

# **INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

### **CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE DESINFETANTES EM ISOLADOS BACTERIANOS AMBIENTAIS**

Trabalho submetido por  
**Maria Carolina da Silva Lourenço**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

**Julho de 2025**



# **INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

### **CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE DESINFETANTES EM ISOLADOS BACTERIANOS AMBIENTAIS**

Trabalho submetido por  
**Maria Carolina da Silva Lourenço**  
para a obtenção do grau de **Mestre** em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por  
**Prof. Doutora Lucinda Bessa**

**julho de 2025**



## **AGRADECIMENTOS**

Chegar até aqui foi um caminho desafiante, feito de esforço, persistência e, sobretudo, de pessoas que ao longo dos anos, me apoiaram, acompanharam e acreditaram em mim. A todas elas, o meu profundo agradecimento.

Em primeiro lugar, agradeço à minha orientadora, a Professora Lucinda Bessa, pela orientação, paciência e disponibilidade durante todo o desenvolvimento desta tese. O seu acompanhamento foi essencial para que este trabalho fosse possível.

Aos meus pais, Sofia e Luís não há palavras que façam justiça ao que sinto por vocês. Foram o meu chão nos momentos de queda e o meu impulso nos momentos de dúvida. Obrigada por cada gesto de amor, cada sacrifício, cada palavra de encorajamento, mesmo quando eu própria já não acreditava. Obrigada por me ensinarem o valor do trabalho, da humildade e da persistência. Esta conquista também é vossa, porque sem o vosso apoio eu não teria chegado aqui.

Às minhas irmãs, Matilde e Madalena que são parte do meu coração. Obrigada por estarem sempre lá, nas vitórias e nas derrotas, nos risos e nas lágrimas. O vosso apoio é um amor que me sustenta diariamente em tudo o que faço. Crescer convosco ao meu lado tornou tudo mais leve quando o caminho foi difícil.

Aos meus avós, Joaquim, Filomena e Celeste, agradeço a paciência e o orgulho com que sempre me acompanharam durante estes 5 anos.

Ao meu tio João, que sempre esteve presente com um carinho discreto, mas constante, com as palavras certas e os seus gestos silenciosos de apoio. Obrigada por acreditares em mim mesmo quando eu duvidava. Por me dares força nas entrelinhas e por seres uma presença firme e afetuosa ao longo desta jornada.

Gostaria também de agradecer ao meu Tio Vasco e Avô Carlos que, apesar de já não estarem cá, sei que de onde estiverem, olharam por mim com amor e orgulho.

Agradeço também ao meu Tio Márcio, que a vida me deu como família e o meu coração abraçou como tal. Obrigado por estares sempre lá, nas conquistas e até nos silêncios. A tua presença será sempre um dos pilares desta caminhada.

Às minhas afilhadas e afilhados, agradeço com o coração por me permitirem fazer parte da vossa vida, agradeço o apoio nos dias difíceis de estudo e por terem sido a minha força ao longo deste percurso. Cada passo que dou é também por vocês, para que saibam que é possível sonhar e alcançar.

À minha querida amiga Leonor, que me acompanha desde os tempos do secundário e com quem tenho o privilégio de terminar este ciclo tão marcante da vida. Agradeço-te por nunca deixares de estar presente, mesmo quando a vida nos afastava fisicamente. O teu apoio foi incondicional, contante e silenciosamente poderoso em todas as fases, em todas as versões de mim. É bonito, e raro, ver que continuamos lado a lado mesmo quando a distância nos tenta dizer o contrário. Obrigada por tudo.

Ao Daniel, meu amigo e vizinho, que me conhece há mais de uma década e cuja amizade tem sido um porto seguro, não só ao longo deste percurso, mas em tantos momentos da vida. Obrigada pela compreensão e paciência nas minhas ausências e, acima de tudo, pela presença constante sempre que mais precisei.

Um agradecimento especial aos meus explicadores Ana e José, que me acompanharam academicamente durante tantos anos. O vosso apoio e ensinamentos foram essenciais para o meu crescimento pessoal e académico.

Agradeço também à Professora Ana Margarida Amaral, a minha professora do 1º ciclo, que me inspirou a gostar de aprender e acreditou em mim quando tudo ainda estava a começar.

Por fim, e talvez mais importante de tudo, um agradecimento a mim própria. Por ter persistido, mesmo quando a vontade de desistir era grande. Por ter sido resiliente, por ter acreditado que era possível.

Como disse um grande homem que o meu pai me ensinou a admirar:

*“It ain` t about how hard you hit. It` s about how hard you can get hit and keep moving forward. That` s how winning is done”*

E eu continuei em frente.

Esta conquista é minha, mas também é de todos vós.

Obrigada.

## RESUMO

**Introdução:** Os biocidas aplicados em superfícies ajudam a prevenir infecções, mas o uso incorreto pode promover resistência antimicrobiana e disseminar patogênicos resistentes.

**Objetivos:** Isolar e caracterizar bactérias presentes em superfícies da Egas Moniz School of Health & Science, determinando os seus perfis de resistência a antibióticos; avaliar a eficácia antibacteriana de três desinfetantes utilizados na instituição.

**Materiais e métodos:** As amostras foram recolhidas com zaragoas embebidas em água peptonada, incubadas em meio de enriquecimento e posteriormente inoculadas em meios seletivos para isolamento de colónias. A identificação preliminar foi realizada através de testes fenotípicos e bioquímicos, sendo confirmada em alguns casos usando API® e, por PCR em tempo real (qPCR). A suscetibilidade dos isolados obtidos aos antibióticos foi avaliada por difusão em agar. A eficácia dos desinfetantes foi determinada através da concentração mínima inibitória (CMI), usando o método de microdiluição, com estirpes de referência e três isolados, um de *Escherichia coli* e dois de *Staphylococcus* spp.

**Resultados:** Foram obtidos 24 isolados: *E. coli* (n=3), *Pseudomonas aeruginosa* (n=2), *Staphylococcus* spp. (n=12, dos quais 9 eram manitol-negativo e coagulase-negativo) e *Enterococcus* spp. (n=7). A identificação definitiva foi levada a cabo para 5 isolados, sendo três *E. coli* e dois *Enterococcus faecium*. Observou-se baixa resistência a antibióticos, sem casos de multirresistência. O isolado de *E. coli* e os dois de *Staphylococcus* coagulase-negativo apresentaram suscetibilidade aos desinfetantes semelhante às estirpes de referência. O qPCR identificou genes de resistência à meticilina em alguns isolados, e excluiu a presença *S. aureus*. Os valores de CMI dos desinfetantes situaram-se dentro dos valores reportados na literatura para as espécies testadas.

**Conclusão:** Os resultados sugerem uma aplicação eficaz dos protocolos de desinfeção e uso criterioso de biocidas na instituição. Contudo, recomenda-se vigilância microbiológica contínua para deteção precoce de alterações nos perfis de resistência e na microbiota ambiental.

**Palavras-chave:** Biocidas; resistência antimicrobiana, desinfetantes, isolados ambientais.



## ABSTRACT

**Introduction:** Biocides applied to surfaces help prevent infections, but incorrect use can promote antimicrobial resistance and spread resistant pathogens.

**Objectives:** To isolate and characterise bacteria present on surfaces at the Egas Moniz School of Health & Science, determining their antibiotic resistance profiles; to evaluate the antibacterial efficacy of three disinfectants used at the institution.

**Materials and methods:** Samples were collected with swabs soaked in peptone water, incubated in enrichment medium and subsequently inoculated in selective media for colony isolation. Preliminary identification was performed using phenotypic and biochemical tests, confirmed in some cases using API® and real-time PCR (qPCR). The susceptibility of the isolates to antibiotics was assessed by agar diffusion. The efficacy of the disinfectants was determined by the minimum inhibitory concentration (MIC) using the microdilution method with reference strains and three isolates, one *Escherichia coli* and two *Staphylococcus* spp.

**Results:** Twenty-four isolates were obtained: *E. coli* (n=3), *Pseudomonas aeruginosa* (n=2), *Staphylococcus* spp. (n=12, of which 9 were mannitol-negative and coagulase-negative) and *Enterococcus* spp. (n=7). Definitive identification was carried out for 5 isolates, three of which were *E. coli* and two *Enterococcus faecium*. Low resistance to antibiotics was observed, with no cases of multidrug resistance. The *E. coli* isolate and the two coagulase-negative *Staphylococcus* isolates showed similar susceptibility to disinfectants as the reference strains. qPCR identified methicillin resistance genes in some isolates and ruled out the presence of *S. aureus*. The MIC values of the disinfectants were within the values reported in the literature for the species tested.

**Conclusion:** The results suggest effective application of disinfection protocols and judicious use of biocides in the institution. However, continuous microbiological surveillance is recommended for early detection of changes in resistance profiles and environmental microbiota.

**Keywords:** Biocides; Antimicrobial resistance, disinfectants, environmental isolates.



## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1. Agentes antimicrobianos .....</b>	<b>14</b>
1.1.1. Regulamentação dos produtos biocidas.....	14
1.1.2. Tipos de agentes biocidas.....	15
<b>1.2. Resistência antimicrobiana.....</b>	<b>18</b>
1.2.1. Mecanismos de resistência aos biocidas .....	21
<b>1.3. Biofilmes microbianos e resistência aos agentes antimicrobianos .....</b>	<b>22</b>
<b>1.4. One Health e a resistência antimicrobiana .....</b>	<b>23</b>
<b>2. MATERIAIS E METÓDOS .....</b>	<b>25</b>
<b>2.1. Colheita de amostras e obtenção de isolados.....</b>	<b>25</b>
<b>2.2. Coloração de Gram e observação microscópica .....</b>	<b>26</b>
<b>2.3. Teste da catalase e teste da coagulase .....</b>	<b>26</b>
<b>2.4. Identificação definitiva usando galeria de testes em miniatura (API®)..</b>	<b>27</b>
<b>2.5. Identificação molecular de <i>S. aureus</i> por qPCR.....</b>	<b>27</b>
<b>2.6. Determinação da suscetibilidade dos isolados aos antibióticos .....</b>	<b>28</b>
<b>2.7. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) dos</b>	
<b>desinfetantes .....</b>	<b>32</b>
2.7.1. Desinfetantes testados .....	32
2.7.2. Determinação da CMI pelo método da microdiluição.....	33
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
<b>3.1. Características dos isolados selecionados .....</b>	<b>37</b>
<b>3.2. Confirmação da identificação de alguns isolados .....</b>	<b>42</b>
<b>3.3. Exclusão molecular da presença de <i>S. aureus</i>.....</b>	<b>42</b>
<b>3.4. Perfis de suscetibilidade e resistência aos antibióticos.....</b>	<b>43</b>
<b>3.5. Valores de CMI dos desinfetantes contra isolados e estirpes de referência</b>	
<b>45</b>	
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>51</b>

<b>6. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>53</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>59</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Comparação de diferentes agentes biocidas, incluindo a sua ação, classificação química, mecanismo de ação, espectro de ação e observações relevantes para a sua utilização (Jones et al., 2021; McDonnel & Russell, 1999; Fernandes et al., 2024).....	16
<b>Tabela 2</b> - Características dos desinfetantes testados. ....	33
<b>Tabela 3</b> - Tabela resumo dos isolados selecionados. ....	37
<b>Tabela 4</b> - Resultados obtidos através da identificação definitiva dos isolados em galeria de API. ....	42
<b>Tabela 5</b> - Resultados obtidos do multiplex qPCR para os isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-negativo.....	43
<b>Tabela 6</b> - Perfis de suscetibilidade aos antibióticos para três isolados de <i>E. coli</i> . S: suscetível; I: intermédio; R: resistente.....	43
<b>Tabela 7</b> - Perfis de suscetibilidade aos antibióticos para dois isolados de <i>Enterococcus</i> spp.. Os valores dos halos de inibição são apresentados em mm. S: suscetível, I: intermédio, R: resistente.....	44
<b>Tabela 8</b> - Perfis de suscetibilidade aos antibióticos para 8 isolados de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativo. Os valores dos halos de inibição são apresentados em mm. S: suscetível, I: intermédio, R: resistente.....	45
<b>Tabela 9</b> - Atividade antibacteriana (valores de concentração mínima inibitória – CMI) de 3 desinfetantes contra <i>S. aureus</i> ATCC 6538 e <i>E. coli</i> ATCC 11105 e três isolados. ....	46



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Representação esquemática dos mecanismos de co-resistência, resistência cruzada e co-regulação (Murray et al., 2024).....	20
<b>Figura 2</b> - Representação esquemática da inoculação efetuada no meio de Mueller-Hinton agar, previamente à colocação dos discos com antibióticos.....	29
<b>Figura 3</b> - Representação esquemática da colocação dos discos de antibióticos para <i>Enterobacteriales</i> . Ampicilina 10 µg ( <b>AMP</b> ), Amoxicilina/ácido clavulânico 10-20µg ( <b>AMC</b> ), Aztreonam 30 µg ( <b>ATM</b> ), Cefepime 30 µg ( <b>FEP</b> ), Ceftazidime 10 µg ( <b>CAZ</b> ), Imipenem 10 µg ( <b>IPM</b> ), Ciprofloxacina 5µg ( <b>CIP</b> ), Amicacina 30 µg ( <b>AMK</b> ), Tigeciclina 15µg ( <b>TIG</b> ), Sulfametoxazol-Trimetoprim 1.25-23.75 µg ( <b>SXT</b> ).....	29
<b>Figura 4</b> - Representação esquemática da colocação dos discos de antibióticos para <i>Staphylococcus</i> spp. Sulfametoxazol-Trimetoprim 1.25-23.75 µg ( <b>SXT</b> ), Ciprofloxacina 5 µg ( <b>CIP</b> ), Cefoxitina 30 µg ( <b>FOX</b> ), Ceftarolina 5 µg ( <b>CBP</b> ), Levofloxacina 5 µg ( <b>LEV</b> ), Amicacina 30 µg ( <b>AMK</b> ), Tigeciclina 15 µg ( <b>TIG</b> ).....	30
<b>Figura 5</b> - Representação esquemática da colocação dos discos de antibióticos para <i>Enterococcus</i> spp. Sulfametoxazol-Trimetoprim 1.25-23.75 µg ( <b>SXT</b> ), Ciprofloxacina 5 µg ( <b>CIP</b> ), Levofloxacina 5 µg ( <b>LEV</b> ), Tigeciclina 15 µg ( <b>TIG</b> ), Imipenem 10 µg ( <b>IPM</b> ), Gentamicina 10 µg ( <b>CN</b> ), Vancomicina 30 µg ( <b>VA</b> ).....	30
<b>Figura 6</b> - Representação esquemática da medição das zonas de inibição. Fonte da imagem: American Society for Microbiology.....	31
<b>Figura 7</b> - Representação esquemática da realização do método da difusão em agar pela técnica de Kirby-Bauer.....	32
<b>Figura 8</b> - Representação esquemática do processo realizado para determinação da CMI pelo método da microdiluição. ....	35
<b>Figura 9</b> - Imagem representativa dos meios seletivos usados e das colónias selecionadas em cada um, correspondentes a isolados a estudar.....	41



