

# Perfil de diversidade da comunidade estafilocócica da pele em doentes com dermatite atópica

## *Diversity profile from the skin staphylococcal community on atopic dermatitis patients*

Data de receção / Received in: 31/07/2012

Data de aceitação / Accepted for publication in: 05/10/2012

Rev Port Imunoalergologia 2013; 21 (3): 187-195

Cristina Lopes<sup>1,2</sup>, José Soares<sup>3</sup>, Freni Tavaría<sup>3</sup>, Rosa Silva<sup>4</sup>, Vera Oliveira<sup>4</sup>, José Morgado<sup>4</sup>, Luís Delgado<sup>1,5</sup>, Manuela Pintado<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Serviço & Laboratório de Imunologia, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

<sup>2</sup> Unidade de Imunoalergologia, Hospital Pedro Hispano, Unidade Local de Saúde de Matosinhos

<sup>3</sup> CBQF – Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa, Porto

<sup>4</sup> Centro Tecnológico e das Indústrias Têxtil e do Vestuário de Portugal, Vila Nova de Famalicão

<sup>5</sup> CINTESIS (Center for Research in Health technologies and information systems), Universidade do Porto

Nota: Prémio SPAIC – Bial-Aristegui 2012 (2.º Prémio)

## RESUMO

**Introdução:** A dermatite atópica (DA) é uma doença cutânea crónica imunologicamente mediada em que a maioria dos doentes está colonizada por *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) capaz de produzir vários factores de virulência. O *S. aureus* pode ser cultivado em cerca de 90% das lesões cutâneas e pode colonizar a pele de aspecto morfológicamente normal. Os estafilococos coagulase negativos (SCN) geralmente não produzem toxinas com actividade superantigénica, mas o seu papel patogénico na DA não pode ser excluído. Neste estudo, pretende-se caracterizar a comunidade estafilocócica da pele de doentes com DA e indivíduos saudáveis, assim como identificar factores de virulência nas espécies identificadas. **Métodos:** Todos os isolados estafilocócicos foram submetidos a análise numérica de factores de virulência. As espécies isoladas da pele de doentes com DA e indivíduos saudáveis foram submetidas a técnicas de identificação molecular por Multiplex-PCR para identificação de bactérias pertencentes às espécies *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. hominis* e *S. haemolyticus* através de fragmentos específicos de ADN de 700, 124, 208, 806 e 271 bp, respectivamente. Identificação complementar de cada isolado, previamente identificado por Multiplex-PCR e de 22 isolados não identifi-

cados foram realizados por sequenciação do gene *sodA*. **Resultados:** Nos doentes com DA isolaram-se estirpes de *S. aureus*, com 71 (36,2%), *S. epidermidis* com 59 (30,1%) e *S. hominis* com 54 (27,6%) isolados. Foi analisada a pele de indivíduos-controlo saudáveis com prevalência para o *S. warneri* com 10 (23,8%) isolados e *S. saprophyticus* com 9 (21,4%) isolados juntamente com mais seis espécies identificadas, i.e., *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. capitis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus* e *S. lugdunensis*. A maioria das espécies de estafilococos foi coagulase negativo (158/238 isolados) e desoxirribonuclease negativos (161/238). Verificou-se maior biodiversidade na pele de indivíduos saudáveis, com 8 espécies identificadas, do que na pele de doentes com DA, com 4 espécies identificadas. **Conclusão:** Existe uma maior diversidade de espécies estafilocócicas em indivíduos saudáveis comparativamente aos doentes com DA na presente amostra. A predominância de SA na pele de doentes com DA evidencia a sua maior adaptação. A caracterização detalhada e o perfil de virulência para cada doente poderão ser úteis numa terapêutica antimicrobiana individualizada. A relação simbiótica versus antagonista entre os estafilococos comensais e SA deverá ser melhor esclarecida.

