



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

LUÍS FELIPE RAMOS BERBEL ANGULSKI

**Relação entre a colonização por *Staphylococcus*
spp. e dermatite atópica: perfil de virulência e sua
influência na gravidade da doença**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Associada Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

2023
Botucatu

Luís Felipe Ramos Berbel Angulski

Relação entre a colonização por *Staphylococcus* spp. e dermatite atópica: perfil de virulência e sua influência na gravidade da doença

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Associada Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Botucatu
2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Angulski, Luis Felipe Ramos Berbel.

Relação entre a colonização por *Staphylococcus spp.* e dermatite atópica : perfil de virulência e sua influência na gravidade da doença / Luis Felipe Ramos Berbel Angulski. - Botucatu, 2023

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha
Capes: 40101037

1. Dermatite atópica. 2. *Staphylococcus aureus*.
3. Medicina tropical. 4. Fatores de virulência. 5. Virulência (Microbiologia).

Palavras-chave: Dermatite atópica; S. Aureus; *Staphylococcus sp.*

DEDICATÓRIA

*Dedico esta tese à minha esposa Dária
e aos meus 3 filhos: Helena, Miguel e Breno,
que são meu principal motivo para seguir em frente.*

AGRADECIMENTOS

Lembro que desde o final da minha residência em Alergia e Imunologia, eu tinha um desejo de seguir com os estudos, no intuito de seguir uma possível carreira acadêmica. Mas a vida reservou um tempo para eu ter os meus filhos, aproveitar um pouco mais a família e esse desejo veio se concretizar em 2019, quando retornamos a Botucatu.

Primeiramente, agradeço a Deus por todas as oportunidades e à minha família, a qual sempre me apoiou em toda minha jornada de formação.

Gostaria de agradecer à profa. Alexandrina Sartori, minha querida professora de Imunologia Básica na graduação, a qual foi a minha primeira inspiração em seguir essa área tão apaixonante da Medicina.

Devo também muito da minha formação à Dra Maria Marluce Vilela, minha ex-chefe de residência na Unicamp, a qual me estimulou a desenvolver minha tese em conjunto com as disciplinas básicas, as quais são fundamentais para a pesquisa clínica na Medicina.

Agradeço também a minha querida orientadora profa. Lurdinha, a qual tive o privilégio de ter sido aluno também na graduação e pós-graduação, na disciplina de Microbiologia. Sua expertise na área dos

Estafilococos veio de encontro ao desejo de eu estudar a microbiota cutânea nos pacientes com Dermatite Atópica.

Muito obrigado Lucas Porangaba, o qual foi essencial para que esse estudo se concretizasse, com apoio incondicional no laboratório de Microbiologia do Instituto de Biociências de Botucatu.

À profa. Lídia Raquel de Carvalho, a qual também tive a oportunidade de ter sido aluno na graduação e também na pós-graduação, na disciplina de Bioestatística, agradeço todo auxílio e aprendizado no desenvolvimento da minha tese.

Agradeço também aos professores da especialidade de Alergia e Imunologia: Dr. Jaime Bolbrich-Neto, Dra. Ariana Yang e Dr. Eli Mansur, os quais sempre foram uma fonte de inspiração, modelos de profissionais exemplares e me estimularam a seguir na busca pelo aprendizado, pelo aperfeiçoamento e a nunca desistir dos meus sonhos.

Finalmente, não poderia deixar de agradecer aos pacientes e seus responsáveis, por terem contribuído imensamente pelo meu aprendizado e ter permitido que este estudo fosse desenvolvido. Espero ter ajudado, mesmo minimamente, no alívio da dermatite atópica dos seus filhos (as).

SUMÁRIO

RESUMO	12
ABSTRACT	14
INTRODUÇÃO	
Definição e Epidemiologia da Dermatite Atópica	17
Fisiopatogenia da Dermatite Atópica	21
Microbioma e Dermatite Atópica	27
Importância do <i>Staphylococcus</i> spp. na Dermatite Atópica	29
Resistência Antimicrobiana dos Estafilococos	36
Qualidade de vida dos responsáveis dos pacientes com DA	38
Justificativa	40
OBJETIVOS DO ESTUDO	
Objetivos geral e específicos	42
MÉTODOS	
Casuística e desenho do estudo	44
Coleta de dados demográficos e clínicos	46
Análise da qualidade de vida	47
Análise e testes microbiológicos	48
Análise estatística	54
RESULTADOS	56
DISCUSSÃO	65
CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
APÊNDICES	82

RESUMO

A dermatite atópica (DA) é uma doença inflamatória cutânea crônica, de etiologia multifatorial, que se manifesta clinicamente sob a forma de eczema. A maioria dos pacientes com DA está colonizada por *Staphylococcus aureus* capaz de produzir vários fatores de virulência. *S. aureus* exerce um papel importante no desenvolvimento da doença, podendo a diferenciação da expressão de toxinas, bem como o grau de resistência aos antibióticos, influenciar diretamente na gravidade da DA. Neste estudo, caracterizou-se a comunidade estafilocócica cutânea e nasal de pacientes pediátricos com DA (n=100) e a presença do gene *mecA* de resistência à meticilina nas amostras de *S. aureus* isoladas. As espécies isoladas da mucosa nasal e pele de doentes (lesões agudas e crônicas) com DA foram submetidas às técnicas de PCR para identificação de bactérias pertencentes às espécies *S. aureus* e estafilococos coagulase-negativa (ECN), incluindo *S. epidermidis*, através de fragmentos específicos de DNA encontrados nesses micro-organismos. O estudo procurou verificar a associação entre a colonização pelo *S. aureus* e ECN nos pacientes com DA e a gravidade da doença, pelo escore clínico SCORAD. Foi observada uma prevalência de colonização por *S. aureus* de 73%, por *S. epidermidis* de 36%, outros ECN 58% e Gram-negativos 18%. A pesquisa do gene *mecA* realizada em amostras de *S. aureus* detectou MRSA em 10 pacientes e em 8 pacientes colonizados por *S. epidermidis*, não sendo estatisticamente significativa a correlação entre a expressão deste gene e a gravidade da DA. Foi identificada a prevalência da expressão fenotípica, pelo método de aglutinação em látex (RPLA), das seguintes enterotoxinas: SEA de 12,3%, SEB de 19,1%, SEC de 28,8% e SED de 8,2%. Houve correlação significativa entre a mediana do SCORAD com a expressão das enterotoxinas SEA e SED. A caracterização detalhada, o perfil de virulência e resistência antimicrobiana desses micro-organismos podem ser úteis para o cuidado dos pacientes e desenvolvimento de estratégias que poderiam ser utilizadas no controle e na terapêutica de pacientes com DA.

Palavras-chaves: dermatite atópica, *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus aureus* e fatores de virulência.

ABSTRACT

Atopic dermatitis (AD) is a chronic inflammatory disease of multifactorial etiology, which clinically manifests itself in the form of eczema. Most patients with AD are colonized by *Staphylococcus aureus* capable of producing several virulence factors. *S. aureus* plays an important role in the development of the disease, being able to differentiate the expression of proteins, as well as the degree of resistance to antibiotics, directly influencing the severity of AD. In this study, we characterized the cutaneous and nasal staphylococcal community of pediatric AD patients (n=100) and the presence of the methicillin resistance gene *mecA* in *S. aureus* exception care. Pediatric species from the nasal mucosa and skin of patients (acute and chronic lesions) with AD were maintained using PCR techniques to identify bacteria belonging to the species *S. aureus* and coagulase-negative staphylococci (ECN), including *S. epidermidis*, through specific fragments of DNA found in these microorganisms. The study sought to verify the association between *S. aureus* colonization and NEC in patients with AD and disease severity, using the SCORAD clinical score. There was a prevalence of colonization by *S. aureus* of 73%, by *S. epidermidis* of 36%, others NEC 58% and Gram-negative 18%. Research on the *mecA* gene carried out in a sample of *S. aureus* detected MRSA in 10 patients and in 8 patients colonized by *S. epidermidis*, with no statistically significant difference between the expression of this gene and the severity of AD. The prevalence of phenotypic expression was monitored, by the latex agglutination method (RPLA), of the following enterotoxins: SEA 12.3%, SEB 19.1%, SEC 28.8% and SED 8.2%. There was significance between the median of SCORAD and the expression of enterotoxins SEA and SED. The detailed characterization, virulence profile and antimicrobial resistance of these microorganisms can be useful for patient care and development of strategies that could be used in the control and therapy of patients with AD.

Keywords: atopic dermatitis, *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus aureus* and virulence factors.

Lista de Abreviaturas

AMPc = monofosfato cíclico de adenosina
BHI = caldo infusão de cérebro e coração
CA-MRSA = estafilococos resistentes à meticilina de origem comunitária
CCL5 = ligante de quimiocina motivo C-C tipo 5
CGRP = proteína relacionada ao gene da calcitonina
DA = dermatite atópica
DFI = *Dermatitis Family Impact Questionnaire*
ECN = estafilococos coagulase-negativa
EV = vesículas extracelulares
Ig = imunoglobulinas (A, M, G, D ou E)
IL = interleucina
ILC = célula linfóide inata
ISD = determinantes de superfície relacionados ao ferro
K10 = queratina tipo 10
Linfócito Tc = T citotóxico
Linfócito Th = T *helper* (auxiliar)
Linfócito Treg = T regulador
LL-37 = catelicidina
MHC = complexo principal de histocompatibilidade (classe I e II)
MRSA = estafilococos resistentes à meticilina
PBP = proteína ligadora de penicilina
PBP 2a ou PBP 2' = proteína ligadora de penicilina suplementar
PCR = reação em cadeia da polimerase
PSM = modulas solúveis ao fenol
Raio UV = raio ultravioleta
Receptor MGPRX2R = receptor X2 MAS-relacionado acoplado à proteína G
SCCmec = cassete cromossômico estafilocócico *mec*
SCORAD = *SCORing Atopic Dermatitis*
SE = enterotoxina estafilocócica
TALE = termo de assentimento livre e esclarecido
TCLE = termo de consentimento livre e esclarecido
TIMP = inibidor tecidual de metaloprotease
TRL = *Toll like receptor* (receptor do tipo Toll)
TSLP = linfopoetina do estroma tímico
TSST-1 = toxina estafilocócica do choque tóxico 1
VEGF = fator de crescimento do endotélio vascular
VRSA = estafilococo resistente à vancomicina

INTRODUÇÃO

I. DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA DA DERMATITE ATÓPICA

A dermatite atópica (DA) é uma doença inflamatória cutânea crônica, de etiologia multifatorial, que se manifesta clinicamente sob a forma de eczema: lesão caracterizada por pápulas ou placas, frequentemente com exsudação ou crostas, sendo a presença do prurido uma característica fundamental.¹

O seu diagnóstico é basicamente clínico. Os critérios de Hanifin e Rajka, apesar de bastante antigos, são classicamente utilizados para definir a DA, consistindo em 4 critérios maiores e 22 menores. Para confirmar o diagnóstico da DA, é necessária a presença de pelo menos 3 critérios maiores e 3 critérios menores.²

A DA pode se apresentar em três estágios: agudo, subagudo ou crônico. O primeiro é caracterizado pela presença de lesões cutâneas com eritema, edema, vesículas e secreção. Já no estágio subagudo, há um predomínio da vesiculação, com formação de crostas, sendo o edema e o eritema menos intensos. Finalmente, no estágio crônico, ocorre liquenificação pela hiperplasia cutânea (Figura 1). O mesmo indivíduo pode ter lesões em diferentes estágios, muitas vezes em uma mesma topografia da pele.¹



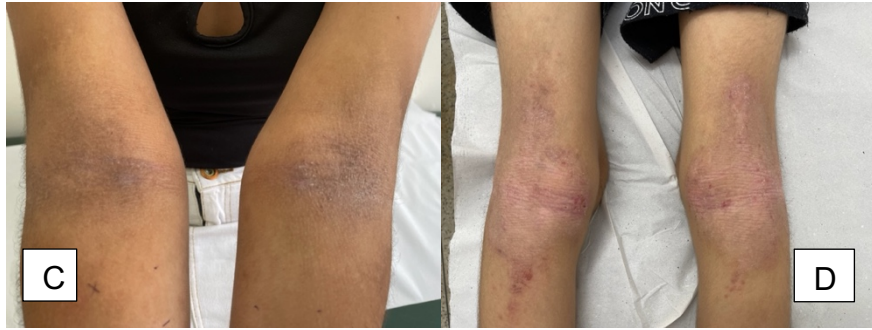


Figura 1 – Diferentes formas de apresentação clínica da DA, conforme a faixa etária. (A) Eczema nas bochechas com eritema, pápulas, crostas e exsudação, caracterizando forma aguda/subaguda. (B) Presença de sinais típicos da facies atópica, como pregas de Dennie-Morgan e sinal de Hertoghe. (C) Distribuição flexural nas fossas cubitais, bastante características das formas de DA acima dos 2 anos. (D) Evolução liquenificação evidente nas fossas poplíteas, caracterizando padrão de eczema crônico (imagens do autor do estudo, autorizadas pelos cuidadores dos pacientes).

A DA costuma ser a primeira manifestação clínica de sensibilização alérgica no curso da marcha atópica, na qual a criança costuma iniciar com eczema, depois pode associar ou migrar para outros quadros atópicos ao longo da infância: alergia alimentar, sibilância recorrente, rinite alérgica e asma.³

A prevalência da DA aumentou nas últimas três décadas, segundo estudo de Williams e colaboradores, mas não de forma homogênea entre os países. Provavelmente, os fatores de risco atuam de formas diferentes nas diversas regiões do mundo. Em países em desenvolvimento, que passaram por um processo de aceleração econômica, o consumo de produtos de higiene, como cosméticos, em idades precoces, pode estar associado a uma alteração na barreira cutânea, favorecendo os indivíduos geneticamente predispostos a desenvolver a DA.⁴

Embora a DA possa se manifestar em qualquer idade, cerca de 60% dos casos ocorre no primeiro ano de vida, podendo se iniciar já a partir dos 3 meses. Cerca de 90% dos casos ocorrem abaixo dos 5 anos. A prevalência na infância é de 15-20%. Em cerca de 70%, há melhora gradual até o final da infância.⁵

O estudo multicêntrico *Internacional Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)*^{4,6}, englobou crianças de 154 centros de 56 países, incluindo o Brasil, com mais de 750 mil participantes. No Brasil, o estudo na Fase III identificou uma prevalência média de DA de 8,2% na faixa etária dos 6-7 anos de idade, e 5% entre aqueles de 13-14 anos.

Em adultos, alguns estudos, como o de Silverberg e Hanifin⁷, estimaram a prevalência ao redor de 10%. Este estudo envolveu mais de 27 mil adultos entre 18 e 85 anos nos Estados Unidos, identificando a DA entre adulto fortemente associada com asma grave, com mais exacerbações e persistência do quadro respiratório ao longo da vida. São considerados fatores associados com sua persistência na idade adulta: início precoce dos sintomas, formas graves de apresentação, história familiar de dermatite atópica, coexistência de rinite alérgica/ asma, baixo nível socioeconômico, etnias não-caucasianas e sensibilização alérgica precoce. Os fatores de risco para alta prevalência de eczema entre adultos são: idade mais avançada, gênero feminino, etnia hispânica, ter nascido nos EUA, alto nível educacional e socioeconômico.

A DA não é uma doença única e hoje sabemos que existem diversos fenótipos possíveis, que podem variar de acordo com a faixa etária, etnia e outras influências genéticas e ambientais⁸.

De acordo com a idade de início na infância¹, a DA é classificada em:

- Fase do lactente (0 a 2 anos): representando 60 a 80% dos casos, caracterizada pelos eczemas mais agudos na face (geralmente poupando-se o maciço centro-facial), dobras do pescoço, tronco e membros de uma forma mais difusa; predominam eczemas do padrão agudo ou subagudo.
- Fase infantil (2 a 12 anos): caracterizada por tendência a localização flexural, englobando crianças com alto risco de desenvolvimento de outras doenças alérgicas; nesta fase, podem surgir lesões liquenificadas (eczema crônico).
- Fase do adolescente e do adulto (a partir dos 12 anos): predominam padrões de eczema crônico, localizados nas áreas flexurais, mas pode se restringir a áreas como mãos, couro cabeludo, mamilos e pescoço.

Além desta classificação baseada na idade de início, podemos classificar os fenótipos de DA em algumas variantes denominadas atípicas⁹:

- eczema numular (lesões com aspecto de moeda); forma folicular (predomínio de ceratose pilar, forma descrita principalmente entre asiáticos e afro-descendentes);
- prurigo nodular (pápulas hiperqueratóticas extremamente pruriginosas, com distribuição acral predominante, bastante frequente em indivíduos de raça negra ou parda);
- formas localizadas exclusivamente nas mãos (incluindo a forma restrita às extremidades dos dedos - pulpíte atópica), nas pálpebras, nos pés (dermatose plantar juvenil), nos mamilos ou nos lábios (queilite angular), podendo nestes casos coexistir a dermatite de contato alérgica^{6,9}.

II. FISIOPATOGENIA DA DERMATITE ATÓPICA

A DA é uma doença complexa e multifatorial. Existem vários fatores associados com o surgimento da dermatite atópica, incluindo desordens genéticas, alterações na barreira cutânea, desregulação imunológica e alterações do microbioma cutâneo.^{1,3}

a) Fatores genéticos e barreira cutânea

A barreira cutânea previne a entrada de alérgenos, a penetração de microrganismos na pele e promove hidratação da pele. Ela depende da interação de componentes da matriz extracelular, de natureza proteica e lipídica.¹⁰

Dentre os componentes proteicos descritos do extrato córneo tem destaque a filagrina, a qual sofre ação enzimática e compõe os ácidos graxos da camada lamelar lipídica. Mutações nesta proteína são descritas em 15-50% dos indivíduos com a dermatite atópica. Porém, cerca de 40% dos portadores de tais mutações não desenvolvem a doença. Naqueles com a mutação e a doença, esta parece ser mais severa, com início precoce, envolvendo maior sensibilização alérgica e maior suscetibilidade às infecções cutâneas. As mutações conferem um risco de 3 a 5 vezes maior de desenvolver dermatite atópica, além de estar associada também com asma e alergia a amendoim.¹¹

Mutações envolvendo outras proteínas estruturais da barreira cutânea, como a involucrina, a loricrina e as claudinas, resultando na perda de junção entre os corneóticos e favorecendo a uma maior perda transepidérmica de água pela pele¹².

Ainda considerando a barreira cutânea, é importante o papel dos lipídios como a ceramida, alterações do pH cutâneo e disbiose na fisiopatologia da doença. Os pacientes com DA apresentam uma maior permeabilidade cutânea a irritantes ambientes, aeroalérgenos e patógenos diversos, com tendência a terem um pH cutâneo mais alcalino.¹³

Sabe-se que existe uma suscetibilidade genética envolvida na predisposição de atopia, de herança poligênica, com alguns estudos citando uma hereditariedade em torno de 75% entre gêmeos monozigóticos¹⁴.

b) Desregulação Imunológica

O sistema imunológico inato e adaptativo participa ativamente na fisiopatogenia da DA. Existe participação ampla de células e citocinas diversas do sistema imune.