## **LISTA DE ABREVIATURAS E SICLAS**

**AMC:** Amoxicilina/ácido clavulânico

**AMK:** Amicacina

**AMP:** Ampicilina

**ATM:** Aztreonam

**BEA:** Bile Esculine Azide Agar

**CAZ:** Ceftazidime

**CBP:** Ceftarolina

**CET:** Cetirimida Agar

**CIP:** Ciprofloxacina

**CMI:** Concentração mínima inibitória

**DGAV:** Direção Geral de Alimentação e Veterinária

**DGS:** Direção Geral de Saúde

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**ECN:** Estafilococos Coagulase-Negativo

**EPS:** Substâncias poliméricas extracelulares

**EUCAST:** *European Committe on Antimicrobial Susceptibility Testing*

**FEP:** Cefepime

**FOX:** Cefoxitina

**IPM:** Imipenem

**LEV:** Levofloxacin

**MHB:** Mueller Hinton Broth

**MK:** MacConkey Agar

**MRSA:** *Staphylococcus aureus* resistente à metilina

**MSA:** Manitol Salt Agar

**OMS:** Organização Mundial de Saude

**PCR:** Reação em cadeia da polimerase

**qPCR:** PCR em tempo real

**RNA:** cido ribonucleico

**SXT:** Sulfametoxazol-Trimetoprim

**TBX:** Tryptone bile X-glucuronide Agar

**THG:** Transmissão horizontal de genes

**TIG:** Tigeciclina

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de agentes biocidas em superfícies constitui uma etapa fundamental para a desinfecção e conseqüente controlo de infeções e prevenção da disseminação de agentes patogénicos em diversos contextos, nomeadamente na indústria alimentar e nos locais de prestação de cuidados de saúde (Jones et al., 2021).

O uso inadequado ou excessivo dos agentes antimicrobianos, nomeadamente antibióticos e biocidas, pode levar ao desenvolvimento de resistências por parte das bactérias, que desse modo persistem e continuam a proliferar e a disseminar-se, e a propagar as resistências adquiridas a outras bactérias, através da transmissão horizontal de genes (THG) (Lerminiaux & Cameron, 2018). Havendo oportunidade e condições propícias, as bactérias patogénicas que assim persistem, podem causar infeções.

Um estudo conduzido por Ghanem & Haddadin (2018), que avaliou a prevalência de resistência a antibióticos e biocidas em isolados ambientais de *Escherichia coli*, concluiu que 47,6% dos isolados eram multirresistentes, apresentando resistência a pelo menos um agente de três ou mais classes/categorias diferentes. Estes resultados destacam a necessidade de compreender mais aprofundadamente estes mecanismos de resistência e a sua disseminação.

A relação entre o uso de agentes antimicrobianos, o surgimento de resistências e os impactos sobre a saúde pública está inserida no conceito *One Health*, que destaca a interdependência entre a saúde humana, a saúde animal e o meio ambiente (Charron et al., 2023).

O presente estudo teve como objetivo avaliar uma dessas vertentes, a resistência antimicrobiana num ambiente particular, através da recolha de isolados de superfícies regularmente desinfetadas do Instituto Universitário Egas Moniz de forma a avaliar os perfis de resistência desses isolados quer aos antibióticos quer aos desinfetantes usados.

## **1.1. Agentes antimicrobianos**

Os agentes antimicrobianos podem apresentar dois tipos de ação antibacteriana, sendo classificados como bactericidas ou bacteriostáticos. Os agentes bactericidas, são agentes que com capacidade de matar os organismos bacterianos, enquanto, um agente bacteriostático é aquele que tem a capacidade de inibir o crescimento bacteriano, sem ter a capacidade de matar os organismos (Ishak et al., 2025). Podemos assim definir antibióticos como substâncias naturais ou sintéticas, com diferentes mecanismos de ação que se traduzem na capacidade de inibir o crescimento bacteriano de forma reversível ou irreversível. Biocida é uma denominação geral utilizada para descrever um agente químico, geralmente com largo espectro de ação, capaz de inativar os microrganismos (Jones et al., 2021). Os desinfetantes são agentes biocidas amplamente utilizados na desinfecção de superfícies, desde ambientes hospitalares até outros espaços públicos. Normalmente, estão presentes em formulações que incorporam uma variedade de compostos químicos, como álcoois, fenóis, iodo e cloro (Chen et al., 2021). A maioria dos desinfetantes demonstra atividade antimicrobiana de largo espectro, atuando em vários alvos inespecíficos, contrariamente aos mecanismos de ação dos antibióticos que atuam em alvos bacterianos específicos (McDonnell & Russell, 1999; Jones et al., 2021).

### **1.1.1. Regulamentação dos produtos biocidas**

O regulamento nº528/2012 do parlamento europeu e do conselho da União Europeia (EU) regula a disponibilização no mercado e a utilização de produtos biocidas no espaço económico europeu. Este estabelece regras para a aprovação de substâncias ativas utilizadas nos produtos biocidas, e regula a autorização do fornecimento e da utilização destes produtos (<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/ALL/?uri=celex:32012R0528>). Este regulamento proporciona, assim, um sistema harmonizado para a autorização de biocidas em todo o mercado europeu, fornecendo ainda uma lista de todas as substâncias ativas aprovadas na UE. Além disso, o regulamento contribui significativamente para a redução de ensaios em animais ao estabelecer a obrigatoriedade da partilha de dados sobre estudos realizados nos diferentes Estados-Membros. Esta medida evita a duplicação desnecessária de procedimentos, promovendo assim uma abordagem mais ética e eficiente na avaliação de produtos biocidas em toda a União Europeia.

A nível nacional, o Decreto-Lei nº140/2017 estabelece o quadro regulatório para a disponibilização e utilização de biocidas (<https://diariodarepublica.pt/dr/detalhe/decreto-lei/140-2017-114177787>). Este decreto-lei designa a Direção Geral de Saúde (DGS) como a autoridade coordenadora nacional e a Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) como uma das autoridades competentes. O decreto-lei impõe requisitos de segurança rigorosos, exigindo que os produtos biocidas sejam classificados, embalados e rotulados em conformidade com as normas europeias. Adicionalmente, cada produto deve ser acompanhado de uma ficha de dados de segurança e um resumo das características do produto, ambos em língua portuguesa, garantindo assim a compreensão clara das informações pelos utilizadores.

Esta legislação harmoniza as práticas nacionais com as diretrizes europeias, assegurando a segurança e eficácia dos produtos biocidas no mercado português, facilitando ao mesmo tempo a sua regulamentação e fiscalização pelas autoridades competentes.

### **1.1.2. Tipos de agentes biocidas**

Dependendo da superfície que pretendemos desinfetar e dos microrganismos que pretendemos eliminar existem variados agentes antibacterianos disponíveis, nomeadamente antissépticos e desinfetantes (Donaghy et al., 2018). Estes são ambos agentes biocidas, mas diferem na sua aplicação e modo de uso. Os antissépticos são substâncias especificamente formuladas para aplicação em tecidos vivos, como a pele humana, com o objetivo de destruir ou inibir o crescimento de microrganismos potencialmente patogénicos. Por outro lado, os desinfetantes são produtos destinados ao uso em superfícies e objetos inanimados, tendo como função reduzir a carga microbiana a níveis considerados seguros para a saúde humana. Embora ambos visem o controlo da carga microbiana, a distinção crucial reside na sua compatibilidade com tecidos vivos e na intensidade da sua ação antimicrobiana, sendo os desinfetantes geralmente mais agressivos e, por esse motivo, inadequados para uso direto no corpo humano (Jones et al., 2021).

A seleção do tipo de antisséptico e desinfetante utilizado deve estar diretamente relacionado com o objetivo da sua aplicação, e devem ser avaliadas inúmeras especificações, nomeadamente espectro da atividade antimicrobiana existente, tempo de

latência do produto utilizado (tempo necessário para que o produto atue e produza os resultados esperados), efeito residual após aplicação do agente, efeitos adversos existentes, bem como a compatibilidade com outros agentes utilizados (Donaghy, et al., 2018; Abreu et al., 2013).

Os biocidas têm diversos mecanismos de ação de forma a exercerem os seus efeitos nos microrganismos, envolvendo múltiplos alvos e vias, conduzindo a danos rápidos e irreversíveis. Contrariamente aos antibióticos, estes atuam simultaneamente em vários componentes celulares, aumentando assim a sua eficácia contra um amplo espectro de agentes patogénicos. Estes mecanismos incluem, principalmente:

1. Perturbação da integridade da membrana celular: Muitos biocidas, como a clorexidina, altera, a permeabilidade da membrana celular, comprometendo a sua função de barreira. Esta alteração leva à rutura da membrana e à consequente perda de material intracelular incluindo a degradação do DNA celular, o que compromete a viabilidade bacteriana (Fernandes et al., 2024).
2. Desnaturação de proteínas: Alguns biocidas desnaturam proteínas, interrompendo assim processos metabólicos essenciais para a replicação bacteriana (McDonnell, 2017).
3. Ação nos ácidos nucleicos: Certos biocidas têm como alvo os ácidos nucleicos, induzindo a degradação do material genético, que é fundamental para a viabilidade bacteriana (Jones et al., 2021).
4. Produção de radicais livres: Alguns biocidas induzem o stress oxidativo através da geração de radicais livres, que podem danificar proteínas, lípidos e ácidos nucleicos, resultando na morte celular (Fernandes et al., 2024).

Na Tabela 1 apresenta-se uma comparação detalhada das características dos biocidas mais utilizados.

**Tabela 1** - Comparação de diferentes agentes biocidas, incluindo a sua ação, classificação química, mecanismo de ação, espectro de ação e observações relevantes para a sua utilização (Jones et al., 2021; McDonnell & Russell, 1999; Fernandes et al., 2024).

Agente	Ação	Classificação Química	Mecanismo de ação	Espectro de ação	Observações
Alcoois (etanol, isopropanol)	Agente não oxidante	Álcool	Desnaturação de proteínas e dissolução de lípidos da membrana celular	Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, alguns vírus e fungos. Pouca ação contra esporos bacterianos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rápido início de ação</li> <li>- Baixo custo</li> <li>- Evapora rapidamente, não tem eficácia a 96% ou 100%</li> </ul>
Hipoclorito de sódio	Agente oxidante	Halogénio	Oxidação de componentes celulares (proteínas, ácidos nucleicos, etc.)	Amplo espectro: bactérias, vírus, fungos, micobactérias e alguns esporos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rápido início de ação</li> <li>- Eficaz contra biofilmes</li> <li>- Baixo custo</li> <li>- Corrosivo e instável sob luz, calor e pH</li> </ul>
Peróxido de hidrogénio	Agente oxidante	Peróxido	Geração de radicais livres que danificam componentes celulares (DNA, lípidos e proteínas)	Bactérias, vírus, fungos e esporos (em elevadas concentrações)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Instável e irritante</li> </ul>
Clorexidina	Agente não oxidante	Biguanida	Interação com a membrana celular, causando a sua permeabilização e precipitação do conteúdo celular	Boa atividade contra bactérias Gram-positivas e atividade moderada contra Gram-negativas,	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ação residual prolongada, pode ser afetada pelo pH</li> </ul>

				alguns vírus e fungos	
Compostos de amónio quaternário (cloreto de didecilmetilamónio)	Agente não oxidante	Surfactante catiónico	Desnaturação de proteínas	Boa atividade contra bactérias Gram-positivas e atividade moderada contra Gram-negativas, alguns vírus e fungos;	- Baixa toxicidade para a pele
Ácido peracético	Agente oxidante	Perácido	Oxidação de componentes celulares	Amplo espectro: bactérias, vírus, fungos e esporos bacterianos	- Corrosivo. Pode irritar a pele e as mucosas
Iodo e Iodóforos (iodopovidona)	Agente oxidante	Halogénio	Iodação de proteínas e ácidos nucleicos	Amplo espectro: bactérias, vírus, protozoários e alguns esporos bacterianos	- Necessita de algum tempo de contacto para ter a sua eficácia

## 1.2. Resistência antimicrobiana

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), “*A resistência antimicrobiana ocorre quando microrganismos como bactérias, vírus, parasitas ou fungos se tornam resistentes aos tratamentos antimicrobianos (antibióticos, antivirais, antiparasitários e antifúngicos) a que anteriormente eram suscetíveis. Como resultado,*

os tratamentos padrões tornam-se ineficazes, as infecções persistentes e podem propagar-se a outras pessoas” (<https://www.who.int/health-topics/antimicrobial-resistance>).

A resistência pode ser natural no agente patogénico, e, por sua vez, esta pode ser intrínseca, ou seja, é uma característica natural e partilhada pela espécie bacteriana que é independente do uso prévio de agentes antimicrobianos, ou induzida, onde o gene responsável pela resistência existe na bactéria, mas é apenas expresso após a exposição a agentes antimicrobianos (Zhang & Cheng, 2022).

A resistência pode ainda ser adquirida, devido a mutações no seu DNA cromossómico que lhes confere resistência a determinado agente, isto normalmente ocorre após exposição consecutiva a agente antimicrobianos (Zeng et al., 2022). Nas bactérias, é também bastante comum a aquisição de resistência a antibióticos, metais pesados e desinfetantes por meio de mecanismos de transferência horizontal de genes.

Interessantemente, evidência acumulada mostra que, não só os antibióticos, mas também os desinfetantes e os metais pesados, aumentam a propagação de resistências a antibióticos mesmo na ausência de pressão de seleção antibiótica, devido a fenómenos de co-seleção (Khan et al., 2016; Zeng et al., 2022). A co-seleção é o processo através do qual a exposição a agentes não-antibióticos pode favorecer a manutenção e propagação de genes de resistência a antibióticos (ARGs), mesmo na ausência de pressão seletiva direta por antibióticos. Esta ocorre frequentemente em ambientes contaminados por metais pesados, biocidas e fármacos não antibióticos, que podem atuar como agentes co-seletivos.

