

## DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDES COM RESISTÊNCIA BACTERIANA

### MOLECULAR DIAGNOSIS FOR STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDES WITH BACTERIAL RESISTANCE

#### Resumo

A sepse permanece como uma das mais comuns doenças ocorridas durante o período neonatal, sendo ainda uma causa significativa de morbidade e mortalidade (1), apesar de consideráveis progressos de higiene, introdução de novos agentes antimicrobianos e avançadas medidas para diagnóstico precoce. Isto contribui com 13-15% das mortes durante o período neonatal, sendo este valor maior em países em desenvolvimento com taxas de 30-50%. Mortalidade relativa à sepse é prevenida com terapia antimicrobiana racional, nutricional e cuidados de suporte agressivos. O artigo aqui produzido teve por objetivo geral realizar uma revisão bibliográfica sobre o diagnóstico por metodologia molecular de resistência bacteriana em estratos de *Staphylococcus epidermidis*, em sangue de recém-nascidos com suspeita de resistência bacteriana ou não.

**Palavras-chave:** diagnóstico por metodologia molecular; resistência bacteriana; extratos de *Staphylococcus epidermidis*; revisão bibliográfica

#### Abstract

Sepsis remains one of the most common diseases occurring during the neonatal period, and is still a significant cause of morbidity and mortality (1), despite considerable advances in hygiene, the introduction of new antimicrobial agents and advanced measures for early diagnosis. This accounts for 13-15% of deaths during the neonatal period, with this figure being higher in developing countries with rates of 30-50%. Sepsis-related mortality is prevented with rational antimicrobial therapy, nutrition, and aggressive supportive care. The general objective of the article produced here was to carry out a literature review on the diagnosis by molecular methodology of bacterial resistance in strata of *Staphylococcus epidermidis*, in the blood of newborns with suspected bacterial resistance or not.

**Keywords:** diagnosis by molecular methodology; Bacterial resistance; extracts of *Staphylococcus epidermidis*; literature review

## 1 INTRODUÇÃO

O *Staphylococcus epidermidis*, ou *S. epidermidis*, é uma bactéria gram-positiva presente na pele de forma natural, não tendo efeitos deletérios ao organismo. No entanto, quando o organismo se encontra debilitado e com baixas condições de defesa, tais micro-organismos – considerados oportunistas – são capazes de provocar desconforto em razão

de algumas infecções, a exemplo da sepse, considerada a mais prevalente infecção por *S. epidermidis*. A sepse é um tipo de infecção no sangue, provocada pela *S. epidermidis* quando esta se insere no organismo, o que ocorre, como mencionado, quando há comprometimento do sistema imunológico (GOTOFF, 1996; HAQUE, 1998).

Conforme explicam Chako e Sohi (2005), a infecção por *S. epidermidis* não tem fácil diagnóstico, haja vista que se confunde com várias outras enfermidades, notadamente no que diz respeito à sintomática apresentada. Assim, sua identificação geralmente é realizada por meio do exame dos sintomas relatados pelos pacientes, dentre os quais destacam-se: febre alta; cefaleia; cansaço recorrente; mal-estar; diminuição da pressão arterial; falta de ar ou dificuldade para respirar.

A sepse permanece como uma das mais comuns doenças ocorridas durante o período neonatal, sendo ainda uma causa significativa de morbidade e mortalidade (CHAKO; SOHI, 2005), apesar de consideráveis progressos de higiene, introdução de novos agentes antimicrobianos e avançadas medidas para diagnóstico precoce (GOTOFF, 1996; HAQUE, 1998). Isso contribui com 13-15% das mortes durante o período neonatal, sendo este valor maior em países em desenvolvimento com taxas de 30-50% (ANTIA-OBONG *et al.* 1992; OMENE, 1979). Mortalidade relativa à sepse é prevenida com terapia antimicrobiana racional, nutricional e cuidados de suporte agressivos (SANKER *et al.* 2008).

Os organismos responsáveis por sepse variam de acordo com as fronteiras geográficas e com o tempo de duração da doença (AL-ZWAINI, 2002). Na maioria dos países em desenvolvimento o grupo de bactérias Gram-Negativas permanecem como principal fonte de infecção (KLEIN; MARCY, 2001), mas o *Staphylococcus epidermidis* tem sido o agente bacteriano que mais ocasiona resistência (NOURSE, 2000). Os sintomas de infecção neonatal não são específicos, por diferentes agentes, o que sugere a necessidade de testes microbiológicos mais sensíveis e específicos (NOURSE, 2000). Microrganismos envolvidos em sepse têm desenvolvido cada vez mais resistência aos antibióticos comumente usados tornando o tratamento extremamente difícil (MOTARA; BALLOT; PEROVIC, 2005).