**Palavras-chave:** Dermatite atópica, estafilococos, factores de virulência.

## ABSTRACT

**Introduction:** Atopic dermatitis (AD) is a chronically inflammatory immunological mediated skin disease where the majority of patients are colonized with *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) capable of producing a quantity of virulence factors. *S. aureus* can be cultured from 90% of skin lesions and can colonize normal-appearing skin in patients with AD. Coagulase negative staphylococci (CNS) generally do not produce such toxins with superantigenic activity, but their role in AD pathogenicity should not be ruled out. Our aim was to study the staphylococcal community from skin of AD patients and normal healthy individuals without skin disruption, as well as some of the virulence factors present in these isolates. **Methods:** All staphylococcal isolates were subject to numerical analysis of some essential virulence factors. The majority of the staphylococcal species were coagulase (158/238 isolates) and deoxyribonuclease (161/238 isolates) negative. The wild strains isolated from the skin surface of healthy and AD individuals were submitted to multiplex PCR to identify the bacteria belonging to the *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. hominis* and *S. haemolyticus* species by yielding specific DNA fragments of 700, 124, 208, 806 and 271 bp, respectively. Complementary identification of each isolate previously identified by multiplex PCR and remaining 22 unidentified isolates was performed by *sodA* gene sequencing. **Results:** The staphylococcal microflora of the skin was dominated by *S. aureus* (71/196 isolates) followed by *S. epidermidis* (59/196 isolates) species in AD patients. In healthy individuals a high prevalence of *S. warneri* (9/42 isolates) followed by *S. aureus* (5/42 isolates) and *S. haemolyticus* (5/42 isolates) species was detected. High biodiversity in the skin of healthy individuals with eight staphylococcal species identified; whereas in the skin of AD patients only four species were distinguished. **Conclusion:** Our study highlighted the higher diversity of the staphylococcal community occurring in the skin of healthy individuals versus AD patients. The predominance of *S. aureus* on the skin of individuals with AD suggests high properties of adaptation of this species to the disease condition. Future perspectives include the detailed characterization of the staphylococcal community and virulence profile for each patient as a mean of tailor made therapeutic approach; the symbiotic versus antagonistic relation between commensals and pathogenic species of *Staphylococcus* should be further investigated.

**Keywords:** Atopic dermatitis, *Staphylococcus*, virulence factors.

## INTRODUÇÃO

A pele é um ecossistema complexo e dinâmico habitado por uma grande variedade de microrganismos. A barreira exercida pela pele é essencial para a sobrevivência, impedindo a perda de humidade e lesão por agentes infecciosos ou tóxicos. A pele humana possui uma microflora residente que pode diferir consideravelmente de acordo com o local do corpo humano, sendo que nenhum outro órgão tem uma microflora com uma composição tão específica como a pele<sup>1</sup>. A população principal da microflora residente consiste em espécies de *SCN*, *Propionibacterium acnes* e espécies de *Malassezia*. A estabilidade deste grupo de microrganismos é baseada num equilíbrio constante com o sistema imunológico<sup>2,3</sup>.

A dermatite atópica (DA) é uma doença cutânea inflamatória crónica imunologicamente mediada. Clinicamente caracteriza-se por surtos e remissões de lesões intensamente pruriginosas e de localização variável<sup>5</sup>. Nas últimas décadas a sua prevalência duplicou nos países industrializados<sup>6,7</sup>, acarretando custos socioeconómicos elevados.

A sua patogénese é complexa, resultando da acção de diversos factores ambientais (alergénios, agentes infecciosos) em indivíduos geneticamente predispostos. Mutações no gene que codifica a filagrina, uma proteína do citoesqueleto da queratina, estão associadas à DA, particularmente em doentes que subsequentemente desenvolvem rinite e/ou asma alérgicas<sup>8</sup>. Ao contrário da pele de indivíduos saudáveis, a pele dos doentes com DA apresenta deficiências do sistema imunológico inato, quer celular (neutrófilos, células dendríticas plasmocitoides), quer de mediadores solúveis (quimiocinas envolvidas no recrutamento de linfócitos T, péptidos antimicrobianos, entre outros)<sup>4</sup>.

Estes doentes apresentam maior predisposição para colonização e infecção por *S. aureus* (em zonas com ou sem lesão aparente) que pode exacerbar o estado da doença<sup>9</sup>. Embora tradicionalmente o *S. aureus* tenha sido considerado um colonizador normal da pele em indivíduos saudáveis, estudos recentes<sup>10</sup> parecem discordar desta

afirmação. A patogenicidade do *S. aureus* é atribuível aos potenciais factores de virulência, como: proteínas de superfície que promovem a sua colonização, factores de superfície que inibem a fagocitose por células imunitárias, exotoxinas que danificam tecidos do hospedeiro (enterotoxinas estafilocócicas A-G, toxina da síndrome do choque tóxico, exfoliatinas) e resistência inerente ou adquirida a agentes antimicrobianos<sup>11</sup>.