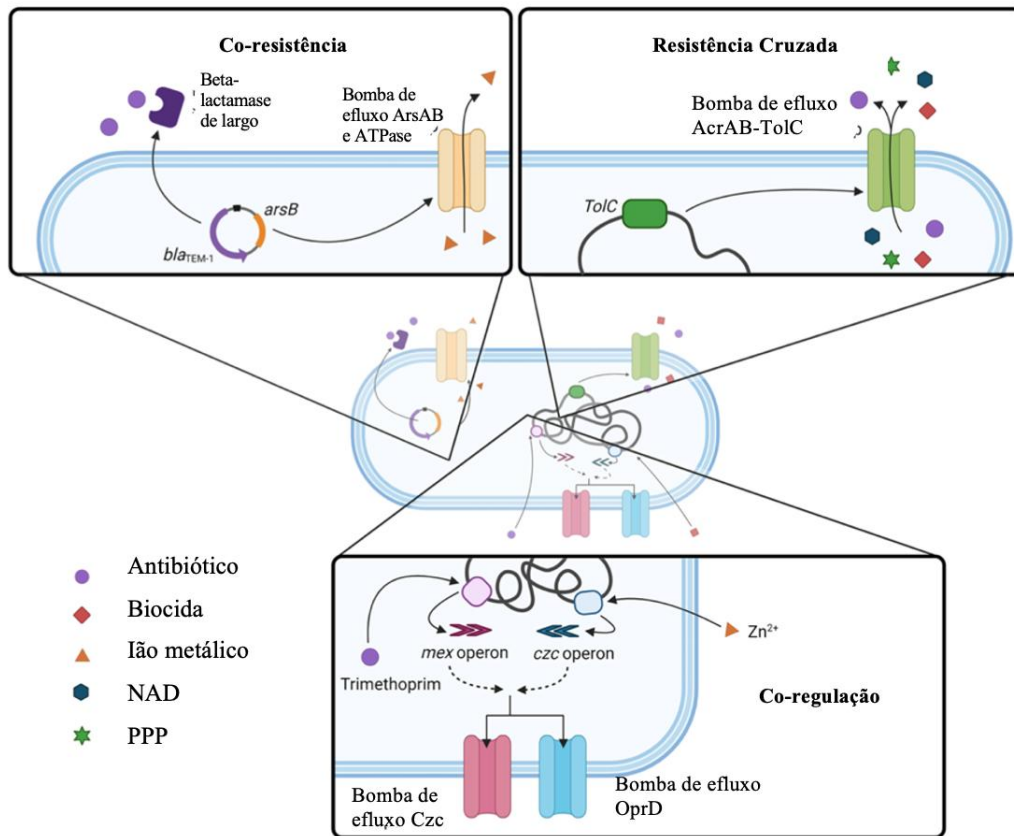
Segundo Murray e colaboradores (2024), a co-seleção refere-se à relação simultânea de resistência a múltiplos agentes e pode ocorrer através de três processos: co-resistência, resistência cruzada e co-regulação (Figura 1).

- Co-resistência: ocorre quando diferentes genes de resistência, como por exemplo a antibióticos e metais, estão fisicamente localizados no mesmo elemento genético móvel, como um plasmídeo. A seleção por um dos agentes pode, portanto, favorecer a persistência de ambos os genes. Como ilustrado na Figura 1, há co-localização dos genes *arsB* (resistência a metais) e *bla<sub>TEM-1</sub>* (resistência a antibióticos) num mesmo plasmídeo.
- Resistência cruzada: acontece quando um único mecanismo confere resistência a múltiplos agentes. Um exemplo é a bomba de efluxo AcrAB-

TolC, que não é seletiva, tendo a capacidade de remover da célula antibióticos, biocidas, fármacos não antibióticos e produtos fitofarmacêuticos.

- Co-regulação: refere-se à ativação conjunta de múltiplos genes de resistência como resposta a um único agente externo. Isto ocorre quando há uma ligação entre vias transcricionais ou transdutoras, como no caso dos operões *mex* e *czc*, cuja expressão coordenada leva à ativação de várias bombas de efluxo, contribuindo para a resistência antimicrobiana múltipla.

Os mecanismos anteriormente descritos permitem concluir que a luta contra a resistência a antibióticos deve considerar não apenas o uso direto de antibióticos, mas também a exposição ambiental a outros compostos com potencial co-seletivo.



**Figura 1** - Representação esquemática dos mecanismos de co-resistência, resistência cruzada e co-regulação (Murray et al., 2024).

### 1.2.1. Mecanismos de resistência aos biocidas

A resistência dos microrganismos aos biocidas é um fenômeno complexo e multifacetado, sendo definida em duas formas principais, conforme descrito por Maillard & Centeleghe (2023):

1. Resistência a nível da espécie: Uma estirpe bacteriana é considerada resistente quando sobrevive a concentrações biocidas que normalmente são letais para a maioria das espécies bacterianas. Esta definição enfatiza a capacidade inata ou adquirida de certas espécies conseguirem tolerar níveis mais elevados de biocidas.
2. Resistência a nível celular: Ocorre quando células bacterianas que se encontram em cultura conseguem sobreviver à exposição a um agente biocida que tem a capacidade de eliminar maior parte da população dessa mesma cultura. Esta definição destaca a variabilidade dentro de uma população bacteriana e a capacidade de algumas resistirem ao tratamento com biocidas.

Estas definições são complementares e captam a natureza multifacetada da resistência bacteriana, abrangendo as diferenças entre as espécies e a heterogeneidade dentro das populações bacterianas. Compreender estas nuances é essencial para o desenvolvimento de estratégias eficazes no controlo microbiano e mitigar o desenvolvimento de futuras resistências.

Em resposta aos diversos mecanismos de ação dos biocidas que visam múltiplos alvos celulares, as bactérias desenvolveram uma variedade de mecanismos de resistência adaptativos (McCarlie et al., 2020). Estas estratégias incluem a redução da concentração do agente biocida nas células bacterianas, através da diminuição da capacidade de penetração do agente, ativação de bombas de efluxo e degradação enzimática do biocida (McCarlie et al., 2020; Partridge et al., 2018).

Além disso, como já foi mencionado anteriormente, as bactérias são capazes de realizar alterações na sua fisiologia e metabolismo através de mutações genéticas e aquisição de genes de resistência através de transferência horizontal mediada por elementos genéticos móveis (Nhung et al., 2015). É importante notar que estes mecanismos de resistência surgem após exposição prolongada, ou uso incorreto dos agentes biocidas, sendo esta exposição responsável pela indução de fenótipos adaptativos de resistência múltipla não só aos biocidas como também aos antibióticos, representando um desafio significativo para a saúde pública.

### 1.3. Biofilmes microbianos e resistência aos agentes antimicrobianos

Os biofilmes são comunidades altamente complexas estruturadas de microrganismos que se encontram envolvidos por uma matriz polimérica por eles autoproduzida e composta por exopolissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos aderidos a uma superfície, podendo esta ser biótica ou abiótica (Wang et al., 2018). Esta matriz, também denominada de EPS (substâncias poliméricas extracelulares), confere diversos benefícios estruturais e funcionais ao biofilme, entre eles a hidratação, captura facilitada de nutrientes e proteção contra agentes antimicrobianos (Sauer et al., 2022; Yasuhiko et.al, 2012).

Além disso, os microrganismos que se encontram organizados em biofilme diferem dos que se encontram isolados, coordenando o seu comportamento através de um sistema de comunicação específico, o *quorum sensing* (Zhau et al., 2020). O *quorum sensing* é conseguido através da produção, detecção e resposta de pequenas moléculas de sinalização extracelular, também conhecidas como auto-indutores, que são detetadas pelas bactérias circundantes (Zhau et al., 2020; Azimi et al., 2020).

Assim, no biofilme, pelas suas características mencionadas, as bactérias estão protegidas contra a resposta imunitária do hospedeiro e da ação dos agentes antimicrobianos, sejam estes antibióticos ou desinfetantes.

A utilização de biocidas no controlo de infeções é uma prática amplamente aceite e frequente. Embora os biocidas sejam eficazes na redução da população microbiana, a sua aplicação isolada nem sempre resulta numa diminuição significativa da taxa de formação de biofilmes (Fernandes et al, 2024). Esta discrepância destaca a complexidade dos biofilmes e a necessidade de abordagens mais abrangentes para o seu controlo efetivo.

Diversos estudos têm investigado a suscetibilidade dos biofilmes aos biocidas e processos de desinfeção convencionais, revelando uma complexa interação entre estes agentes e as comunidades microbianas estruturadas. Estes estudos demonstraram consistentemente que a eficácia reduzida de um agente pode estar ligada à espessura e maturidade do biofilme, destacando a importância da sua estrutura na conferência de proteção aos microrganismos (Simões et al., 2011; Stewart, 2015).

Embora existam vários parâmetros que afetam a eficácia dos biocidas contra os biofilmes, uma abordagem promissora para aumentar a eficácia antimicrobiana contra biofilmes envolve a utilização de inibidores de *quorum sensing*. Esta estratégia visa

interromper a comunicação intercelular crucial para a formação e manutenção dos biofilmes, potencializando assim a sua ação (Fernandes et al., 2023).

Além disso, a natureza da superfície onde o biofilme se desenvolve, seja ela biótica ou abiótica, bem como a carga orgânica presente no ambiente, podem impactar significativamente a eficácia dos agentes biocidas. Estes fatores podem não afetar apenas a capacidade de penetração do biocida, mas também a remoção física do biofilme (Iñiguez-Moreno et al., 2021).

#### 1.4. *One Health* e a resistência antimicrobiana

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o conceito *One Health* (Uma só saúde) corresponde a uma abordagem integrada e unificadora que visa equilibrar e otimizar, de forma sustentável, a saúde humana, animal e ambiental (WHO, 2023). Esta perspectiva reconhece que os seres humanos, animais – tanto domésticos como selvagens – e os ecossistemas partilham uma estreita interdependência, sendo afetados por fatores comuns, como as alterações climáticas, degradação ambiental e a crescente urbanização (Destoumieux-Garzón et al., 2018).

A rápida expansão populacional, a intensificação da agricultura, a desflorestação, o comércio de animais selvagens e a globalização facilitam a emergência e disseminação de doenças infecciosas, muitas das quais têm origem zoonótica. Estima-se que aproximadamente 75% das doenças infecciosas emergentes nas últimas décadas tenham origem em animais, realçando a importância de uma vigilância integrada e multidisciplinar (Erkyihun & Alemayehu, 2022).

Neste contexto, o conceito *One Health* defende a colaboração entre diferentes setores e disciplinas – como a medicina humana, a medicina veterinária, a biologia, a ecologia e a saúde ambiental – para a prevenção, deteção e resposta eficaz de ameaças sanitárias que atravessam fronteiras entre espécies e ecossistemas (Ellwanger & Chies, 2022).

Um dos desafios mais prementes que exemplifica a necessidade desta abordagem integrada é a resistência antimicrobiana. Esta constitui umas das principais ameaças globais à saúde pública, comprometendo a eficácia de tratamentos médicos e veterinários, e exigindo uma resposta coordenada entre os setores da saúde humana, animal e ambiental. A abordagem *One Health* é, por isso, fundamental para o controlo e mitigação

da resistência antimicrobiana, através de práticas como o uso responsável de antimicrobianos, a vigilância partilhada e o desenvolvimento de políticas globais (World Bank, 2019; McEwen & Collignon, 2018).

## 2. MATERIAIS E METÓDOS

### 2.1. Colheita de amostras e obtenção de isolados

Durante este estudo, o foco foi isolar espécies bacterianas pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, e aos géneros *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Enterococcus* de diferentes locais do Instituto Universitário Egas Moniz, Egas Moniz School of Health & Science, Almada, Portugal. Foram selecionados como locais alvo a casa de banho dos alunos e as bancadas de laboratório de Microbiologia. Estes foram selecionados por serem locais de muita utilização por parte dos alunos, mas também por serem alvo de extensa desinfeção durante o dia e ser o local mais provável de se encontrarem microrganismos resistentes aos desinfetantes.

A recolha foi feita com zaragatoas de algodão humedecidas em água peptonada estéril. Não foi amostrada uma área definida, uma vez que o objetivo é qualitativo e não quantitativo. Cada zaragatoa/amostra foi transferida imediatamente para 5 mL meio de enriquecimento Brain Heart Infusion (BHI; Sigma-Aldrich, Germany), seguindo-se incubação a 37°C durante 24 horas.

Após esse tempo foram realizadas inoculações em diferentes meios, incluindo meios seletivos com o objetivo de encontrar isolados específicos. Concretamente, a partir dessa suspensão, alíquotas de 10 µL foram inoculadas em dois meios básicos Tryptic Soy Agar (TSA, Biokar Diagnostics, France) e Blood agar (Frilabo, Portugal), e em meios seletivos e diferenciais, nomeadamente Tryptone Bile X-Glucuronide (TBX) agar (Fisher Scientific, Portugal) para o isolamento de *Escherichia coli*, MacConker agar (MK, Biokar Diagnostics, France) para bactérias Gram-negativo, Cetrimide agar (CET, Scharlab, Spain) para *Pseudomonas aeruginosa*, Manitol Salt Agar (HiMedia Laboratories, India) para *Staphylococcus* spp. e Bile Esculin Azide agar (BEA, Biokar Diagnostics, France) para *Enterococcus* spp.. As placas foram incubadas em aerobiose a 37°C por 24 horas. Em caso de crescimento de colónias nos meios seletivos, 1 a 3 colónias com aparência típica, com base no tamanho e morfologia das colónias, foram selecionadas de modo a cobrir todas as colónias ligeiramente distintas, e repicadas para meio de TSA, para obtenção de culturas puras (incubação em aerobiose a 37°C por 24 horas).

Para facilitação de codificação, às colónias selecionadas, foi atribuída uma numeração conforme o meio de onde foram isoladas, segundo o seguinte código:

- 01 a 09: do meio TBX (Tryptone bile X-glucuronide);

- 10 a 19: do meio MK (MacConkey);
- 20 a 29: do meio MSA (Manitol Salt Agar);
- 30 a 39: do meio BEA (Bile Esculine Azide Agar);
- 40 a 49: do meio CET (Cetrimide Agar);

## **2.2. Coloração de Gram e observação microscópica**

Das culturas puras dos isolados selecionados dos meios seletivos, foi realizada a coloração de Gram, para análise da forma e confirmação da sua classificação em Gram-positivo ou Gram-negativo.