Em relação ao sistema imune inato, é descrita a participação dos queratinócitos da pele e das células linfoides inatas tipo 2 na síntese de mediadores, como as alarminas TSLP, IL-25, IL-33, e citocinas do perfil T2, como IL-5 e IL-13, além de peptídeos antimicrobianos, como a catelicidina e as beta-defensinas. Os receptores tipo-*Toll* (TLR) também participam da fisiopatologia. É descrito que o TLR-2 promove integridade da barreira cutânea e defende o hospedeiro de infecções por *S.aureus* e *Herpes simplex* virus, estando sua síntese reduzida na dermatite atópica.¹⁵

Já em relação ao sistema imune adaptativo, antigamente, era descrita uma predominância no padrão Th2 nas fases iniciais da dermatite atópica, enquanto que, com o avançar da doença, havia predomínio do padrão Th1. Mais recentemente, esta simples polarização da resposta foi modificada,

sendo descritos novos perfis de citocinas de outras subpopulações de linfócitos Th, como os Th17, Th22 e Th9 (Figura 2).⁸

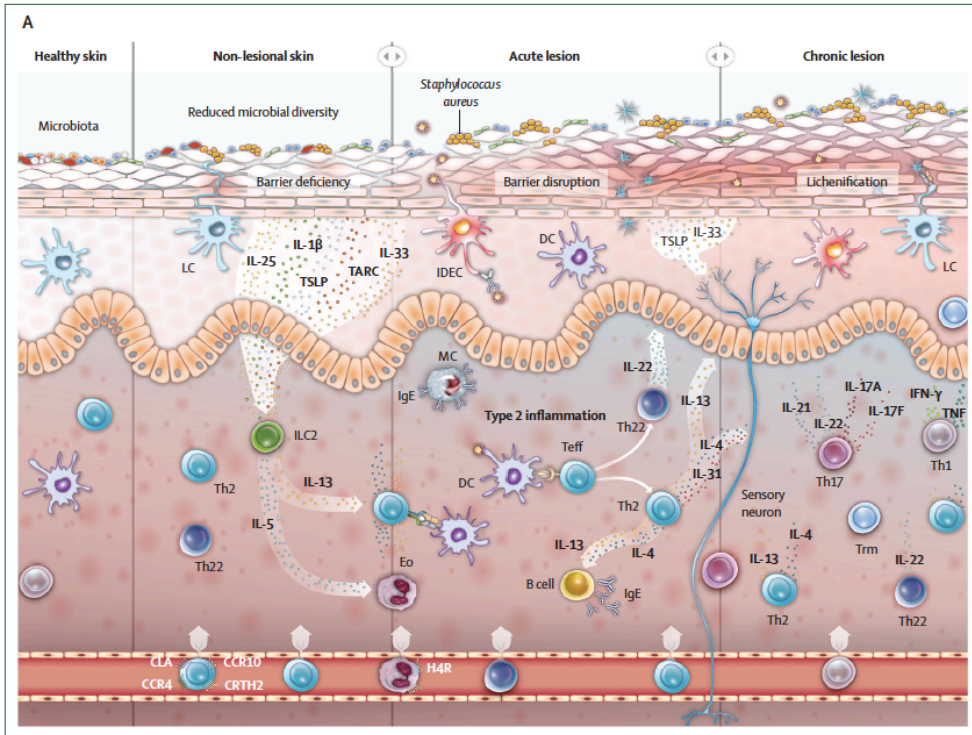


Figura 2 – Esquema representando as alterações imunológicas descritas em cada fase da evolução da DA. Fonte: Langan et al, 2020.

Os linfócitos Th9 surgem na pele pela diferenciação de linfócitos T *naive* sob ação das citocinas IL-4 e TGF-beta, ou diferenciando-se a partir dos Th2. O papel da IL-9 ainda não está totalmente esclarecido na dermatite atópica, mas ela parece estar envolvida na inflamação, sobrevivência e proliferação de subpopulações específicas de linfócitos T. Nos queratinócitos, a IL-9 induz a síntese de VEGF, o qual está associado com mudanças epidérmicas vistas na dermatite atópica.^{8,15}

Já os linfócitos Th22 são marcadores associados com a cronificação e intensificação da doença. A IL-22 participa da remodelação cutânea, induz hiperplasia cutânea, participa da regulação da barreira da pele e modifica o

padrão de diferenciação celular. Ela ativa fibroblastos, favorecendo a hiperqueratose e hiperpigmentação, comuns na forma crônica da DA.⁸

O papel dos linfócitos Th17 ainda permanece controverso. Estudos mais recentes consideram que a IL-17 tem particular importância no agravamento da lesão da barreira cutânea, atuando na degradação da claudina-1, alterando os corneodesmosomos.¹⁶

Parece que o perfil de citocinas Th2 presente em fases iniciais da dermatite atópica inibe o eixo Th17. Alguns estudos descrevem a ação da IL-17 também na diferenciação dos queratinócitos e alteração da expressão de determinados genes, como da filagrina.¹⁶

Finalmente, as citocinas IL-31 e IL-33 tiveram também um papel identificado na patogenia da DA. A primeira é muito importante no processo de prurido cutâneo, pois ativa terminações nervosas, com liberação de neuropeptídeos como a substância P e CGRP, representando o exemplo principal da interface entre o sistema imune e nervoso na DA. Já a IL-33 estimula os mastócitos a liberar histamina, além de ativar eosinófilos e células ILC2, colaborando para uma polarização T2.¹⁷

c) Fatores ambientais

Entre os fatores de risco ambientais, está bem documentada a associação da exposição passiva ao tabaco, exposição a substâncias químicas irritativas (como por exemplo, o lauril sulfato de sódio, presente nos amaciantes, e o hidróxido de sódio) e a outros poluentes atmosféricos, com o aumento da incidência da dermatite atópica.¹⁸

Estudos associaram maior prevalência da DA em localidades com baixa umidade, baixa exposição aos raios UV, baixa temperatura e uso de aquecimento interno¹⁹.

Os distúrbios da transpiração, representados pelo excesso de suor (sudorese), associado com altas temperaturas e umidade, parece favorecer ou exacerbar o surgimento da DA. Pode haver condições favoráveis para proliferação de microrganismos como fungos, principalmente *Malassezia sp.*²⁰

Além disso, a ocorrência de estresse materno durante a gestação²¹, o parto cesáreo e modificações da microbiota, tanto cutânea quanto intestinal, são descritos como fatores de risco associado ao surgimento de doenças alérgicas.²²

A DA também está associada com a sensibilização a vários aeroalérgenos, sendo os ácaros os mais relevantes. O mecanismo envolvido é uma clássica reação de hipersensibilidade do tipo I de Gell e Coombs. Outros alérgenos que podem estar envolvidos são os derivados de epitélios de cão ou de gato, fungos do ar e baratas.²³

Na faixa etária pediátrica, a alergia alimentar pode estar associada à dermatite atópica em até 40% dos casos, quando o quadro é moderado a grave. A alergia alimentar na DA apresenta mecanismo misto na fisiopatogenia, podendo haver um componente IgE-mediado (sintomas imediatos, geralmente em até 2h da ingestão) e não-IgE mediado (manifestações tardias).²⁴

Quanto mais precoce o início da DA, maior a chance de sensibilização alimentar²⁵. Os alimentos mais envolvidos são o ovo de galinha e o leite de

vaca. Nos adultos com alergia alimentar, é descrito que cerca de 10% apresentam a dermatite atópica como manifestação clínica.²⁶

Analisando-se o papel da alimentação do lactente (aleitamento materno *versus* uso de fórmulas infantis a base de proteína do leite de vaca), estudos demonstram haver um fator protetor contra o desenvolvimento de alergia à proteína do leite de vaca nos indivíduos expostos aos produtos lácteos em torno dos 6 meses de idade, através do mecanismo de indução de tolerância oral.^{26,27}

É descrito que os defeitos da barreira cutânea na DA favorecem a penetração de alimentos, culminando com um processo de sensibilização e resposta imune via Th2, por via cutânea. Porém, casos graves de DA geralmente cursam com níveis bastante elevados de IgE sérica total, podendo haver sensibilização a diversos alimentos, sem que haja uma relação causal entre a ingestão e a piora das lesões.²⁷

Recentemente, um estudo de Jones e colaboradores²⁸ reportou que existe uma associação de alergia alimentar (ovo, leite de vaca e amendoim) e colonização por *S. aureus*, em crianças com DA. Houve significância estatística demonstrando que níveis mais elevados de IgE específico para amendoim foi encontrada em pacientes colonizados principalmente por cepas MRSA.

Além disso, também pode haver pacientes com DA sensibilizados a um determinado alimento, cuja manifestação IgE-mediada é outra, que não a piora do eczema na DA, podendo inclusive haver anafilaxia. Portanto, apenas através de uma anamnese detalhada, com um acompanhamento especializado, adotando-se restrições e testes de provocações

subsequentes, é possível confirmar a correlação entre um determinado alimento e a exacerbação da DA.^{26,27}

Dietas restritivas, baseadas somente no resultado dos testes alérgicos, são desencorajadas, havendo descrições de surgimento de quadros IgE-mediados a tais alimentos que se desenvolvem após período variável de restrição (geralmente 2 a 3 meses). Isto ocorre devido a uma imunodesregulação envolvendo os linfócitos Treg, havendo uma perda da tolerância imunológica e desenvolvimento de alergia²⁶.

III. MICROBIOMA E DERMATITE ATÓPICA

Mais recentemente, o microbioma vem ganhando destaque no estudo de diversas doenças, como obesidade, doença inflamatória intestinal, diabetes melito, rinite alérgica e dermatite atópica, demonstrando que a interação entre os diversos microrganismos presentes no ser humano e o sistema imunológico é bastante complexa. A microbiota da pele vive em simbiose com os fatores do sistema imune, regulando o papel fisiológico da barreira cutânea²⁹.

A microbiota cutânea é variável de acordo com a idade, além de se modificar de acordo com determinados locais do corpo. Por exemplo, áreas com grande quantidade de glândulas sebáceas costumam ser colonizada por bactérias do gênero *Cutibacterium* spp. e fungos *Malassezia* spp.; em áreas úmidas, ocorre predomínio de *Corynebacterium* spp. e *Staphylococcus* spp.³⁰

Quanto à idade, estudos demonstraram predomínio de bactérias dos gêneros *Streptococcus*, *Rothia*, *Gemella*, *Granulicatella* e *Haemophilus* entre crianças pequenas; enquanto em adultos há um predomínio de:

Cutibacterium, *Lactobacillus*, *Anaerococcus*, *Finnegoldia* e *Corynebacterium*³¹.

Na DA, é descrita uma redução da variabilidade de espécies compondo a microbiota cutânea, com predomínio da colonização por *Staphylococcus aureus* e uma redução de outras espécies, incluindo estafilococos coagulase-negativa (ECN).³²

A disfunção na barreira cutânea dos pacientes com DA que têm mutações na filagrina favorece a colonização por *S. aureus*. Ocorre um aumento do pH da pele e estímulo à expressão de proteínas envolvidas na adesão celular e evasão do sistema imune pelo *S. aureus*, tais como a proteína ligadora de fibronectina e o fator B de aglutinação.³³

Com intuito de demonstrar a influência da colonização precoce da pele e sua influência no surgimento da DA, um estudo³⁴ demonstrou que a colonização cutânea por bactérias *Staphylococcus* coagulase-negativa (ECN) aos dois meses de idade foi associada com um menor risco de desenvolvimento da doença com um ano de idade. Neste mesmo estudo, a via de parto e a presença de aleitamento materno não exerceram influência na modificação da microbiota cutânea, diferente de outros estudos que demonstram que tais fatores aumentam o risco de certas doenças alérgicas, como a alergia alimentar, por serem importantes na modulação da microbiota intestinal.

Estudos³⁵⁻³⁷ demonstraram que a microbiota cutânea nos pacientes com DA sofre influência da terapêutica utilizada e também durante as exacerbações. Existem estudos demonstrando o efeito da corticoterapia sistêmica e tópica, imunossupressores, inibidores tópicos de calcineurina e mesmo alguns imunobiológicos, como o Dupilumabe³⁸, sobre a modificação

da microbiota cutânea, havendo redução das cepas de *S. aureus* e de citocinas inflamatórias do perfil T2, como a IL-4 e IL-13.

Tratamentos emergentes com intuito de modular a microbiota cutânea foram desenvolvidos nos últimos anos. A utilização de emolientes com a bactéria *Vitreoscilla filiformis* demonstrou discreta redução de *S. aureus*, porém reduziu o SCORAD dos pacientes com DA³⁹. Outros estudos demonstraram a ação benéfica na redução da gravidade da DA, com uso de emolientes contendo cepas de *Lactobacillus johnsonii* e *Aquaphilus dolomia*⁴⁰⁻⁴¹. O transplante cutâneo bacteriano com *Roseomonas mucosa* também evidenciou redução do SCORAD, prurido e necessidade de uso de corticoterapia⁴². Outro estudo envolveu o transplante cutâneo de ECN das espécies *S. hominis* e *S. epidermidis*, com redução significativa da colonização por *S. aureus*⁴³.

III. IMPORTÂNCIA DE “*Staphylococcus spp.*” NA DERMATITE ATÓPICA

Os estafilococos são bactérias cocos Gram-positivos, pertencentes à família Staphylococcaceae, imóveis, anaeróbios facultativos, apresentando metabolismo fermentativo com produção de ácido e não gás, não fotossintético, não esporulado, catalase-positiva e capazes de crescer no meio contendo cloreto de sódio 10%. São microrganismos mesófilos, capazes de se desenvolver em temperaturas de 7 a 48°C e pH na faixa de 4,0 a 10,0 (sendo ótimo entre 6-7,0)⁴⁴.

São classicamente divididos em 2 grandes grupos baseado na capacidade de expressar a enzima coagulase: *Staphylococcus aureus* (principal representante do grupo coagulase-positivo, de maior interesse

médico, estando envolvida na etiologia de diversos processos infecciosos, principalmente das piodermites, síndrome do choque tóxico e quadros invasivos, como pneumonia, piodartrite, meningite e sepse) e os estafilococos coagulase-negativa (incluindo diversas espécies, anteriormente consideradas microrganismos comensais e oportunistas, porém com crescente evidência de patogenicidade e virulência, principalmente entre indivíduos imunossuprimidos, recém-nascidos e portadores de implantes ou cateteres vasculares) – cujos principais representantes são: *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. capitis*, etc.⁴⁵

Como membros da microbiota cutânea, tais bactérias colonizam diversos locais, com variações de acordo com a espécie, havendo, de uma forma geral, predomínio nas narinas, axilas, região inguinal e perineal. Diversos estudos demonstraram que o *Staphylococcus aureus* coloniza cerca de 30 a 100% dos pacientes com a dermatite atópica, tanto nas lesões quanto em áreas sem lesões; enquanto coloniza apenas 5 a 20% dos indivíduos saudáveis⁴⁶.

Uma recente metanálise mostrou que os pacientes com DA apresentam prevalência de colonização por *S. aureus* nas lesões em atividade de 70%, comparado com 39% em áreas sem lesões ou comparando com indivíduos sem DA⁴⁷.

Comparando-se o padrão de eczema agudo versus crônico, foi demonstrado que existe uma maior taxa de colonização por *S. aureus* nas lesões agudas, verificando-se que existe uma correlação positiva entre o grau de intensidade da inflamação cutânea com a densidade destas bactérias nas lesões⁴⁸⁻⁴⁹. Este mesmo estudo⁴⁸ demonstrou que pacientes

com níveis mais elevados de IgE sérica também tendem a ser mais colonizados por *S. aureus*.

S. aureus produz uma série de proteínas e enzimas (mais de 20 descritas) que atuam como fatores de virulência⁵⁰, podendo ser divididos em tais grupos:

- (a) superantígenos, incluindo as enterotoxinas (SE A-U) e a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1): estimulam de forma policlonal os linfócitos T e macrófagos, com ativação direta do MHC II, culminando na liberação de citocinas pró-inflamatórias, na ativação dos mastócitos, basófilos, células de Langerhans e queratinócitos, e na produção de citocinas do perfil Th2 e Th22 (Figura 3);
- (b) citotoxinas, incluindo a alfa-toxina e as leucocidinas;
- (c) enzimas, como a beta-toxina, com ação citotóxica;
- (d) adesinas, como a proteína A, que se ligam aos componentes do tecido humano, como a laminina e fibronectina;
- (e) outras enzimas, com ação de protease e nuclease.

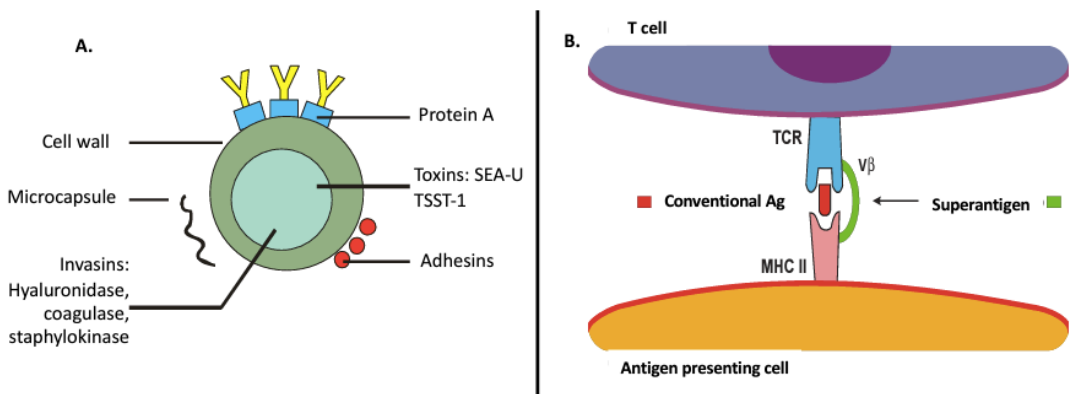


Figura 3 – A) representação esquemática dos principais fatores de virulência do *S. aureus*. B) Superantígenos, representados pelo grupo das enterotoxinas estafilocócicas, as quais atuam se ligando no MHC classe II e TCR, estimulando os linfócitos T de forma policlonal.⁵¹

As enterotoxinas estafilocócicas que atuam como superantígenos promovem ativação das células dendríticas e estimulam a polarização da resposta T2, levando ao aumento da síntese de citocinas como IL-4, IL-5, IL-13 e IL-31, à alteração da barreira cutânea, à redução da produção de peptídeos antimicrobianos, ao prejuízo na diferenciação dos queratinócitos e ao prurido. Na fase mais crônica da DA, há um envolvimento das respostas de Th1, Th22 e Th17, causando o espessamento cutâneo e liquenificação.⁵¹

Em resumo, as enterotoxinas estafilocócicas na DA apresentam os seguintes efeitos (Figura 4):

- a) Disfunção da ação de linfócitos Th22 e estimulação dos linfócitos Tc22;
- b) Redução da proliferação de linfócitos e monócitos, corroborando um perfil de exaustão imune;
- c) Atuação os eosinófilos sobre o processo de remodelamento cutâneo, com desbalanço entre diferentes citocinas (aumento de CCR3 e redução de CD23, CD62L, TIMP-1, TIMP-2 e CCL5).
- d) Aumenta a síntese IL-10 e reduz a resposta mediada por IFN-gama e TNF na fase crônica da DA.

