

# **Avaliação da capacidade de formação de biofilme e resistência à meticilina de isolados de *Staphylococcus* de origem alimentar**

**Jussara Patrícia de Pina Correia**

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Alimentar**

## **Júri:**

Presidente: Doutor Vítor Manuel Delgado Alves, Professor Auxiliar do(a) Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutor Manuel José de Carvalho Pimenta Malfeito Ferreira, Professor Associado com Agregação do(a) Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa;

Doutora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito, Professora Auxiliar com Agregação do(a) Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa, orientadora

**2023**

**Para os meus pais e para o meu irmão.**

## Agradecimentos

Apesar de grande parte do esforço ser solitário, é reconfortante saber que existem pessoas que estão sempre dispostas a ajudar e apoiar. Gostaria de, antes de mais, deixar o meu agradecimento e dedicar algumas palavras de carinho a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, ajudaram-me a alcançar os objetivos e contribuir para o meu sucesso.

Começo por agradecer a Deus, principalmente pelas pessoas que cruzaram comigo ao longo da minha caminhada.

Agradeço à minha família por sempre acreditar em mim e não medir forças para me ajudar, ainda que à distância. Em especial ao meu irmão que sempre foi o meu suporte. Aos meus pais que mesmo longe sempre me deram forças e me fizeram sentir que eu tinha sempre um porto seguro. E aos meus avós, por me incluírem em todas as orações.

Agradeço a todos os professores que contribuíram pelo sucesso no meu percurso académico. Em especial, à professora doutora Luísa Brito, por acreditar em mim, pela oportunidade, pelo apoio e atenção demonstrado ao longo da orientação da tese.

Agradeço ao mestre Acácio Salamandane pelo apoio e incentivo ao longo desses meses, pela paciência e por estar sempre disponível para ajudar. Também agradeço à equipa do laboratório de microbiologia por todo o conhecimento e pelo ambiente de trabalho partilhado durante o trabalho laboratorial.

Agradeço ao meu companheiro de caminhada Luís Miguel, por não me deixar desistir, por muitas vezes ser o meu suporte e por estar sempre presente em todos os momentos.

Às minhas amigas, muito obrigada pelos momentos que tornaram a caminhada mais leve.

Por fim, agradeço a mim mesma, por não ter desistido ao longo do percurso, mesmo quando parecia ser a única solução. Por acreditar em mim, pela coragem e resiliência em sempre acreditar que tudo vai dar certo.

## Índice

<i>Resumo</i> .....	1
<i>Abstract</i> .....	2
1. <i>Introdução</i> .....	3
1.1. Caracterização geral do género <i>Staphylococcus</i> .....	3
1.2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	4
1.2.1. Mecanismos de resistência aos antimicrobianos .....	6
1.2.2. <i>Staphylococcus</i> resistente à metilina .....	7
1.2.3. Mecanismo de resistência à metilina.....	11
1.3. Métodos de avaliação da resistência a antibiótico.....	13
1.3.1. Concentração mínima inibitória .....	13
1.3.2. Concentração Mínima Bactericida.....	13
1.4. Biofilmes microbianos.....	13
1.4.1. Formação do biofilme .....	15
1.4.2. Métodos de avaliação da capacidade de formação e quantificação de biofilmes	16
1.4.2.1. Método da enumeração celular (EC) .....	17
1.4.2.2. Método do cristal violeta (CV) .....	17
1.5. Enquadramento do trabalho e objetivos.....	18
2. <i>Material e métodos</i> :.....	18
2.1. Estirpes utilizadas.....	18
2.2. Meios de cultura .....	19
2.3. Soluções .....	19
2.4. Condições de crescimento das estirpes bacterianas .....	19
2.5. Quantificação de biofilmes .....	19
2.5.1. Copões de aço inoxidável.....	20
2.5.2. Placa de poliestireno.....	21
2.5.3. Tubos de vidro.....	21
2.6. Determinação dos valores de MIC e de MBC .....	22
2.7. Avaliação da suscetibilidade do biofilme a diferentes concentrações do antibiótico	22

2.8.	Interpretação de resultados e análise de dados.....	23
3.	<i>Resultados</i> .....	24
3.1.	Avaliação da suscetibilidade dos isolados à meticilina (MIC e MBC) .....	24
3.2.	Avaliação da capacidade de formação de biofilme em três tipos de superfícies.....	26
3.3.	Avaliação da suscetibilidade dos biofilmes a meticilina .....	30
4.	<i>Discussão</i> .....	30
5.	<i>Conclusões e perspectivas futuras</i> .....	34
6.	<i>Bibliografia</i> .....	35

## Índice de ilustrações

Figura 1 - Principais mecanismos de resistência à antimicrobianos (adaptado de Castanheira, 2013) .....	5
Figura 2 - Distribuição geográfica de estirpes MRSA no mundo (Grundmann et al. 2006).....	10
Figura 3 - Alteração da proteína de ligação a penicilina induzida pela presença do gene mecA (adaptado de Rybak & LaPlante, 2005).....	12
Figura 4 – Exemplo de utilização de uma microplaca para determinação da MIC .....	22
Figura 5 - Percentagem de isolados de Staphylococcus resistentes e suscetíveis ao antibiótico meticilina.....	26
Figura 6 - Capacidade de formação de biofilme de SCP e de SCN avaliada nas três superfícies testadas. Letras diferentes nas colunas indicam diferenças significativas nas médias ( $p < 0,05$ ). .....	28
Figura 7 - Análise em componentes principais das metodologias utilizadas para avaliar a capacidade de formação de biofilme em três matérias de superfície: contagem em cupões de aço inoxidável (stainless steel); contagem em tubos de ensaio de vidro (Glass); contagem em tubos de ensaio de vidro (Glass); contagem em tubos de ensaio de vidro (Glass); contagem em Poliestireno (Polystyrene).....	29
Figura 8 - Reduções logarítmicas ( $\text{Log UFC/cm}^2$ ) obtidas após exposição dos biofilmes de diferentes espécies de Staphylococcus a cinco concentrações de meticilina, durante 24 h a 37 °C. O antibiótico seria considerado eficaz na erradicação do biofilme se se verificasse uma redução de 3 $\text{log UFC/cm}^2$ nas contagens. Para cada concentração de meticilina, diferentes letras nas colunas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). Foram realizadas pelo menos duas réplicas biológicas, com duas réplicas técnicas cada.....	30
Tabela 1 - Valores de MIC, MBC e a razão MBC/MIC do antibiótico meticilina para isolados de Staphylococcus.....	24
Tabela 2 - Capacidade de formação de biofilme dos isolados de Staphylococcus expressa em Log ( $\text{UFC/cm}^2$ ).....	27
Tabela 3 - . Coeficiente de correlação de ordem de classificação de Spearman emparelhado ( $r$ ) para métodos de análise de biofilme .....	29

## Resumo

A resistência aos antimicrobianos é uma das causas de centenas de mortes todos os anos, no mundo. As estirpes de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) são patógenos nosocomiais sérios, sendo, portanto, um desafio encontrar um tratamento eficaz. O objetivo principal deste estudo foi caracterizar isolados de *Staphylococcus* (coagulase positiva – SCP e coagulase negativa – SCN), com origem em alimentos comercializados nas ruas em Moçambique, relativamente à sua capacidade de formação de biofilme e suscetibilidade à meticilina. Foram utilizadas três superfícies diferentes (aço inoxidável, vidro e polistireno). Todas as estirpes apresentaram capacidade de formação de biofilme, sendo o poliestireno a superfície onde o biofilme apresentou um número significativamente maior de células viáveis (UFC/cm<sup>2</sup>). Relativamente ao valor de MIC da meticilina, 56,7% dos isolados apresentaram valores inferiores a 4 µg/ml, podendo ser considerados suscetíveis à meticilina. Os mais suscetíveis pertenceram à espécie *S. warini* e os mais resistentes a *S. aureus* e a *S. saprophyticus*. As espécies *S. pasteurii* e *S. saprophyticus* foram as espécies que apresentaram maior produtividade de biofilme (cerca de 8 log UFC/cm<sup>2</sup>). Relativamente à avaliação da suscetibilidade do biofilme à meticilina, constatou-se uma elevada resistência em todas as doses testadas (concentração máxima 32 µg/ml). Não foi detetada associação entre a capacidade de formação de biofilme e a resistência à meticilina (correlação entre a formação de biofilme e o MIC foi de -0,331, e entre a formação de biofilme e o MBC foi de -0,329). A presença destes isolados de *Staphylococcus* em alimentos pode representar uma ameaça para a saúde pública. Reforça-se, assim, com este trabalho a necessidade de implementação de boas práticas de produção e comercialização dos alimentos vendidos nas ruas, o que passa pela melhoria da higiene dos produtores e do ambiente de produção.

Palavras-chave: *Staphylococcus* resistente à meticilina; Biofilmes; Boas Práticas de Higiene (BPH) e Boas Práticas de Fabrico (BPF)

## Abstract

Antibiotic resistance is one of the causes of hundreds of deaths every year around the world. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains are serious nosocomial pathogens, making it a challenge to find effective treatment. The main objective of this study was to characterize isolates of *Staphylococcus* (coagulase-positive - SCP and coagulase-negative - SCN) from food sold on the streets in Mozambique, with respect to their biofilm formation capacity and susceptibility to methicillin. Three different surfaces (stainless steel, glass, and polystyrene) were used. All strains showed biofilm formation capacity, with polystyrene being the surface where the biofilm had a significantly higher number of viable cells (CFU/cm<sup>2</sup>). Regarding the MIC value of methicillin, 56.7% of the isolates had values lower than 4 µg/ml, which could be considered susceptible to methicillin. The most susceptible belonged to the *S. warini* species, and the most resistant were *S. aureus* and *S. saprophyticus*. The *S. pasteurii* and *S. saprophyticus* species showed the highest biofilm productivity (about 8 log CFU/cm<sup>2</sup>). Regarding the evaluation of biofilm susceptibility to methicillin, a high resistance was observed at all doses tested (maximum concentration 32 µg/ml). No association was found between biofilm formation capacity and methicillin resistance (correlation between biofilm formation and MIC was -0.331, and between biofilm formation and MBC was -0.329). The presence of these *Staphylococcus* isolates in food can represent a threat to public health. Therefore, this study reinforces the need to implement good production and commercialization practices for street foods, which involves improving the hygiene of producers and the production environment.

Keywords: Methicillin resistant *Staphylococcus*; biofilms; Good Hygiene Practices (GHP) and Good Manufacturing Practices (GMP).

## 1. Introdução

*Staphylococcus* são habitantes comuns da microbiota da pele humana, mas também estão entre os principais patógenos responsáveis por infecções hospitalares em todo o mundo (Kranjec et al., 2021). As infecções por *S. aureus* tornaram-se cada vez mais graves, com algumas estirpes a causar taxas de mortalidade tão elevadas que variam entre 30-67%, apesar da existência de tratamento (Ball et al., 2022). Um dos fatores que tornam as infecções tão problemáticas decorre da sua capacidade de expressar uma ampla variedade de fatores de virulência, envolvendo genes responsáveis pela formação de biofilmes e pelos genes de virulência e de resistência a antibióticos (Ball et al., 2022).

Os biofilmes afetam seriamente a produção de alimentos, bem como as áreas biomédica, ambiental, industrial e económica (Ferreira et al., 2010). Uma característica importante dos biofilmes é a sua capacidade, em estágios posteriores de maturação, de desprender e dispersar células bacterianas associadas ao biofilme, resultando na colonização de novas superfícies (Oliveira, Brugnera & Piccoli, 2010). Além disso, a formação de biofilme promove a aderência a uma variedade de superfícies bióticas e abióticas, aumentando a resistência das comunidades bacterianas a fatores ambientais hostis (como presença de antibióticos ou resposta imune do hospedeiro) (Ball et al., 2022; Oliveira, Brugnera & Piccoli, 2010). Os biofilmes de bactérias patogénicas são particularmente perigosos, representando uma fonte de contaminação de alimentos, com consequentes perdas económicas e veiculação de toxinfecções alimentares (Oliveira, Brugnera & Piccoli, 2010).

O desenvolvimento e a introdução de antibióticos, juntamente com o rápido surgimento de resistência em *S. aureus*, mostram que este organismo tem uma notável capacidade de adaptação a novos tipos de agentes antimicrobianos. Como consequência, há uma população crescente de *S. aureus* resistente aos antibióticos. Além disso, esta resistência está a mudar-se do hospital para a comunidade, representando assim uma ameaça ainda maior do que antes (Shito, 2006).

### 1.1. Caracterização geral do género *Staphylococcus*

O género *Staphylococcus* foi identificado pela primeira vez em 1880 pelo cirurgião Escocês Alexander Ogston que o isolou do pus de abscessos cirúrgicos, tendo-o relacionado pela primeira vez como agente de infecções pós-cirúrgicas que descreveu como "micrococcus" (Rasheed & Hussein, 2021). A aparência circular e a disposição das células de *Staphylococcus* em

cachos levaram a que Ogston as rotulasse de *Staphylococcus*, derivado das palavras gregas “staphyle” (que significa “cacho de uvas”) e “kokkos” (que significa “forma esférica- cocos”) (Rasheed & Hussein, 2021).

As espécies de *Staphylococcus* são, pois, cocos gram-positivos, não móveis, não esporulados, de tamanho variável, que podem ocorrer de forma isolada, aos pares ou em cachos irregulares, (Harris et al., 2002; Rasheed & Hussein, 2021). As colónias são opacas e podem ser branco, creme, amarelo ou laranja. A temperatura ótima de crescimento é de 30 °C - 37 °C. São anaeróbios facultativos e possuem metabolismo fermentativo (Harris et al., 2002; Public health England & National Health Service, 2019). Os *Staphylococcus* colonizam a maioria dos indivíduos saudáveis em diferentes partes do corpo, como pele e mucosas sem causar doença (Harris et al., 2002; Taylor & Unakal, 2022). Atualmente são conhecidas 32 espécies e oito subespécies do género *Staphylococcus*. *S. aureus* e *S. epidermidis* são as duas espécies mais caracterizadas e estudadas (Harris et al., 2002).

Com base na capacidade de induzir a coagulação do plasma de mamíferos, as espécies de *Staphylococcus* são divididas em dois grandes grupos, *Staphylococcus* coagulase-positivos (SCP) e coagulase-negativos (SCN), (Silva, et al., 2022). O primeiro grupo, SCP, é representado principalmente por *S. aureus*, um patógeno que pode causar uma variedade de infeções em pacientes imunocompetentes, desde infeções cutâneas até infeções sistémicas (Martins & Cunha, 2007). O segundo grupo, SCN, compreende diversas espécies que normalmente estão envolvidas em processos infecciosos em pacientes imunocomprometidos ou pacientes com cateteres e são membros da microbiota normal de humanos, mamíferos em geral e aves (Martins & Cunha, 2007).

