

CELINA VIEIRA DA CUNHA GUEDES ALVARENGA

Caracterização de amostras de *Staphylococcus aureus*
isoladas de pacientes pediátricos com dermatite atópica e
relação com amostras de contactantes



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

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**

**RIO DE JANEIRO
Dezembro/2016**

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Kátia Regina Netto dos Santos e co-orientação dos Professores Fernanda Sampaio Cavalcante e Dennis Carvalho Ferreira.

FICHA CATALOGRÁFICA

V
472
c

Vieira da Cunha Guedes Alvarenga, Celina
Caracterização de amostras *Staphylococcus aureus*
isoladas de crianças com dermatite atópica e relação
Com amostras de contactantes / Celina Vieira
Da Cunha Guedes Alvarenga. -- Rio de Janeiro,
2016.
69 f.

Orientadora: Kátia Regina Netto dos
Santos. Coorientadora: Fernanda
Sampaio Cavalcante. Trabalho de
conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Instituto de Microbiologia, Bacharel em
Ciências Biológicas: Microbiologia e
Imunologia, 2016.

1. Dermatite atópica. 2. contactantes. 3. *Staphylococcus aureus*. 4. Colonização Nasal. 5. Clonalidade. I. Regina Netto dos Santos, Kátia, orient. II. Sampaio Cavalcante, Fernanda, coorient. III. Título

FOLHA DE APROVAÇÃO

CELINA VIEIRA DA CUNHA GUEDES ALVARENGA

CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLADAS
DE PACIENTES PEDIÁTRICOS COM DERMATITE ATÓPICA E RELAÇÃO COM
AMOSTRAS DE CONTACTANTES

Rio de Janeiro, 14 de dezembro de 2016.

(Sérgio Eduardo Longo Fracalanza, Professor Titular, IMPPG)

(Thainá da Costa Miranda, Doutoranda, IMPPG)

(Karla Rodrigues Miranda, Doutora, IMPPG)

(Regina Maria Cavalcanti Pilotto Domingues, Professora Titular, IMPPG)

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus por ter me ouvido nos momentos difíceis e ter me dado forças para continuar firme apesar de todas as dificuldades.

Agradeço a minha mãe Cleide e minha irmã Ana Carolina, que são a base da minha vida, a razão pelo qual eu busco dar o meu melhor, pensando sempre em orgulhá-las o máximo possível. Estivemos sempre juntas em todas as etapas importantes, e eu não teria dado sequer um passo sem a força e o apoio de vocês.

Ao João, por todo incentivo e apoio e por acreditar em mim mais do que eu mesma.

Às minhas amigas de classe Amanda, Caroline Esther, Caroline Monteiro, Gabriela e Luana por me acompanharem durante toda a trajetória nesses 4 anos, por não me deixarem desistir e mostrar que juntas sempre somos melhores.

À prof. Kátia Regina Santos, por ter aberto a mim às portas do LIH, ter acreditado no meu trabalho e permitido que tudo isso se tornasse real.

Minha eterna gratidão à minha coorientadora Fernanda Cavalcante, que foi simplesmente incrível durante todos esses anos. Não caberia em palavras o quanto eu tenho a agradecer por toda compreensão, atenção e por dividir o tempo do Dudu comigo. Tive imensa sorte por tê-la como co-orientadora.

A toda equipe do Laboratório de Infecção Hospitalar: Tamara, Andréia, Vanessa, Dayane, Thainá, Thais, Rosana, Raiane, Pryscilla, Veronica, Roberta e também a todos que passaram pelo laboratório ao longo desses 3 anos e meio. Em especial, à Fernanda, Tamara e Andréia pela saga interminável do PFGE, que após longos meses de gestação, nasceu com saúde.

Ao Dennis pela colaboração em vários momentos, em especial, nas análises dos últimos dados.

A toda equipe da Dermatite Atópica, que possibilitou a realização deste trabalho e à todas as famílias que aceitaram participar.

Ao Marlei Gomes, pela ajuda em absolutamente tudo, todas as vezes que precisamos.

Ao professor Sérgio Fracalanza, pelo carinho e atenção, através de ótimos conselhos e orientações para o meu futuro.

À Thaina Miranda, Karla Miranda e aos Professores Sérgio Fracalanza e Regina Cavalcanti que aceitaram gentilmente participar da avaliação deste trabalho.

À Universidade Federal do Rio de Janeiro, que me acompanha desde o jardim da infância, e ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, meu cativo durante esses 4 anos e que proporcionou toda estrutura para meu desenvolvimento profissional.

Ao CNPq, CAPES e FAPERJ, pelo suporte financeiro que permite nosso trabalho.

Nenhuma batalha é vencida sozinha. Muito obrigada a todos!

“Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!”

Mario Quintana.

Sumário

RESUMO	vii
ABSTRACT	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	ix
I. INTRODUÇÃO.....	1
1. Dermatite atópica	1
1.2. Epidemiologia.....	3
1.3. Quadro Clínico	4
1.4. Diagnóstico e acompanhamento da D.A.....	4
2. Gênero <i>Staphylococcus</i>	8
2.1. Espécie <i>Staphylococcus aureus</i>	8
2.1.1. Resistência à metilina/oxacilina	9
2.1.2. Virulência e patogenia.....	10
2.1.3. Aspectos relativos à clonalidade de amostras.....	11
2.1.4. <i>Staphylococcus aureus</i> e a dermatite atópica	13
II. JUSTIFICATIVA	16
III. OBJETIVOS.....	17
IV. MATERIAIS e MÉTODOS.....	18
1. Caracterização do estudo e local.....	18
1.1. Critérios.....	18
1.2. Grau de Gravidade Index Scrad.....	19
2. Análises Microbiológicas.....	20
2.1. Caracterização fenotípica.....	20
2.2. Caracterização molecular.....	21
3. Análise estatística.....	25
V. RESULTADOS.....	27
1. Amostras incluídas no estudo.....	27
2. Susceptibilidade à cefoxitina e caracterização do SCCmec.....	27
3. Determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos em geral	28
4. Presença do gene da PVL em amostras de pacientes e contactantes	30
4. Análise da similaridade genética entre amostras de <i>S. aureus</i> de pacientes e de contactantes.....	31
6. Perfil clínico e demográfico dos pacientes e contactantes do estudo incluídos no estudo	32
VI. DISCUSSÃO.....	37
VII. CONCLUSÕES.....	42
VIII. BIBLIOGRAFIA	43
IX. ANEXOS.....	53

Resumo

Celina Vieira da Cunha Guedes Alvarenga**CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
ISOLADAS DE CRIANÇAS COM DERMATITE ATÓPICA E RELAÇÃO COM
AMOSTRAS DE CONTACTANTES****Orientadora: Kátia Regina Netto dos Santos****Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

A dermatite atópica (DA) é uma doença cutânea crônica que afeta até 20% da população pediátrica mundial e cujos sintomas são prurido, xerose cutânea e lesões eczematosas. O SCORAD (“Scoring Atopic Dermatitis”) é um dos índices utilizados para classificar a gravidade das lesões da DA. Um dos fatores associados ao desencadeamento da doença e aumento na gravidade das lesões é a presença da bactéria *Staphylococcus aureus*. Este patógeno coloniza a mucosa da narina anterior e pode ser facilmente transmitido no ambiente domiciliar. O objetivo deste estudo foi detectar amostras de *S. aureus* em narina de pacientes com dermatite atópica e de seus contactantes domiciliares e avaliar características associadas à sua resistência a antimicrobianos, virulência e clonalidade, correlacionando os resultados encontrados com o SCORAD e entre os indivíduos do estudo. Foram analisados swabs nasais de crianças atendidas no ambulatório de dermatologia do IPPMG/UFRJ e de seus contactantes, entre setembro de 2011 e setembro de 2012. Os swabs foram cultivados em ágar manitol salgado e as amostras foram identificadas pelos testes de Gram, catalase, coagulase e susceptibilidade à bacitracina. A resistência aos antimicrobianos foi detectada pelo método de difusão a partir do disco e para detecção dos tipos de SCCmec foi utilizada a PCR. Entre 48 grupos familiares investigados foram selecionados 30 grupos em que a criança e seu respectivo contactante apresentavam *S. aureus* em sua microbiota. Em 25 casos, tanto a criança quanto seu respectivo contactante apresentavam colonização por amostras de *S. aureus* sensível à metilina (MSSA) e em cinco casos, o paciente e o contactante estavam colonizados por MRSA e todas estas carregavam o SCCmec do tipo IV. A taxa mais elevada de resistência antimicrobiana foi verificada para eritromicina (31,3%). A faixa de concentração mínima inibitória obtida para mupirocina foi de 0,19µg/mL a >1024 µg/mL e cinco amostras mostraram altos níveis de resistência. Os genes da PVL foram significativamente mais encontrados entre amostras de pacientes do que entre amostras de contactantes ($p=0,026$) e mais comuns entre amostras MRSA. A análise da similaridade genética entre as linhagens de amostras de *S. aureus* de pacientes e de seus respectivos contactantes mostrou que dos cinco casos que apresentavam colonização por MRSA, quatro tinham similaridade genética, enquanto de 10 casos que apresentavam colonização por MSSA, três possuíam perfis genéticos similares, indicando a possibilidade de transmissão do patógeno através do contato familiar. Apesar do alto percentual de amostras carreadoras do gene da PVL (44,78%), não houve diferença significativa na ocorrência dos mesmos entre amostras de pacientes com DA leve, grave ou moderada.

Palavras-chave: Dermatite Atópica, *Staphylococcus aureus*, Contactantes, Transmissão cruzada, PFGE.

Abstract

Celina Vieira da Cunha Guedes Alvarenga

**CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
ISOLADAS DE PACIENTES PEDIÁTRICOS COM DERMATITE ATÓPICA E
RELAÇÃO COM AMOSTRAS DE CONTACTANTES**

Orientadora: Kátia Regina Netto dos Santos

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

Atopic dermatitis (AD) is a chronic skin disease that affects up to 20% of the world's pediatric population and whose symptoms are pruritus, cutaneous xerosis and eczematous lesions. SCORAD ("Scoring Atopic Dermatitis") is one of the indices used to classify the severity of AD lesions. One of the factors associated with the onset of the disease and increase in the severity of the lesions is the presence of the bacterium *Staphylococcus aureus*. This pathogen colonizes the mucosa of the anterior nostril and can be easily transmitted in the home environment. The objective of this study was to detect *S. aureus* samples in the nostrils of patients with atopic dermatitis and their home contacts and to evaluate characteristics associated with their antimicrobial resistance, virulence and clonality, correlating the results found with SCORAD and among study subjects. Nasal swabs were analyzed from children treated at the IPPMG / UFRJ dermatology clinic and their contacts between september 2011 and September 2012. The swabs were cultured on saline mannitol agar and the samples were identified by Gram, catalase, coagulase and susceptibility to bacitracin. The antimicrobial resistance was detected by the diffusion method from the disk and for the detection of the types of SCCmec the PCR was used. Among the 48 investigated family groups, 30 groups were selected in which the child and his / her respective contact person had *S. aureus* in their microbiota. In 25 cases, both the child and his or her respective contact person had colonization with methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) samples, and in five cases the patient and the recipient were colonized with MRSA and all of them were carrying type IV SCCmec. The highest rate of antimicrobial resistance was found for erythromycin (31.3%). The minimum inhibitory concentration range obtained for mupirocin was 0.19 µg / mL at > 1024 µg / mL and five samples showed high levels of resistance. The PVL genes were significantly more found among patient samples than between contact samples ($p = 0.026$) and more common among MRSA samples. The analysis of the genetic similarity between the strains of *S. aureus* samples from patients and their respective contactors showed that of the five cases that had colonization by MRSA, four had genetic similarity, whereas of 10 cases that presented colonization by MSSA, three had profiles Genetics, indicating the possibility of transmission of the pathogen through family contact. Despite the high percentage of carrier samples of the PVL gene (44.78%), there was no significant difference in their occurrence among samples from patients with mild, severe or moderate AD.

Key-words: Atopic dermatitis, *Staphylococcus aureus*, Contacts, Cross-transmission, PFGE.

Lista de Abreviaturas

Ag	Antígeno
APC	célula apresentadora de antígeno
CC	complexo clonal
CEB	clone endêmico brasileiro
CMI	concentração mínima inibitória
DA	dermatite atópica
Dsg-1	desmogleína-1
EASI	do inglês <i>eczema area and severity index</i>
<i>Flg</i>	proteína filagrina
IgE	Imunoglobulina E
GM-CSF	de fatores estimuladores de macrófagos e granulócitos
ISAAC	do inglês <i>International Study of Asthma and Allergies in Childhood</i>
MHC	complexo principal de histocompatibilidade (<i>major histocompatibility complex</i>)
MIC	Concentração Mínima Inibitória
MLST	tipagem por sequenciamento de multilocus enzimático (<i>multilocus sequence typing</i>)
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (<i>methicillin-resistant S. aureus</i>)
MSCRAMMs	do inglês <i>microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules</i>
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível a meticilina (<i>methicillin-susceptible S. aureus</i>)
NMF	fator natural de umidificação (<i>natural moisturizing factor</i>)
PBP	proteína ligadora de penicilina-2
PCR	reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFGE	eletroforese em gel de campo pulsado (<i>pulsed field gel electrophoresis</i>)
Ph	potencial hidrogeniônico
PVL	leucocidina de Panton-Valentine (<i>Panton-Valentine leukocidin</i>)
SAGs	Superantígenos
SCC _{mec}	cassete cromossômico estafilocócico <i>mec</i> (<i>staphylococcal chromosome cassette mec</i>)
SCN	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo
SCORAD	do inglês <i>scoring atopic dermatites</i>
TcR	receptor de célula T (<i>T cell receptor</i>)
Th2	linfócitos T “helper” tipo 2
TNF-alfa	fator de necrose tumoral alfa
TSST-1	toxina da síndrome do choque tóxico 1 (<i>toxic shock syndrome toxin 1</i>)

I. Introdução

1. Dermatite Atópica

1.1. Aspectos gerais, etiopatogenia e fisiopatologia

A dermatite atópica (DA) é uma doença inflamatória crônica da pele, de caráter persistente e crônico-recidivante. Nesta doença, células hematopoiéticas anormais, apresentando produção exacerbada de IgE, circulam e se infiltram na pele, tecido respiratório e em outros sítios do corpo, atuando como antígenos e desencadeando quadros clínicos típicos (Johansson *et al.*, 2004; Thomsen, 2014; Lyons, Milnere Stone, 2015). O termo atopia, introduzido por Coca e Cooke (1923 apud Cavalcante *et al.*, 2015), tem sua origem do grego *ἀτοπία*, que significa “fora do lugar”, e foi usado para descrever algumas das manifestações clínicas de hipersensibilidade humana, como asma e outros sinais atópicos.

As principais manifestações da DA são caracterizadas por lesões de pele eczematosas e eritematosas, com prurido de intensidade variável, levando a formação de papulovesículas e ao desenvolvimento de xerose cutânea. (Piliang, 2009; Thomsen, 2014; Milner e Stone, 2015). A evolução se dá inicialmente por uma sensação de prurido, seguido de arranhões e subsequente criação de uma erupção cutânea. Estes pacientes atópicos em sua maioria podem desenvolver a “tríade atópica”, caracterizada pela ocorrência de asma e alergias, além das manifestações cutâneas (Schmid-Grendelmeier *et al.*, 2001; Liu, Goodarzi e Chen, 2011).

Apesar da etiopatologia da DA não estar totalmente elucidada, dois fenômenos são descritos como principais para o desenvolvimento da doença. Primeiro, a falha na barreira do extrato córneo da pele, devido à baixa presença de ceramidas e a redução de proteínas de barreira, como a proteína filagrina (*flg*), levando ao ressecamento da pele e declínio de peptídeos antimicrobianos. Outro aspecto é o comprometimento na resposta imune adaptativa do indivíduo causado pela desregulação de células T CD4+ “naïves” que se diferenciam em células T “helper” tipo 2 (Th2), aumentando significativamente a produção de interleucinas, responsáveis por níveis elevados de IgE. Também o aumento no número de células inflamatórias, como mastócitos, desencadeia os diversos sintomas de atopia nos pacientes (Eyerich e Novak, 2013). Na dermatite, esses sintomas são basicamente o eczema, a xerose cutânea e o prurido. O prurido é definido como uma sensação desagradável de coceira, e contribui para o desenvolvimento e agravamento da dermatite por exacerbar o sistema imune através da liberação de citocinas decorrente do trauma dos ceratinócitos (Aoki e Cestari, 2005). Também, através do ato de coçar, alérgenos e patógenos podem penetrar na pele, favorecendo processos alérgicos, asma e febre (De Benedetto, Kubo e Beck, 2012).

Outro aspecto importante é a xerose cutânea. O seu desenvolvimento é o reflexo da perda de água transepidermica e da diminuída capacidade da camada córnea de reter a água.

Isto ocorre devido a um decréscimo no nível de ceramidas no estrato córneo, aumentando a perda de água e, finalmente, resultando em uma pele seca e com aspecto rachado (Arikawa *et al.*, 2002). Além disso, há uma falha na expressão de proteínas de barreira que funcionam como peptídeos antimicrobianos. Um exemplo é a proteína filagrina (*flp*) que tem como função manter os queratinócitos unidos e atuar na regulação da liberação de outra proteína, denominada fator natural de umidificação (NMF), que retém as moléculas de água, (Sandilands *et al.*, 2009). Essa falha na união dos queratinócitos associada ao intenso ressecamento da pele favorece a formação do eczema.

Os queratinócitos dos pacientes com DA, além de atuarem na barreira física, também podem produzir citocinas e quimiocinas, com aumento da expressão de fatores estimuladores de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) e interleucinas que contribuem para o recrutamento de células inflamatórias e perpetuação da resposta inflamatória da pele (Leung e Boguniewicz, 2003).

Um amplo espectro de fatores, incluindo os ambientais pode explicar a elevada ocorrência de alergia geralmente associada ao estilo de vida em populações ocidentais. O estresse, a alimentação, a umidade e a microbiota cutânea, além de fatores genéticos desempenham um papel no desenvolvimento e agravamento da dermatite atópica e também podem contribuir com a presença de atopia entre familiares (Spergelle Paller, 2003; Castro *et al.*, 2006; Piliang, 2009). O padrão de distribuição da doença, portanto, irá depender da predisposição genética ao desenvolvimento de reações de hipersensibilidade mediada por IgE, da idade de aparecimento e da cronicidade das lesões.

Fatores imunológicos e genéticos, segundo Pastar e colaboradores (2005), podem ser observados em dois perfis da DA: a chamada “Dermatite atópica intrínseca” (renomeada de Síndrome do Eczema/Dermatite não-atópica por recomendação da “World Allergy Organization”), que não é associada à IgE, e a extrínseca (ou Síndrome do Eczema/Dermatite atópica) na qual observa-se correlação entre os níveis séricos de IgE e o aparecimento de eczema. Esta última pode prevalecer em 70-80% dos pacientes (Johansson *et al.*, 2004). Atualmente, a atopia pode ser definida como tendência individual ou familiar, portanto uma predisposição genética determinada a produzir IgE para alérgenos ambientais comuns. A IgE sérica total está elevada em mais de 80% dos pacientes com DA, e estes níveis geralmente se correlacionam com a severidade da dermatite (Laske e Niggemann, 2004; Somani, 2008)

1.2. Epidemiologia

A DA é uma dermatose inflamatória predominantemente infantil, do lactente e da criança (Laughter *et al.*, 2000; Levy *et al.*, 2003), apresentando uma prevalência de 10 a 20% em

crianças e de 1 a 3% em adultos (Leung e Bieber, 2003). Aproximadamente 50% das crianças com DA desenvolvem a doença ao longo do primeiro ano de vida e 95% manifestam os sintomas até os 5 anos. Em 75% dos casos há uma remissão espontânea até a fase da adolescência, com persistência de eczemas e rinite alérgica ao longo da vida adulta (Barnetson e Rogers, 2002; Williams, 2005). Dados do Estudo Internacional de Asma e Alergia na Infância (ISAAC, 1998) coletados em diversos países do mundo demonstraram uma prevalência média para dermatite atópica de 7,3% e dermatite grave de 0,8% na faixa etária de 6 e 7 anos de idade. Na idade de 13 e 14 anos, a prevalência média de dermatite atópica foi de 5,3% e dermatite grave de 0,9% (Yamada, 2002I; SAAC, 2003).

Canadá, Austrália, Suécia, Nigéria e África do Sul são os países com as maiores taxas de DA em crianças, apresentando taxas maiores que 14%. Nos Estados Unidos, a DA afeta 10% da população entre 13 e 14 anos e cerca de 17% das crianças de 5 a 9 anos (Laughter *et al.*, 2000; Asher *et al.*, 2006). No Brasil, a prevalência da DA é de 5% a 8% em crianças na faixa etária entre 5 à 12 anos (Solé, Camelo-Nunes e Naspitz, 2006).