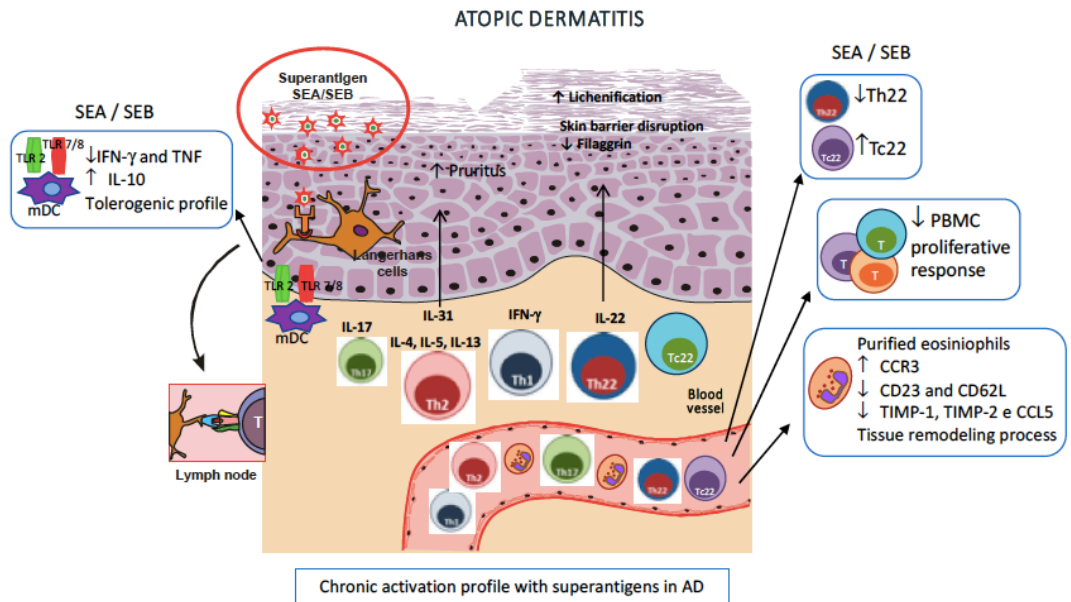


Figura 4 – Ações das enterotoxinas estafilocócicas SEA e SEB na fisiopatogenia da DA.⁵¹

Na DA, são descritos outros fatores de virulência que contribuem para a disfunção da barreira cutânea⁵²:

- a proteína A, como adesina, que se liga à fibronectina do tecido conjuntivo da derme;
- as lipoproteínas da parede celular bacteriana, que são reconhecidas pelos receptores TLR-2 presentes nos queratinócitos da epiderme;
- a alfa-hemolisina, que contribui para a ruptura da barreira cutânea, interagindo com a esfingomielina das membranas celulares e criando verdadeiros poros que culminam com a lise dos queratinócitos;
- a alfa-toxina, que degrada as E-caderinas, rompendo as junções promovidas pelos corneodesmossomos.

Na DA, existe uma redução na síntese de peptídeos antimicrobianos, sendo um fator adicional que contribui para a proliferação do *S. aureus*. É descrita a redução de defensinas, como a catelicidina (LL-37), beta-

defensinas e dermicidinas, decorrente do aumento de citocinas do perfil Th2, como IL-4 e IL-13⁵³.

Além destes efeitos sobre a barreira cutânea, também são descritos outros fatores de virulência envolvidos na fisiopatogenia da DA. A delta-toxina promove a degranulação dos mastócitos e basófilos, através da ativação via receptor MRGPRX2 presente na membrana destas células. Algumas proteínas inibem a degradação dos eosinófilos, perpetuando a processo inflamatório da DA; além de algumas enterotoxinas como a SEB estimular a polarização Th2, importante via da patogênese da DA. A tabela abaixo resume os principais fatores de virulência do *S.aureus* e seu papel na patogênese da DA⁵⁴ (Tabela 1).

Tabela 1 – Fatores de virulência do *S.aureus* e sua importância na Dermatite Atópica.

FATOR B DE AGLUTINAÇÃO	Adesão ao estrato córneo via loricrina ou outros ligantes.
PROTEÍNA LIGADORA DE FIBRONECTINA	Adesão a fibronectina presente em alta concentração na epiderme.
PROTEÍNA A	Ação pró-inflamatória. Liga-se ao TNFR-1 dos queratinócitos.
LIPOPROTEÍNA	Pró-inflamatória. Ativa o receptor TLR-2 nos queratinócitos.
ALFA-TOXINA	Promove lise dos queratinócitos, ligando-se ao receptor ADAM10.
DELTA-TOXINA	Degranulação de mastócitos, promovendo inflamação alérgica.
ENTEROTOXINA B (SEB)	Ativa inflamação T2, inibe a síntese de filagrina e aumenta síntese de IL-31.
MODULINAS SOLÚVEIS AO FENOL (PSM)	Ação pró-inflamatória, com lise de neutrófilos.
ENTEROTOXINAS	Ativação policlonal de linfócitos T e síntese maciça de citocinas pró-inflamatórias.
AUREOLISINA	Inativação de peptídeos antimicrobianos.
PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE REGULADAS POR FERRO (ISD)	Adesão a loricrina, involucrina e K10 dos queratinócitos. Contribuem para a resistência à ação dos ácidos graxos e peptídeos antimicrobianos.

Também foi descrito que os pacientes podem apresentar uma desregulação imunológica, envolvendo a participação dos linfócitos B. A expressão de exotoxinas estafilocócicas promove a síntese de anticorpos IgE específicos contra estas toxinas bacterianas, as quais atuam como alérgenos. No estudo de Nomura e colaboradores⁵⁵, foi verificado que as IgE anti-exotoxinas estafilocócicas ocorriam principalmente abaixo dos 7 anos de idade, estando seus níveis correlacionados positivamente com a gravidade da DA.

Assim, o *S. aureus* exerce um papel importante no desenvolvimento da DA, podendo a diferenciação da expressão de toxinas, bem como o grau de resistência aos antibióticos, influenciar diretamente na gravidade da doença. As toxinas produzidas pelo *S. aureus* também induzem uma resistência *in vitro* dos leucócitos periféricos à ação de corticosteroides, os quais são amplamente usados no controle dos sintomas da doença.^{56,57}

Além das toxinas, foi descrita a produção de vesículas extracelulares (EV) pelos *S. aureus*, contendo no seu interior mais de 90 tipos diferentes de proteínas patogênicas, envolvidas na fisiopatogenia da DA⁵⁸. Foi demonstrado que tais proteínas têm ação preponderante em estimular uma resposta inflamatória tanto do perfil Th1, quanto Th17 e Th2, havendo produção de IgE anti-EV.

Sabe-se que os pacientes com dermatite atópica apresentam uma redução da variabilidade de espécies participando da microbiota cutânea, comparado com controles saudáveis. Existe um nítido predomínio de *S. aureus* em detrimento de outras espécies de estafilococos coagulase-negativas (ECN)^{59,60}. Assim, uma estratégia que favoreça o crescimento destas últimas pode auxiliar no controle da dermatite atópica. Estudos

demonstram que os ECN sintetizam diversas enzimas e peptídeos antimicrobianos que reduzem a proliferação do *S. aureus* nos pacientes com DA. Também foi verificada a ação de outros microrganismos em reduzir a população cutânea de *S. aureus*, como a presença de *Streptococcus pneumoniae*, *Lactobacillus johnsonii*, *L. reuteri* e *L. plantarum*⁶¹.

V. RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DOS ESTAFILOCOCOS

Nos últimos 10 anos, tem sido observado um crescente desenvolvimento de resistência aos agentes antimicrobianos comumente prescritos. E cepas de *S. aureus* resistente a metilicina (MRSA) ou mesmo vancomicina (VRSA) estão descritas globalmente em ambiente hospitalar ou comunitário.⁶²

A utilização de penicilinas semi-sintéticas resistentes às penicilinases, tendo a oxacilina como a seu principal representante de uso clínico no Brasil, iniciou em 1959. Já em 1961, foi descrito o surgimento de amostras de *S. aureus* resistente a este antibiótico (MRSA), sendo descrito pela produção de uma proteína ligadora de penicilina (PBP) suplementar (denominada PBP 2' ou PBP 2a), a qual apresenta baixa afinidade a este grupo de antibióticos. Esta enzima é produto do gene denominado *mecA*. Este gene é carregado em um elemento genético móvel identificado como Cassete Cromossômico Estafilocócico *mec* (SCC*mec*), incluindo seus genes reguladores.⁶²

No contexto da DA, diversos trabalhos demonstram que a colonização por cepas MRSA estão associados com maior número de exacerbações da doença e pior gravidade do quadro clínico, mesmo sem o desenvolvimento de infecções nestes pacientes colonizados. Foi verificada que estas bactérias

expressam uma maior quantidade de fatores de virulência, os quais podem estar envolvidos na gravidade da DA^{63,64}. Um estudo em Hong Kong⁶⁵, verificou a associação de colonização por MRSA em pacientes com DA e a presença de mais eritema ou eczema mais generalizados, comparado com indivíduos colonizados por cepas MSSA.

Nos pacientes com DA, estudos evidenciam um predomínio de cepas de MRSA de origem comunitária (CA-MRSA), com prevalência estimada em torno de 0 a 38%⁶⁶. Estas cepas apresentam um perfil de resistência e sensibilidade antimicrobiana mais favorável comparada às de origem hospitalar, sendo geralmente sensíveis ao tratamento com antibióticos sistêmicos orais, como a clindamicina e o sulfametoxazol-trimetoprim^{65,67}.

A preocupação em desenvolver estratégias para restabelecer uma microbiota cutânea mais fisiológica levou ao desenvolvimento de estratégias para se tentar reduzir a colonização pelo *S. aureus* e aumentar a diversidade da microbiota, com aumento proporcional de espécies de ECN, principalmente *S. epidermidis*^{68,69}. A utilização de banhos com clorexidina, permanganato de potássio ou hidróxido de sódio, em diferentes concentrações, é descrita como uma estratégia possível⁷⁰.

Além disso, também existe a recomendação de se utilizar antibióticos tópicos em locais de alta colonização pelo *S. aureus*, como nas narinas, regiões periungueais, períneo e axilas, com resultado variáveis na redução da colonização⁶⁰.

O que se tem observado em diversos estudos, é que ocorre uma re-colonização pelo *S. aureus* ao longo de alguns meses, dependente principalmente na presença deste agente entre os demais membros da família do paciente com DA⁴⁸.

Uma metanálise da Cochrane de 2011⁷⁰ mostrou que não existe benefício do tratamento com antibióticos sistêmicos em pacientes com DA, exceto no contexto da presença de infecções por *S. aureus*.

A presença destas bactérias multirresistentes pode influenciar o tratamento da dermatite atópica e, num futuro não muito distante, a modulação da colonização por esta bactéria pode ser um alvo terapêutico importante.⁷¹

VI. QUALIDADE DE VIDA DOS RESPONSÁVEIS DOS PACIENTES COM DERMATITE ATÓPICA

A DA é uma doença crônica com importante impacto negativo na qualidade de vida tanto dos pacientes quanto dos seus responsáveis/familiares. A presença do prurido, a perturbação do sono, a necessidade de um tratamento árduo e diário, além dos gastos com o tratamento, sentimentos de culpa, perda de emprego devido a necessidade de vindas frequentes às consultas médicas, a exaustão e a necessidade de dedicação intensa são alguns dos fatores responsáveis pelo desgaste físico e emocional nos cuidadores dos indivíduos com a doença^{72,73}.

Estudos demonstraram que o impacto que a DA representa na qualidade de vida dos pacientes e cuidadores se equipara àqueles envolvidos em outras doenças crônicas impactantes, como a diabetes insulino-dependentes^{74,75}. Isto ainda se torna ainda mais relevante quando consideramos a presença frequente de outras comorbidades nos pacientes com DA, principalmente a asma, a qual também contribui para um prejuízo significativo na qualidade de vida.

Dentre os diversos instrumentos que existem na forma de questionário para avaliar de forma mais objetiva o impacto na qualidade de vida dos cuidadores dos pacientes com DA, existe um, que está validado para o português, denominado *Dermatitis Family Impact Questionnaire* (DFI), o qual o impacto da doença nos seguintes quesitos: distúrbios emocionais, perturbações do sono, interferência nas tarefas domésticas, na alimentação, nas atividades de lazer, no relacionamento conjugal e nos custos financeiros.⁷⁵

Estudos demonstraram que quanto maior a gravidade da DA, pior a qualidade de vida do paciente e seus cuidadores. Apesar disto, sabe-se que a visão dos familiares pode superestimar a gravidade dos sintomas, o que contribui para um prejuízo na qualidade de vida, independente da forma de apresentação da DA, principalmente quando a família acredita que existam múltiplos fatores envolvidos na exacerbação da doença, principalmente em relação aos alimentos⁷⁶⁻⁷⁸.

Portanto, a DA representa um grande impacto negativo na vida dos pacientes, podendo estar secundariamente associada ao surgimento de outras complicações e manifestações sistêmicas, como os transtornos psiquiátricos, aumento do risco de infecções cutâneas e é descrita associação crescente com doenças autoimunes, como a psoríase, além de síndrome metabólica relacionada ao processos inflamatório crônico, incluindo dislipidemia e complicações cardiovasculares⁷⁹.

VII. JUSTIFICATIVA

O presente estudo representa um panorama de aspectos clínicos e epidemiológicos de pacientes pediátricos (faixa etária de 0 a 18 anos de idade) diagnosticados com dermatite atópica, em seguimento em um serviço especialidade de um Hospital Terciário. Existem poucos estudos nesta faixa etária que relacionam a DA e sua gravidade com a presença de bactérias da microbiota cutânea do gênero *Staphylococcus*, bem como a sua correlação com a expressão de fatores de virulência (incluindo as enterotoxinas e expressão do gene *mecA*). Portanto, é um estudo considerado relevante, levando-se em conta o detalhamento do perfil microbiológico realizado, englobando desde testes microbiológicos básicos como o Gram, as provas fenotípicas e os métodos de biologia molecular como a PCR, a fim de possibilitar a identificação genotípica de genes específicos de fatores de virulência e perfil de resistência antimicrobiana. Tais aspectos são importantes no planejamento terapêutico destes indivíduos.

OBJETIVOS DO ESTUDO

Objetivo Geral:

- Descrever a frequência da colonização cutânea e nasal por *Staphylococcus aureus* e as principais espécies de estafilococos coagulase-negativos (com destaque para o *S. epidermidis*) em pacientes com dermatite atópica, nas lesões agudas e crônicas, além de identificar os genes e a expressão de determinadas toxinas.

Objetivos Específicos:

- Avaliar a associação entre a colonização pelo *Staphylococcus aureus* e estafilococos coagulase-negativos nos pacientes com dermatite atópica e a gravidade da doença.
- Verificar o perfil de sensibilização aos aeroalérgenos e alimentos entre os pacientes com DA e correlacionar com a gravidade da doença.
- Avaliar a relação entre a gravidade da dermatite atópica e o perfil de sensibilidade à meticilina das espécies de *Staphylococcus* spp.
- Avaliar a correlação entre a expressão de determinados fatores de virulência dos estafilococos estudados com a gravidade da DA.
- Avaliar o impacto da DA na qualidade de vida dos responsáveis pelos pacientes.

MÉTODOS

I. Casuística e desenho do estudo

Trata-se de um estudo transversal, envolvendo uma amostra de pacientes com diagnóstico de dermatite atópica, em seguimento nos ambulatórios de Alergia e Imunologia Pediátrica e/ou Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (Unesp), durante o período de janeiro de 2021 a agosto de 2022.

Critérios de inclusão

1. Pacientes com idade de 0 a 18 anos completos.
2. Diagnóstico da dermatite atópica segundo os critérios de Hanifin e Rajka (1980) – vide em APÊNDICES, o qual considera doença confirmada a presença de 3 critérios clínicos maiores e 3 ou mais critérios clínicos menores.
3. Presença de dermatite atópica leve, moderada ou grave de acordo com o escore de gravidade SCORAD⁸⁰ (*Scoring atopic dermatites*), sendo considerados leves os pacientes com pontuação entre 0-25, moderada entre 25-50 e grave >50. O SCORAD consiste em um escore clínico utilizado na prática clínica para avaliar a gravidade da DA, considerando como variáveis a área da superfície corpórea acometida (A), o aspecto das lesões (B) – xerose, edema, escoriações, eritema, exsudação e liquenificação (graduadas de 0 a 3, de acordo com a intensidade) – e uma escala analógica visual da intensidade do prurido interferindo nas atividades diárias e na qualidade do sono (graduados de 0 a 10), nas últimas 48 horas. A pontuação total é obtida pela fórmula: $A/5 + 7B/2 + C$.

4. Presença de lesão aguda caracterizada por hiperemia, exsudato e prurido, sem sinais de infecção secundária. Já a lesão crônica é caracterizada pela presença de liquenificação.

Critérios de exclusão

1. Pacientes que apresentem, no momento da seleção, lesões infecciosas bacterianas secundárias, como impetigo, celulite, furúnculo, etc.
2. Uso de antibiótico sistêmico e tópico nos últimos 30 dias da coleta do material clínico.
3. Uso atual de imunossupressor sistêmico ou imunobiológicos.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, com registro do parecer 4.519.478. Os responsáveis pelos pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e os pacientes, acima de 6 anos de idade, assinaram um Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE) – vide nos Apêndices.

O perfil de sensibilização de aeroalérgenos e alimentos dos pacientes selecionados foi obtido pela realização de teste de puntura de leitura imediata (*prick test*), com extratos comercializados. Os pacientes foram orientados a virem para a consulta sem terem usado medicamentos que possam interferir no resultado do teste, como o uso de anti-histamínico sistêmico na última semana. Foi realizada a técnica de Pepys para a interpretação do *prick test*, sendo considerado relevante uma pápula com diâmetro de 3 ou mais milímetros. Para pápulas irregulares ou com pseudópodos, foi calculada uma média entre o maior e menor diâmetro

observados. Dentre os aeroalérgenos, utilizamos extratos comercializados (empresa Ipl ASAC BRASIL – <http://ipibrasil.com.br>) das três principais espécies de ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. farine* e *Blomia tropicalis*), epitélio de cão e de gato, fungos do ar (*Aspergillus fumigatus*, *Penicillium notatum*, *Alternaria alternata* e *Candida albicans*) e baratas presentes no ambiente doméstico (*Periplaneta americana* e *Blatella germanica*). Já os alimentos testados incluíram proteínas do ovo de galinha, leite de vaca, trigo, soja, amendoim, milho, castanhas mix (Pará e caju) e camarão. Tais alimentos foram escolhidos devido a serem citados na literatura internacional como os principais alimentos alergênicos na população. O milho foi incluído com intuito de se identificar um novo alérgeno alimentar regional, considerando o seu impacto cultural e a alta frequência de consumo na região onde o estudo foi realizado (centro-oeste paulista).