A topografia da pele e respectivos microambientes são determinantes importantes da estrutura da comunidade microbiana em locais específicos. A DA envolve preferencialmente a região antecubital e poplíteia – locais que abrigam grupos semelhantes de organismos mas com composições distintas no seio da comunidade microbiana residente<sup>10</sup>. Estes resultados sugerem que as comunidades microbianas podem contribuir para as predilecções de algumas patologias cutâneas em locais estereotipados. A caracterização da comunidade estafilocócica residente na pele de indivíduos com DA é fundamental para esclarecer a sua relevância na patogénese da doença. O objectivo deste trabalho foi caracterizar numa perspectiva molecular a biodiversidade da comunidade estafilocócica residente na pele e alguns factores de virulência associados em doentes com DA e sua comparação com indivíduos saudáveis.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostra populacional

Foram incluídos 6 doentes (com idades entre 5 e 35 anos) com diagnóstico médico de DA moderada a grave com lesões de DA no momento da observação mas sem evidência clínica de infecção, sem tratamento com corticóides tópicos, inibidores da calcineurina, imunossuppressores sistémicos ou antibióticos nas duas semanas prévias. Cinco dos doentes eram atópicos, sensibilizados a alergénios inalantes (ácaros e pólenes de gramíneas), três dos quais com diagnóstico prévio de asma. Um dos doentes apresentava concomitantemente alergia alimentar (anafilaxia a fru-

tos secos). Foram incluídos 21 indivíduos saudáveis (com idades entre 18 e 24 anos) sem diagnóstico prévio de doenças do foro dermatológico, rinite e asma alérgica.

### Colheita das amostras

Foram colhidas amostras da fossa poplíteia e antecubital nos dois grupos, sendo que nos doentes com DA foram recolhidas amostras em locais de lesão de DA (13 amostras). As amostras foram colhidas em dias independentes e transportadas imediatamente para o laboratório sob refrigeração. No dia de recolha das amostras não foi requerido aos indivíduos analisados nenhuma preparação prévia da pele. A superfície total de pele amostrada em cada zona foi de 25 cm<sup>2</sup> utilizando a técnica da zaragatoa. As amostras recolhidas foram inoculadas em Baird Parker Medium (Lab M, Lancashire, Reino Unido) a 37 °C durante 24 a 48 horas.

### Estirpes de referência

As estirpes de referência utilizadas na Multiplex-PCR foram: *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 14990, *S. capitis* subsp. *capitis* ATCC 27840, *S. hominis* subsp. *hominis* ATCC 27844 e *S. haemolyticus* ATCC 29970. Os con-

trols positivos utilizados na detecção dos genes produtores de toxinas, a partir de estirpes referência de *S. aureus* foram: R5371/00 (SEA, SEG, SEH, SEI, SEM, SEN, SEO, SEU e TSST-1), R5460/00 (SEB, SEG, SEH, SEM, SEN, SEO, SEU e TSST-1), FRI 472 (SED, SEG, SEJ, SEM, SEN, SEO e SER), 3169 (SEC, SED, SEJ, SEL, SEO, SER e TSST-1) e FRI 913 (SEA, SEC, SEE, SEL, SEK, SEQ e TSST-1) fornecidas gentilmente pelo Prof. Løvseth (Secção de Alimentação e Microbiologia de Alimentos, Veterinária Nacional Institute, Ullevålsveien, Oslo, Noruega).

### Identificação molecular

Multiplex-PCR: A colecção dos isolados totais foi submetida à tecnologia de Multiplex-PCR. O ADN celular foi isolado pelo método da guanidina-isotiocianato como descrito<sup>11</sup>. O processo de amplificação foi efectuado num termociclador Techne TC-512 (Cambridge, Reino Unido) usando um volume total de reacção de 25 µL contendo 4 µL de ADN (50 ng/µL), 2,5 µL de uma mistura de 5 *primers* (0,5 µM cada *primer*), 12,5 µL da NZYTaq 2x Green Master Mix e 6 µL de água estéril. Os *primers* utilizados na reacção de Multiplex e os produtos de amplificação obtidos estão descritos no Quadro 1. As condições de ampli-