O protocolo utilizado foi o seguinte:

1. Colheu-se, com ansa estéril, uma colónia isolada, de cada cultura pura em TSA;
2. Espalhou-se com a ansa as colónias recolhidas numa lâmina com uma gota de água, realizando-se um esfregaço e deixou-se secar;
3. Fixou-se o esfregaço obtido à chama;
4. Deixou-se arrefecer a lâmina e corou-se a mesma com cristal violeta durante 1 minuto;
5. Rejeitou-se o cristal violeta e cobriu-se com solução de lugol (mordente) e deixou-se atuar durante 1 minuto;
6. Lavou-se a lâmina com álcool acetona durante 5 a 10 segundos;
7. Lavou-se a lâmina com água da torneira num jato suave de forma a não remover o esfregaço;
8. Corou-se a preparação obtida com a solução de fucsina diluída durante 1 minuto;
9. Lavou-se novamente a lâmina com água da torneira num jato suave;
10. Deixou-se secar a lâmina durante uns minutos até a preparação se encontrar inteiramente seca;
11. Observou-se no microscópio ótico e na objetiva de 100× com óleo de imersão.

## **2.3. Teste da catalase e teste da coagulase**

Os isolados Gram-positivo foram submetidos ao teste da catalase. Brevemente, transferiu-se uma pequena quantidade da colónia bacteriana para uma lâmina limpa e seca, e adicionou-se 1 gota de peróxido de hidrogénio a 3% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) diretamente sobre a

colónia. Observou-se imediatamente se havia formação de bolhas de oxigénio (positivo) ou não (negativo).

Os isolados obtidos do meio MSA e que eram manitol-positivo foram submetidos ao teste da coagulase para eventual identificação de estafilococos coagulase-positivo. Para o efeito, foi utilizado o teste da coagulase em tubo. Brevemente, num tubo com 500 µL de plasma de coelho adicionaram-se 3-4 colónias do isolado e incubou-se a 37°C por 24 horas. A formação de um coágulo visível, que não se desfazia com agitação suave, foi considerada resultado positivo.

#### **2.4. Identificação definitiva usando galeria de testes em miniatura (API®)**

Para identificação bioquímica de alguns dos isolados bacterianos obtidos do meio TBX e do meio BEA foram utilizadas duas galerias API® (bioMérieux, Portugal): API 20E e API 20STREP, respetivamente. A preparação das suspensões bacterianas, inoculação e interpretação dos resultados foram realizadas conforme as instruções do fabricante e descrito a seguir de forma muito resumida.

No caso das galerias API 20E, estas foram inoculadas com uma suspensão bacteriana em solução salina estéril (0,85%), previamente ajustada à turvação padrão da escala de McFarland 0,5. Os microtubos dos diferentes testes foram inoculados, sendo alguns preenchidos por completo e outros apenas na parte inferior, conforme indicado pelo protocolo. Em seguida a galeria foi incubada a 37°C durante 18 a 24 horas.

Para as galerias API 20STREP, foi utilizada uma suspensão bacteriana em meio API *Suspension Medium*, também ajustada à turvação na escala de McFarland 4. Após inoculação dos microtubos, a galeria foi incubada a 37°C por um período entre 4 e 24 horas.

Após o tempo de incubação, foram adicionados os reagentes específicos nos testes indicados, e os resultados foram lidos com base nas tabelas de interpretação do fabricante. Os perfis numéricos gerados foram introduzidos no software (APIweb bioMérieux) para identificação das espécies bacterianas.

#### **2.5. Identificação molecular de *S. aureus* por qPCR**

Para nove isolados obtidos do MSA que apresentaram fermentação de manitol, mas foram coagulase-negativo, e diante da impossibilidade de realizar a identificação da

espécie por galeria API devido a limitações orçamentais, optou-se por confirmar, por meio de PCR em tempo real, que nenhum desses isolados correspondia realmente a *S. aureus*. Para isso foi utilizado o kit MRSA Multiplex Real-Time PCR IVD® (NZYtech, Portugal), que estava disponível no laboratório. Este kit fornece o conjunto de reagentes, enzimas e oligonucleótidos (primers e sondas) para a deteção de vários genes, nomeadamente, o gene *muc*, que codifica para uma nuclease termoestável específica da espécie *S. aureus* (sendo por isso utilizado para identificar especificamente *S. aureus*), e os genes *mecA* e *mecC*, que estão implicados na resistência à meticilina, cuja deteção indica a presença de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA). O protocolo usado foi o descrito exatamente de acordo com as instruções do fabricante ([https://www.nzytech.com/media/dds/brochurescertificates/md0493\\_im\\_pt\\_v2405.pdf](https://www.nzytech.com/media/dds/brochurescertificates/md0493_im_pt_v2405.pdf)).

Previamente, e para obtenção do ADN dos respetivos isolados, foi usado o kit NZYMicrobial gDNA Isolation Kit (Nzytech, Portugal) de acordo com as instruções do fabricante e partir de colónias frescas isoladas em TSA.

## **2.6. Determinação da suscetibilidade dos isolados aos antibióticos**

De forma a determinar os perfis de resistência aos antibióticos dos isolados (Scb1, Scb2, Scb3, Bcb30, Bcb31, Bcb20, Bcb21, Tcb21, Tcb22, SB20, SB21, SB22, SB23) selecionados, realizou-se o método de difusão em agar (Kirby-Bauer), também denominado de antibiograma. Neste método foi seguido o seguinte protocolo, que está em conformidade com as recomendações do EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) ([https://www.eucast.org/ast\\_of\\_bacteria](https://www.eucast.org/ast_of_bacteria)).

### Preparação do inóculo:

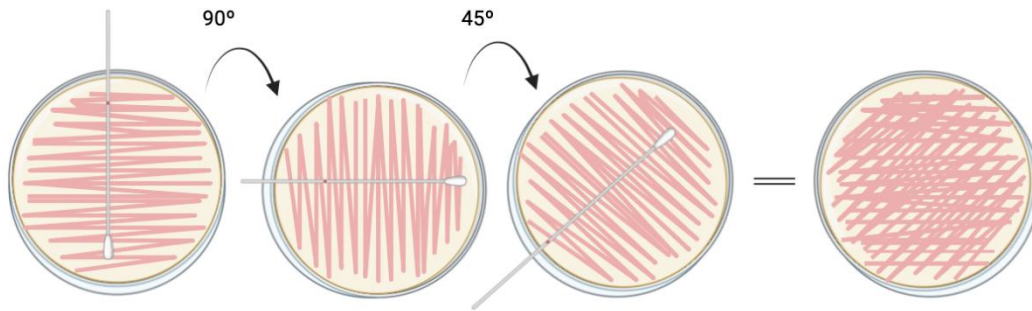
1. Suspenderam-se 4 a 5 colónias de cada isolado em 2 mL de solução salina esterilizada;
2. Com recurso ao vórtex, agitou-se o tubo com o inóculo de forma a obter uma solução homogénea;
3. Ajustou-se a turvação da suspensão obtida a 0,5 na escala de McFarland;

### Inoculação do meio Mueller-Hinton agar:

1. Inoculou-se a superfície do meio de Mueller-Hinton agar, com a zaragatoa, fazendo estrias juntas e ao longo de toda a placa em movimentos vai e vem; rodou-

se a placa 90° e repetiu-se o processo, e por fim, rodou-se a placa mais uma vez (cerca de 45°) e inoculou-se da mesma maneira uma terceira vez (Figura 2);

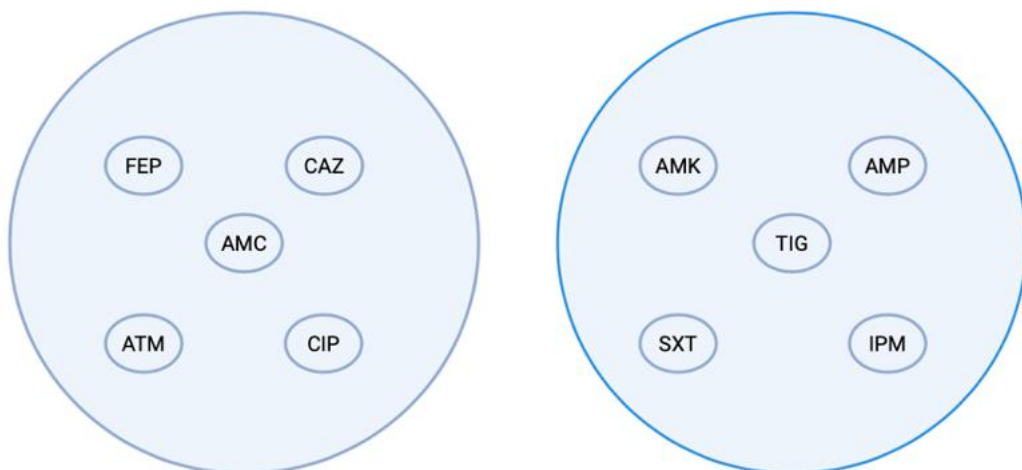
- Deixou-se a placa repousar à temperatura ambiente durante, pelo menos, 3 minutos, para possibilitar que a superfície inoculada seque antes de se passar à colocação dos discos de antibióticos;



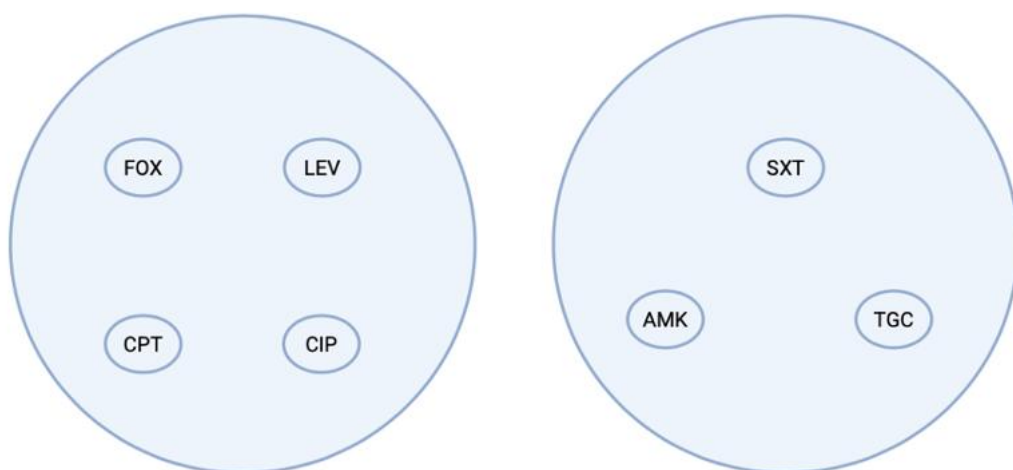
**Figura 2** - Representação esquemática da inoculação efetuada no meio de Mueller-Hinton agar, previamente à colocação dos discos com antibióticos.

### Colocação dos discos de antibióticos

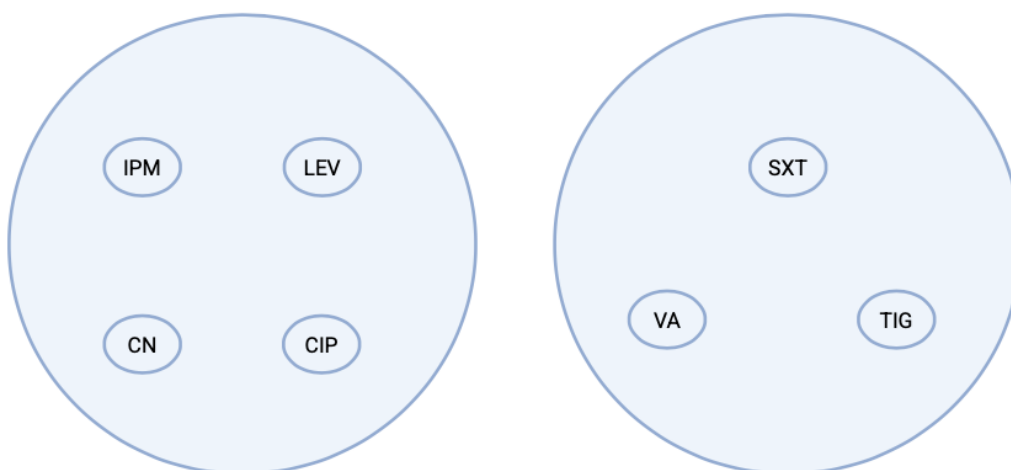
- Com recurso a uma pinça, dispensou-se na superfície do agar os discos impregnados com os antibióticos que se pretendiam testar. Colocaram-se entre 4 a 5 discos por placa, de forma equidistante (Figuras 3, 4 e 5);



**Figura 3** - Representação esquemática da colocação dos discos de antibióticos para *Enterobacteriales*. Ampicilina 10 µg (AMP), Amoxicilina/ácido clavulânico 10-20µg (AMC), Aztreonam 30 µg (ATM), Cefepime 30 µg (FEP), Ceftazidime 10 µg (CAZ), Imipenem 10 µg (IPM), Ciprofloxacina 5µg (CIP), Amicacina 30 µg (AMK), Tigeciclina 15µg (TIG), Sulfametoxazol-Trimetoprim 1.25-23.75 µg (SXT).



**Figura 4** - Representação esquemática da colocação dos discos de antibióticos para *Staphylococcus spp.*  
Sulfametoxazol-Trimetoprim 1.25-23.75  $\mu\text{g}$  (**SXT**), Ciprofloxacina 5  $\mu\text{g}$  (**CIP**), Cefoxitina 30  $\mu\text{g}$  (**FOX**), Ceftarolina 5  $\mu\text{g}$  (**CBP**), Levofloxacina 5  $\mu\text{g}$  (**LEV**), Amicacina 30  $\mu\text{g}$  (**AMK**), Tigeciclina 15  $\mu\text{g}$  (**TIG**).

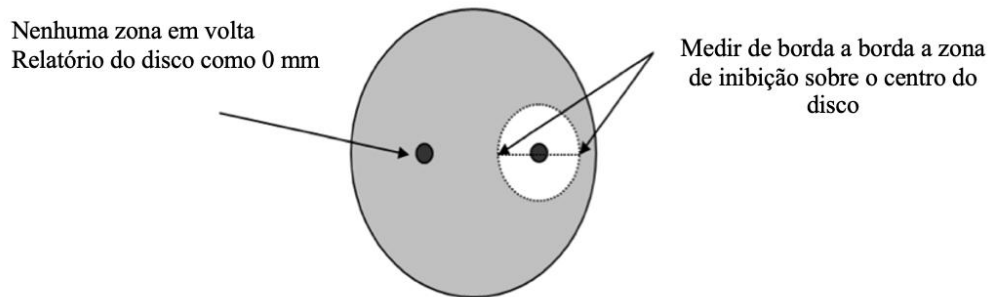


**Figura 5** - Representação esquemática da colocação dos discos de antibióticos para *Enterococcus spp.*  
Sulfametoxazol-Trimetoprim 1.25-23.75  $\mu\text{g}$  (**SXT**), Ciprofloxacina 5  $\mu\text{g}$  (**CIP**), Levofloxacina 5  $\mu\text{g}$  (**LEV**), Tigeciclina 15  $\mu\text{g}$  (**TIG**), Imipenem 10  $\mu\text{g}$  (**IPM**), Gentamicina 10  $\mu\text{g}$  (**CN**), Vancomicina 30  $\mu\text{g}$  (**VA**).