II. Coleta de dados demográficos e clínicos

Foi aplicado um questionário com os responsáveis pelos pacientes, que autorizaram a participação, incluindo os seguintes dados:

- Dados demográficos (sexo e idade);
- Composição familiar (número de moradores);
- Renda familiar (média salarial mensal);
- Idade de início dos sintomas da DA;
- Idade do diagnóstico da DA;
- Desencadeantes ou gatilhos da DA;
- Presença de animais domésticos;

- Presença de outras atopias;
- Co-morbidades;
- Antecedentes familiares de atopia;
- Tempo total de aleitamento materno;
- Introdução de leite de vaca antes de 1 ano de vida;
- Via de parto (vaginal ou cesárea);
- Tratamentos vigentes no momento da entrevista (divididos em grupos: emolientes, anti-histamínicos tópicos ou sistêmicos, corticoides tópicos ou sistêmicos e inibidores de calcineurina tópicos);
- Internações e procedimentos médicos no último ano;
- Quadros infecciosos e uso de antimicrobianos no último ano;
- Dosagem de eosinófilos no hemograma;
- Dosagem sérica de imunoglobulinas (IgA, IgG, IgM e IgE total)
– método de quimioluminescência – sendo obtidos os resultados dos exames laboratoriais contidos no prontuário dos pacientes.

Os dados obtidos foram complementados através de posterior análise dos prontuários (autorizada pelos pacientes e/ou seus responsáveis).

III. Avaliação da Qualidade de Vida

Com intuito de avaliar o impacto da DA na qualidade de vida dos responsáveis, foi aplicado, ao final da consulta, um questionário padronizado denominado *Dermatitis Family Impact Questionnaire* (DFI), validado para o português (Lewis-Jones, Finlay e Dykes, 1999)⁷⁵. Este questionário consiste em 10 perguntas objetivas, sendo possível avaliar os seguintes domínios: interferência nas tarefas domésticas, interferência no preparo das refeições e alimentação, perturbações do sono, interferência nas atividades de lazer,

tempo gasto em compras, gastos com o tratamento, sentimentos de cansaço e exaustão, perturbação emocional, interferência no relacionamento conjugal e interferência global na vida do principal cuidador.

O questionário DFI é pontuado de 0 a 30 pontos, sendo que pontuações mais elevadas representam um impacto negativo maior na qualidade de vida dos indivíduos. A interpretação da pontuação pode ser da seguinte forma: 0-5 (impacto pequeno), 5-10 (impacto moderado), 10-20 (impacto elevado) e > 20 (impacto muito elevado).

IV. Análise e Testes Microbiológicos

a) Coleta dos espécimes microbiológicos

Amostras das mucosas nasal e lesões cutâneas em atividade foram coletadas simultaneamente através de *swabs*. Os espécimes foram obtidos das narinas anteriores, utilizando um *swab* para cada sítio. No caso dos pacientes que apresentavam várias lesões no momento da coleta, foi escolhida a lesão considerada mais representativa, com severidade maior considerando os parâmetros objetivos das características da lesão pontuados no SCORAD.

A técnica de coleta nasal consiste na umidificação do *swab* com SF 0,9% (técnica estéril) e introdução em ambas às narinas e rotação da haste pressionando gentilmente a extremidade contra a mucosa. O procedimento para coleta das lesões nos pacientes com dermatite atópica consistiu na umidificação do *swab*, comprimindo o mesmo de forma suave sobre toda

superfície da lesão. Os *swabs* foram transportados em meio de Stuart para o Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da Unesp, para realização de semeadura em placas contendo Ágar Sangue. Após incubação a 37°C por 24 horas, as amostras foram submetidas ao procedimento de identificação dos micro-organismos isolados.

b) Identificação fenotípica de *Staphylococcus aureus*

Os micro-organismos foram submetidos à coloração de Gram, objetivando-se a observação de sua morfologia e coloração específica. Após a confirmação dessas características, foram realizadas as provas de catalase e coagulase em tubo, conforme descrito por Koneman e colaboradores⁸¹.

c) Extração do ácido nucléico

O ácido nucléico total foi extraído de *Staphylococcus* spp. cultivados em ágar sangue e inoculados individualmente em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) e incubados a 37°C por 24 horas.

Para a extração, foi utilizado o Kit Illustra® (GE Healthcare) que consiste na digestão inicial das células de estafilococos com lisozima (10 mg/ml) e proteinase K (20 mg/ml). A seguir, 500 µl da solução de extração foi adicionada à mistura e esta centrifugada a 5.000 x g por 1 min. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para a coluna e centrifugado a 5.000 x g por 1 min. O líquido coletado foi descartado e 500 µl de solução de

extração foi adicionado novamente à coluna. Após a centrifugação e descarte do líquido coletado, 500 µl da solução de lavagem foi adicionada à coluna e esta submetida à centrifugação a 14.000 x rpm por 3 min. A coluna foi transferida para um tubo de 1,5 ml e 200 µl de água Milli Q aquecida a 70°C foi utilizada para a eluição. As amostras foram centrifugadas novamente a 5000 x g por 1 minuto, e a coluna desprezada. O DNA extraído foi guardado sob refrigeração a -20°C.

d) Identificação genotípica de *Staphylococcus aureus*

A confirmação genotípica para os isolados de *S. aureus* foi realizada através da amplificação do fragmento de DNA Sa442, específico da espécie *S. aureus*. Os *primers* utilizados são descritos na Tabela 2. O produto das amplificações foi analisado por eletroforese (2,0% de gel agarose) a 110V e Ladder de 100 pb. As reações de amplificação foram realizadas com controle positivo: *S. aureus* ATCC 19095 e Controle negativo (água).

Tabela 2. Oligonucleotídeos para a identificação genotípica de *Staphylococcus aureus*.

Primer	Sequência de nucleotídeos	Produto amplificado
SA442 1	AAT CTT TGT CGG TAC ACG ATA TTC TTC ACG	241 pb
SA442 2	CGT AAT GAG ATT TCA GTA GAT AAT ACA ACA	

Fonte: Martineau et al. (1998)⁸²

e) Identificação de espécies de *Staphylococcus epidermidis*

Os isolados negativos na prova de coagulase foram submetidos à identificação genotípica usando *primers* de sequências conservadas pela técnica PCR (*Polymerase Chain Reaction*) descrita por Martineau e colaboradores⁸³, usando os *primers* descritos na Tabela 3. Todas as reações de amplificação foram realizadas com um controle positivo ATCC 12228 (*S. epidermidis*) e o negativo (Água MilliQ estéril).

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados na identificação genotípica de *S. epidermidis*.

Primers	Sequência de nucleotídeos 5'- 3'	Produto amplificado (pb)
SE-1	ATC AAA AAG TTG GCG AAC CTT TTC A	124
SE-2	CAA AAG AGC GTG GAG AAA AGT ATC A	

Fonte: Martineau et al.(1996)⁸³

f) Detecção do gene *mecA* de resistência à metilina

As reações de PCR para a detecção do gene *mecA* de resistência à metilina (Tabela 4) foram realizadas conforme os parâmetros descritos por Murakami e colaboradores⁸⁴. Em todas as reações realizadas foram

utilizadas linhagens de referência internacional, como controle positivo (*S. aureus* ATCC 33591) e negativo (*S. aureus* ATCC 25923).

Tabela 4. Oligonucleotídeos para a detecção do gene *mecA*

Primer	Sequência de nucleotídeos	Produto amplificado
<i>mecA1</i>	AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG	533 pb
<i>mecA2</i>	AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG	533 pb

Fonte: Murakami et al. (1991).⁸⁴

g) Visualização dos produtos amplificados

A eficiência das amplificações foi confirmada pela eletroforese em gel de agarose 2% preparado em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5M. Como padrão, foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pb. O DNA foi corado com *Syber safe* e posteriormente fotografado sob transiluminação ultravioleta.

h) Produção de Enterotoxinas pela Técnica de *cellophane-over-agar*

A produção das enterotoxinas A, B, C e D em cepas de *S. aureus* foi investigada utilizando a técnica de *cellophane-over-agar* realizada de acordo com Hallander⁸⁵. Na superfície de placas de Petri (60x12mm) com ágar Brain Heart Infusion-BHI adicionado de 1% de extrato de levedura foi colocado celofane esterilizado no tamanho do diâmetro da placa. Sobre o celofane foi inoculado 0.1mL das suspensões de estafilococos cultivadas em caldo BHI

durante 24h a 37°C. Com o auxílio de uma alça de Drigalsky, o inóculo foi semeado homoganeamente sobre a superfície do celofane. Após 24 horas de incubação a 37°C, a cultura foi removida com 1.5mL de uma solução de NaH₂PO₄ 0,01M estéril. Este extrato foi centrifugado em microcentrífuga Eppendorf a 8.000 x g / 4°C, durante 10 minutos. Os sobrenadantes obtidos foram conservados a -20°C até sua utilização, e o sobrenadante mantido a -5°C até a análise.

i) Detecção de enterotoxinas estafilocócicas pelo Método de Aglutinação em Látex (RPLA)

Para a detecção das enterotoxinas A, B, C e D foi utilizado o kit SET-RPLA TOXIN DETECTION (Oxoid) por meio da técnica de aglutinação passiva reversa em látex (RPLA), descrita por SHINGAKI⁸⁶. O sobrenadante de *S. aureus* obtido conforme item descrito acima foi filtrado por meio de membrana filtrante de baixa ligação de proteína, de 0,22 µm e o filtrado foi utilizado para a pesquisa de toxina. Para essa finalidade, nos poços de microplaca com fundo em V, foram colocados 25 µl dos filtrados. A seguir, foram adicionados 25 µl do látex sensibilizado com anti-SEA, anti-SEB, anti-SEC e anti-SED. As toxinas padrão foram utilizadas como controle positivo e as reações inespecíficas foram analisadas adicionando-se 25 µl do sobrenadante em 25 µl do látex controle. As placas assim preparadas serão cobertas com celofane e os reagentes homogeneizados em micromixer por 3 minutos. Após incubação durante 20 a 24 horas em temperatura ambiente, os resultados serão registrados com o auxílio de uma lupa e iluminação. A formação de um botão róseo foi interpretada como resultado negativo.

V. Análise estatística

Os dados dos questionários foram alimentados em banco de dados no *software* EPI INFO 7 (*Centers for Diseases Control and Prevention*, Atlanta, GA, USA). Os dados foram inicialmente submetidos a análise univariada através do teste do qui-quadrado, e posteriormente foram submetidos a modelos multivariados de regressão logística. Os desfechos de interesse foram a colonização por *S. aureus*, espécies de ECN e MRSA, para identificação de fatores associados aos desfechos. Também foram analisadas associações entre a colonização por isolados de *Staphylococcus* spp. carreadores de genes e produtores de fatores de virulência com a gravidade da DA.

RESULTADOS

1) Características sócio-demográficas e clínicas

Entre os 100 pacientes incluídos no estudo, durante o período de janeiro de 2021 a agosto de 2022, 59 foram do sexo feminino, 41 do masculino e ambos apresentaram mediana de idade de 8 anos (Tabela 5). Houve predominância da raça branca (76%), comparada com a parda (24%). A mediana de idade do início da DA foi de 1 ano, sendo que a mediana de idade para o diagnóstico da doença foi 3 anos. Foi observado que 91 pacientes apresentaram outros diagnósticos de doenças alérgicas e 93 tinham antecedente familiar de atopia.

Quanto às questões sociais, foi verificada que a média de moradores no domicílio dos pacientes com DA foi de 4,3 indivíduos, sendo a média da renda mensal familiar de R\$3.256,65.

Quanto a avaliação clínica da gravidade da DA pelo SCORAD, foi observado que 55% tiveram classificação leve, 34% moderada e 11% grave ($p < 0,0001$).

Em relação à via de parto, foi observada 47% de parto vaginal e 53% de parto cesárea ($p = 0,55$). Noventa e um dos pacientes recebeu aleitamento materno, com média 10,4 meses de tempo de amamentação. A introdução de leite de vaca integral com menos de 6 meses de idade ocorreu em 69% dos pacientes.

Quanto aos tratamentos utilizados no controle da DA, foi verificado que 55% não utilizavam nem mesmo os emolientes após os banhos, enquanto 46% utilizavam anti-histamínicos orais para controle do prurido, 47% usavam corticoides tópicos nas crises, 2% corticoterapia sistêmica (em ciclos de no máximo 1 semana) e apenas 3% inibidores de calcineurina tópico.

Em relação à presença de animais domésticos, foi verificado que 77% tinham pelo menos algum animal: 70% cão, 24% gato e 6% outros animais (pássaros, coelho, porquinho da Índia, hamster ou galinhas).

Quanto aos principais fatores citados como exacerbadores ou gatilhos das crises da DA, foram observados: poeira doméstica 20%, mudança de clima 62%, sudorese 29%, fatores emocionais (estresse) em 18% e alimentos 16%.

Tabela 5 – Dados sócio-demográficos e clínicos dos pacientes pediátricos com DA

Sexo		n	%	p = 0,07
	Masculino	41	41,0	
	Feminino	59	59,0	
Idade				p <0,0001
	< 2 anos	5	5,0	
	2-12 anos	69	69,0	
	> 12 anos	23	23,0	
Raça				p <0,0001
	Branca	76	76,0	
	Parda	24	24,0	
Nº de moradores	Média		4,3	
	DP		1,1	
Renda familiar mensal	Média		R\$3.256,65	
	DP		R\$1.911,52	
Idade de início (anos)	Média		1,9	
	DP		2,5	
	Mediana		1,0	
Idade de diagnóstico (anos)	Média		3,8	
	DP		3,6	
	Mediana		3,0	
Comorbidades atópicas				p <0,0001
	Ausentes	9	9,0	
	1	19	19,0	
	2	25	25,0	
	≥ 3	47	47,0	
Antecedente familiar de atopia (1º grau)				p <0,0001
	SIM	93	93,0	
	NÃO	7	7,0	
Aleitamento materno:				p <0,0001
	SIM	91	91,0	
	NÃO	9	9,0	
Tempo de aleitamento materno (meses)				
	Média		10,4	
	DP		10,3	
	Mediana		6,0	
Uso de leite de vaca com < 6 meses				p <0,0001
	n		%	
	SIM	69	69,0	
	NÃO	31	31,0	
Via de parto				p = 0,55
	n		%	
	Vaginal	47	47,0	
	Cesárea	53	53,0	
Tratamento				p <0,0001
	n		%	
	Emolientes	78	78,0	
	A.H. VO ¹	46	46,0	
	CE tópico ²	47	47,0	
	CE VO ³	2	2,0	
	IC ⁴	3	3,0	
Animais domésticos				p <0,0001
	n		%	
	SIM	77	77,0	
	NÃO	23	23,0	

1 = anti-histamínico via oral; 2 = corticóide tópico; 3 = corticoide via oral; 4 = inibidor de calcineurina.

2) Teste alérgico de puntura de leitura imediata – *prick test*

Todos os pacientes foram submetidos ao *prick test* durante a avaliação clínica. Foi observada sensibilização predominante de aeroalérgenos (espécies de ácaros - DP 77,0%, DF 63,0% e BT19,0%; fungos 5,0% e baratas 13%), comparada à de alimentos (LV 5%, ovo 6%, soja 5%, milho 1%, amendoim 5%, castanhas 4% e camarão 10%). A maior sensibilização alimentar foi para o camarão (Tabela 6).

Dos pacientes que haviam citado algum alimento como desencadeante ou gatilho para as crises de DA, apenas 16% evidenciaram sensibilização a algum alimento.

Tabela 6 - Distribuição de frequências quanto aos resultados positivos do teste de puntura de leitura imediata – *prick test*.

Extratos	%
<i>Aeroalérgenos</i>	
DP ^a	77,0
DF ^b	63,0
BT ^c	19,0
Fungos	5,0
Baratas	13,0
Cão	53,0
Gato	26,0
<i>Alimentos</i>	
Leite de vaca	5,0
Ovo	6,0
Soja	5,0
Trigo	0,0
Milho	1,0
Amendoim	5,0
Castanhas	4,0
Camarão	10,0

a,b e c: ácaros *Dermatophanoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* e *Blomia tropicalis*, respectivamente.

3) Avaliação de eosinofilia periférica e níveis de imunoglobulinas

Do total de pacientes, 80% tiveram dosagem de eosinófilos periféricos com o exame de hemograma. Este exame foi obtido em algum momento durante o acompanhamento clínico ambulatorial do paciente, diferente daquele no qual foi realizada a avaliação clínica e aplicação do questionário deste estudo.

A média dos eosinófilos periféricos foi 627,5 células/mm³, com desvio-padrão de 490,0 e mediana de 470,0. Embora os pacientes classificados pelo SCORAD como tendo DA moderada e grave tivessem níveis mais elevados de eosinofilia periférica (mediana de 575,0 contra 435,0 dos leves), esses valores não foram estatisticamente significativos ($p=0,76$).

Quanto à dosagem sérica das imunoglobulinas, 48% tiveram IgA (mediana 127,5 mg/dl, limite inferior de 10,3 mg/dl, limite superior de 248,52 mg/dl), 44% IgM (mediana 101,7 mg/dl, limite inferior de 30,92 mg/dl, limite superior de 266,58 mg/dl), 46% IgG (mediana 1071,0 mg/dl, limite inferior de 467 mg/dl, limite superior de 1685,86 mg/dl) e 34% IgE total (mediana 502 mg/dl, limite inferior de 16,3 mg/dl, limite superior de 6086,3 mg/dl). Entre os pacientes que tiveram dosagem das imunoglobulinas, não tivemos nenhum com suspeita clínica ou laboratorial para algum erro inato da imunidade. Embora os pacientes com DA moderada e grave tivessem níveis mais elevados de IgE (mediana 660,0 contra 468,1 dos leves), esses valores não foram estatisticamente significativos ($p=0,69$).

4) Avaliação da qualidade de vida dos cuidadores pelo DFI

Foi observada uma média da pontuação total do questionário DFI de 9,1 (impacto moderado), com desvio-padrão de 7,5 e mediana de 7,0.

As perguntas que tiveram as maiores médias foram àquelas relativas aos domínios: interferências nas tarefas domésticas, gastos com o tratamento e sentimentos de cansaço/exaustão por parte dos cuidadores.

Quando se tentou correlacionar as maiores pontuações com a gravidade dos pacientes pelo SCORAD, não se observou uma correlação estatisticamente significativa entre essas duas variáveis.

5) Prevalência de *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e outros

Foi programada a coleta de amostras de quatro sítios para investigação da colonização por bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. (Figura 5). Em todos os pacientes, foram coletadas amostras nas narinas e axilas. No entanto, somente alguns pacientes apresentavam lesão em atividade no momento da consulta, seja com padrão agudo e/ou crônico. Foi identificada a prevalência de *S. aureus* em 73% dos pacientes, enquanto a prevalência de *S. epidermidis* foi de 36%, a de outros ECN de 58% e de bactérias Gram-negativas de 18% do total dos pacientes.