**Quadro 1.** Sequências de oligonucleótidos usadas na reacção de Multiplex-PCR

Primer	Sequência de oligonucleótidos (5'-3')	Espécie alvo	Produto (bp)	Referência
femF	ACAGCTAAAGAGTTTGGTGCCT <sub>xxxxx</sub> GATAGCATGC	<i>S. aureus</i>	723	Mehrotra et al., 2000
femR	TTCATCAAAGTTGATATACGCTAAAGGT <sub>xxxxx</sub> CACACGGTC			
staEp1	ATCAAAAAGTTGGCGAACCTTTTCA	<i>S. epidermidis</i>	124	Martineau et al., 1996
staEp2	CAAAAGAGCGTGGAGAAAAGTATCA			
staCap1	GCTAATTTAGATAGCGTACCTTCA	<i>S. capitis</i>	208	Iwase et al., 2007
staCap2	CAGATCCAAAGCGTGCA			
staHom1	TGCCATATAGTCATTTACG	<i>S. hominis</i>	866	Vannuffel et al., 1999
staHom2	GTTCTAATTGAAGTTGTGTTG			
staHaem1	GGTCGCTTAGTCGGAACAAT	<i>S. haemolyticus</i>	271	Schuenck et al., 2008
staHaem2	CACGAGCAATCTCATCACCT			

ficação foram: desnaturação inicial à temperatura de 94 °C durante 2 minutos e 30 segundos, seguido de 35 ciclos de amplificação a 94°C durante 1 minuto, 50°C durante 1 minuto e 15 segundos e 72°C durante 1 minuto, ao que se seguiu uma extensão final a 72°C durante 5 minutos. Os produtos PCR resultantes foram analisados por electroforese em gel de agarose a 2%.

**Sequenciação do gene *sodA*:** Os isolados não identificados por Multiplex foram identificados por sequenciação parcial do gene *sodA*, como descrito<sup>12</sup>.

### Factores de virulência

**Testes fenotípicos:** O teste da coagulase foi realizado por inoculação de cada isolado em 0,5 mL de plasma de coelho (Biomérieux, Marcy-l'Etoile, França) e incubação a 37°C com leitura de coagulação a 30 minutos e 24 horas. A enzima desoxirribonuclease (DNase) foi detectada em meio gelose DNase (Pronadisa, Madrid, Espanha) com incubação a 37°C durante 24 horas. De forma a determinar o tipo de hemólise, inoculou-se cada estirpe em meio gelose sangue de carneiro (Biomérieux) e as placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas.

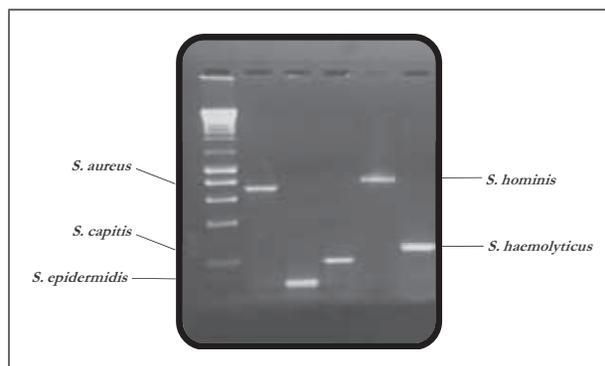
**Deteção de enterotoxinas por Multiplex-PCR:** os primers usados para as enterotoxinas e a toxina da síndrome do choque tóxico e as condições do Multiplex-PCR foram preparados como descrito em Hwang *et al.*<sup>5</sup>.

## RESULTADOS

### Identificação molecular

Após isolamento das estirpes das placas de Baird Parker Medium foram obtidos uma colecção total de 238 isolados, dos quais 196 e 42 foram provenientes de indivíduos com DA e indivíduos saudáveis, respectivamente.

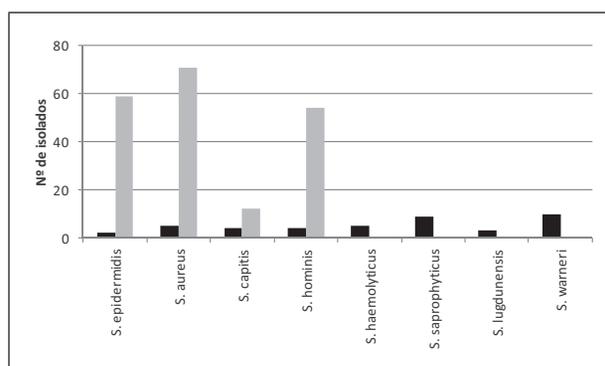
A colecção dos isolados totais foi avaliada por tecnologia de Multiplex-PCR (Figura 1). A identificação molecular baseou-se na amplificação de sequências específicas para as espécies-alvo: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. hominis* e *S. haemolyticus*, resultando em produtos PCR de