2. Após a colocação de todos os discos, as placas incubaram-se durante 24 horas a 37°C.

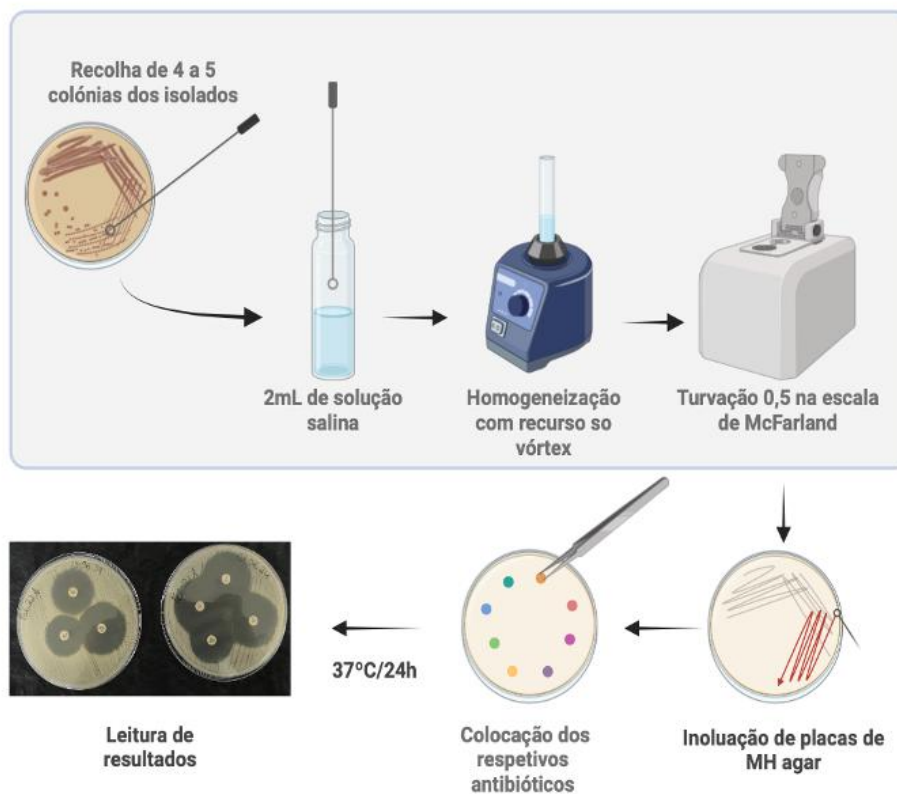
### Medição das zonas de inibição e interpretação dos resultados

1. Após a incubação, mediu-se o diâmetro das zonas de inibição de crescimento à volta de cada disco com recurso a uma régua (Figura 6);
2. Registou-se o tamanho da zona de inibição (em mm) numa folha de registo para posterior interpretação;
3. Comparam-se os valores obtidos com os *breakpoints* mais atualizados publicados no site do EUCAST ([https://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints](https://www.eucast.org/clinical_breakpoints)) e classificou-se cada isolado em R – resistente, I-intermédio, S-suscetível para cada antibiótico testado.



**Figura 6** - Representação esquemática da medição das zonas de inibição. Fonte da imagem: American Society for Microbiology.

Na Figura 7 está ilustrado, de forma esquemática, todo o protocolo executado.



**Figura 7** - Representação esquemática da realização do método da difusão em agar pela técnica de Kirby-Bauer.

## 2.7. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) dos desinfetantes

### 2.7.1. Desinfetantes testados

Neste ensaio foram usados 3 desinfetantes, cujas características são apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 2** - Características dos desinfetantes testados.

Componente desinfetante	Nome comercial	Características
Hipoclorito de sódio 7,8%	Aquagen® SDF (Sucitesa)	Agente oxidante, atua por desnaturação de proteínas e destruição de membranas celulares
Etanol 70%		Atua na desidratação e desnaturação das proteínas dos microrganismos, sendo o seu uso comum na higienização das mãos e de superfícies
Cloreto de didecildimetilamónio 0,5%	Sanytol	Causa rompimento de interações intermoleculares e dissociação de bicamadas lipídicas

### 2.7.2. Determinação da CMI pelo método da microdiluição

A suscetibilidade de estirpes de referência (*S. aureus* ATCC 6538 e *E. coli* ATCC 11105) e de alguns dos isolados (Scb1, SB20 e SB22) aos três desinfetantes foi determinada através do método da microdiluição como a seguir descrito.

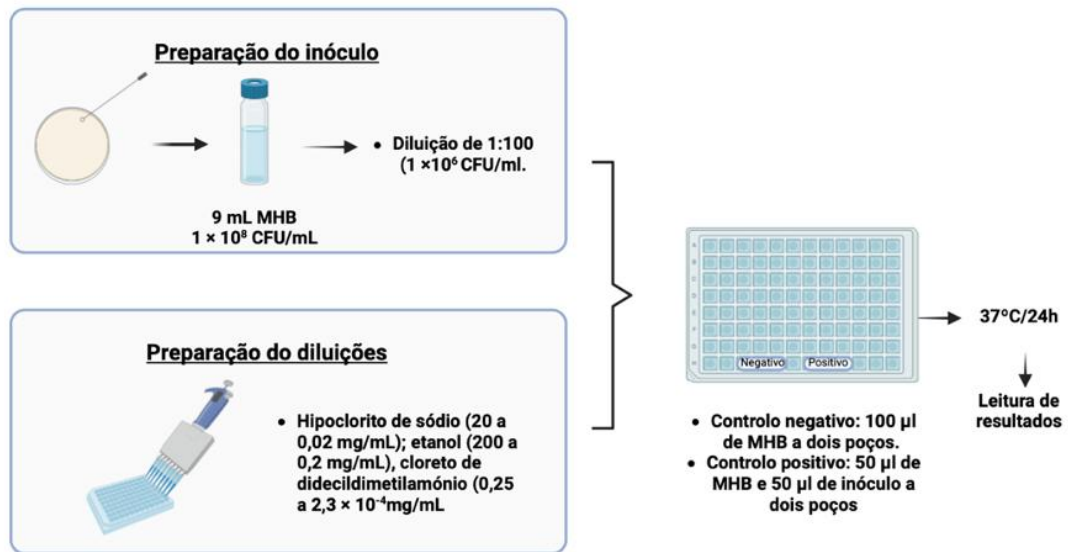
#### Preparação do inóculo:

1. Recolha de colónias frescas e suspensão das mesmas em 9 ml de Mueller-Hinton broth (MHB, Sigma Aldrich, Germany);
2. Ajuste da concentração até se atingir uma densidade ótica a 600 nm (OD<sub>600</sub>) de 0,1 (corresponde a aproximadamente  $1 \times 10^8$  CFU/mL);
3. Diluição 1:100 do inóculo anteriormente obtido, de forma a se obter  $1 \times 10^6$  CFU/mL.

Preparação das diluições:

4. Seleção do intervalo de concentrações a testar para cada desinfetante: hipoclorito de sódio (20 a 0,02 mg/mL); etanol (200 a 0,2 mg/mL), cloreto de didecildimetilamónio (0,25 a  $2,3 \times 10^{-4}$  mg/mL);
5. A partir das soluções stock de cada desinfetante, preparou-se uma solução intermédia em MHB com concentração duas vezes superior à primeira que se pretendeu testar;
6. Dispensou-se 100 µL dessa solução intermédia no primeiro poço e dispensou-se 50 µL de MHB do poço 2 ao 12;
7. Utilizando a pipeta multicanal, retirou-se 50 µL a partir do primeiro poço para o segundo e assim sucessivamente. O último poço permaneceu com um volume final de 100 µL (isto serviu para controlar se as diluições não estavam contaminadas);
8. Por fim, adicionou-se 50 µL do inóculo a cada poço (obtendo-se uma diluição de 1:2, pelo que a concentração bacteriana em cada poço passou a ser de cerca de  $5 \times 10^5$  CFU/mL. As concentrações de desinfetante também se diluíram 1:2 neste passo, e por isso, inicialmente se partiu de uma solução 2× mais concentrada;
9. Controlo negativo: adicionou-se 100 µL de MHB a dois poços.  
Controlo positivo: adicionou-se 50 µL de MHB e 50 µL de inóculo a dois poços;
10. Incubou-se a 37°C durante aproximadamente 24 horas;
11. A leitura foi feita a olho nú, anotando para cada desinfetante testado, a concentração mínima a partir do qual deixou de ser visível turvação, correspondente ao crescimento bacteriano.

Um resumo do protocolo descrito está ilustrado na Figura 8.



**Figura 8** - Representação esquemática do processo realizado para determinação da CMI pelo método da microdiluição.



### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Características dos isolados selecionados

Foram feitas colheitas em 5 momentos diferentes. Essa informação, assim como as características das colónias e o resultado da coloração de Gram estão compilados na Tabela 3. Vários isolados foram selecionados dos vários meios seletivos (Figura 9).

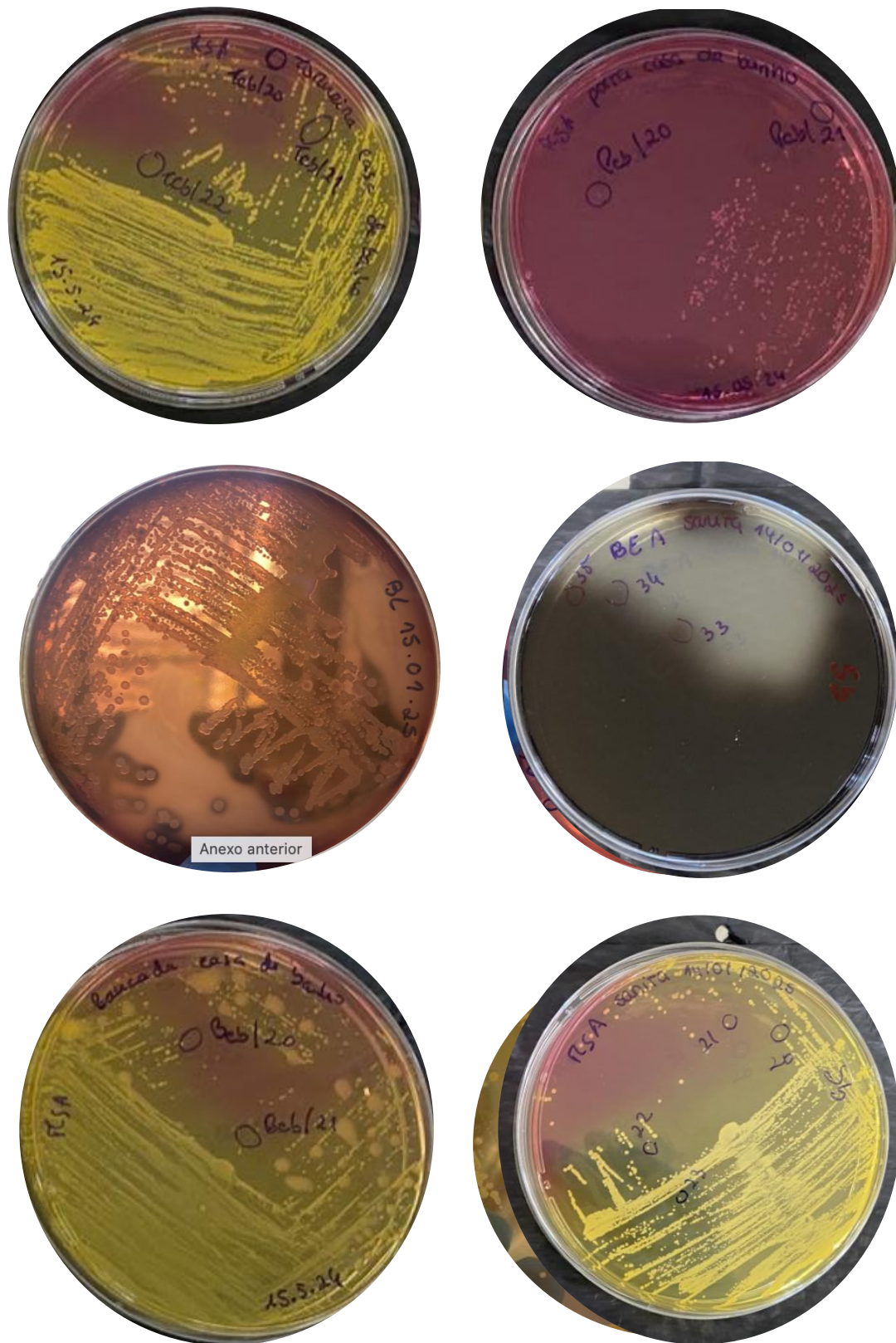
**Tabela 3** - Tabela resumo dos isolados selecionados.