Normalmente, as lesões de eczema e as alergias alimentares aparecem ao longo dos primeiros 5 anos de vida e afetam a grande maioria das crianças com DA. Episódios de alergia alimentar decaem e a incidência de asma aumenta significativamente até os 10 anos; a partir desta idade, a rinite alérgica passa a ser um sintoma comum. Crianças com DA possuem uma propensão maior a episódios de hospitalização, gastroenterites, infecções do trato respiratório inferior e pneumonias que crianças não atópicas (Rotsztein *et al.*, 2012).

Estudos demonstrando variações regionais de DA foram descritos para diferentes climas e países. Solé e colaboradores (2006) realizaram um estudo da prevalência da DA em adolescentes brasileiros em relação à temperatura média anual e verificaram que quanto maior a temperatura, maior a prevalência de diagnóstico médico de eczema entre os indivíduos. Os autores detectaram uma associação significativa entre a presença de eczema e a temperatura ambiente.

A DA é geneticamente complexa, e estudos demonstram que um histórico familiar de doença atópica é um fator de risco significativo para o desenvolvimento da doença, em especial por ascendência materna. O risco de transmissão vertical de uma mãe atópica para o filho é quatro vezes maior do que aconteceria se somente o pai fosse atópico (Leung e Bieber, 2003), ainda que os motivos para este fato sejam desconhecidos.

Além disso, estudos epidemiológicos apontam para maior prevalência de DA em famílias pequenas, de nível socioeconômico elevado, especialmente em filhos de pais com elevado grau de escolaridade, residentes de ambientes urbanos, tendo como justificativa à hipótese da

higiene, devido ao estilo de vida ocidental, onde há menor contato com determinados microrganismos que estimulariam a resposta imune (Strachan, 1989).

1.3. Quadro clínico

A dermatite atópica é uma doença usualmente intermitente difícil de ser definida devido a sua distribuição diversa, podendo se apresentar na área flexural, nas faces extensoras ou fracamente demarcadas; com morfologia variada, desde lesões secretoras agudas até o processo de liquenificação, tornando a pele mais seca e rígida; e com ausência de diagnóstico definido como padrão de referência (Flohr e Williams, 2006). De forma geral, indivíduos com DA apresentam lesões de pele eczematosas e altamente pruriginosas, caracterizadas por vesículas, exsudato e crostas.

A dermatite atópica do lactente é mais aguda com lesões pápulo-vesiculosas sobre a pele eritematosa e com presença de exsudato seroso. As lesões se apresentam de forma simétricas, atingindo as laterais dos membros e da face. O eczema da DA pode atingir o tronco de forma leve a moderada, sem indício de xerose cutânea (Spergel e Paller, 2003).

Já na fase da infância o aspecto das lesões é variável, e a pele tende a se tornar xerótica. As lesões agudas podem se apresentar eritematosas, secretantes e impetiginizadas. Em casos crônicos, a lesão adquire um aspecto numular no tronco e nos membros, caracterizada por uma dermatite papular exsudativa, acometendo as áreas flexurais e dobras do pescoço, antecubitais e poplíteas, assim como os punhos e tornozelos (Spergel e Paller, 2003; Oliveira e Cestari, 2005).

Na fase adulta os indivíduos costumam desenvolver dermatite de cabeça e pescoço, e a maioria apresenta lesões nas mãos. As lesões tendem a ser caracterizadas por pápulas eritematosas, descamativas e ressecadas e com liquenificação (Spergel e Paller, 2003; Oliveira e Cestari, 2005).

1.4 Diagnóstico e acompanhamento da DA

Atualmente não há nenhum marcador laboratorial para confirmar a doença. Vários critérios vêm sendo propostos para o diagnóstico e acompanhamento da doença uma vez que as lesões eczematosas não são patognomônicas. Em 1980, Hanifin e Rajka propuseram utilizar dados clínicos para estabelecer a presença de ao menos três critérios maiores e três menores para ser considerado um portador de dermatite atópica (Quadro 1). Por exemplo, a presença de prurido e de histórico familiar de dermatite seriam considerados critérios maiores, enquanto urticária colinérgica e elevação da IgE sérica seriam critérios menores (CASTRO *et al.*, 2006).

Quadro 1- Descrição dos critérios para o diagnóstico de DA (adaptado de Hanifin e Rajka, 1980)

Critérios diagnósticos de Hanifin & Rajka	
Critérios maiores (3 ou mais):	
Prurido	
Morfologia e distribuição típica das lesões (envolvimento facial e extensor nas crianças e liquenificação e linearidade nos adultos)	
História pessoal ou familiar de atopia	
Dermatite crônica e recidivante	
Critérios menores (3 ou mais)	
Xerose	Hiperlinearidade palmar
Início precoce da doença	Tendência a infecções cutâneas
Queratose pilar	Prega infra-orbital de Dennie-Morgan
Tendência à dermatite inespecífica de mãos e pés	Pitíriase alba
Dermografismo branco	Palidez ou eritema facial
Queilite	Eczema de mamilo
Pregas anteriores do pescoço	Acentuação perifolicular
Escurecimento periorbital	Alopécia areata
Sinal de Hertogue (rarefação das sombrancelhas)	Hiperreatividade cutânea (Tipo I)
Elevação da IgE sérica	Enxaqueca (?)
Conjuntivites recorrentes	Intolerância alimentar
Curso influenciado por fatores emocionais	Catarata
Curso influenciado por fatores ambientais	Ceratocone
Prurido quando sua	Urticária colinérgica
Alergia ao níquel	

Técnicas não invasivas foram desenvolvidas para a avaliação de padrões característicos. Dois métodos instrumentais podem ser utilizados para a avaliação da barreira cutânea na dermatite atópica: a medida do conteúdo hídrico da camada córnea (corneometria) e a medida da perda de água transepidermica (TEWL) (Serup, 1992).

O histórico do paciente e a escala clínica possuem grande importância na realização do diagnóstico e do acompanhamento destes pacientes. Os índices para a avaliação da gravidade da DA baseados nos parâmetros de extensão e intensidade das lesões e sintomas subjetivos são os mais utilizados na prática clínica. O mais aplicado é o SCORAD (do inglês “*Scoring atopic dermatitis*”), em que valores abaixo de 25 sugerem casos leves, de 25 a 50 sugerem casos moderados e valores acima de 50 sugerem casos graves (Hanifin e Rajka, 1980).

O índice SCORAD utiliza uma avaliação que consiste em três itens principais (Figura 1): (A) Extensão da doença, adaptada a regra dos 9, correspondente a 20% do *score*; (B) Intensidade das lesões, sendo composto de 6 sinais clínicos: eritema; edema / pápulas; efeito da coçadura; formação de crostas; liquenificação e xerose. Este item corresponde à 60% do *score*; e (C) sintomas subjetivos, como prurido e insônia, e correspondem a 20% do *score*. A insônia é avaliada levando-se em consideração as últimas três noites em que o indivíduo teve dificuldades devido ao prurido intenso. Para fins de pontuação é importante usar as lesões mais representativas.

SCORAD INDEX
EUROPEAN TASK FORCE
ON ATOPIC DERMATITIS

Last Name: First Name:
Date of Birth: DD/MM/YY
Date of Visit:

Figures in parenthesis for children under two years

A: EXTENT Please indicate the area involved

B: INTENSITY

C: SUBJECTIVE SYMPTOMS
PRURITUS + SLEEP LOSS

A/5 + 7B/2 + C

CRITERIA	INTENSITY
Erythema	
Oedema/Papulation	
Oozing/crust	
Excoriation	
Lichenification	
Dryness*	

* Dryness is evaluated on uninvolved areas

MEANS OF CALCULATION	
INTENSITY ITEMS (average representative area)	
0 = absence	
1 = mild	
2 = moderate	
3 = severe	

Visual analog scale (average for the last 3 days or nights)

PRURITUS (0 to 10) 0 10

SLEEP LOSS (0 to 10) 0 10

Figura 1 - Índice SCORAD (Scoring Atopic Dermatitis)

Em 2001 foi proposto também o EASI (do inglês “*Eczema area and severity index*”), baseado num índice já existente para avaliação da psoríase (HANIFIN *et al.*, 2001), em que sua pontuação considera: eritema, pápulas, escoriação, liquenificação e extensão da superfície corpórea comprometidas. O cálculo é dado pela soma das pontuações das quatro regiões corpóreas: cabeça/pescoço, membros superiores, tronco e membros inferiores.

Para o tratamento de indivíduos com DA, são necessárias medidas que incluem a hidratação como medida básica para a umectação do estrato córneo e a estabilização da função da barreira epidérmica. Para isso, são recomendados banhos rápidos e mornos, evitando-se o uso de fragrâncias, hidratantes emolientes e álcool, sendo medidas fundamentais para a restauração da barreira cutânea. O controle do processo inflamatório é de grande importância, pois evita o contato de indivíduos sensibilizados a estes produtos desencadeantes de processos

alérgicos (Boguniewicz, 2004; Castro *et al.*, 2006). Para tal, é empregado o uso de medicamentos corticóides de uso tópico, que são substâncias que atuam como agentes anti-inflamatórios e/ou imunossupressores, pois inibem a atividade das células dendríticas e dos linfócitos, bem como impedem a liberação de interleucinas (Boguniewicz, 2004; Castro *et al.*, 2006).

Apesar da sua eficiência, o uso de corticóides pode apresentar efeitos adversos sendo recomendado atualmente imunossupressor da classe dos inibidores de calcineurina por não apresentarem as complicações dos corticóides, o que permite seu uso diário. Os mais utilizados são tacrolimus e o pimecrolimus, ambos de uso tópico, com eficácia ao aliviar o prurido nos primeiros dias de uso (El-batawy *et al.*, 2009; Ring *et al.*, 2012). A recomendação ideal é a utilização diária de hidratantes à base de uréia, contendo ceramidas, reduzindo a necessidade de corticoides (Simpson *et al.*, 2010).

A antibioticoterapia também desempenha um papel importante no tratamento durante as exacerbações cutâneas na presença de infecção secundária (Cardona, Cho e Leung, 2006). A clindamicina e o sulfametoxazol-trimetoprima são importantes alternativas na terapêutica de pacientes com DA. Apesar do amplo uso de cefalexina em pacientes com DA, a sua farmacodinâmica se restringe apenas a amostras de *S. aureus* produtores de penicilinase, sem atuar sobre amostras resistentes a meticilina (Shaw, Burkhardt e Morrel, 2009). Antissépticos tópicos, como a mupirocina podem ser usados em emolientes revelando-se eficazes na redução da colonização da pele por *S. aureus*, no qual o tratamento da doença localizada é feito com o antibiótico em pomada, 2 vezes ao dia, durante 5 dias (Huang *et al.*, 2009). Antibióticos orais, como dicloxacilina e cefalexina, podem ser administrados nos casos de lesões extensas ou resistentes. No caso de colonização por *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) tratamento para lesões deve ser direcionado pelos resultados de um antibiograma, tipicamente com clindamicina, rifampicina e trimetoprima-sulfametoxazol que são efetivos contra a maioria das cepas de MRSA oriundas da comunidade (Tang *et al.*, 2011).

Em casos de DA grave recomenda-se imunossupressão sistêmica. Entretanto a avaliação dos riscos e benefícios desta intervenção nestes pacientes é de extrema relevância. Fototerapia tem sido empregada em alguns casos, porém, ainda tem caráter adjuvante e apresenta alguns efeitos colaterais, como queimação e ardor (Boguniewicz *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2006).

A hospitalização pode expor os pacientes aos riscos de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), com grande possibilidade de entrar em contato com fatores descritos previamente como de risco para o desenvolvimento ou agravamento da doença. Estes fatores podem ser caracterizados por agentes infecciosos como *S. aureus* fungos do gênero *Malassezia*, alérgenos alimentares, aeroalérgenos, auto-antígenos, dentre outros (Castro *et*

al.,2006). A eliminação de fatores desencadeantes é fundamental no acompanhamento dos pacientes com DA e pode ser feito através de medidas tais como controle de agentes irritantes que facilitem a sudorese ou contenham produtos irritantes e controle de agentes infecciosos, sobretudo do *S. aureus*, que apresenta papel fundamental na intensificação do processo inflamatório.

2.0. Gênero *Staphylococcus*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Staphylococcaceae* e é composto por 52 espécies e 28 subespécies (LPSN, 2016), que colonizam e podem causar infecções em mamíferos e aves (Lowder e Fitzgerald, 2010; Huber *et al.*, 2011). As espécies do gênero *Staphylococcus* apresentam-se na forma de cocos Gram positivos, organizados em forma de cachos. São microrganismos anaeróbios facultativos, resistentes a 0,04 U de bacitracina, não formadores de esporos, resistentes à altas concentrações de NaCl (até 7,5%) e com temperatura ótima de crescimento de 35°C. São produtores da enzima catalase, com exceção de *S. aureus* subespécie *anaerobius* e *S. Saccharolyticus* (Holt *et al.*, 1994; Peacock, 2005; Bannermane Peacock, 2007). Essa enzima é responsável pela conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, sendo usada em testes laboratoriais para diferenciá-los de outros cocos Gram positivos, como *Streptococcus spp.* e *Enterococcus spp.* (Ryan, 2004).

As espécies do gênero *Staphylococcus* são divididas em dois grupos importantes: *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) e coagulase positivos. Essa classificação se deve à produção da enzima coagulase, ausente nos SCN, e que é capaz de converter o fibrinogênio presente no plasma em fibrina, resultando na formação de um coágulo (Kloose Bannerman, 1999; Archer, 2000). Os SCN são principalmente causa de infecções em unidades neonatais e de bacteremias associadas ao uso prolongado de cateteres vasculares (Mireya *et al.*, 2007; Kassis *et al.*, 2009; Silversteine Moylan, 2010), enquanto os coagulase positivos são caracterizados principalmente pela espécie *Staphylococcus aureus*, envolvidos em infecções bacterianas humanas, tanto de origem comunitária quanto hospitalar (Frazee *et al.*, 2005; Jerassy *et al.*, 2006; Vincent *et al.*, 2009)

2.1. *Staphylococcus aureus*

A espécie *S. aureus* faz parte do grupo dos *Staphylococcus* coagulase positivos e apresenta um genoma de cerca de 3 milhões de pares de bases (Holden *et al.*, 2004). Aproximadamente 97% das amostras produzem também o fator "clumping", caracterizado por uma adesina de parede celular bacteriana capaz de se ligar ao fibrinogênio, provocando a agregação de microrganismos. As colônias de *S. aureus* são relativamente grandes,

hemolíticas, e de coloração amarelo-dourada, com crescimento de 24 a 48 horas em ágar sangue desfibrinado, a 35°C. Em meio ágar manitol salgado, com 7,5% de cloreto de sódio *S. aureus* tem a capacidade de fermentar este açúcar, produzindo ácidos que irão alterar a cor do indicador vermelho de fenol. *S. aureus* é o principal patógeno envolvido em infecções bacterianas humanas (Frazee *et al.*, 2005; Jerassy *et al.*, 2006; Vincent *et al.*, 2009). É frequentemente isolado em casos de pneumonias hospitalares (Gupta *et al.*, 2011), infecções cutâneas graves (Zilberberg *et al.*, 2010) e infecções da corrente sanguínea, inclusive aquelas associadas a dispositivos vasculares (Burton *et al.*, 2009).

2.1.1. Resistência à meticilina/oxacilina

As penicilinas semi-sintéticas resistentes às β -lactamases, como a meticilina e a oxacilina, foram introduzidas no início da década de 1960 para contornar o problema de resistência a penicilina (Enright *et al.*, 2002). No entanto, no ano seguinte à sua introdução ocorreu o primeiro caso de resistência, identificado na Inglaterra (Jevons, 1961; Crum *et al.*, 2006). Essa amostra foi chamada *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA, “methicillin-resistant *S. aureus*”).

Os β -lactâmicos possuem capacidade de ligação a proteínas envolvidas na síntese da parede celular, denominadas PBP's, que atuam impedindo a formação desta parede, acarretando na lise celular bacteriana (Gelatti *et al.*, 2009). A resistência à meticilina é relacionada a expressão de uma proteína modificada, a PBP2a, que mesmo sendo funcional, não possui afinidade por β -lactâmicos. Essa proteína é codificada pelo gene *mecA*, e tem a capacidade de preservar a atividade de transpeptidase, essencial para a constituição de ligações cruzadas na parede celular deste patógeno mesmo na presença de penicilina (Chambers, 1993).

O gene *mecA* encontra-se inserido no cromossomo, dentro de um elemento genético móvel, denominado cassete cromossômico *mec* de estafilococos (SCC*mec*, “*Staphylococcal Cassette Chromosome mec*”) (Katayama, Ito e Hiramatsu, 2000), detectados em amostras MRSA.

São descritos onze tipos de SCC*mec*, do I ao XI (IWG-SCC, 2015), sendo estes:

- SCC*mec* dos tipos I, II, III, VI e VIII - Relacionados a estirpes de origem hospitalar;
- SCC*mec* dos tipos IV, V e VII - Em geral, associados à origem comunitária. (Ito *et al.*, 2001; Oliveira, Milheiriço e De Lencastre, 2007, Christianson *et al.*, 2007);

O SCC*mec* tipo I possui poucos determinantes de resistência, e era encontrado entre estirpes MRSA hospitalares na década de 1960, quando poucos antimicrobianos eram disponíveis, sendo atualmente raro (Hiramatsu *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 2001; Enright *et al.*,

2002). O SCCmec tipo IV ainda é o principal cassete *mec* encontrado em amostras comunitárias, porém há relatos na última década de disseminação em hospitais do Brasil (De Miranda *et al.*, 2007; Schuenck *et al.*, 2012; Caboclo *et al.*, 2013). Essas estirpes em geral, possuem maior potencial de virulência e crescem mais rápido do que amostras que carregam outros tipos de SCCmec (Diep e Otto, 2008).

2.1.3. Virulência e patogenia

Staphylococcus aureus é um patógeno extremamente versátil e apresenta uma série de adesinas e citocinas para diversos tecidos humanos, realizando processos que envolvem uma ampla quantidade de componentes extracelulares e da parede celular, que são coordenadamente expressos durante os estágios da infecção. A bactéria inicialmente fixa-se às células do hospedeiro, produzindo adesinas específicas para vários tipos de tecidos humanos (Kuroda *et al.*, 2001). Dentre essas, pode-se destacar as proteínas superficiais de adesão denominadas MSCRAMM (do inglês “*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*”) responsáveis por promover a aderência bacteriana às proteínas solúveis presentes no plasma, como fibrinogênio, fibronectina, colágeno e outras (Dinges, Orwine Schlievert, 2000; Bannerman e Peacock, 2007; Santos *et al.*, 2007; Diep e Otto, 2008).

Procedimentos invasivos ou imunossupressão podem criar as condições propícias para o início de infecções oportunistas. No estabelecimento desta infecção, há inicialmente a evasão do sistema imune inato, protegendo-se contra a ação das células de defesa inicial do hospedeiro. Uma série de genes é coordenadamente expressa para evitar a fagocitose das bactérias. Desta forma, há formação da cápsula, expressão da proteína A e da coagulase (JOHN e BARG, 2004; O’riordan e Lee, 2004; Cheung *et al.*, 2004; Speziale *et al.*, 2009). A relação entre o microrganismo e o hospedeiro é dependente das propriedades de sua superfície celular, especificamente da presença de exopolissacarídeos na parte externa da parede bacteriana, que parece desenvolver um importante papel na virulência. A produção de biofilme por algumas linhagens de *S. aureus* é um importante mecanismo de escape a fagocitose (Wilkinson, 1983), além de reduzir a susceptibilidade a antimicrobianos, aumentando a colonização e manutenção destas cepas no hospedeiro durante a infecção (Arslan e Özkardes, 2007).

Dentre todas as toxinas de *S. aureus*, destacam-se na infecção da DA a toxina PVL (Panton-Valentine Leucocidin) que está associada a infecções graves, com elevadas taxas de mortalidade (Hyvernats *et al.*, 2007; Labandeira-Rey *et al.*, 2007) e enterotoxinas, com espectro multifacetado podendo causar desde alterações gastrintestinais até o choque tóxico. A PVL é codificada pelos genes *lukS-PV* e *lukF-PVL* e composta por duas proteínas secretadas

separadamente, conhecidas como componentes S e F, que vão atuar de forma sinérgica lisando células do sistema imune (Prevóst *et al.*, 1995). Em baixas concentrações, a toxina penetra na célula do hospedeiro e atua formando poros na membrana plasmática da mitocôndria, criando um processo em cascata ao liberar citocromos C, que irão ativar as vias das caspases as quais estão diretamente envolvidas no processo de fragmentação do DNA nuclear, levando a célula a apoptose. Já em altas concentrações, ela atua na formação de poros na bicamada lipídica (Genestier *et al.*, 2005).

Estudos demonstram que amostras MRSA associadas às linhagens USA300 e USA400 são produtoras de peptídeos que potencializam o efeito citolítico da PVL em infecções (Hongo *et al.*, 2009). Com isso, uma série de mediadores inflamatórios é expresso, causando quadros de necrose tecidual, sepse e coagulação intravascular disseminada. Estirpes de *S. aureus* PVL + tem sido associadas a infecções graves em sua maioria (Kaneko e Kamio, 2004).