Sendo assim, os dados epidemiológicos relativos à sepse neonatal devem ser constantemente atualizados para detectar mudanças no padrão de infecção dos patógenos e sua suscetibilidade a vários antibióticos e assim fornecer dados para escolha da antibioticoterapia (WEST; PETERSIDE, 2012). O conhecimento etiológico do agente infeccioso tanto quanto sua sensibilidade antimicrobiana é necessário para uma efetiva

intervenção terapêutica. Portanto, importante notar a necessidade de se começar uma terapia antimicrobiana enquanto se espera o resultado das hemoculturas. Sendo que o tratamento empírico inicial deve ser uma combinação de medicamentos para cobrir organismos prevalentes naquela localidade (WEST; PETERSIDE, 2012).

Hemoculturas é o padrão ouro no diagnóstico da sepse, mas possui menor sensibilidade e os resultados são disponíveis em não menos do que 48 a 72 horas (MURRAY, 2004). O método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) mostram serem mais rápidos e específicos (MIGLIOLI, 2009), mas quando comparamos qPCR com PCR convencional, sabe-se que mesmo que aquele consista de uma técnica mais rigorosa e sensível, na prática exige custos mais elevados do que a PCR convencional (FURTADO *et al.*, 2014).

Nesse sentido, medidas precisam ser tomadas para prevenir ou controlar o aparecimento de estirpes de resistência. Leis, portanto, devem ser aplicadas para evitar o uso indiscriminado de antibióticos, bem como desencorajar doses inadequadas que também contribuem para o crescente surgimento de cepas resistentes (WEST; PETERSIDE, 2012). O grande índice de infecções resistentes ao tratamento de antibioticoterapia na Unidade Terciária Neonatal estimulou o interesse na realização deste projeto para que o conhecimento dos mecanismos de resistência de *Staphylococcus epidermidis* possibilite benefícios no tratamento de infecções neonatais. Este projeto surgiu com base no grande índice de infecções resistentes ao tratamento de antibioticoterapia.

## 2 Revisão de Literatura

A sepse neonatal é a mais frequente infecção hospitalar em unidades de terapia intensiva neonatais e sua incidência vem aumentando em decorrência da maior sobrevivência dos recém-nascidos de muito baixo peso e extremo muito baixo peso. Além disso, o uso de cateteres vasculares é grande fator de risco para esta complicação, contribuindo significativamente com a morbidade, custos e prolongamento da hospitalização (SADER *et al.*, 1999).

É definida como síndrome clínica de bacteremia com sinais sistêmicos e sintomas de infecção, nas primeiras quatro semanas de vida, sendo a principal causa de mortalidade entre neonatos, responsável por aproximadamente 30 a 50% do total de mortes neonatais (SALGADO; ISON, 2006). Além disso, a resistência aos antibióticos é uma ameaça nos

países em desenvolvimento, devido à elevada carga de doenças bacterianas e à presença de fatores de risco para o seu aparecimento e propagação (PADGET *et al.*, 2016).

## 2.1 Resistência Bacteriana em Neonatos

A resistência antimicrobiana pode ocorrer por mecanismos intrínsecos, correspondendo a uma característica da espécie, ou adquiridos. A associação desses mecanismos leva à multiresistência, limitando de maneira drástica as opções terapêuticas para o tratamento das infecções por patógenos multiresistentes (WILSON, 2013). A aquisição de resistência geralmente ocorre devido ao surgimento de algumas alterações genéticas que se expressam bioquimicamente. Diversos mecanismos podem estar envolvidos, porém a causa mais frequente é a aquisição de genes de resistência através de elementos genéticos móveis (MULVEY; SIMOR, 2009).

O consumo de antibióticos é elevado, principalmente em unidades de cuidados intensivos, podendo levar ao aumento de bactérias multi-resistentes. De maneira frequente se reportam novos mecanismos de resistência bacteriana tanto em bactérias Gram negativas como em bactérias Gram positivas. Muitos fatores influenciam a decisão médica quanto a duração do tratamento antimicrobiano, tais como as características do microrganismo, do paciente, a infecção e as drogas disponíveis para tratamento (WILSON, 2013).

O conhecimento a respeito da resistência antimicrobiana e tendências em padrões de resistência entre os principais patógenos causadores de infecções em crianças pequenas (até 90 dias de vida) é um componente importante do desenvolvimento de estratégias de gestão de base comunitária, sendo os resultados de estudos baseados na comunidade extremamente limitados. E, representam um desafio na elaboração de estratégias simples de gerenciamento de base comunitária (MULVEY; SIMOR, 2009).

Resistência significativa para cotrimoxazole entre todos os agentes patogênicos, e à gentamicina e cefalosporinas de terceira geração entre *Klebsiella*, além da resistência emergindo em *E. coli* é motivo de preocupação e sugere que a recomendação de ampicilina e gentamicina combinadas para o tratamento da sepse neonatal pode já não ser eficaz no tratamento de muitos recém-nascidos com sepsis (MULVEY; SIMOR, 2009).

O mecanismo de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em *Staphylococcus spp.* está associado, em parte, à expressão da proteína de ligação à penicilina, PBP2a (PBP, penicillin binding protein), cuja característica principal é a ligação alterada à

penicilinas. Os  $\beta$ -lactâmicos se ligam às proteínas PBP, transpeptidases integrais de membrana que participam da fase inicial de síntese da parede celular, mudando sua conformação e desencadeando um processo, ainda não esclarecido, que leva à morte dos cocos.