*S. lugdunensis* tornou-se conhecido como uma “espécie intermediária” pois, apesar de pertencer ao grupo SCN, compartilha várias características com *S. aureus* (SCP) apresentando características clínicas de ambos os grupos (Silva, et al., 2022). Enquanto *S. aureus* é um patógeno clássico de mamíferos e pode causar doenças potencialmente fatais, os SCN foram considerados quase não patogénicos. De facto, antes da década de 1970, os SCN eram reconhecidos como contaminantes em amostras clínicas (Silva, et al., 2022).

## 1.2. *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* é um importante patógeno bacteriano humano que causa uma ampla variedade de manifestações clínicas, incluindo bacteremia, endocardite infecciosa, infeções de pele e tecidos

moles (por exemplo, impetigo, foliculite, furúnculos, carbúnculos, celulite, síndrome da pele escaldada, e outros), osteomielite, artrite séptica, infeções por dispositivos prostéticos, infeções pulmonares (por exemplo, pneumonia e empiema), gastroenterite, meningite, síndrome do choque tóxico e infeções do trato urinário (Taylor & Unakal, 2022). As colónias são caracterizadas por serem lisas e elevadas, com uma cor amarela-dourada, resultado da estafiloxantina (um carotenoide) produzida pela bactéria, que a protege da fagocitose (Rasheed & Hussein, 2021).

O crescimento e a sobrevivência das bactérias dependem da sua capacidade de se adaptarem às mudanças ambientais e *S. aureus* desenvolveu muitos mecanismos para tal (Harris et al., 2002). As bactérias de vida livre precisam de ser capazes de sobreviver a produtos tóxicos e resíduos de outros organismos, enquanto as bactérias que infetam os humanos precisam de se defender de agentes antimicrobianos (Reygaert, 2018).

Por seu lado, os principais processos de resistência aos antibióticos (Fig. 1) envolvem mecanismos que se enquadram em quatro categorias principais: (1) limitação da absorção ou da permeabilidade da parede; (2) modificação ou alteração dos locais-alvo; (3) inativação do antibiótico através de hidrólise enzimática; (4) presença de bombas de efluxo (Oliveira, J., 2021; Reygaert, 2018). Todos estes mecanismos são igualmente importantes e a maioria das resistências a antibióticos está sujeita a mais do que um destes mecanismos (Fig. 1)

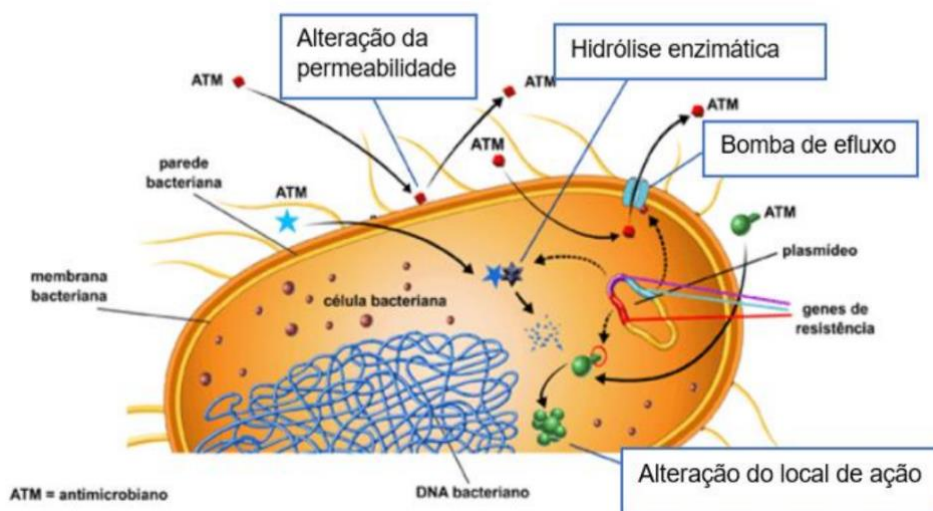


Figura 1 - Principais mecanismos de resistência à antimicrobianos (adaptado de Castanheira, 2013)

### 1.2.1. Mecanismos de resistência aos antimicrobianos

As espécies bacterianas não são uniformemente suscetíveis ou resistentes a um determinado agente antimicrobiano específico. Os níveis de resistência podem variar muito dentro de grupos bacterianos relacionados (Dancer, 2008). As bactérias podem possuir resistência intrínseca ou natural ao antibiótico ou também podem adquirir genes de resistência de outros organismos (resistência adquirida) (Reygaert, 2018).

A resistência natural pode ser intrínseca (sempre expressa na espécie) ou induzida (os genes ocorrem naturalmente nas bactérias, mas só são expressos após a exposição a um antibiótico) (Reygaert, 2018). A resistência intrínseca pode ser definida como uma característica que é compartilhada universalmente dentro de uma espécie bacteriana. É independente da exposição prévia a antibióticos e não está relacionada com a transferência horizontal de genes (Dancer, 2008).

A aquisição de material genético que confere resistência é possível através das três vias pelas quais as bactérias adquirem material genético: transformação, transdução e conjugação (todas denominadas transferências horizontais de genes - HGT); além disso, as bactérias podem sofrer mutações no DNA cromossômico. (Dancer, 2008; Reygaert, 2018).

#### 1.2.1.1 Alteração da permeabilidade (limitação da absorção do antibiótico)

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos inibem o crescimento bacteriano ao interromper o processo de síntese da parede celular. As  $\beta$ -lactamases (originalmente denominadas penicilinas e cefalosporinas) inativam os medicamentos  $\beta$ -lactâmicos hidrolisando um local específico na estrutura do anel  $\beta$ -lactâmico, fazendo com que o anel se abra. O drogas de anel aberto não são capazes de se ligar às suas proteínas PBPs (*Penicillin-binding proteins*) alvo (Reygaert, 2018).

*S. aureus* recentemente desenvolveu resistência à vancomicina, um mecanismo ainda não explicado. A bactéria produz uma parede celular mais espessa, que dificulta a entrada do antibiótico na célula e fornece uma resistência intermediária à vancomicina (Dancer, 2008).

#### 1.2.1.2 Inativação enzimática (hidrólise enzimática, transferência de grupo funcional e reação redox)

O mecanismo mais comum de resistência a antibióticos em bactérias é a inibição enzimática (Kon & Rai, 2016). Existem duas maneiras principais pelas quais as bactérias inativam os antibióticos; pela hidrólise, que ocorre principalmente com agentes  $\beta$ -lactâmicos; ou pela transferência de um grupo químico para a molécula (Dancer, 2008). Esta transferência de grupos funcionais (acil, fosforil, tiol, nucleotidil, ADP-ribosil, glicosil), ocorre com muitos

antibacterianos, como aminoglicosídeo, cloranfenicol, rifamicina e lincosamida; e também outras modificações químicas (redox, liase), que ocorrem com os antibióticos tetraciclina, rifamicina e estreptograminas (Dancer, 2008; Kon & Rai, 2016).

#### 1.2.1.3 Bomba de efluxo

As bombas de efluxo são proteínas de membrana que exportam antibióticos da célula mantendo-nos em baixas concentrações intracelulares. Funcionam principalmente para livrar a célula bacteriana de substâncias tóxicas, e muitas dessas bombas transportam uma grande variedade de compostos (bombas de efluxo mult medicamentos [MDR]) (Reygaert, 2018). Com a mesma velocidade com que esses antimicrobianos entram na célula, são bombeados antes que atinjam o seu local alvo (Kapoor, Saigal, & Elongavan, 2017). As bombas de efluxo contribuem significativamente para organismos multirresistentes (Dancer, 2008; Kapoor, Saigal, & Elongavan, 2017).

#### 1.2.1.4 Alteração do local alvo

Existem múltiplos componentes da célula bacteriana que podem ser alvos de agentes antimicrobianos e muitos alvos que podem ser modificados pelas bactérias para permitir a resistência a essas drogas (Reygaert, 2018).

Um mecanismo de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos utilizado quase que exclusivamente por bactérias gram-positivas é através de alterações na estrutura e/ou número de PBPs (Reygaert, 2018). Esses PBPs modificados perdem ou diminuem a sua afinidade com a proteína alvo, promovendo resistência aos  $\beta$ -lactâmicos (Kon & Rai, 2016).

#### 1.2.2. *Staphylococcus* resistente à metilina (MRSA)

Os primeiros registros de resistência aos antimicrobianos remontam ao ano de 1940 e foram verificados em isolados clínicos de *S. aureus* que apresentaram resistência a penicilina, logo após a sua introdução como agente antibacteriano (Guo et al., 2020). Ao longo dos anos, *S. aureus* têm vindo a mostrar enorme capacidade adaptativa a diferentes tipos de antibióticos, desenvolvendo múltiplos mecanismos de resistência a várias classes de antibióticos usados no tratamento de infecções estafilocócicas (Guo et al., 2020; Schito, 2006).

Atualmente, um dos grandes problemas da resistência aos antibióticos em espécies de *Staphylococcus* é o surgimento de estirpes resistentes à metilina, particularmente *S. aureus* designados MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) (Suhaili et al., 2014). Foi relatado pela primeira vez num hospital do Reino Unido em 1961, após a introdução da metilina para tratar pacientes com infecção por *Staphylococcus* resistentes à penicilina (Chambers & DeLeo,

2009), sendo que nos anos seguintes se disseminou para o resto da Europa e posteriormente para diversos países do Mundo (Deurenberg & Stobberingh, 2008). MRSA são um grupo de estirpes de *S. aureus* resistente a antibióticos beta-lactâmicos, incluindo penicilina, meticilina, oxacilina e cefalosporina (Masimen, Harun, Maulidiani, & Ismail, 2022), devido a produção da enzima  $\beta$ -lactamase que hidrolisa o anel  $\beta$ -lactâmico destes antibióticos. As estirpes MRSA geralmente superam os efeitos dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos produzindo enzimas  $\beta$ -lactamases e alterando o local de ligação para a síntese da parede celular. As estirpes de MRSA têm a capacidade de resistir a quase todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos disponíveis (Berglund et al., 2008), por isso, as infecções por MRSA estão a surgir tanto no hospital quanto na comunidade (Taylor & Unakal, 2022). Estima-se que a taxa de mortalidade para infecções por MRSA seja 2 a 3 vezes maior do que para estirpes de MSSA (Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (Reygaert, 2018).

Em termos de classificação, MRSA foi inicialmente dividido em dois grupos principais, conhecidos como MRSA associados a ambientes hospitalares (HA-MRSA), que representa a maior percentagem das estirpes MRSA, e MRSA associados a ambientes comunitários (CA-MRSA), para definir as diferenças ao nível do genótipo e do fenótipo existentes nos isolados de MRSA, assim como as diferenças relativas à epidemiologia das respetivas infecções (Garoy et al., 2019). Atualmente, os isolados de MRSA são subdivididos em três grupos principais conhecidos como MRSA associados a ambientes hospitalares, MRSA associados a ambientes comunitários, mas também MRSA associados à produção pecuária (Suhaili et al., 2014).

As estirpes de MRSA apresentam elevadas taxas de transmissibilidade, a sua transmissão pode se dar por contacto com objetos contaminados e de indivíduo para indivíduo, como por exemplo, as mãos de um indivíduo portador, sendo este atualmente o veículo mais comum de transmissão (Castro et al., 2016).

Alguns fatores de risco como o longo período de hospitalização, internamento em Unidades de Cuidados Intensivos, hemodiálise, terapêutica antibiótica prolongada, intervenções cirúrgicas, presença de dispositivos invasivos, indivíduos a viver em unidades de internamento de cuidados continuados, ou residências/lares de idosos, e contacto próximo com portadores assintomáticos de MRSA, contribuem para a passagem de HA-MRSA para a comunidade (Deurenberg et al., 2007; Witte, 2009). Em geral, a penicilina continua sendo o antibiótico de escolha se os isolados forem sensíveis (MSSA) ou a vancomicina para estirpes MRSA (Taylor & Unakal, 2022).

Geneticamente, HA-MRSA difere de CA-MRSA nos tipos de SCCmec (*Staphylococcal Cassette Chromosome mec*). CA-MRSA normalmente apresentam SCCmec do tipo IV e V, o que lhes

confere resistência exclusivamente aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, sendo por isso sensíveis à maioria dos restantes antibióticos. Por seu turno, HA-MRSA apresenta os SCCmec tipo I, II, e III que lhes confere resistência a diversas classes de antibióticos (Deurenberg & Stobberingh, 2008; Yamamoto et al., 2010). Dada a elevada disseminação destas estirpes ao longo dos anos, vários estudos relatam a coexistência de HA-MRSA e CA-MRSA tanto a nível hospitalar como a nível comunitário, o que torna difícil a sua distinção (Chen, 2013; Witte, 2009; Yamamoto et al., 2010). Este fenómeno deve-se ao facto de poderem existir indivíduos que podem ter sido colonizados num meio e desenvolverem a infeção noutro, indivíduos que têm contacto frequente com entidades de saúde e residentes em instituições, como por exemplo lares de idosos (Chen, 2013; Witte, 2009; Yamamoto et al., 2010).

De um modo geral, a prevalência de infeções por MRSA varia entre os países, sendo que os países mais desenvolvidos apresentam os maiores índices de prevalência, podendo representar mais de 75% dos casos reportados a nível mundial (Hassoun et al., 2017). Entretanto, estudos recentes apontam para uma tendência crescente de casos de MRSA em países em desenvolvimento, principalmente na África e na Ásia (Garoy et al., 2019). A prevalência de infeções por *S. aureus* em países do Sul e Leste da Ásia e do Pacífico Ocidental é difícil de determinar por falta de dados. No entanto, publicações e dados de vigilância nacionais dessas regiões identificaram uma incidência de MRSA variando de 2,3 a 69,1% (Hassoun et al., 2017; Nickerson et al., 2009).

Na Europa, a prevalência de MRSA exhibe uma variação norte-sul, com uma proporção maior de isolados resistentes nos países do Sul, em comparação com os países do Norte (Hassoun et al., 2017). Embora a proporção de isolados de MRSA na Europa tenha diminuído ao longo do tempo, sete dos 29 países da União Europeia ainda relatam 25% ou mais de isolados de *S. aureus* invasivos como MRSA (Hassoun et al., 2017).

