERFEL T. Antibiotic treatment of cutaneous infections with *Staphylococcus aureus* in patients with atopic dermatitis: current antimicrobial resistances and susceptibilities. *Exp Dermatol*. 2008 Nov;17(11):953-7.

MEHROTRA M, WANG G, JOHNSON WM. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J Clin Microbiol*. 2000 Mar;38(3):1032-5.

NIEBUHR M, MAI U, KAPP A, WERFEL T. Antibiotic treatment of cutaneous infections with *Staphylococcus aureus* in patients with atopic dermatitis: current antimicrobial resistances and susceptibilities. *Exp Dermatol*. 2008 Nov;17(11):953-7.

STÄNDER S. Atopic Dermatitis. *N Engl J Med*. 2021 Mar 25;384(12):1136-1143.