A proteína PBP2a substitui as PBP que exibem ligação normal às penicilinas, conferindo uma defesa eficiente contra esses medicamentos. PBP2a é o produto do gene *MecA*, que é ausente em cepas susceptíveis a meticilina (MOUSALLEM; KURY, 2007). A resistência a meticilina em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulans* negativos é mediada primeiramente pela superprodução de PBP2a, uma proteína de ligação à penicilina (PBP) alterada, adicional às normais PBP1 a PBP4, porém com afinidade extremamente baixa aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos.

O gene *MecA*, determinante estrutural que codifica a PBP2a, é muito conservado entre *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* resistentes a meticilina (MOUSALLEM; KURY, 2007). O gene *MecA* é ausente nos isolados de estafilococos suscetíveis. O gene *MecA* está contido em um elemento genético móvel chamado de cassete MEC do cromossomo de *Staphylococcus*, SCCmec, que possui também o elemento de sequência de inserção IS431mec e um cassete único de genes da recombinase, *ccr*, que são responsáveis pela integração e excisão do SCCmec. A tipificação do SCCmec é essencial para compreender a epidemiologia molecular dos *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MOUSALLEM; KURY, 2007).

### 2.2.2 Resistência aos $\beta$ -lactâmicos

Constitui um problema global e emergente, uma vez que se trata de uma categoria formada por várias classes de medicamentos bastante utilizados na clínica médica. Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos têm em comum na sua base de estrutura molecular um anel  $\beta$ -lactâmico central (ALBORN *et al.*, 1996; MURRAY *et al.*, 2008). As cefalosporinas são um grupo de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos mais utilizados para o tratamento das infecções hospitalares (BRADFORD, 2001).

No entanto, o aumento de cepas resistentes a esses compostos tem restringido seu uso pelos profissionais da saúde (DESHPANDE, 2010). A resistência aos  $\beta$ -lactâmicos pode ser causada por quatro mecanismos: Produção de  $\beta$ -lactamases, falta e ou produção reduzida das proteínas de membrana externa, hiperexpressão de bombas de efluxo e alteração do sítio alvo das proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs) (BARIC, HUJER;

BONOMO, 2010).

O uso excessivo de penicilinas e cefalosporinas contribuiu para o surgimento de  $\beta$ -lactamases, uma família de enzimas bacterianas capazes de hidrolisar esses medicamentos, impulsionando o aumento na utilização de carbapenêmicos considerados antimicrobianos de última escolha. Porém, o uso indiscriminado dos carbapenêmicos, associado à exposição a outros medicamentos e a ausência de protocolos de controle e prevenção de infecção hospitalar permitiu a emergência de enterobactérias resistentes a este grupo de antibióticos (DA SILVA, 2014). A hidrólise de antimicrobianos pelas  $\beta$ -lactamases é o principal mecanismo de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos em bactérias Gram-negativas.

Os genes que codificam essas enzimas sofrem mutações constantemente em resposta à pressão exercida pelos antimicrobianos (NOYAL, 2009). As  $\beta$ -lactamases do tipo AmpC, ou cefalosporinases cromossomais, são enzimas que tem a capacidade de hidrolisar penicilinas e cefamicinas com grande eficácia, enquanto o aztreonam e as cefalosporinas de terceira geração são hidrolisadas com menor eficácia. Geralmente, as cefalosporinas de quarta geração e os carbapenêmicos são fracamente hidrolisados pelas enzimas AmpC (JACOBY, 2009).

Quando os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos não estão presentes, a  $\beta$ -lactamase AmpC é produzida em níveis baixos, mas na presença de  $\beta$ -lactâmicos indutores, como a cefoxitina e, especialmente, o imipenem, essas enzimas passam a ser produzidas em grande quantidade. O mecanismo de indução de AmpC é controlado pela atividade de três proteínas a AmpG, AmpD e AmpR (JACOBY, 2009).

As carbapenemases da classe A, ou serino-carbapenemases, pertencem a classe molecular A de Ambler e hidrolisam uma ampla variedade de  $\beta$ -lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas, aztreonam, carbapenêmicos, e são inibidas pelo ácido clavulânico e tazobactam (QUEENAN; BUSH, 2007). As oxacilinases (OXA) foram nomeadas assim por apresentarem uma atividade hidrolítica potente contra as penicilinas resistentes às penicilinas, dentre elas: a oxacilina, a cloxacilina e a meticilina. Uma característica marcante desse grupo de enzimas é o fato de serem fracamente inibidas pelo ácido clavulânico, mas fortemente inibidas pelo cloreto de sódio (POIREL, 2010).