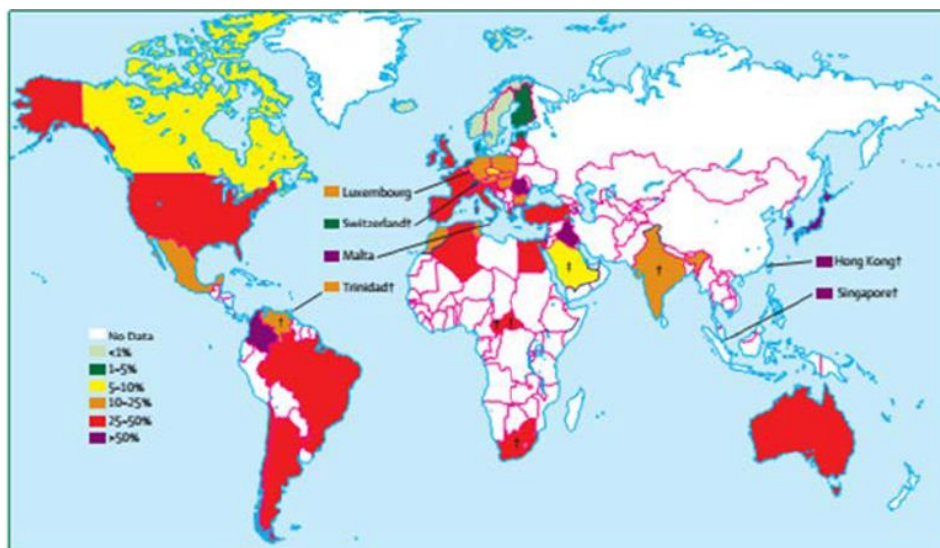


Figura 2 - Distribuição geográfica de estirpes MRSA no mundo (Grundmann et al. 2006)

Em África, os dados sobre MRSA são escassos (Abdulgader et al., 2015). O maior número de dados disponíveis que permite uma avaliação geral da prevalência da resistência à meticilina em *S. aureus* é dos países da bacia do Mediterrâneo, África do Sul e Nigéria. De acordo com estes dados, bem como dados fornecidos por outros países, a prevalência de MRSA em África situa-se entre 25-50% (Falagas et al., 2013). A falta de dados sobre MRSA em África deve-se a uma fraca cooperação entre médicos e investigadores da área de microbiologia e a uma deficiente partilha de informação sobre vigilância sanitária, entre os países africanos (Abdulgader et al., 2015). No entanto, os poucos dados disponíveis sobre MRSA em África, chamam a atenção para a necessidade de aumentar a vigilância de MRSA, bem como o desenvolvimento de estudos epidemiológicos e moleculares (Schaumburg et al., 2014).

A prevalência também pode ser avaliada em função do tipo de MRSA. Em relação a HA-MRSA, verificou-se um aumento da prevalência nos últimos anos, sendo o continente asiático aquele onde foram verificadas taxas de prevalência superiores a 60%, em países como o Sri Lanka (86,5%), Coreia do Sul (77,6%), Vietname (74,1%) e Taiwan (65,0%), seguidos pela América do Sul e do Norte e Malta. Relativamente aos valores intermédios (25-50%), foram essencialmente observados em alguns países da África, China, Austrália e nalguns países europeus como Portugal (49%), Grécia (40%), Itália (37%), e Roménia (34%) (Stefani et al., 2012; Yamamoto et al., 2010).

Quanto à prevalência de CA-MRSA, os dados são ainda escassos. Entretanto, nos países onde foram reportados casos destas infeções, a taxa pode atingir os 50% e é mais comum em crianças do que em adultos (Skov et al., 2012). Apesar de ainda ser reduzida, estima-se que a prevalência de CA-MRSA tende a aumentar nos próximos anos a nível mundial. Pensa-se que, atualmente, a

sua prevalência seja inferior a 1% (Deurenberg et al., 2007; Deurenberg & Stobberingh, 2008). Em termos clínicos, calcula-se que 70-80% das infecções causadas por CA-MRSA são ao nível da pele e dos tecidos moles (David & Daum, 2010). No entanto, dependendo da evolução da infecção, poderão ocorrer diversas infecções sistêmicas, como por exemplo, osteomielite, bacteriemia e pneumonia necrosante (David & Daum, 2010; Yamamoto et al., 2010).

### 1.2.3. Mecanismo de resistência à meticilina

A resistência de *S. aureus* à meticilina deve-se a presença do gene cromossômico *mecA*. O gene *mecA* codifica a proteína PBP2A, uma transpeptidase que ajuda a formação da parede celular bacteriana. PBP2A tem pouca afinidade para antibióticos beta-lactâmicos como a meticilina e a penicilina (Rybak & LaPlante, 2005; Spratt, 2012). Portanto PBP2A ainda pode sintetizar a parede celular na presença do antibiótico (Deurenberg et al., 2007; Lowy, 2003; Turner et al., 2019). Como resultado, estirpes de *S. aureus* que sintetizam PBP2A (MRSA) são resistentes a diferentes antibióticos (Schito, 2006; Taylor & Unakal, 2022).

O gene *mecA* é parte integrante de SCCmec regulado pelo repressor MecI e pelo transdutor transmembranar de sinal de  $\beta$ -lactâmicos, MecRI. Assim, aquando da presença de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, o MecRI é clivado de forma autocatalítica e o domínio metalo-protease, que se encontra localizado no citoplasma, é ativado (Deurenberg et al., 2007; Lowy, 2003). O domínio metalo-protease é então capaz de clivar a MecI (proteína repressora) e, assim, o operador fica livre para que possa ocorrer a transcrição do gene *mecA* e, conseqüentemente, a codificação da PBP2A (Deurenberg et al., 2007; Deurenberg & Stobberingh, 2008; Spratt, 2012). Em termos evolutivos, pensa-se que o gene *mecA* tenha sido adquirido por transferência horizontal da unidade móvel SCCmec a partir de *S. sciuri*, visto que vários estudos apontam que as sequências de aminoácidos da PBP presentes nesta espécie eram mais de 87% idênticas à PBP2A presente em MRSA (Deurenberg et al., 2007; Deurenberg & Stobberingh, 2008).

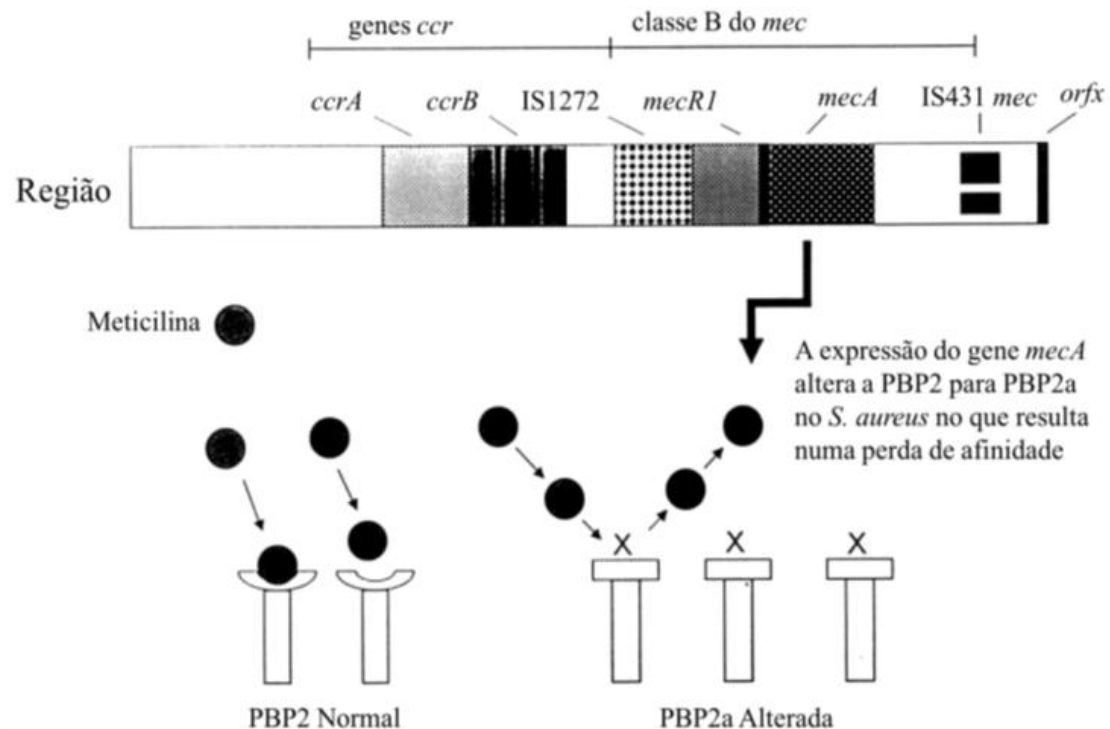


Figura 3 - Alteração da proteína de ligação a penicilina induzida pela presença do gene *mecA* (adaptado de Rybak & LaPlante, 2005).

Atualmente, o tratamento de infecções por MRSA envolve diferentes classes de antibióticos, como a vancomicina, eritromicina e teicoplanina. Estes antibióticos glicopeptídeos atuam na parede celular bacteriana de forma semelhante aos  $\beta$ -lactâmicos, mas utilizam alvos diferentes ao se ligarem à cadeia lateral do peptidoglicano, o que impede a reticulação do peptidoglicano. No entanto, a estirpe mais recente de MRSA começou a exibir resistência aos antibióticos glicopeptídeos, o que dificulta o tratamento destas infecções. Outros tipos de antibióticos, como mupirocina, clindamicina, ácido fusídico e cotrimoxazol, também são usados como opção de segunda linha no tratamento de MRSA. Porém, estes antibióticos só podem ser prescritos quando não há outra alternativa disponível devido ao risco de resistência (Masimen, Harun, Maulidiani, & Ismail, 2022).

O surgimento de MRSA é em grande parte devido à disseminação de estirpes clonais, e os surtos hospitalares temporários são geralmente devidos a esta expansão clonal. No entanto, se forem tomadas medidas de controle eficazes para prevenir a transmissão, a prevalência de MRSA pode ser reduzida para níveis esporádicos (Schito, 2006). A eficácia do controle de MRSA depende de vários fatores, incluindo boas práticas de higiene (higiene das mãos, práticas de isolamento de pacientes com MRSA), e políticas de prescrição adequada de medicamentos antimicrobianos (Schito, 2006).

### 1.3. Métodos de avaliação da resistência a antibiótico

A suscetibilidade e a resistência são geralmente medidas em função da concentração mínima inibitória (CMI).

#### 1.3.1. Concentração mínima inibitória

O valor da concentração mínima inibitória, MIC (do inglês, *Minimum Inhibitory Concentration*), do agente antibacteriano é definido como a menor concentração do agente capaz de inibir o crescimento da população bacteriana, durante um intervalo de tempo definido (geralmente entre 8-24 h) (Martins J., 2019). De acordo com os guidelines do CLSI, os isolados de *Staphylococcus* são considerados resistente a metilina quando o valor de MIC for superior a 4 µg/mL (CLSI, 2018)

#### 1.3.2. Concentração Mínima Bactericida

A concentração mínima bactericida, MBC (do inglês, *Minimum Bactericidal Concentration*) é definida como a menor concentração do agente capaz de matar a população, após remoção do agente.

A determinação dos valores de MIC e de MBC pode ser realizada através do método de microdiluição (Martins J., 2019). Este método consiste na utilização simultânea de diferentes concentrações do composto no meio de cultura, distribuídos pelos poços de uma microplaca.

### 1.4. Biofilmes microbianos

O biofilme pode ser definido como uma comunidade tridimensional de microrganismos viáveis ou não, aderidos a uma determinada superfície biótica ou abiótica. Estas comunidades de microrganismos são circundadas por uma matriz de polímeros extracelulares (EPS - *Extracellular polymeric substances*) que podem ser polissacarídeos, DNA extracelular (eDNA) e/ou proteínas, que lhes permitem as capacidades de aderência e agregação (Ferreira et al., 2010; Kranjec et al., 2021).

As células associadas ao biofilme são capazes de sentir os sinais ambientais para comunicar e coordenar a formação do biofilme com as células bacterianas vizinhas. Essa comunicação é frequentemente controlada por mecanismos de quorum-sensing (QS), que coordenam e ajustam a expressão génica durante o ciclo do biofilme (Kranjec et al., 2021). Sendo assim, o biofilme pode ser considerado como o resultado integrado de uma comunidade que inclui fatores internos e externos. No entanto, cada microrganismo dentro dele pode ter uma

habilidade única para formar um biofilme respondendo de forma diferente ao mesmo sinal ambiental (Cho et al., 2022).

O quorum-sensing da comunidade microbiana no biofilme é orientado para mobilizar os recursos para a sobrevivência dos microrganismos. Desta forma, verifica-se a redução do metabolismo, a ativação de protetores para defesa contra agentes imunológicos do hospedeiro e a proteção contra agentes antimicrobianos, o que resulta muitas vezes em infecções persistentes e de difícil tratamento (El-Nagdy et al., 2020).

A maior parte da biomassa do biofilme é composta por EPS. As moléculas de EPS preenchem e moldam o espaço entre as células do biofilme, determinando diretamente o ambiente e as condições de vida das células e proporcionando estabilidade ao biofilme (Flemming et al., 2016).

A principal componente da matriz é água (até 97%), que contém os componentes estruturais e funcionais da matriz: polissacarídeos solúveis formadores de gel, proteínas e eDNA, além de componentes insolúveis, como amiloides, celulose, fímbrias, pili e flagelos (Flemming et al., 2016). Recentemente, foram identificados poros e canais na matriz do biofilme, que podem estar relacionados com o transporte de líquidos (Flemming et al., 2016).

Embora os biofilmes desempenhem papéis fundamentais na preservação da biodiversidade microbiana, a sua formação é muitas vezes indesejada, principalmente em ambientes hospitalares e em agroindústrias (Hall-Stoodley et al., 2004). Em ambientes agroindustriais, os biofilmes interferem na higienização dos equipamentos por serem mais resistentes aos desinfetantes industriais, e conseqüentemente, podem causar redução da transferência de calor nos equipamentos de pasteurização, queda de pressão nos tubos ou condutas, aumento da corrosão das superfícies metálicas dos equipamentos, causando aumento dos custos de produção e contaminações recorrentes dos produtos finais (Ait Ouali et al., 2014). Em ambientes hospitalares, quando formados em dispositivos médicos como cateteres, por exemplo, os biofilmes podem causar bacteremias (Dancer, 2022).