Data	Local de recolha	Meio	Designação do isolado	Descrição das colónias	Coloração de Gram	Catalase	Coagulase
17/05/2024	Torneira da casa de banho	MSA	Tcb20	Colónia ligeiramente rosada e pequena	Gram positivo		
			Tcb21	Colónia amarelada e pequena com o meio amarelo em volta (fermentadora do manitol)	Gram positivo		Coagulase negativo
			Tcb22	Colónia pequena, de coloração amarela e com o meio em volta amarelo (fermentadora do manitol)	Gram positivo		Coagulase negativo
17/05/2024	Porta da casa de banho	MSA	Pcb20	Colónia pequena, de coloração rosa e não fermentadora do manitol	Gram positivo		
			Pcb21	Colónia pequena, de coloração	Gram positivo		

				rosa e não fermentador a do manitol			
17/05/2024	Bancada da casa de banho	MSA	Bcb20	Colónia pequena, amarela com tom rosado em volta	Gram positivo	Catalase positivo	Coagulase negativo
			Bcb30	Colónia muito pequena e com o meio muito negro em volta	Gram negativo	Catalase negativo	
			Bcb31	Colónia muito pequena e com o meio negro em volta	Gram negativo	Catalase negativo	
12/09/2024	Sanita	TBX	Scb1	Colónia média de coloração esverdeada	Gram negativo		
			Scb2	Colónia média de coloração esverdeada	Gram negativo		
			Scb3	Colónia média de coloração esverdeada	Gram negativo		
		MSA	Scb20	Colónia pequena com o meio amarelo em volta (fermentadora do manitol)	Gram positivo	Catalase positivo	Coagulase negativo
		BEA	Scb30	Colónia pequena, de coloração acinzentada com escurecimento com meio em volta	Gram positivo	Catalase negativo	

			Sbc31	Colónia muito pequena com escurecimento do meio em volta	Gram positivo	Catalase negativo	
		CET	Scb40	Colónia com pequena com tonalidade azulada	Gram negativo		
			Scb41	Colónia pequena com tonalidade azulada	Gram negativo		
28/10/2024	Bancada do laboratório	MSA	BI20	Colónia amarelada e pequena com o meio amarelo em volta (fermentadora do manitol)	Gram positivo	Catalase positivo	Coagulase negativo
16/01/2025	Sanita	MSA	SB20	Colónia de tamanho médio, de cor amarelo-esbranquiçado	Gram positivo	Catalase positivo	Coagulase negativo
			SB21	Colónia de tamanho médio com o meio totalmente amarelo em volta (fermentadora do manitol)	Gram positivo	Catalase positivo	Coagulase negativo
			SB22	Colónia de tamanho médio com meio totalmente amarelo em	Gram positivo	Catalase positivo	Coagulase negativo

				volta (fermentado ra do manitol)			
			SB23	Colónia de tamanho médio com o meio totalmente amarelo em volta (fermentado ra do manitol)	Gram positivo	Catalase positivo	Coagulase negativo
		BEA	SB33	Colónia muito pequena e com escurecimen to do meio em volta	Gram positivo	Catalase negativo	
			SB34	Colónia muito pequena e com escurecimen to do meio em volta	Gram positivo	Catalase negativo	
			SB35	Colónia pequena e com escurecimen to do meio em volta	Gram positivo	Catalase negativo	



**Figura 9** - Imagem representativa dos meios seletivos usados e das colónias selecionadas em cada um, correspondentes a isolados a estudar.

### 3.2. Confirmação da identificação de alguns isolados

Usando as galerias de provas bioquímicas API®, verificou-se que os isolados Scb1, Scb2 e Scb3 foram todos identificados como *E. coli*. Os isolados Scb30 e Scb31 foram identificados como sendo *Enterococcus faecium*.

**Tabela 4** - Resultados obtidos através da identificação definitiva dos isolados em galeria de API.

Isolados	Galeria API selecionada	Código dos testes	Identificação (%)	Espécie identificada
Scb1, Scb2 e Scb3	API 20E	5144552	97,7%, 97,6%, e 98,4%	<i>E. coli</i>
Scb30 e Scb31	API 20STREP	515751	98,1% e 99,5%	<i>E. faecium</i>

### 3.3. Exclusão molecular da presença de *S. aureus*

Os nove isolados, que pelas características das colónias em meio de MSA e sendo manitol-positivo aparentavam ser *S. aureus*, revelaram ser coagulase-negativo e molecularmente foi confirmado não eram *S. aureus* (não possuem o gene *nuc*) (Tabela 5).

**Tabela 5** - Resultados obtidos do multiplex qPCR para os isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativo.

Amostras	Genes <i>mecA/mecC</i>	Gene <i>SCCmec/orfX</i>	Gene <i>Nuc</i>	Resultado
SB20	+	+	-	<i>S. aureus</i> - negativo
SB21	+	-	-	<i>S. aureus</i> - negativo
SB22	+	-	-	<i>S. aureus</i> - negativo
SB23	+	+	-	<i>S. aureus</i> - negativo
Scb20	-	-	-	<i>S. aureus</i> - negativo
BL20	-	-	-	<i>S. aureus</i> - negativo
Bcb20	-	-	-	<i>S. aureus</i> - negativo
Tcb22	-	-	-	<i>S. aureus</i> - negativo
Tcb20	-	-	-	<i>S. aureus</i> - negativo
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	-	+	+	<i>S. aureus</i> - positivo
MRSA (controle +)	+	+	+	<i>S. aureus</i> - positivo
(-)	-	-	-	<i>S. aureus</i> - negativo

### 3.4. Perfis de suscetibilidade e resistência aos antibióticos

Após a identificação presuntiva dos isolados obtidos dos diferentes meios diferenciais, procedeu-se ao antibiograma mais adequado de acordo com a identificação efetuada. Os perfis de suscetibilidade aos antibióticos obtidos para alguns dos isolados podem ser vistos nas Tabelas 6,7 e 8.

**Tabela 6** - Perfis de suscetibilidade aos antibióticos para três isolados de *E. coli*. S: suscetível; I: intermédio; R: resistente

Isolado	AMP	AMC	ATM	FEP	CAZ	IPM	CIP	AMK	TIG	SXT
Scb1	0 (R)	24 (S)	36 (S)	36 (S)	32 (S)	31 (S)	40 (S)	22 (S)	27 (S)	30 (S)
Scb2	0 (R)	26 (S)	35 (S)	38 (S)	30 (S)	31 (S)	37 (S)	22 (S)	27 (S)	29 (S)
Scb3	0 (R)	18 (S)	35 (S)	35 (S)	32 (S)	32 (S)	22 (I)	22 (S)	24 (S)	0 (R)

Legenda: AMP: Ampicilina; AMC: Amoxicilina/ácido clavulânico; ATM: Aztreonam; FEP: Cefepime, CAZ: Ceftazidime; IPM: Imipenem; CIP: Ciprofloxacina; AMK: Amicacina; TIG: Tigeciclina; SXT: Sulfametoxazol-Trimetoprim.

A análise da Tabela 6 permite aferir que os isolados Scb1 e Scb2 são, muito provavelmente, clones do mesmo isolado. Ambos foram isolados da mesma placa e exibem o mesmo perfil de suscetibilidade aos antibióticos testados, não apresentando qualquer variação fenotípica, o que reforça essa hipótese. O isolado Scb3, embora apresente um perfil globalmente semelhante, diferencia-se dos anteriores por exibir uma sensibilidade intermédia à ciprofloxacina, enquanto os outros dois foram sensíveis. Esta diferença pode indicar uma variação genética ou fenotípica dentro da mesma espécie ou, eventualmente, a presença de um mecanismo de resistência em fase inicial.

**Tabela 7** - Perfis de suscetibilidade aos antibióticos para dois isolados de *Enterococcus* spp.. Os valores dos halos de inibição são apresentados em mm. S: suscetível, I: intermédio, R: resistente

Isolado	IPM	CIP	LEV	CN	VA	TIG	SXT
Bcb30	46 (S)	26 (S)	25 (S)	25 (S)	19 (S)	33 (S)	13 (S)
Bcb31	43 (S)	25 (S)	24 (S)	26 (S)	19 (S)	32 (S)	0 (R)

Legenda: IMP: Imipenem; CIP: Ciprofloxacina; LEV: Levofloxacina; CN: Gentamicina; VA: Vancomicina; TIG: Tigeciclina; SXT: Sulfametoxazol-Trimetoprim

Ambos os isolados de *Enterococcus* spp. (previamente já identificados como sendo *E. faecium*), provenientes da mesma placa, apresentam um perfil de resistência muito semelhante, contudo diferenciam-se no facto de o isolado Bcb31 apresentar resistência ao SXT. Esta variação pode indicar que existe uma diferenciação clonal, onde ambos podem pertencer à mesma estirpe, mas apresentarem níveis de resistência diferentes, o que mostra a existência de uma heterogeneidade populacional.

**Tabela 8** - Perfis de suscetibilidade aos antibióticos para 8 isolados de *Staphylococcus* coagulase-negativo. Os valores dos halos de inibição são apresentados em mm. S: suscetível, I: intermédio, R: resistente

Isolado	FOX	CBP	CIP	LEV	AMK	TIG	SXT
Bcb20	22 (S)	32 (S)	25 (I)	24 (S)	18 (S)	31 (S)	12 (R)
Bcb21	22 (S)	35 (S)	25 (I)	23 (S)	19 (S)	33 (S)	29 (S)
Tcb21	32 (S)	39 (S)	32 (I)	32 (S)	30 (S)	32 (S)	35 (S)
Tcb22	28 (S)	34 (S)	34 (I)	34 (S)	27 (S)	28 (S)	34 (S)
SB20	22 (I)	26 (S)	35 (I)	35 (S)	30 (S)	30 (S)	29 (S)
SB21	32 (S)	24 (S)	36 (I)	36 (S)	28 (S)	30 (S)	33 (S)
SB22	28 (S)	32 (S)	38 (I)	38 (S)	30 (S)	32 (S)	0 (R)
SB23	22 (I)	24 (S)	32 (I)	32 (S)	29 (S)	30 (S)	28 (S)

Legenda: FOX: Cefoxitina; CBP: Ceftarolina; CIP: Ciprofloxacina; LEV: Levofloxacina; AMK: Amicacina; TIG: Tigeciclina; SXT: Sulfametoxazol-Trimetoprim.

Os isolados Bcb20 e Bcb21, apresentam diferente suscetibilidade ao SXT, sendo por isso presuntivamente diferentes clones da mesma espécie. Os isolados Tcb21 e Tcb22 apresentaram o mesmo perfil de suscetibilidades. Os isolados SB20 e SB23 apresentaram perfis semelhantes entre eles, sendo de salientar a suscetibilidade intermédia à cefoxitina. A suscetibilidade à cefoxitina é usada como um teste de *screening* para deteção de resistência à meticilina em *Staphylococcus aureus* e outros estafilococos, especialmente para inferir a presença do gene *mecA* (ou *mecC*).

Os isolados Tcb21 e Tcb22 exibem perfis de resistência idênticos para todos os antibióticos testados. Os isolados SB20 e SB22 apresentam o mesmo perfil de suscetibilidade, e que é ligeiramente diferente do isolado SB21 e do SB23. Os isolados SB20 e SB22 serão provavelmente clones da mesma estirpe.

### 3.5. Valores de CMI dos desinfetantes contra isolados e estirpes de referência

Foi determinada a CMI dos três desinfetantes em estudo, o etanol 70%, o hipoclorito de sódio 7,8% e o cloreto de didecildimetilamónio 0,5% contra duas estirpes de referência e três isolados, um de *E. coli* (Scb1) e dois de *Staphylococcus* coagulase-negativo (SB20 e SB22) (Tabela 9).

**Tabela 9** - Atividade antibacteriana (valores de concentração mínima inibitória – CMI) de 3 desinfetantes contra *S. aureus* ATCC 6538 e *E. coli* ATCC 11105 e três isolados.

Desinfetante	Valor de CMI (mg/mL)				
	<i>E. coli</i> ATCC 11105	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	Isolado Scb1	Isolado SB20	Isolado SB22
Etanol a 70%	200	100-200	50	> 200	> 200
Hipoclorito de sódio 7,8%	0,62	0,08	0,62	0,16	0,16
Cloreto de didecildimetilamônio 0,5%	0,0037	0,0018	0,0037	$9,2 \times 10^{-4}$	$< 4,6 \times 10^{-4}$

O isolado Scb1 apresentou uma suscetibilidade superior (valor de CMI inferior, 50 mg/mL) ao etanol 70% em comparação com a estirpe de *E. coli* de referência (CMI = 200 mg/mL). Mas, ambas essas estirpes apresentaram a mesma suscetibilidade aos outros dois desinfetantes. A suscetibilidade dos isolados SB20 e SB22 foram semelhantes, apresentando valores de MIC idênticos ou próximos., e tendo sido ligeiramente mais distintos dos valores obtidos para a estirpe de *S. aureus* de referência.

#### 4. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivos principais o isolamento de espécies bacterianas a partir de superfícies da Egas Moniz School of Health and Science, a determinação dos seus perfis de resistência a antibióticos e a avaliação da atividade antibacteriana de três desinfetantes utilizados na instituição.

Durante o desenvolvimento do trabalho, foi possível isolar e identificar de forma definitiva estirpes de *Escherichia coli* e *Enterococcus faecium*, bem como realizar a identificação presuntiva de outros microrganismos, incluindo *Staphylococcus* spp. coagulase-negativo.

Devido ao facto de terem sido obtidos vários isolados ( $n = 9$ ) que apresentavam fermentação do manitol e que eram coagulase-negativo, pode-se logo antever que não se trataria de *Staphylococcus aureus*, que é classicamente coagulase positivo, mas sim de uma espécie do grupo tradicionalmente conhecido como estafilococos coagulase-negativo (ECN). Embora a fermentação do manitol seja uma característica frequentemente associada ao *S. aureus*, outras espécies ECN, como *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus lugdunensis* e, ocasionalmente, *Staphylococcus haemolyticus*, também podem fermentar o manitol (Becker et al., 2014, Frank et al., 2008). Estas bactérias são habitualmente comensais da pele e mucosas, mas podem também atuar como agente patogénicos oportunistas. Para confirmar os resultados fenotípicos e garantir que não se tratava de isolados de *S. aureus*, realizou uma reação multiplex de qPCR para pesquisa simultânea de um gene constitutivo da espécie *S. aureus*, o gene *nuc*, e de genes *mecA* e *mecC* que codificam uma proteína chamada PBP2a (ou PBP2'), uma proteína de ligação à penicilina com baixa afinidade para os  $\beta$ -lactâmicos, e a junção *SCCmec/orfX* (região de junção entre o elemento genético *SCCmec* e o gene cromossómico *orfX* característico de MRSA). O qPCR permitiu confirmar que os isolados não eram de facto *S. aureus*, pois não houve amplificação do gene *nuc*. Conclui-se ainda que os isolados SB20 e SB23 apresentavam os genes *mecA/mecC* e *SCCmec/orfX*. Este resultado indica que, embora não pertençam à espécie *S. aureus*, essas outras espécies do grupo dos ECN carregam genes de resistência clinicamente relevantes, os quais podem ser facilmente disseminados para outras bactérias. Este resultado apoia os resultados obtidos no método de difusão em agar, que revelaram que estes dois isolados, SB20 e SB23 tinham suscetibilidade intermédia à

cefexitina. O que significa que estes isolados podem estar em transição fenotípica entre sensível e resistente, expressando PBP2a em níveis baixos ou variáveis.