### 2.2.3 Resistência através de Plasmídios

principal fator na evolução das espécies, conferindo vantagens para as células como degradação de diferentes substratos. A transferência de genes pode ocorrer de uma célula para outra através de unidades genéticas móveis, como plasmídios conjugativos, elementos de transferência horizontal que se movem de uma bactéria a outra, ou cassetes de genes que se mobilizam no genoma através da recombinação por meio de transposons e/ou integrons (BENNET, 2008). Os plasmídeos são moléculas de DNA extracromossomais, que possuem um papel importante na transferência horizontal da informação genética entre bactérias da mesma, ou de espécies diferentes, por meio da conjugação bacteriana (SORENSEN *et al.*, 2005).

A ampla distribuição de plasmídios e integrons nos cromossomos bacterianos indica que os mesmos desempenham importante papel na disseminação e acumulação de genes que conferem resistência a diferentes classes de antimicrobianos entre bactérias de um mesmo ambiente (HALL, 2012). Informações sobre a resistência antimicrobiana entre bactérias que causam infecções nas comunidades é essencial para o desenvolvimento de estratégias adequadas de gestão. Além disso, a sustentabilidade das estratégias de gestão de base comunitária depende de mudanças de monitoramento na etiologia, bem como padrões de resistência de infecções graves ao longo do tempo (MULVEY; SIMOR, 2009).

Em um estudo realizado para se investigar a infecção nosocomial em uma Unidade de Terapia Intensiva na região sul do Brasil foi encontrado *Staphylococcus coagulase negative* como o agente mais frequente. Sendo que, dentre os como fatores de risco significativos para infecção por *Staphylococcus coagulase negative* estão a internação em UTI Neonatal (UTIN), utilização de cateter venoso, ventilação mecânica e nutrição parenteral (MOUSALLEM; KURY, 2007). Sendo assim, mais estudos de diferentes regiões de países em desenvolvimento são necessários para determinar a prevalência de cepas resistentes, bem como avaliar as tendências regionais e temporais (DAL-BÓ; SILVA; SAKAE, 2012).

### **3 *Staphylococcus epidermidis* resistência à meticilina**

*Staphylococcus epidermidis* é o membro mais frequentemente isolado do grupo dos estafilococos coagulase-negativos. Este grupo se distingue diagnosticamente do *Staphylococcus aureus* por sua incapacidade de produzir coagulase. Juntamente com os estafilococos coagulase-negativos mais raramente encontrados, o *S. epidermidis* coloniza a pele e as mucosas do corpo humano e representa a maior parte da flora bacteriana normal



deste habitat.

*S. epidermidis* ganhou interesse substancial nos últimos anos porque se tornou a causa mais importante de infecções nosocomiais (TEIXEIRA *et al.*, 1995; CHAMBERS, 1997). Enquanto o *S. epidermidis* foi considerado por muito tempo como relativamente inócuo, agora é geralmente aceito como um patógeno. No entanto, *S. epidermidis* requer um hospedeiro predisposto para mudar de um habitante normal da pele humana para um agente infeccioso e, portanto, deve ser claramente descrito como oportunista (AL-MASSAUD; DAY; RUSSEL, 1991; MIYAZAKI *et al.*, 2007).

Demais estafilococos, notadamente os *S. epidermides*, são responsáveis por infectar indivíduos imunocomprometidos, a exemplo dos recém-natos prematuros, indivíduos idosos ou que manifestam afecções de base responsáveis diretas pela imunossupressão. Mas outros grupos também sofrem com as infecções causadas por *S. epidermides*, como os dependentes químicos de drogas ilícitas injetáveis e pacientes submetidos à terapia imunossupressora. Pesquisas realizadas (CUNHA *et al.*, 2002; RAIMUNDO *et al.*, 2002; BRADFORD *et al.*, 2006), demonstram que os estafilococos são os micro-organismos mais prevalentes nos episódios de septicemia em neonatos dentre os estafilococos coagulase negativa – ECN.

Conforme as informações de Mattos e colaboradores (2003), tem sido observado ao longo das últimas décadas um considerável incremento na constância de resistência à meticilina e na multirresistência entre os *Estafilococcus coagulase Negativa* (ECN) (DE). Para estes pesquisadores, há um aumento expressivo no quantitativo de cepas de *S. epidermidis* multirresistentes que habitam a pele de indivíduos em condição hospitalar, de profissionais da área de saúde e até mesmo de indivíduos saudáveis da comunidade.

No estudo realizado por De Araújo e colaboradores (2006 apud Rito 2008), também foi demonstrado que, além das cepas nosocomiais, as cepas de MRSE isoladas de indivíduos sadios da comunidade vêm crescendo quanto ao seu potencial de multirresistência aos antimicrobianos, pois 15 das 35 cepas de MRSE analisadas naquele estudo, de origem comunitária, apresentaram resistência até de quatro antimicrobianos diferentes, além da penicilina e oxacilina, demonstrando que cepas de MRSE isoladas de indivíduos sadios da comunidade, podem apresentar multirresistência.