2.1.2. Aspectos relativos à clonalidade de amostras

A técnica de PFGE (eletroforese em gel de campo pulsado”) é bastante utilizada em estudos de epidemiologia em função do seu alto poder discriminatório de linhagens microbianas (Mcdougal *et al.*, 2003; Clancy *et al.*, 2005; Larssen *et al.*, 2005). Apesar da técnica ser utilizada em inúmeros estudos, a mesma pode se mostrar inadequada para avaliação de amostras coletadas em longos períodos, bem como em estudos de epidemiologia em nível nacional ou global. Portanto, no ano de 2000, Enright e colaboradores descreveram a aplicação da técnica de tipagem por sequenciamento de multilocus enzimáticos (“multilocus sequence typing”, MLST) na caracterização de amostras MSSA e MRSA. Através dessa técnica, sete genes que codificam enzimas de manutenção celular (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *tpi*, *yqiL* e *pta*) são sequenciados após amplificação através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Cada nova sequência caracteriza-se por um novo alelo e a combinação desses alelos forma a “sequence type” (ST) de cada amostra (Enright *et al.*, 2000). Amostras de ST evolutivamente semelhantes são agrupadas em um mesmo complexo clonal (CC). Os resultados obtidos com o uso do MLST para organização dos complexos clonais são utilizados para a construção de um banco de dados que permite a comparação de amostras de *S. aureus* isoladas de várias partes do mundo.

Linhagens endêmicas de *S. aureus* são caracterizadas por apresentar facilidade de transmissão, longa persistência e capacidade de cruzar barreiras geográficas (Papakyriacou *et al.*, 2000). Os primeiros estudos conduzidos na década de 1990 identificaram linhagens de MRSA disseminadas nos hospitais ao redor do mundo. Posteriormente, estudos moleculares

começaram a elucidar a epidemiologia das amostras sensíveis à meticilina (MSSA) (Rolo *et al.*, 2012).

A primeira linhagem de MRSA identificada na literatura foi o clone Ibérico, primeiramente descrito em hospitais na Espanha, em 1989 (Dominguez *et al.*, 1994) que, desde então, tem sido isolado em toda Europa Ocidental (Witte *et al.*, 1994; Deplano *et al.*, 2000; Sanches *et al.*, 1995; Mato *et al.*, 1998) e Estados Unidos (Roberts *et al.*, 1998). O clone Nova Iorque/Japão foi identificado como sendo predominante nos hospitais da costa leste dos EUA e em Tóquio (Roberts *et al.* 1998; Roberts *et al.*, 2000; Aires de Sousa *et al.*, 2000). O clone pediátrico foi inicialmente descrito em um hospital infantil de Portugal, mas em poucos anos disseminou-se por mais de 20 países (Corso *et al.*, 1998; Leski *et al.*, 1998; Roberts *et al.*, 1998b; Sá-leão *et al.*, 1999; Gomes *et al.*, 2001). O clone brasileiro (CEB) foi inicialmente descrito por Teixeira e colaboradores (1995) e encontrado em vários hospitais do Brasil (Teixeira, Lourenço e Figueiredo, 1996; Santos *et al.*, 1999), Argentina, Uruguai e Chile (Aires de Sousa *et al.*, 2001). Em um estudo realizado entre 1992 a 1998, envolvendo isolados de 11 hospitais brasileiros, 89% dos isolados pertenciam ao clone Brasileiro, sendo que os 11% restantes não eram pertencentes a nenhum outro dos cinco clones pandêmicos (Oliveira *et al.*, 2001). A patogenicidade do clone brasileiro é decorrente de diversas propriedades, como multirresistência, inclusive resistência a β -lactâmicos, cloranfenicol, quinolonas, lincosamidas, eritromicina, aminoglicosídeos e trimetoprim-sulfametoxazol; resistência à mupirocina (Ramos *et al.*, 1999); produção de biofilme (Amaral *et al.*, 2005); capacidade de aderir e invadir as células epiteliais das vias aéreas (Amaral *et al.*, 2005); e produção de toxinas, como enterotoxinas e PVL (Ribeiro *et al.*, 2005).

Na década de 1990 foram também descritas amostras MRSA isoladas entre indivíduos da comunidade, o que não havia sido verificado até então (Udo, Pearman Grubb, 1993). Elas foram inicialmente descritas como causadoras de infecções de pele em comunidades aborígenes na Austrália, não eram relacionadas com nenhuma clonalidade já descrita e foram designadas como do clone Oceania (Udo, Pearman e Grubb, 1993). Este clone posteriormente se disseminou por vários países. Atualmente, amostras pertencentes a esse clone estão amplamente disseminadas no Brasil e são as mais isoladas em infecções comunitárias no país (Ribeiro *et al.*, 2007; Caboclo *et al.*, 2013; Gelatti *et al.*, 2013).

Em 2003, McDougal e colaboradores propuseram a uniformização da nomenclatura das linhagens mais comuns nos Estados Unidos. Assim, foram descritas linhagens a partir da tipagem do gene *spa* e quanto ao ST. Dentre aquelas associadas com amostras MRSA SCCmec IV estão: o USA600/ST45, associado ao clone Berlim, o USA800/ST5 relacionado ao clone pediátrico, os clones USA300/ST8, USA400/ST1 e USA700/ST72, associados a

estirpes comunitárias e o USA1100/ST30, associado ao clone Oceania (Mcdougal *et al.*, 2003; Tenover *et al.*, 2008; Monecke *et al.*, 2011).

O clone comunitário USA300 foi encontrado inicialmente entre amostras de infecções em atletas, nos Estados Unidos (CDC, 2003), mas posteriormente se disseminou em hospitais norte-americanos (Hultén *et al.*, 2010; Mcdougal *et al.*, 2010). Embora o clone pandêmico USA300/ST8 seja predominante em infecções nos EUA, é raramente encontrado no Brasil (Schuenck *et al.*, 2009; Silva-Carvalho *et al.*, 2009).

A análise genotípica de amostras de *S. aureus* isoladas de crianças com DA indica uma grande variabilidade genética. No Canadá, Yeung e colaboradores (2011) analisaram 137 amostras isoladas de crianças com DA e identificaram principalmente os complexos clonais 45 (21%), 5 (15%) e 15 (14%) nessas amostras. No mesmo país, Balma-Mena e colaboradores (2011) avaliaram amostras de *S. aureus* de 95 crianças e os complexos clonais prevalentes foram o 45 (24,2%), 5 e 8 (16,8% cada). Em São Francisco, EUA, Graber e colaboradores (2011), acompanharam durante um ano pacientes pediátricos com diversas dermatoses, com o objetivo de verificar as linhagens de *S. aureus* presentes em colonização nasal e de pele. Dentre sete pacientes com DA, os STs mais encontrados foram o 80 e o 59; Na Coreia do Sul, Kim e colaboradores (2009) avaliaram 36 amostras isoladas de crianças com DA e encontraram 14 STs diferentes. Os mais comuns foram o ST 188 (19,4% das amostras) e o ST 1 (13%). Já em Taiwan, o ST59 foi encontrado em 96% de 23 amostras isoladas de pacientes pediátricos com a doença (Lo *et al.*, 2010). No Brasil, Cavalcante e colaboradores (2013) avaliaram 18 amostras de *S. aureus* isoladas de oito crianças com DA com colonização nasal e infecção de pele pelo patógeno. Os autores verificaram que 55% dessas amostras estavam associadas aos clones USA1100, USA400 e USA800.

2.1.2. *Staphylococcus aureus* e a dermatite atópica

Por estar presente em diversas regiões da pele e nas mucosas, a maioria das infecções causadas por *S. aureus* é de natureza superficial e atinge a derme e tecidos subjacentes. Desta forma, este patógeno está presente na pele de mais de 90% de pacientes com DA, enquanto na população em geral, essa taxa varia de 5 a 30% (Kuster *et al.*, 1990).

A densidade populacional deste patógeno na pele desses pacientes é maior em região com lesão do que em regiões sem lesão de pele (Ardern-Jones *et al.*, 2007). Crianças com DA são mais frequentemente colonizadas por *S. aureus*, mesmo em regiões sem lesões de pele, do que crianças saudáveis. Além disso, o maior número de células de *S. aureus* em lesões de pele está associado à maior severidade desta lesão (eczema) (Williams, 2000; Lübbe, 2003).

Apesar de não totalmente elucidado o modo como esse patógeno pode agravar a lesão de pele em crianças com DA, a condição inflamatória da pele pode se tornar pior através de diversos mecanismos. Um deles é a produção de superantígenos, tais como as enterotoxinas A e E, e a toxina da síndrome do choque tóxico-1 estafilocócicas. Essas toxinas podem ativar uma variedade de células e moléculas que participam da resposta inflamatória, como células T, eosinófilos e macrófagos contribuindo na patogênese da DA (Bieber, 2008). Segundo Orfali e colaboradores (2009), enterotoxinas também podem estar envolvidas no agravamento da dermatite atópica, além da psoríase (Atefi *et al.*, 2014) e do linfoma de células T (Woetmann *et al.*, 2007; Krejsgaard *et al.*, 2014). Em estudo recente realizado no Brasil por Cavalcante (2015), os genes codificadores de enterotoxinas presentes no *cluster egc* (SEG, SEI, SEM, SEN, SEO) estavam presentes 69% das amostras hospitalares analisadas, apresentando pelo menos um desses genes entre os pacientes com DA. Segundo Mempele colaboradores (2013), há grande associação entre o cluster *egce* amostras oriundas de pacientes com DA.

Segundo Llewelyn e Cohen (2002), a maioria dos pacientes com DA pode ser portador de amostras que produzem superantígenos com capacidade de iniciar uma resposta inflamatória pela produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, além de causar um decréscimo de células regulatórias do sistema imune inato. O conjunto desses fatores pode desencadear os processos patológicos da DA.

Estudos recentes relatam altas taxas de colonização por *S. aureus* em contactantes de pacientes com dermatite atópica, em especial os pais. Esta circunstância pode significar possíveis fontes de reinfecção nos pacientes (Chiu *et al.*, 2010), contribuindo para persistência ou reativação da doença (Pascolini *et al.*, 2011). Segundo Bonness e colaboradores (2008), há várias explicações para as altas taxas de colonização nos pais: (1) o tratamento das lesões infectadas é normalmente realizado pelos pais, oferecendo oportunidade para a transmissão do patógeno; (2) existe um contato físico estreito entre familiares e (3) os pais de crianças atópicas muitas vezes possuem algum grau de susceptibilidade à doença atópica, o que pode deixá-los propensos à colonização por *S. aureus*.

A colonização nasal por *S. aureus* nasal está associada com lesões mais extensas e um índice SCORAD maior (Hon *et al.*, 2005). Chiu e colaboradores (2009), avaliando 34 crianças e 55 contactantes em Singapura encontraram 91% das crianças e 45% dos contactantes apresentando colonização nasal. Do mesmo modo, Bonness e colaboradores (2008) encontraram colonização em 66% de crianças e em 48% dos contactantes ao avaliar 30 pacientes e 29 grupos familiares na Alemanha. Em ambos os casos, técnicas de tipagem molecular como a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) indicaram que pais e crianças carregavam cepas idênticas na grande maioria das famílias, apresentando índices de

similaridade de 81% (Chiu *et al.*, 2009) e 84% (Boness *et al.*, 2008). Assim, é possível presumir que as narinas anteriores de contatos próximos de pacientes com DA podem servir como reservatórios de *S. aureus*.

Segundo Pascolini (2011), há uma relação entre a idade da criança e a severidade da doença. Foi observado que a prevalência de colonização por *S. aureus* e o índice alto de SCORAD era significativamente maior em crianças com até três anos de idade, sugerindo que esses valores estejam relacionados ao contato íntimo com os cuidadores e a exposição durante o período neonatal, enquanto crianças mais velhas têm maior contato com o meio externo.

Outro estudo conduzido por Chiu e colaboradores (2010), em Cingapura, demonstrou que uma elevada carga *S. aureus* no ambiente foi associada com um aumento na severidade da DA. Os autores isolaram amostras de *S. aureus* da poeira da cama e do chão do quarto de pacientes com DA e foi proposto que a gravidade da DA, baseada no índice SCORAD, estaria relacionada com a quantidade de *S. aureus* presente no ambiente de rotina dos pacientes. A presença de células de *S. aureus* em grande quantidade no ambiente também facilitaria a transmissão cruzada entre o paciente e seu contactante.

A importância da transmissão familiar também foi demonstrada por Kim e colaboradores (2012), em uma avaliação feita em uma escola na Coreia do Sul. Os autores procuraram determinar a fonte de colonização por *S. aureus* entre crianças diagnosticadas com DA ou com lesões de peles similares. Os professores e colegas de classe dessas crianças foram pesquisados quanto à colonização nasal e o estudo também contou com a coleta e correlação de diversos sítios como pele lesionada, pele não lesionada, narinas anteriores, áreas subungueais e das mãos de todos os indivíduos envolvidos no estudo. A análise da similaridade genética entre as amostras de crianças, professores e colegas de classe não apresentou valores significativos, indicando que a maior probabilidade é que essas crianças adquiram colonização a partir de seus contatos familiares. O perfil genético das amostras de *S. aureus* dos diferentes sítios analisados, por sua vez, mostrou, na maioria dos casos, correlação entre a colonização nasal e áreas subungueais e mãos, indicando que são importantes reservatórios de *S. aureus* para autocontaminação e recolonização. Desta forma, foi mostrada a possibilidade de transmissão da região nasal para a área subungeoal e a partir desta para a pele, através da fricção de lesões pruriginosas.

Segundo Chiu e colaboradores (2009) e Bonness e colaboradores (2008), as altas taxas de concordância encontradas entre amostras de *S. aureus* de colonização de pacientes e seus contactantes são importantes como base para futuras medidas de intervenção, como a descolonização de contatos próximos, como meio de reduzir a carga microbiana e a recolonização em pacientes com DA.

II. JUSTIFICATIVA

Apesar da etiopatogenia da DA não estar totalmente elucidada, a colonização por *S. aureus* em contactantes próximos de pacientes com DA tem sido relatada como um importante fator de reinfecção. Ao serem colonizados pelas amostras provenientes dos pais, ou por autoinfecção de outros sítios, pode ocorrer agravamento da doença. Estudos tem demonstrado a transmissão cruzada intrafamiliar através da análise da similaridade genética por técnicas de tipagem molecular de amostras provenientes de crianças atópicas e de seus contactantes.

Ainda que a frequência dessa transmissão intrafamiliar tenha sido demonstrada em estudos anteriores, não existem relatos no Brasil sobre a transferência de amostras de *S. aureus* dentro do grupo familiar. A análise da similaridade genética de amostras de *S. aureus* isoladas de crianças atópicas e de seus contactantes permite avaliar indícios de transmissão intrafamiliar além de identificar os genótipos mais frequentes nestes pacientes. Tais resultados, bem como a caracterização da susceptibilidade aos antimicrobianos e da presença dos genes da PVL podem auxiliar na implementação de medidas de intervenção que permitam reduzir a colonização por *S. aureus* em pacientes com DA.

III. OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo caracterizar amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de pacientes pediátricos com dermatite atópica e de seus respectivos contactantes domiciliares.

Objetivos Específicos:

1. Detectar e identificar e isolar a espécie *S. aureus* através de testes fenotípicos.
2. Determinar a susceptibilidade a metilina e aos antimicrobianos em geral e identificar o tipo de SCCmec presente nas amostras de *S. aureus* resistentes à metilina;
3. Detectar os genes da Leucocidina de Panton Valentine (PVL) em todas as amostras de *S. aureus*;
4. Verificar a similaridade genética entre as amostras;
5. Relacionar o SCORAD e os dados clínicos e demográficos com os resultados microbiológicos.

IV. MATERIAIS e MÉTODOS

1. Características do estudo e local

Foi realizado um estudo do tipo seccional e laboratorial a partir de amostras de colonização nasal oriundas de pacientes com idade inferior a 18 anos diagnosticados com dermatite atópica (DA) e de seus contactantes, caso tivessem mais de 12 horas de convívio diário. O estudo foi realizado no ambulatório de Dermatologia do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira (IPPMG) – UFRJ. Um swab umedecido com solução fisiológica foi friccionado nas narinas dos indivíduos e em seguida enviado diretamente ao laboratório de Infecção Hospitalar do Instituto de Microbiologia da UFRJ, para a análise laboratorial. Os testes fenotípicos e moleculares foram realizados utilizando amostras controles descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Amostras controle utilizadas no estudo

Espécie	Amostra	Descrição	Referência
<i>Staphylococcus aureus</i>	1013a	USA1100, SCCmec IV	Caboclo <i>et al</i> , 2013
	630a	USA400, SCCmec IV	Vivoni <i>et al</i> , 2013
	1008a	USA800, SCCmec IV	Caboclo <i>et al</i> , 2013
	843a	USA600, SCCmec II	Caboclo <i>et al</i> , 2013
	63a	CEB, SCCmec III	Vivoni <i>et al</i> , 2013
	526	SCCmec IV, USA300	Schuenck <i>et al.</i> ,2009
	601	SCCmecIV, <i>pvl</i> +	Schuenck <i>et al.</i> ,2009
	Mu50	SCCmecII	Hiramatsu <i>et al</i> , 1997
	52a	Amostra clínica positiva para genes <i>mecA</i> e <i>ileS-2</i>	Schuenck <i>et al.</i> , 2004
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC14900	Amostra tipo, controle do teste da coagulase	-
<i>Escherichia coli</i>	ATCC25922	Amostra tipo, controle da coloração de Gram	-
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC10240	Amostra tipo, controle do teste da bacitracina	British Pharmacopoeia,2003

1.1 Critérios

Quanto aos critérios de inclusão para participação no estudo, foram considerados pacientes que:

- Possuíam diagnóstico de DA segundo critérios clínicos descritos por Hanifine Hajka (1980) e/ou Williams *et al.*, 1994 e pela Associação Brasileira de Alergia e Imunopatologia e pela Sociedade Brasileira de Pediatria (2006);
- Apresentaram critério de gravidade da doença segundo o SCORAD;
- O responsável concordou e assinou o Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Foram excluídos do estudo os pacientes:

- Com histórico de internação nos últimos 6 meses;
- Com idade acima de 18 anos;
- Que não tenham apresentado sintomas clinicamente compatíveis com a DA;
- Cujo responsável não tenha concordado com o TCLE.

O presente estudo foi submetido previamente ao Comitê de Ética (Anexo 2) em pesquisa do IPPMG da UFRJ, sob o número 11/51 e está em consonância com o estabelecido na Resolução nº 196/96 e suas complementares e com o Código de Ética Médica de 1988 (artigos 122 e 130).

1.2 Grau de gravidade (Index SCORAD) e dados clínicos dos pacientes

O grau de gravidade da dermatite atópica nos pacientes foi avaliada baseando-se nos parâmetros do Index SCORAD, que consiste na interpretação objetiva da extensão, intensidade da doença e sintomas subjetivos de prurido e perda de sono. Desse consenso, resultou uma equação, onde foram incluídos atributos observados nesses pacientes durante o exame físico habitual:

$$\text{Índice SCORAD} = A/5 + 7B/2 + C$$

Dessa forma, A consiste na superfície corporal acometida por área inflamada, variando de 0 a 100; B na intensidade dos sinais clínicos observados, composta pelos itens: eritema; edema; e/ou pápulas; exsudação e/ou crostas; escoriações e pode variar de 0 a 18; E a letra C significa sintomas subjetivos, como prurido e perda de sono, escalonados de 0 a 10, individualmente. O valor máximo atingido no índice SCORAD é de 103. Os valores numéricos de cada incógnita foram aplicados na equação supracitada considerando:

- $\square \leq 24$ – leve;
- $\square 25- 50$ – moderada;
- $\square > 50$ – grave.

Os dados clínicos e demográficos dos pacientes foram obtidos através do emprego de uma ficha que era preenchida no momento da coleta. (Anexo 1).

2. Análises microbiológicas

2.1 Caracterização fenotípica

➤ Identificação do gênero *Staphylococcus*

Todas os swabs foram cultivados em ágar manitol salgado, e o crescimento bacteriano foi submetido aos testes de confirmação de gênero e espécie. Os seguintes testes foram utilizados para a caracterização do gênero *Staphylococcus* e realizados de acordo com as metodologias previamente descritas: coloração de Gram (análise do aspecto morfotintorial), teste da catalase (reação com peróxido de hidrogênio a 3%) e de susceptibilidade a 0,04U de bacitracina (disco-difusão, no qual halo ≤ 10 mm caracteriza amostra resistente) (Becker e Von Eiff, 2011).

➤ Confirmação da identificação da espécie *S. aureus*.

Para a confirmação da espécie *S. aureus* foi verificada a produção da coagulase, utilizando-se o sistema comercial Coagu-Plasma (Laborclin, Pinhais, Brasil) seguindo as instruções do fabricante. Os testes para a caracterização do gênero foram realizados de acordo com as metodologias descritas por Macfaddin (2000) e Bannerman e Peacock (2007).