Abaixo, constam os dados relativos à identificação de *S. aureus*, MRSA, *S. epidermidis*, outros ECN e Gram-negativos, em cada sítio coletado por *swab*.

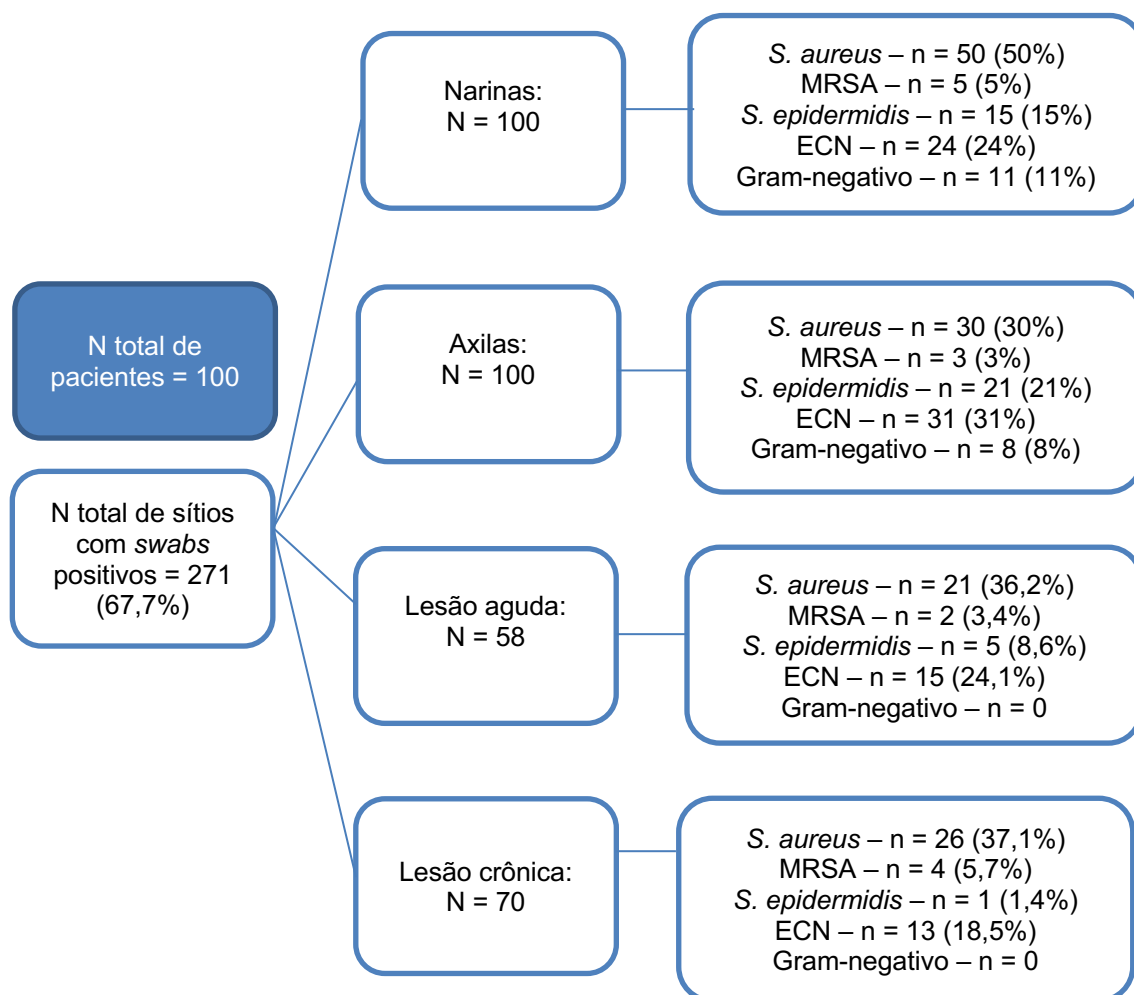


Figura 5. Diagrama do total de amostras coletadas com swab e a sua distribuição de acordo com os sítios colonizados, com as respectivas prevalências.

A expressão de gene *mecA* por *S. aureus* (MRSA) foi observada nos sítios de swabs coletados em 10 indivíduos (Tabela 7); enquanto a expressão deste gene foi evidenciada nos swabs em 8 indivíduos colonizados por *S. epidermidis*. Não foi observada correlação entre a gravidade da DA pelo SCORAD e a expressão deste gene (Gráfico 1).

Tabela 7 – Classificação de gravidade da DA dos pacientes que tiveram MRSA isolados, de acordo com o sítio de *swab* coletado.

Paciente	Sítios	SCORAD
Nº 1	nasal	LEVE
Nº 8	nasal	LEVE
Nº 9	axila	LEVE
Nº 10	nasal, lesão aguda e crônica	LEVE
Nº 13	nasal	LEVE
Nº 17	lesão crônica	MODERADO
Nº 57	axila	GRAVE
Nº 69	nasal	MODERADO
Nº 70	lesão crônica	LEVE
Nº 75	axila, lesão aguda e crônica	MODERADO

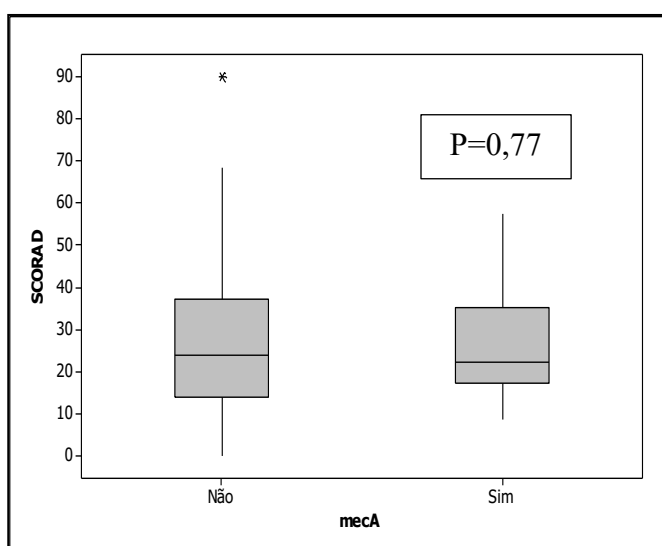


Gráfico 1 – Correlação entre SCORAD e expressão do gene *mecA* – utilizando-se Teste de Mann-Whitney.

6) Expressão de enterotoxinas estafilofólicas

Considerando os pacientes colonizados por *S. aureus*, foi identificada a prevalência da expressão fenotípica, pelo método de aglutinação em látex (RPLA), das seguintes enterotoxinas: SEA de 12,3%, SEB de 19,1%, SEC de 28,8% e SED de 8,2%. Houve significância estatística quando se comparou a síntese destas enterotoxinas com a gravidade da DA somente para SEA e SED, sendo que a mediana do SCORAD foi maior para os que apresentaram a expressão destas toxinas (vide Gráfico 2).

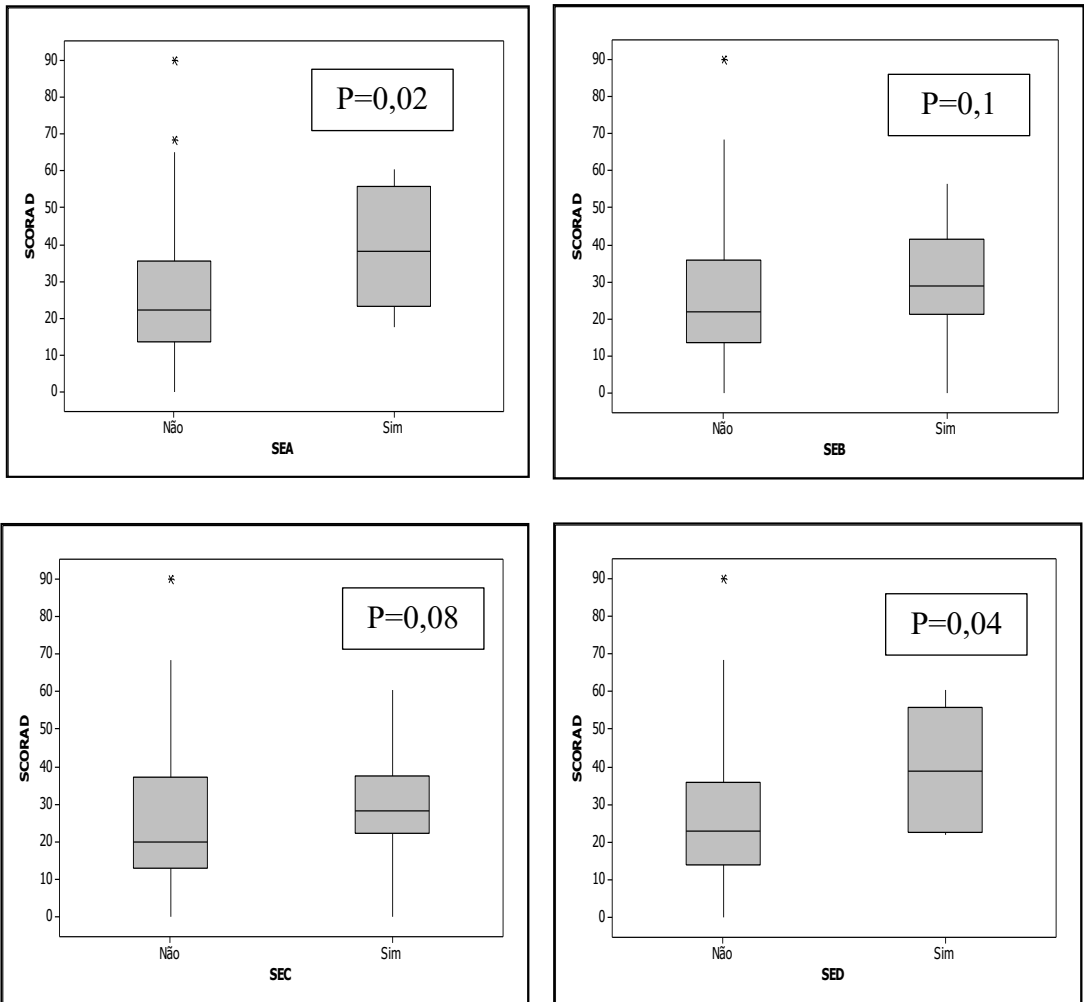


Gráfico 2 – Representação em boxplot da correlação da expressão fenotípica das enterotoxinas estafilocócicas (SEA, SEB, SEC e SED) e a gravidade da dermatite atópica, pelo SCORAD. Utilizado teste de Mann-Whitney.

DISCUSSÃO

A dermatite atópica é uma dermatose crônica prevalente na infância e de etiologia multifatorial e fisiopatogenia ainda não totalmente esclarecida. Fatores relacionados às características genéticas, resultantes em alterações na estrutura e composição da barreira cutânea, sensibilização a diversos aeroalérgenos, imunodesregulação envolvendo a participação de vias Th1, Th2, Th17 e Th22, além de disbiose cutânea e a exposição a fatores ambientais atuam de forma interligada, resultando em quadros fenotípicos diversos³.

Entre os fatores associados ao desenvolvimento da marcha atópica, pudemos verificar que grande parte dos participantes tinham antecedente pessoal e familiar de doenças alérgicas, corroborando esse dado da literatura⁸. Porém, nosso estudo não demonstrou significância estatística em alguns fatores citados como associados ao maior risco de atopia, como via de parto cesárea, citado como um modulador da microbiota intestinal, capaz de influenciar o desenvolvimento de alergia alimentar ou mesmo as demais doenças atópicas.

A associação entre a exposição precoce ao leite de vaca (antes dos 6 meses de idade) e formas mais graves de DA, no contexto de alergia a proteína do leite de vaca, também não foi estatisticamente relevante no nosso estudo. Uma revisão sistemática⁸⁷, concluiu que existe evidência insuficiente que correlacione qualquer tempo de duração do aleitamento materno e introdução precoce do leite de vaca (mesmo em fórmulas infantis) com o aumento da incidência de DA até a adolescência.

Ao se tentar correlacionar fatores associados a uma pior evolução da DA, considerando o SCORAD dos pacientes, não foi verificada correlação significativa com maior sensibilização aos alimentos testados pelo *prick test*,

idade do indivíduo durante a consulta, presença de outras comorbidades alérgicas ou antecedente familiar de atopia.

Também não foi observada maior gravidade da DA conforme a idade do indivíduo. Muitos estudos relatam que a persistência da doença além dos 5 anos de idade pode estar associada com uma evolução mais grave, refratária ao tratamento e com maior prejuízo na vida do indivíduo⁴.

Em relação a dosagem de eosinófilos, verificada ao hemograma, e a dosagem sérica de IgE total, percebemos que os níveis mais elevados estiveram associados com DA moderadas e graves, porém sem significância estatística. A literatura cita que estes exames poderiam servir como biomarcadores de atividade da doença³⁵, tendendo a se elevar na vigência de uma exacerbação, o que poderia ser mais bem avaliado em um trabalho prospectivo dos indivíduos com DA.

Níveis elevados de IgE total também podem criar um viés de interpretação nos níveis de IgE específicos ou mesmo no resultado do *prick test*, tanto para aeroalérgenos quanto para alimentos^{24,26}. Estes indivíduos podem apresentar diversas sensibilizações, com testes positivos, porém sem uma correlação clínica evidente entre a exposição ambiental ou ingestão daquele determinado alimento com a piora do padrão do eczema.

Além disso, devemos ainda lembrar que a fisiopatogenia da DA envolve um componente celular, de resposta de hipersensibilidade tardia, a qual ainda carece de disponibilidade de um teste padronizado para avaliação e auxílio na clínica.³

Quanto a avaliação da qualidade de vida dos cuidadores dos pacientes, não houve significância estatística na associação da gravidade dos pacientes com uma maior pontuação pelo questionário DFI utilizado. Isto,

provavelmente, justifica-se pelo fato de que, muitas vezes, os responsáveis pelos pacientes supervalorizam a gravidade da DA nos seus filhos.

O impacto representado pela doença nos diversos domínios avaliados, principalmente: interferência nas tarefas domésticas, gastos exigidos com o tratamento e sentimento de exaustão/cansaços, devido às demandas do cuidado dos pacientes, ocorreram de forma semelhante entre cuidadores, independente da gravidade da DA.

Também devemos considerar que a nossa avaliação quanto a gravidade foi pontual, em uma única consulta, e que os pacientes aparentemente leves provavelmente já vivenciaram momentos de maior exacerbação da DA, considerando ser esta uma doença crônica, recidivante, com exacerbações de intensidade variável.

Um estudo brasileiro⁷², incluiu 101 cuidadores de pacientes com DA e nele foi evidenciado um impacto da DA na qualidade de vida dos familiares de crianças com formas graves de DA. Neste estudo, os domínios referentes aos gastos financeiros com o tratamento (citado em 46% dos questionários), sentimento de exaustão (36%) e prejuízos no sono (33%) foram os mais frequentemente afetados.

Quanto a investigação microbiológica, com intuito de identificar espécies de *Staphylococcus* spp. colonizando determinados sítios dos pacientes estudados, observamos a prevalência do *S. aureus* em 73% nos pacientes com DA, em pelos um sítio coletado. Na literatura, é citada uma taxa de colonização, entre indivíduos saudáveis, que varia de 5-40%; enquanto nos pacientes com DA, de 30 a 100%⁴⁸.

Nosso estudo identificou uma prevalência de colonização por MRSA de 10%. Em um estudo brasileiro, o qual estudou 500 crianças hígdas

atendidas em setor público na cidade de Niteroi-RJ, foi verificada uma colonização por *S. aureus* em 48% delas, sendo apenas 6,2% por MRSA⁸⁸.

Em estudo desenvolvido em Porto Alegre⁶⁶, entre 91 crianças com DA, foi isolada *S. aureus* em 73,6% delas, sendo em 60,4% de amostras das narinas e 48,4% de lesões em atividade da DA. Neste mesmo estudo, nenhuma das amostras foi identificada por MRSA.

Um estudo desenvolvido em um hospital universitário do Sri Lanka⁸⁹, observou através de amostras de *swabs* nasais e de lesões dos pacientes com DA moderada a grave a presença de *S. aureus* em 57% dos 100 pacientes incluídos na pesquisa. Já em um estudo brasileiro com crianças e adolescentes com DA, assim como no nosso, não observou uma correlação entre a frequência de colonização por *S. aureus* e a gravidade da DA⁴⁹.

Quando consideramos a presença de *S. aureus* nas lesões agudas e crônicas, verificamos as prevalências de 36,2% e 37,1%, respectivamente. Estudos prévios⁹⁰, evidenciaram uma maior taxa de colonização em lesões mais úmidas, com padrão agudo do eczema.

A presença do gene *mecA* de resistência à metilina, que caracteriza a multirresistência em *Staphylococcus aureus* foi pesquisada, sendo identificados MRSA em 10 pacientes, sendo em sete deles isolado no sítio nasal. Apenas em dois pacientes, houve identificação nas lesões agudas e crônicas. Considerando a gravidade da DA pelo SCORAD, em apenas dois pacientes onde foi identificado o gene *mecA* nos isolados de *S. aureus*, o paciente tinha DA moderada e apenas um com grave.

Em uma meta-análise realizada com intuito de definir a prevalência de colonização nasal por MRSA em criança, foi verificada a prevalência de 5,2%

em crianças com alguma comorbidade, 2,7% em crianças hígidas, 5,4% naquelas que estavam internadas e 3% nas de origem comunitária⁶⁷.

Cavalcante e colaboradores⁶³ foi o pioneiro no Brasil na identificação de MRSA em 26,6% dos pacientes com dermatite atópica, sendo considerada uma taxa elevada, provavelmente justificada pela origem dos pacientes estudados, os quais frequentavam um hospital terciário de alta complexidade, com alto índice de internações.

Já em um estudo brasileiro publicado em 2021, o qual estudou 106 crianças com diagnóstico de DA com infecções cutâneas de etiologia por *S. aureus*, foi identificada uma prevalência de MRSA em 41,8% dos pacientes colonizados por *S. aureus*.⁶⁴ Diferenças demográficas entre os diferentes países são justificativas para taxas tão variáveis de isolamento de MRSA, sendo que este mesmo estudo cita uma variação de 14-45%.

Em um estudo realizado na cidade de Botucatu-SP⁹¹, a mesma deste estudo, foi observada uma prevalência de colonização nasal por *S. aureus* de 32,7%, o que representou cerca de 1/3 da população estimada no período. A prevalência de colonização nasal por MRSA foi de 0,9%. Neste estudo, foram incluídos adultos e crianças a partir de 1 ano de idade, hígidas ou com comorbidades diversas. Na análise multivariada, foram identificadas como variáveis significativamente associadas com o risco de colonização nasal a idade (inversamente proporcional) e o antecedente pessoal de infecção cutânea recente (no último ano).