**Figura 1.** Resultado da amplificação por Multiplex-PCR com primers específicos para estirpes de referência de *S.aureus*, *S. capitis*, *S. epidermidis*, *S. hominis* e *S. haemolyticus*

723 bp, 124 bp, 208 bp, 866 bp e 271 bp, respectivamente. Todos os primers amplificaram com sucesso os genes-alvo na reacção de PCR sem produção de bandas inespecíficas. A tecnologia de Multiplex implementada permitiu identificar 216 (90,7%) dos isolados totais. Os restantes isolados (n=22) foram identificados por sequenciação parcial do gene *sodA*.

O padrão total de identificação das estirpes isoladas está descrito na Figura 2. As estirpes prevalentes em doentes com DA foram o *S. aureus*, com 71 (36,2%) isolados, seguido por *S. epidermidis* com 59 (30,1%) e *S. hominis* com 54 (27,6%).



**Figura 2.** Padrão de identificação dos isolados totais provenientes da pele de indivíduos com DA (■) e de indivíduos-controlo saudáveis (■)

Em indivíduos saudáveis foi encontrado uma maior biodiversidade de espécies com um total de 8 espécies identificadas. *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. capitis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. lugdunensis* e *S. warneri* (Figura 2). Dessas espécies, as mais prevalentes foram o *S. warneri* com 10 (23,8%) e o *S. saprophyticus* com 9 (21,4%) isolados.

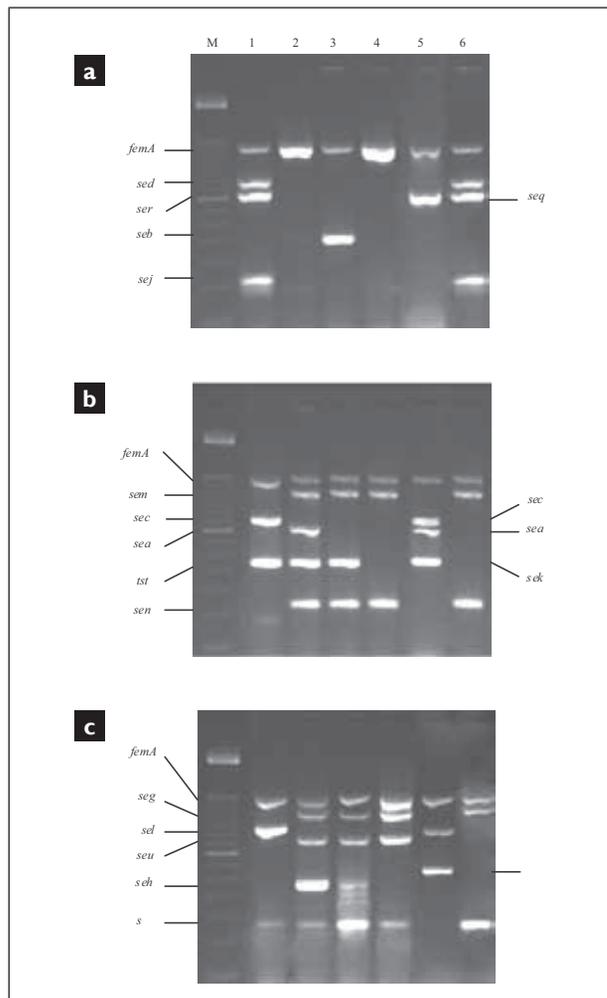
Na DA nota-se uma redução da heterogeneidade no número de espécies identificadas (n=4) e paralelamente um aumento significativo na proporção de cada uma das espécies identificadas.

### Factores de virulência

**Detecção das enterotoxinas:** Foi utilizado um ensaio de Multiplex-PCR (Figura 3) que permitiu a detecção dos 19 genes que codificam as enterotoxinas estafilocócicas (SEA-SEE, SEG-SER e SEU) e a toxina da síndrome do choque tóxico<sup>5</sup>.