Conforme a dissertação de Rito (2008, p. 56), ainda citando De Araújo (2006), de acordo com este mesmo estudo, “das 21 cepas de MRSE obtidas de pacientes hospitalizados, 76% apresentaram resistência a três ou mais antibióticos além dos  $\beta$ -lactâmicos. Um estudo semelhante realizado no mesmo hospital relatou que 72% das



cepas de MRSE apresentaram multirresistência”.

Em outra pesquisa (MONSEN; KARLSSON; WISTROM, 2005) realizada em um hospital na Suécia, foram isoladas 70 cepas de ECN oriundas de 68 pacientes. Os autores relataram que todas as cepas analisadas apresentaram resistência à oxacilina, à clindamicina, ao cotrimazol, à gentamicina e ao ácido fusídico. Dentre estas 70 cepas multirresistentes, 69 foram identificadas como *Staphylococcus epidermidis*.

No que diz respeito às normas referentes aos protocolos, muitos documentos normativos já foram publicados, notadamente os que remetem aos procedimentos preconizados para a identificação de MRSA, como se verifica das tabelas abaixo. São protocolos elaborados para delinear de forma mais proveitosa os esforços de identificação de MRSA, potencializando os tratamentos e diminuindo a margem de erros e retrabalho.

*Tabela 1. Normas para diagnóstico de MRSA4*

<b>Origens</b>	<b>Recomendações</b>
<i>Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais]</i>	<i>Padrões de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana4 Vigilância de Staphylococcus aureus resistente à meticilina: Princípios, Práticas e Desafios5</i>
<i>European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) [Sistema Europeu de Vigilância da Resistência Antimicrobiana]</i>	<i>Protocolos novos e atualizados para testes de sensibilidade antimicrobiana de patógenos sob vigilância do EARSS 20056</i>
<i>Sociedad Española de Infectología y Microbiología Clínica (SEIMC) [Sociedade Espanhola de Infectología e Microbiología Clínica]</i>	<i>Protocolos de diagnóstico em Microbiologia7</i>
<i>British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC) [Sociedade Britânica de Quimioterapia Antimicrobiana]</i>	<i>Método padronizado de teste de sensibilidade em disco da BSAC (versão 7)8</i>
<i>Grupo de Trabalho Misto da British Society for Antimicrobial Chemotherapy [Sociedade Britânica de Quimioterapia Antimicrobiana], Hospital Infection Society [Sociedade de Infecções Hospitalares] e Infection Control Nurses Association [Associação de Enfermeiras Especializadas em Controle das Infecções] (BSAC/HIS/ICNA)</i>	<i>Recomendações para diagnóstico laboratorial e testes de sensibilidade de Staphylococcus aureus resistente à meticilina (MRSA)9</i>

Baseado no trabalho de Zurita, Mejía, Guzmán-Blanco, 2010, p. 598-100

*Tabela 2. Manifestações clínicas da infecção por S. aureus*

<b>Origem da Infecção</b>	<b>Doença</b>
<i>Pele e tecido mole</i>	<i>Impetigo, furúnculos, carbúnculos, abscessos, celulite, fasciite, piomiosite, infecções em feridas cirúrgicas e traumáticas</i>
<i>Associada a corpo estranho</i>	<i>Cateter intravascular; cateter urinário</i>
<i>Intravascular</i>	<i>Bacteremia, seps, tromboflebite séptica, cardite infecciosa</i>
<i>Ossos e articulações</i>	<i>Osteomielite séptica, artrite séptica</i>

Trato respiratório	Pneumonia, empiema, sinusite, otite média
Outras infecções invasivas	Meningite, infecção de espaço cirúrgico
Doença mediada por toxina	Choque tóxico estafilocócico, intoxicação alimentar, síndrome da pele escaldada estafilocócica, impetigo bolhoso, pneumonia necrosante, osteomielite necrosante