Este estudo identificou significância estatística na expressão das toxinas estafilocócicas SEA e SED no impacto sobre a gravidade da DA pelo SCORAD. Um estudo alemão⁹², no qual participaram 74 crianças com DA, foi identificada uma prevalência de colonização por *S. aureus* de 81%,

havendo correlação significativa da gravidade pelo SCORAD com a síntese das toxinas SEB, SEC e SED.

Avaliando os dados relativos ao uso recente de antibióticos sistêmicos, internações hospitalares e realização de procedimentos cirúrgicos no último ano, anterior ao momento da consulta realizada com o paciente, pudemos verificar que estes fatores não influenciariam na colonização por *Staphylococcus* spp.

Considerando os principais medicamentos disponíveis no Brasil para o tratamento da DA, nosso estudo evidenciou que grande parte dos pacientes adere ao uso diário de emolientes diversos, enquanto menos da metade da amostra utiliza anti-histamínicos sistêmicos e corticoterapia tópica de forma regular, evidenciando uma baixa adesão ao tratamento pró-ativo, divulgado como uma estratégia a ser utilizada principalmente em pacientes com quadros moderados ou graves. Apenas 2% dos pacientes tiveram acesso ao uso de inibidores de calcineurina, provavelmente devido ao alto custo desta classe de fármacos, considerando que a totalidade dos nossos pacientes são atendidos em um Hospital Terciário do SUS, com uma média de renda mensal em torno de R\$3.200,00, necessária para sustentar em média 4 familiares.

Portanto, pudemos observar no nosso estudo que, independente da gravidade da DA, os pacientes estavam sendo subtratados, o que nos faz refletir a importância de reforçar as orientações durante as consultas especializadas, garantindo uma adesão adequada.

Como limitações encontradas no presente estudo, tivemos algumas a serem consideradas: o estudo foi realizado durante a pandemia de covid-19, o que repercutiu negativamente na possibilidade de se obter uma quantidade

maior de participantes (n), considerando que os mesmos eram convidados a virem ao HC-FMB-Unesp, de forma voluntária, para participar do estudo. Além disso, tivemos limitações financeiras e técnicas quanto ao acesso aos exames para dosagem de IgE específica para os alérgenos testados, inclusive quanto aos IgE anti-toxinas estafilocócicas. Também não tivemos material para realizar os *prick-to-prick* com os alimentos *in natura*, os quais recentemente vêm sendo mais valorizados na avaliação de sensibilização no contexto das alergias alimentares.

Uma contribuição do estudo para o serviço de atendimento aos pacientes dentro do SUS foi a possibilidade de garantir retornos e seguimentos dos pacientes que desejassem ou haviam perdido seguimento devido a pandemia, além de termos conseguido o tratamento com o imunobiológico Dupilumabe para 6 pacientes, com DA grave, os quais estão sendo acompanhados de forma mais próxima.

CONCLUSÃO

- Neste estudo, foi encontrada uma prevalência de colonização por *S. aureus* de 73%, de 36% por *S. epidermidis*, de 58% de outros ECN e de 18% de Gram-negativos;
- A pesquisa do gene *mecA* foi observada em 10 pacientes dentre aqueles que tiveram *S. aureus* isolado em algum sítio de *swab* coletado e em 8 indivíduos com *S. epidermidis*.
- Não foi observada significância estatística quando se comparou a gravidade da DA (pelo SCORAD) com a presença do *S. aureus* ou de MRSA;
- Foi observada significância estatística quando se comparou a expressão fenotípica das enterotoxinas estafilocócicas SEA e SED com a gravidade da DA;
- A sensibilização alimentar identificada pelo teste alérgico de puntura (*prick test*) também não se correlacionou de forma significativa com a gravidade da DA.
- O impacto da qualidade de vida dos responsáveis pelos pacientes com DA, avaliado pelo questionário DFI, não apresentou correlação positiva com a gravidade da DA.
- Portanto, a DA é uma doença de etiologia multifatorial, complexa, com vários mecanismos fisiopatológicos responsáveis pela sua apresentação clínica. Conclui-se, que a presença dos *S. aureus* colonizando os pacientes com DA pode ser considerada apenas um dos diversos fatores que modulam a sua expressão fenotípica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Weidinger S, Novak N. Atopic dermatitis. *Lancet*. 2016 Mar 12;387(10023):1109-1122. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00149-X. Epub 2015 Sep 13. PMID: 26377142.
2. Hanifin JM, Rajka G. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol*. 1980;92:44-7.
3. Antunes AA, Solé D, Carvalho VO, Bau AEK, Kuschnir FC, Mallozi MC, et al. Guia prático de atualização em dermatite atópica - Parte I: etiopatogenia, clínica e diagnóstico. Posicionamento conjunto da Associação Brasileira de Alergia e Imunologia e da Sociedade Brasileira de Pediatria. *Braz J Allergy Immunol*. 2017;1(2):131-156.
4. Williams H, Stewart A, von Mutius E, Cookson W, Anderson HR, and the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase One and Three Study Groups. Is eczema really on the increase worldwide? *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121:947-54.
5. Deckers IA, McLean S, Linssen S, Mommers M, van Schayck CP, Sheikh A. Investigating international time trends in the incidence and prevalence of atopic eczema 1990-2010: a systematic review of epidemiological studies. *PLoS One* 2012;7:e39803.
6. Odhiambo JA, Williams HC, Clayton TO, Robertson CF, Asher MI; ISAAC Phase Three Study Group. Global variations in prevalence of eczema symptoms in children from ISAAC Phase Three. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(6):1251-8.e23. doi: 10.1016/j.jaci.2009.10.009.
7. Silverberg JI, Hanifin JM. Adult eczema prevalence and associations with asthma and other health and demographic factors: a US population-based study. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132:1132-38
8. Langan SM, Irvine AD, Weidinger S. Atopic dermatitis. *Lancet*. 2020 Aug 1;396(10247):345-360. doi: 10.1016/S0140-6736(20)31286-1. Erratum in: *Lancet*. 2020 Sep 12;396(10253):758. PMID: 32738956.
9. Prado E, Pastorino AC, Harari DK, Mello MC, Chong-Neto N, Carvalho VO, et al. Dermatite atópica grave: guia prático de tratamento da Associação Brasileira de Alergia e Imunologia e Sociedade Brasileira de Pediatria. *Arq Asma Alerg Imunol*. 2022;6(4):432-467.
10. Hon KL, Leung AK, Barankin B. Barrier repair therapy in atopic dermatitis: an overview. *Am J Clin Dermatol*. 2013;14(5):389-99.
11. Margolis DJ, Gupta J, Apter AJ, Ganguly T, Hoffstad O, Papadopoulos M, et al. Filaggrin-2 variation is associated with more persistent atopic dermatitis in African American subjects. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(3):784-9
12. Cork MJ, Robinson DA, Vasilopoulos Y, Ferguson A, Moustafa M, MacGowan A, et al. New perspectives on epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis: gene-environment interactions. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118(1):3-21.
13. Van Smeden J, Bouwstra JA. Stratum corneum lipids: their role for the skin barrier function in healthy subjects and atopic dermatitis patients. *Curr Probl Dermatol*. 2016;49:8-26.
14. Thomsen SF, Ulrik CS, Kyvik KO et al. **Importance of genetic factors in the etiology of atopic dermatitis: a twin study.** *Allergy Asthma Proc*. 2007; **28**: 535-539
15. Simon D, Wollenberg A, Reinz H, Simon HU. Atopic dermatitis: Collegium Internationale Allergologicum (CIA) Update 2019. *Int Arch Immunol*. 2019; 178(3):207-18. doi: 10.1159/000497383.
16. Gutowska-Owsiak D, Schaupp AL, Salimi M, Selvakumar TA, McPherson T, Taylor S, et al. IL-17 downregulates filaggrin and affects keratinocyte expression of genes associated with cellular adhesion. *Exp Dermatol*. 2012;21:104-10.
17. Sroka-Tomaszewska J, Trzeciak M. Molecular Mechanisms of Atopic Dermatitis Pathogenesis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(8):4130. doi: 10.3390/ijms22084130.
18. Cork MJ, Danby SG, Vasilopoulos Y, Hadgraft J, Lane ME, Moustafa M, et al. Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2009;129:1892-908.
19. Nguyen GH, Andersen LK, Davis MDP. Climate change and atopic dermatitis: is there a link? *Int J Dermatol*. 2019;58

20. Hiragun T, Ishii K, Hiragun M, Suzuki H, Kan T, Mihara S, et al. Fungal protein MGL_1304 in sweat is an allergen for atopic dermatitis patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132:608e15. doi: 10.1016/j.jaci.2013.03.047.
21. Andersson NW, Hansen MV, Larsen AD, Hougaard KS, Kolstad HA, Schlünssen V. Prenatal maternal stress and atopic diseases in the child: a systematic review of observational human studies. *Allergy*. 2016 Jan;71(1):15-26. doi: 10.1111/all.12762. Epub 2015 Sep 22. PMID: 26395995; PMCID: PMC5054838.
22. Turner PJ, Campbell DE, Boyle RJ, Levin ME. Primary Prevention of Food Allergy: Translating Evidence from Clinical Trials to Population-Based Recommendations. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2018 Mar-Apr;6(2):367-375. doi: 10.1016/j.jaip.2017.12.015. PMID: 29524992; PMCID: PMC5840515
23. Werfel T, Heratizadeh A, Niebuhr M, Kapp A, Roesner LM, Karch A, et al. Exacerbation of atopic dermatitis on grass pollen exposure in an environmental challenge chamber. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136:96-103,e109.
24. Cartledge N, Chan S. Atopic Dermatitis and Food Allergy: A Paediatric Approach. *Curr Pediatr Rev*. 2018;14(3):171-179. doi: 10.2174/1573396314666180613083616. PMID: 29895253.
25. Graham F, Eigenmann PA. Atopic dermatitis and its relation to food allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2020 Jun;20(3):305-310. doi: 10.1097/ACI.0000000000000638. PMID: 32109909.
26. Domínguez O, Plaza AM, Alvaro M. Relationship Between Atopic Dermatitis and Food Allergy. *Curr Pediatr Rev*. 2020;16(2):115-122. doi: 10.2174/157339631566619111122436. PMID: 31713486.
27. Robison RG, Singh AM. Controversies in Allergy: Food Testing and Dietary Avoidance in Atopic Dermatitis. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2019 Jan;7(1):35-39. doi: 10.1016/j.jaip.2018.11.006. Epub 2018 Nov 27. PMID: 30501976; PMCID: PMC6312729.
28. Jones AL, Curran-Everett D, Leung DY. Food allergy is associated with *Staphylococcus aureus* colonization in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2016;137:1247-1248.e3.
29. Byrd AL, Belkaid Y, Segre JA. The human skin microbiome. *Nat Rev Microbiol*. 2018 Mar;16(3):143-155. doi: 10.1038/nrmicro.2017.157. Epub 2018 Jan 15. PMID: 29332945.
30. Paller AS, Kong HH, Seed P, Naik S, Scharschmidt TC, Gallo RL, Luger T, Irvine AD. The microbiome in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2019 Jan;143(1):26-35. doi: 10.1016/j.jaci.2018.11.015. Epub 2018 Nov 23. Erratum in: *J Allergy Clin Immunol*. 2019 Apr;143(4):1660. PMID: 30476499; PMCID: PMC7163929.
31. Kim JE, Kim HS. Microbiome of the Skin and Gut in Atopic Dermatitis (AD): Understanding the Pathophysiology and Finding Novel Management Strategies. *J Clin Med*. 2019 Apr 2;8(4):444. doi: 10.3390/jcm8040444. PMID: 30987008; PMCID: PMC6518061.
32. Koh LF, Ong RY, Common JE. Skin microbiome of atopic dermatitis. *Allergol Int*. 2022 Jan;71(1):31-39. doi: 10.1016/j.alit.2021.11.001. Epub 2021 Nov 24. PMID: 34838450.
33. Miyake R, Iwamoto K, Sakai N, Matsunae K, Aziz F, Sugai M, Takahagi S, Tanaka A, Hide M. Uptake of *Staphylococcus aureus* by keratinocytes is reduced by interferon-fibronectin pathway and filaggrin expression. *J Dermatol*. 2022 Nov;49(11):1148-1157. doi: 10.1111/1346-8138.16546. Epub 2022 Aug 19. PMID: 35983802.
34. Kennedy EA, Connolly J, Hourihane JO, Fallon PG, McLean WHI, Murray D, Jo JH, Segre JA, Kong HH, Irvine AD. Skin microbiome before development of atopic dermatitis: Early colonization with commensal staphylococci at 2 months is associated with a lower risk of atopic dermatitis at 1 year. *J Allergy Clin Immunol*. 2017 Jan;139(1):166-172. doi: 10.1016/j.jaci.2016.07.029. Epub 2016 Sep 5. PMID: 27609659; PMCID: PMC5207796.
35. Reiger M, Traidl-Hoffmann C, Neumann AU. The skin microbiome as a clinical biomarker in atopic eczema: Promises, navigation, and pitfalls. *J Allergy Clin Immunol*. 2020 Jan;145(1):93-96. doi: 10.1016/j.jaci.2019.11.004. PMID: 31910987.

36. Kong HH. Sharing is caring? Skin microbiome insights into staphylococci in patients with atopic dermatitis and caregivers. *J Allergy Clin Immunol.* 2022 Oct;150(4):793-795. doi: 10.1016/j.jaci.2022.07.010. Epub 2022 Aug 2. PMID: 35931225; PMCID: PMC9930850.
37. Chia M, Naim ANM, Tay ASL, Lim K, Chew KL, Yow SJ, Chen J, Common JEA, Nagarajan N, Tham EH. Shared signatures and divergence in skin microbiomes of children with atopic dermatitis and their caregivers. *J Allergy Clin Immunol.* 2022 Oct;150(4):894-908. doi: 10.1016/j.jaci.2022.01.031. Epub 2022 Mar 19. PMID: 35318044.
38. He H, Olesen CM, Pavel AB, Clausen ML, Wu J, Estrada Y, Zhang N, Agner T, Guttman-Yassky E. Tape-Strip Proteomic Profiling of Atopic Dermatitis on Dupilumab Identifies Minimally Invasive Biomarkers. *Front Immunol.* 2020 Aug 6;11:1768. doi: 10.3389/fimmu.2020.01768. PMID: 32849633; PMCID: PMC7423990.
39. Guéniche A, Dahel K, Bastien P, Martin R, Nicolas JF, Breton L. *Vitreoscilla filiformis* bacterial extract to improve the efficacy of emollient used in atopic dermatitis symptoms. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2008 Jun;22(6):746-7. doi: 10.1111/j.1468-3083.2007.02428.x. PMID: 18482031.
40. Blanchet-Réthoré S, Bourdès V, Mercenier A, Haddar CH, Verhoeven PO, Andres P. Effect of a lotion containing the heat-treated probiotic strain *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 on *Staphylococcus aureus* colonization in atopic dermatitis. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2017 Jul 3;10:249-257. doi: 10.2147/CCID.S135529. PMID: 28721083; PMCID: PMC5501445.
41. Deleuran M, Georgescu V, Jean-Decoster C. An Emollient Containing *Aquaphilus dolomiae* Extract is Effective in the Management of Xerosis and Pruritus: An International, Real-World Study. *Dermatol Ther (Heidelb).* 2020 Oct;10(5):1013-1029. doi: 10.1007/s13555-020-00415-6. Epub 2020 Jul 14. PMID: 32666271; PMCID: PMC7477020.
42. Myles IA, Earland NJ, Anderson ED, Moore IN, Kieh MD, Williams KW, Saleem A, Fontecilla NM, Welch PA, Darnell DA, Barnhart LA, Sun AA, Uzel G, Datta SK. First-in-human topical microbiome transplantation with *Roseomonas mucosa* for atopic dermatitis. *JCI Insight.* 2018 May 3;3(9):e120608. doi: 10.1172/jci.insight.120608. PMID: 29720571; PMCID: PMC6012572.
43. Nakatsuji T, Hata TR, Tong Y, Cheng JY, Shafiq F, Butcher AM, Salem SS, Brinton SL, Rudman Spergel AK, Johnson K, Jepson B, Calatroni A, David G, Ramirez-Gama M, Taylor P, Leung DYM, Gallo RL. Development of a human skin commensal microbe for bacteriotherapy of atopic dermatitis and use in a phase 1 randomized clinical trial. *Nat Med.* 2021 Apr;27(4):700-709. doi: 10.1038/s41591-021-01256-2. Epub 2021 Feb 22. PMID: 33619370; PMCID: PMC8052297.
44. Konemann EW, Allen SD, Dowell VR, Sommer HM. Introdução à microbiologia médica. In: *Diagnóstico microbiológico: texto e Atlas colorido.* 5th ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.
45. Plumet L, Ahmad-Mansour N, Dunyach-Remy C, Kissa K, Sotto A, Lavigne JP, Costechareyre D, Molle V. Bacteriophage Therapy for *Staphylococcus Aureus* Infections: A Review of Animal Models, Treatments, and Clinical Trials. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022 Jun 17;12:907314. doi: 10.3389/fcimb.2022.907314. PMID: 35782148; PMCID: PMC9247187
46. Lipnarski C, d'Azevedo PA, Quinto VP, Bessa G, Bonamigo RR. Colonization by *S. aureus* increases the EASI and the number of appointments by patients with atopic dermatitis: cohort with 93 patients. *AnBrasDermatol.* 2013;88(4):518-21.
47. Totté JE, van der Feltz WT, Bode LG, van Belkum A, van Zuuren EJ, Pasmans SG. A systematic review and meta-analysis on *Staphylococcus aureus* carriage in psoriasis, acne and rosacea. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2016 Jul;35(7):1069-77. doi: 10.1007/s10096-016-2647-3. Epub 2016 May 5. PMID: 27151386; PMCID: PMC4902839.
48. Park HY, Kim CR, Huh IS, Jung MY, Seo EY, Park JH, Lee DY, Yang JM. *Staphylococcus aureus* Colonization in Acute and Chronic Skin Lesions of Patients with Atopic Dermatitis. *Ann Dermatol.* 2013 Nov;25(4):410-6. doi: 10.5021/ad.2013.25.4.410. Epub 2013 Nov 30. PMID: 24371386; PMCID: PMC3870207.