A elevada propensão de *Staphylococcus* para formar biofilmes confere-lhes vantagens competitivas adicionais, que incluem um aumento de 10 a 1000 vezes na resistência aos antibióticos em comparação com as células planctônicas, elevando ainda mais a sua resiliência ao tratamento. Kranjec et al. (2021) relataram diferentes problemas no tratamento de biofilmes estafilocócicos com antibióticos, incluindo a disseminação da resistência aos antibióticos, a penetração limitada dos antibióticos nos biofilmes e a heterogeneidade de células na comunidade do biofilme potenciando a transferência horizontal de genes de resistência a antibióticos.

*Staphylococcus* sensíveis à metilina (MSSA) para formar biofilme requerem adesinas intercelular polissacarídica (PIA), enquanto os MRSA, não. Os polissacarídeos são o principal componente dos biofilmes de MSSA, enquanto os biofilmes de MRSA são predominantemente compostos por proteínas e eDNA (Ball et al., 2022).

#### 1.4.1. Formação do biofilme

A colonização bacteriana de superfícies é um processo complexo que depende da interação de três fatores principais: (i) as características do material, como a rugosidade superficial específica, a porosidade ou a topografia da superfície, a composição química e a molhabilidade ou energia livre de superfície (SFE); (ii) as propriedades bacterianas, como a carga de superfície, a energia de superfície, a forma e o tamanho, apêndices e adesinas e (iii) as condições ambientais, como as condições de fluxo ao redor da superfície (temperatura, umidade, viscosidade, hidrodinâmica, pH, tensão superficial, força iônica e propriedades dielétricas) (Nakanishi et al., 2021).

A formação de biofilme por *Staphylococcus* é, assim, um processo complexo, multifatorial que envolve um grande número de proteínas estafilocócicas e pode ser dividida em três etapas principais: aderência/fixação, desenvolvimento do biofilme/maturação e desprendimento/dispersão de bactérias maduras embebidas em biofilme para fora do biofilme (Ferreira et al., 2010; Kranjec et al., 2021; Kirmusaoglu, 2016).

- **Aderência/fixação**

A formação de biofilme inicia-se com a aderência da bactéria a uma superfície que atua como substrato e continua com a agregação formada pela aderência célula-célula. A aderência estafilocócica a uma superfície abiótica depende da estrutura físico-química do material e dos componentes de superfície, tais como ácido teicóico de parede, ácido lipoteicóico, proteína associada à acumulação, autolisinas AtIA/E (AtIA e AtIE em *S. aureus* e *S. epidermidis*, respectivamente) (Kranjec et al., 2021; Kirmusaoglu, 2016).

Os ácidos teicóicos são glicopolímeros ligados por meio de ligações covalentes aos componentes da parede celular (ácidos teicóicos da parede) ou alternativamente à membrana celular por meio de âncoras lipídicas (ácidos lipoteicóicos). Notavelmente, os ácidos teicóicos desempenham um papel importante na colonização bacteriana de superfícies abióticas, como o poliestireno e o vidro, onde a sua carga líquida negativa medeia a aderência à superfície (Kranjec et al., 2021).

- **Desenvolvimento do biofilme/maturação**

Após a fixação inicial, um processo conhecido como maturação consolida a transição da vida bacteriana planctónica para a vida bacteriana sésil (estado de biofilme). Durante esta fase, é formado a maior parte do EPS, promovendo a aderência intercelular e permitindo que as células se acumulem em múltiplas camadas para formar uma comunidade tridimensional. Em *Staphylococcus*, como já foi dito, a formação do EPS pode ser conseguida através de duas vias principais: uma via dependente de polissacarídeos e uma via independente de polissacarídeos (Kranjec et al., 2021).

- **Desprendimento/dispersão**

O desprendimento ou dispersão é a última fase do ciclo de formação do biofilme e tem um papel fundamental na disseminação de infeções e contaminações estafilocócicas. Nesta fase, as células sésseis passam ao estado planctónico, podendo se espalhar e colonizar outras superfícies e formar biofilme nas regiões colonizadas (Kranjec et al., 2021; Kirmusaoğlu, 2016). O desprendimento de microrganismos do biofilme pode ser causado pelas próprias bactérias, como degradação da matriz do biofilme ou por forças externas, como forças de cisalhamento do fluido, corrosão e intervenção humana (Kranjec et al., 2021; Kirmusaoğlu, 2016).

As enzimas que degradam os polímeros essenciais do biofilme podem teoricamente contribuir para o desprendimento do biofilme, no entanto, existem apenas evidências preliminares para tal função enzimática em *S. aureus* ou noutros *Staphylococcus*. Em contraste, há relatos indicando que várias bactérias usam moléculas semelhantes a surfactantes para estruturar e destacar biofilme. Assim, há evidências que sugerem que a expressão controlada por quorum-sensing de moléculas de surfactante é crucial para os processos de maturação do biofilme (Periasamy et al., 2012).

#### 1.4.2. Métodos de avaliação da capacidade de formação e quantificação de biofilmes

A capacidade de formação de biofilme tem sido avaliada através de diferentes metodologias. Cada uma influenciada por uma combinação de diferentes fatores, nomeadamente: material de superfície, condições de crescimento e procedimentos de quantificação do biofilme (Lourenço et al., 2012). Uns são métodos indiretos, como o método de cristal violeta e outros são métodos de enumeração ou contagem direta que podem usar diferentes superfícies como aço inoxidável, poliestireno, vidro ou cristal (Corte et al., 2019).

#### **1.4.2.1. Método da enumeração celular (EC)**

Este método consiste na produção do biofilme em superfícies planas, e posterior remoção das células. Após diluições decimais sucessivas da suspensão obtida, procede-se à inoculação em placas de meio de cultura adequada ao tipo de microrganismo avaliado, para a determinação do número de unidades formadoras de colónias (UFC). Esta técnica tem como limitação o demorado tempo de análise. Um exemplo desta metodologia é representado na figura 4.

Várias abordagens podem ser usadas para desalojar as células das superfícies, incluindo sonificação, vórtex, raspagem e uso de zaragatoas (Lourenço et al., 2012; Peeters et al., 2008; Wilson et al., 2017).

O aço inoxidável de grau alimentar é o material mais usado na enumeração das células viáveis, em estudos de biofilmes de contaminantes na Indústria Alimentar, devido à sua estabilidade físico-química e elevada resistência à corrosão (Gonçalves, 2017). Uma limitação do método de enumeração celular em cupões é a extensa manipulação dos cupões durante a realização da análise, aumentando as probabilidades de erros do operador. Também o vidro é um material bastante utilizado neste tipo de estudos. As bactérias crescem no meio líquido, mas apenas se contabilizam as células aderentes às paredes de vidro dos tubos.

#### **1.4.2.2. Método do cristal violeta (CV) (método indireto)**

O método do cristal violeta (CV) proposto por Christensen et al. (1985) tem sido amplamente utilizado para o rastreio das culturas. O método do CV envolve a produção de biofilmes nos poços de microplacas P96, corando-os com cristal violeta (Lourenço et al., 2012), um corante básico que se liga a moléculas de superfície com carga negativa e a polissacáridos da matriz extracelular (Peeters et al., 2008). Posteriormente, solubilizando o corante ligado, mede-se a sua absorvância (Lourenço et al., 2012).

Este método tem o inconveniente de corar tanto células viáveis como não viáveis, bem como toda a matriz de polímeros extracelulares (Peeters et al., 2008). A quantidade de corante solubilizado pelo solvente é medida através da absorvância a 590 nm), sendo diretamente proporcional à quantidade de biofilme (Pantanella et al., 2013). O método não fornece informações sobre o número real de bactérias viáveis, tornando-se pouco adequado para avaliar a eficácia de substâncias antimicrobianas na remoção do biofilme (Pantanella et al., 2013).

## 1.5. Enquadramento do trabalho e objetivos

O objetivo deste estudo consistiu em caracterizar a capacidade de formação de biofilme de isolados de estafilococos, coagulase negativos e coagulase positivos, de origem alimentar, previamente caracterizados relativamente à presença de genes que codificam toxinas estafilocócicas, bem como de genes de resistência a antibióticos. Este objetivo geral foi subdividido em três objetivos específicos:

- 1) Avaliar a capacidade de produção de biofilme em três superfícies diferentes, nomeadamente, vidro, poliestireno e aço inoxidável;
- 2) Avaliar a suscetibilidade dos isolados à metilina através da determinação da concentração mínima inibitória (*minimum inhibitory concentration*) - MIC e concentração mínima bactericida (*minimum bactericidal concentration*) - MBC);
- 3) Avaliar a suscetibilidade dos biofilmes a diferentes concentrações do antibiótico metilina.

## 2. Material e métodos:

### 2.1. Estirpes utilizadas

Neste trabalho foram utilizados 34 isolados de *Staphylococcus* previamente recuperados de 81 amostras de alimentos de rua RTE vendidos em Maputo (Salamandane et al., 2021). Estes isolados incluem 10 *S. aureus* (coagulase positiva -SCP e 24 *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN); sete isolados de *S. warneri* e sete de *S. saprophyticus*, cinco isolados de *S. pasteurii* e cinco de *S. xylosum*. As colónias presuntivas foram obtidas após incubação por 48 h a 37°C em Cromogénico Baird Parker Agar—CBPA, de acordo com a ISO 6888, conforme descrito em Salamandane et al. (2021). De cada placa foi selecionada uma UFC que apresentasse características típicas de *Staphylococcus*.

Para a sua identificação e caracterização quanto à presença de genes de virulência e de resistência aos antibióticos, os isolados foram submetidos a testes bioquímicos e moleculares (Salamandane et al, 2022). O critério de seleção dos isolados utilizados neste trabalho foi a presença de genes que codificam enterotoxina(s) estafilocócica(s) e/ou *hly* (hemolisina).

## 2.2. Meios de cultura

Todos os meios líquidos e sólidos, após reconstituição, foram esterilizados durante 15 minutos a 121 °C. Sempre que foi necessária a utilização de água para a preparação de meios e soluções, e quando nada se disser em contrário, utilizou-se água destilada e esterilizada.

- ***Tryptone Soy Broth with Yeast Extract (TSB-YE)***

Dissolver 30 g de TSB desidratado e 6 g de extrato de levedura em 1 L de água.

Após distribuir por tubos, esterilizar e deixar arrefecer

- ***Tryptone Soy Agar with Yeast Extract (TSA-YE)***

Dissolver 30 g de TSB desidratado e 6 g de extrato de levedura. Adicionar 20 g de agar e perfazer o volume com água até 1 L e levar a autoclavar. Após a autoclavagem, deixar arrefecer em banho de água termostaticado até 56 °C e distribuir em caixas de Petri.

## 2.3. Soluções

- **Solução de Ringer (SR)**

Dissolver uma pastilha de SR em 500 ml de água utilizando o sonificador e esterilizar.

- **Antibiótico metilina**

Solução stock de 64 µg/ml

## 2.4. Condições de crescimento das estirpes bacterianas

- **Em meio líquido**

As bactérias foram inoculadas em meio TSB-YE e incubadas durante a noite a 37 °C, para serem usadas, posteriormente, nos ensaios de formação de biofilmes.

- **Em meio sólido**

As bactérias foram inoculadas por riscado à superfície de meio TSA-YE e incubadas a 37 °C durante a noite.

## 2.5. Quantificação de biofilmes

Para a avaliação da capacidade de formação de biofilme foram utilizados 18 isolados (Tabela 2) e três superfícies de aderência, nomeadamente; aço inoxidável, poliestireno e vidro.

### 2.5.1. Cupões de aço inoxidável

As estirpes foram inoculadas em microplacas de poliestireno P24 (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgium) com cupões de aço inoxidável (Metalurgica Quinacorte, Lda, Lousa, Portugal) (1 × 1 cm).

- **Tratamento dos cupões**

Antes de serem utilizados, os cupões foram tratados com acetona para remover a possível gordura existente, passados por água destilada e, de seguida, imersos em ácido fosfórico, durante 20 minutos à temperatura ambiente. Seguidamente, foram passados novamente por água destilada. Os cupões foram então colocados em tubos de ensaio e autoclavados durante 15 minutos à temperatura de 121 °C.

- **Produção de biofilmes**

Em cada placa P24 foi colocado um cupão por poço. Os poços com os cupões foram adicionados de 1 mL de suspensão bacteriana (cerca de 10<sup>8</sup> UFC/mL). Nos poços usados como controlo negativo (ausência de contaminações) o volume de suspensão foi substituído por igual volume de meio de cultura esterilizado. As microplacas foram seladas com *Parafilm*<sup>®</sup> (Amcors, Zurich, Switzerland) e de seguida incubadas a 37 °C durante 24 horas.

- **Remoção do biofilme**

Numa nova microplaca P24 foram colocadas 20 esferas de vidro esterilizadas ( $\varnothing = 3$  mm) por poço. Após o período de incubação dos biofilmes, cada *cupão* de aço inoxidável foi lavado com SR, pipetando-se 1 mL em cada face do cupão, de modo a serem retiradas todas as células não aderentes (planctónicas). Cada cupão foi colocado no poço correspondente da nova microplaca P24 com esferas e foram adicionadas outras 30 esferas de vidro, por cima de cada cupão e 1 mL de SR.

A microplaca foi agitada num vortex de microplacas durante 2 minutos à velocidade máxima, para que fosse removido o biofilme de ambas as faces dos *cupões*.

A partir de cada poço foram feitas diluições decimais sucessivas até 10<sup>-4</sup> ou 10<sup>-5</sup>.

De cada uma das diluições, foram inoculados por *spot* (25  $\mu$ L) em placas de TSA-YE. As placas foram incubadas *overnight* a 37 °C e após 24 horas realizou-se a contagem de UFC. A área total da superfície de aderência do biofilme foi calculada e o número total de UFC foi convertido para log UFC/cm<sup>2</sup>.

### 2.5.2. Placa de poliestireno

Para este método, foram também utilizadas microplacas P24. A preparação dos inóculos foi feita como descrita anteriormente. Inocularam-se os poços com 1 mL da suspensão bacteriana com concentração equivalente a cerca de  $10^8$  UFC/mL (0,5 na escala de MacFarland).

Incubaram-se as microplacas P24 durante 24 h a 37 °C. Após este período, removeu-se o caldo com a cultura e, de seguida, os poços foram submetidos a três lavagens com 1,5 mL de água destilada esterilizada, cada.