Baseado no trabalho de Zurita, Mejía, Guzmán-Blanco, 2010, p. 598-100

Tabela 3. Métodos para identificação de isolados de *S. aureus*

Princípios	Métodos	Considerações
<b>Teste: Coagulase</b>		
A coagulase produzida por certos cocos Gram-positivos, inclusive <i>S. aureus</i> em forma ligada (aderida à parede celular bacteriana) ou como enzima livre, converte fibrinogênio em fibrina insolúvel na presença de plasma, resultando em coagulação	Teste em tubo Detecta coagulase livre Suspensão bacteriana adicionada a plasma de coelho diluído; incubação a 37° C A coagulase livre faz com que o plasma coagule, formando um gel, habitualmente dentro de 4 h	Teste em tubo Algumas espécies de estafilococos não comumente detectadas em isolados humanos (p. ex., <i>S. schleiferi</i> e <i>S. intermedius</i> ) podem resultar em teste positivo Ocasionalmente, <i>S. aureus</i> raros podem resultar em teste negativo Algumas linhagens precisam de até 24 h de incubação Os testes não devem ser incubados por mais de 24 h
A presença de coagulase diferencia <i>S. aureus</i> de estafilococos coagulase-negativos (CoNS)	Teste da lâmina Detecta coagulase ligada à célula Suspensão de bactérias misturadas com plasma sobre uma lâmina A presença de coagulase ligada provoca rápida aglutinação dos cocos (5-10 s)	Teste em lâmina Resultado rápido 10%-15% das linhagens de <i>S. aureus</i> resultam em teste negativo Algumas outras espécies de estafilococos resultam em teste positivo (p. ex., <i>S. schleiferi</i> , <i>S. lugdunensis</i> )
<b>Teste: Aglutinação em látex</b>		
Proteínas na superfície de <i>S. aureus</i> (p. ex., proteína A, antígenos específicos de grupo do fator de aglutinação, polissacarídeos capsulares) são identificadas por esferas de látex específicas, resultando em agregação	Suspensão bacteriana de <i>S. aureus</i> misturada com esferas de látex específicas A agregação resulta em “limpeza” do meio de fundo	Foram comercializados kits de aglutinação em látex específicos para <i>S. aureus</i> (p. ex., Staphaurex, Staphaurex Plus; Wellcome Diagnostics, Inglaterra) Detectam tanto MSSA como MRSA Sensibilidade > 98% para todas as linhagens de <i>S. aureus</i> Teste rápido e barato Algumas espécies de estafilococos podem resultar em teste positivo (p. ex., <i>S. schleiferi</i> , <i>S. lugdunensis</i> )
<b>Teste: Catalase</b>		
<i>S. aureus</i> produz catalase em abundância, que pode interagir com peróxido de hidrogênio, resultando na produção de oxigênio	Peróxido de hidrogênio a 3% adicionado a colônias em placa de ágar Colônias catalase-positivas produzem oxigênio; ocorre formação quase imediata de bolhas	Resultado rápido e barato Diferencia cocos produtores de catalase (p. ex., estafilococos) de não produtores (p. ex., estreptococos) Não pode ser realizado em ágar-sangue, porque sangue contém catalase
<b>Teste: Ágar-sal-manitol (MSA)</b>		
As linhagens de <i>S. aureus</i> crescem bem em ambiente com alto teor de	Bactérias plaqueadas sobre MSA consistindo de manitol, ~ 7,5%-	Habitualmente detecta MRSA and MSSA MSA pode ser suplementado com

Staphylococcus aureus, sendo capazes de fermentar manitol para produzir ácido, que pode ser detectado com o uso de um indicador de pH	10% de sal e vermelho fenol, um indicador de pH Estafilococos patogênicos, como S. aureus, crescem bem em ambiente rico em sal, virando o MSA para o amarelo mediante liberação de ácido	<i>outros antibióticos, inclusive cefoxitina, para triagem de MRSA</i>
<b>Teste: Sensibilidade à polimixina B e novobiocina</b>		
Polimixina B é um antibiótico detergente catiônico específico para bacilos Gram-negativos	Discos de polimixina B (10 U) adicionados à placa de ágar S. aureus é resistente à polimixina B	Discos de polimixina B e novobiocina são relativamente baratos e de fácil uso Devem ser utilizados como parte de uma série de testes diagnósticos para S. aureus
Novobiocina é um antibiótico aminocumarínico que pode ser utilizado para diferenciar S. aureus de alguns CoNS	Discos de novobiocina (5 µg) adicionados à placa de ágar S. aureus e alguns CoNS (p. ex., S. epidermis) são sensíveis à novobiocina, enquanto a maioria dos demais CoNS (p. ex., S. saprophyticus) é resistente	Discos de polimixina B e novobiocina são relativamente baratos e de fácil uso Devem ser utilizados como parte de uma série de testes diagnósticos para S. aureus
<b>Teste: DNase e nucleases termoestáveis</b>		
Identificação de S. aureus com base na detecção de DNase específica e de nucleases termoestáveis comuns às linhagens de S. aureus	Os métodos são: teste antinuclease para medir anticorpo antinucleases comuns a todas as linhagens de S. aureus, e difusão em ágar metacromático para nucleases termoestáveis	Alguns CoNS raros podem ser positivos em testes de nuclease termoestável S. aureus pode ser detectado em placas com desoxirribonuclease (DNase) utilizadas na triagem de isolados Considerando que CoNS produz quantidades variáveis de DNase, os positivos devem ser confirmados com um teste adicional
<b>Teste: Métodos automatizados</b>		
Os sistemas automatizados utilizam uma bateria de testes para obter identificação de S. aureus	Os sistemas comerciais são: VITEK/VITEK2 (bioMérieux®) Phoenix (BD Biosciences) Microscan (Dade Behring)	Conveniente e confiável para S. aureus Problemas de recursos limitam seu uso em laboratórios de menor porte
<b>Teste: Métodos moleculares</b>		
S. aureus contém vários genes, permitindo sua diferenciação de outras espécies estafilocócicas	Os métodos são PCR (simples, multiplex e em tempo real), sequenciamento do DNA, e técnicas baseadas em hibridização Os genes específicos para espécie comumente utilizados são nuclease (nuc), coagulase (coa), proteína A (spa), femA e femB, Sa442, e 16S rRNA específico de S. aureus	Robusto e de simples realização Muitos laboratórios locais não possuem instalações/equipamento para abordagens moleculares