49. Vanessa Teixeira Pereira. Perfil de colonização de *S. aureus* em pacientes com dermatite atópica nas lesões agudas e crônicas. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Orientadora: Ana Paula Beltran Moschione Castro.
50. Niebuhr M, Scharonow H, Gathmann M, Mamerow D, Werfel T. Staphylococcal exotoxins are strong inducers of IL-22: A potential role in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Dec;126(6):1176-83.e4. doi: 10.1016/j.jaci.2010.07.041. PMID: 20864149.
51. Seiti Yamada Yoshikawa F, Feitosa de Lima J, Notomi Sato M, Álefe Leuzzi Ramos Y, Aoki V, Leao Orfali R. Exploring the Role of *Staphylococcus aureus* Toxins in Atopic Dermatitis. *Toxins (Basel)*. 2019 Jun 5;11(6):321. doi: 10.3390/toxins11060321. PMID: 31195639; PMCID: PMC6628437.
52. Kim J, Kim BE, Ahn K, Leung DYM. Interactions Between Atopic Dermatitis and *Staphylococcus aureus* Infection: Clinical Implications. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2019 Sep;11(5):593-603. doi: 10.4168/aaair.2019.11.5.593. PMID: 31332972; PMCID: PMC6658404.
53. Geoghegan JA, Irvine AD, Foster TJ. *Staphylococcus aureus* and Atopic Dermatitis: A Complex and Evolving Relationship. *Trends Microbiol*. 2018 Jun;26(6):484-497. doi: 10.1016/j.tim.2017.11.008. Epub 2017 Dec 9. PMID: 29233606.
54. Lacey KA, Geoghegan JA, McLoughlin RM. The Role of *Staphylococcus aureus* Virulence Factors in Skin Infection and Their Potential as Vaccine Antigens. *Pathogens*. 2016 Feb 17;5(1):22. doi: 10.3390/pathogens5010022. PMID: 26901227; PMCID: PMC4810143.
55. Nomura I, Tanaka K, Tomita H, Katsunuma T, Ohya Y, Ikeda N, Takeda T, Saito H, Akasawa A. Evaluation of the staphylococcal exotoxins and their specific IgE in childhood atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 1999 Aug;104(2 Pt 1):441-6. doi: 10.1016/s0091-6749(99)70390-8. PMID: 10452768.
56. Ong PY, Leung DY. The infectious aspects of atopic dermatitis. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2010;30(3):309-21.
57. Boguniewicz M, Leung DY. Recent insights into atopic dermatitis and implications for management of infectious complications. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(1):4-13.
58. Hong SW, Kim MR, Lee EY, Kim JH, Kim YS, Jeon SG, Yang JM, Lee BJ, Pyun BY, Gho YS, Kim YK. Extracellular vesicles derived from *Staphylococcus aureus* induce atopic dermatitis-like skin inflammation. *Allergy*. 2011 Mar;66(3):351-9. doi: 10.1111/j.1398-9995.2010.02483.x. Epub 2010 Sep 9. PMID: 20831718; PMCID: PMC3052535.
59. Tauber M, Balica S, Hsu CY, Jean-Decoster C, Lauze C, Redoules D, Viodé C, Schmitt AM, Serre G, Simon M, Paul CF. *Staphylococcus aureus* density on lesional and nonlesional skin is strongly associated with disease severity in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2016 Apr;137(4):1272-1274.e3. doi: 10.1016/j.jaci.2015.07.052. Epub 2015 Nov 11. PMID: 26559326
60. Huang JT, Abrams M, Tloutan B, Rademaker A, Paller AS. Treatment of *Staphylococcus aureus* Colonization in Atopic Dermatitis Decreases. *Pediatrics*. 2009;123(5):e808-14
61. Hwang J, Thompson A, Jaros J, Blackcloud P, Hsiao J, Shi VY. Updated understanding of *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis: From virulence factors to commensals and clonal complexes. *Exp Dermatol*. 2021 Oct;30(10):1532-1545. doi: 10.1111/exd.14435. Epub 2021 Jul 30. PMID: 34293242
62. Xing SY, Wei LQ, Abushelaibi A, Lai KS, Lim SHE, Maran S. Current molecular approach for diagnosis of MRSA: a meta-narrative review. *Drug Target Insights*. 2022 Dec 31;16:88-96. doi: 10.33393/dti.2022.2522. PMID: 36761068; PMCID: PMC9906022.
63. Cavalcante FS, Abad ED, Lyra YC, Saintive SB, Ribeiro M, Ferreira DC, Santos KR. 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*. 2015;48(7):588-94.
64. Cavalcante FS, Saintive S, Carvalho Ferreira D, Rocha Silva AB, Guimarães LC, Braga BS, Dios Abad E, Ribeiro M, Netto Dos Santos KR. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from infected skin lesions present several virulence

- genes and are associated with the CC30 in Brazilian children with atopic dermatitis. *Virulence*. 2021 Dec;12(1):260-269. doi: 10.1080/21505594.2020.1869484. PMID: 33356835; PMCID: PMC7808431.
65. Hon KL, Leung AK, Kong AY, Leung TF, Ip M. Atopic dermatitis complicated by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *J Natl Med Assoc*. 2008;100(7):797-800.
 66. Petry V, Lipnharski C, Bessa GR, Silveira VB, Weber MB, Bonamigo RR, d'Azevedo PA. Prevalence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and antibiotic resistance in patients with atopic dermatitis in Porto Alegre, Brazil. *Int J Dermatol*. 2014;53(6):731-5.
 67. Gesualdo F, Bongiorno D, Rizzo C, Bella A, Menichella D, Stefani S, Tozzi AE. MRSA Nasal Colonization in Children: Prevalence Meta-analysis, Review of Risk Factors and Molecular Genetics. *Pediatr Infect Dis J*. 2013;32(5):479-85.
 68. Suh L, Coffin S, Leckerman KH, Gelfand JM, Honig PJ, Yan AC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in children with atopic dermatitis. *Pediatr Dermatol*. 2008;25:528-34.
 69. Gong JQ, Lin L, Lin T, Hao F, Zeng FQ, Bi ZG, Yi D, Zhao B. Skin colonization by *Staphylococcus aureus* in patients with eczema and atopic dermatitis and relevant combined topical therapy: a double-blind multicentre randomized controlled trial. *Br J Dermatol*. 2006;155(4):680-7.
 70. Bath-Hextall FJ, Birnie AJ, Ravenscroft JC, Williams HC. Interventions to reduce *Staphylococcus aureus* in the management of atopic eczema: an updated Cochrane review. *Br J Dermatol*. 2010 Jul;163(1):12-26. doi: 10.1111/j.1365-2133.2010.09743.x. Epub 2010 Mar 5. PMID: 20222931.
 71. Masiuk H, Wcislek A, Jursa-Kulesza J. Determination of nasal carriage and skin colonization, antimicrobial susceptibility and genetic relatedness of *Staphylococcus aureus* isolated from patients with atopic dermatitis in Szczecin, Poland. *BMC Infect Dis*. 2021 Jul 23;21(1):701. doi: 10.1186/s12879-021-06382-3. PMID: 34294061; PMCID: PMC8299601.
 72. Carvalho SLC, Boguchewski AP, Nascimento FLS, Dalmas LM, Carvalho VO. Impacto da dermatite atópica na qualidade de vida da família. *Arq Asma Alerg Imunol*. 2017;1(3):305-310
 73. Santos P et al. Qualidade de vida em crianças e adolescentes com dermatite atópica e seus cuidadores. *Rev Port de Imunoalerg*, 2021 (SPAIC).
 74. Lewis-Jones MS, Finlay AY, Dykes PJ. Measurement of the impact of atopic dermatitis on infant's and their families lives. *Br J of Dermatol*. 1999;141(55):105-6.
 75. Lawson V, Lewis-Jones M S, Finlay A Y, Reid P, Owens RG. The family impact of childhood atopic dermatitis: the Dermatitis Family Impact questionnaire. *Br J Dermatol*. 1998;138:107-13.
 76. El Achkar Mello ME, Simoni AG, Rupp ML, de Azevedo Simões PWT, de Souza Pires MM. Quality of life of pediatric patients with atopic dermatitis and their caregivers. *Arch Dermatol Res*. 2023 Feb 1. doi: 10.1007/s00403-023-02544-2. Epub ahead of print. PMID: 36723680.
 77. Alvarenga TMN, Caldeira AP. Quality of life in pediatric patients with atopic dermatitis. *Jornal de Pediatria*, 2009.
 78. Su JC, Kemp AS, Varigos GA, Nolan TM. Atopic eczema: its impact on the family and financial cost. *Arch Dis Child*. 1997 Feb;76(2):159-62. doi: 10.1136/adsc.76.2.159. PMID: 9068310; PMCID: PMC1717083.
 79. Campos ALB, Araújo FM, Santos MALD, Santos AASD, Pires CAA. IMPACT OF ATOPIC DERMATITIS ON THE QUALITY OF LIFE OF PEDIATRIC PATIENTS AND THEIR GUARDIANS. *Rev Paul Pediatr*. 2017 Jan-Mar;35(1):5-10. doi: 10.1590/1984-0462/2017;35;1;00006. Epub 2017 Feb 20. PMID: 28977306; PMCID: PMC5417799.
 80. Severity Scoring of atopic dermatitis: the SCORAD index. Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis. *Dermatology*. 1993;186:23-31.
 81. KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR.; W. C. W. *Diagnóstico microbiológico*. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. 1465 p.

82. Martineau F, Picard FJ, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(3): 618–23.
83. Martineau F, Picard FJ, Ke D, Paradis S, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Species-specific and ubiquitous DNA-based assays for rapid identification *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Microbiol.* 1996; 34:2888-2893.
84. Murakami K, Minamide W, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1991;29(10):2240-4.
85. HALLANDER HO. PRODUCTION OF LARGE QUANTITIES OF ENTEROTOXIN B AND OTHER STAPHYLOCOCCAL TOXINS ON SOLID MEDIA. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1965;63:299-305. doi: 10.1111/apm.1965.63.2.299. PMID: 14295449.
86. Shingaki, M.H. et al. Study on reversed passive latex agglutination for the detection of staphylococcal enterotoxins A-C. *Annu. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. Publ. Hlth.*,v.32, p.128-31, 1981.
87. Gungör D, Nadaud P, LaPergola CC, Dreibelbis C, Wong YP, Terry N, Abrams SA, Beker L, Jacobovits T, Järvinen KM, Nommsen-Rivers LA, O'Brien KO, Oken E, Pérez-Escamilla R, Ziegler EE, Spahn JM. Infant milk-feeding practices and food allergies, allergic rhinitis, atopic dermatitis, and asthma throughout the life span: a systematic review. *Am J Clin Nutr.* 2019 Mar 1;109(Suppl_7):772S-799S. doi: 10.1093/ajcn/nqy283. Erratum in: *Am J Clin Nutr.* 2019 Oct 1;110(4):1041. PMID: 30982870; PMCID: PMC6500928.
88. Braga ED, Aguiar-Alves F, de Freitas Mde F, de e Silva MO, Correa TV, Snyder RE, de Araújo VA, Marlow MA, Riley LW, Setúbal S, Silva LE, Araújo Cardoso CA. High prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* colonization among healthy children attending public daycare centers in informal settlements in a large urban center in Brazil. *BMC Infect Dis.* 2014 Oct 6;14:538. doi: 10.1186/1471-2334-14-538. PMID: 25287855; PMCID: PMC4287590.
89. Gomes PL, Malavige GN, Fernando N, Mahendra MH, Kamaladasa SD, Seneviratne JK, Karunatilaka DH, Ogg GS. Characteristics of *Staphylococcus aureus* colonization in patients with atopic dermatitis in Sri Lanka. *Clin Exp Dermatol.* 2011 Mar;36(2):195-200. doi: 10.1111/j.1365-2230.2010.03962.x. Epub 2010 Nov 10. PMID: 21070340.
90. Yeung M, Balma-Mena A, Shear N, Simor A, Pope E, Walsh S, McGavin MJ. Identification of major clonal complexes and toxin producing strains among *Staphylococcus aureus* associated with atopic dermatitis. *MicrobesInfect.* 2011;13(2):189-97.
91. Pires FV, da Cunha Mde L, Abraão LM, Martins PY, Camargo CH, Fortaleza CM. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in Botucatu, Brazil: a population-based survey. *PLoS One.* 2014 Mar 24;9(3):e92537. doi: 10.1371/journal.pone.0092537. PMID: 24663818; PMCID: PMC3963891
92. Bunikowski R, Mielke ME, Skarabis H, Worm M, Anagnostopoulos I, Kolde G, Wahn U, Renz H. Evidence for a disease-promoting effect of *Staphylococcus aureus*-derived exotoxins in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2000 Apr;105(4):814-9. doi: 10.1067/mai.2000.105528. PMID: 10756234.

APÊNDICES

I. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)
(menores de 18 anos)
Resolução 466/2012

Convido o (a) senhor (a),
_____, responsável pelo
paciente: _____,

a participar da minha tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação de Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp intitulado **“Relação entre a colonização por *Staphylococcus* spp. e dermatite atópica: perfil de virulência e sua influência na gravidade da doença”**. A pesquisa será desenvolvida por mim, Luís Felipe Ramos Berbel Angulski, médico especialista em Alergia e Imunologia Clínica e Pediatria, sob orientação da professora Dra Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha, do Departamento de Ciências Químicas e Biológicas - Setor de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da Unesp, em Botucatu-SP.

Sabemos que a dermatite atópica é a doença alérgica na pele mais comum, sendo que a maior parte dos casos iniciam na infância, cerca de 60% já no primeiro ano de vida. Ela é uma doença bastante complexa e vários fatores estão envolvidos na sua origem. Um destes fatores é a influência da colonização da pele por espécies de bactérias do gênero *Staphylococcus*, predominando espécies de *S. aureus*.

O objetivo da nossa pesquisa é estudar o papel destas espécies de bactérias na dermatite atópica, além de tentar identificar uma relação entre a produção de toxinas específicas por elas e a gravidade da doença. Será aplicado inicialmente um questionário com perguntas relacionadas a presença de outras doenças alérgicas e antecedentes familiares, seguida de um exame físico realizado por mim, para classificar a gravidade da Dermatite Atópica. Também serão realizados testes de avaliação de resistência aos antibióticos destas bactérias. Para isto, realizaremos a coleta de amostras com uma espécie de cotonete (swab), em áreas específicas do corpo do paciente, como narinas, axilas, períneo e das próprias lesões da dermatite atópica. O procedimento é indolor e não apresenta riscos para saúde e integridade da criança.

Realizaremos também um teste alérgico nos pacientes, denominado Teste de Puntura, o qual consiste em pingar uma gota de cada extrato padronizado no antebraço do paciente, seguida de uma puntura leve superficial na pele e leitura do teste em 15 minutos. Caso o paciente reaja aquele determinado extrato, forma-se no local da picada uma “bolinha” avermelhada que é medida em milímetros. Testaremos extratos padronizados dos principais aeroalérgenos (ácaros da poeira, pelo de cão e de gato, fungos do ar e baratas) e alimentos (leite de vaca, ovo de galinha, soja, trigo, milho, amendoim, castanhas e camarão). Os testes realizados não terão nenhum custo para o paciente, provocando leve coceira na pele, por cerca de 30 minutos. Não há nenhum risco adicional à saúde e integridade dos participantes.

Esperamos que nosso trabalho ajude a compreender melhor a relação entre as bactérias do gênero *Staphylococcus* e a gravidade da dermatite atópica na criança e

adolescente, tendo em vista que existem no Brasil poucos estudos publicados semelhantes ao nosso. Reforçamos que os pacientes poderão ser encaminhados para a especialidade de Alergia e Imunologia Pediátrica, caso ainda não realizem o seguimento com a especialidade, através do agendamento direto de consultas no setor.

Fique ciente que a sua participação no estudo é totalmente voluntária e que mesmo após assinar este termo de consentimento aceitando participar da pesquisa, você pode decidir em desistir da participação, sem qualquer prejuízo no seu tratamento e seguimento médico. Os custos necessários ao transporte ao HC-FMB ficam sob responsabilidade do responsável do paciente, não havendo nenhum tipo de ressarcimento pelos pesquisadores. Não será ofertado nenhum tipo de pagamento para a participação na pesquisa.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será elaborado em 2 vias de igual teor, o qual 01 via será entregue ao senhor (a) devidamente rubricada, e a outra via será arquivada e mantida pelos pesquisadores por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Qualquer dúvida adicional você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa através dos telefones (14) 3880-1608 ou 3880-1609 que funciona de 2ª a 6ª feira das 8.00 às 11.30 e das 14.00 às 17horas, na Chácara Butignolli s/nº em Rubião Júnior – Botucatu - São Paulo. Os dados de localização dos pesquisadores estão abaixo descrito:

Após terem sido sanadas todas minhas dúvidas a respeito deste estudo, CONCORDO EM PARTICIPAR de forma voluntária, estando ciente que todos os meus dados estarão resguardados através do sigilo que os pesquisadores se comprometeram. Estou ciente que os resultados desse estudo poderão ser publicados em revistas científicas, sem no entanto, que minha identidade seja revelada.

Botucatu, ____ / ____ / ____

Participantes do Estudo:

Luís Felipe Ramos Berbel Angulski – alergiabotucatu@gmail.com

Endereço: Rua Genetal Telles, 1509. Centro. Botucatu-SP CEP 18602-120

Telefone: (14) 3811-6080 / 99113-8213

Profa. Dra. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha - cunhamlr@ibb.unesp.br

Endereço: Departamento de Ciências Químicas e Biológicas – Setor de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências – Unesp – Botucatu

Telefone: (14) 3880-0428

Qualquer dúvida adicional, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, através dos fones: (14) 3880-1608/3880-1609. Endereço: na Chácara Butignolli s/nº em Rubião Júnior – Botucatu - São Paulo. Horário de funcionamento: de 2ª a 6ª feira das 8:00 às 12.00 e das 13.30 às 17horas

**II. TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TALE)
RESOLUÇÃO 466/2012
(Para menores de 18 anos)**

CONVIDO, você, _____ para participar do Projeto de Pesquisa intitulado “Relação entre a colonização por *Staphylococcus spp.* e dermatite atópica: perfil de virulência e sua influência na gravidade da doença”, que será desenvolvido por mim, Luís Felipe Ramos Berbel Angulski, médico especialista em Alergia/Imunologia e Pediatria, com orientação da professora Dra. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha (docente do Departamento de Ciências Químicas e Biológicas – Setor de Microbiologia e Imunologia).

Caso concorde em participar da pesquisa você deverá assinar este Termo de Assentimento e seu Representante Legal assinará o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participantes de pesquisa menores de 18 anos.

O nosso trabalho será com pacientes com Dermatite Atópica. Será realizada coleta de amostra de bactérias da pele dos participantes, através de um swab (semelhante a um cotonete), sob a superfície das lesões, além de narinas e axilas. Além disso, realizaremos um teste alérgico de punção no antebraço, para verificar a provável alergia aos ácaros, pêlos de cão e gato, fungos, baratas e alguns alimentos (leite de vaca, ovo de galinha, soja, trigo, amendoim, castanhas, camarão e milho).

Solicito também seu consentimento para levantar seu prontuário médico para coletar informações lá contidas como referentes às suas consultas realizadas anteriormente. Também será realizado um questionário sobre algumas questões relacionadas as doenças alérgicas, com duração de alguns minutos.

O benefício que você terá em participar será em contribuir para os estudos da Dermatite Atópica e sua relação com a Microbiota Cutânea (influência das bactérias da pele sobre a evolução da doença). Você também poderá verificar quais são os fatores que podem estar auxiliando na piora da sua doença, como a exposição de ácaros ou algum alimento.