Os isolados SB21 e SB22 apresentaram apenas a presença dos genes *mecA/mecC*, sendo negativas para os restantes alvos. A ausência de *SCCmec/orfX*, reforça a hipótese de se tratar de uma estirpe não *S. aureus*, possivelmente resistente à meticilina mas com perfil genético incompleto. A identificação definitiva destes isolados ECN com resistência à meticilina não foi possível devido ao elevado custo das Galerias de API que iria ultrapassar o orçamento concedido. Mas estes isolados fazem agora parte da coleção do laboratório e poderão ser estudos e caracterizados futuramente.

Os isolados Scb20, BL20, Bcb20, Tcb22 e Tcb20 apresentaram resultados negativos para todos os genes testados (*mecA/mecC*, *SCCmec/orfX* e *nuc*). Esta ausência de amplificação sugere que estas estirpes não possuem estes genes de resistência específicos, contrariamente aos isolados anteriores, e não pertencem à espécie *S.aureus*.

A presença destas espécies, como *E. coli*, *E. faecium* e ECN em superfícies frequentemente tocadas levanta preocupações quanto à eficácia das práticas de limpeza, quando são encontradas em quantidades significativas, mas o objetivo deste trabalho não foi fazer uma quantificação e, portanto, nada podemos concluir quanto à eficácia da desinfecção. O objetivo foi apenas obter alguns isolados, caracterizá-los e identificá-los para depois construir uma pequena coleção de isolados, que será depois uma mais-valia para testar a eficácia dos desinfetantes. Naturalmente, a deteção de microrganismos potencialmente patogénicos, mesmo que em quantidades limitadas, indica que as superfícies podem funcionar como reservatórios microbianos, com implicações na transmissão cruzada em ambientes clínicos e académicos.

Os perfis de suscetibilidade aos antibióticos foram encorajadores. Observou-se uma baixa prevalência de resistência aos antibióticos entre os isolados testados, sendo que a maioria apresentou suscetibilidade a todos os antibióticos testados. Esta observação sugere que, no momento da colheita, as superfícies analisadas não estavam colonizadas por populações multirresistentes, o que poderá refletir a eficácia das estratégias de controlo de infeções implementadas na instituição. No entanto é importante salientar que esta realidade pode ser dinâmica e sujeita a alterações ao longo do tempo, pelo que a vigilância contínua é fundamental.

A segunda fase do estudo centrou-se na avaliação da atividade antibacteriana de três desinfetantes amplamente utilizados na instituição. Esta avaliação foi inicialmente realizada nas estirpes de referência, tendo posteriormente sido estendida a alguns

isolados. Os valores de CMI obtidos não são passíveis de ser comparados com valores de referência acima ou abaixo dos quais se classifica em resistente ou suscetível. Contudo, valores de CMI baixos e próximos dos valores de CMI obtidos para estirpes suscetíveis de referência, permitem-nos concluir que não carregarão resistências ao desinfetante em questão. A eficácia ligeiramente inferior observada em alguns isolados ambientais, nomeadamente no isolado SB20 e SB22 relativamente ao hipoclorito de sódio quando comparada às estirpes de referência, poderá refletir adaptações fenotípicas adquiridas pela exposição contínua aos mesmos.

O estudo realizado por Rakshit e colaboradores (2024), reforça estas observações, onde foi demonstrado que microrganismos isolados em ambientes hospitalares podem desenvolver mecanismos complexos de resistência a desinfetantes, incluindo a formação de biofilmes e a expressão de genes específicos, que favorecem a sua sobrevivência em ambientes supostamente limpos.

Paralelamente, uma revisão realizada por Dhan e colaboradores (2022) enfatiza que a disseminação da resistência a desinfetantes e antibióticos é frequentemente mediada por elementos genéticos móveis, onde a co-seleção de resistência e a exposição simultânea a antibióticos e biocidas, constitui uma preocupação crescente em diversos ambientes.

A diversidade microbiana revelada pelos resultados é, de acordo com a literatura (Flores et al., 2011, Gilbert et al., 2018) comum em ambiente de elevada circulação de pessoas, como instituições de ensino e saúde. No entanto, deve ser salientado o potencial patogénico das espécies isoladas sendo, por isso, importante o reforço das práticas de higiene nestes locais.

Já a reduzida taxa de resistência antimicrobiana detetada poderá estar associada à correta adesão aos protocolos de desinfeção e ao uso racional de biocidas na instituição. No entanto, é importante reconhecer a capacidade adaptativa das bactérias e o seu potencial de adquirir resistência, sobretudo através da exposição prolongada a concentrações sub-inibitórias de desinfetantes e antibióticos. Assim, recomenda-se a implementação de um programa de monitorização microbiológica regular, que permita a deteção precoce de alterações nos perfis de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos e da composição da microbiota ambiental.

Entre as limitações do estudo destaca-se a limitação temporal, que restringiu a análise a um momento pontual e a um número limitado de superfícies. Para obter uma visão mais abrangente e representativa da dinâmica microbiológica do ambiente em

estudo, seria desejável a realização de amostragens periódicas ao longo do tempo, em diferentes horários e em áreas com diferentes níveis de uso. Além disso, a análise da eficácia dos desinfetantes deve, em estudos futuros, ser alargada a contextos mais desafiantes, incluindo a presença de matéria orgânica e biofilmes, uma vez que estas condições refletem melhor a realidade de ambiental e podem comprometer a ação dos biocidas.

Por fim, a crescente preocupação com o desenvolvimento de resistência a desinfetantes químicos, associada ao uso indiscriminado e contínuo destes agentes, reforça a importância de estratégias de desinfecção integradas e rotativas, baseadas na evidência científica e adaptadas às características microbiológicas do ambiente em questão.

## 5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que as superfícies analisadas da Egas Moniz School of Health & Science abrigam uma diversidade microbiana compatível com ambientes de elevada circulação de pessoas, incluindo microrganismos com potencial patogénico e perfis genéticos associados à resistência antimicrobiana.

A identificação definitiva de *Escherichia coli* e *Enterococcus faecium*, bem como a deteção de estafilococos coagulase-negativo carregando genes de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, evidencia a importância de uma vigilância microbiológica contínua e da utilização de métodos moleculares, como a qPCR, para confirmação da identidade e da resistência de estirpes isoladas. A deteção dos genes *mecA/mecC* e *SCCmec/orfX* em alguns isolados, sugere a circulação de estafilococos coagulase-negativo com mecanismos de resistência semelhantes aos do MRSA, o que pode representar um risco em contextos clínicos e académicos.

A análise dos perfis de suscetibilidade aos antibióticos revelou, no geral, uma baixa prevalência de resistência, o que é um dado encorajador e poderá refletir a eficácia das práticas de controlo de infeção implementadas na instituição. No entanto, a identificação de genes de resistência mesmo em estirpes não multirresistentes reforça a necessidade de precaução e monitorização regular, uma vez que a resistência pode emergir rapidamente mediante pressão seletiva.

Relativamente à eficácia dos desinfetantes, os resultados mostraram que os três produtos testados foram globalmente eficazes tanto em estirpes de referência como em isolados ambientais, com exceções pontuais que sugerem possível adaptação fenotípica. A ligeira redução da eficácia observada em alguns isolados ambientais — particularmente no caso do hipoclorito de sódio — destaca a importância de avaliar a atividade antimicrobiana dos desinfetantes em condições realistas, que incluam fatores como a presença de matéria orgânica e em biofilmes.

Assim, este trabalho evidencia a relevância da monitorização microbiológica ambiental como ferramenta de suporte às estratégias de prevenção e controlo de infeções. Além disso, a criação de uma coleção de isolados locais constitui um recurso valioso para estudos futuros, nomeadamente na avaliação contínua da eficácia de desinfetantes e na deteção precoce de alterações nos perfis de resistência. Para complementar e aprofundar os resultados agora obtidos, recomenda-se a realização de estudos longitudinais e experimentais mais abrangentes, que integrem variáveis ambientais e operacionais, bem

como a avaliação de metodologias de desinfecção alternativas ou combinadas. A adoção de abordagens baseadas na evidência científica é fundamental para assegurar a segurança microbiológica dos espaços institucionais e mitigar o risco de disseminação de microrganismos resistentes.

## 6. BIBLIOGRAFIA

Abreu, A. C., Tavares, R. R., Borges, A., Mergulhão, F., & Simões, M. (2013). Current and emergent strategies for disinfection of hospital environments. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(12), 2718–2732. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt281>

Azimi, S., Klementiev, A. D., Whiteley, M., & Diggle, S. P. (2020). Bacterial quorum sensing during infection. *Annual Review of Microbiology*, 74, 201–219. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-032020-010945>

Becker, K., Heilmann, C., & Peters, G. (2014). Coagulase-negative staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 870–926. <https://doi.org/10.1128/CMR.00109-13>

Charron, D. F., Thomas, M. K., Waltner-Toews, D., & Aramini, J. J. (2023). One Health: Interdependence of human, animal, and ecosystem health. In *One Health: The Theory and Practice of Integrated Health Approaches*.

Chen, B., Han, J., Dai, H., & Jia, P. (2021). Biocide-tolerance and antibiotic-resistance in community environments and risk of direct transfers to humans: Unintended consequences of community-wide surface disinfecting during COVID-19? *Environmental Pollution*, 283, 117074. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117074>

Chindera, K., Mahato, M., Kumar Sharma, A., Horsley, H., Kloc-Muniak, K., Kamaruzzaman, N. F., Kumar, S., McFarlane, A., Stach, J., Bentin, T., & Good, L. (2016). The antimicrobial polymer PHMB enters cells and selectively condenses bacterial chromosomes. *Scientific Reports*, 6, 23121. <https://doi.org/10.1038/srep23121>

Chitsaz, M., & Brown, M. H. (2017). The role played by drug efflux pumps in bacterial multidrug resistance. *Essays in Biochemistry*, 61(1), 127–139. <https://doi.org/10.1042/EBC20160064>

Daeschlein, G. (2013). Antimicrobial and antiseptic strategies in wound management. *International Wound Journal*, 10(S1), 9–14. <https://doi.org/10.1111/iwj.12175>

Destoumieux-Garzón, D., Mavingui, P., Boetsch, G., Boissier, J., Darriet, F., Duboz, P., Fritsch, C., Giraudoux, P., Roux, F. le, Morand, S., Paillard, C., Pontier, D., Sueur, C., & Voituron, Y. (2018). The One Health concept: 10 years old and a long road ahead. *Frontiers in Veterinary Science*, 5, 14. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00014>

Donaghy, J. A., Jagadeesan, B., Goodburn, K., Grunwald, L., Jensen, O. N., Jespers, A., Kanagachandran, K., Lafforgue, H., Seefelder, W., & Quentin, M. C. (2019). Relationship of sanitizers, disinfectants, and cleaning agents with antimicrobial resistance. *Journal of Food Protection*, 82(5), 889–902. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-373>

Ellwanger, J. H., Byrne, L. B., & Chies, J. A. B. (2022). Examining the paradox of urban disease ecology by linking the perspectives of Urban One Health and Ecology with Cities. *Urban Ecosystems*, 25(6), 1735–1744. <https://doi.org/10.1007/s11252-022-01260-5>

Erkyihun, G. A., & Alemayehu, M. B. (2022). One Health approach for the control of zoonotic diseases. *Zoonoses*, 2(1), 1–10. <https://doi.org/10.15212/ZOONOSES-2022-0037>

Fernandes, S., Gomes, I. B., & Simões, M. (2023). Antimicrobial and antibiofilm potentiation by a triple combination of dual biocides and a phytochemical with complementary activity. *Food Research International*, 167, 112680. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112680>

Flores, G. E., Bates, S. T., Knights, D., Lauber, C. L., Stombaugh, J., Knight, R., & Fierer, N. (2011). Microbial biogeography of public restroom surfaces. *PLoS ONE*, 6(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028132>

Frank, K. L., del Pozo, J. L., & Patel, R. (2008). From clinical microbiology to infection pathogenesis: How daring to be different works for *Staphylococcus lugdunensis*. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 21, Issue 1, pp. 111–133). <https://doi.org/10.1128/CMR.00036-07>

Ghanem, M. M., & Haddadin, R. N. (2018). Multiple drug resistance and biocide resistance in *Escherichia coli* environmental isolates from hospital and household settings. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 7(1), 47. <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0339-8>

Gilbert, J.A., Stephens, B. Microbiology of the built environment. *Nat Rev Microbiol* 16, 661–670 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0065-5>

Hernando-Amado, S., Coque, T. M., Baquero, F., & Martínez, J. L. (2019). Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nature Microbiology*, 4(9), 1432–1442. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0503-9>

Iñiguez-Moreno, M., Gutiérrez-Lomelí, M., & Avila-Novoa, M. G. (2021). Removal of mixed-species biofilms developed on food contact surfaces with a mixture of enzymes and chemical agents. *Antibiotics*, 10(8), 931. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10080931>

Irie, Y., Borlee, B. R., O'Connor, J. R., Hill, P. J., Harwood, C. S., Wozniak, D. J., & Parsek, M. R. (2012). Self-produced exopolysaccharide is a signal that stimulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(50), 20632–20636. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217993109>

Ishak, A., Mazonakis, N., Spernovasilis, N., Akinosoglou, K., & Tsioutis, C. (2025). Bactericidal versus bacteriostatic antibacterials: Clinical significance, differences and synergistic potential in clinical practice. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 80(1), 1–17. <https://doi.org/10.1093/jac/dkae380>

Jones, I. A., & Joshi, L. T. (2021). Biocide use in the antimicrobial era: A review. *Molecules*, 26(8). <https://doi.org/10.3390/molecules26082276>

Khan, S., Beattie, T. K., & Knapp, C. W. (2016). Relationship between antibiotic and disinfectant-resistance profiles in bacteria harvested from tap water. *Chemosphere*, 152, 132–141. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.086>

Kurenbach, B., Marjoshi, D., Amábile-Cuevas, C. F., Ferguson, G. C., Godsoe, W., Gibson, P., & Heinemann, J. A. (2015). Sublethal exposure to commercial formulations of the herbicides dicamba, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, and glyphosate cause changes in antibiotic susceptibility in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *mBio*, *6*(2), e00009-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.00009-15>

Lerminiaux, N. A., & Cameron, A. D. S. (2019). Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian Journal of Microbiology*, *65*(1), 34–44. <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0275>

Lin, W., Yuan, D., Deng, Z., Niu, B., & Chen, Q. (2019). The cellular and molecular mechanism of glutaraldehyde-didecyldimethylammonium bromide as a disinfectant against *Candida albicans*. *Journal of Applied Microbiology*, *126*(1), 102–112. <https://doi.org/10.1111/jam.14142>

Maillard, J.-Y., & Centeleghe, I. (2023). How biofilm changes our understanding of cleaning and disinfection. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, *12*(1), 64. <https://doi.org/10.1186/s13756-023-01290-4>

McCarlie, S., Boucher, C. E., & Bragg, R. R. (2020). Molecular basis of bacterial disinfectant resistance. *Drug Resistance Updates*, *48*, 100672. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2019.100672>

McDonnell, G. E., & Russell, A. D. (1999). Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, *12*(1), 147–179. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.1.147>

McEwen, S. A., & Collignon, P. J. (2018). Antimicrobial resistance: A One Health perspective. *Microbiology Spectrum*, *6*(2), ARBA-0009-2017. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017>

McDonnell, G. E. (2017). *Antisepsis, disinfection, and sterilization: Types, action, and resistance* (2nd ed.).