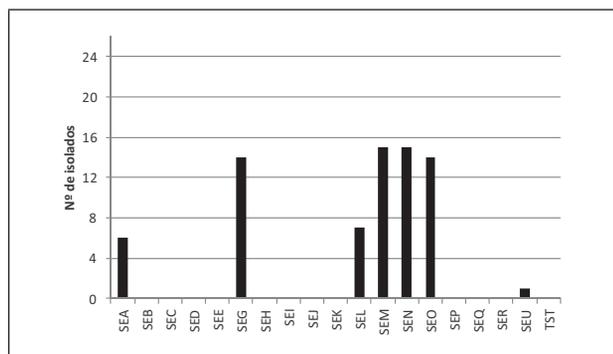
Os resultados da detecção dos genes das enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico estão apresentados na Figura 4. Na detecção dos genes produtores de toxinas foram avaliados 21 dos isolados provenientes de doentes com DA e identificados com *S. aureus*. Foram encontradas 7 enterotoxinas diferentes nos 21 isolados. Em 76% (16/21) dos isolados foi detectada a presença de pelo menos um gene produtor de enterotoxina. As toxinas encontradas com maior frequência foram a SEG (14/21), SEM (15/21), SEN (15/21) e SEO (14/21), sempre encontradas juntas no mesmo isolado, com excepção de uma única estirpe. Neste estudo, foram ainda detectadas, mas com uma taxa menor de incidência, a SEA (6/21), SEL (7/21) e SEU (1/21). De acordo com o seu perfil genético, foram encontrados 7 genótipos com combinações diferentes de enterotoxinas (resultados não apresentados).

**Testes fenotípicos:** Incluíram a detecção da actividade de coagulase e DNase, assim como a avaliação da actividade hemolítica em placa de gelose sangue. A grande maioria dos isolados (68,1%) demonstrou ser coagulase e DNase negativo. No que diz respeito à actividade hemolítica, 67%



**Figura 3.** Resultados do Multiplex-PCR de cada conjunto de estirpes de referência de *S. aureus*. (a) Conjunto 1: *sej* (102 pb), *sei* (154 pb), *seb* (196 pb), *seq* (330 pb), *ser* (368 pb), *sed* (451 pb), e *femA* (723 pb). (b) Conjunto 2: *sen* (103 pb), *tst* (200 pb), *sek* (282 pb), *sea* (344 pb), *sec* (399 pb), *sem* (572 pb), e *femA* (723 pb). (c) Conjunto 3: *seo* (116 pb), *seh* (218 pb), e *femA* (723 pb). Linha M, marcador molecular de 50 pb, linha 1: 3169 (*sec*, *sed*, *sej*, *sel*, *seo*, *ser*, *tsst*, e *femA*); linha 2: R5371 (*sea*, *seg*, *seh*, *sem*, *sen*, *seo*, *seu*, *tsst*, e *femA*); linha 3: R5460 (*seb*, *seg*, *seh*, *sem*, *sen*, *seo*, *seu*, *tst*, e *femA*); linha 4: ATCC 25293 (*seg*, *sem*, *sen*, *seo*, *seu* e *femA*); linha 5: FRI913 (*sea*, *seg*, *see*, *sek*, *sel*, *seq*, *tsst*, e *femA*); linha 6: FRI 472 (*sed*, *seg*, *sej*, *sem*, *sen*, *seo*, *ser*, e *femA*).

dos isolados não apresentaram actividade hemolítica e 33% demonstraram β-hemólise. Não foi detectada α-hemólise nos isolados totais.



**Figura 4.** Detecção de enterotoxinas e da toxina do choque tóxico em estirpes de *S. aureus* (n=21) provenientes de indivíduos com DA. Em 16/21 isolados (76%) foram encontradas combinações diferentes de quatro ou mais enterotoxinas

## DISCUSSÃO

A DA é uma doença inflamatória cutânea classicamente associada à colonização e infecção por um grupo de microrganismos específicos. A caracterização detalhada do microbioma cutâneo nesta patologia é fundamental para uma abordagem terapêutica adequada. No presente estudo, a metodologia molecular permitiu caracterizar de forma eficaz e abrangente o perfil da microflora estafilocócica residente na pele. A microflora identificada foi distinta nos dois grupos, notando-se uma heterogeneidade nas espécies identificadas entre os indivíduos com DA e indivíduos saudáveis. Verificou-se uma redução da diversidade bacteriana nos indivíduos com DA relativamente aos indivíduos saudáveis com 4 e 8 espécies identificadas (Figura 2), respectivamente.