*Baseado no trabalho de Zurita, Mejía, Guzmán-Blanco, 2010, p. 598-100*

## Considerações Finais

A múltipla resistência aos antibióticos em *S. epidermidis* é um problema

reconhecido mundialmente e parece estar relacionado com o uso indiscriminado e prolongado dessas drogas. Apesar do avanço relativo às pesquisas na área, o diagnóstico molecular para *staphylococcus epidermides* ainda apresenta dificuldades, haja vista que tem por base uma combinação de informações epidemiológicas, sintomas clínicos e a caracterização da linhagem infecciosa de MRSA. Desse modo, é cada vez mais relevante a produção de estudos, pesquisas e experimentos que tenham como objeto a resolução dos muitos problemas causados pela infecção de *S. epidermides*, bem como a resistência bacteriana desse patógeno.

## REFERÊNCIAS

ALBORN, W. E., Jr., J. HOSKINS, S. UNAL, J. E. FLOKOWITSCH, C. A. HAYES, J. E. DOTZLAF, W. K. YEH, and P. L. SKATRUD. 1996. Cloning and characterization of femA and femB from *Staphylococcus epidermidis*. **Gene**, n. 180, p. 177-181.

AL-MASSAUD, S.B.; DAY, M.J.; RUSSEL, A.D. Antimicrobial resistance and gene transfer in *Staphylococcus aureus*. **J. Appl. Bacteriol.**, n. 70, p. 279- 290. 1991.

AL-ZWAINI, E. J. K. Neonatal Septicaemia in the Neonatal Care Unit, AlAnbar governorate, Iraq. **East Medit Health J.** n. 8, p. 4-5, 2002.

ANTIA-OBONG, C. E.; UTSALO, S. J.; UDO, J. J.; UDO, K. T. Neonatal Septicaemia in Calabar, Nigeria. **Central Afr J Med.** n. 36, p. 161-165, 1992.

BABIC, M.; HUJER, A. M.; BONOMO, R. A. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. **Drug Resist Updat**, v. 9, n. 3, p.142-156, 2006.

BAO, R.; CHEN, J. Characteristics and problems of unplugged computer science curriculum for young children: Comparative and practical research based on the curriculum in four countries. **International Journal for Innovation Education and Research**, 10 (4), 1–22, 2022. <https://doi.org/10.31686/ijer.vol10.iss4.3700>

BENNET, P. M. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. **British Journal of Pharmacology**. v. 153, n. 1, p. 347-357, 2008.

BRADFORD R. et al. Coagulase-negative staphylococci in very-low-birth-weight infants: inability of genetic markers to distinguish invasive strains from blood culture contaminants. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 25, p. 283-90, Mai. 2006.

CHAMBERS, H. F. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 10, n. 4, p. 781-91, Out. 1997

CHAKO, B.; SOHI, I. Early Onset Neonatal Septicaemia. **Indian J Pediatr.**, n. 72, p. 23-26, 2005.

CRISTO, H. S. DE, FILHO, A. S. N., MARINHO DE ARAGÃO, J. W., & SABA, H. Media Bios and Artificial Intelligence: The dark side of Fake News. **International Journal for Innovation Education and Research**, 10(4), 23–33, 2022.  
<https://doi.org/10.31686/ijer.vol10.iss4.3701>

CUNHA, L.; LOPES, C. A, RUGOLO LM, CHALITA LV. Clinical significance of coagulase-negative *staphylococci* isolated from neonates. *Journal de Pediatria* 78:279-288, 2002.

DAL-BÓ K; SILVA RM; SAKAE TM. Infecção hospitalar em uma unidade de terapia intensiva neonatal do Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. 24(4):381-385; 2012.

DA SILVA, K. E. **Epidemiologia molecular de Enterobactérias resistentes à carbapenêmicos**. 2014. 106 fs. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2014.

DE MATTOS, E.M. et al. Isolation of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from patients undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) and comparison of *Staphylococcus epidermidis*. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 45, p.13-22, Jan. 2003.

DESHPANDE P. et al. New Delhi Metallo-beta lactamase (NDM-1) in Enterobacteriaceae: treatment options with carbapenems compromised. **J Assoc Physicians India**. v. 58, p. 147-149, 2010.

FURTADO, I.; XAVIER, P. C.; TAVARES, L. V. M.; ALVES, F.; MARTINS, S. F; MARTINS, A. S.; PALHARES, D. B. Enterococcus faecium AND Enterococcus faecalis IN BLOOD OF NEWBORNS WITH SUSPECTED NOSOCOMIAL INFECTION. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 56, n.1, p. 77-80; 2014.

GOTOFF, S. P. **Neonatal sepsis and meningitis**. Nelson Textbook of Pediatrics. Edited by: Behrman RE, Kleigman RM, Arvin AM. p. 528-537. Philadelphia: WB Saunders Co, 15, 1996.