Nhung, N. T., Thuy, C. T., Trung, N. V., Campbell, J., Baker, S., Thwaites, G., Hoa, N. T., & Carrique-Mas, J. (2015). Induction of antimicrobial resistance in *Escherichia*

*coli* and non-typhoidal *Salmonella* strains after adaptation to disinfectant commonly used on farms in Vietnam. *Antibiotics*, 4(4), 480–494. <https://doi.org/10.3390/antibiotics4040480>

Ni, B., Zhang, T., Cai, T., Xiang, Q., & Zhu, D. (2024). Effects of heavy metal and disinfectant on antibiotic resistance genes and virulence factor genes in the plastsphere from diverse soil ecosystems. *Journal of Hazardous Materials*, 465, 133335. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.133335>

Rakshit, P., Singh, A., Singh, R., & Banerjee, T. (2024). An in-depth study on survival mechanism of bacterial isolates in disinfectants within the hospital environment. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14, 1442914. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1442914>

Rosman, P. S., Elangovan, T., Wan Anuar, W. N. H., & Hasmi, N. A. (2021). Biocide resistance. *Journal of Advanced Research in Applied Sciences and Engineering Technology*, 24(1), 63–67. <https://doi.org/10.37934/araset.24.1.6367>

Rozman, U., Duh, D., Cimerman, M., & Turk, S. Š. (2022). Hygiene of medical devices and minimum inhibitory concentrations for alcohol-based and QAC disinfectants among isolates from physical therapy departments. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(22), 14690. <https://doi.org/10.3390/ijerph192214690>

Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D. M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P. S., & Bjarnsholt, T. (2022). The biofilm life cycle: Expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology*, 20(10), 608–620. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>

Simões, L. C., Lemos, M., Pereira, A. M., Abreu, A. C., Saavedra, M. J., & Simões, M. (2011). Persister cells in a biofilm treated with a biocide. *Biofouling*, 27(4), 403–411. <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.579599>

Stewart, P. S. (2015). Antimicrobial tolerance in biofilms. *Microbiology Spectrum*, 3(3), MB-0010-2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0010-2014>

Wang, Y., Wang, Y., Sun, L., Grenier, D., & Yi, L. (2018). *Streptococcus suis* biofilm: Regulation, drug-resistance mechanisms, and disinfection strategies. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(21), 9121–9129. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9356-z>

World Bank. (2019). *Pulling together to beat superbugs: Knowledge and implementation gaps in addressing antimicrobial resistance*. <https://www.worldbank.org/en/topic/agriculture/publication/pulling-together-to-beat-superbugs-knowledge-and-implementation-gaps-in-addressing-antimicrobial-resistance>

You, R., Margenat, A., Lanzas, C. S., Cañameras, N., Carazo, N., Navarro-Martín, L., Matamoros, V., Bayona, J. M., & Díez, S. (2020). Dose effect of Zn and Cu in sludge-amended soils on vegetable uptake of trace elements, antibiotics, and antibiotic resistance genes: Human health implications. *Environmental Research*, 191, 109879. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109879>

World Health Organization. (2023). *One Health*. Retrieved July 2, 2025, from <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/one-health>


Zeng, J., Li, Y., Jin, G., Su, J.-Q., & Yao, H. (2022). Short-term benzalkonium chloride (C12) exposure induced the occurrence of wide-spectrum antibiotic resistance in agricultural soils. *Environmental Science & Technology*, 56(21), 15054–15063. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c04730>

Zhang, F., & Cheng, W. (2022). The mechanism of bacterial resistance and potential bacteriostatic strategies. *Antibiotics*, 11(9), 1215. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11091215>

Zhao, X., Yu, Z., & Ding, T. (2020). Quorum-sensing regulation of antimicrobial resistance in bacteria. *Microorganisms*, 8(3), 425. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030425>

7. ANEXOS


Poster apresentado no “7th Egas Moniz International Scientific Congress”, 2 de Julho de 2025.



EGAS MONIZ  
INTERNATIONAL  
SCIENTIFIC  
CONGRESS  
JULY 2-4<sup>th</sup> 2025

EGAS MONIZ SCHOOL  
OF HEALTH & SCIENCE

## Isolation and characterization of environmental bacteria and susceptibility testing to disinfectants



**Maria Lourenço<sup>1\*</sup>, Laura Piedade<sup>1</sup>, Lucinda J. Bessa<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> Instituto Universitário Egas Moniz, Egas Moniz School of Health & Science, Almada, Portugal \*(MIFC - estudante)  
<sup>2</sup> Egas Moniz Research for Interdisciplinary Research (CiEM), Egas Moniz School of Health & Science, Almada, Portugal

\*Junior Research Fellowship awardee 2023  
 marialourenco09@hotmail.com

INTRODUCTION

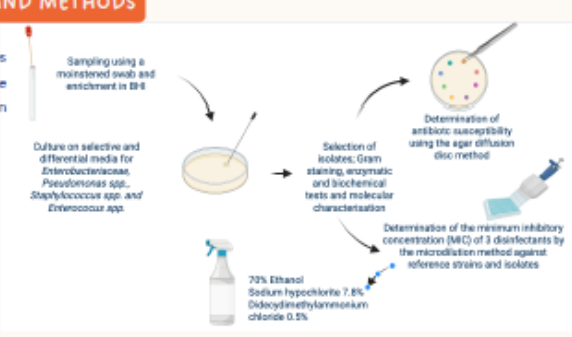
- The use of disinfectants on surfaces is crucial for controlling infections and preventing the spread of pathogens in various environments [1]
- Inappropriate or excessive use of disinfectants can promote antibiotic resistance, promoting the spread of resistant bacteria and increasing the risk of infections [1,2]

AIMS

1. Sampling surfaces at Egas Moniz School of Health & Science to isolate bacterial species and determine their antibiotic resistance profiles
2. Evaluate the antibacterial activity of three disinfectants used in the institution

MATERIALS AND METHODS

• The scheme illustrates the workflow and the methodology used in this study



RESULTS

- A total of 24 isolates were obtained, including strains of presumptive *E. coli* (n = 3), *P. aeruginosa* (n = 2), *Staphylococcus* spp. (n = 12; four of which were coagulase-negative) and *Enterococcus* spp. (n = 7)
- Definitive identification of selected isolates using the API biochemical gallery confirmed three as *Escherichia coli* and two as *Enterococcus faecium*; identification of the remaining isolates is ongoing
- A low level of antibiotic resistance was observed across isolates, with no multidrug-resistant strains detected (Figure 1)

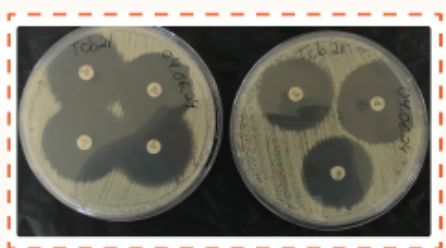


Figure 1. Representative image of the agar diffusion disc results for isolate Tcb21. The isolate was susceptible to all antibiotics tested.

- The antibacterial activity of 70% ethanol, 7% sodium hypochlorite, and 0.5% didecylmethylammonium chloride was evaluated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) against both reference strains and environmental isolates (Table 1)

REFERENCES

[1] Jones IA, Joshi LT. (2021). Biocide Use in the Antimicrobial Era: A Review. *Molecules*, 26(8):2276. doi: 10.3390/molecules26082276.  
 [2] Ambrozinio A, Pironti C, Dell'Annunziata F, Giugliano R, Chianese A, Nocco G, DeCaro F, Galdero M, Franci G, Motta O. (2022). Investigation of biocidal efficacy of commercial disinfectants used in public, private and workplaces during the pandemic event of SARS-CoV-2. *Sci. Rep.*, 12(1):5408. doi: 10.1038/s41598-022-09575-1

Table 1. Antibacterial activity (minimum inhibitory concentration - MIC) of 3 disinfectants against *S. aureus* ATCC 6538 and *E. coli* ATCC 11105 and against some isolates.


Disinfectants	MIC values (mg/mL)				
	<i>E. coli</i> ATCC 11105	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	Isolate Sctb1	Isolate SB20	Isolate SB22
Ethanol 70%	200	100-200	50	>200	>200
Sodium hypochlorite 7.8%	0,0062	0,08	0,0062	0,08	0,08
Didecylmethylammonium chloride 0.5%	0,0031	0,0016	0,0031	0,00098	0,00049

- The isolates *E. coli* Sctb1 and *Staphylococcus* coagulase-negative (SB20 and SB22) showed susceptibility to the disinfectants comparable to that of reference strains, suggesting no evidence of resistance to these agents (Table 1)

CONCLUSION


- Some species were potentially pathogenic, such as *E. coli* and *E. faecium*
- Most isolates were sensitive to the antibiotics and disinfectants tested
- Small variations in the efficacy of disinfectants indicate possible bacterial adaptations
- Despite the limitations, the study highlights the importance of microbiological surveillance and rotation in the use of disinfectants


Poster apresentado nas V Jornadas Científicas Egas Moniz 2024.



JORNADAS  
CIENTÍFICAS  
EGAS MONIZ

## Caracterização de isolados bacterianos ambientais e avaliação da eficácia de desinfetantes





EGAS MONIZ  
SCHOOL of  
HEALTH &  
SCIENCE

Maria Lourenço<sup>1</sup>, Carina Alves<sup>2</sup>, Lucinda J. Bessa<sup>1,3</sup>  
<sup>1</sup> Instituto Universitário Egas Moniz, Egas Moniz School of Health & Science, Almada, Portugal (MICF - estudante)  
<sup>2</sup> Instituto Politécnico da Guarda, Guarda, Portugal  
<sup>3</sup> Egas Moniz Research for Interdisciplinary Research (CiEM), Egas Moniz School of Health & Science, Almada, Portugal

**A. Introdução**

- A utilização de desinfetantes em superfícies é crucial para o controlo de infeções e a prevenção da disseminação de agentes patogénicos em diversos ambientes [1].
- O uso inadequado ou excessivo de desinfetantes pode promover a resistência bacteriana, facilitando a propagação de microrganismos resistentes e aumentando o risco de infeções [1,2].

**B. Objectivos**

- Colheita amostras de superfícies da Egas Moniz School of Health & Science para isolar espécies bacterianas e determinar os seus perfis de resistência a antibióticos;
- Avaliação da atividade antibacteriana de três desinfetantes utilizados na instituição.

**C. Materiais e métodos**

Colheita de amostras através de zaragatoa humedecida e enriquecimento em BHI

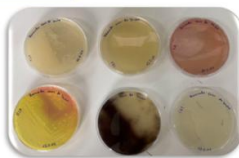
Sementeira em meios seletivos e diferenciais para *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas spp.*, *Staphylococcus spp.* e *Enterococcus spp.* (Figura 1)

Seleção de isolados; coloração de Gram e testes enzimáticos e bioquímicos

Determinação da suscetibilidade aos antibióticos pelo método de disco por difusão em agar

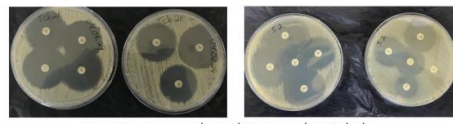
Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de 3 desinfetantes pelo método de microdiluição contra estirpes de referência, e posteriormente, será determinada contra os isolados previamente obtidos

**D. Resultados**



**Figura 1.** Imagem representativa do crescimento bacteriano de isolados em meios seletivos e diferenciais.

- Identificação presuntiva de *Staphylococcus spp.* coagulase- negativo (n=5), *Enterococcus spp.* (n=4), e *Escherichia coli* (n=2). Está a decorrer a identificação da espécie através de testes bioquímicos. Tendo já sido feita a identificação definitiva de 2 isolados de *E. coli* e de 1 de *Enterococcus faecium*.
- O perfil de suscetibilidade dos isolados aos antibióticos mostrou que a maioria dos isolados não apresenta resistência a nenhum dos antibióticos testados (Figura 2). Apenas resistência ao Sulfametoxazol+Trimetoprim foi encontrada em 3 isolados e à Ampicilina em 2.



**Figura 2.** Imagens do antibiograma de 2 isolados

- Os valores de CMI de três desinfetantes, etanol a 70%, hipoclorito de sódio a 7% e cloreto de didecildimetilamónio 0,5%, foram já obtidos contra duas estirpes de referência (Tabela 1).

**Tabela 1.** Atividade antibacteriana (valores de concentração mínima inibitória - CMI) de 3 desinfetantes contra *S. aureus* ATCC 6538 e *E. coli* ATCC 11105.

Desinfetante	Valor de CMI (mg/mL)	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Etanol 70%	100-200	200
Hipoclorito de sódio 7,8%	0,08	0,0062
Cloreto de didecildimetilamónio 0,5%	0,0016	0,0031

**F. Conclusão**

- O estudo em curso representa um passo importante na compreensão do perfil de resistência de isolados ambientais aos desinfetantes comumente utilizados.
- A continuidade da obtenção e análise de isolados adicionais fortalecerá significativamente a base de dados, permitindo uma avaliação mais robusta e abrangente da suscetibilidade bacteriana aos agentes desinfetantes testados.

**Referências Bibliográficas:**

[1] Jones IA, Joshi LT. (2021). Biocide Use in the Antimicrobial Era: A Review. *Molecules*, 26(8):2276. doi: 10.3390/molecules26082276.

[2] Ambrosino A, Pironti C, Dell'Annunziata F, Giugliano R, Chianese A, Moccia G, DeCaro F, Galdiero M, Franci G, Motta O. (2022). Investigation of biocidal efficacy of commercial disinfectants used in public, private and workplaces during the pandemic event of SARS-CoV-2. *Scientific Reports*, 12(1):5468. doi: 10.1038/s41598-022-09575-1.

**Agradecimento:**  
Os autores agradecem a FCT/MCTES pelo apoio financeiro ao CiEM (DOI 10.54499/2022.01430.PTDC) por meio de fundos nacionais.