A DA tem sido associada a uma prevalência elevada de colonização da pele por estirpes de *S. aureus*, o que está intimamente relacionado com a gravidade da doença<sup>8</sup>. O *S. aureus* foi a estirpe prevalente no contexto da DA com 71/196 isolados. Do grupo de 6 indivíduos analisados com DA, 4 (67%) estavam colonizados por *S. aureus*. Outros autores<sup>13,14</sup> demonstraram que até cerca de 80% dos doentes com DA podem estar coloniza-

dos por *S. aureus*. No grupo de 21 indivíduos saudáveis, 5 (24%) estavam colonizados por estirpes de *S. aureus*, resultados que estão de acordo com o previamente descrito<sup>15</sup>.

Também ocorreram flutuações em outras espécies de bactérias presentes na pele. O *S. epidermidis* e o *S. hominis* são espécies comuns na pele de indivíduos saudáveis e têm sido considerados microrganismos comensais, com a capacidade de inibir o *S. aureus*<sup>16</sup>. A proporção destas duas espécies também aumenta consideravelmente nos indivíduos com DA, sugerindo uma visão diferente sobre a relação da comunidade estafilocócica com a DA. Estas espécies de estafilococos podem compartilhar uma relação mutualística ou comensal para melhorar a resistência comum a peptídeos antimicrobianos. Alternativamente também foi sugerido como sendo um mecanismo compensatório de aumento destas estirpes de *Staphylococcus coagulase negativos* com o intuito de controlar o *S. aureus*<sup>8</sup>.

Existem várias linhas de evidência apoiando o conceito de que as toxinas com capacidade de superantigénios desempenham um papel na patogénese da DA. Estes superantigénios podem penetrar a barreira da pele e contribuir para a persistência e exacerbação da inflamação alérgica da pele<sup>17</sup>. Do ponto de vista clínico, mais do que 50% dos doentes com DA são colonizados por estirpes de *S. aureus* que secretam, pelo menos, um superantigénio<sup>14</sup>. Neste estudo, em 16/21 (76%) estirpes de *S. aureus* isoladas de indivíduos com DA foram detectadas exotoxinas, com combinações diferentes de quatro ou mais enterotoxinas. Estudos prévios demonstraram que 30 a 60% das estirpes de *S. aureus* isoladas de indivíduos com DA eram toxigénicas<sup>13,14</sup>. Os genes predominantes foram o SEM, SEM, SEG e SEO. Estes genes são conhecidos como componentes normais do operão *egc* (SEG, SEI, SEM e SEN com SEO ou SEU), de modo que este elemento genético móbil foi frequentemente detectado<sup>5</sup> e pode ser considerado uma possível fonte de genes com actividade superantigénica. Mempel *et al.*<sup>18</sup> também identificou a presença do operão *egc* em estir-

pes de *S. aureus* isoladas de doentes com DA. De notar ainda que das enterotoxinas clássicas (SEA-SED), apenas a SEA foi identificada em 6/21 (28,5%) isolados. Alguns estudos apontam a SEB<sup>19</sup> ou a SEC<sup>20</sup> como as toxinas preferencialmente associadas com a DA, no entanto, neste estudo não foram detectados os genes produtores destas toxinas. Esta caracterização deveria também ser alargada às estirpes de SCN isoladas neste estudo, de modo a verificar a taxa de incidência de estirpes de SCN toxigénicas nos isolados totais e realçar melhor o papel de estirpes de SCN no contexto da DA.

## CONCLUSÕES

Existe uma maior diversidade de espécies estafilocócicas em indivíduos saudáveis comparativamente aos doentes com DA na nossa população. As estirpes prevalentes em doentes com DA foram o *S. aureus*, seguido do *S. epidermidis* e *S. hominis*. A relação entre as diversas espécies da comunidade estafilocócica cutânea é complexa e ainda não está completamente esclarecida. Poderá ter sentido no futuro imunomodular a pele com espécies comensais não patogénicas?

A possibilidade de estabelecer para cada doente com DA o seu perfil estafilocócico tem importantes e potenciais implicações clínicas: dirigir a terapêutica antimicrobiana de forma específica, “*tailor-made*” à comunidade microbiana daquele doente e não de forma empírica. Em estudos futuros a caracterização do perfil de virulência de espécies SCN provenientes de doentes com DA poderá esclarecer o seu papel na manutenção da inflamação cutânea.

**Financiamento:** Estudo financiado pelo Projecto 2nd Dermis – IDT Individual, promovido pela empresa Crispim Abreu, cofinanciado no âmbito do Quadro de Referência Estratégico Nacional (QREN) segundo a Portaria 1462/2007 de 15 de Novembro.