Adicionaram-se cerca de 30 esferas de vidro por poço e 1 mL de SR. A microplaca foi agitada em vortex de microplacas (Tittertek DSG, Flowlabs, Germany) durante 2 minutos à velocidade máxima (1400 rpm), para que fosse removido o biofilme da superfície dos poços.

De cada poço, foram retirados 100 µL de suspensão celular e realizadas diluições decimais até  $10^{-4}$  ou  $10^{-5}$ .

De cada uma das diluições, foram inoculados spot (25 µL) por espalhamento à superfície de placas de TSA-YE. As placas foram incubadas *overnight* a 37 °C e após 24 horas realizou-se a contagem de UFC. A área total da superfície de aderência do biofilme foi calculada e o total de UFC contado foi convertido para  $\log$  UFC/cm<sup>2</sup>.

### 2.5.3. Tubos de vidro

Foram utilizados tubos de ensaio de vidro (16×160 mm) que foram previamente autoclavados a 121 °C, durante 15 minutos. A preparação dos inóculos foi feita como descrita anteriormente. Inocularam-se os tubos com 5 mL da suspensão bacteriana com concentração equivalente a 0,5 na escala de McFarland.

Incubaram-se os tubos, durante 24 h a 37 °C. Após este período, removeu-se o caldo com a cultura e, de seguida, lavou-se cada tubo com 7 mL de água destilada esterilizada. Repetiu-se o processo de lavagem por três vezes e inverteram-se, de seguida, os tubos em papel absorvente, para retirar a água de lavagem remanescente. Posteriormente, adicionou-se 5 mL de SR em cada tubo e levou-se a um banho de ultrassons à temperatura ambiente durante 10 minutos, para libertar o biofilme.

A partir de cada uma das suspensões resultantes, realizaram-se diluições decimais e inocularam-se placas por espalhamento. As placas foram incubadas *overnight* a 37 °C e após 24 horas realizou-se a contagem de UFCs. A área total da superfície de aderência do biofilme foi calculada e o total de UFC contado foi convertido para  $\log$  UFC/cm<sup>2</sup>.

## 2.6. Determinação dos valores de MIC e de MBC

Para a determinação da concentração mínima inibitória (MIC) e da concentração mínima bactericida (MBC) foram utilizados 30 isolados (Tabela 3). O MIC foi determinado através do método de diluições seriada e avaliação do crescimento através da observação de turvação visível em meio TSB (Biokar Diagnostics, Beauvais, France), conforme indicado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018). Foram feitas micro diluições seriadas do antibiótico metilicina em microplacas (P96) em caldo TSB de 64  $\mu\text{l/ml}$  a 1  $\mu\text{l/mL}$ .

Os poços foram inoculados com 100  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana com concentração ajustada ( $10^8$  UFC/ml) e as placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Todos os ensaios tiveram um controlo negativo (adicionado de caldo TSB esterilizado, em vez do inóculo).

O valor da MIC correspondeu à menor concentração de metilicina capaz de inibir o crescimento. Após a determinação da MIC, foi retirado um volume de 100  $\mu\text{L}$  de todos os tubos que não apresentaram crescimento bacteriano visível para inoculação em placas de ágar Trypto-Caseína-Soja TSA-YE (Biokar Diagnostics) que foram incubadas a 37 °C por 24 h. A MBC foi determinada como menor concentração de metilicina capaz de eliminar 99,9% da população bacteriana (redução de 3 log).

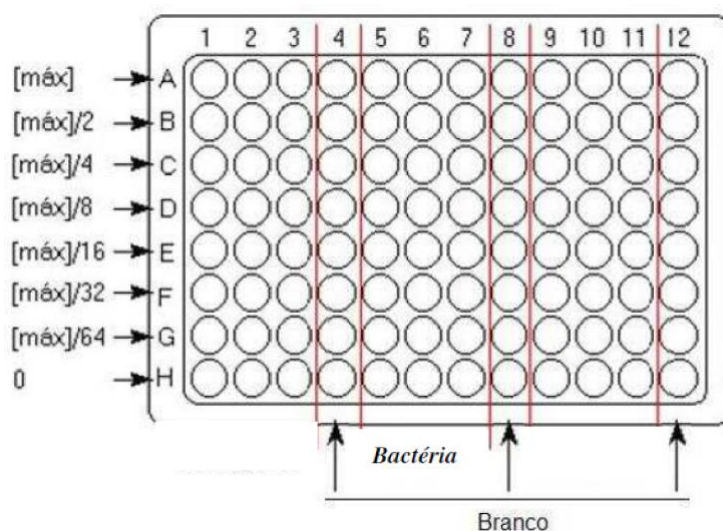


Figura 4 – Exemplo de utilização de uma microplaca para determinação da MIC

## 2.7. Avaliação da suscetibilidade do biofilme a diferentes concentrações do antibiótico

Para a avaliação da suscetibilidade do biofilme a diferentes concentrações de antibióticos foram utilizados 30 isolados (Tabela 3) para a produção do biofilme em superfície de poliestireno, como

descrito no ponto 2.5.2. Foram utilizadas duas microplacas para cada isolado, uma para a quantificação do biofilme inicial e a outra para a avaliação da suscetibilidade do biofilme a diferentes doses de metilicina.

Na placa utilizada para a avaliação da suscetibilidade do biofilme à metilicina, o biofilme foi produzido em seis poços para cada isolado, de modo a serem aplicadas doses decrescentes de metilicina para cada poço. Foram utilizadas cinco concentrações diferentes de metilicina, nomeadamente, 32 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL, 2 µg/mL e 1 µg/mL. Foi adicionado 1 mL do antibiótico na concentração correspondente em todos os poços da microplaca P24, à exceção dos poços reservados aos controlos, em que se substituiu o antibiótico por TSB, e a placa foi incubada a 37 °C por 24h.

Após este tempo de exposição ao antibiótico, cada poço foi submetido a três séries de lavagens com 1,5 mL de SR. Foram colocadas 30 esferas de vidro em cada poço e foi adicionado 1 mL de SR e a placa foi agitada no vortex durante 2 minutos, para remoção do biofilme. De cada poço foram retirados 100 µL desta suspensão e adicionados a 900 µL de SR. As diluições decimais prosseguiram até 10<sup>-4</sup>.

De cada uma das diluições, foram feitas inoculações por espalhamento, em placas de TSA-YE, seguido de incubação durante a noite, a 37 °C para contagem de UFCs.

A redução logarítmica foi efetuada subtraindo ao valor médio dos resultados obtidos para o biofilme o valor médio dos resultados obtidos, após exposição ao antibiótico. O tratamento foi considerado efetivo quando foi observada uma redução logarítmica superior a 3.

## 2.8. Interpretação de resultados e análise de dados

Para a avaliação da capacidade de formação de biofilme e determinação da MIC e da MBC, os valores obtidos para as contagens das células viáveis nos biofilmes (UFC) foram transformados em logaritmos decimais e submetidos a uma análise de variância (ANOVA), com recurso ao programa IBM SPSS.

Os ensaios realizados para a determinação do MIC e MBC foram sempre realizados em duplicado. Assim, e após o respetivo período de incubação, foram considerados como resultados positivos os poços da placa de recuperação, que apresentavam turvação visível em contraste com os controlos não inoculados. Quando pelo menos duas das três réplicas apresentavam turvação, o resultado foi considerado positivo (crescimento). Quando apenas uma, ou nenhuma

das réplicas apresentava turvação o resultado foi considerado negativo (ausência de crescimento).

Foram realizadas análises de correlação de Pearson para determinar as relações entre a MIC e a MBC, e entre a MIC e a capacidade de formação de biofilme. Os resultados foram submetidos ao teste de homogeneidade de variâncias de Bartlett e ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e, em seguida, foi realizada a análise de variância. A análise de componentes principais também foi realizada para reduzir a dimensionalidade dos dados e descrever melhor a variação observada. Toda a análise estatística foi realizada a 5% na linguagem de programação R (R, 2020).

### 3. Resultados

#### 3.1. Avaliação da suscetibilidade dos isolados à metilina (MIC e MBC)

Trinta e quatro isolados de *Staphylococcus* foram avaliados quanto aos valores da concentração mínima inibitória (MIC) e da concentração mínima bactericida (MBC) da metilina. Os valores da MIC variaram entre 1 µg/ml a mais de 32 µg/ml (Tabela 1). Dos 34 isolados testados, 15 (44,1%) apresentaram valores de MIC superiores a 4 µg/ml (não suscetível à metilina) (Tabela 1). Nenhum dos sete isolados de *S. warningeri* foi resistente à metilina (MIC variando entre 2 µg/ml e 4 µg/ml). Ao contrário, entre *S. aureus* e *S. saprophyticus* foi encontrada a maior percentagem de resistência (80% e 71,4%, respetivamente) (Fig.5). Dois dos quatro isolados que apresentaram valores de MIC superiores a 32 µg/ml eram *S. aureus* e os outros dois *S. pasteurii* e *S. saprophyticus*.

Tabela 1 - Valores de MIC, MBC e a razão MBC/MIC do antibiótico metilina para isolados de *Staphylococcus*

Código do isolado	Espécie	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)	MBC/MIC
11	<i>S. aureus</i>	8	8	1
15	<i>S. aureus</i>	2	4	1
32	<i>S. aureus</i>	16	32	2
47	<i>S. aureus</i>	2	4	2
48	<i>S. aureus</i>	4	4	1
49	<i>S. aureus</i>	4	8	2
50	<i>S. aureus</i>	32	> 32	
52	<i>S. aureus</i>	4	8	2
53	<i>S. aureus</i>	> 32	> 32	
68	<i>S. aureus</i>	> 32	> 32	
41	<i>S. pasteurii</i>	4	4	1

24	<i>S. pasteurii</i>	4	8	2
37	<i>S. pasteurii</i>	4	4	1
40	<i>S. pasteurii</i>	4	4	1
43	<i>S. pasteurii</i>	> 32	> 32	
6	<i>S. saprophyticus</i>	2	4	2
13	<i>S. saprophyticus</i>	8	8	1
19	<i>S. saprophyticus</i>	> 32	> 32	
26	<i>S. saprophyticus</i>	8	16	2
31	<i>S. saprophyticus</i>	4	16	4
35	<i>S. saprophyticus</i>	8	16	2
59	<i>S. saprophyticus</i>	32	> 32	
1	<i>S. warneri</i>	4	8	2
18	<i>S. warneri</i>	2	4	2
9	<i>S. warneri</i>	4	8	2
10	<i>S. warneri</i>	2	4	2
20	<i>S. warneri</i>	2	2	1
22	<i>S. warneri</i>	2	4	2
34	<i>S. warneri</i>	2	4	2
21	<i>S. xylosum</i>	4	8	2
23	<i>S. xylosum</i>	1	2	2
28	<i>S. xylosum</i>	32	> 32	
30	<i>S. xylosum</i>	4	4	1
65	<i>S. xylosum</i>	32	>32	

Dois dos quatro isolados em que foi verificado crescimento na concentração de 32 µg/ml foram de *S. aureus* e os restantes dois *S. pasteurii* e *S. saprophyticus*. Os valores de MBC seguiram a mesma tendência do MIC. Em 18 dos 34 isolados, o valor de MBC foi o dobro do valor de MIC (Tabela 1).

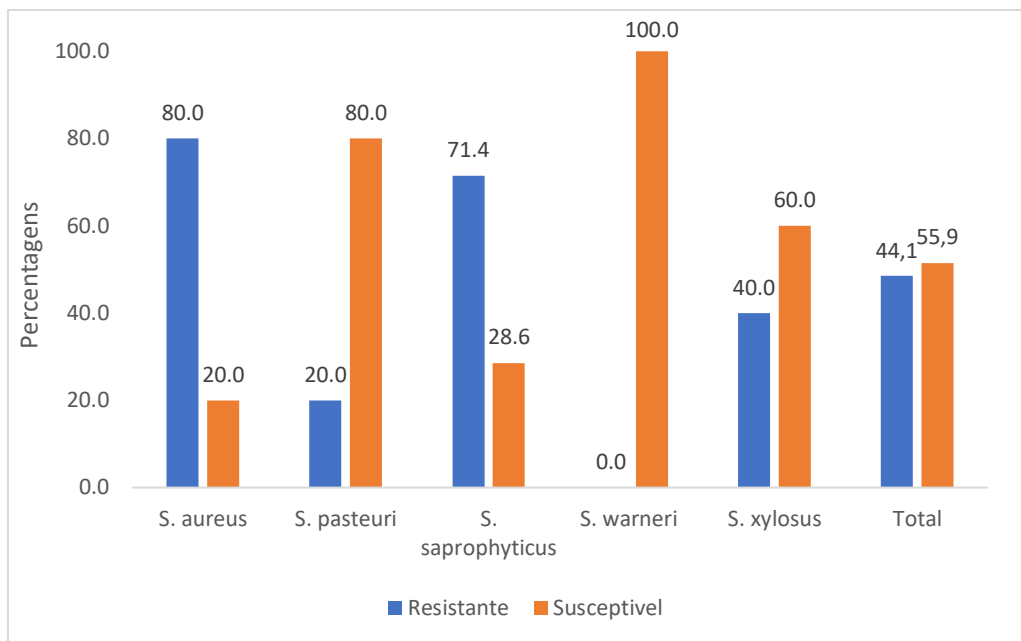


Figura 5 - Percentagem de isolados de *Staphylococcus* resistentes e suscetíveis ao antibiótico meticilina

### 3.2. Avaliação da capacidade de formação de biofilme em três tipos de superfícies

Para a avaliação da capacidade de formação de biofilme em três diferentes materiais, foram utilizados 18 isolados de *Staphylococcus* spp. (oito SCP e 10 SCN). Os valores das contagens (Log (UFC/cm<sup>2</sup>)) obtidos nos biofilmes estão apresentados na tabela 2.

No método de enumeração celular em aço inoxidável, a capacidade de formação de biofilme dos isolados de SCP (Log UFC/cm<sup>2</sup>) variou entre  $4,58 \pm 0,02$  a  $6,86 \pm 0,02$ . Nos isolados de SCN esta variação foi de  $4,30 \pm 0,04$  a  $6,97 \pm 0,01$  (Tabela 2). Nos biofilmes produzidos em superfície de vidro, foram obtidas contagens entre  $6,30 \pm 0,01$  e  $7,66 \pm 0,01$  log UFC/cm<sup>2</sup> em isolados de SCP e entre  $6,10 \pm 0,01$  e  $7,67 \pm 0,03$  log UFC/cm<sup>2</sup>, em isolados SCN (Tabela 2). Por outro lado, os dados de enumeração de células em poliestireno variaram entre  $7,04 \pm 0,13$  e  $8,47 \pm 0,53$  log UFC/cm<sup>2</sup> em isolados SCP e entre  $6,68 \pm 0,11$  e  $8,13 \pm 0,05$  log UFC/cm<sup>2</sup> em isolados SCN (Tabela 2).