➤ Análise da susceptibilidade aos antimicrobianos

A análise da susceptibilidade aos antimicrobianos para todas as amostras identificadas como *S. aureus*, foi realizada pelo teste de disco difusão, utilizando os antimicrobianos cefoxitina (30 μ g), ciprofloxacina (5 μ g), clindamicina (2 μ g), cloranfenicol (30 μ g), eritromicina (15 μ g), gentamicina (10 μ g), linezolida (30 μ g), mupirocina (5 μ g), oxacilina (1 μ g), rifampicina (5 μ g), sulfametoxazol/ trimetoprima (25 μ g), teicoplanina (30 μ g), tetraciclina (30 μ g) e Penicilina G. Linezolida, mupirocina, oxacilina, cefoxitina e tigeciclina foram obtidos da Oxoid (Cambridge, UK), e os demais antimicrobianos foram fornecidos pela CECON (São Paulo, Brasil). Os discos de antimicrobianos foram colocados sobre o meio e de acordo com o CLSI (2015). As amostras cultivadas em meio TSA (ágar tripton de soja, BD BBLTM) com 24h de incubação foram suspensas em salina e padronizadas de acordo com a turvação 0,5 na escala McFarland. Essa suspensão bacteriana foi semeada em meio ágar Müller- Hinton com swab estéril, em direções diversas assegurando uma semeadura uniforme. Os discos de antimicrobianos foram então depositados sobre a superfície do meio e a leitura dos halos de inibição realizada após 18h de incubação, a 35°C. Para visualização do Teste D, os discos de

eritromicina e clindamicina, foram posicionados a uma distância de 2 cm. As leituras dos testes foram realizadas de acordo com o CLSI (2015) e com o EUCAST (2015), utilizando a amostra padrão *S. aureus* ATCC 25923 como controle.

➤ **Determinação da concentração Mínima Inibitória (CMI) para Mupirocina através do Etest®**

A concentração Mínima Inibitória (MIC) para a mupirocina foi avaliada usando o método Etest® (Biomérieux), que consiste num gradiente de concentração dos antibióticos pré-definido colocado numa fita plástica. Para isso, as amostras foram pré-cultivadas em meio TSA (ágar tripton de soja, BD BBL™) com 24h de incubação e suspensas em salina e padronizadas de acordo com a turvação 0,5 na escala McFarland. A suspensão bacteriana foi semeada novamente em meio ágar Müeller- Hinton (Difco) com swab estéril, em direções diversas assegurando uma semeadura uniforme. As fitas plásticas foram então depositadas sobre a superfície central do meio. As leituras dos testes foram realizadas de acordo com o CLSI (2015) no qual valores acima ou igual à 256 µg/mL foram considerados altos níveis de resistência e abaixo deste valor como ausência de altos níveis de resistência. Foi utilizado como controle a amostra clínica 52a, positiva para o gene *ile-2*.

2.2 Caracterização molecular

➤ **Extração do DNA através da guanidina**

O DNA de todas as amostras foi obtido através de lise utilizando o isotiocianato de guanidina, conforme descrito por Pitcher, Saunders e Owen (1989), com algumas modificações. Cinco colônias isoladas previamente em ágar sangue foram transferidas para um tubo contendo caldo TSB e incubadas a 35 °C durante 18 h. Em seguida, 1,5 mL do crescimento bacteriano foram transferidos para um microtubo e centrifugado por 5 min a 8000 xg. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi dissolvido em 1 mL de tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,8) e novamente centrifugado a 8000 xg por 5 min. Ao sedimento, foram adicionados 100 µL de solução de lise [1 mL de tampão TE, 10 mg de lisozima (Sigma-Aldrich Chemical Company), 50 µL de polietilenoglicol [BRIJ a 0,5% (p/v)] (Sigma-Aldrich Chemical Company)] acrescido de 5 µL de lisostafina (1 mg/mL) (Sigma-Aldrich Chemical Company), seguidos por agitação e incubação a 37 °C, por 18 hs, em banho-maria. No dia seguinte, 500 µL de solução de isotiocianato de guanidina (Life Technologies, Gathersburg, MD, EUA) a 5 M foram adicionados, sendo os tubos agitados manualmente e incubados à temperatura ambiente de 5 a 10 min. As amostras lisadas foram deixadas posteriormente em gelo, durante 10 min, quando, então, foram adicionados 250 µL de acetato de amônio (Vetec,

Rio de Janeiro, Brasil) a 7,5 M. Após agitação manual, os tubos foram deixados por 10 min no gelo. Após este tempo, foram adicionados aos tubos 500 µL de solução de clorofórmio/álcool isoamílico 24:1 (v/v) (Vetec), homogeneizando-os manualmente. Os microtubos foram centrifugados a 13000 xg por 10 min e aproximadamente 800 µL de sua fase aquosa foram transferidos a um novo microtubo, acrescentando-se 0,54 volumes (430 µL aproximadamente) de isopropanol gelado (Vetec). Os tubos foram agitados suavemente por inversão durante 1 min para homogeneização e levados à centrífuga por 5 min a 13000 xg. O DNA precipitado foi lavado com etanol (Vetec) gelado a 70% (a 13000 xg por 5 min) e dissolvido em 50 µL de tampão TE, sendo incubado por 1 h a 55 °C, em banho-maria, para ser estocado a -20 °C. O DNA obtido foi utilizado para os testes de PCR. A concentração de DNA extraído das amostras foi determinada em Nanodrop *plus* (Healthcare Bio-sciences, Suécia).

➤ Caracterização do tipo de SCC*mec*

A determinação do tipo de SCC*mec* foi baseada no protocolo de Milheiriço e colaboradores (2007) utilizando PCR multiplex. No quadro 3 estão descritas as sequências dos oligonucleotídeos que foram utilizadas, o tamanho dos amplicons e a especificidade para cada tipo de SCC*mec* (Tabela 3). A amplificação dos fragmentos gênicos de regiões específicas de cada tipo de SCC*mec* foi realizada em termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient), utilizando um volume total de 50 µL, constituído por 3 µL de DNA extraído como descrito anteriormente, 5 µL de tampão da enzima (10 mM de Tris-HCl e 25 mM de KCl), 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Life Technologies Inc., Gathersburg, MD, EUA), 1,5 U de *Taq* DNA polimerase (Biotools, Madrid, Espanha), 0,2µM dos oligonucleotídeos kdp F1, kdp R1, MRS1 e MRS2, 0,4µM dos oligonucleotídeos CIF2 F2, CIF2 R2, RIF5 R10, RIF5 R13, SCC*mec*V J1F, SCC*mec* V J1R, SCC*mec*III J1F, SCC*mec*III J1R e 0,8µM dos oligonucleotídeos ccrC F2, ccrC R2, dcs F2, dcs R2, ccrB2 F2, ccrB2 R2, mecI P2 e mecI P3, completando-se com água para chegar ao volume final da reação. O ciclo consiste em desnaturação inicial a 94°C por 4min, seguida de 30 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 53°C e 1 min a 72°C, e um ciclo de extensão final a 72°C, por 4 min. O DNA amplificado em cada reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2% (p/v) (Invitrogen Carlsbad, EUA), em TBE 1X (Tris 0,89 M, ácido bórico 0,89 M, EDTA 2,5 mM, pH 8,2), a 80 volts. Após a corrida, o gel foi submerso em solução com brometo de etídio (0,5 µg/mL) por 40 min e a imagem foi capturada sob luz ultravioleta em um fotodocumentador (Vilber Lourmat, Marnela-Valleé, França). Como padrão tamanho de DNA, utilizamos o marcador 100 pb DNA Ladder (Biotools).

Tabela 3- Oligonucleotídeos utilizados e amplicons obtidos na PCR multiplex para tipagem do SCCmec (Milheirico *et al.*, 2007)

Oligonucleotídeos	Sequência (5'-3')	Tamanho do amplicon (pb)	Especificidade de (tipo de SCCmec)	Concentração final na reação (µM)
CIF2 F2 CIF2 R2	TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG ATTTACCACAAGGACTACCAGC	495	I	0,2
ccrC F2 ccrC R2	GTACTCGTTACAATGTTTGG ATAATGGCTTCATGCTTACC	449	V	0,4
kdp F1 kdp R1	AATCATCTGCCATTGGTGATGC CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG	284	II	0,8
mecI P2 mecI P3	ATCAAGACTTGCATTCAGGC GCGGTTTCAATTCATTGTC	209	II, III	0,8
dcs F2 dcs R1	CATCCTATGATAGCTTGGTC CTAAATCATAGCCATGACCG	342	I,II, IV	0,4
RIF5 F10 RIF5 R13	TTCTTAAGTACACGCTGAATCG GTCACAGTAATTCCATCAATGC	414	III	0,4
SCCmec V JIF SCCmec VJIR	TTCTCCATTCTTGTTTCATCC AGAGACTACTGACTTAAGTGG	377	V	0,8
SCCmec II JIF SCCmec III JIR	CATTTGTAGAAACACAGTACG GTTATTGAGACTCCTAAAGC	243	III	0,8
ccrB2 F2 ccrB2 R2	AGTTTCTCAGAATTCGAACG CCGATATAGAAGGGTTAGC	311	II, IV	0,4
MRS1 MRS2	TAGAAATGACTGAACGTCCG TTGCGATCAATGTTACCGTAG	154	Controle interno (<i>mecA</i>)	1

➤ **Deteção dos genes que codificam a leucocidina de Panton-Valentine (PVL)**

A detecção dos genes que codificam a leucocidina de Panton-Valentine (PVL) foi realizada para todas as amostras, seguindo o protocolo de Lina e colaboradores (1999). A amplificação do fragmento dos genes *lukS-PV* e *lukF-PV* foi feita em um termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient), utilizando 3 µL de DNA extraído por lise de guanidina, 2,5 µL de tampão da enzima (10 mM Tris HCl, 25 mM KCl), 2mM de MgCl₂, 200mM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Life Technologies Inc., Gathersburg, EUA), 1,5 U de *Taq* DNA polimerase (Biotools, Madrid, Espanha) e 1 µM dos

oligonucleotídeos representados na tabela 4. O produto da reação foi realizado por eletroforese em gel de agarose a 1%, em TBE (0,89 M Tris, 0,89 M ácido bórico, 2,5 mM EDTA, pH 8,2) em 80V. Como padrão de DNA foi utilizado o marcador 100 pb DNA ladder (Life Technologies). Previamente à solidificação da agarose, oi adicionado 1 µl de UniSafe Dye® (Uniscience Corporation, Miami, FL, EUA). A imagem foi capturada sob luz ultravioleta em um fotodocumentador (Vilber Lourmat, Marnela-Valleé, França). (Tabela 4)

Tabela 4 – Genes pesquisado, oligonucleotídeos utilizados e condições das PCR para detecção do geneda PVL em amostras de *S. aureus*

Oligonucleotídeos	Sequência (5'-3')	Amplicon (bp)	Concentração final na reação (µM)	Referência
LUKS-PV	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGA TCCA	433	1	Lina <i>et al.</i> ,1999
LUKF-PV	GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAAGC			

➤ **Determinação da relação clonal entre as amostras de *S. aureus* através de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)**

A análise do perfil de fragmentação do DNA cromossômico das amostras de *S. aureus* foi realizada após separação por PFGE dos fragmentos gerados após tratamento com a enzima de restrição *Sma*I, segundo Vivoni e colaboradores (2006). Primeiramente, as amostras foram cultivadas em ágar sangue a 35°C por 24 horas. Posteriormente, cinco colônias isoladas foram inoculadas em 5 mL de caldo TSB e incubadas durante 4 horas a 35°C, até atingir a turvação correspondente à escala 2 de McFarland (aproximadamente $6,0 \times 10^8$ UFC/mL). Em seguida, 1 mL desta suspensão foi transferido para um tubo do tipo Eppendorf®, o conteúdo centrifugado (7000xg), por 5 minutos e o sedimento suspenso em 250 µL de tampão PIV (NaCl 1 M, Tris-HCl 10 mM, pH 7,6). A esta suspensão foi adicionada o mesmo volume de agarose de baixo ponto de fusão (“Low Melting Point Agarose”, IBI Technical, New Heaven, EUA) a 1,8%, dissolvida em tampão PIV e mantida a 58°C. Após homogeneização as amostras foram distribuídas em moldes de agarose, que foram mantidos a 4°C por cerca de 10 minutos para serem cortados em pequenos blocos. Os "plugs" de agarose formados foram colocados em 2 mL de solução de lise EC (Tris-HCl 6 mM, NaCl 1 M, EDTA 100 mM, 0,5% de BRIJ e 0,5% lauril sarcosinato de sódio; pH final 7,5) contendo lisozima (0,5 mg/mL) (Sigma-Aldrich Company) e lisostafina (0,05 mg/mL) (Sigma-Aldrich Company) e incubados a 35°C, sob agitação lenta, durante 18 horas. Após 18 horas, os tubos foram resfriados a 4°C

ea solução de lise foi substituída por 2mL de uma solução ES (EDTA 0,4 M pH 9,5, 1% [p/v] de lauril sarcosinato de sódio) contendo proteinase K (0,1 mg/mL) (Sigma-Aldrich Company). Após incubação a 50°C, em banho-maria, durante 18 horas, os blocos de agarose foram resfriados a 4°C e a solução substituída por 2 mL de nova solução ES. A digestão do DNA cromossômico foi realizada em blocos de agarose, lavados quatro vezes em tampão TE a 37°C, em banho de imersão, sendo as três primeiras lavagens de 1 hora cada e a última de 18 horas. Os "plugs" de agarose foram transferidos para outra solução contendo 0,25 mL do tampão específico da enzima de restrição *SmaI* (New England Biolabs, Ipswich, Inglaterra) e incubado a 25°C, por 4 horas. Em seguida a solução tampão foi removida e novo tampão foi adicionado (0,25mL) contendo 20 U da enzima *SmaI*. Os "plugs" foram incubados a 25°C, durante 18 horas. Após esse intervalo de tempo, a solução contendo a enzima foi removida, o plug de agarose fundido a 70°C e aplicado no gel de agarose (Invitrogen) a 1% dissolvida em tampão TBE 0,5x. O gel foi submetido à eletroforese em campo pulsado (CHEF DR III, Bio-Rad, Hercules, EUA) utilizando um tempo de pulso crescente de 1 a 35 segundos, durante 21 horas, a 6 V/cm, 14°C, com ângulo de 120°. Ao término da corrida o gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL), por 40 minutos e descorado por 1 hora em água destilada. A imagem foi capturada sob luz ultravioleta em um fotodocumetador (Vilber Loumat). Como padrão de tamanho molecular, foi utilizado o marcador 50-1.000 Kb Lambda Ladder PFGE Marker (New England BioLabs). Os fragmentos obtidos no PFGE foram analisados através do programa Bionumerics, versão 6.0 (Applied Maths, Bélgica), usando o coeficiente de similaridade e o método de "Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages" (UPGMA) para análise dos agrupamentos. Foi utilizado o critério de Van Belkum e colaboradores (2009), que considera até quatro bandas de diferença e mínimo de 80% de similaridade entre as amostras para inclusão em um mesmo genótipo.

2.3 Análise estatística

Os dados obtidos durante o estudo foram armazenados e processados de acordo com programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 13.0 para análise estatística, através do qual foram aplicados testes adequados para cada determinado tipo de análise. Para as variáveis contínuas foram calculadas as medidas de tendência central e dispersão e para as variáveis discretas, a distribuição de frequência. A significância estatística foi definida quando $p \leq 0,05$.

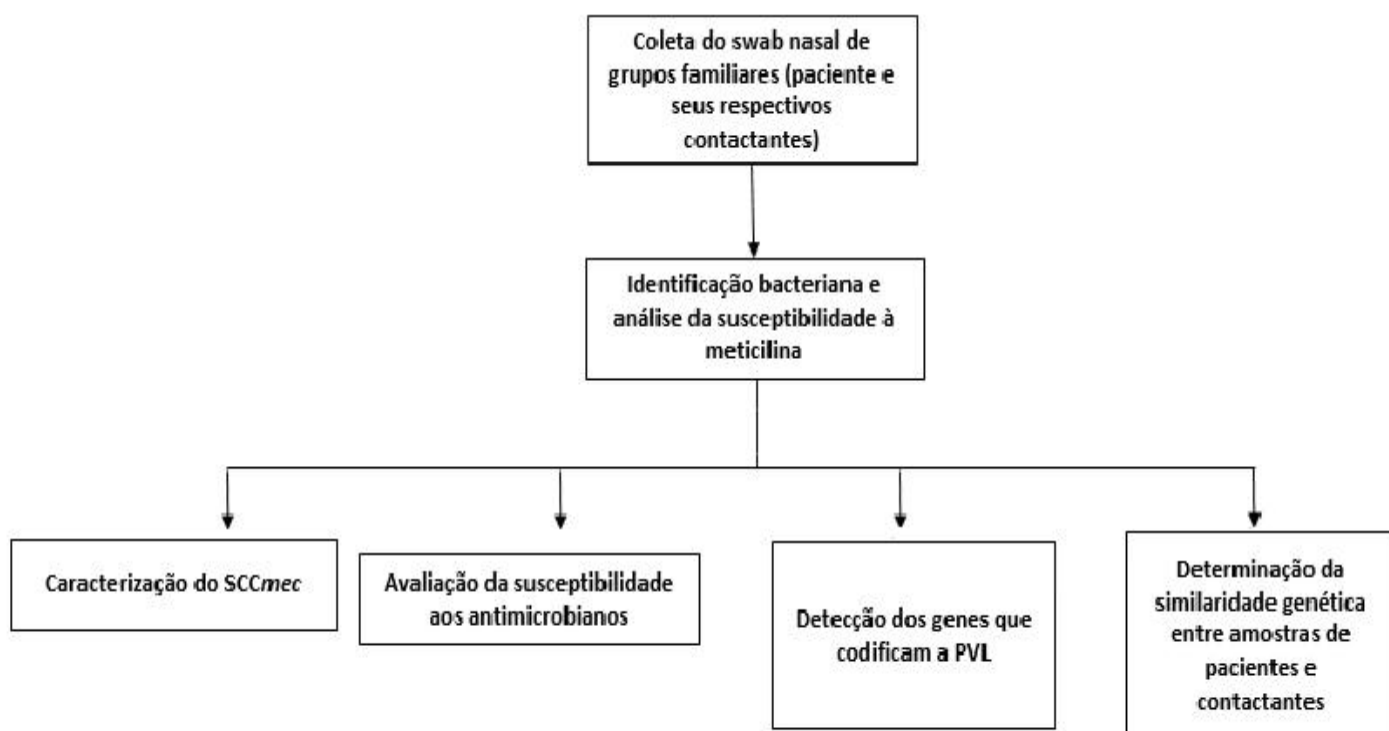


Figura 2– Fluxograma da metodologia empregada neste estudo.

V. Resultados

1. Amostras incluídas no estudo

Foram coletadas amostras de 115 pacientes e de 55 contactantes, no período de setembro de 2011 a dezembro de 2012 no ambulatório de dermatologia do IPPMG. Foi considerado grupo familiar cada paciente e seu (s) respectivo (s) contactante (s) totalizando 48 grupos. Foram selecionados 30 grupos familiares em que a criança e seu respectivo contactante apresentavam *S. aureus* em sua microbiota. Em 7 grupos familiares foi incluído mais de um contactante. No total foram analisadas 67 amostras de *S. aureus*, 30 de pacientes e 37 de contactantes (Figura 3).