**Declaração de conflitos de interesse:** Nenhum.

### Contacto:

Cristina Lopes  
Serviço e Laboratório de Imunologia  
Faculdade de Medicina da Universidade do Porto  
Alameda Prof. Hernâni Monteiro  
4200-450 Porto  
E-mail: clabreu@med.up.pt

## REFERÊNCIAS

1. Rosenthal M, Goldberg D, Aiello A, Larson E. Skin microbiota: microbial community structure and its potential association with health and disease. *Foxman Infect Genet Evol* 2011;11:839-48.
2. Fredricks DN. Microbial ecology of human skin in health and disease. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2001;6:167-9.
3. Katsuyama M, Ichikawa H, Ogawa S, Ikezawa Z. A novel method to control the balance of skin microflora. Part 1. Attack on biofilm of *Staphylococcus aureus* without antibiotics. *J Dermatol Sci* 2005;38:197-205.
4. Lopes C, Duarte AF, Correia O, Delgado L. Atopic dermatitis, innate immunity, and infection. *Dermatol Online J* 2011;17:4.
5. Hwang SY, Kim SH, Jang EJ, Kwon NH, Park YK, Koo HC, et al. Novel multiplex PCR for the detection of the *Staphylococcus aureus* superantigen and its application to raw meat isolates in Korea. *Int J Food Microbiol* 2007;117:99-105.
6. Asher MI, Montefort S, Björkstén B, Lai CK, Strachan DP, Weiland SK, et al. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet* 2006;368:733-43.
7. Shaw TE, Currie GP, Koudelka CW, Simpson EL. Eczema prevalence in the United States: data from the 2003 National Survey of Children's Health. *J Invest Dermatol* 2011;131:67-73.
8. Kong HH, Oh J, Deming C, Conlan S, Grice EA, Beatson MA, et al. Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. *Genome Res* 2012;22:850-9.
9. Boguniewicz M, Leung DY. Recent insights into atopic dermatitis and implications for management of infectious complications. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:4-13.
10. Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol* 2011;9:244-53.
11. Cuny C, Witte W. Typing of *Staphylococcus aureus* by PCR for DNA sequences flanked by transposon Tn916 target region and ribosomal binding site. *J Clin Microbiol* 1996;34:1502-5.
12. Poyart C, Quesne G, Boumaila C, Trieu-Cout P. Rapid and accurate species – level identification of coagulase-negative staphylococci by using the *sodA* gene as a target. *J Clin Microbiol* 2001;39:4296-301.

13. Bunikowski R, Mielke ME, Skarabis H, Worm M, Anagnostopoulos I, Kolde G, et al. Evidence for a disease-promoting effect of *Staphylococcus aureus*-derived exotoxins in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:814-9.
14. Nada RA, Shaheen HI, Touni I, Fahmy D, Armstrong AW, Weiner M, et al. Design and validation of a multiplex polymerase chain reaction for the identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* and associated colonization factor antigens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010;67:134-42.
15. Higaki S, Kitagawa T, Morohashi M, Yamagishi T. Distribution and antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci from skin lesions. *J Int Med Res* 1999;27:191-5.
16. Iwase T, Seki K, Shinji H, Mizunoe Y, Masuda S. Development of a real-time PCR assay for the detection and identification of *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus warneri*. *J Med Microbiol* 2007;56:1346-9.
17. Schlievert PM, Case LC, Strandberg KL, Abrams BB, Leung DY. Superantigen profile of *Staphylococcus aureus* isolates from patients with steroid-resistant atopic dermatitis. *Clin Infect Dis* 2008;46:1562-7.
18. Mempel M, Lina G, Hojka M, Schnopp C, Seidl HP, Schäfer T, et al. High prevalence of superantigens associated with the *egc* locus in *Staphylococcus aureus* isolates from patients with atopic eczema. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003;22:306-9.
19. Bonness S, Szekat C, Novak N, Bierbaum G. Pulsed-field gel electrophoresis of *Staphylococcus aureus* isolates from atopic patients revealing presence of similar strains in isolates from children and their parents. *J Clin Microbiol* 2008;46:456-61.
20. Tomi NS, Kränke B, Aberer E. Staphylococcal toxins in patients with psoriasis, atopic dermatitis, and erythroderma, and in healthy control subjects. *J Am Acad Dermatol* 2005;53:67-72.