Tabela 2 - Capacidade de formação de biofilme dos isolados de *Staphylococcus* expressa em Log (UFC/cm<sup>2</sup>)

Código do isolado	Espécie	Capacidade de formação de biofilme (log UFC/cm <sup>2</sup> )		
		Aço inoxidável	Vidro	Poliestireno
11	<i>S. aureus</i>	4,98 ± 0,01	6,99 ± 0,04	8,32 ± 0,02
15	<i>S. aureus</i>	6,86 ± 0,01	6,30 ± 0,02	8,47 ± 0,53
32	<i>S. aureus</i>	5,85 ± 0,06	6,36 ± 0,09	7,56 ± 0,11
42	<i>S. aureus</i>	6,26 ± 0,07	6,56 ± 0,07	8,05 ± 0,19
47	<i>S. aureus</i>	4,58 ± 0,02	6,30 ± 0,01	8,00 ± 0,01
49	<i>S. aureus</i>	6,24 ± 0,07	7,63 ± 0,04	7,04 ± 0,13
52	<i>S. aureus</i>	6,25 ± 0,01	7,66 ± 0,01	8,20 ± 0,47
48	<i>S. aureus</i>	5,53 ± 0,01	6,83 ± 0,01	7,83 ± 0,07
1	<i>S. warneri</i>	4,30 ± 0,04	6,41 ± 0,03	7,72 ± 0,04
18	<i>S. warneri</i>	6,49 ± 0,09	7,67 ± 0,03	8,04 ± 0,02
6	<i>S. saprophyticus</i>	6,32 ± 0,01	6,72 ± 0,10	7,66 ± 0,03
19	<i>S. saprophyticus</i>	5,32 ± 0,02	6,10 ± 0,01	7,68 ± 0,03
35	<i>S. saprophyticus</i>	4,85 ± 0,06	6,53 ± 0,01	7,60 ± 0,09
21	<i>S. xylosus</i>	6,28 ± 0,01	7,11 ± 0,01	7,40 ± 0,16
28	<i>S. xylosus</i>	4,85 ± 0,06	6,33 ± 0,02	7,37 ± 0,05
30	<i>S. xylosus</i>	5,41 ± 0,03	6,72 ± 0,03	8,13 ± 0,05
40	<i>S. pasteurii</i>	6,28 ± 0,01	7,13 ± 0,01	6,85 ± 0,11
43	<i>S. pasteurii</i>	6,97 ± 0,01	7,46 ± 0,01	7,97 ± 0,12

Nas três superfícies utilizadas, a comparação entre as médias dos isolados SCP e dos isolados SCN não apresentou diferenças significativas ( $p > 0,05$ ). No entanto, ao comparar as médias obtidas para a capacidade de formação de biofilme dos 18 isolados, nas três superfícies, os valores obtidos indicaram uma maior formação de biofilme (Log UFC/cm<sup>2</sup>) em poliestireno ( $p < 0,05$ ), em comparação com o biofilme produzido em aço inoxidável (Figura 6).

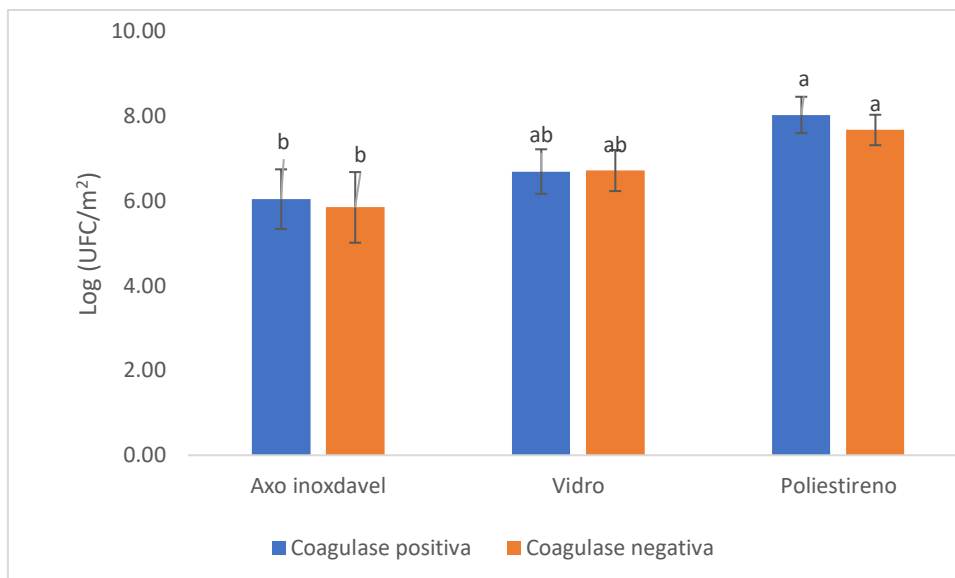


Figura 6 - Capacidade de formação de biofilme de SCP e de SCN avaliada nas três superfícies testadas. Letras diferentes nas colunas indicam diferenças significativas nas médias ( $p < 0,05$ ).

Os valores das contagens obtidos nas três superfícies (Log UFC/cm<sup>2</sup>) pelos 18 isolados foram transformados por ordem de classificação e submetidos à análise de componentes principais. O espaço tridimensional inicial (três variáveis - três superfícies) foi reduzido a um plano F1/F2 definido pelos dois componentes principais que cobrem 85,3% da variabilidade dos dados (51,5% no primeiro componente e 33,8% no segundo componente).

Quando os isolados foram projetados neste plano F1/F2, pôde observar-se que a capacidade de formação de biofilme não é determinada consistentemente nas três superfícies testadas. A capacidade de formação de biofilme em poliestireno está positivamente correlacionada com F2, indicando que valores superiores de F2 correspondem, em geral, a um aumento na capacidade de formação de biofilme dos isolados. Da mesma forma, variações no sentido oposto indicam um decréscimo na capacidade de formação de biofilme dos isolados. Isto pode ser ilustrado pelos isolados 15 (*S. aureus*) e 30 (*S. xylosus*) como bons produtores de biofilme e pelos isolados 49 (*S. aureus*) e 40 (*S. pasteurii*) como fracos produtores de biofilme (Fig. 7).

As contagens para avaliação da capacidade de formação de biofilme em vidro e em aço inoxidável estão positivamente correlacionadas entre si (Tabela 2) e com F1 (Fig. 7), indicando que valores superiores de F1 correspondem, em geral, a um aumento na capacidade de formação de biofilme dos isolados. Da mesma forma, variações no sentido oposto indicam um decréscimo na capacidade de formação de biofilme dos isolados. Isto pode ser ilustrado pelos isolados 18 (*S. warneri*) e 43 (*S. pasteurii*) como bons produtores de biofilme e pelos isolados 28 (*S. xylosus*) e 47 (*S. aureus*) como fracos produtores de biofilme (Fig. 7).

Por outro lado, o método de enumeração baseado na contagem de células nas superfícies de aço inoxidável está positivamente correlacionado com as duas componentes, F1 e F2, o que indica que valores maiores de F1 somados à contribuição de F2 correspondem a um aumento na capacidade de formação de biofilme (isolado 43 - *S. pasteurii*) (Fig. 7).

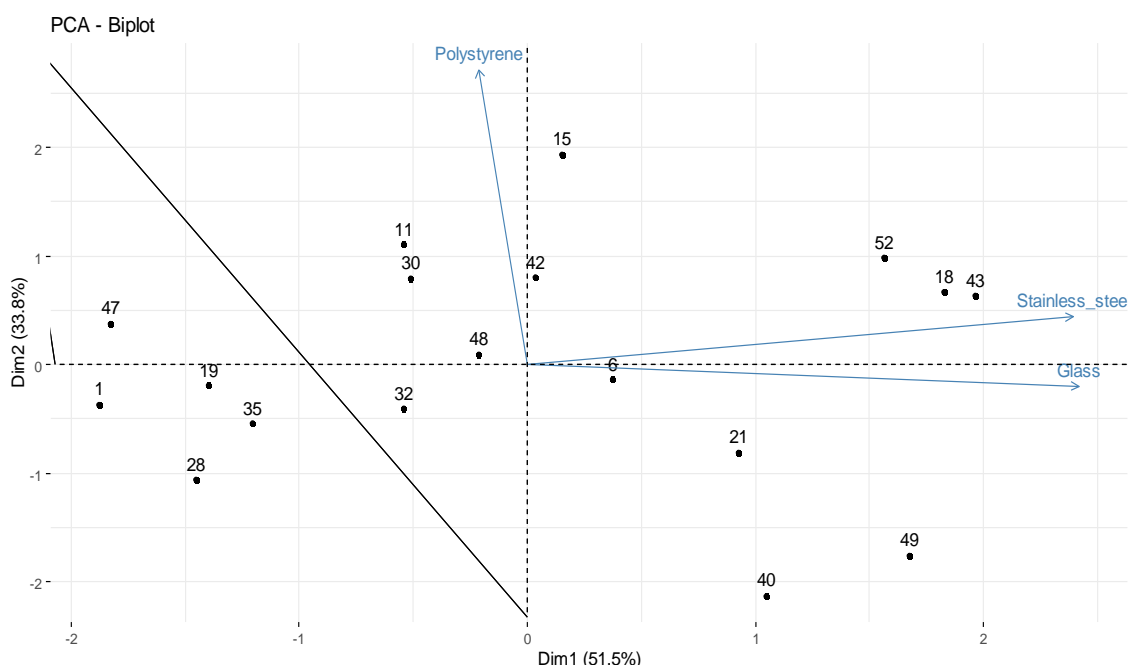


Figura 7 - Análise em componentes principais das metodologias utilizadas para avaliar a capacidade de formação de biofilme em três matérias de superfície: contagem em cupões de aço inoxidável (stainless steel); contagem em tubos de ensaio de vidro (Glass); contagem em tubos de ensaio de vidro (Glass); contagem em tubos de ensaio de vidro (Glass); contagem em Poliestireno (Polystyrene)

Neste estudo, observou-se uma baixa correlação entre as contagens em poliestireno e em vidro ( $r=-0,09$ ) e entre poliestireno e aço inoxidável ( $r=0,04$ ). Como já referido, os resultados das contagens em aço inoxidável e em vidro apresentaram a correlação mais elevada ( $r=0,54$ ) (Tabela 3) e significativa ( $p=0,02$ ).

Tabela 3 - . Coeficiente de correlação de ordem de classificação de Spearman emparelhado ( $r$ ) para métodos de análise de biofilme

	<b>Vidro</b>	<b>Poliestireno</b>
<b>Aço inoxidável</b>	$r = 0,54$	$r = 0,04$
	$p\text{-value} = 0,02$	$p\text{-value} = 0,86$
<b>Poliestireno</b>	$r = -0,09$	
	$p\text{-value} = 0,72$	

### 3.3. Avaliação da suscetibilidade dos biofilmes a metilina

Comparando os biofilmes iniciais com os biofilmes após a exposição à metilina, verificaram-se reduções que variaram entre 1,5 e 2,3 Log UFC/cm<sup>2</sup>, sendo, portanto, inferior a 3 log definidos como a linha de corte para ser considerado como eficaz na redução do biofilme (Fig. 8). Na concentração mais baixa (2µg/ml), as espécies *S. pasteurii* e *S. saprophyticus* tiveram a menor redução. Nas concentrações 4 e 8 µg/ml foram verificadas diferenças significativas entre as espécies *S. saprophyticus* e *S. pasteurii* com as outras três espécies (*S. aureus*, *S. warneri* e *S. xylosum*), sendo que a menor redução foi para a espécie *S. saprophyticus*, como verificado na concentração 2µg/ml (Fig. 8). Nas concentrações mais elevadas (16 e 32 µg/ml) verificou-se um aumento de 0.5log na redução para a espécie *S. pasteurii*, passando esta a ter uma redução significativamente superior as espécies *S. aureus*, *S. saprophyticus* e *S. xylosum* (Fig.8).

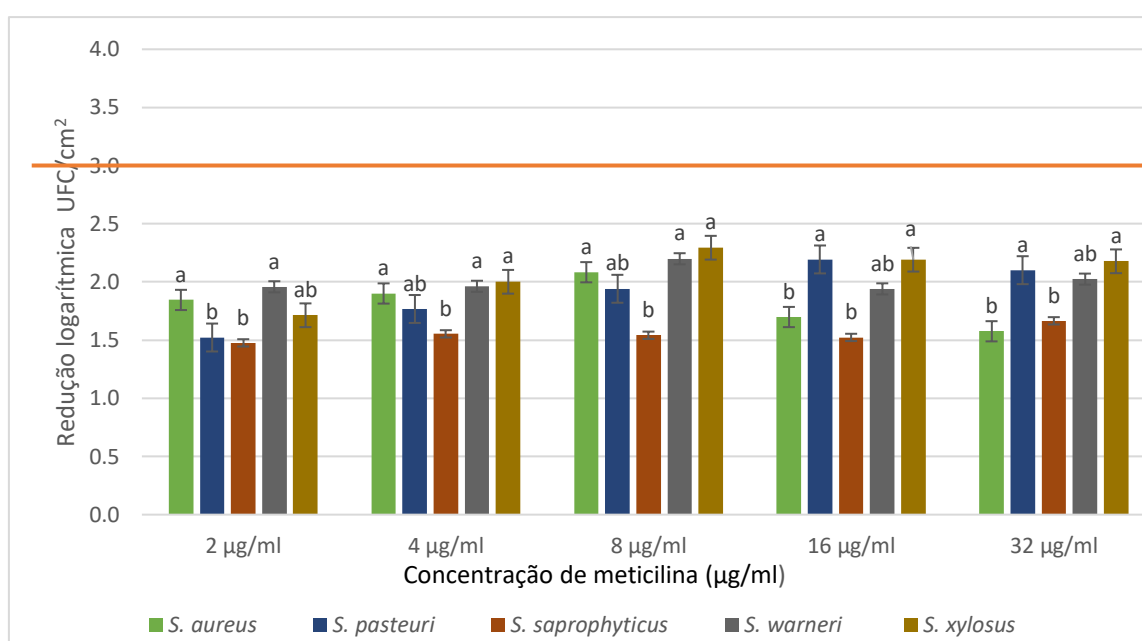


Figura 8 - Reduções logarítmicas (Log UFC/cm<sup>2</sup>) obtidas após exposição dos biofilmes de diferentes espécies de *Staphylococcus* a cinco concentrações de metilina, durante 24 h a 37 °C. O antibiótico seria considerado eficaz na erradicação do biofilme se se verificasse uma redução de 3 log UFC/cm<sup>2</sup> nas contagens. Para cada concentração de metilina, diferentes letras nas colunas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). Foram realizadas pelo menos duas réplicas biológicas, com duas réplicas técnicas cada.