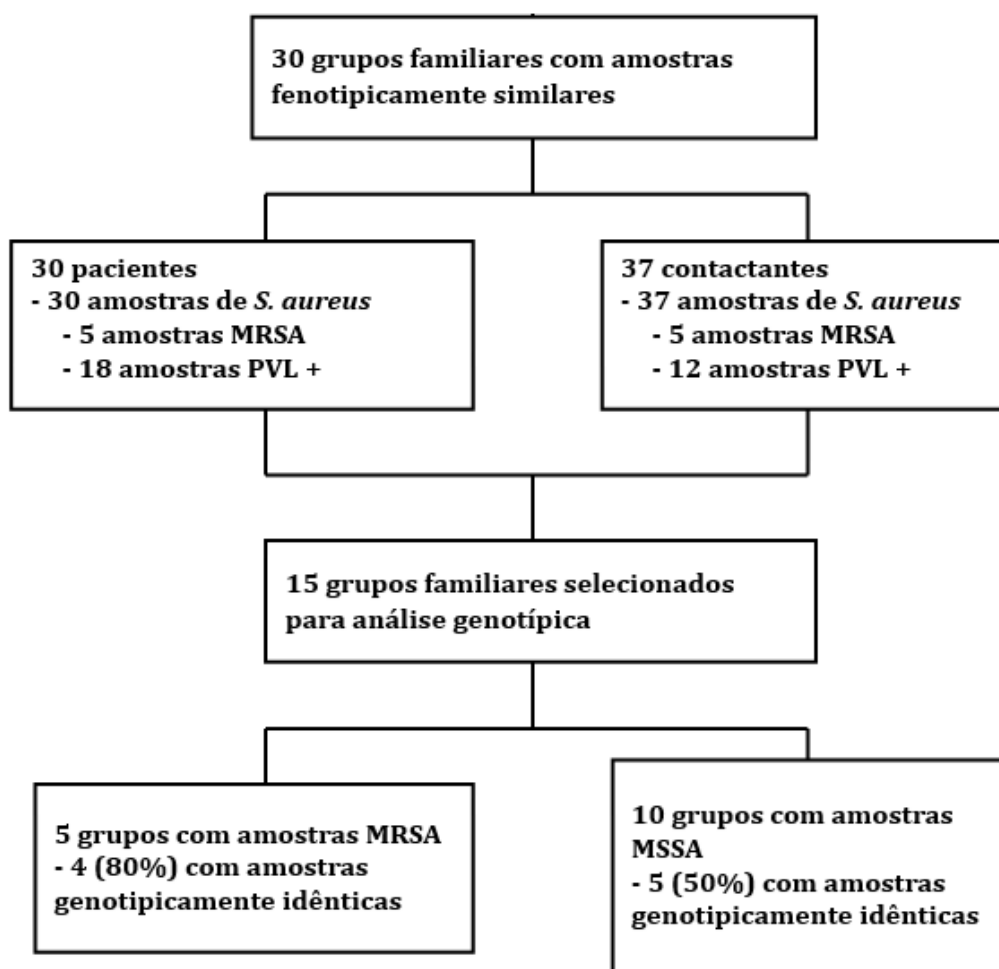


Figura 3 – Fluxograma simplificado dos resultados obtidos no presente estudo

2. Susceptibilidade à cefoxitina e caracterização do SCCmec

Todas as amostras foram testadas quanto à susceptibilidade ao disco de cefoxitina e aquelas que se apresentaram resistentes ao antimicrobiano foram classificadas como MRSA. Das 67 amostras analisadas, 10 (14,9%) foram classificadas como MRSA, sendo 5 de contactantes e 5 de pacientes (cinco casos familiares). As 57 (82,1%) amostras identificadas

como MSSA foram incluídas em 25 casos familiares. Das amostras MSSA, 25 (80%) eram de pacientes e 32 (83,70%) de contactantes (Tabela 5).

Todas as 10 amostras identificadas como MRSA foram caracterizadas quando ao tipo de SCCmec por meio de PCR *multiplex*. O SCCmec do tipo IV foi detectado em todas as amostras, tanto naquelas de pacientes como de contactantes.

Tabela 5 – Microrganismos isolados de pacientes pediátricos com dermatite atópica e seus respectivos contactantes em 30 grupos familiares nos quais pacientes e contactantes apresentavam microbiota fenotipicamente semelhante.

Microrganismo	Pacientes n (%)	Contactantes n (%)	Total n (%)
<i>S. aureus</i>	30	37	
MRSA	5 (16,60%)	5 (13,50%)	10 (14,93%)
MSSA	25 (80,0%)	32 (83,70%)	57 (82,08%)
Total	30 (44,7%)	37 (55,3%)	67 (100%)

MRSA: *S. aureus* resistente à meticilina; MSSA: *S. aureus* sensível à meticilina.

3. Determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos em geral

Todas as amostras de *S. aureus* foram avaliadas quanto à susceptibilidade a 14 antimicrobianos pelo método de disco-difusão. A tabela 6 apresenta os resultados de resistência antimicrobiana obtidos frente a 6 dos 14 antimicrobianos testados, já que todas as amostras foram resistentes à penicilina G, assim como todas foram sensíveis a a teicoplanina, ciprofloxacina, clindamicina, linezolida, rifampicina e tigeciclina (Tabela 6).

A resistência de forma geral, foi verificada para os antimicrobianos eritromicina (31,3%), cefoxitina (14,9%), gentamicina (4,47%), tetraciclina (7,46%), cloranfenicol (1,5%) mupirocina (7,46 %) e sulfametoxazol-trimetoprim (SUT) (1,5%). Resistência à clindamicina induzida pela eritromicina (teste D positivo) foi verificada em quinze amostras.

Tabela 6- Resistência antimicrobiana das 67 amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de pacientes pediátricos com dermatite atópica e de seus contactantes.

Antimicrobianos	Número de amostras resistentes		Número (%) total de amostras Resistentes
	Pacientes	Contactantes	
Cefoxitina	5	5	10 (14,9)
Cloranfenicol	0	1	1 (1,5)
Eritromicina	11	10	21 (31,3)
Gentamicina	0	3	3 (4,47)
Mupirocina	4	1	5 (7,46)
Tetraciclina	4	1	5 (7,46)
SUT	1	0	1 (1,5)

Todas as amostras foram resistentes a penicilina G e todas foram sensíveis a teicoplanina, ciprofloxacina, clindamicina, linezolida, rifampicina, e tigeciclina. SUT: sulfametoxazol-trimetoprim.

A análise da susceptibilidade aos antimicrobianos demonstrou que dentre as 30 amostras de pacientes, oito foram resistentes a eritromicina, uma a tetraciclina e uma a SUT. A resistência à clindamicina induzida pela eritromicina (teste D positivo) foi detectada em sete (23,3%) das amostras isoladas de pacientes (figura 4). Entre 37 amostras de *S. aureus* isoladas de contactantes, foi encontrada resistência a eritromicina (10 amostras; 30,3%), gentamicina (três amostras; 9,1%) e cloranfenicol (uma amostra; 3%) (Figura 5). O teste D positivo foi encontrado em oito (24,2%) amostras.

Todas as 67 amostras foram submetidas ao método E-test para observação da CMI para mupirocina. A faixa de CMI para mupirocina variou de 0,19 a >1024 µg/mL. Foram detectadas cinco amostras com altos níveis de resistência (ausência de halo no teste de disco-difusão) a mupirocina. Quatro amostras foram isoladas de pacientes e a quinta amostra foi isolada do contactante de um destes pacientes. Estas amostras apresentaram valores de CMI para mupirocina maiores ou iguais que 256 µg/mL, incluindo duas com CMI >1024 µg/mL.

Entre as amostras MSSA, as CMIs variaram de 0,19 a >1024 µg/mL. A maioria das amostras dos pacientes (22; 73,3%) e dos contactantes (26; 81,1%) apresentou concentrações < 4 µg/mL. Duas amostras de pacientes apresentaram CMI para mupirocina >1024 µg/mL e outras duas apresentaram CMI 256 µg/mL. Um dos contactantes destes pacientes apresentou uma amostra com CMI 256 µg/mL. Para amostras MRSA, a CMI para mupirocina variou de 0,19 a 8 µg/mL. A maioria das amostras de pacientes (4; 80%) e contactantes (5; 100%) apresentaram CMI abaixo de 4 µg/mL, tendo apenas uma amostra, proveniente de paciente, apresentado CMI= 8 µg/mL (Tabela 8).

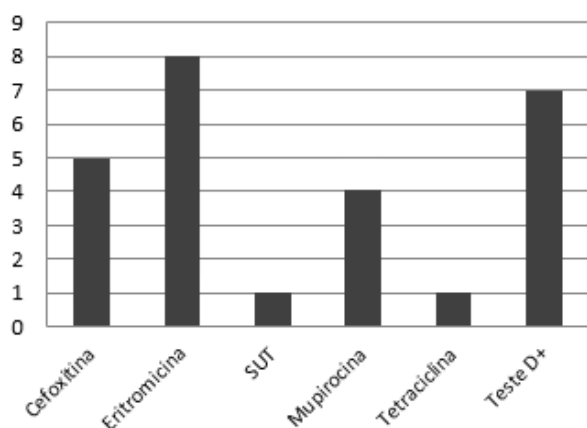


Figura 4- Número de amostras resistentes aos antimicrobianos entre 30 amostras isoladas de pacientes. SUT: sulfametoxazol-trimetoprim; Teste D: resistência à clindamicina induzida pela eritromicina

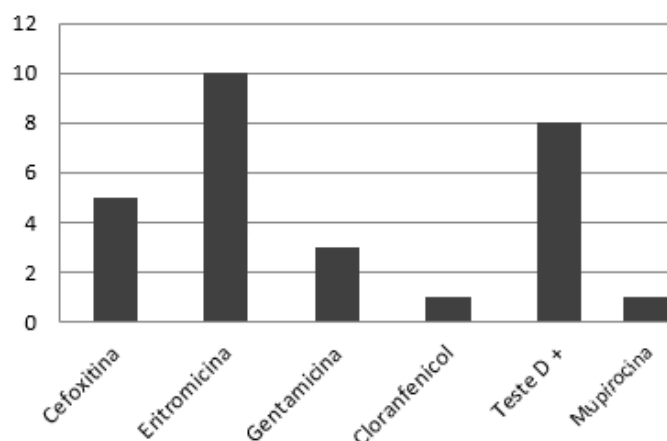


Figura 5- Número de amostras resistentes aos antimicrobianos entre 37 amostras isoladas de contactantes. SUT: sulfametoxazol-trimetoprim; Teste D: resistência à clindamicina induzida pela eritromicina

4. Presença do gene da PVL em amostras de pacientes e contactantes

A presença dos genes da Leucocidina de Pantón-Valentine (PVL) foi analisada em 67 amostras de *S. aureus* obtidas de sítios nasais de pacientes e seus contactantes. Esses genes foram detectados em 44,78% (30) das amostras. Esses genes foram identificados em 18 (62%) das 30 amostras de pacientes e em 12 (33,3%) de 37 contactantes, sendo significativamente mais encontrados entre amostras de pacientes (62%) do que entre amostras de contactantes (33,3%) ($p=0,026$) (Figura 6).

Entre as 10 amostras identificadas como MRSA, seis (60%) foram positivas para PVL, sendo estas provenientes de três pacientes e seus respectivos contactantes. Para as 57 amostras MSSA, apenas 17 (29,8%) apresentaram o gene PVL, sendo mais comuns em amostras identificadas como MRSA.

Dentre 15 pacientes com DA leve, nove (60%) estavam colonizados por amostras PVL positivas. Esta característica foi detectada em amostras de sete (58%) pacientes com DA moderada e dois (66,7%) pacientes com a forma grave da doença. A análise estatística mostrou que não houve diferença significativa na ocorrência dos genes da PVL quando amostras isoladas de pacientes com DA leve, grave e moderada foram comparadas ($p=0,46$).

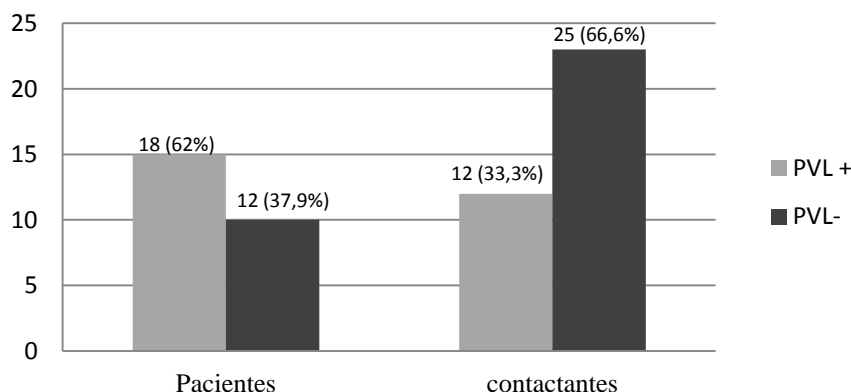


Figura 6 – Ocorrência dos genes da PVL em 67 amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de sítio nasal de pacientes pediátricos com dermatite atópica e de seus contactantes.

5. Análise da similaridade genética entre amostras de *S. aureus* de pacientes e de contactantes

A similaridade genética foi avaliada, através da técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), para todos os cinco grupos familiares nos quais foram identificadas amostras MRSA (10 amostras, cinco de pacientes e cinco de seus respectivos contactantes) e para 10 casos familiares nos quais foram identificadas amostras MSSA (10 amostras de pacientes e 11 de seus respectivos contactantes).

Dos 15 grupos analisados, em sete (46,7%) foram identificados perfis genotípicos idênticos. Dentre os cinco grupos familiares nos quais foram identificadas amostras MRSA, em quatro (80%) foram observados perfis genotípicos idênticos entre as amostras isoladas da criança e do seu contactante. Três grupos familiares apresentaram amostras pertencentes à linhagem USA800 e um à linhagem USA400. No único grupo familiar em que paciente e contactante carregavam amostras MRSA sem similaridade genética, o paciente apresentou colonização por uma amostra associada a linhagem USA1100, enquanto seu contactante estava colonizado por uma amostra pertencente à linhagem USA800 (Figura 7 e Tabela 7).

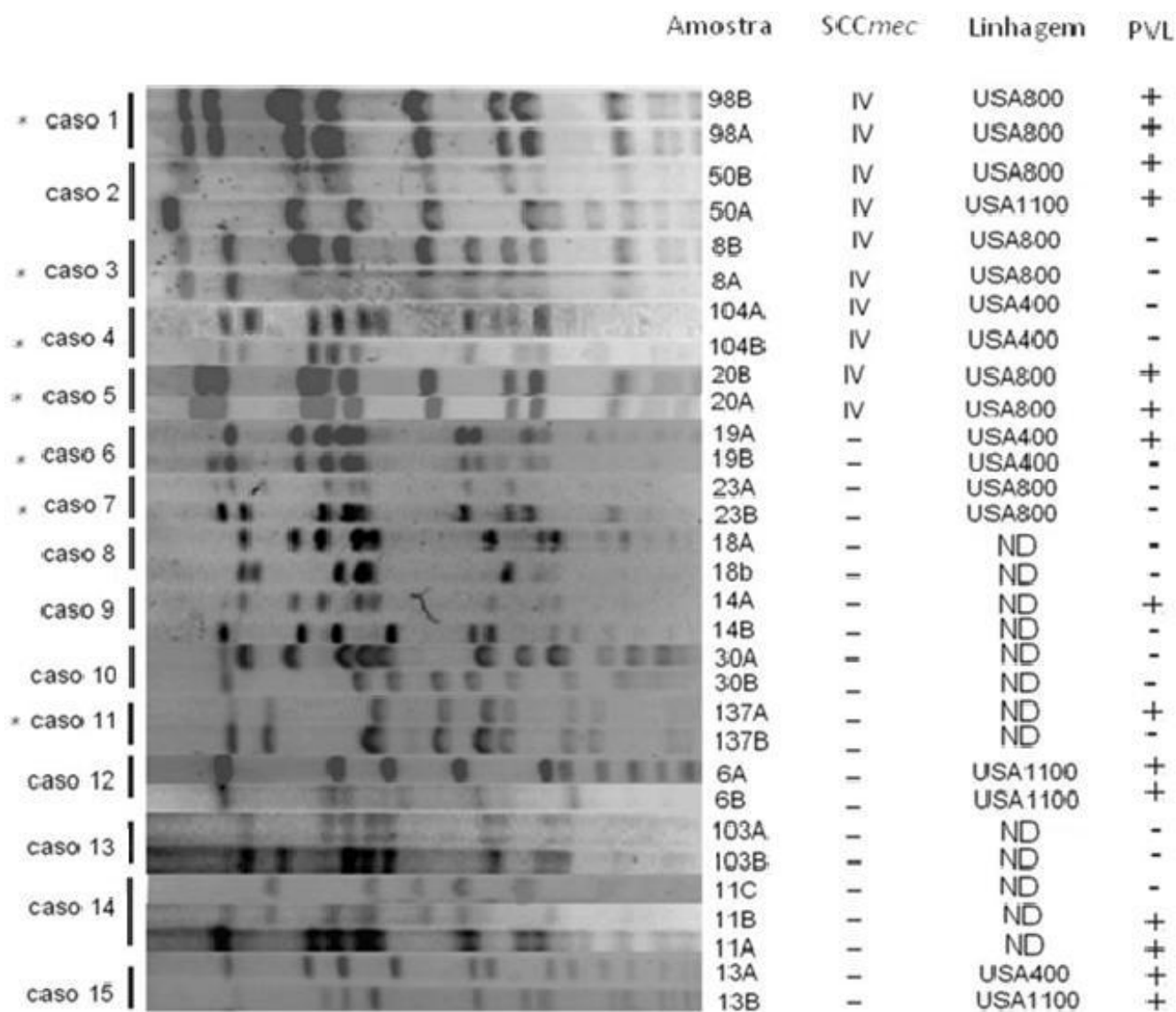


Figura 7- Perfil de fragmentação do DNA gênomico de amostras de *Staphylococcus aureus* de pacientes com dermatite atópica e seus contactantes após tratamento com enzima de restrição *SmaI* e PFGE. A letra “A” associado à numeração se refere ao paciente e “B” ao contactante. *: caso em o paciente apresentava o mesmo perfil genético que o seu contactate.

Com relação aos 05 grupos familiares nos quais foram detectadas amostras MRSA analisadas por PFGE, em 4 (80%) deles o paciente e o contactante apresentaram amostras com perfil genotípico idêntico (Figura 7 e Tabela 8). Em três desses grupos foram evidenciadas amostras pertencentes a linhagens USA800. Dentre as 21 amostras MSSA analisadas de 10 grupos familiares avaliados, a maioria (62%) foi relacionada a clones não descritos. Em três grupos familiares as amostras de paciente e contactante eram do mesmo clone.

Tabela 7. Características gerais das 10 amostras de MRSA isoladas de pacientes pediátricos com dermatite atópica e de seus respectivos contactantes atendidos em um ambulatório de dermatologia no Rio de Janeiro, entre setembro de 2011 e dezembro de 2012.

Amostra	Origem da amostra	Idade	Data de isolamento (dd/mm/aa)	SCORAD	CMI (µg/mL) para Mupirocina	Tipo de SCC _{mec}	Presença dos genes da PVL	Perfil de resistência aos antimicrobianos	Clonalidade	Genótipo
8a	Paciente	9	30/09/11	6,8/L	0,19	IV	-	Eritromicina	USA800	A3
8b	Contactante (Mãe)	48	30/09/11		4	IV	-	-	USA800	A3
20a	Paciente	9	14/10/11	3,3/M	4	IV	+	-	USA800	A4
20b	Contactante (Mãe)	49	14/10/11		1	IV	+	-	USA800	A4
50a	Paciente	6	09/12/11	17/L	8	IV	+	-	USA1100	C1
50b	Contactante (Mãe)	39	09/12/11		4	IV	+	-	USA800	A2
98a	Paciente	13	02/03/12	21,5/L	4	IV	+	-	USA800	A1
98b	Contactante (Mãe)	38	02/03/12		0,5	IV	+	-	USA800	A1
104a	Paciente	16	02/03/12	64,4/G	4	IV	-	-	USA400	B1
104b	Contactante (Mãe)	39	02/03/12		4	IV	-	-	USA400	B1

PVL: leucocidina de Panton-valentine; CMI: Concentração Mínima Inibitória; L: Leve; M: moderado; G: Grave.

Tabela 8. Características gerais de 21 amostras de MSSA isoladas de pacientes pediátricos com dermatite atópica e de seus respectivos contactantes atendidos em um ambulatório de dermatologia no Rio de Janeiro, entre setembro de 2011 e dezembro de 2012.

Amostra	Origem da amostra	Idade	Data de isolamento (dd/mm/aa)	SCORAD	CMI (µg/mL) para Mupirocina	Presença dos genes da PVL	Perfil de resistência aos antimicrobianos	Clonalidade	Genótipo
6a	Paciente	10	30/10/2011	44/M	0,19	+	Eritromicina, Clindamicina	USA1100	C1
6b	Contactante (Mãe)	37	30/10/2011		4	+	-	USA1100	C2
11a	Paciente	13	07/10/2011	35/M	>1024	+	Mupirocina	USA400	B4
11b	Contactante (Mãe)	46	07/10/2011		4	+	Eritromicina, Clindamicina	ND	L1
11c	Contactante (Irmão)	12	07/10/2011		8	+	-	ND	M1
13a	Paciente	14	07/10/2011	54,3/G	>1024	+	Mupirocina	USA/1100	C3
13b	Contactante (Mãe)	34	07/10/2011		0,38	+		USA/400	B3
14a	Paciente	15	07/10/2011	17,8/L	4	+	Sulfametoxazol-trimetoprima	ND	E1
14b	Contactante (Mãe)	38	07/10/2011		4	-	-	USA1100	B3
18a	Paciente	16	14/10/2011	39/M	64	-	-	ND	E1
18b	Contactante (Mãe)	40	14/10/2011		4	-	-	ND	J1
19a	Paciente	19	18/10/2011	10,6/L	0,19	+	-	USA400	B2
19b	Contactante (Mãe)	40	18/10/2011		2	-	-	USA400	B2
23a	Paciente	10	18/10/2011	20,9/L	1,5	-	-	USA800	A5
23b	Contactante (Mãe)	45	18/10/2011		2	-	-	USA800	A5
30a	Paciente	6	25/11/2011	23,3/L	0,19	-	-	ND	F1
30b	Contactante (Mãe)	38	25/11/2011		2	-	-	ND	G1
103a	Paciente	7	04/12/2011	9,2/L	4	-	Tetraciclina	ND	H1
103b	Contactante (Mãe)	35	04/12/2011		0,19	-	-	ND	I1
137a	Paciente	10	04/12/2011	44,5/M	4	+	Eritromicina, Clindamicina	ND	D1
137b	Contactante (Mãe)	35	04/12/2011		2	-	Eritromicina, Clindamicina	ND	D1

6. Perfil clínico e demográfico dos pacientes do estudo

Foram incluídos no estudo 30 grupos familiares, sendo um paciente de cada grupo avaliado. A idade dos pacientes variou de 1 a 19 anos, sendo a média de idade 11 anos, e em geral eram do sexo feminino (63,3%). A maioria dos contactantes avaliados no estudo foi representada pela mãe do paciente (81% dos casos). Nos grupos familiares nos quais mais de um contactante foi analisado, um dos contactantes era a mãe e o segundo era o irmão ou pai do paciente (Tabela 9).