GRIMBERG J. et al. A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood. **Nucleic Acids Research**. v. 17, n. 20, p. 83-90, 1989.

HALL, M. Integrins and gene cassettes: hotspots of diversity in bacterial genomes. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 71–78, 2012.

HAQUE, K. H. **Infection and Immunity in the newborn**. Forfor and Arneil's Textbook of pediatrics. Edited by: Campbell AGM, Macintosh, p. 273-289. Pearson Professional Limited, 5. 1998.

JACOBY, G. A. AmpC beta-lactamases. **Clin Microbiol Rev.**, v. 22, n. 1, p.161-82, 2009.

KLEIN, J. O.; MARCY, M. S. **Bacterial Sepsis and Meningitis**. Infectious Diseases of the Fetus and the Newborn Infant. Edited by: Remington JS, Klein JO. 2001, 943-998. Philadelphia: WB Saunders Co, 5.

MIGLIOLI, A. M. D. **DNA genômico de *Streptococos* e *Escherichia coli* em sangue e aspirado traqueal e gástrico de recém-nascidos intubados imediatamente após o nascimento**. Tese (Doutorado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste) – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande/MS, 2009.

MEIJA, C.; ZURITA, J.; GUSMÁN-BLANCO, M. Epidemiologia e vigilância de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina na América Latina. **Epidemiologia de MRSA na América Latina**, 2010.

MIYAZAKI, N. H.; ABREU, A. O.; MARIN, V.A.; REZENDE, C.A.; MORAES, M. T.; VILLAS BÔAS, M. H. The presence of QuacA/B gene in Brazilian methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Mem. Inst. Osw. Cruz**, v. 102, n. 4. 2007.

MOTARA, F.; BALLOT, D. E.; PEROVIC, O. Epidemiology of Neonatal Sepsis at Johannesburg Hospital. **Southern Afr J Epidemiol Infect.**, v. 20, p. 90-93, 2005.

MONSEN, T.; KARLSSON, C.; WISTROM, J. Spread of clones of multidrug-resistant, coagulase-negative *staphylococci* within a university hospital. **Infection Control and Hospital Epidemiology** 26:76-80, 2005.

MOUSALLEM, B. C.; KURY, M. H.; MEDINA-ACOSTA, E. Detecção dos genes Meca efem A, marcadores moleculares de resistência a meticilina em *Staphylococcus* spp. Isolados de pacientes admitidos em uma Unidade Neonatal de tratamento Intensivo. **Revista Científica da FMC**. v. 2, n. 2, p. 2-9, 2007.

MURRAY, P. R.; RESENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p. 220-3.

MURRAY, P. R. *et al.*, **Microbiologia Médica**. 5º Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

MULVEY, M. R; SIMOR, A. E. Antimicrobial resistance in hospitals: how concerned should we be? **CMAJ**. 180, n. 4, p. 408-15, 2009.

NOYAL, M. J. C. et al. Simple screening tests for detection of carbapenemases in clinical isolates of nonfermentative Gram-negative bacteria. **Indian J Med Res**. n 129: p. 707-712, 2009.

OMENE, J. A. Neonatal Septicaemia in Benin City. Nigeria: a review of 74 cases. **Trop Geogr Med**. N. 31, p. 35-39, 1979.

POIREL, L. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the United States. **Antimicrob. Agents Chemother**. v. 54, p. 3072, 2010.

QUEENAN, A. M; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile betalactamases. **Clin Microbiol Rev**. 2007;20(3):440-58.



RAIMUNDO O. et al. Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococcal bacteraemia in a newborn intensive care unit. **J. Hosp. Infect.**, v. 51, p. 33-42, Maio 2002.

RITO, P. DA N. **Caracterização de cepas de staphylococcus resistentes à metilina quanto a produção de biofilme, resistência a antimicrobianos e realização do perfil e da tipificação clonal.** 2008. 84 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz.

SADER, H. S.; SAMPAIO, J. L. M.; ZOCOLLI, C.; JONES, R. N. Results of 1997 SENTRY antimicrobial surveillance program in three Brazilian medical centers. **BJID**, v. 3(2): 63-79, 1999.

SALGADO, C. D.; ISON, M. G. Should Clinicians worry about vancomycinresistant Enterococcus bloodstream infections? **Bone Marrow Transplantation.** 2006; 38: 771-774.

SANKER, M. J.; AGARWAL, R.; DEORARI, A. K.; PAUL, V. K. Sepsis in the Newborn. **Indian J Pediatr.** v. 75, p. 261-266, 2008.

TEIXEIRA, L.A. et al. Geografic spread of epidemic multirresistant Staphylococcus aureus clone in Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 2400-2404, 1995.

WEST, A. B.; PETERSIDE, O. Sensitivity pattern among bacterial isolates in neonatal septicaemia in port Harcourt. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials.** v. 11, p.7, 2012.

WILSON, D. N. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial. **Nat Rev Microbiol.**, v. 12, n. 1, p. 35-48, 2013.