## 4. Discussão

Neste estudo, foi caracterizada a capacidade de formação de biofilme de isolados de *Staphylococcus* em três superfícies diferentes (vidro, aço inoxidável e poliestireno). Em poliestireno os isolados, CPS e CNS, apresentaram maior quantidade de biofilme produzido ( $p \leq 0.05$ ) em comparação com o biofilme produzido em aço inoxidável. No entanto, para cada

superfície, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre CPS e CNS ( $p \geq 0,05$ ). A maior correlação encontrada e significativa foi entre as contagens obtidas pelos isolados em aço inoxidável e em vidro (0,54). Os dados dos métodos Vidro e Poliestireno apresentaram a menor correlação (-0,09). Estes materiais possuem diferentes propriedades físico-químicas que influenciam a aderência das bactérias. O poliestireno é mais hidrofóbico do que o aço inoxidável e o vidro e apresenta baixa energia superficial. Enquanto o aço inoxidável e o vidro são moderadamente hidrofílicos e tem uma leve carga negativa (Lourenço et al 2012; Nauruzbayeva et al. 2020; Bernardes et al. 2010). Portanto, superfícies de poliestireno, que são naturalmente hidrofóbicas, promovem maior aderência dos microrganismos quando comparadas a outras superfícies hidrofílicas, como o aço inoxidável e o vidro (Kim, et al., 2022).

Vários autores avaliaram a implicação da hidrofobicidade dos materiais na formação de biofilme (Frade & Arthington-Skaggs, 2011; Koseki et al., 2014; Subbiahdoss et al., 2010; Wagner, Aytac & Hänsch, 2011). Num estudo realizado por Koseki et al. (2014) usando *S. epidermidis* a diminuição da formação de biofilme na liga de cobalto-cromo-molibdênio (Co-Cr-Mo) foi atribuída ao seu aumento de hidrofobicidade (Koseki et al., 2014; Wagner, Aytac & Hänsch, 2011). Da mesma forma, alguns estudos afirmam que a hidrofobicidade tem apenas um impacto residual na formação do biofilme, como mostrado pelo fato de que a formação do biofilme de *S. epidermidis* não ter sido significativamente alterada por diferenças na molhabilidade da superfície (Subbiahdoss et al., 2010). Outros fatores determinantes que influenciam a capacidade de aderência das células e a produção de biofilme são as características dos materiais como a sua rugosidade (Van Houdt & Michiels, 2010). Assim, superfícies lisas drenam e secam mais rapidamente, facilitando a limpeza e a desinfecção. Portanto, a rugosidade da superfície influencia significativamente na aderência bacteriana e a subsequente formação de biofilme. Superfícies rugosas fornecem proteção às bactérias das forças de remoção, ou seja, dos processos de limpeza, e fornecem uma superfície global maior, disponível para colonização.

Por outro lado, as interações eletrostáticas que se estabelecem entre as superfícies e as células microbianas ocorrem devido à formação de uma dupla camada eletrostática em cada superfície. A formação dessa dupla camada depende da força iônica e do pH do meio circundante, embora as células se liguem a superfícies com cargas opostas. Por exemplo, *S. aureus* adere mais às superfícies carregadas positivamente do que às carregadas negativamente, como o aço inoxidável (Giaouris, et al., 2014; Frank, 2001)

Neste estudo, os 18 isolados de *Staphylococcus* (CPS e CNS) apresentaram similar capacidade de formação de biofilme. Por outro lado, a capacidade de formação de biofilme não parece estar

relacionada com a resistência à meticilina, visto que foram encontrados isolados considerados como bons formadores entre os isolados resistentes e suscetíveis a meticilina (Tabela 1 e figura 8).

Esses resultados corroboram com os resultados obtidos por Smith et al. (2008) que também não encontraram em *S. aureus* correlação entre a suscetibilidade à meticilina e a formação de biofilme. Entretanto, vários estudos sugerem que a resistência à meticilina contribuiu para a persistência dos biofilmes (Silva et al., 2022). Da Fonseca Baltistão et al. (2016) mostraram que as estirpes de *S. aureus* caracterizadas como fortes produtoras de biofilme eram portadoras de genes que codificaram fatores de resistência a meticilina. O mesmo tinha sido sugerido anteriormente por Lim et al. (2013) que referem resistência a meticilina como uma predisposição a formação de biofilme em isolados de *S. aureus*.

A MIC da meticilina variou de 1 µg/mL a > 32 µg/mL, com 13 dos 34 isolados apresentando não suscetibilidade (MICs superiores a 4 µg/mL). Em 20 dos 34 isolados, o valor de MBC foi o dobro do valor de MIC. De facto, Macia et al. (2014) concluem que a maioria dos antibióticos mostra para o valor de MBC um aumento de concentração igual ou superior a duas vezes o valor de MIC (Macia, Rojo-Molinero & Oliver, 2014). Neste estudo, não foi possível determinar a concentração de meticilina necessária à remoção do biofilme. Vários fatores têm sido sugeridos para explicar a extraordinária resistência das bactérias do biofilme aos antibióticos, de entre eles estão as baixas taxas metabólicas e as reduzidas taxas de crescimento das bactérias do biofilme, particularmente aquelas profundamente internalizadas no biofilme. Também a ativação dos mecanismos de resistência a antibióticos e dos mecanismos de defesa do hospedeiro, podem tornar as células do biofilme entre 10 e 1 000 vezes mais resistentes do que as respetivas células planctónicas (Silva et al., 2022).

Por outro lado, a própria matriz do biofilme pode impedir que os antimicrobianos entrem e atinjam os seus alvos por diferentes mecanismos como, a modificação/degradação do antimicrobiano, a tolerância, a quelação e/ou a precipitação do antibiótico. No entanto, antibióticos como as fluoroquinolonas, a rifampicina e a ampicilina que têm boa capacidade de penetração na matriz do biofilme, também não conseguem erradicar as bactérias do biofilme (Lebeaux et al., 2014). No entanto, mesmo no caso de compostos com baixa difusão nos biofilmes, a maioria dos antibióticos acaba mesmo por atingir todas as bactérias do biofilme, embora com tempos de ação e eficiência diferentes (Maya et al., 2007).

Silva et al. (2022) avaliaram a remoção de biofilmes em 12 espécies de SCN, através da exposição à tetraciclina e à amicacina, em concentrações de MIC e de 10 MIC, e concluíram que nenhuma

das concentrações dos dois antimicrobianos testados, foi capaz de eliminar os biofilmes de *Staphylococcus*. Vários autores (Anderl et al., 2000; Rodríguez-Martínez et al., 2007; Walters et al., 2003; Zheng & Stewart, 2002) sugeriram que a redução da penetração de antibióticos não pode explicar completamente a resistência a antibióticos de biofilmes. Outros mecanismos que explicam a resistência e tolerância a antibióticos em biofilmes podem estar relacionados com células persistentes e respostas adaptativas (Singh et al., 2017). Antibióticos como fluoroquinolonas, rifampicina e ampicilina têm boa penetração na matriz do biofilme, embora não possam erradicar as bactérias do biofilme (reduções  $\geq 3 \log \text{ UFC/cm}^2$ ) (Lebeaux et al., 2014). Além disso, mesmo no caso de compostos com baixa difusão nos biofilmes, todos acabam alcançando as bactérias do biofilme, embora com tempos de ação e eficiência diferentes (Maya et al., 2007). Høiby et al. (2015), sugerem o uso da combinação de várias estratégias para a erradicação de biofilmes de *S. aureus*, incluindo a remoção física precoce de materiais colonizados ou a aplicação local de elevadas doses de quimioterapia antibacteriana.

## 5. Conclusões e perspectivas futuras

O estudo de patógenos de origem alimentar com capacidade de formar biofilmes tem sido fundamental para a segurança alimentar e, conseqüentemente, para a saúde do consumidor. Falhas nos procedimentos de limpeza e higienização levam à aderência microbiana e, em última instância, à formação de biofilmes em superfícies e equipamentos, resultando na contaminação e recontaminação de alimentos e bebidas. Desta forma, entender o conceito de biofilme microbiano, bem como aspectos relevantes relacionados com a sua estrutura, composição e formação são fundamentais para desenvolver estratégias de controle eficazes.

Este estudo procurou dar ênfase à importância de *Staphylococcus* de origem alimentar bem como à importância de uma regulamentação mais rigorosa da qualidade microbiológica dos alimentos vendidos nas ruas (*street food*). Os resultados aqui apresentados mostram que todos os isolados têm a capacidade de formar biofilmes, em diferentes tipos de materiais. Apesar de não ter sido encontrada uma associação entre a capacidade de formação de biofilme e a resistência antimicrobiana, este trabalho reforça resultados anteriores, ao mostrar que, no estado de biofilme, os isolados são altamente resistentes à metilina. Portanto, é urgente e necessária a investigação sobre novas classes de antimicrobianos ou alternativas aos atuais antimicrobianos. Os isolados analisados neste trabalho, com origem em *street food*, apresentaram capacidade de formação de biofilme e elevada resistência à metilina, podendo representar uma ameaça à saúde pública. Reforça-se, assim, a necessidade de implementação de boas práticas de higiene na produção e comercialização dos alimentos vendidos nas ruas.

## 6. Bibliografia

- Abdulgader, S. M., Shittu, A. O., Nicol, M. P., & Kaba, M. (2015). Molecular epidemiology of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Africa: A systematic review. *Frontiers in Microbiology*, 6(APR), 348. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00348>
- Ait Ouali, F., Al Kassaa, I., Cudennec, B., Abdallah, M., Bendali, F., Sadoun, D., Chihib, N. E., & Drider, D. (2014). Identification of lactobacilli with inhibitory effect on biofilm formation by pathogenic bacteria on stainless steel surfaces. *International Journal of Food Microbiology*, 191, 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.011>
- Anderl, J. N., Franklin, M. J., & Stewart, P. S. (2000). Role of Antibiotic Penetration Limitation in *Klebsiella pneumoniae* Biofilm Resistance to Ampicillin and Ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(7), 1818–1824. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.7.1818-1824.2000>
- Ball, A. L., Augenstein, E. D., Wienclaw, T. M., Richmond, B. C., Freestone, C. A., Lewis, J. M., Thompson, J. S., Pickett, B. E., & Berges, B. K. (2022). Characterization of *Staphylococcus aureus* biofilms via crystal violet binding and biochemical composition assays of isolates from hospitals, raw meat, and biofilm-associated gene mutants. *Microbial Pathogenesis*, 167(April), 105554. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105554>
- Berglund, C., Prévost, G., Laventie, B. J., Keller, D., & Söderquist, B. (2008). The genes for Panton Valentine leukocidin (PVL) are SCNerved in diverse lines of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Microbes and Infection*, 10(8), 878–884. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.04.018>
- Bernardes PC, de Andrade NJ, Ferreira SO, de Sá JP, Araújo EA, Delatorre DM, Luiz LM. Assessment of hydrophobicity and roughness of stainless steel adhered by an isolate of *Bacillus cereus* from a dairy plant. *Braz J Microbiol*. 41(4) 2010:984-92. doi: 10.1590/S1517-838220100004000017.
- Castanheira, Bruno Alexandre Martins Guerreiro - Mecanismos de resistência a antibióticos. Dissertação de Mestrado, Lisboa, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde. 2013) 42.
- Castro, A., Komora, N., Ferreira, V., Lira, A., Mota, M., Silva, J., & Teixeira, P. (2016). Prevalence of *Staphylococcus aureus* from nares and hands on health care professionals in a Portuguese Hospital. *Journal of Applied Microbiology*, 121(3), 831–839. <https://doi.org/10.1111/jam.13186>
- Chambers, H. F., & DeLeo, F. R. (2009). Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature Reviews Microbiology*, 7(9), 629–641. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2200>
- Chen, L. F. (2013). The changing epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: 50 years of a superbug. *American Journal of Infection Control*, 41(5), 448–451. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2012.06.013>
- Cho, J. A., Roh, Y. J., Son, H. R., Choi, H., Lee, J. W., Kim, S. J., & Lee, C. H. (2022). Assessment of the biofilm-forming ability on solid surfaces of periprosthetic infection-associated pathogens. *Scientific Reports*, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-22929-z>
- Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M., & Beachey, E. H. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue

- culture plates: A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*, 22(6), 996–1006.  
<https://doi.org/10.1128/jcm.22.6.996-1006.1985>
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2018). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 13th ed. CLSI standard M02. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. In *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 13th ed. CLSI standard M02. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.*
- Corte, L., Pierantoni, D. C., Tascini, C., Roscini, L., & Cardinali, G. (2019). Biofilm specific activity: A measure to quantify microbial biofilm. *Microorganisms*, 7(3), 1–14.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms7030073>
- Da Fonseca Batista, D. W., de Campos, P. A., Camilo, N. C., Royer, S., Araújo, B. F., Naves, K. S. C., Martins, M., Pereira, M. O., Henriques, M., Gontijo-Filho, P. P., Botelho, C., Oliveira, R., & Ribas, R. M. (2016). Biofilm formation of Brazilian methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: Prevalence of Biofilm determinants and clonal profiles. *Journal of Medical Microbiology*, 65(4), 286–297. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000228>
- Dancer, S. J. (2008). The effect of antibiotics on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(2), 246–253.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dkm465>
- Dancer, S. J. (2022). How Do Biofilms Affect Surface Cleaning in Hospitals? *Hygiene*, 2(3), 132–135. <https://doi.org/10.3390/hygiene2030011>
- David, M. Z., & Daum, R. S. (2010). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and clinical SCNequences of an emerging epidemic. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(3), 616–687. <https://doi.org/10.1128/CMR.00081-09>
- Deurenberg, R. H., & Stobberingh, E. E. (2008). The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution*, 8(6), 747–763.  
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.07.007>
- Deurenberg, R. H., Vink, C., Kalenic, S., Friedrich, A. W., Bruggeman, C. A., & Stobberingh, E. E. (2007). The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*, 13(3), 222–235. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01573.x>
- El-Nagdy, A. H., Abdel-Fattah, G. M., & Emarah, Z. (2020). Detection and control of biofilm formation by *staphylococcus aureus* from febrile neutropenic patient. *Infection and Drug Resistance*, 13, 3091–3101. <https://doi.org/10.2147/IDR.S259914>
- Falagas, M. E., Karageorgopoulos, D. E., Leptidis, J., & Korbila, I. P. (2013). MRSA in Africa: Filling the Global Map of Antimicrobial Resistance. *PLoS ONE*, 8(7), e68024.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068024>
- Ferreira, C., Pereira, A. M., Melo, L. F., & Simões, M. (2010). Advances in industrial biofilm control with micro-nanotechnology. *Applied Microbiology*, May 2014, 845–854.
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563–575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Frade, J.P.; Arthington-Skaggs, B.A. Effect of Serum and Surface Characteristics on *Candida Albicans* Biofilm Formation. *Mycoses* **2011**, 54, e154–e162, doi:10.1111/j.1439-

0507.2010.01862.x.