Entre os 30 pacientes pediátricos com dermatite atópica que apresentavam amostras de *S. aureus*, cinco carregavam amostras MRSA, sendo quatro (80%) destes com histórico prévio de colonização por MRSA e uso prévio de antimicrobianos, e um deles com internação nos últimos 6 meses. Quanto ao ambiente educativo, foi observado que 27 (90%) pacientes colonizados por *S. aureus* frequentavam creche/escola, sendo que cinco (16,5%) destes estavam colonizados por MRSA.

Quanto ao ambiente doméstico, foi observado que 19 (63,3%) crianças compartilhavam a mesma cama com seus pais e em 3 (10%) casos havia histórico de familiares com dermatite atópica. A maioria dos pacientes apresentava DA leve (15; 50%) e moderada (12; 40%). Três (10%) apresentaram a forma grave da doença. A maioria dos pacientes colonizados por MRSA (60%) apresentava DA moderada ou grave, com presença do gene da PVL em 80% dos casos.

Tabela 9- Parâmetros clínicos relacionados aos 30 pacientes pediátricos com dermatite atópica em relação a presença de amostras nasais de *Staphylococcus aureus* sensíveis e resistentes à metilina, atendidos em um ambulatório de dermatologia no Rio de Janeiro, no período de setembro de 2011 a dezembro de 2012.

Parâmetros Clínicos	MSSA	MRSA	N (%) Total de pacientes	*P valor
Pacientes	25 (83,3)	5 (16,6)	30 (100)	-
Idade	14,4 ± 8,4 (1-19)	9,6 ± 5,9 (1-17)	-	
Sexo				
Masculino	9 (81,8)	2(18,1)	11 (36,7)	1,00
Feminino	16(84,2)	3(15,7)	19(63,3)	
SCORAD				
Leve	13 (52)	2(40)	15(50)	1,00
Moderado	10 (40)	2(40)	12(40)	1,00
Grave	2 (8)	1(20)	3(10)	0,43
O responsável tinha DA				
Sim	3(12)	0(0)	3(10)	-
Não	22(88)	0(0)	22(73,3)	-
Frequente creche/ escola				
Sim	23 (85,1)	5 (18,5)	27 (90)	0,48
Não	2 (66,7)	1(33,3)	3 (10)	
Possui saneamento básico				
Sim	25 (89,1)	5 (3,1)	30 (100)	-
Não	0 (0)	0 (0)	0(0)	
Compartilhava a mesma cama com alguém				
Sim	15 (60)	4(80)	19 (63,3)	0,62
Não	10(40)	1 (20)	11 (36,7)	
Paciente foi colonizado previamente por MRSA				
Sim	1(4)	4(80)	5 (16,6)	0,001
Não	24 (96)	1(20)	25 (83,3)	
Houve internação nos últimos 6 meses pelo paciente				
Sim	0(0)	1(10)	1 (3,3)	-
Não	15(57,4)	4 (80)	29 (96,7)	
Faz uso prévio de antibiótico				
Sim	1(4)	4(80)	5 (18,1)	0,001
Não	24(96)	1(20)	25 (81,9)	

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à metilina; MSSA: *Staphylococcus aureus* sensível à metilina;

* **Diferença estatisticamente significativa (valor de $p < 0.05$)**

VI. Discussão

A Dermatite atópica (DA) é uma doença cutânea crônica, caracterizada pelo aparecimento de lesões eczematosas e altamente pruriginosas, que pode afetar até 20% da população pediátrica mundial (Wolter e Price, 2014). Devido à maior frequência de DA durante a infância, há a necessidade de um contato mais estreito dos pais para o cuidado das lesões, o que possibilita a transmissão de *S. aureus*, presente na microbiota dos contactantes, para as lesões das crianças (Chiu *et al.*, 2010; Pascolini, 2011).

Em nosso estudo, foram avaliadas 67 amostras de 30 grupos familiares de crianças com DA, em que tanto a criança quanto seu respectivo contactante apresentavam na microbiota *S. aureus*, totalizando 30 amostras provenientes de pacientes e 37 de seus contactantes. Sete pacientes apresentaram mais de um contactante. Das 67 amostras analisadas, 10 (14,93%) foram classificadas como MRSA, sendo cinco de pacientes e de seus contactantes. Deste modo, o percentual de amostras MRSA foi de 16,7% entre pacientes e de 13,5% entre contactantes. A baixa frequência de indivíduos colonizados por MRSA encontrada nesse estudo coincide com os resultados encontrados por Suh e colaboradores (2008) no qual, das 43 amostras de *S. aureus* de crianças com DA nos Estados Unidos apenas 16% delas eram MRSA. Porém, no Canadá, um estudo envolvendo 96 crianças atópicas colonizadas por *S. aureus* não detectou nenhuma amostra MRSA. Em outro estudo, desta vez realizado no Brasil, na cidade de Porto Alegre, por Petry e colaboradores (2012), também não foram encontradas amostras de *S. aureus* resistentes à metilicina em crianças com DA colonizadas pelo patógeno. Na região metropolitana do Rio de Janeiro as taxas de MRSA entre crianças saudáveis já é bastante alta, em torno de 13% (Braga *et al.*, 2014) quando comparada a outras cidades, como Goiânia (GO), onde a prevalência em MRSA em crianças sem fatores de risco é de menos de 4% (Lamaro-Cardoso *et al.*, 2009). Considerando que este estudo foi realizado com pacientes oriundos da região metropolitana do Rio de Janeiro, em especial das zonas Norte e Oeste, é possível que nossos dados indiquem que as taxas de MRSA entre crianças com DA acompanhem o padrão observado entre crianças saudáveis e estejam relacionadas a características sociais e demográficas do Rio de Janeiro.

No presente estudo, foram observadas taxas de resistência abaixo de 15% para todos os antimicrobianos, exceto eritromicina, cujo percentual de amostras resistentes foi de 31,3%. Este dado é semelhante ao encontrado por Petry e colaboradores (2012)

que relataram 36% de resistência à eritromicina em amostras de pacientes pediátricos com DA dentre 70 avaliados. Este é um dado preocupante, visto que a eritromicina é um antibiótico de uso sistêmico frequentemente utilizado para o tratamento da DA no caso de alergia a penicilinas (Petry *et al.*, 2012). Por outro lado, uma única amostra apresentou resistência ao sulfametoxazol-trimetoprima, um antimicrobiano que pode ser utilizado como alternativa no tratamento de infecções em pacientes atópicos (Travers *et al.*, 2012). Com relação à mupirocina, um antimicrobiano utilizado na descolonização nasal de pacientes com amostras MRSA (Fraser *et al.*, 2010), quatro amostras de pacientes e uma de contactante foram classificadas, de acordo com os critérios do CLSI (2016), como portadoras de altos níveis de resistência ao antimicrobiano, pois apresentaram ausência de halo no teste de difusão em agar com disco de 200µg e valores de CMI acima de 256µg/mL. A mupirocina é um antimicrobiano que também pode ser utilizado como parte do tratamento da DA, (Huang *et al.*, 2009; Canpolat *et al.*, 2012). O tratamento e a eliminação do estado de portador em crianças com DA são essenciais, pois a presença de *S. aureus* além de aumentar o risco de desenvolvimento de infecção pelo patógeno também está associada a maior gravidade da doença (Huang *et al.*, 2009; Jagadeesan *et al.*, 2014). A ocorrência de amostras resistentes a este antimicrobiano pode dificultar o manejo da doença nessas crianças.

O SCCmec IV foi encontrado em todas das amostras MRSA de colonização de pacientes e de contactantes no presente estudo. Chung e colaboradores (2008) em um estudo na Coreia do Sul, também encontraram uma predominância do SCCmec IV (68,7%) entre amostras MRSA isoladas de crianças com DA. Segundo Gelatti e colaboradores (2013), o SCCmec do tipo IV é o mais encontrado em amostras comunitárias no Brasil, o que coincide com nossos resultados e fortalece a hipótese de que as características genéticas das amostras de *S. aureus* encontradas em pacientes com DA seguem o perfil das amostras disseminadas na população brasileira.

A prevalência de genes que codificam fatores de virulência entre amostras isoladas de crianças com DA e de seus contactantes também foi avaliada. O conhecimento da presença de amostras de *S. aureus* carreando genes da PVL em pacientes com DA tem sido relatado em vários estudos, já que esta é uma importante toxina produzida tanto por amostras MSSA quanto MRSA, e está associada a lesões cutâneas graves, como furunculose e fasciíte necrosante (Lina *et al.*, 1999; Lina *et al.*, 1999; Omoe *et al.*, 2003; Chen Chiou & Tsen, 2004; Wannet *et al.*, 2005; Roberts *et al.*,

2008). Nos últimos 20 anos a PVL foi reconhecida como um fator de virulência importante nas infecções por amostras de *S. aureus* de origem comunitária (Lina *et al.*, 1999; Vandenesch *et al.*, 2003; Wannet *et al.*, 2005). No presente estudo foi detectada a presença dos genes que codificam a PVL em 18 (62%) das 30 amostras de pacientes, e em 12 (33,3%) de 37 contactantes, totalizando 30 (44,78%) amostras *pvl* +. Esses dados diferem da maioria dos achados em estudos conduzidos com amostras isoladas de pacientes com DA em outros países, que encontraram taxas menores, variando de 0 a 4,2% (Chung *et al.*, 2008; Pascolini *et al.*, 2011; Yeung *et al.*, 2011). No entanto, no Brasil, um estudo realizado por Cavalcante e colaboradores (2015) em um ambulatório de dermatologia no Rio de Janeiro, que avaliou 106 pacientes pediátricos com diferentes níveis de gravidade da doença foi observado elevado potencial de virulência em amostras de colonização por *S. aureus*. Os autores reportaram que 70,9% das amostras carregavam os genes da PVL. Este mesmo estudo demonstrou que os genes da PVL eram significativamente mais prevalentes em amostras isoladas de crianças com DA moderada e grave. O mesmo não foi verificado em nosso estudo, no qual não houve diferença significativamente estatística na distribuição dos genes da PVL entre amostras isoladas de pacientes com DA leve, moderada ou grave. Embora outros estudos ao redor do mundo já tenham reportado que não existe correlação entre o carregamento dos genes da PVL e a gravidade da DA (Yeung *et al.*, 2011), o número baixo de amostras incluída em nosso estudo pode ter impedido que obtivéssemos um resultado significativo. Contudo, vale lembrar que encontramos uma diferença significativa em relação a presença desses genes entre amostras de pacientes e de contactantes, confirmando a relevância deste fator de virulência em amostras de *S. aureus* entre indivíduos atópicos, os quais podem apresentar seu quadro agravado em decorrência da maior patogenicidade do microrganismo.

Entre as 10 amostras identificadas como MRSA, seis (60%) foram positivas para PVL, sendo estas provenientes de três pacientes e seus respectivos contactantes. Para as 55 amostras MSSA, apenas 17 (%) apresentaram os genes da PVL. Em Taiwan, Lo e colaboradores (2010) ao analisarem amostras de 23 crianças colonizadas por MRSA, encontraram 65% de amostras PVL positivas. Em geral, a maior prevalência de PVL ocorre entre amostras de origem comunitária sensíveis à meticilina, as quais costumam ser mais virulentas. Entretanto, no presente estudo, a maior taxa de genes da PVL foi verificada entre amostras MRSA. Tal resultado pode estar relacionado ao grande número de amostras associadas ao clone USA1100 identificado entre nossos pacientes,

os quais estão relacionados à presença destes genes (Von Eiff *et al.*, 2004; Ellington *et al.*, 2007). Além disso, as 8 amostras MRSA positivas para os genes da PVL correspondiam à 4 pacientes e 4 de seus espectivos contactantes, indicando a possibilidade de transmissão da mesma cepa entre pacientes e contactantes.

A caracterização molecular das amostras através da técnica de PFGE foi realizada com objetivo de analisar o perfil clonal das mesmas e investigar a possibilidade de transmissão cruzada entre pacientes e contactantes. No presente estudo, todas as estirpes MRSA, exceto de um grupo familiar, isoladas tanto do paciente quanto do contactante foram similares entre elas e associadas aos genótipos USA400, USA800 ou USA1100. Estas são as linhagens mais comumente encontradas no Brasil, tanto nos hospitais quanto na comunidade (Caboclo *et al.*, 2013; Gelatti *et al.*, 2013; Cavalcante *et al.*, 2015). Um estudo conduzido por nosso grupo com crianças atópicas com colonização e infecção por *S. aureus* no Rio de Janeiro indicou que mais de 50% das amostras isoladas pertencia a uma dessas três linhagens (Caboclo *et al.*, 2013), confirmando dados do presente estudo.

Dos grupos familiares cujas amostras foram analisadas por PFGE, perfis genotípicos idênticos foram encontrados em 80% dos casos com amostras MRSA e em 30% dos casos com amostras MSSA. Considerando todos os 15 grupos familiares cujas amostras foram analisadas por PFGE verificamos que perfis genotípicos idênticos foram observados em 7 (46,4%) deles. Pascolini e colaboradores (2011) detectaram 75% de similaridade ao avaliar 47 amostras de crianças e seus respectivos contactantes na Itália. Em Singapura, Chiu e colaboradores (2009) avaliaram 21 grupos familiares constituídos de pacientes atópicos e um contactante e verificaram que 67% apresentavam perfis genotípicos idênticos. Nenhum desses estudos, no entanto, identificou as linhagens as quais as amostras identificadas pertenciam. Os resultados encontrados no presente estudo, em que foram verificadas amostras com perfis genotípicos idênticos, corrobora dados da literatura e reforça a hipótese de transmissão cruzada entre crianças atópicas e seus familiares, indicando a importância de estudos adicionais que mostrem a necessidade da avaliação microbiológica e possível tratamento dos contactantes próximos de crianças com DA, algo que não faz parte, atualmente do protocolo de tratamento desses indivíduos.

No presente estudo, as condições clínicas mais significativamente associadas a colonização por MRSA foram uso de antibiótico ($p=0,001$) e colonização previa por MRSA ($p=0,001$). O uso prévio de antibióticos já foi considerado por outros autores

como um fator de risco que pode levar a seleção de microrganismos resistentes em infecções por *S. aureus*, tanto em pacientes com DA como em indivíduos saudáveis (Tumbarello *et al.*, 2002; Shet *et al.*, Hidron *et al.*, 2005; 2009; Ramsetty *et al.*, 2010). A colonização prévia por MRSA em pacientes atópicos tem sido discutida na DA como um fator relevante associado a transmissão em pacientes com doenças de pele, nos quais devido a falha na barreira cutânea, pode haver o favorecimento da recorrência do MRSA (Daeschlein *et al.*, 2015; Brans *et al.*, 2016). Não houve diferença estatisticamente significativa na ocorrência de amostras MRSA e MSSA em crianças que dividem a cama com pais ou parentes. Porém, no estudo realizado por Cavalcante e colaboradores (2015) os autores também mostraram similaridade de genótipos de amostras isoladas de crianças e de contactantes que dormiam na mesma cama. Também é importante lembrar que uns altos percentuais (63,3%) de indivíduos do presente estudo compartilhavam o mesmo local ao dormir, o que predispõe ao risco de aquisição do patógeno por indivíduos atópicos. O pequeno numero de amostras analisadas por PFGE não permite uma análise mais profunda, mas é possível que o fato de dividir a cama com os pais ou contactante esteja associado, não a aquisição especificamente de MRSA, mas a transmissão cruzada de amostras de *S. aureus*.

VII. Conclusões

- Os resultados indicam elevada taxa de colonização nasal por *S. aureus* em pacientes com DA e seus contactantes, incluindo amostras resistentes à meticilina.
- O SCC_{mec} IV foi identificado em todas as amostras identificadas como MRSA, tanto em pacientes como em contactantes
- Os genes da PVL foram significativamente mais encontrados entre amostras de pacientes (62%) do que entre amostras de contactantes (33,3%) ($p=0,026$). Esses genes foram também mais comuns entre amostras MRSA
- Similaridade genética entre amostras nasais de *S. aureus* de pacientes e de contactantes foi encontrada em 7 (46,6%) dos 15 grupos familiares analisados, indicando a possibilidade de transmissão cruzada entre os familiares.

VIII. Bibliografia

- Ahuja, A., Land, K., Barnes, C. J. (2003). Atopic dermatitis. *Southern Med. J.*, 96, 1068-1072.
- Aires de Souza, M., De Lencastre, H., Sanches, I. S., Kikuchi, K., Totsuka, K. e Tomasz, A. (2000). Similarity of antibiotic resistance patterns and molecular typing properties of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates widely spread in hospitals in New York City and in a hospital in Tokyo, Japan. *Microb. Drug. Res.*, 6, 253-258.
- Aires de Sousa, M., Miragaia, M., Sanches, I. S., Ávila, S., Adamson, I., Casagrande, S. T. e Camou, T. (2001). Three-Year Assessment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clones in Latin America from 1996 to 1998. *J. Clin. Microb.*, 39, 2197-2205.
- Amaral, M.M., Coelho, L.R., Flores, R.P. (2005). The predominant variant of the Brazilian epidemic clonal complex of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* has an enhanced ability to produce biofilm and to adhere to and invade airway epithelial cells. *J. Infect. Dis.*, 192, 801-10.
- Arikawa, J., Ishibashi, M., Kawashima, M. (2007). Decreased levels of sphingosine, a natural antimicrobial agent, may be associated with vulnerability of the stratum corneum from patients with atopic dermatitis to colonization by *Staphylococcus aureus*. *J. Invest. Dermatol.*, 119, 33-9.
- Asher, M.I., Keil, U., Anderson, H.R., Beasley, R., Crane, J. (1995). International study of asthma and allergies in childhood (ISAAC): rationale and methods. *Eur. Respir. J.*, 8, 483-91.
- Aoki, V., Cestari, S. C. P. (2005). Dermatite atópica. Rio de Janeiro: diagraphic, 61-71.
- Ardern-Jones, M.R., Black A.P., Bateman, E.A., Ogg, G.S. (2007) Bacterial superantigen facilitates epithelial presentation of allergen to T helper 2 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 5557-62.
- Argudín M.A., Mendoza, M.C; Rodicio M.R. (2001). Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*, 2, 1751-1773.
- Archer, G.L. (2000). *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative staphylococci. In: principles and practice of infectious diseases – 8th edition. NY, USA.
- Arslan, S., Özkardes, F. (2007). Slime production and antibiotic susceptibility in staphylococci isolated from clinical samples. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 102, 29-33.
- Asher, M.I., Montefort, S., Björkstén, B., Lai, C.K., Strachan, D.P., Weiland, S.K., Williams, H. (2006). Phase three study group. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC phases one and three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet*, 368, 733-43.
- Atefi, N., Noorbakhsh, S. (2014). Ghavidel darestani s, tabatabaei a, rezaee m. The rise of staphylococcal super antigens in psoriatic patients: a case-control study. *J. Microbiol.* 7, 9912.
- Balma-Mena, A., Lara- Corrales, I., Zeller, J., Richardson, S., McGavin, M. J., Weinstein, M., e Pope, E. (2011). Colonization with community- acquired Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with atopic dermatitis: a cross-sectional study. *Int. J. Dermatol.*, 50, 682-688.
- Bannerman, T.I. e Peacock, S.J. (2007). *Staphylococcus, micrococcus* and other catalase-positive cocci. In: manual of clinical microbiology. Murray PR, Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L. and Tenover, M.A. (Eds.). Washington DC: ASM press, 390-411.
- Barnetson, R.S., Rogers, M. (2007) Childhood atopic eczema. *BMJ*, 324, 1376-9.
- Bergdoll, M.S. (1981). A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin f, associated with toxic-shock-syndrome *Staphylococcus aureus* isolates. *Lancet*. 1, 1017-21.
- Bieber, T. (2008). Atopic dermatitis. *N. Engl. J. Med.*, 358, 1483-1494.
- Boguniewicz, M. (2004). Topical treatment of atopic dermatitis. *Immunol. Allergy Clin. N. Am.*, 24, 631- 44.
- Bonness, S., Szekat, T., Novak, N., Bierbaum, G. (2008). Pulsed-field gel elec-trophoresis of *Staphylococcus aureus* isolates from atopic patients revealing presence of similar isolates in isolates from children and their parents. *J. Clin. Microbiol.*, 46, 456-61.