Fique ciente, que a participação neste estudo é voluntária e que mesmo após ter dado consentimento para participar da pesquisa, você poderá retirar a qualquer momento, sem qualquer prejuízo na continuidade do tratamento, ou qualquer outra atividade em que você esteja participando.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será elaborado em 2 vias de igual teor, o qual 01 via será entregue a você devidamente rubricada, e a outra via será arquivada e mantida pelos pesquisadores por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Qualquer dúvida adicional você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa através dos telefones (14) 3880-1608 ou 3880-1609 que funciona de 2ª a 6ª feira das 8.00 às 12.00 e das 13.30 às 17horas, na Chácara Butignolli s/nº em Rubião Júnior – Botucatu - São Paulo. Os dados de localização dos pesquisadores estão abaixo descritos:

Após terem sido sanadas todas minhas dúvidas a respeito deste estudo, CONCORDO em participar de forma voluntária, estando ciente que todos os meus dados estarão resguardados através do sigilo que os pesquisadores se comprometeram. Estou ciente que os resultados desse estudo poderão ser publicados e revistas científicas.

Botucatu, ____/____/_____
Pesquisador

Participante da Pesquisa

Contato dos pesquisadores:

Luís Felipe Ramos Berbel Angulski – alergiabotucatu@gmail.com

Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp (HCFMB)

Setor CRIE / NHE – Fone (14) 3811-6080

Profa. Dra. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha - cunhamlr@ibb.unesp.br

Endereço: Departamento de Ciências Químicas e Biológicas – Setor de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências – Unesp - Botucatu

Fone: (14) 3880-0428

III. FICHA DE LEVANTAMENTO DE DADOS - PACIENTES COM DERMATITE ATÓPICA (DA)

Nome: _____ RG _____

Gênero: _____ Idade: _____ Raça: _____ Fone: _____

Local de residência: _____ Número de moradores no domicílio: _____

Renda familiar mensal: _____

Início dos sintomas de DA: _____. Idade do diagnóstico de DA: _____

Antecedentes pessoais de atopia: _____

Gravidade (SCORAD): Pontuação total _____

1 - Leve

2 - Moderada

3 - Grave

Outras comorbidades:

Antecedentes familiares de atopia:

Recebeu aleitamento materno: () SIM () NÃO. Tempo de aleitamento materno total:

Recebeu fórmula de Leite de Vaca antes de 1 ano: () SIM () NÃO.

Via de parto: () PARTO VAGINAL () PARTO CESÁREA.

Exames laboratoriais:

() Dosagem de eosinófilos (hemograma)

() Dosagem sérica de IgA

() Dosagem sérica de IgG

() Dosagem sérica de IgM

() Dosagem sérica de Ig E total

Tratamentos utilizados:

() Hidratação Cutânea:

() Anti-Histamínicos VO:

() Corticóide Tópico:

() Corticóide VO:

() Inibidor de Calcineurina:

Internações no último ano:

Hospital	Data Entrada	Data Saída	Motivo

Uso de antimicrobianos no último ano

Antimicrobiano	Data início	Data fim	Motivo

Cirurgias e procedimentos invasivos no último ano

Procedimento	Data	Motivo

Outras informações de interesse:**- Fatores desencadeantes da DA (gatilhos):**

poeira/ pó doméstico mofo (fungos) alimentos suor excessivo mudança de clima alimento (especificar qual) animal (especificar qual) estresse

- Presença de animais domésticos

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
 “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
 HOSPITAL DAS CLÍNICAS – HCFMB
 FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP

IV. LAUDO DE TESTE ALÉRGICO

PRICK TEST

NOME: _____
 Idade: _____ Data de realização do teste: ____ / ____ / ____

Controle Positivo (Histamina): ____ mm
 Controle Negativo (Salina): ____ mm

EXTRATO	Resultado (mm)	EXTRATO	Resultado (mm)
Ácaro (DP)		Leite de vaca	
Ácaro (DF)		Ovo de galinha	
Ácaro (BT)		Soja	
Fungos mix		Trigo	
Baratas mix		Milho	
Epitélio de cão		Amendoim	
Epitélio de gato		Castanhas mix	
		Camarão	

DP = Dermatophagoides pteronyssinus
 DF = Dermatophagoides farinae
 BT = Blomia tropicalis
 Fungos mix = Aspergillus fumigatus, Alternaria alternaria e Penicillium notatum
 Baratas mix = Blatella germanica e Periplaneta americana
 Leite de vaca = caseína, alfa-lactoalbumina e beta-lactoglobulina
 Ovo de galinha = ovoalbumina e ovomucoide
 Castanhas mix = castanha do Pará e castanha de caju

Exame realizado pelo Dr Luís Felipe Ramos Berbel Angulski
 CRM-SP 145055 / RQE 79081 (ALERGIA E IMUNOLOGIA)
 Doutorado em Doenças Tropicais – FMB – Unesp
 alergiabotucatu@gmail.com

V. Questionário de Impacto da Dermatite Atópica na Família (DFI)

O objetivo deste questionário é medir o quanto o problema de pele do seu (sua) filho (a) tem afetado você e os membros da família durante a **última semana**. Por favor, marque apenas uma resposta em cada pergunta.

- 01) Qual o efeito provocado pela criança e seu problema de pele no trabalho de casa, por exemplo, faxina, lavar e limpar.
() muitíssimo () muito () pouco () nenhum
- 02) Qual o efeito provocado pela criança e seu problema de pele na preparação das refeições/ alimentação.
() muitíssimo () muito () pouco () nenhum
- 03) Qual o efeito provocado pela criança e seu problema de pele no sono dos outros membros da família.
() muitíssimo () muito () pouco () nenhum
- 04) Qual o efeito provocado pela criança e seu problema de pele nas atividades de lazer da família.
() muitíssimo () muito () pouco () nenhum
- 05) Qual o efeito provocado pela criança e seu problema de pele nas compras e para a família.
() muitíssimo () muito () pouco () nenhum
- 06) Qual o efeito provocado pela criança e seu problema de pele nas despesas da casa, incluindo custos com o tratamento, roupas, etc.
() muitíssimo () muito () pouco () nenhum
- 07) Qual o efeito provocado pela criança e seu problema de pele ao causar cansaço ou exaustão nos pais ou responsáveis.
() muitíssimo () muito () pouco () nenhum
- 08) Qual o efeito provocado pela criança e seu problema de pele ao causar distúrbios emocionais, tais como depressão, frustração ou culpa nos seus pais ou responsáveis.
() muitíssimo () muito () pouco () nenhum
- 09) Qual o efeito provocado pela criança e seu problema de pele nas relações entre o principal responsável/ cuidador e seu parceiro e os demais membros da família.
() muitíssimo () muito () pouco () nenhum
- 10) Qual o efeito provocado pela criança e seu problema de pele nos aspectos gerais da vida do seu principal cuidador/ responsável.
() muitíssimo () muito () pouco () nenhum

PONTUAÇÃO TOTAL: ____

VI. SCORAD

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

SLEEP LOSS (0 to 10)

10

VII. Critérios Clínicos de Hanifin e Rajka (1980)

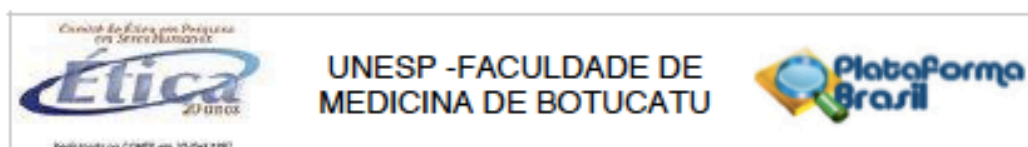
Critérios maiores (3 ou +)

1. Prurido
2. Morfologia e distribuição típica das lesões
 - Liquenificação flexural ou linearidade em adultos
 - Envolvimento facial e extensor na criança
3. Dermatite crônica e recidivante
4. História pessoal ou familiar de atopia (asma, rinite alérgica, dermatite atópica)

Critérios menores

- | | |
|--|---|
| 1. Xerose | 12. Catarata subcapsular anterior |
| 2. Ictiose, hiperlinearidade palmar, creatose pilar | 13. Escurecimento periorbital |
| 3. <i>Prick-test</i> positivo | 14. Eritema ou palidez facial |
| 4. Aumento da IgE sérica | 15. Pitíriase alba |
| 5. Tendência a infecções da pele (<i>S. aureus</i> /Herpes) | 16. Prurido com a transpiração |
| 6. Tendência à dermatite inespecífica de mãos e pés | 17. Pregas anteriores no pescoço |
| 7. Eczema de mamilo | 18. Intolerância à lã e solventes lipídicos |
| 8. Queilite | 19. Acentuação perifolicular |
| 9. Conjuntivite recorrente | 20. Intolerância alimentar |
| 10. Prega infra orbitária de Dennie-Morgan | 21. Curso influenciado por fatores ambientais e/ou emocionais |
| 11. Ceratocone | 22. Dermografismo branco |

VIII. Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Relação entre a colonização por *Staphylococcus* spp. e dermatite atópica: perfil de virulência e sua influência na gravidade da doença.

Pesquisador: Luis Felipe Ramos Berbel Angulski

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 35423920.7.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Microbiologia e Imunologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.519.478

Apresentação do Projeto:

Existem relatos na literatura sobre a relação entre dermatite atópica e colonização nasal por espécies de estafilococos. Neste estudo, os autores propõem o estudo da presença de colonização nasal por *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* em três grupos: dermatite atópica leve (70 pacientes), moderada (65 pacientes) e grave (65 pacientes). A pesquisa será feita pela coleta de swabs nasais (procedimento que causa desconforto leve, mas de baixos riscos). Os microrganismos serão estudados quanto à clonalidade e presença de genes de virulência.

O estudo será estudo prospectivo envolvendo uma amostra de pacientes com diagnóstico de dermatite atópica em seguimento no ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (Unesp), sendo respeitados os critérios de inclusão e exclusão, os responsáveis dos pacientes selecionados serão convidados a participar da pesquisa, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O perfil de sensibilização de aeroalérgenos e alimentos dos pacientes selecionados será obtido pela dosagem sérica de IgE específico ou teste de puntura de leitura imediata (pricktest), com extratos padronizados, em qualquer momento da doença. Será feita coleta de dados demográficos e clínicos, aplicação de questionários, análise de prontuários, coleta dos espécimes microbiológicos. As amostras das mucosas nasal e lesões serão coletadas simultaneamente através de swabs.

Endereço: Chácara Butignoni, s/n

Bairro: Rubião Junior

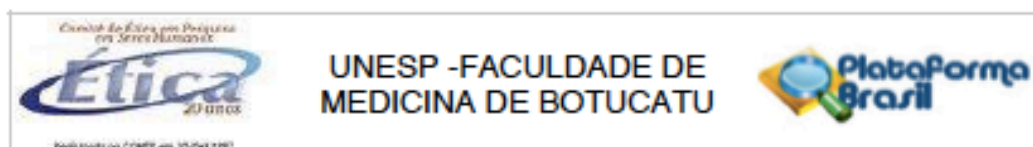
CEP: 18.618-070

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1600

E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 4.519.478

Critério de Inclusão: 1. Pacientes com idade de 0 a 18 anos completos. 2. Diagnóstico da dermatite atópica segundo os critérios de Hanfín e Rajka (1980), o qual considera doença confirmada a presença de 3 critérios clínicos maiores e 3 ou mais critérios clínicos menores. 3. Presença de dermatite atópica leve, moderada ou grave de acordo com o escore de gravidade SCORAD (Scoring atopic dermatitis), sendo considerados leves os pacientes com pontuação entre 0-15, moderada entre 15-50 e grave >50. 4. Presença de lesão aguda caracterizada por hiperemia, exsudato e prurido, sem sinais de infecção secundária. Já a lesão crônica é caracterizada pela presença de liquenificação. - **Análise estatística** Os dados dos questionários serão alimentados em banco de dados no software EPI INFO 7 (Centers for Diseases Control and Prevention, Atlanta, GA, USA) e analisados com o SPSS v. 19.0 (IBM, Armonk, NY, USA). Os desfechos de interesse serão a colonização por *S. aureus*, espécies de ECN e MRSA. Dados serão inicialmente submetidos a análise univariada, e posteriormente a modelos multivariados de regressão logística, para identificação de fatores independentemente associados aos desfechos. Também serão analisadas associações entre a colonização por isolados de *Staphylococcus* spp. carreadores de genes e produtores de fatores de virulência com a gravidade da DA. **Critério de Exclusão:** 1. Pacientes que apresentem, no momento da seleção, lesões infecciosas bacterianas secundárias, como impetigo, celulite, furúnculo, etc. 2. Uso de antibiótico sistêmico nos últimos 30 dias da coleta do material clínico. 3. Uso atual de imunossupressor sistêmico.

Total 200 participantes

Objetivo da Pesquisa:

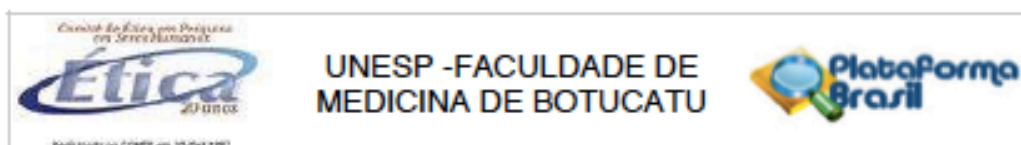
Identificar associação entre colonização estafilocócica e gravidade da dermatite atópica.

Descrever a frequência da colonização cutânea e nasal por *Staphylococcus aureus* e as principais espécies de estafilococos coagulase-negativos (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. capitis*, *S. lugdunensis* e *S. warneri*) em pacientes com dermatite atópica, nas lesões agudas e crônicas, além de identificar os genes e a expressão de toxina, as quais atuam como superantígenos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Refere apresentar risco de desconforto aos participantes de pesquisa devido a utilização de swabs para a coleta das amostras de vestibulo nasal. Os testes alérgicos cutâneos (prick test) são

Endereço: Chácara Butignoll, s/n
Bairro: Rubião Junior **CEP:** 18.618-070
UF: SP **Município:** BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1609 **E-mail:** osp@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 4.519.478

considerados não invasivos, com leve desconforto na pele, sem causar hemorragia ou complicações. Quanto aos benefícios, o trabalho poderá servir de apoio para a compreensão da epidemiologia da colonização e infecção pelos micro-organismos estudados nos pacientes com dermatite atópica. Possibilitará correlacionar a gravidade da doença com o perfil de virulência das bactérias estudadas. Os pacientes também se beneficiarão com a realização dos testes alérgicos dos principais aeroalérgenos e alimentos que possam estar envolvidos na etiopatogenia da doença, auxiliando numa melhor restrição/exposição e controle da doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de estudo relevante e factível. Conforme pareceres anteriores emitidos pelo CEP, os pesquisadores apresentaram TCLE aos participantes da Pesquisa, atendendo a Resolução 466/2012.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados documentos: folha de rosto, anuências institucionais, incluindo do HCFMB (local de execução da pesquisa), projeto completo, TALE e TCLE aos pais ou responsáveis pelos participantes.

Recomendações:

apresentar relatório final de atividades após encerramento da pesquisa.
a coleta de dados deverá ser iniciada após a aprovação do CEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após análise em REUNIÃO ORDINÁRIA, o Colegiado deliberou APROVADO o Projeto de Pesquisa.

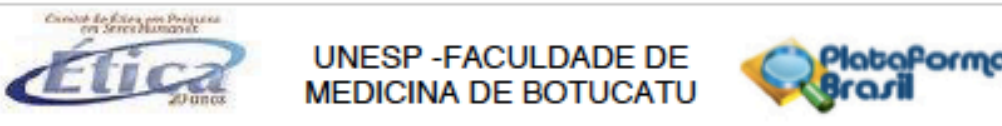
Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberação do Colegiado, em REUNIÃO ORDINÁRIA do Comitê de Ética em Pesquisa FMB/UNESP, realizada em 01/02/2021, o Projeto de Pesquisa apresentado encontra-se APROVADO. O Pesquisador deverá enviar Relatório Final de Atividades ao final da pesquisa.

Atenciosamente,

Comitê de Ética em Pesquisa FMB/UNESP

Endereço: Chácara Butignoll, s/n	CEP: 18.618-070
Bairro: Rubião Junior	
UF: SP	Município: BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1600	E-mail: csp@fmb.unesp.br



UNESP - FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

Centro de Ética em Pesquisa em Saúde Humana
20 anos
Instituído no COEP em 30/04/1990

Continuação do Parecer: 4.519.478

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1564761.pdf	14/01/2021 08:41:46		Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA_3.odt	14/01/2021 08:41:26	Luis Felipe Ramos Berbel Angulski	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_JAN2021.docx	14/01/2021 08:39:57	Luis Felipe Ramos Berbel Angulski	Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA_2.odt	09/11/2020 08:33:01	Luis Felipe Ramos Berbel Angulski	Aceito
Outros	ANUENCIA_SUPERINTENDENTE.pdf	09/11/2020 08:32:44	Luis Felipe Ramos Berbel Angulski	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEFINAL.odt	09/11/2020 08:32:25	Luis Felipe Ramos Berbel Angulski	Aceito
Outros	Carta_Resposta_2.pdf	05/11/2020 08:48:05	Luis Felipe Ramos Berbel Angulski	Aceito
Outros	ANUENCIA_KIKA.pdf	04/11/2020 12:37:37	Luis Felipe Ramos Berbel Angulski	Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA.pdf	20/08/2020 09:11:31	Luis Felipe Ramos Berbel Angulski	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE.docx	17/08/2020 15:31:17	Luis Felipe Ramos Berbel Angulski	Aceito
Outros	HCFMB.pdf	17/08/2020 15:28:41	Luis Felipe Ramos Berbel Angulski	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.odt	06/07/2020 07:38:01	Luis Felipe Ramos Berbel Angulski	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorrepositorio.pdf	06/07/2020 07:36:53	Luis Felipe Ramos Berbel Angulski	Aceito
Declaração de concordância	DECLARACAOEXTERNA.pdf	06/07/2020 07:36:07	Luis Felipe Ramos Berbel Angulski	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO2020.docx	06/07/2020 07:34:42	Luis Felipe Ramos Berbel Angulski	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.odt	06/07/2020 07:33:23	Luis Felipe Ramos Berbel Angulski	Aceito

Endereço: Chácara Butignoni, s/n

Bairro: Rubião Junior

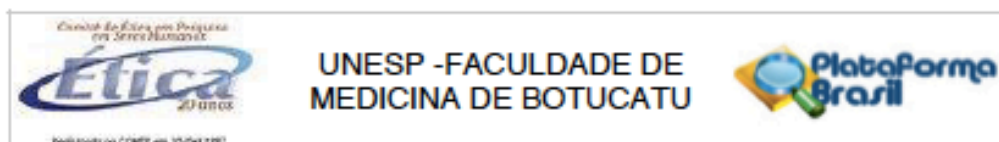
CEP: 18.618-070

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1600

E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 4.519.478

Folha de Rosto	FOLHAROSTO.pdf	06/07/2020 07:31:56	Luis Felipe Ramos Berbel Angulski	Aceito
----------------	----------------	------------------------	--------------------------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BOTUCATU, 02 de Fevereiro de 2021

Assinado por:

SILVANA ANDREA MOLINA LIMA
(Coordenador(a))

Endereço: Chácara Butignoli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-070

UF: SP Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1600

E-mail: osp@fmb.unesp.br