- Frank, J. (2001). Microbial Attachment to Food and Food Contact Surfaces. *Adv Food Nutr Res*, 43, 319–370. doi:10.1016/S1043-4526(01)43008-7
- Garoy, E. Y., Gebreab, Y. B., Achila, O. O., Tekeste, D. G., Kesete, R., Ghirmay, R., Kiflay, R., & Tesfu, T. (2019). Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA): Prevalence and Antimicrobial Sensitivity Pattern among Patients - A Multicenter Study in Asmara, Eritrea. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/8321834>
- Giaouris, E., Heir, E., Hébraud, M., Chorianopoulos, N., Langsrud, S., Mørretrø, T., . . . Nychas, G. (2014). Attachment and Biofilm Formation by Foodborne Bacteria in Meat Processing Environments: Causes, Implications, Role of Bacterial interaction and control by alternative novel methods. *Meat Sci*, 97, 298--309. doi:10.1016/J.MEATSCI.2023.05.023.
- Gonçalves, A. I. D. (2017). *estirpes persistentes de Listeria monocytogenes Ana Isabel Dias Gonçalves Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar.*
- Grundmann, H.; Aires-de-Sousa, M.; Boyce, J.; Tiemersma, E. Emergence and resurgence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus as a public-health threat. *Lancet* 2006, 368, 874–885.
- Guo, Y., Song, G., Sun, M., Wang, J., & Wang, Y. (2020). Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in Staphylococcus aureus. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 107. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00107>
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 95–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>
- Harris, L. G., Foster, S. J., Richards, R. G., Lambert, P., Stickler, D., & Eley, A. (2002). An introduction to Staphylococcus aureus, and techniques for identifying and quantifying S. aureus adhesins in relation to adhesion to biomaterials: Review. *European Cells and Materials*, 4, 39–60. <https://doi.org/10.22203/ecm.v004a04>
- Hassoun, A., Linden, P. K., & Friedman, B. (2017). Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations-a review of recent developments in MRSA management and treatment. *Critical Care*, 21(211), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13054-017-1801-3>
- Høiby, N., Bjarnsholt, T., Moser, C., Bassi, G. L., Coenye, T., Donelli, G., Hall-Stoodley, L., Holá, V., Imbert, C., Kirketerp-Møller, K., Lebeaux, D., Oliver, A., Ullmann, A. J., Williams, C., ESCMID Study Group for Biofilms (ESGB), & SCNUlting External Expert Werner Zimmerli. (2015). ESCMID\* guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clinical Microbiology and Infection*, 21(S1), S1–S25. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2014.10.024>
- Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, 33.
- Kim, J.-H., Lee, E.-S., Song, K.-J., Kim, B.-M., Ham, J.-S., & Oh, M.-H. (2022). Development of Desiccation-Tolerant Probiotic Biofilms Inhibitory for Growth of Foodborne Pathogens on Stainless Steel Surfaces. *Foods*, 11, 831. doi:doi:10.3390/foods11060831

- Kirmusaoglu, S. (2016). Staphylococcal Biofilms: Pathogenicity, Mechanism and Regulation of Biofilm Formation by Quorum-Sensing System and Antibiotic Resistance Mechanisms of Biofilm-Embedded Microorganisms. *Microbial Biofilms - Importance and Applications*. Obtido em 2022, de <http://dx.doi.org/10.5772/62943>
- Kon, K., & Rai, M. (2016). *Antibiotic Resistance: Mechanisms and New Antimicrobial Approaches*. ELSEVIER.
- Koseki, H.; Yonekura, A.; Shida, T.; Yoda, I.; Horiuchi, H.; Morinaga, Y.; Yanagihara, K.; Sakoda, H.; Osaki, M.; Tomita, M. Early Staphylococcal Biofilm Formation on Solid Orthopaedic Implant Materials: In Vitro Study. *PLoS One* **2014**, *9*, e107588, doi:10.1371/journal.pone.0107588.
- Kranjec, C., Angeles, D. M., Mârli, M. T., Fernández, L., García, P., Kjos, M., & Diep, D. B. (2021). Staphylococcal biofilms: Challenges and novel therapeutic perspectives. *Antibiotics*, *10*(2), 1–30. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020131>
- Lebeaux, D., Ghigo, J.-M., & Beloin, C. (2014). Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *78*(3), 510–543. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00013-14>
- Lim, Y., Shin, H. J., Kwon, A. S., Reu, J. H., Park, G., & Kim, J. (2013). Predictive genetic risk markers for strong biofilm-forming *Staphylococcus aureus*: FnbB gene and SCCmec type III. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *76*(4), 539–541. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.04.021>
- Lourenço, A., Rego, F., Brito, L., & Frank, J. F. (2012). Evaluation of methods to assess the biofilm-forming ability of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, *75*(8), 1411–1417. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-464>
- Lowy, F. D. (2003). Antimicrobial resistance: The example of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation*, *111*(9), 1265–1273. <https://doi.org/10.1172/JCI18535>
- Macia, M.D.; Rojo-Molinero, E.; Oliver, A. Antimicrobial Susceptibility Testing in Biofilm-Growing Bacteria. *Clinical Microbiology and Infection* **2014**, *20*, 981–990, doi:10.1111/1469-0691.12651.
- Martins, A., & Cunha, M. D. L. R. S. (2007). Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci: Epidemiological and molecular aspects. *Microbiology and Immunology*, *51*(9), 787–795. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2007.tb03968.x>
- Masimen, M. A., Harun, N. A., Maulidiani, M., & Ismail, W. I. (2022). Overcoming Methicillin-Resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) Using Antimicrobial Peptides-Silver Nanoparticles. *Antibiotics*, *11*(951). doi:<https://doi.org/10.3390/antibiotics11070951>
- Maya, I. D., Carlton, D., Estrada, E., & Allon, M. (2007). Treatment of Dialysis Catheter-Related *Staphylococcus aureus* Bacteremia With an Antibiotic Lock: A Quality Improvement Report. *American Journal of Kidney Diseases*, *50*(2), 289–295. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2007.04.014>
- Nakanishi, E. Y., Palacios, J. H., Godbout, S., & Fournel, S. (2021). Interaction between biofilm formation, surface material and cleanability SCNidering different materials used in pig facilities—an overview. *Sustainability (Switzerland)*, *13*(11). <https://doi.org/10.3390/su13115836>
- Nauruzbayeva, J., Sun, Z., Gallo, A. et al. Electrification at water–hydrophobe interfaces. *Nat*

Commun 11, 5285 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19054-8>

- Nickerson, E. K., West, T. E., Day, N. P., & Peacock, S. J. (2009). Staphylococcus aureus disease and drug resistance in resource-limited countries in south and east Asia. *The Lancet Infectious Diseases*, 9(2), 130–135. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70022-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70022-2)
- Oliveira, J. (2021). Caracterização de Staphylococcus de origem alimentar: Resistência a antimicrobianos e pesquisa de genes virulentos. Lisboa, Portugal: Instituto Superior de Agronomia. Oliveira MMM, Brugnera DF, Piccoli RH (2010). Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. *Rev Inst Adolfo Lutz*. São Paulo; 69(3):277-84.
- Pantarella, F., Valenti, P., Natalizi, T., Passeri, D., & Berlutti, F. (2013). Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. *Annali Di Igiene : Medicina Preventiva e Di Comunità*, 25(1), 31–42. <https://doi.org/10.7416/ai.2013.1904>
- Peeters, E., Nelis, H. J., & Coenye, T. (2008). Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods*, 72(2), 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.11.010>
- Periasamy, S., Joo, H. S., Duong, A. C., Bach, T. H. L., Tan, V. Y., Chatterjee, S. S., Cheung, G. Y. C., & Otto, M. (2012). How Staphylococcus aureus biofilms develop their characteristic structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(4), 1281–1286. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115006109>
- Public Health England, & National Health Service. (2019). *ID 7 - Identification of Staphylococcus species, Micrococcus*. [https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/832968/ID\\_7\\_dj\\_.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/832968/ID_7_dj_.pdf)
- Rasheed, N. A., & Hussein, N. R. (2021). Staphylococcus aureus: An overview of Discovery, Characteristics, Epidemiology, Virulence Factors and Antimicrobial Sensitivity. *European Journal of Molecular and Clinical Medicine*, 8(3), 1160–1183.
- Reygaert, W. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3), 482–501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>
- Rodríguez-Martínez, J. M., Ballesta, S., & Pascual, Á. (2007). Activity and penetration of fosfomicin, ciprofloxacin, amoxicillin/clavulanic acid and co-trimoxazole in Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30(4), 366–368. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.05.005>
- Rybak, M. J., & LaPlante, K. L. (2005). Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus: A review. In *Pharmacotherapy* (Vol. 25, Issue 1, pp. 74–85). Pharmacotherapy. <https://doi.org/10.1592/phco.25.1.74.55620>
- Salamandane, A., Silva, A. C., Brito, L., & Malfeito-Ferreira, M. (2021). Microbiological assessment of street foods at the point of sale in Maputo (Mozambique). *Food Quality and Safety*, 5, 1–9. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyaa030>
- Schaumburg, F., Alabi, A. S., Peters, G., & Becker, K. (2014). New epidemiology of Staphylococcus aureus infection in Africa. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(7), 589–596. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12690>
- Schito, G. C. (2006). The importance of the development of antibiotic resistance in Staphylococcus aureus. *Clinical Microbiology and Infection*, 12(SUPPL. 1), 3–8. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01343.x>

- Shanmughapriya, S., Manilal, A., Sujith, S., Selvin, J., Kiran, G. S., & Natarajaseenivasan, K. (2008). Antimicrobial activity of seaweeds extracts against multiresistant pathogens. *Annals of Microbiology*, *58*(3), 535–541. <https://doi.org/10.1007/BF03175554>
- Silva, V., Correia, E., Pereira, J. E., González-Machado, C., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Igrejas, G., & Poeta, P. (2022). Exploring the Biofilm Formation Capacity in *S. pseudintermedius* and Coagulase-Negative Staphylococci Species. *Pathogens*, *11*(6), 1–16. <https://doi.org/10.3390/pathogens11060689>
- Singh, S., Singh, S. K., Chowdhury, I., & Singh, R. (2017). Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents. *The Open Microbiology Journal*, *11*(1), 53–62. <https://doi.org/10.2174/1874285801711010053>
- Smith, K., Perez, A., Ramage, G., Lappin, D., Gemmell, C., & Lang, S. J. (2008). Biofilm Formation by Scottish Clinical Isolates of Staphylococcus Aureus. *Med Microbiol*, *57*, 1018–1023. doi:10.1099/jmm.0.2008/000968-0.
- Spratt, B. G. (2012). The 2011 Garrod Lecture: From penicillin-binding proteins to molecular epidemiology. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *67*(7), 1578–1588. <https://doi.org/10.1093/jac/dks109>
- Stefani, S., Chung, D. R., Lindsay, J. A., Friedrich, A. W., Kearns, A. M., Westh, H., & MacKenzie, F. M. (2012). Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): Global epidemiology and harmonisation of typing methods. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *39*(4), 273–282. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.09.030>
- Subbiahdoss, G.; Grijpma, D.W.; van der Mei, H.C.; Busscher, H.J.; Kuijper, R. Microbial Biofilm Growth versus Tissue Integration on Biomaterials with Different Wettabilities and a Polymer-Brush Coating. *J Biomed Mater Res A* **2010**, *9999A*, NA-NA, doi:10.1002/jbm.a.32731.
- Suhaili, Z., Lean, S. S., Yahya, A., Mohd Desa, M. N., Ali, A. M., & Yeo, C. C. (2014). Draft genome sequence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus KT/Y21, a sequence type 772 (ST772) strain isolated from a pediatric blood sample in Terengganu, Malaysia. *Genome Announcements*, *2*(2). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00271-14>
- Taylor, T. A., & Unakal, C. G. (Janeiro de 2022). Staphylococcus Aureus. *StatPearls*. Obtido em 29 de Agosto de 2022, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/>
- Turner, N. A., Sharma-Kuinkel, B. K., Maskarinec, S. A., Eichenberger, E. M., Shah, P. P., Carugati, M., Holland, T. L., & Fowler, V. G. (2019). Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: an overview of basic and clinical research. *Nature Reviews Microbiology*, *17*(4), 203–218. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0147-4>
- Van Houdt, R., & Michiels, C. (2010). Biofilm Formation and the Food Industry, a Focus on the Bacterial Outer Surface. *J Appl Microbiol*, *109*, 1117–1131. doi:doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04756.x.
- Wagner, C.; Aytac, S.; Hänsch, G.M. Biofilm Growth on Implants: Bacteria Prefer Plasma Coats. *Int J Artif Organs* **2011**, *34*, 811–817, doi:10.5301/ijao.5000061.
- Walters, M. C., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M. J., & Stewart, P. S. (2003). Contributions of Antibiotic Penetration, Oxygen Limitation, and Low Metabolic Activity to Tolerance of

*Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Ciprofloxacin and Tobramycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(1), 317–323. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.1.317-323.2003>

Witte, W. (2009). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: What do we need to know? *Clinical Microbiology and Infection*, 15(SUPPL. 7), 17–25. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.03097.x>

Yamamoto, T., Nishiyama, A., Takano, T., Yabe, S., Higuchi, W., Razvina, O., & Shi, D. (2010). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Community transmission, pathogenesis, and drug resistance. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 16(4), 225–254. <https://doi.org/10.1007/s10156-010-0045-9>

Zheng, Z., & Stewart, P. S. (2002). Penetration of Rifampin through *Staphylococcus epidermidis* Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(3), 900–903. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.3.900-903.2002>