- Braga, L. C., Leite, A. A., Xavier, K. G., Takahashi, J. A., Bemquerer, M. P., e Nascimento, A. M. (2005). Synergic interaction between pomegranate extract and antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *Can. J. Microbiol.*, 51, 541-547.
- Brans, R., Kolomanski, K., Mentzel, F., Vollmer, U., Kaup, O., e John, S. M. (2016). Colonisation with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and associated factors among nurses with occupational skin diseases. *Occup. Environ. Med*, 1-6.
- British Pharmacopoeia commission biological assay of antibiotics. London, UK: Pharmacopoeia Commission; British Pharmacopoeia Appendix XIV A, 2003.
- Burton, D.C., Edwards, J.R., Horan, T.C., Jernigan, J.A. e Fridkin, S.K. (2009). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* central line associated bloodstream infections in us intensive care units. *Jama*, 301, 727-736.
- Caboclo, R.M., Cavalcante, F.S., Iorio, N.L, Schuenc, R.P., Olendzki, A.N., Felix, M.J. (2013). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Rio de Janeiro hospitals: dissemination of the USA400/st1 and USA800/st5 scmec type IV and USA100/st5 SCCmec type ii lineages in a public institution and polyclonal presence in a private one. *Am. J. Infect Control*, 41, 21-26.
- Cardona, I., Cho, S., Leung, D. (2006). Role of bacterial superantigens in atopic dermatitis: Implications for future therapeutic strategies. *Am. J. Clin. Dermatol.*, 7, 273-9.
- Carmo, L.S, Dias, R.S., Linardi, V.R., Sena, M.J., Santos, D.A., Faria, M.E., Pena, E.C., Jett, M., Heneine, L.G. (2002) Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbial*. 19, 9-14.
- Castro, A. P. (2006). Calcineurin inhibitors in the treatment of allergic dermatitis. *J. Pediatr.*, 82, 166-72.
- Cavalcante, F.S., Schuenck, R.P., Ferreira, D.C., Da Costa, C.R., Nouér, S.A., Dos Santos, K.R. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: spread of specific lineages among patients in different wards at a Brazilian teaching hospital. *J. Hosp. Infect.*, 86, 151-4.
- Cavalcante, F. S., Abad, E. D., Lyra, Y. C., Saintive, S. B., Ribeiro, M., Ferreira, D. C. e dos Santos, K. R. N. (2015). High prevalence of methicillin resistance and PVL genes among *Staphylococcus aureus* isolates from the nares and skin lesions of pediatric patients with atopic dermatitis. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 48, 588-594.
- Chambers, H.F. (1993). Detection of methicillin-resistant staphylococci. *Infect. Dis. Clin. North. Am.*, 7, 425-33.
- Chen, T. R., Chiou, C. S., e Tsen, H. Y. (2004). Use of novel PCR primers specific to the genes of staphylococcal enterotoxin G, H, I for the survey of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-poisoning cases and food samples in Taiwan. *Int. J. Food Microbiol.*, 92, 189-197.
- Cheung, A.L., Bayer, A.S., Zhang, G; Gresham, H., Xiong, Y.Q. (2004) Regulation of virulence determinants *in vitro* and *in vivo* in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* 40, 1-9.
- Chiu, L.S., Ho, M.S, Hsu, L.V, Tang, M.B. (2009). Prevalence and molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates colonizing patients with atopic dermatitis and their close contacts in Singapore. *Braz. J. Dermatol.*, 160, 965-971.
- Chiu, L.S, Chow, V.C, Ling, J.M.(2010). *Staphylococcus aureus* carriage in the anterior nares of close contacts of patients with atopic dermatitis. *Arch. Dermatol.*; 146, 748-752.
- Chng, S.V., Goh, D.Y., Wang, X.S., Tan, T.N., Ong, N.B. (2004). Snoring and atopic disease: a strong association. *Pediatr. Pulmonol.* 38, 210-6.
- Clancy, M. J., Graepler, A., Breese, P. E., Price, C. S., e Burman, W. J. (2005). Widespread emergence of methicillin resistance in community-acquired *Staphylococcus aureus* infections in Denver. *Southern Med. J.*, 98,1069-1076.
- Cooke, F.J. e Brown, N.M. (2010). Community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Braz. Med. Bull.* 94, 215-27.
- Corso, A., Sanches, I. S., De Sousa, M. A., Rossi, A., e De Lencastre, H. (1998). Spread of a methicillin-resistant and multiresistant epidemic clone of *Staphylococcus aureus* in Argentina. *Microb. Drug Resist.*, 4, 277-288.

- Crum, N.F., Lee, R.U., Thornton, S.A., Stine, O.C., Wallace, M.R., Barrozo, C., Keefer-norris, A., Judd, S. e Russel, K.L. (2006). Fifteen-year study of the changing epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Med.*, 119, 943-51.
- Daeschlein, G., Podewils, S., Bloom, T., Assadian, O., Napp, M., Haase, H., e Jünger, M. (2015). Risk factors for MRSA colonization in dermatologic patients in Germany. *J. Dtsch Dermatol. Ges.*, 13, 1015-1022.
- De Benedetto, A., Kubo, A., Beck, L.A. (2012). Skin barrier disruption: a requirement for allergen sensitization. *J. Invest. Dermatol.*, 132, 949-63
- De Miranda, O.P., Silva-Carvalho, M.C., Ribeiro, A, Portela, F., Cordeiro, R.F., Caetano, N., Vidal, C.F., Figueiredo, A.M. (2007). Emergence in Brazil of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCCmec IV that are related genetically to the USA800 clone. *Clin. Microbiol. Infect.* 13, 1165-72.
- Deplano, A., Schuermans, A., Van Eldere, J., Witte, W., Meugnier, H., Etienne, J., e Van Belkum, A. (2000). Multicenter evaluation of epidemiological typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains by repetitive-element PCR analysis. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 3527-3533.
- Diep, B. A. , Otto, M. (2008). The role of virulence determinants in community-associated MRSA pathogenesis. *Trends Microbiol.*, 16, 361-9.
- Dinges, M.M., Orwin, P.M, Shievert, P.M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microb. Rev.*, 13,16–34
- Dominguez, M. A., De Lencastre, H., Linares, J., e Tomasz, A. (1994). Spread and maintenance of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone during an outbreak of MRSA disease in a Spanish hospital. *J. Clin. Microb.*, 32, 2081-2087.
- Dumitrescu, O., Boisset, S., Badiou, C., Bes, M., Benito, Y., Reverdy, M.E., Vandenesch, F., Etienne, J. e Lina, G. (2007). Effect of antibiotics on *Staphylococcus aureus* producing panton-valentine leukocidin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51, 1515-19.
- Katayama, Y; Ito, T; Hiramatsu, K. (2000). A new class of genetic element, *Staphylococcus* cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44, 1549-55.
- El-batawy, M.M., Bosseila, M.A., Mashaly, H.M., Hafez, VS. (2009). Topical calcineurin inhibitors in atopic dermatitis: a systematic review and meta-analysis. *J. Dermatol. Sci.*, 54, 76-87.
- Euzéby (2016). List of prokaryotic names with standing in nomenclature – genus *Staphylococcus*. Disponível em <http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.htmL>. Acesso em 24/06/2016.
- Enright, M. C., Day, N. P., Davies, C. E., Peacock, S. J., E Spratt, B. G. (2000). Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 1008-1015.
- Enright, M.C., Robinson, D.A, Randle, G., Feil, E.J., Grundmann, H., Spratt, B.G. (2002). The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc. Natl. Ac. Sci.*, 99, 7687-92.
- Eyerich, K., Novak, N. (2013). Immunology of atopic eczema: overcoming the th1/th2 paradigm. *Allergy*, 68, 974-82.
- Flohr, C., Williams, H. C. (2006). Epidemiology of atopic dermatitis. In: Harper, J., Oranje, A; Prose, N. *Textbook of pediatric Dermatology*, 181-190.
- Fraser, T. G., Fatica, C., Scarpelli, M., Arroliga, A. C., Guzman, J. e Procop, G. W. (2010). Decrease in *Staphylococcus aureus* colonization and hospital-acquired infection in a medical intensive care unit after institution of an active surveillance and decolonization program. *Infect. Cont. Hosp.*, 31, 779-783.
- Frazer, B. W., Lynn, J., Charlebois, E. D., Lambert, L., Lowery, D., Perdreau-remington, F. (2005). High prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in emergency department skin and soft tissue infections. *Ann. Emerg. Med.*, 45, 311-20.
- Gales, A.C., Helio, S. (2009). Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated in Brazilian hospitals participating in the sentry program. *Braz. J. Infect. Dis.*, 13, 90-98.

- Gelatti, L. C., Souza, A., Pereira, S., dos Santos Mendes, A. P., Jasef, D. F. A., do Nascimento, F. S., e dos Reis, N. O. (2013). Ocorrência de parasitos e comensais intestinais numa população de escolares da rede pública estadual de ensino do município de Uruaçu, Goiás. *Fasem Ciências*, 3, 55-65.
- Genestier A. L; Michallet, M. C., Prévost, G., Bellot, G., Chalabreysse, L., Peyrol, S., Thivolet, F., Etienne, J., Lina, G., Vallette, F.M., Vandenesch, F., Genestier, L. (2005). *Staphylococcus aureus* Panton-valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces bax-independent apoptosis of human neutrophils. *J. Clin. Invest.*, 115, 3117-27.
- Gilani, S.J., Gonzalez, M., Hussain, I.(2005) *Staphylococcus aureus* re-colonization in atopic dermatitis: beyond the skin. *Clin. Exp. Dermatol.*, 30, 10–13.
- Gomes, A. R., Santos Sanches, I., Aires de Sousa, M., Castaneda, E., e De Lencastre, H. (2001). Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Colombian hospitals: dominance of a single unique multi microbiol-resistant clone. *Microb. Drug. Res.*, 7, 23-32.
- Gupta A., Agrawal, A., Mehrotra, M., Singh, A., Malik, S., Khanna, A. (2011). Incidence, risk stratification, antibiogram of pathogens isolated and clinical outcome of ventilator associated pneumonia. *Indian J. Crit. Care*, 12, 96-101.
- Gustafsson, D., Sjöberg, O. e Foucard, T. (2000). Development of allergies and asthma in infants and young children with atopic dermatitis – a prospective follow-up to 7 years of age. *Allergy*. 55, 240-5.
- Hanifin, J. M., Rajka, G. (1980). Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta. Derm. Venereol.*, 92, 44-7.
- Hanifin, J.M., Thurston, M., Omoto, M., Cherill, R., Tofte, S.J., Graeber, M. (2001). The eczema area and severity index (EASI): assessment of reliability in atopic dermatitis. EASI evaluator group. *Exp. Dermatol.*, 10, 11-8.
- Hiramatsu, K., Cui, L., Kuroda, M., Ito, T. (2001) The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.*, 9, 486-93.
- Herbert, S., Barry, P. e Novick, R.P. (2001). Subinhibitory clindamycin differentially inhibits transcription of exoprotein genes in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.*, 69, 2996-3003.
- Holt, G.H., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Stanley, I.T., Williams, S.T. (1994). Genus *staphylococcus*. In: *bergey's manual of determinative bacteriology – 9th edition*. Baltimore, Williams e Wilkins Company, USA, 1-532.
- Hon, K. L. E., Lam, M. C. A., Leung, T. F., Kam, W. Y. C., Li, M. C. A., Ip, M., e Fok, T. F. (2005). Clinical features associated with nasal *Staphylococcus aureus* colonisation in Chinese children with moderate-to-severe atopic dermatitis. *Ann. Acad. Med.*, 34, 602–605.
- Hongo. I., Baba, T., Oishi, K., Morimoto, Y., Ito, T., Hiramatsu, K. (2009). Phenol-soluble modulin 3 enhances the human neutrophil lysis mediated by panton-valentine leukocidin. *Clin. Infect. Dis.*, 715–23.
- Holtfreter, S., Bauer, K., Thomas, D., Feig, C., Lorenz, V., Roschack, K., e Greinacher, A. (2004). egc-Encoded superantigens from *Staphylococcus aureus* are neutralized by human sera much less efficiently than are classical staphylococcal enterotoxins or toxic shock syndrome toxin. *Infect. Immun.*, 72, 4061-4071.
- Hidron, A.I., Kourbatova, E.V., Halvosa, J.S., Terrel, B.J., Mcdougal, L.K., Tenover, F.C, Blumberg H.M. E King, M.D.(2005). Risk factors for colonization with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in patients admitted to an urban hospital: emergence of community-associated MRSA nasal carriage. *Clin. Infect. Dis.*, 41, 159-166.
- Huang, J.T., Abrams, M., Tlougan, B., Rademaker, A., Paller, A.S. (2009). Treatment of *Staphylococcus aureus* colonization in atopic dermatitis decreases disease severity. *Pediatrics*, 123, 808-14.
- Hyvernat, H., Pulcini, C., Carles, D., Roques, A., Lucas, P., Hofman, V., Hofman, P., Bernardin, G. (2007). Fatal *Staphylococcus aureus* haemorrhagic pneumonia producing panton-valentine leukocidin. *Scand. J. Infect. Dis.*, 39, 183-5.
- ISAAC (1998). The International Study of asthma and Allergies in Childhood. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema. The international study of asthma and allergies in childhood (ISAAC). Steering Committee. *Lancet*, 351, 1225-32.

- Ito, T., Katayama, Y., Asada, K., Mori, N., Tsutsumimoto, K., Tienstorn, C., Hiramatsu, K. (2001). Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45, 1323-36.
- Jagadeesan, S., Kurien, G., Divakaran, Mv., Sadanandan, Sm., Akumari K., Sarin A. (2014). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization and disease severity in atopic dermatitis: a cross-sectional study from South India. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.*, 80, 229-34.
- Jarraud, S., Peyrat, M.A., Lim, A., Tristan, A., Bes, M., Mougel, C., Etienne, J., Vandenesch, F., Bonneville, M., Lina, G. (2001). *egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.*, 166, 669-77.
- Jerassy, Z., Yinnon, A. M., Mazouz-Cohen, S., Benenson, S., Schlesinger, Y., Rudensky, B. e Raveh, D. (2006). Prospective hospital-wide studies of 505 patients with nosocomial bacteraemia in 1997 and 2002. *J. Hosp. Infect.*, 62, 230-236.
- Johansson, S. G. O., Bieber, T., Dahl, R., Friedmann, P. S., Lanier, B. Q., Lockey, R. F., e Thien, F. (2004). Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 113, 832-836.
- John, J.F. e Barg, N.L. (2004). *Staphylococcus aureus*. In: hospital epidemiology and infection control – 3th edition. Edited by: mayhall, c.g. Philadelphia, lippincott Williams E Wilkins, 443-470.
- Kaneko, J. e Kamio, Y. (2004). Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 981-1003.
- Kassis, C., Rangaraj, F., Jiang, Y., Hachem, R.Y. e Raad, I. (2009). Differentiating coagulase-negative staphylococcal bacteremia from those representing contamination 2 using time to positivity and quantitative blood cultures methods. *J. Clin. Microbiol.* 47, 3255-60.
- Kloos, W.E. e Bannerman, T.L. (1999) *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: manual of clinical Microbiology 7th edition, 264-282.
- Krakauer, T. e Stiles, B.G. (2013). The staphylococcal enterotoxin (SE) family *seb* and siblings. *Virulence*, 4, 759–73.
- Krejsgaard, T., Willerslev-Olsen, A., Lindahl, L. M., Bonefeld, C. M., Koralov, S. B., Geisler, C. e Woetmann, A. (2014). Staphylococcal enterotoxins stimulate lymphoma-associated immune dysregulation. *Blood*, 124, 761-770.
- Kuster, W., Petersen, M., Christophers, E., Goos, M., Sterry, W. (1990). A family study of atopic dermatitis. Clinical and genetic characteristics of 188 patients and 2,151 family members. *Arch. Dermatol. Res.*, 282, 98-102.
- Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi e Lian, J. (2001). Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, 357, 1225-1240.
- Labandeira-Rey, M., Couzon, F., Boisset, S., Brown, E. L., Bes, M., Benito e Vandenesch, F. (2007). *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science*, 315, 1130-1133.
- Lamaro-Cardoso, J., de Lencastre, H., Kipnis, A., Pimenta, F. C., Oliveira, L. S. (2009). Molecular epidemiology and risk factors for nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* in infants attending day care centers in Brazil. *J. Clin. Microbiol.*, 47, 3991-3997.
- Laske, N., Niggemann, B. (2004) Does the severity of atopic dermatitis correlate with serum igE levels? *Pediatr. Allergy Immunol.*, 15, 86-88.
- Larssen, K. W., Jacobsen, T., Bergh, K., Tvette, P., Kvello, E., e Scheel, O. (2005). Outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in two nursing homes in Central Norway. *J. Hosl. Infec.*, 60, 312-316.
- Laughter, D., Istvan, J.A., Tofte, S.J., Hanifin, J.M. (2000). The prevalence of atopic dermatitis in Oregon school children. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 43, 649-55.
- Lee, Y. L., Su, H. J., Sheu, H. M., Yu, H. S., e Guo, Y. L. (2008). Traffic-related air pollution, climate, and prevalence of eczema in Taiwanese school children. *J. Invest. Dermatol.* 128, 2412-2420.

- Le Loir, Y., Baron, F., Gautier, M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics Mol. Res.*, 2, 63-76.
- Leski, T., Oliveira, D., Trzcinski, K., Sanches, I. S., de Sousa, M. A., Hryniewicz, W., e De Lencastre, H. (1998). Clonal distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Poland. *J. Clin. Microbiol.*, 36, 3532-3539.
- Letertre, C., Perelle, S., Dilasser, F., Fach P. (2003) Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiol.* 95, 38-43.
- Leung, D.Y e Bieber, T. (2003). Atopic dermatitis. *Lancet*, 361, 151-160.
- Leung, D. Y., Boguniewicz, M., Howell, M. D., Nomura, I., e Hamid, Q. A. (2004). New insights into atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.*, 113, 651-657.
- Levy, R. M., Gelfand, J. M., e Yan, A. C. (2003). The epidemiology of atopic dermatitis. *Clin. Dermatol.*, 21, 109-115.
- Llewelyn, M. e Cohen, J. (2002). Superantigens: microbial agents that corrupt immunity. *Lancet Infect. Dis.*, 2, 156-162.
- Lina, G., Piémont, Y., Godail-Gamot, F., Bes, M., Peter, M. O., Gauduchon e Etienne, J. (1999). Involvement of Pantón-Valentine leukocidin—producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin. Infect. Dis.*, 29, 1128-1132.
- Liu, F.T., Goodarzi, H., Chen, H.Y. (2011). IgE, mast cells, and eosinophils in atopic dermatitis. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 41, 298-310.
- Llewelyn, M. e Cohen, J. (2002). Superantigens: microbial agents that corrupt immunity. *Lancet Infect. Dis.*, 2, 156–62.
- Lo, W. T., Wang, C. C., Lin, W. J., Wang, S. R., Teng, C. S., Huang, C. F., e Chen, S. J. (2010). Changes in the nasal colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children: 2004-2009. *PloS one*, 5, 15791.
- Lowder, B.V. e Fitzgerald, J.R. (2010). Human origin for avian pathogenic *Staphylococcus aureus*. *Virulence*. 1, 283-84.
- LPSN (2016). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Disponível em: <http://www.bacterio.net/>. Acesso em 18/6/2016.
- Lyons, J.J., Milner J.D., Stone, K.D. (2015). Atopic dermatitis in children: clinical features, pathophysiology, and treatment. *Immunol. Allergy Clin. North. Am.*, 35, 161-83.
- Lübbe, J. (2003). Secondary infections in patients with atopic dermatitis. *Am. J. Clin. Dermatol.* 4, 641–654.
- Mato, R., Sanches, I. S., Venditti, M., Platt, D. J., Brown, A., Chung, M., e De Lencastre, H. (1998). Spread of the multiresistant Iberian clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) to Italy and Scotland. *Microbial. Drug Res.*, 4, 107-112.
- Macias E.S., Pereira, F., Rietkerk, W., Safai, B. (2011). Superantigens in dermatology. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 64, 455-72.
- MacFaddin, J. F. (2000). Individual biochemical tests. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*, 1, 456.
- McDougal, L. K., Steward, C. D., Killgore, G. E., Chaitram, J. M., McAllister, S. K., e Tenover, F. C. (2003). Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *J. Clin. Microbiol.*, 41, 5113-5120.
- Mempel, M., Lina, G., Hojka, M., Schnopp, C., Seidl, H. P., Schäfer e Abeck, D. (2003). High prevalence of superantigens associated with the *egc* locus in *Staphylococcus aureus* isolates from patients with atopic eczema. *Eur. J. Clin. Microbiol.*, 22, 306-309.
- Milheiro, C., Oliveira, D.C., De Lencastre, H. (2007). Multiplex PCR strategy for subtyping the staphylococcal cassette chromosome *mec* type IV in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: ‘scmec IV multiplex’. *J. Antimicrob. Chemother.*, 60, 42-8.

- Mireya, U. A., Marti, P. O., Xavier, K. V., Cristina, L. O., Miguel, M. M., E Magda, C. M. (2007). Nosocomial infections in paediatric and neonatal intensive care units. *J. Infect.*, 54, 212-220.
- Monecke, S., Coombs, G., Shore, A. C., Coleman, D. C., Akpaka, P., Borg, M., e Kadlec, K. (2011). A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PloS one*, 6, 17936.
- Oliveira, D.C. e De Lencastre, H. (2001). The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated mec elements. *Microb. Drug Resist.*, 7, 349-61.
- Oliveira, D.C. e De Lencastre, H. (2002). Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46, 215.
- O’riordan, K. e Lee, J.C. (2004). *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin. Microbiol. Rev.*, 17, 218-34.
- Omoe, K., Hu. D. L., Takahashi-Omoe, H., Nakane, A. e Shinagawa, K. (2003). Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. *Infect. Immunol.*, 71, 6088-6094.
- Orwin, P. M., Leung, D. Y., Donahue, H. L., Novick, R. P., e Schlievert, P. M. (2001). Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. *Infect. Immun.*, 69, 360-366.
- Orwin, P. M., Fitzgerald, J. R., Leung, D. Y., Gutierrez, J. A., Bohach, G. A., e Schlievert, P. M. (2003). Characterization of *Staphylococcus aureus* enterotoxin L. *Infect. Immun.*, 71, 2916-2919.
- Papakyriacou, H., Vaz, D., Simor, A., Louie, M., e McGavin, M. J. (2000). Molecular Analysis of the Accessory Gene Regulator (*agr*) Locus and Balance of Virulence Factor Expression in Epidemic Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.*, 181, 990-1000.
- Pascalini, C., Sinagra, J., Pecetta, S., Bordignon, V., De Santis, A., Cilli, L. e Stefani, S. (2011). Molecular and immunological characterization of *Staphylococcus aureus* in pediatric atopic dermatitis: implications for prophylaxis and clinical management. *Clin. Dev. Immun.*, 2011, 7188.
- Patel, G. K., Wyatt, H., Kubiak, E. M., Clark, S. M., e Mills, C. M. (2001). *Staphylococcus aureus* colonization of children with atopic eczema and their parents. *Acta. Derm. Venereol.*, 81, 66-367.
- Peacock, S.J. (2005). *Staphylococcus*. In: topley E Wilson’s microbiology e microbial infections – 10th edition, 2, 772-831.
- Petry, V., Bessa, G. R., Poziomczyck, C. S., Oliveira, C. F. D., Weber, M. B., Bonamigo, R. R., e d’Azevedo, P. A. (2012). Bacterial skin colonization and infections in patients with atopic dermatitis. *An. Bras. Dermatol.*, 87, 729-734.
- Piliang, M. (2009). Atopic dermatitis. Cleveland Clinic Foundation. Disease Manegemant. Lyndhurst, OH, 24 jun. 2016. Disponível em <<http://www.clevelandclinicmeded.com>>. Acesso em: 24 jun. 2016.
- Prevost, G., Couppie, P., Prevost, P., Gayet, S., Petiau, P., Cribier, B., e Piemont, Y. (1995). Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins. *J. Med. Microbiol.*, 42, 237-245.
- Ramos, R.L., Teixeira, L.A., Ormonde, L.R. (1999). Emergence of mupirocin resistance in multiresistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates belonging to Brazilian epidemic clone III. *J. Med. Microbiol.*, 48, 303-7.
- Ramsetty, SK., Stuart, L.L., Blake, R.T., Parsons, C.H., Salgado, C.D. (2010) Risks for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization or infection among patients with HIV infection. *HIV Med.*, 11, 389-394.
- Ribeiro, A., Dias, C., Silva-Carvalho, M.C. (2005). First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. *J. Clin. Microbiol.*, 43, 1985-8.
- Ribeiro, A., Coronado, A. Z., Silva-Carvalho, M. C., Ferreira-Carvalho, B. T., Dias, C., Rozenbaum, R. e Figueiredo, A. M. S. (2007). Detection and characterization of international community-acquired infections by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Rio de Janeiro and Porto Alegre cities causing both community-and hospital-associated diseases. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 59, 339-345.

- Roberts, R. B., de Lencastre, A., Eisner, W., Severina, E. P., Shopsin, B. E Kreiswirth, B. N. e MRSA Collaborative Study Group. (1998). Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 12 New York hospitals. *J. Infec. Dis.*, 178, 164-171.
- Roberts, R. B., Chung, M., de Lencastre, H, Hargrave, J., Tomasz, A., Nicolau, D. P., e Korzeniowski, O. (2000). Distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones among health care facilities in Connecticut, New Jersey, and Pennsylvania. *Microb. Drug. Res.*, 6, 245-251.
- Roberts, J. C., Gulino, S. P., Peak, K. K., Luna, V. A., e Sanderson, R. (2008). Fatal necrotizing pneumonia due to a Panton-Valentine leukocidin positive community-associated methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* and Influenza co-infection: a case report. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, 7, 1.
- Rojo, A., Aguinaga, A., Monecke, S., Yuste, J. R., Gastaminza, G. e España, A. (2014). *Staphylococcus aureus* genomic pattern and atopic dermatitis: may factors other than superantigens be involved? *Eur. J. Clin. Microbiol.*, 33, 651-658.
- Rolo, J., Miragaia, M., Turlej-Rogacka, A., Empel, J., Bouchami, O., Faria, N. A. e CONCORD Working Group. (2012). High genetic diversity among community-associated *Staphylococcus aureus* in Europe: results from a multicenter study. *PloS one*, 7, 34768.
- Rotsztejn, H., Frankowski, J., Kamer, B. e Trznadel-Grodzk, E. (2012). Infection cases in infants and small children with atopic dermatitis—own observations. *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 66, 96-103.
- Sá-Leão, R., Sanches, I. S., Dias, D., Peres, I., Barros, R. M., e De Lencastre, H. (1999). Detection of an Archaic Clone of *Staphylococcus aureus* with Low-Level Resistance to Methicillin in a Pediatric Hospital in Portugal and in International Samples: Relics of a Formerly Widely Disseminated Strain? *J. Clin. Microbiol.*, 37, 1913-1920.
- Sanches, I. S., Ramirez, M., Troni, H., Abecassis, M., Padua, M., Tomasz, A. e De Lencastre, H. (1995). Evidence for the geographic spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone between Portugal and Spain. *J. Clin. Microbiol.*, 33, 1243-1246.
- Santos, K.R., Teixeira, L.M., Leal, G.S., Fonseca, L.S. e Gontijo Filho, P.P. (1999). DNA typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: isolates and factors associated with nosocomial acquisition in two Brazilian university hospitals. *J. Med. Microbiol.*, 48, 17-23.
- Simon, D., Simon, H. U., Akdis, C. A., e Wüthrich, B. (2001). Epidemiology, clinical features, and immunology of the “intrinsic” (non- IgE- mediated) type of atopic dermatitis (constitutional dermatitis). *Allergy*, 56, 841-849.
- Shet, A., Mathema, B., Mediavilla, J.R., Kishii, K., Mehandru, S., Jeane-Pierre, P., Laroche, M., Willey, B.M., Kreiswirth, N, Narkowitz, M. E Kreiswirth, B.N. (2009). Colonization and subsequent skin and soft tissue infection due to Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a cohort of otherwise healthy adults infected with HIV type I. *J. Infec. Dis.*, 200, 88-93.
- Schuenck, R. P., Nouér, S. A., de Oliveira Winter, C., Cavalcante, F. S., Scotti, T. D., Ferreira, A. L. P. e dos Santos, K. R. N. (2009). Polyclonal presence of non-multiresistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCCmec IV in health care-associated infections in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Diagn. Microbiol. Infec. Dis.*, 64, 434-441.
- Schuenck, R. P., Dalati, P., Silva, M.G., Fonseca e dos Santos, K. R. N. (2004). Oxacilin and mupirocin-resistant *Staphylococcus aureus*: “in vitro” activity of silver sulphadiazine and cerum nitrate in hopitals strains. *J. Chemother.*, 16, 453-428.
- Shaw, M. G., Burkhart, C. N., e Morrell, D. S. (2009). Systemic therapies for pediatric atopic dermatitis: a review for the primary care physician. *Pediatr. Annals*, 38, 984.
- Silva-Carvalho, M. C., Bonelli, R. R., Souza, R. R., Moreira, S., dos Santos, L. C. G., de Souza Conceição, M., e Teixeira, L. A. (2009). Emergence of multiresistant variants of the community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineage ST1-SCCmecIV in 2 hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Diagn. Microbiol. Infec. Dis.*, 65, 300-305.
- Silverstein, D. M., e Moylan, K. (2010). Cause and outcome of central venous catheter infections in paediatric haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transpl.*, 146.
- Simpson, E. L. (2010). Atopic dermatitis: a review of topical treatment options. *Curr. Opin. Pediatr.* 26, 633-640.

- Soares, J., Lopes, C., Tavarina, F., Delgado, L., e Pintado, M. (2013). A diversity profile from the staphylococcal community on atopic dermatitis skin: a molecular approach. *J. Appl. Microbiol.*, 115, 1411-1419.
- Solé, D., Camelo-Nunes, I. C., Wandalsen, G. F., Mallozi, M. C., e Naspitz, C. K. (2005). Prevalence of atopic eczema and related symptoms in Brazilian schoolchildren: results from the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) phase 3. *J. Invest. Allerg. Clin. Immunol.* 16, 367-376.
- Somani, V. K. (2008). A study of allergen-specific IgE antibodies in Indian patients of atopic dermatitis. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.*, 74, 100-4.
- Spergel, J.M. (2010). From Atopic Dermatitis to Asthma: The Atopic March. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 105, 99-106.
- Speziale, P., Pietrocola, G., Rindi, S., Provenzano, M., Provenza, G., Di Poto, A., e Arciola, C. R. (2009). Structural and functional role of *Staphylococcus aureus* surface components recognizing adhesive matrix molecules of the host. *Future Microbiol.*, 4, 1337-1352.
- Spergell, J.M. e Paller, A.S. (2003). Atopic dermatitis and the atopic march. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 112, 118-27.
- Sprinkelman, A. B., Tupker, R. A., Burgerhof, H., Schouten, J. P., Brand, P. L. P., Heymans, H. S. A., e Aalderen, W. V. (1997). Severity scoring of atopic dermatitis: a comparison of three scoring systems. *Allergy*, 52, 944-949.
- Stecher, B., Hardt, W. (2011). Mechanisms controlling pathogen colonization of the gut. *Curr. Opin. Microbiol.*, 14, 82-91.
- Sturgill, S. e Bernard, L.A. (2004). Atopic dermatitis update. *Curr. Opin. Pediatr.* 16, 396-401.
- Suh, L., Coffin, S., Leckerman, K. H., Gelfand, J. M., Honig, P. J., e Yan, A. C. (2008). Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus* Colonization in Children with Atopic Dermatitis. *Pediatr. Dermatol.*, 25, 528-534.
- Suzuki, M. T., e Giovannoni, S. J. (1996). Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microb.*, 62, 625-630.
- Tang, C. S., Wang, C. C., Huang, C. F., Chen, S. J., Tseng, M. H., e Lo, W. T. (2011). Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* in children with atopic dermatitis. *Pediatr. Int.*, 53, 363-367.
- Takano, T., Saito, K., Teng, L. J. e Yamamoto, T. (2007). Spread of Community- Acquired Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Hospitals in Taipei, Taiwan in 2005, and Comparison of Its Drug Resistance with Previous Hospital- Acquired MRSA. *Microbiol. Immunol.*, 51, 627-632.
- Teixeira, L. A., Lourenço, M. C. S., e Figueiredo, A. M. (1996). Emergence of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone related to the Brazilian epidemic clone III: B: A causing invasive disease among AIDS patients in a Brazilian hospital. *Microb. Drug. Resist.*, 2, 393-399.
- Tenover, F. C., McAllister, S., Fosheim, G., McDougal, L. K., Carey, R. B., Limbago, B. e Gorwitz, R. (2008). Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from nasal cultures collected from individuals in the United States in 2001 to 2004. *J. Clin. Microbiol.*, 46, 2837-2841.
- Thomsen, S. F. (2014). Atopic dermatitis: natural history, diagnosis, and treatment. *ISRN allergy*, 16, 90.
- Tong, S.Y., Lilliebridge, R.A., Bishop, E.J., Cheng, A.C., Holt, D.C., McDonald, M.I., Giffard, P., Currie, B.J., Boutlis, C.S.(2006). Clinical correlates of panton-valentine leukocidin (PVL): PVL isoforms, Brazilian schoolchildren: results from the international study of asthma and allergies in childhood (ISAAC) phase 3. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 16, 367-76.
- Tong, S. Y., Lilliebridge, R. A., Bishop, E. J., Cheng, A. C., Holt, D. C., McDonald, M. I. e Boutlis, C. S. (2010). Clinical correlates of Pantone-Valentine leukocidin (PVL): PVL isoforms, and clonal complex in the *Staphylococcus aureus* population of Northern Australia. *J. Infect. Diseases*, 202, 760-769.
- Tong, S. Y., Chen, L. F., e Fowler Jr, V. G. (2012). Colonization, pathogenicity, host susceptibility, and therapeutics for *Staphylococcus aureus*: what is the clinical relevance? *Semin. Immunopathol.*, 34, 185-200.

- Travers, J. B., Kozman, A., Mousdicas, N., Saha, C., Landis, M. e Haggstrom, A. N. (2010). Infected atopic dermatitis lesions contain pharmacologic amounts of lipoteichoic acid. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 125, 146-152.
- Tumbarello, M., Donati, K.G.G., Tacconelli, E., Citton, R., Spanu, T., Leone, F., Fadda, G. e Cauda, R. (2002). Risk factors and predictors of mortality of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bacteraemia in HIV-infected patients. *J. Antimicrob. Chem.*, 50, 375-382.
- Udo, E. E., Pearman, J. W., e Grubb, W. B. (1993). Genetic analysis of community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. *J. Hos. Infec.*, 25, 97-108.
- Vandenesch, F., Naimi, T., Enright, M. C., Lina, G., Nimmo, G. R., Heffernan e Etienne, J. (2003). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Pantone-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg. Infect. Dis.*, 9, 978-984.
- Vincent, J. L., Rello, J., Marshall, J., Silva, E., Anzueto, A., Martin, C. D. e Reinhart, K. (2009). International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *Jama*, 302, 2323-2329.
- Vivoni, A. M., Diep, B. A., de Gouveia Magalhaes, A. C., Santos, K. R. N., Riley, L. W., Sensabaugh, G. F., e Moreira, B. M. (2006). Clonal composition of *Staphylococcus aureus* isolates at a Brazilian university hospital: identification of international circulating lineages. *J. Clin. Microbiol.*, 44, 1686-1691.
- Von Eiff, C., Becker, K., Machka, K., Stammer, H., e Peters, G. (2001). Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *New Engl. J. Med.*, 344, 11-16.
- Von Eiff, C., Friedrich, A., Peters, G. e Becker, K. (2004). Prevalence of genes encoding for members of the staphylococcal leukotoxin family among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Diag. Microbiol. Infec. Dis.*, 49, 157-162.
- Wannet, W. J. B., Spalburg, E., Heck, M. E. O. C., Pluister, G. N., Tiemersma, E., Willems, R. J. L. e Etienne, J. (2005). Emergence of virulent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains carrying Pantone-Valentine leukocidin genes in The Netherlands. *J. Clin. Microbiol.*, 43, 3341-3345.
- Wilkinson, B. J. (1983). Staphylococcal capsules and slime. *N. Engl. J. Med.*, 2, 481-523.
- Williams, H.C. (2005). Clinical practice. Atopic dermatitis. *N. Engl. J. Med.*, 352, 2314-2324
- Witte, W., Cuny, C., Halle, E., Mauch, H., e Wagner, J. (1994). Methicillin resistance in an epidemic *Staphylococcus aureus* strain with genomic fingerprints corresponding to those of a sensitive strain in the community. *Med. Microbiol. Lett.*, 3, 388-395.
- Woetmann, A., Lovato, P., Eriksen, K. W., Krejsgaard, T., Labuda, T., Zhang e Odum, N. (2007). Nonmalignant T cells stimulate growth of T-cell lymphoma cells in the presence of bacterial toxins. *Blood*, 109, 3325-3332.
- Wolter, S. e Price, H. N. (2014). Atopic dermatitis. *Pediatr. Clin. North. Am.*, 61, 241-60.
- Yamaguchi, T. (2002). Identification of the *Staphylococcus aureus* ETD pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, etd, and edin-b. *Infec. Immunol*, 70, 5835-45.
- Yamada, E. (2002). Validation of written questionnaire (eczema component) and prevalence of atopic eczema among Brazilian children. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.*, 12, 34-41.
- Zilberberg, M. D., Shorr, A. F; Micek, S. T., Chen, J., Ramsey, A. M., Hoban, A. P., Pham, V., Doherty, J. A., Mody, S. H., Kollef, M. H. (2010). Hospitalizations with healthcare-associated complicated skin and skin structure infections: impact of inappropriate empiric therapy on outcomes. *J. Hosp. Med.*, 5, 535-40.

IX. Anexo 1**FICHA PARA COLETA DOS DADOS:**

Nº da pesquisa: _____ Data da coleta de dados: ___/___/___

Prontuário: _____ Data de nasc: ___/___/___

Idade: [] Sexo: [] F [] M Data da admissão no ambulatório ___/___/___

End: _____

Bairro: _____ Município: _____

CEP: _____ TEL: _____

CEL: _____ Tel de referência: _____

Nome para contato tel: _____

N de pessoas que residem na casa: _____

Saneamento básico: _____

Frequente (1) creche ou (2) escola: [] Sim [] Não Caso sim: [] 1 [] 2

Colonizado previamente por MRSA: [] Sim [] Não

Internação nos últimos 6 meses: [] Sim [] Não

Compartilha a mesma cama com alguém? [] Sim [] Não

O responsável possui Dermatite atópica? [] Sim [] Não

O Responsável foi internado recentemente? [] Sim [] Não

Internação em unidade de saúde de curta permanência nos últimos 6 meses: [] Sim [] Não

Uso prévio de ATB: [] Sim [] Não

Qual ATB : _____

Hidratação [] sim [] não

Corticoide maior que 1mg/kg 1 – sim 2- não

Azatioprina [] sim [] não

Ciclosporina [] sim [] não

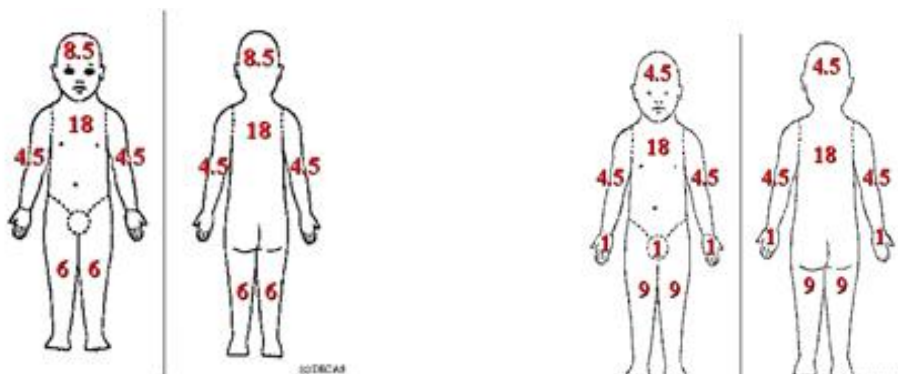
Swab nasal do pac: [] Sim [] Não

Resultado [] MSSA [] CA-MRSA [] H-MRSA [] neg

Avaliação Dermatológica:

Valores para crianças abaixo de 2 anos

Valores para crianças acima de 2 anos



Severidade:
0: ausente
1: leve
2: moderada
3: severa

A: extensão (indique a área envolvida): _____

B: intensidade: _____

Critérios: _____ Severidade: _____

Eritema:

Edema/Pápula:

Exsudação/Crosta:

Escoriação:

Xerodermia:

C: sintomas subjetivos:

(prurido + alteração de sono)

Escala visual: _____ Prurido: 0 ----- 10

Média dos últimos 3 dias/noites: Alteração do sono: 0 ----- 10

Tratamento: _____

Observações: _____ Agudizações por mês: _____

SCORAD $A/5+7B/2+C$: _____

IX. Anexo 2



UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO
UFRJ

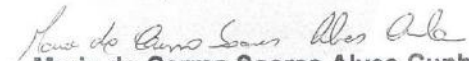
INSTITUTO DE PUERICULTURA E PEDIATRIA MARTAGÃO GESTEIRA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

O projeto "Staphylococcus aureus em pacientes com dermatite atópica em um hospital do Rio de Janeiro: análise fenotípica e molecular de amostras isoladas de colonização e/ou infecção e avaliação dos fatores de risco relacionados à colonização por MRSA", cadastrado com o número 51/11, de responsabilidade da Dra. Kátia Regina Netto dos Santos, foi analisado pelo CEP/IPPMG e aprovado nesta data.

Solicitamos o envio dos relatórios rotineiros periódicos nos seguintes prazos: a) 12 meses após o início efetivo e b) e a cada ano até o término do projeto.

Rio de Janeiro, 20 de setembro de 2011


Maria do Carmo Soares Alves Cunha

Coordenadora do CEP/IPPMG